

### 【基础研究】

与病死率在我国呈逐年上升趋势,是导致中国民众乃至全世界人群恶性肿瘤死亡的重要因素之一<sup>[1]</sup>。Survivin 是近年来新研究发现的凋亡抑制基因,具有调控细胞周期和抑制细胞凋亡的双重作用<sup>[2]</sup>,高表达于人类多数肿瘤组织中,并参与肿瘤的发生、发展

及预后,而在健康成人组织中表达较低甚至不表达<sup>[3-4]</sup>,已成为目前肿瘤靶向基因治疗的研究热点。本研究利用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术特异性沉默 survivin 基因,并通过裸鼠移植瘤模型分析抑制 survivin 表达对食管癌 Eca-109 细胞体内生长增殖的影响,以期对临床食管癌患者靶向基因治疗提供理论基础。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞及动物** 人食管癌 Eca-109 细胞购自上海细胞生物研究所;无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 4~6 周龄雌性 BALB/c 裸鼠 18 只,购自中国科学院上海实验动物中心,随机分为空白对照组、阴性对照组和干扰组,每组 6 只。

**1.2 主要试剂及仪器** RPMI1640 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;干扰载体 pRNAT-U6.1/Neo[含绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)编码序列]购自美国 Genscript 公司;Lipofectamine™ 2000 和转染试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;限制性内切酶 *Bam*H1 和 *Hind*Ⅲ 购自大连 TaKaRa 公司;稳定转染抗性筛选试剂 G418 购自美国 Inalco 公司;脱脂奶粉购自中国伊利公司;鼠抗人 survivin 一抗、兔抗鼠二抗及内参  $\beta$ -actin 抗体均购自美国 Santa Cruze 公司;增强型化学发光(enhanced chemical luminescence, ECL)试剂盒购自美国 Pierce 公司;微分干涉差(differential interference contrast microscope, DIC)显微镜和倒置荧光显微镜均购自日本 Olympus 公司;末端脱氧核苷酸转移酶介导的脱氧尿苷三磷酸缺口末端标记技术(terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒购自武汉博士德公司。

**1.3 细胞培养** 人食管癌 Eca-109 细胞常规培养于含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,置于 37℃ 含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内,待细胞生长融合度达 70%~80% 时,以 2.5 g·L<sup>-1</sup> 胰蛋白酶消化液进行消化与传代。

**1.4 靶向 survivin 的寡核苷酸序列的设计** 利用生物信息学预测软件,针对 survivin 基因 487~505 bp 的靶点设计 2 条互补 DNA 链,序列分别为:5'-GATCCAGAATTTGAGGAACTGCGCTGTGAAGC-CACAGATGGCGCAGTTTCCTCAAATTCCTTTTTTA-3'和 3'-GTCTTAAACTCCTTTGACGCGACACTTCGGTG-TCTACCCGCGTCAAAGGAGTTTAAGAAAAAATTCGA-5',2 条 DNA 链的结构均为 *Bam*H1 酶切点+正义序列+茎环序列+反义序列+转录终止子+*Hind*Ⅲ 酶

切点,在细胞内形成“发夹结构”。

**1.5 真核表达干扰质粒构建** 载体 pRNAT-U6.1/Neo 经 *Hind*Ⅲ 和 *Bam*H1 双酶切后与已合成的靶向 survivin 的寡核苷酸链退火后连接,即得到针对 survivin 的小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)真核表达干扰质粒 pRNAT-siRNA-survivin;同法构建阴性对照质粒 pRNAT-siRNA-control。

**1.6 细胞稳定转染** 待 Eca-109 细胞达对数生长期即细胞生长融合度达 90% 时,按转染试剂盒说明将干扰质粒 pRNAT-siRNA-survivin 和阴性对照质粒 pRNAT-siRNA-control 分别转染至 Eca-109 细胞,48 h 后用 G418 进行抗性筛选 2~3 周,得到稳定的细胞克隆,扩大培养,即为稳定转染细胞系,分别命名为 Eca-109/si-survivin(干扰组)和 Eca-109/si-control(阴性对照组)。

**1.7 Western blot 检测 survivin 基因沉默效果** 将对数生长期的干扰组、阴性对照组及空白对照组 Eca-109 细胞按蛋白抽提要求进行处理,取各组细胞 50  $\mu$ g 总蛋白进行十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),随后将分离的蛋白质用半干石墨电转移 1.5 h 至硝酸纤维素膜上,再在室温摇床上用 1×磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)配制的 50 g·L<sup>-1</sup> 脱脂奶粉封闭 1 h,加鼠抗人 survivin 一抗(1:300),4℃ 摇床孵育过夜, PBS 洗膜 3 次,再加入兔抗鼠二抗(1:2 000),室温孵育 1.5 h,再用 PBS 洗膜 3 次,最后 ECL 化学发光检测,以  $\beta$ -actin 作为内参,结果通过灰度扫描从蛋白水平对比观察各组细胞 survivin 的不同表达。实验重复 3 次。

**1.8 裸鼠移植瘤模型的构建** 取对数生长期的干扰组、阴性对照组及空白对照组 Eca-109 细胞,胰蛋白酶消化收集于离心管中,室温 1 000~1 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,然后用无血清培养液清洗细胞沉淀 2 遍,按要求继续离心,再加入适量无血清培养液充分重悬细胞沉淀,制成单细胞悬液并进行细胞计数,然后用带 6 号针头的注射器抽取 0.2 mL(含 1×10<sup>7</sup> 个活细胞)细胞悬液接种于裸鼠腋部皮下,每组 6 只,接种后定期观察记录裸鼠体内肿瘤的生长情况,4 周后终止实验,颈椎脱臼法处死小鼠取瘤结节测质量,结果取平均值,进行统计学分析;然后取干扰组和阴性对照组捣碎的移植瘤组织,分别置于倒置荧光显微镜和 DIC 显微镜下,对比观察裸鼠移植瘤模型构建情况。

**1.9 TUNEL 法检测移植瘤组织细胞凋亡** 按 TUNEL 法实验操作说明对裸鼠移植瘤组织石蜡切

片进行原位细胞凋亡检测,取各组标本 6 张,显微镜下观察细胞凋亡变化,其中细胞核染色为棕黄色者为阳性凋亡细胞,计数 5 个高倍视野,每个视野计数 200 个细胞,计算阳性凋亡细胞所占的百分数即为移植瘤细胞凋亡指数 (apoptotic index, AI)。

**1.10 统计学处理** 应用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,进行多组间单因素方差分析,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

**2.1 稳定转染细胞株的筛选** 转染真核表达质粒 pRNAT-siRNA-survivin 的 Eca-109 细胞,经不同质量浓度培养液 G418 抗性筛选,在荧光显微镜下形成带有绿色荧光蛋白 GFP 的阳性克隆 (图 1)。

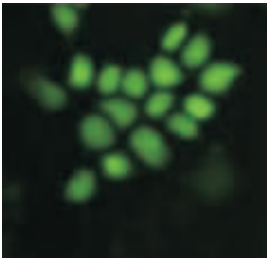
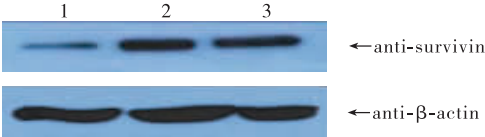


图 1 稳定转染 pRNAT-siRNA-survivin 质粒的 Eca-109 细胞形成的阳性克隆 (×200)

Fig.1 Positive clone of Eca-109 cells formed by stable transfection of pRNAT-siRNA-survivin (×200)

**2.2 Western blot 检测干扰后 survivin 蛋白的表达** 以  $\beta$ -actin 为内参,灰度扫描结果显示干扰组、阴性对照组及空白对照组细胞 survivin 蛋白表达分别为  $18.75 \pm 3.10$ 、 $44.17 \pm 3.15$  和  $46.20 \pm 2.62$ ,干扰组细胞 survivin 蛋白表达水平显著低于阴性对照组和空白对照组 ( $P < 0.05$ );而阴性对照组细胞 survivin 蛋白表达与空白对照组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图 2)。



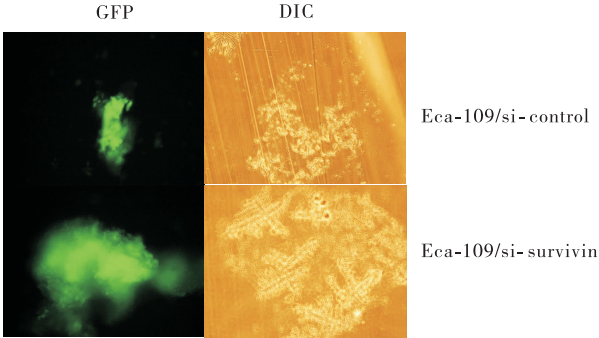
1: 干扰组; 2: 阴性对照组; 3: 空白对照组。

图 2 Western blot 检测各组细胞 survivin 蛋白的表达  
Fig.2 Expression level of survivin protein in each group by Western blot

**2.3 裸鼠移植瘤模型的成功构建** 对比观察荧光显微镜和 DIC 显微镜下捣碎的移植瘤组织,结果显示 GFP 绿色荧光,证实实验中成功构建了裸鼠移植瘤模型 (图 3)。

**2.4 3 组裸鼠平均瘤结节质量比较** 空白对照组、

阴性对照组、干扰组裸鼠平均瘤结节质量分别为  $(0.87 \pm 0.24)$ 、 $(0.82 \pm 0.12)$ 、 $(0.35 \pm 0.20)$  g,干扰组裸鼠平均瘤结节质量显著低于阴性对照组和空白对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );阴性对照组与空白对照组裸鼠的平均瘤结节质量比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。



GFP:倒置荧光显微镜下的移植瘤组织;DIC:微分干涉差显微镜下的移植瘤组织。

图 3 裸鼠移植瘤模型的成功构建

Fig.3 Successful construction of the models of transplanted tumors in nude mice

**2.5 3 组裸鼠移植瘤细胞凋亡的检测** 干扰组、阴性对照组及空白对照组裸鼠移植瘤细胞 AI 分别为  $11.25 \pm 2.05$ 、 $4.95 \pm 1.35$  和  $5.86 \pm 1.45$ ,干扰组裸鼠移植瘤细胞 AI 明显高于阴性对照组和空白对照组 ( $P < 0.05$ ),而阴性对照组与空白对照组裸鼠移植瘤细胞 AI 比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

3 讨论

Survivin 为近年来新发现的凋亡抑制基因,具有抑制细胞凋亡的重要生理功能,并参与促进细胞有丝分裂和促进血管的形成<sup>[5-6]</sup>。有研究表明,survivin 基因高表达于人类绝大多数肿瘤组织尤其是恶性肿瘤组织中,而在成年分化成熟组织和癌旁组织中低表达甚至不表达<sup>[7]</sup>,通过抑制肿瘤组织内源性 survivin 的表达,还能明显诱导肿瘤细胞的凋亡,抑制肿瘤细胞的生长增殖,进而干扰肿瘤的生长。因此,survivin 基因很可能与肿瘤的发生、发展甚至预后密切相关。有研究显示,survivin 基因在食管癌组织中的表达水平显著高于邻近正常食管组织,可能作为一种肿瘤癌基因参与食管癌的发生、发展及转移等病理生理过程<sup>[8-9]</sup>。因此,survivin 很可能成为食管癌基因治疗的理想靶点,从而为食管癌患者临床基因治疗开辟新的路径。

RNAi 技术是近年来研究哺乳动物细胞基因功能的核心工具,是由双链 RNA 介导的特异性抑制同源基因表达的技术,具有高度专一性,可产生转录后

特定基因沉默的效果;目前 RNAi 技术已广泛应用于生物工程学、医学及药学研究等众多领域中,为临床众多包括食管癌在内的恶性肿瘤患者开辟了靶向基因治疗的新路径。

本研究中利用靶向 survivin 基因的真核表达质粒 pRNAT-siRNA-survivin 成功转染食管癌 Eca-109 细胞,结果显示,干扰组细胞 survivin 蛋白表达水平显著低于阴性对照组和空白对照组,镜下观察显示裸鼠移植瘤模型构建成功,干扰组裸鼠平均瘤结节质量显著低于阴性对照组和空白对照组,说明沉默 survivin 基因表达能抑制体内肿瘤细胞增殖,延缓肿瘤组织的生长;移植瘤细胞 AI 检测显示,干扰组裸鼠移植瘤细胞 AI 明显高于阴性对照组和空白对照组,说明干扰 survivin 基因表达能诱导食管癌 Eca-109 细胞的体内凋亡,与 survivin 基因的重要抗凋亡作用相一致。

综上所述,本研究证实了靶向 survivin 的 siRNA 能特异性沉默 survivin 基因表达,诱导细胞凋亡,进而抑制人食管癌 Eca-109 细胞的体内增殖,为临床食管癌患者的靶向基因治疗提供了新思路。

参考文献:

[1] 孟祥丽,李伟伟,崔艳慧,等.二甲双胍对顺铂治疗食管鳞癌的

增敏作用[J].新乡医学院学报,2014,31(4):253-255.

[2] 张朝霞,刘子勤,陈燕飞,等.小分子干扰 RNA 对肝癌细胞株 MHCC-97H 增殖和凋亡及 Survivin 表达的影响[J].中华实用儿科临床杂志,2015,30(9):707-710.

[3] ENDO T, ABE S, SEIDLAR H B, et al. Expression of IAP family proteins in colon cancers from patients with different age groups [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(9):770-776.

[4] ALTIERI D C. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(1):61-70.

[5] 胡梦泽,师晓东,王天有,等.小干扰 RNA 沉默 survivin 基因表达对肿瘤细胞 A549、Hela S3 和 K562 的影响及小干扰 RNA 序列的筛选[J].中华实用儿科临床杂志,2014,29(3):194-198.

[6] 杨丹,余德立,余资江.复方五花血藤对鼠视网膜缺血再灌注损伤的保护作用[J].眼科新进展,2014,34(8):713-717.

[7] YANG L, ZHU H J, LIU D X, et al. Aspirin suppresses growth of human gastric carcinoma cell by inhibiting survivin expression[J]. *J Biomed Res*, 2011, 25(4):246-253.

[8] BONGIOVANNI L, D'ANDREA A, ROMANUCCI M, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition: immunohistochemical investigation of related molecules in canine cutaneous epithelial tumours[J]. *Vet Dermatol*, 2013, 24(1):195-203.

[9] HAFEEZ B B, ZHONG W, FISCHER J W, et al. Plumbagin, a medicinal plant (Plumbago zeylanica)-derived 1,4-naphthoquinone, inhibits growth and metastasis of human prostate cancer PC-3M-luciferase cells in an orthotopic xenograft mouse model[J]. *Mol Oncol*, 2013, 7(3):428-439.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:杨 博)

(上接第 351 页)

[21] VERMA R K, YU W, SINGH S P, et al. Anthothecol-encapsulated PLGA nanoparticles inhibit pancreatic cancer stem cell growth by modulating sonic hedgehog pathway[J]. *Nanomedicine*, 2015, 11(8):2061-2070.

[22] DAS J, DAS S, PAUL A, et al. Assessment of drug delivery and anticancer potentials of nanoparticles-loaded siRNA targeting STAT3 in lung cancer, *in vitro* and *in vivo* [J]. *Toxicol Lett*, 2014, 225(3):454-466.

[23] GONÇALVES C, BERCHEL M, GOSSELIN M P, et al. Lipopolyplexes comprising imidazole/imidazolium lipophosphoramidate, histidinylated polyethyleneimine and siRNA as efficient formulation for siRNA transfection[J]. *Int J Pharm*, 2014, 406(1/2):264-272.

[24] JEON S Y, PARK J S, YANG H N, et al. Co-delivery of SOX9 genes and anti-Cbfa-1 siRNA coated onto PLGA nanoparticles for chondrogenesis of human MSCs[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(17):4413-4423.

[25] PATIL Y B, SWAMINATHAN S K, SADHUKHA T, et al. The use of nanoparticle-mediated targeted gene silencing and drug delivery to overcome tumor drug resistance [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(2):358-365.

[26] PARK J S, YANG H N, JEON S Y, et al. The use of anti-COX2 siRNA coated onto PLGA nanoparticles loading dexamethasone in the treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Biomaterials*, 2012, 33

(33):8600-8612.

[27] XU Q, XIA Y, WANG C H, et al. Monodisperse double-walled microspheres loaded with chitosan-p53 nanoparticles and doxorubicin for combined gene therapy and chemotherapy[J]. *J Control Release*, 2012, 163(2):130-135.

[28] WANG H, WU Y, ZHAO R, et al. Engineering the assemblies of biomaterial nanocarriers for delivery of multiple theranostic agents with enhanced antitumor efficacy[J]. *Adv Mater*, 2013, 25(11):1616-1622.

[29] 郑明彬,赵鹏飞,罗震宇,等.纳米技术在癌症诊疗一体化中的应用[J].科学通报,2014,59(31):3009-3024.

[30] FANG K, SONG L, GU Z, et al. Magnetic field activated drug release system based on magnetic PLGA microspheres for chemothermal therapy[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, 136:712-720.

[31] DAS M, DUAN W, SAHOO S K. Multifunctional nanoparticle-EpCAM aptamer bioconjugates: a paradigm for targeted drug delivery and imaging in cancer therapy[J]. *Nanomedicine*, 2015, 11(2):379-389.

[32] CARMEN I, ANTONIO C, ANNALISA P, et al. Enhancing photothermal cancer therapy by clustering gold nanoparticles into spherical polymeric nanoconstructs [J]. *Optics Lasers Engineering*, 2016, 76(1):74-81.

(本文编辑:孟 月)