

## 基础研究

# 慢病毒介导 shRNA 沉默 survivin 基因对鸡胚绒毛尿囊膜子宫内 膜异位症模型的影响

彭冬先<sup>1</sup>, 何援利<sup>1</sup>, 丘立文<sup>2</sup>南方医科大学珠江医院<sup>1</sup>妇产科,<sup>2</sup>临床医学基础研究所, 广东 广州 510282

**摘要:**目的 研究慢病毒介导生存素基因特异性短发夹状RNA(shRNA)对子宫内位症异位内膜生长及新生血管形成的影响。方法 建立鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)子宫内位症模型,随机分成单纯接种组、shRNA慢病毒组、空载慢病毒组和空白载体组,每组30只。通过Image-proplus软件测量新生血管面积与鸡胚尿囊膜面积比(VA/CAM)评价沉默survivin基因对CAM血管生成的影响,TUNEL检测异位内膜细胞凋亡,组织病理学观察异位内膜病灶生长行为。结果 shRNA慢病毒处理组种植内膜存活率最低,该组VA/CAM明显低于单纯接种组、空载慢病毒组和空白载体组( $P<0.001$ ),后3组间比较无显著性差异( $P>0.05$ )。shRNA慢病毒处理组种植内膜细胞凋亡率明显高于其他3组( $P<0.05$ ),另3组间比较无显著性差异( $P>0.05$ )。shRNA慢病毒处理组病灶在光镜下可见腺体结构不完整,间质伴有不同程度的坏死。结论 慢病毒介导survivin基因特异性shRNA能够显著抑制人子宫内位症种植CAM模型的新生血管形成,抑制子宫内位在CAM上的种植生长。

**关键词:**生存素;短发夹状RNA;子宫内位症;慢病毒;鸡胚绒毛尿囊膜

中图分类号:R711.71 文献标志码:A 文章编号:1673-4254(2012)07-0995-05

doi: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.07.020 <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1627.R.20120620.1550.019.html>

## Effect of lentiviral vector-mediated short hairpin RNA targeting survivin against endometriosis-like lesions in chick embryo chorioallantoic membrane

PENG Dongxian<sup>1</sup>, HE Yuanli<sup>1</sup>, QIU Liwen<sup>2</sup><sup>1</sup>Department of Gynecology and Obstetrics, <sup>2</sup>Cinical Medical Institute, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China

**Abstract: Objective** To investigate the inhibitory effect of lentiviral vector-mediated short hairpin RNA targeting survivin (LV-survivin shRNA) on angiogenesis and growth of endometriosis-like lesions in chick en embryo chorioallantoic membrane. **Methods** Eutopic endometrium from women with endometriosis was transplanted onto the non-vascular region of (CAM), where LV-survivin shRNA was delivered subsequently. The angiogenesis and the growth of endometriosis-like lesions in the CAM model were evaluated. **Results** The angiogenesis and formation of endometriosis-like lesions were significantly suppressed in the CAM model by treatment with LV-survivin shRNA in comparison with those in the untreated CAM models and models treated with empty LV or DMEM ( $P<0.001$ ). LV-survivin shRNA also caused a significantly higher cell apoptotic rate in the endometriosis-like lesions than the other treatments ( $P<0.001$ ) and induced necrosis in the lesions. **Conclusion** LV-survivin shRNA can effectively inhibit angiogenesis induced by the eutopic endometrium and markedly suppress the formation of endometriosis-like lesions in the CAM model.

**Key words:** survivin; short hairpin RNA; endometriosis; lentivirus; chicken embryo chorioallantoic membrane

子宫内位症是一种严重影响妇女身心健康的常见、良性病变,但却有侵袭、种植和复发等恶性行为。研究表明,异位子宫内位细胞抗凋亡能力的增强及新生血管的形成是导致子宫内位症发生和发展的关键<sup>[1-2]</sup>。survivin是凋亡抑制蛋白家族中的新成员,是迄今发现最强的凋亡抑制因子,能抑制细胞凋亡,促进细

胞增殖,并参与血管生成<sup>[3-5]</sup>。近年研究发现survivin在子宫内位症的发生、发展中起着重要作用<sup>[6-8]</sup>。本研究建立鸡胚绒毛尿囊膜(chick embryo chorioallantoic membrane, CAM)子宫内位症模型,观测慢病毒介导的靶向survivin基因的短发夹状RNA(shRNA)对异位接种后内膜的生长行为及新生血管的形成的影响,为子宫内位症的靶向治疗提供实验依据。

收稿日期:2012-04-27

基金项目:广东省科技计划项目(2011B031800089)

作者简介:彭冬先,博士,副主任医师,副教授,电话:020-62782969,

E-mail: pengdx1969@163.com

通讯作者:何援利,主任医师,教授,博士研究生导师,电话:020-61643361,

E-mail: heyuanli310@yahoo.com.cn

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料来源

1.1.1 子宫内位组织标本的选择与收集 选取珠江医院妇产科行手术治疗的子宫内位症患者10例,年龄

(35±8)岁,月经规律,无其他内分泌、免疫和代谢性疾病,手术前3个月未接受激素治疗。于术时或子宫离体后立即刮取子宫内膜组织,小部分组织用甲醛溶液固定,行常规病理检查。术后病理证实为子宫内膜异位症,分泌期子宫内膜。余大部分组织标本用无菌D-hanks液漂洗3次,洗去血块和粘液,将标本剪成1 mm×1 mm×1 mm,装入盛有100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素的冰D-hanks液中备用。标本的采集均经患者的知情同意。

1.1.2 鸡胚 选用7日龄德国沙伊鸡种鸡胚,质量约(48±5)g。由华南农业大学实验动物禽场提供。

1.1.3 主要试剂 Survivin-shRNA慢病毒表达载体自行构建<sup>[10]</sup>。阴性对照空载慢病毒由上海吉凯基因化学公司提供。末端脱氧核苷酸转移酶介导的脱氧尿苷三磷酸标记法(TUNEL)细胞凋亡原位检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 鸡胚的制备 鸡胚购回实验室后即以1%温新洁尔灭溶液清洗,移至超净台,在照蛋器指示下距胚头右下方1.5 cm处做标记,用碘酒、酒精消毒后,以标记处为中心开出一个1.0 cm×1.0 cm的小窗,滴加2滴生理盐水使CAM下塌,与卵壳膜分离,去除卵壳膜,暴露CAM,制成假气室,用无菌贴膜封口,窗口朝上,放入温度37.8℃、相对湿度60%的孵箱中孵育备用。

1.2.2 子宫内膜接种与实验分组 开窗后第1天,鸡胚随机分成单纯接种组、shRNA慢病毒组、空载慢病毒组和空白载体组,每组30只。单纯接种组将1 mm×1 mm×1 mm的子宫内膜组织接种至CAM相对无血管区,用无菌贴膜封口;后3组均先将1 mm×1 mm×1 mm子宫内膜碎片接种至CAM相对无血管区,用无菌贴膜封口,24 h后再以2 mm×2 mm×2 mm无菌明胶海绵碎片为载体,shRNA慢病毒组、空载慢病毒组分别选用浓度为8×10<sup>8</sup> TU/ml的survivin-shRNA慢病毒4 μl和2×10<sup>9</sup> TU/ml的空载慢病毒1.6 μl用无血清DMEM培养液稀释至20 μl,滴加于无菌明胶海绵上,贴附于鸡胚种植内膜处。空白载体组于明胶海绵上滴加无血清DMEM培养液20 μl。经上述处理后将鸡胚放入温度37.8℃、相对湿度60%的孵箱中继续孵育,每天翻蛋2

次,共孵育7 d。

1.2.3 血管生成定量分析方法 接种7 d后所有鸡胚揭去贴膜,向假气室内加入等量甲醇、丙酮配成的固定液,固定15 min,剪下3 cm×3 cm的CAM,平铺于滤纸上,在自然光线下,用数码相机采用近距离模式原位拍照。保存图像文件,用计算机图像处理系统Image-Pro Plus 6.0读入保存的图像,进行数据收集。分别计算以载体为中心直径1 cm区域内新生血管面积与该区域鸡胚尿囊膜面积比(VA/CAM)。根据下列公式计算血管抑制率(Inhibition rate, IR)。IR=(1-接种后shRNA慢病毒处理组血管面积/接种后空载慢病毒处理组血管面积)×100%。

1.2.4 种植的内膜组织收集及组织形态学观察 将CAM上种植成功的子宫内膜组织固定于4%多聚甲醛液中,常规石蜡包埋、4 μm连续切片,HE染色,光镜观察。

1.2.5 TUNEL法检测细胞凋亡 具体操作按照TUNEL试剂盒说明书进行,凋亡细胞胞核呈黄色到棕色着色,非凋亡细胞胞核着蓝紫色。光镜下随机取6个高倍视野计算细胞凋亡率,即凋亡细胞数占细胞总数的比值。

1.3 统计学分析

应用SPSS13.0统计软件行进行数据分析,计量资料采用均数±标准差表示,采用单向方差分析,如方差齐,组间多重比较采用SNK分析;如方差不齐,Welch法校正后采用Dunnett's T<sub>3</sub>分析。计数资料采用χ<sup>2</sup>检验。检验水准均为α=0.05。

2 结果

2.1 各组鸡胚模型中子宫内膜组织的种植成功率

各组鸡胚中子宫内膜组织的种植成功率差异有显著性意义(χ<sup>2</sup>=14.316, P=0.003),shRNA慢病毒组种植内膜存活率最低(表1)。

2.2 Survivin-shRNA慢病毒对子宫内膜异位症病灶血管生成的影响

单纯接种组、空载慢病毒组及空白载体组的种植灶周围见丰富的血管网生成,以病灶为中心呈放射状生长,形成血管“辐辏”现象(图1A~C)。shRNA慢病毒组的种植灶周围的CAM血管生成明显受抑,新生血管稀

表1 各组鸡胚中子宫内膜组织的种植成功率、VA/CAM比值、细胞凋亡率

Tab.1 Transplantation achievement ratio, VA/CAM, and apoptotic rate in the endometrium in the CAM model (n=30)

分组	种植成功标本数 (n)	成功率 (%)	VA/CAM比值 (%)	凋亡率 (%)
单纯接种组	24	80.00	24.84±4.90*	8.74±2.81*
shRNA慢病毒组	11	36.67	5.62±1.68	35.49±7.45
空载慢病毒组	20	66.67	23.31±2.63*	10.61±2.56*
空白载体组	22	73.33	25.19±3.01*	9.35±2.08*

与shRNA慢病毒组, \*P<0.001

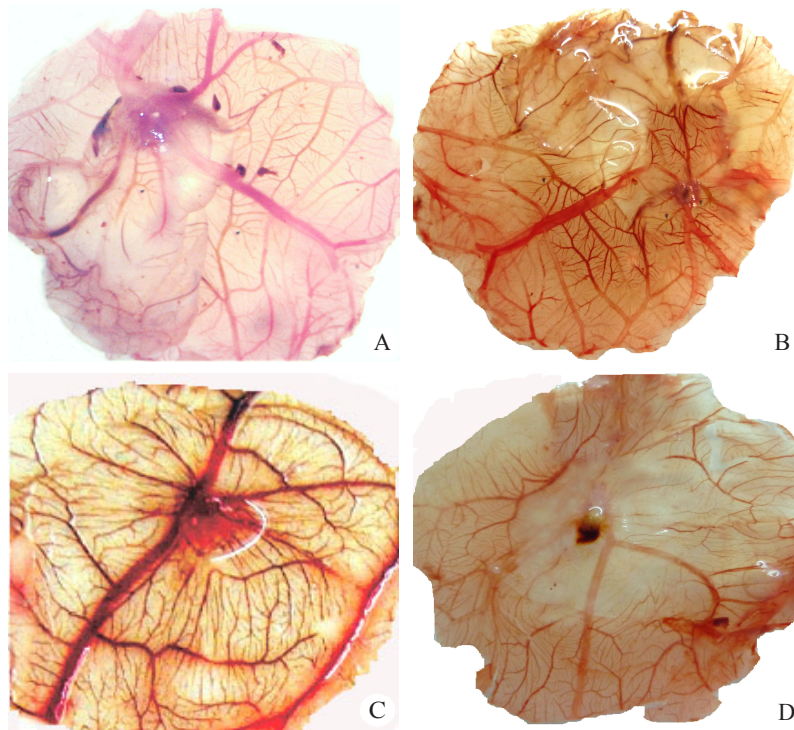


图1 shRNA对异位病灶CAM血管生成的影响

A: 单纯接种组; B: 空载慢病毒组; C: 空白载体组; D: shRNA 慢病毒组

Fig.1 Effect of lentiviral vector-mediated short hairpin RNA on vascularization of chick embryo chorioallantoic membrane.

疏,结构模糊,分布无规律,颜色变浅、苍白(图1D)。shRNA慢病毒组的VA/CAM明显低于其余3组( $P < 0.001$ ),血管生成抑制率达75.89%。而其余3组之间比较差异则无统计学意义( $P > 0.05$ ,表1)。

### 2.3 Survivin-shRNA慢病毒对子宫内膜异位症病灶细胞凋亡的影响

TUNEL检测结果显示,shRNA慢病毒组种植内膜细胞凋亡明显增多,可见大量细胞核染为棕黄色或棕褐色的凋亡细胞,腺上皮和间质中都存在凋亡,见图2D。而单纯种植组、空载慢病毒组及空白载体组种植内膜中可见少许凋亡细胞,见图2A~C。经方差分析显示,4组种植内膜细胞凋亡率比较差异显著( $F=91.754$ , $P < 0.001$ ),shRNA慢病毒组的细胞凋亡率显著高于单纯接种组、空载慢病毒组及空白载体组( $P < 0.001$ ),而后3组间两两比较均无显著性差异( $P$ 均 $> 0.05$ ,表1)。

### 2.4 种植内膜的组织学检测

接种存活的子宫内膜组织标本行组织切片HE染色,光镜下均可见子宫内膜腺体和间质细胞。单纯接种组、空载慢病毒组及空白载体组的子宫内膜间质和腺体结构较为完整(图3A~C);而shRNA慢病毒组子宫内膜腺体结构不完整,间质伴有不同程度的坏死(图3D)。

## 3 讨论

子宫内膜异位症发病机制不清,但普遍认为异位

内膜细胞抗凋亡能力的增强及新生血管的形成是子宫内膜异位症发生的基本条件<sup>[1-2]</sup>。因此,促进细胞凋亡和阻断新生血管的形成是防治子宫内膜异位症的有效策略。survivin作为凋亡抑制蛋白家族的特殊成员,它可通过多种途径抑制细胞凋亡,促进细胞的转化与增殖,同时在病理性新生血管形成过程中起重要作用。研究发现<sup>[6-7]</sup>survivin在正常内膜的增生期无表达,分泌晚期有微弱表达。而子宫内膜异位症患者的在位内膜、异位内膜中survivin呈高表达,均显著高于正常内膜,并且异位内膜的survivin表达也显著高于在位内膜。Watanabe等<sup>[8]</sup>研究发现,survivin表达水平升高导致异位内膜细胞抗凋亡能力明显增强,能抵抗凋亡诱导剂星状孢子素对异位内膜细胞的攻击。以上结果表明,survivin高表达在子宫内膜异位症发病中起着极其重要的作用。survivin可能通过抑制细胞凋亡、促进细胞增殖、并参与血管生成等多种功能及途径共同参与了子宫内膜异位症发生及发展。因此,survivin基因可能成为治疗子宫内膜异位症的理想靶点。我们前期体外实验研究表明,慢病毒介导靶向survivin基因的shRNA能明显抑制异位内膜细胞生长及诱导细胞凋亡<sup>[9-10]</sup>。关于靶向抑制survivin基因后能否抑制子宫内膜异位症的新生血管形成,尚未见相关文献报道。

CAM是目前研究血管形成与抗血管形成的较为理



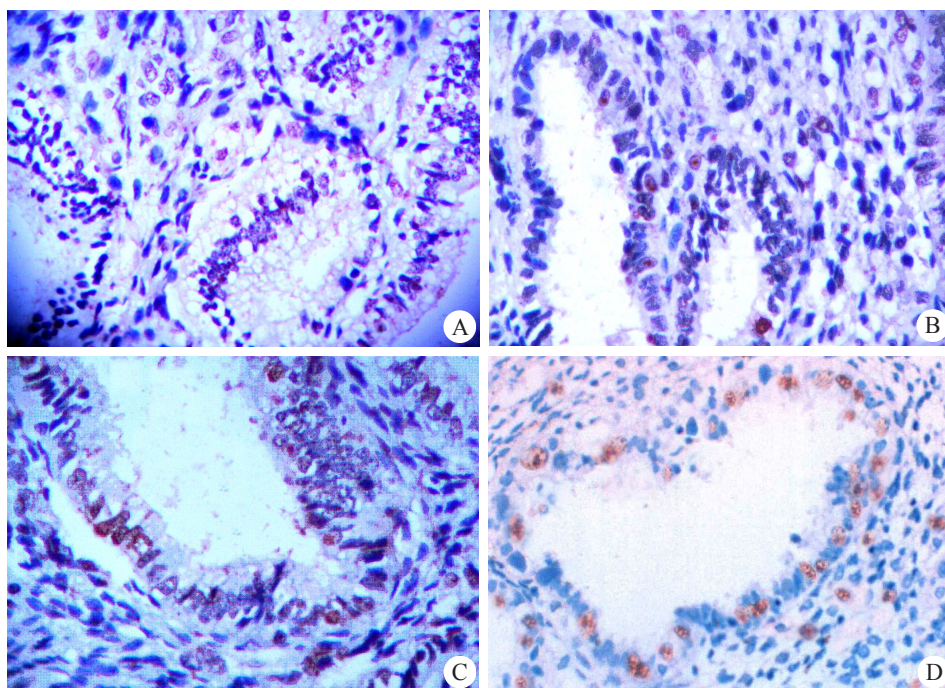


图2 TUNEL法检测异位内膜细胞的凋亡  
 A: 单纯接种组; B: 空载慢病毒组; C: 空白载体组; D: shRNA 慢病毒组  
 Fig.2 Apoptotic rates of ectopic endometrial cells tested by TUNEL assay (Original magnification: ×400).

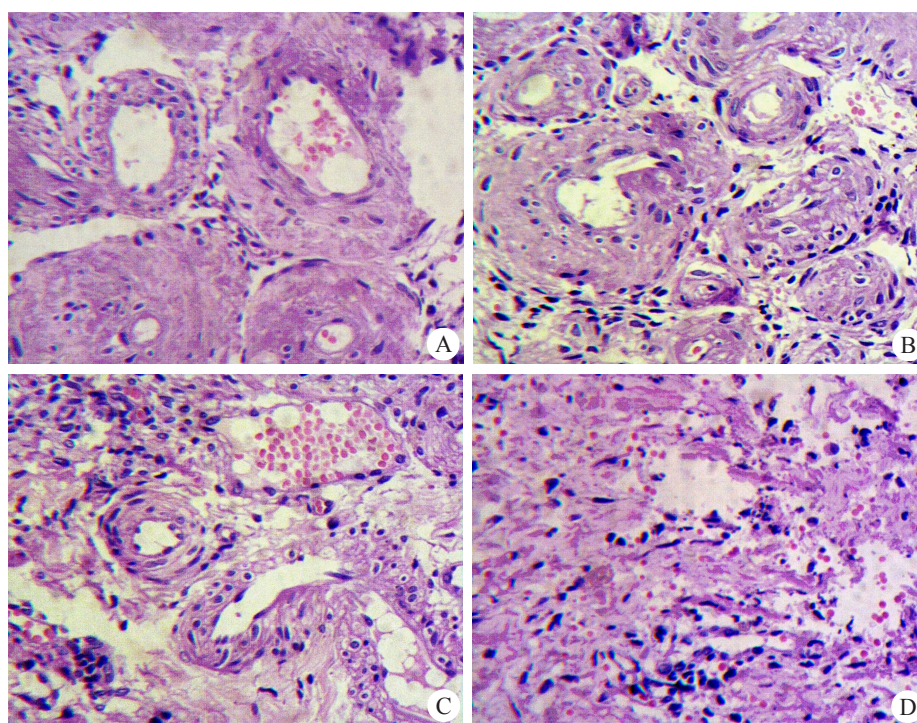


图3 异位种植内膜病理改变  
 A: 单纯接种组; B: 空载慢病毒组; C: 空白载体组; D: shRNA 慢病毒组  
 Fig.3 Endometriotic lesions in the CAM models (HE staining, original magnification: ×400).

想的体内模型之一<sup>[11-12]</sup>,它因实验成本低廉、操作简便、实验周期短、结果直观等优点而得到广泛应用。自21世纪初 Maas<sup>[13]</sup>成功构建鸡胚子宫内位内膜异位症模型开

始,随后不少学者已将CAM子宫内膜异位症模型应用于相关研究中<sup>[14]</sup>。在受精鸡蛋孵育第6~9天是CAM毛细血管生成的旺盛阶段,同时,机体免疫系统尚未完全



建立,此阶段对异物几乎不产生排斥反应。因此,本实验采用孵育第8天的鸡胚种植子宫内膜组织,单纯接种组种植成功率达80%,与文献[15]报道相似。

我们在前期研究中已成功构建靶向 survivin 基因的 shRNA 慢病毒载体,体外感染人异位内膜细胞后可有效抑制 survivin 基因的表达。本研究观察慢病毒介导靶向 survivin 基因的 shRNA 对内膜组织接种于 CAM 上的生长行为及 CAM 新生血管形成的影响。实验结果表明,接种人子宫内膜异位症在位内膜后,鸡胚新生血管生成明显增强,呈“辐辏”状分布。而靶向沉默 survivin 基因后,明显抑制了内膜异位种植灶周围的新生血管形成。另外,通过检测 CAM 上种植成功的内膜组织病理及细胞凋亡率发现,靶向 survivin 基因的 shRNA 能明显促进种植内膜组织中的细胞凋亡,内膜间质和腺体结构的完整性亦不同程度地受到破坏。由于以上两种原因,明显降低了实验组子宫内膜组织的种植成功率。本研究结果表明慢病毒介导 shRNA 可以通过促进异位内膜细胞凋亡及抑制种植灶周围新生血管形成等多种途径达到抑制异位种植灶生长的目的。该结果提示靶向抑制 survivin 基因在子宫内膜异位症的防治中具有潜在的价值。

综上所述,本研究初步发现慢病毒介导的靶向 survivin 基因的 shRNA 在体外可明显抑制子宫内膜异位症 CAM 模型的血管生成及异位种植灶生长,但靶向 survivin 基因的 shRNA 在子宫内膜异位症动物模型体内的抗血管生成作用及抑制异位病灶生长的效果,以及其抗子宫内膜异位症血管生成的机制均有待于进一步研究和确证。

#### 参考文献:

- [1] Harada T, Taniguchi F, Izawa M, et al. Apoptosis and endometriosis [J]. *Front Biosci*, 2007, 12: 3140-51.
- [2] May K, Becker CM. Endometriosis and angiogenesis [J]. *Minerva*

*Ginecol*, 2008, 60(3): 245-54.

- [3] Caldas H, Fangusaro JR, Boué DR, et al. Dissecting the role of endothelial SURVIVIN DeltaEx3 in angiogenesis [J]. *Blood*, 2007, 109(4): 1479-89.
- [4] 王强,赵滢,张天彪,等. survivin, PTEN 在胃癌组织中的表达以及相关性的研究 [J]. *中国医科大学学报*, 2009, 38(4): 270-3.
- [5] 李震东,马清涌,罗羽宏. Survivin 基因在急性胰腺炎中的表达及其意义 [J]. *南方医科大学学报*, 2009, 29(6): 1141-3, 1146.
- [6] Fujino K, Ueda M, Takehara M, et al. Transcriptional expression of survivin and its splice variants in endometriosis [J]. *Mol Hum Reprod*, 2006, 12(6): 383-8.
- [7] Goteri G, Lucarini G, Pieramici T, et al. Endothelial cell survivin is involved in the growth of ovarian endometriotic cysts [J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(6B): 4313-8.
- [8] Watanabe A, Taniguchi F, Izawa M, et al. The role of survivin in the resistance of endometriotic stromal cells to drug-induced apoptosis [J]. *Hum Reprod*, 2009, 24(12): 3172-9.
- [9] 彭冬先,何援利,丘立文. shRNA 转染对异位内膜细胞 survivin 基因的靶点抑制作用 [J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(4): 859-62, 866.
- [10] 彭冬先,何援利,丘立文,等. 慢病毒介导短发夹状 RNA 沉默生存素基因对人异位内膜细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *现代妇产科进展*, 2010, 19(12): 881-4.
- [11] Nowak-Sliwinska P, van Beijnum JR, Casini A, et al. Organometallic ruthenium(II) arene compounds with antiangiogenic activity [J]. *J Med Chem*, 2011, 54(11): 3895-902.
- [12] Xu Y, Zhao H, Zheng Y, et al. A novel antiangiogenic peptide derived from hepatocyte growth factor inhibits neovascularization *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Vis*, 2010, 16(11): 1982-95.
- [13] Maas JW, Groothuis PG, Dunselman GA, et al. Development of endometriosis-like lesions after transplantation of human endometrial fragments onto the chick embryo chorioallantoic membrane [J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(4): 627-31.
- [14] 刘木彪,何援利,钟洁. 靶向 NF- $\kappa$ B 的小干扰 RNA 抑制人子宫内膜异位症体外血管生成模型的实验研究 [J]. *南方医科大学学报*, 2009, 29(4): 757-9.
- [15] Kressin P, Wolber EM, Wodrich H, et al. Vascular endothelial growth factor mRNA in eutopic and ectopic endometrium [J]. *Fertil Steril*, 2001, 76(6): 1220-4.

(编辑:吴锦雅)