

[文章编号] 1000-1182(2009)04-0433-03

· 专栏论著 ·

## 生存素小干扰RNA对人腺样囊性癌ACC-2 细胞移植瘤体生长的抑制作用

杨军 汪欣 许波 熊宇

(第三军医大学西南医院 口腔科, 重庆 400038)

**[摘要]** 目的 观察生存素(Survivin)小干扰RNA(siRNA)在体内是否能抑制腺样囊性癌移植瘤体的生长。方法 裸鼠体内注射稳定转染靶向Survivin基因的shRNA真核表达载体pGenesil-shRNA-Survivin后的人腺样囊性癌细胞株ACC-2, 观察移植肿瘤生长情况, 以空白对照组及阴性质粒对照组作为对照。处死裸鼠后测量移植瘤体积; 采用苏木精-伊红染色病理证实移植瘤后, 免疫组织化学法检测移植瘤的Survivin蛋白表达情况, 半定量RT-PCR检测Survivin mRNA表达情况。结果 处死裸鼠后测量移植瘤体积表明, pGenesil-shRNA-Survivin组移植瘤体积明显减小; 其Survivin mRNA及蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ )。结论 siRNA能在体内明显抑制腺样囊性癌Survivin的表达, Survivin siRNA能有效抑制腺样囊性癌裸鼠体内移植瘤的生长。

**[关键词]** RNA干扰; 小发夹结构RNA; 腺样囊性癌

**[中图分类号]** R 739.8 **[文献标志码]** A

**Survivin small interfering RNA suppresses the growth of adenoid cystic carcinoma cell xenografts in vivo**  
YANG Jun, WANG Xin, XU Bo, XIONG Yu. (Dept. of Stomatology, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of stable transfection of small hairpin RNA(shRNA) targeting Survivin gene on the growth of adenoid cystic carcinoma(ACC) xenografts in nude mice. **Methods** Adenoid cystic carcinoma cell-2 line(ACC-2) was transfected with Survivin targeting shRNA eukaryotic expression vector, and stable monoclonal cells were selected. Transfected and nontransfected cells were respectively inoculated into subcutaneous tissue of nude mice as experimental and controls. Survivin mRNA expression of transfected and nontransfected cells were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR). Survivin protein expression of tumors was investigated by immunohistochemistry. The growth of xenograft tumors was observed by measurement of tumor volume. **Results** Compared to controls, the expression of tumor volume decreased in transfected group by pGenesil-shRNA-Survivin. The expression of Survivin mRNA and protein was obviously reduced. **Conclusion** Survivin siRNA markedly suppressed the growth of adenoid cystic carcinoma cell xenografts in nude mice through lastingly inhibition effect on Survivin.

**[Key words]** RNA interference; short hairpin RNA; adenoid cystic carcinoma

生存素(Survivin)是凋亡抑制蛋白家族成员, 通过抑制凋亡, 参与细胞分裂, 促进新生血管形成等途径影响肿瘤的生物行为, 是很有价值的基因治疗靶点<sup>[1-2]</sup>。RNA干扰技术是目前最有效的转录后基因沉默的方法之一, 其本质是一种双链RNA(double stranded RNA, dsRNA)分子在mRNA水平上关闭相应序列基因的表达或使其沉默的过程, 也就是序列特异性的转录后基因沉默(post transcriptional gene

silencing, PTGS)<sup>[3]</sup>。小发夹结构RNA(small hairpin RNA, shRNA)是45~502 mer的结果, 通过将其转染到细胞, shRNA在细胞内会自动被加工成为小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA), 从而引发基因沉默或者表达抑制<sup>[4]</sup>。本课题组<sup>[5]</sup>在前期实验中已证实RNA干扰Survivin能有效抑制人腺样囊性癌细胞在体外的生长。本研究通过转染靶向Survivin基因的shRNA真核表达载体pGenesil-shRNA-Survivin到人腺样囊性癌细胞ACC-2, 获得稳定转染的人腺样囊性癌细胞, 将转染后细胞植入裸鼠皮下, 观察Survivin siRNA对人腺样囊性癌体内成瘤及生长的抑制

[收稿日期] 2008-08-11; [修回日期] 2008-11-03

[基金项目] 重庆市自然科学基金资助项目(CSTC, 2007BB5064)

[作者简介] 杨军(1962—), 男, 江苏人, 副教授, 硕士

[通讯作者] 杨军, Tel: 023-68754406

作用,探讨RNA干扰Survivin基因对涎腺腺样囊性癌的治疗作用。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 细胞株和质粒 人腺样囊性癌细胞株ACC-2(四川大学华西医学中心细胞生物学教研室)培养于含有10%胎牛血清的RPMI1640培养液中(37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下)。采用成功构建的pGenesil-shRNA-Survivin<sup>[5]</sup>稳定沉默ACC-2细胞株和非处理ACC-2细胞及转染阴性质粒的ACC-2细胞进行对照研究。阴性质粒(质粒的碱基构成采用的是将选中的siRNA碱基序列打乱,并且与其没有同源性)由第三军医大学西南医院烧伤实验室苏踊跃馈赠。

1.1.2 实验动物 免疫缺陷BALB/c雄性裸小鼠18只(中国科学院上海实验动物中心),4~6周龄,体重16~20g,饲养于恒温、恒湿SPF环境,食物笼具和饮水皆经过消毒处理。随机分为转染组、阴性质粒对照组和空白对照组各6只。

1.1.3 主要试剂和仪器 PCR引物由上海英俊生物技术有限公司合成;兔抗人生存素多克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

#### 1.2 方法

1.2.1 皮下成瘤实验 将对数生长期转染组和对照组ACC-2细胞,胰酶消化,用PBS调整细胞密度为每毫升 $4 \times 10^7$ 个,取0.2 mL细胞悬液接种于裸鼠右腋下皮下,建立裸鼠皮下人腺样囊性癌移植瘤模型。每3 d用游标卡尺测量皮下肿块大小,按照公式 $V = 1/2ab^2$ 计算肿瘤体积, $a$ 为肿瘤长径, $b$ 为短径。当肿瘤体积超过2 000 mm<sup>3</sup>或破溃后处死动物,取下肿瘤组织,病理切片苏木精-伊红染色,证实为肿瘤组织。各组先取一部分新鲜组织标本备用,剩余组织标本10%甲醛固定,进行下一步实验。

1.2.2 免疫组织化学法检测Survivin蛋白表达 各组10%甲醛固定的标本,石蜡包埋,采用免疫组化SP法,具体操作严格按照试剂盒操作说明。Survivin免疫组化以如下方法判定结果:根据免疫组化染色深度及阳性细胞数量分别记0~3分,其中染色深度以多数细胞呈色反应为准。不着色为0分,浅棕黄色为1分,棕黄色为2分,深褐色为3分。阳性细胞数小于10%记为0分,10%~45%为1分,46%~64%为2分,65%以上为3分。染色深度及阳性细胞数得分相乘,0分为阴性(-),1~2分为弱阳性(+),3~4分为阳性(++),5~6分为强阳性(+++)。

1.2.3 Survivin mRNA表达的RT-PCR检测 收集新鲜瘤组织于研钵中,采用Trizol试剂提取各组的总

RNA,进行RT-PCR检测Survivin mRNA的水平。cDNA的合成严格按Promega反转录试剂盒的说明书进行,以GAPDH基因为内参照。PCR引物序列如下。Survivin基因上游:5'-TCAAGGACCACCGCA-TCTCTAC-3',下游:5'-GCACCTTCTCCGCAGTTT-CCTC-3';内参照基因GDPHD上游:5'-CTGACT-GACTACCTCATGAAGATC -3',下游:3'-GGAAG-GAAGGCTGGAAGAGTG-5'。PCR反应条件为94℃ 3 min;94℃ 40 s,60℃ 1 min,72℃ 1 min,30个循环;72℃ 5 min延伸。取PCR产物25 μL与GAPDH 10 μL加上样缓冲液5 μL混匀后,上样于1.6%的琼脂糖凝胶中,其中一孔加DNA Marker,80 V电压,电泳1 h。凝胶分析系统观察拍照、分析。

#### 1.3 统计学处理

采用SPSS 12.0统计软件进行分析,组间比较采用 $t$ 检验和方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 RNA干扰Survivin抑制皮下移植肿瘤生长

阴性质粒对照组裸鼠皮下移植肿瘤细胞后3~6 d形成肿瘤,在20~29 d当阴性质粒对照组肿瘤体积超过2 000 mm<sup>3</sup>后,分批处死裸鼠。阴性质粒对照组在29 d结束实验后,转染组继续观察2周,肿瘤体积仍难于观测,其中4只裸鼠可触及可疑结节,最大结节直径为5 mm(体积62.5 mm<sup>3</sup>),经病理证实了结节为肿瘤组织。移植后20 d时阴性质粒对照组肿瘤平均体积为(680.21±214.80) mm<sup>3</sup>,转染组肿瘤平均体积为(10.26±6.75) mm<sup>3</sup>,2组肿瘤体积差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.2 各组移植瘤的Survivin蛋白表达

免疫组化结果显示,阴性质粒对照组肿瘤Survivin蛋白为阳性,而转染组为弱阳性,转染组Survivin蛋白表达明显降低(图1)。

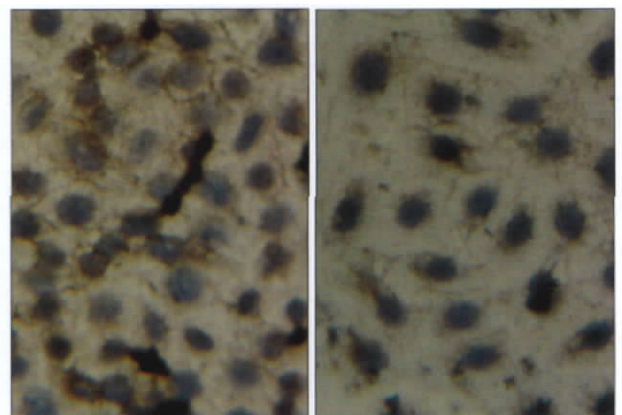
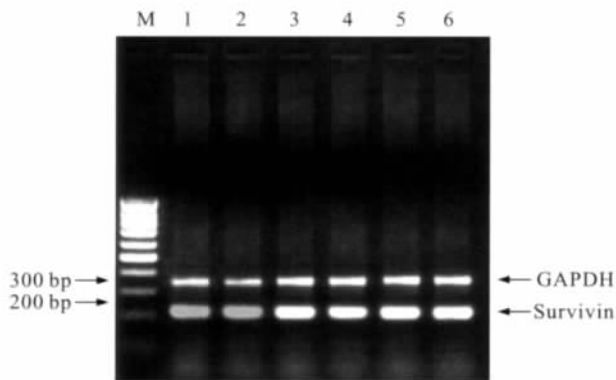


图 1 阴性质粒对照组(左)和转染组(右)Survivin蛋白表达 SP × 200

Fig 1 Survivin protein expression in nontransfected cells group (left) and transfected cells group(right) SP × 200

### 2.3 各组移植瘤的Survivin mRNA表达

电泳结果表明,在转染组、阴性质粒对照和空白对照组200 bp处可见清晰条带,转染组条带明显减弱(图2),各组内对照GAPDH条带一致。半定量分析结果表明转染组Survivin mRNA的表达受到了明显抑制(表1)。



M: DM3000 Marker; 1, 2: 转染组; 3, 5: 阴性质粒对照组; 4, 6: 空白对照组

图2 Survivin mRNA RT-PCR图

Fig 2 Survivin mRNA RT-PCR electrophoresis

表1 各组移植瘤电泳条带灰度值半定量分析

Tab 1 The semiquantitative analysis results for gray-scale values of each band group

分组	灰度值					
	1	2	3	4	5	6
Survivin	374.272	367.803	473.123	485.332	470.265	486.872
GAPDH	609.951	611.419	647.629	620.387	657.877	649.954
Survivin/ GAPDH	0.614	0.602	0.731	0.782	0.715	0.749

### 3 讨论

Survivin是目前发现作用最强的凋亡抑制因子,位于人染色体17q25上,表达于几乎所有的人类肿瘤中,而不表达于正常终末分化的组织和细胞。由于Survivin在肿瘤组织表达的特异性,使其已经成为肿瘤基因治疗很有价值的靶点。

本研究结果显示靶向Survivin的RNA干扰有效的下调ACC癌细胞Survivin mRNA表达。由于siRNA作用瞬时,基因沉默效应持续时间短,短期内需要多次给药才能达到转基因效果,构建其表达载体后可以长时间有效的抑制基因表达对基因功能作进一步研究<sup>[6]</sup>。通过半定量RT-PCR检测转染组ACC-2移植瘤Survivin mRNA表达水平较未转染组ACC-2移植瘤下调,说明pGenesil-shRNA-Survivin抑制Survivin基因表达的有效性和持久性。

通过RNA干扰下调Survivin基因表达,将明显抑制肿瘤细胞在体内外的增殖<sup>[7]</sup>。本实验转染ACC-2

细胞在裸鼠体内,其形成肿瘤的能力明显减弱,阴性质粒对照组在29 d前形成体积达2 000 mm<sup>3</sup>的肿瘤,而转染组追加观察2周后体积仍无明显变化,维持在仅可触及而肉眼难以观测的阶段,经病理证实有4只裸鼠形成肿瘤,最大体积为62.5 mm<sup>3</sup>,2组之间差异显著。肿瘤组织的免疫组化显示,阴性质粒对照组细胞在皮下形成的肿瘤Survivin蛋白高表达,而转染组形成的肿瘤Survivin蛋白表达显著降低,提示转染组肿瘤生长抑制是通过下调Survivin基因实现的;同时说明shRNA持久的下调目的基因Survivin的表达,并封闭其功能,从而抑制了体内肿瘤生长;下调Survivin基因表达,减弱肿瘤细胞成瘤性为细胞凋亡增加及抑制血管形成提供了可能<sup>[8]</sup>。

本实验应用RNAi技术,针对Survivin设计的Survivin siRNA在体内成功地抑制了移植瘤ACC-2 Survivin基因以及蛋白表达的同时,使肿瘤生长减缓甚至不能形成肿瘤,表明Survivin siRNA有明显抑制人腺样囊性癌生长的作用。

### [参考文献]

- [1] Mu D, Chen W, Yu B, et al. Calcium and survivin are involved in the induction of apoptosis by dihydroartemisinin in human lung cancer SPCA-1 cells[J]. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2007, 29(1) 33-38.
- [2] Miao GY, Lu QM, Zhang XL. Downregulation of Survivin by RNAi inhibits growth of human gastric carcinoma cells[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(8) :1170-1174.
- [3] 薛义军, 温端改, 侯建全, 等. RNA干扰对5 637膀胱癌细胞生存素基因表达的影响[J]. 江苏医药, 2006, 32(7) 630-632. XUE Yi-jun, WEN Duan-gai, HOU Jian-quan, et al. Effect of interference RNA on survivin expression in 5 637 bladder cancer cells[J]. Jiangsu Medical J, 2006, 32(7) 630-632.
- [4] Hou JQ, He J, Wang XL, et al. Effect of small interfering RNA targeting survivin gene on biological behaviour of bladder cancer[J]. Chin Med J, 2006, 119(20) :1734-1739.
- [5] 杨军, 汪欣, 许波, 等. RNA干扰Survivin对腺样囊性癌细胞株ACC-M生长的抑制作用[J]. 临床口腔医学杂志, 2008, 24(4) : 197-200. YANG Jun, WANG Xin, XU Bo, et al. Inhibitory effect of RNAi-mediated Survivin gene in adenoid cystic carcinoma cells lines ACC-M[J]. J Clin Stomatol, 2008, 24(4) :197-200.
- [6] Sui G, Soohoo C, Affarel B, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(8) 5515-5520.
- [7] Uchida H, Tanaka T, Sasaki K, et al. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against survivin induced apoptosis and attenuated tumor cell growth *in vivo* and *in vitro*[J]. Mol Ther, 2004, 10(1) :162-171.
- [8] Tu SP, Jiang XH, Lin MC, et al. Suppression of survivin expression inhibits *in vivo* tumorigenicity and angiogenesis in gastric cancer[J]. Cancer Res, 2003, 63(22) :7724-7732.

(本文编辑 汤亚玲)