

· 基础研究 ·

凋亡抑制蛋白XIAP基因对A549细胞 凋亡和化疗敏感性的影响

陈复辉 曲宏岩 隋广杰

【摘要】背景与目的 X连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)是新发现的一个IAP家族中的主要成员,是IAP家族中最强的凋亡抑制因子,它可直接抑制caspases并可多途径调节细胞凋亡。XIAP基因在大多数的肿瘤细胞株中过表达,其表达与肿瘤的进展、复发、预后以及肿瘤化疗的耐药密切相关。研究通过RNAi方法下调非小细胞肺癌(NSCLC)细胞NIC-A549的XIAP基因表达后,研究XIAP siRNA特异序列在NSCLC细胞凋亡和化疗敏感性方面的作用。方法 应用半定量RT-PCR法检测A549细胞中XIAP mRNA基因的表达,设计并构建XIAP干扰性小RNA(small interfering RNA, siRNA)序列的表达载体,转染siRNA载体至A549中。荧光纤维镜确定转染效率,MTT法测定细胞增殖率及化疗药物对细胞杀伤率,流式细胞仪测定细胞凋亡率。结果 酶切和DNA测序证实XIAP siRNA构建成功。荧光纤维镜显示阳性转染组及阴性转染组的细胞转染效率无差异。半定量RT-PCR法示阳性转染组较阴性转染组、未转染组细胞XIAP mRNA表达明显降低;与对照组相比,顺铂对阳性转染组XIAP mRNA表达的抑制作用明显增强、阳性转染组细胞增殖在24 h、48 h、72 h、96 h明显受抑制;细胞杀伤率、凋亡率明显增加。结论 XIAP基因在NSCLC中表达增高,可抑制NSCLC细胞凋亡,导致NSCLC化疗耐药。XIAP siRNA序列可特异性地抑制NSCLC细胞增长,下调XIAP基因的表达,促进细胞凋亡,增加NSCLC化疗敏感性。XIAP siRNA序列有可能成为NSCLC治疗的靶标。

【关键词】肺肿瘤 XIAP RNA干涉

【中图分类号】R734.2 DOI:10.3779/j.issn.1009-3419.2008.03.027

Effects of apoptosis protein XIAP inhibitor on the apoptosis and sensitivity of chemotherapy in A549 cell

CHEN Fuhui*, QU Hongyan#, SUI Guangjie[△]

*Department of Respiratory Medicine, The Second Clinical College of Harbin Medical University, Harbin 150086, China;

#Department of General Surgery, The Third Clinical College of Harbin Medical University, Harbin 150040, China;

[△]Department of Medical Oncology, The Third Clinical College of Harbin Medical University, Harbin 150040, China

Corresponding author: Qu Hongyan, E-mail: chenfuhui2006@126.com

【Abstract】Background and objective X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is a newly discovered inhibitor of apoptosis protein which prevents apoptosis by inhibiting the activation of caspase. After down-regulating XIAP gene expression in A549 cells, a non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines, we investigated the role of XIAP specific siRNA in apoptosis and chemotherapy sensitivity. **Methods** The mRNA levels of XIAP gene in A549 cells were assessed using a semi-quantitative reverse transcriptase-PCR (RT-PCR). The expression vector of XIAP small interfering RNA (XIAP siRNA) was constructed and transfected into A549 cells. The transfection was proved effective by the fluorescence microscope. Cell proliferation and cell killing rate after chemotherapeutics treatment were investigated by MTT assay. The rate of apoptosis was detected by flow cytometry assay. **Results** XIAP siRNA construction was proved successful by enzyme digestion and DNA sequencing. The transfection efficiency in A549 cells from positive transfection group and negative transfection group had no differences. Compared to those in cell from control group, the level of XIAP mRNA expression was significantly decreased, the inhibition activity of Cisplatin was significantly higher in cells from positive transfection group. Proliferation of cells from positive transfection group was significantly inhibited after 24, 48, 72, 96 hours. The rates cell killing and apoptosis in cells from positive transfection group caused by Cisplatin were significantly higher compared to those cells from control group. **Conclusion** The increased expression of XIAP in NSCLC can inhibit

本研究受黑龙江省科技攻关计划项目(No.2006G1437-00)资助

作者单位: 150080 哈尔滨, 哈尔滨医科大学附属第二医院呼吸内科(陈复辉); 150040 哈尔滨, 哈尔滨医科大学附属第三医院腹外科(曲宏岩); 哈尔滨医科大学附属第三医院肿瘤内科(隋广杰)(通讯作者: 曲宏岩, E-mail: chenfuhui2006@126.com)

the apoptosis of NSCLC cells and result in NSCLC chemotherapy drug resistance. XIAP siRNA could inhibit the NSCLC cell growth specifically, down-regulation of XIAP gene expression promote apoptosis and increase the chemotherapy sensitivity of NSCLC. XIAP siRNA sequence might become a therapeutic target of NSCLC.

【Key words】 Lung neoplasms Human XIAP protein RNA interference

The work was supported by Heilongjiang Province Scientific and Technological Project (No.2006G1437-00)

肺癌的发病率在世界范围内急剧上升,其死亡率居恶性肿瘤首位。大多数肺癌晚期才得以确诊,且绝大多数非小细胞肺癌(NSCLC)患者对现行的放、化疗不敏感。XIAP是IAP家族里最强有力的caspase抑制物^[1],可以直接结合和抑制caspases,导致细胞凋亡受到抑制^[2]。线粒体促凋亡蛋白Smac/DIABLO能够结合XIAP,使凋亡进行^[3]。XIAP在大多数肿瘤细胞株中过表达^[4,5,6]且与肿瘤的进展、复发、预后以及化疗耐药性密切相关^[6,7,8]。亦有研究发现肺癌组织和转移灶中XIAP表达较正常肺组织及癌旁组织明显增高^[4],推测可能与肺癌的进展、复发、预后以及化疗耐药性密切相关,但尚未见通过RNA干扰载体阻断肺癌细胞XIAP基因表达与肺癌化疗敏感性的相关报道。为研究XIAP基因在NSCLC的发病及化疗耐药方面的作用,我们应用RNAi方法在体外下调NSCLC A549细胞系的XIAP表达,探讨XIAP基因在NSCLC发病和化疗耐药方面的作用;XIAP siRNA特异序列在诱导NSCLC细胞凋亡和提高化疗敏感性方面的作用。

1 材料与方法

1.1 主要药物及试剂 人类NSCLC细胞系NCI-A549购于上海细胞所, LB液态培养基、琼脂粉、RNAi-Mate试剂、无血清DMEM、RNA提取试剂盒(Trizol Reagent kit)购自美国Invitrogen公司,柱离心式小量质粒提取试剂盒50T购自上海吉玛公司。顺铂购自锦州九泰药业公司。

1.2 细胞培养 在5%CO₂、37℃条件下,于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 mg/mL链霉素的RPMI1640培养液中培养传代,每2-3日更换培养基,实验用细胞均处于对数生长期。

1.3 引物设计 XIAP引物设计参照文献^[5],引物序列上游:5'-ACTATGCTCACCTAACCCC-3',下游:5'-CCGTGCTTCATAATCTGCC-3',产物:281 bp,同时以β-actin(250 bp)作内参照,上游:5'-ACGAAACTACCTTCAACTCC-3',下游:5'-CAATGTGCAATCAAA GTCC-3',产物:536 bp。

1.4 XIAP表达的检测 取细胞约1×10⁷个,按Trizol试剂盒说明书提取细胞系总RNA,逆转录反应体系如

下:Oligo(dT)1 μL, RNA(10 pg-5 μg)2 μL, 10 mM dNTP Mix 2 μL, DEPC-treated Water 7 μL, 65℃, 置冰上孵育5 min。按下列组分配置逆转录体系:5×cDNA Synthesis buffer 4 μL, 0.1 M DTT 1 μL, RNase OUTTM(40 U/μL)1 μL, DEPC-treated water 1 μL, ThermoScriptTMRT(15 u/μL)1 μL,充分混匀后,吸取8 μL加入孵育后的每个反应管中,混匀后将反应管放入PCR仪内,50℃,60 min进行cDNA的合成;运行85℃,5 min终止反应。

1.5 设计siRNA 采用Ambion公司提供软件和siRNA设计的原则,设计并筛选出特异的siRNA。siRNA的设计:

human XIAP Ss: 5'-CACCGTAGTGCCACGCAGTCTACAT TCAAGAGATGTAGACTGCGTGGCACTATTTTTTTG-3' AS: 5'-GATCCAAAAAATAGTGCCACGCAGTCTACATCTCTT GAATGTAGACTGCGTGGCACTAC-3' Negative Control-S: 5'-CACCGTTCTCCGAACGTGTCACGTCAAGAGATTAC GTGACACGTTCGGAGAA TTTTTT G-3' Negative Control-AS: 5'-GATCCAAAAAATCTCCGAACGTGTCACGTAAT CTCTGACGTGACACGTTCCGAGAAC-3'。

1.6 RNAi表达载体的构建 取相应的正义链和反义链oligo溶液,进行siRNA模板的退火,取2 μg pGPU1/GFP/Neo载体进行酶切处理,按照如下体系进行载体的连接反应:10×T4 Ligation缓冲液2 μL, pGPU6/GFP/Neo(BbsI+BamH I)1 μL, siRNA模板(20 nM)1 μL, T4 ligase(5 weissU/uL)0.5 μL。然后22℃反应1 h,转移至JM 109的活细胞中。挑取单菌落,接种到含50 μg/ml新霉素LB培养基中。37℃水浴,震荡过夜。扩增菌落并提取质粒,用BamH I, EcoR I分别酶切鉴定。阳性重组载体可以被BamH I切开,而不能被EcoR I切开。选择阳性重组载体送上海英俊生物技术有限公司进行测序鉴定。按LysView Dye的标准纯化操作程序提取重组体的阳性菌质粒。

1.7 细胞分组和基因转染 分为3组,未转染组,转染XIAP siRNA对照序列组,转染XIAP siRNA序列组。取4×10⁴-5×10⁴的生理状态良好的细胞接种在24孔板上,每孔2 mL,24 h内细胞汇合率达到40%-70%,进行XIAP siRNA载体转染。转染参照lipofectamine2000说明书进

行。细胞转染24 h-48 h后,使用荧光显微镜观察计数表达绿色荧光蛋白的细胞,在明场观察计数同一视野中的总细胞数,转染细胞率=荧光蛋白表达细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.8 瞬时转染后对XIAP mRNA的表达的影响 同方法3进行基因转染48 h的细胞的XIAP mRNA的表达检测。

1.9 瞬时转染后对A549细胞生长及凋亡影响的检测

1.9.1 MTT法测定细胞生长曲线 取转染48 h的A549细胞接种在24孔板中,每孔接种 1×10^4 细胞。每组分别在1、2、3、4天各取3个复孔,每孔加入5 g/L MTT液20 μ L,37 $^{\circ}$ C继续孵育4 h,终止培育,小心弃去孔内培养液,每孔加入150 μ L DMSO,震荡10 min。选择592 nm波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值,记录结果。以时间为横轴,吸光度数值为纵轴,绘制细胞生长曲线。存活率($\%$)=实验孔D值/对照孔D值 $\times 100\%$ 。

1.9.2 流式细胞法检测细胞凋亡 取转染48h的A549细胞进行细胞凋亡的检测,按凋亡检测试剂盒说明书操作。

1.10 瞬时转染后细胞体外化疗药物敏感性分析

1.10.1 顺铂作用下细胞增殖抑制率 取转染48 h的A549细胞接种24孔板,每种每组细胞数为 1×10^4 ,每种每组平行3孔,每孔加入浓度2.5 μ mol/L的顺铂,37 $^{\circ}$ C培养48 h后,每孔加入MTT (5 g/L) 20 μ L,37 $^{\circ}$ C继续作用4 h,弃掉培养液,每孔加DMSO(二甲基亚砷)200 μ L,震荡,使沉淀充分溶解,混匀。用酶标仪读取592 nm处吸光度(A)值。记录结果,按下式计算细胞增殖抑制率,细胞增殖抑制率%=[(对照孔A值-实验孔A值)/对照孔A值] $\times 100\%$ 。

1.10.2 顺铂作用下细胞的凋亡率 检测上述加入浓度2.5 μ mol/L的顺铂培养48 h后的A549细胞阳性转染组、阴性转染组的细胞凋亡率。操作方法同前所述。

1.11 瞬时转染后化疗药物对A549细胞的XIAP mRNA的表达的影响 顺铂作用下细胞的XIAP mRNA的表达 检测上述加入浓度2.5 μ mol/L的顺铂培养48 h后的A549各组细胞的XIAP mRNA,操作方法同前所述。

1.12 统计学分析 采用SPSS10.0统计软件统计分析数据结果。数据均以均数Mean \pm SD表示,样本均数间比较采用单因素分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光标记鉴定转染效率 转染组细胞转染48 h后在倒置荧光纤维镜下观察A549细胞,可见XIAPsiRNA阳性转染组、XIAPsiRNA阴性转染组均有较多细胞表达绿色荧

光。绿色荧光蛋白百分率分别为38.7%、39.6.1%,无统计学差异。见图1。

2.2 RT-PCR检测瞬时转染后XIAP的表达 阳性转染组的A549较阴性转染组及未转染组细胞的XIAP表达明显下降。见图2。

2.3 瞬时转染对A549细胞增殖、凋亡的影响

2.3.1 细胞生长曲线的测定 阳性转染组的A549细胞与阴性转染组和未转染组细胞相比,生长明显受抑制。见图3。

2.3.2 流式细胞仪检测细胞凋亡 阴性转染组的A549细胞无细胞凋亡,而阳性转染组的细胞凋亡率为7.14%。见图4。

2.4 瞬时转染质粒对细胞体外化疗药物敏感性分析

2.4.1 MTT法检测顺铂对细胞增殖抑制率。见表1。

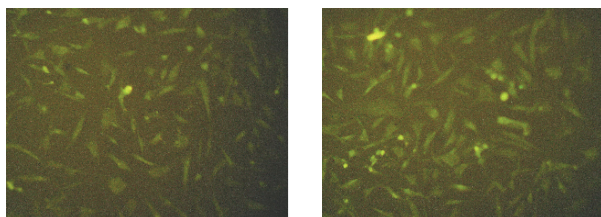
2.4.2 流式细胞仪法检测细胞凋亡 阳性转染加药组的A549细胞在顺铂的作用下较阴性转染加药组的细胞凋亡率明显增加。见图5。

2.4.3 RT-PCR检测XIAP mRNA的表达 阳性转染加药组XIAP mRNA的表达明显低于未转染加药组和阴性转染加药组。见图6。

3 讨论

我们将转染XIAPsiRNA特异序列的A549细胞称阳性转染组,转染XIAPsiRNA对照序列的细胞称阴性转染组,无转染的细胞称未转染组,以阴性转染组和未转染组为对照组。应用MTT法测定A549细胞的三组细胞的生长曲线,结果表明阳性转染组的A549细胞活力明显低于未转染组及阴性转染组。XIAP siRNA作用于A549细胞24 h、48 h、96 h后细胞存活数逐渐下降,明显低于对照组。应用RT-PCR法检测了A549细胞的XIAP mRNA表达,发现阳性转染组的XIAP mRNA的表达均较未转染组及阴性转染组明显降低。应用流式细胞仪法测定转染48 h的A549细胞的凋亡率,发现阳性转染组为7.14%,而阴性转染组的细胞无凋亡。以上结果表明XIAP siRNA特异序列能下降XIAP的表达,而XIAP表达的下降可抑制NSCLC细胞的增殖、促进细胞凋亡。

为进一步研究XIAP与化疗敏感性之间的关系,我们在A549细胞的阳性转染组、阴性转染组及未转染组细胞中均加入2.5 μ mol/L浓度的顺铂后,分别应用MTT法、流式细胞仪法和RT-PCR法测定A549的生长抑制率、凋亡率和XIAP mRNA表达,发现阳性转染组的细胞生长抑制率均较阴性转染组及未转染组明显增加,差异有显著性



阴性转染组A549细胞 阳性转染组A549细胞

图1 荧光显微镜观察转染效率 (原始放大倍数×100)

Fig 1 Transfection rates were observed by fluorescent microscope (original magnification × 100)

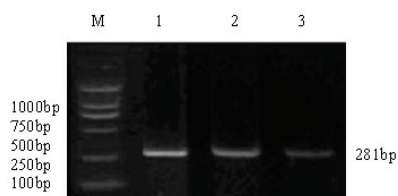


图2 RT-PCR检测转染后细胞XIAP的表达

Fig 2 Expression of XIAP measured by RT-PCR after contransfected

- 1: 未转染组A549细胞 (non-transfection group A549 cell)
- 2: 阴性转染组A549细胞 (negative transfection group A549 cell)
- 3: 阳性转染组A549细胞 (positive transfection group A549 cell)

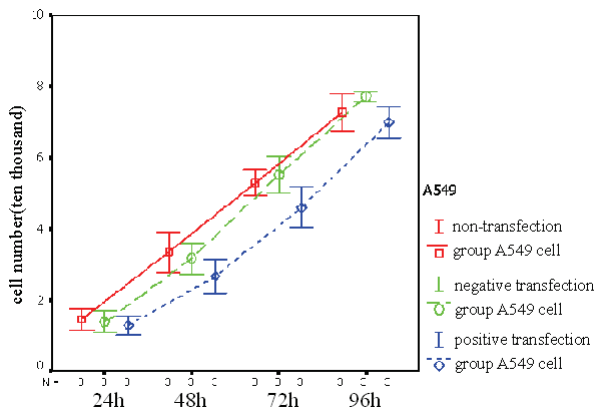


图3 A549细胞生长曲线

Fig 3 Curve of viable A549 cell

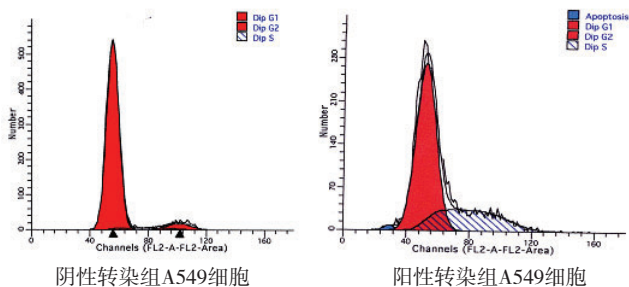


图4 流式细胞仪检测转染后的细胞凋亡率

Fig 4 Cell apoptosis rates of NSCLC cells after transfection were observed by flow cytometry

表1 XIAP 转染后对肺癌细胞株A549的影响

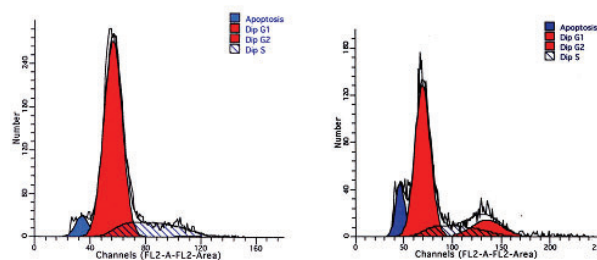
Tab 1 Effects of XIAP transfection on the proliferation of lung cancer cell line A549(Mean ± SD, n=3)

Group	Proliferation (%)	F
uninfected+drugs	31.98 ± 2.55	124.931
infected(+) + drugs	78.68 ± 0.19 ^{abc}	
infected(-) + drugs	26.96 ± 1.71 ^c	
infected(+)	24.86 ± 6.01 ^a	

a: compared with uninfected+drugs group, P<0.01

b: compared with infected(-) + drugs group, P<0.05;

c: compared with iinfected(+) group, P<0.05



阴性转染组A549细胞 阳性转染组A549细胞

图5 流式细胞仪检测转染后A549细胞在顺铂作用下的凋亡率

Fig 5 Cell apoptosis rates of A549 induced by cisplatin after transfection of XIAP gene detected by flow cytometry

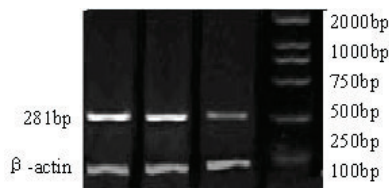


图6 顺铂对转基因A549细胞株的XIAP mRNA表达的影响

Fig 6 Effect of cisplatin on the expression of XIAP gene in the transfected lung cancer cell ling A549.

- 1: 未转染组A549细胞 (non-transfection group A549 cell)
- 2: 阴性转染组A549细胞 (negative transfection group A549 cell)
- 3: 阳性转染组A549细胞 (positive transfection group A549 cell)

(与阴性转染组相比两种细胞均P<0.05, 与未转染组相比两种细胞均P<0.01), 阴性转染组与未转染组相比较无差异; 阳性转染组细胞加入顺铂后较阴性转染组的细胞凋亡率明显增加; 阳性转染加顺铂组较阴性转染加顺铂组及未转染加顺铂组的XIAP mRNA表达明显降低。以上结果说明XIAPsiRNA特异序列干扰是在基因水上降低XIAP的表达, 抑制A549细胞的增殖, 促进细胞凋亡, 增加细胞对顺铂化疗敏感性。因此可以推测出高表达XIAP基因的NSCLC可以抑制细胞凋亡, 降低化疗药物的敏感性, 是导致NSCLC对化疗药物耐药的一个重要

原因。用RNAi技术降低XIAP的表达,可以抑制NSCLC细胞的增殖,促进细胞凋亡,提高NSCLC的化疗敏感性。

我们的研究结论与国外的一些研究相一致。Li等^[9]和Yang等^[10]分别发现高表达XIAP的卵巢癌细胞和胰腺癌细胞对顺铂和表阿霉素的化疗敏感性下降。Hu等^[11]运用反义核苷酸技术降低非小细胞肺癌细胞A549中的XIAP后,发现肿瘤的生长明显减慢;然后运用不同的化疗药物注射,发现与对照组相比,治疗组的肿瘤抑制作用明显增强,提示通过基因水平阻断XIAP的表达对治疗肺癌有极大的潜力。亦有报道在NSCLC细胞中,腺病毒介导XIAP靶向的反义核酸能降低XIAP蛋白表达,使癌细胞对化疗敏感^[10]。Lima^[12]与McManus等^[13]运用异硫氰酸荧光毒(FITC)标记的siRNA和RNA干扰载体阻断肿瘤细胞中XIAP的表达,发现癌细胞凋亡指数增加,对化疗药物诱导细胞凋亡的敏感性明显增强。以上的报道均说明高表达XIAP基因的肿瘤对化疗药物的敏感性下降,是导致肿瘤对化疗药物耐药的一个重要原因,用反义寡核苷酸、siRNA技术降低XIAP的表达可提高肿瘤的化疗敏感性。RNAi技术是细胞内由双链RNA诱导降解与其配对的特定mRNA的过程,是机体细胞一种强有力的基因调控机制。它比反义核酸技术和同源共抑更有效,能在低于反义核酸几个数量级的浓度下,使目标基因表达降低到极低水平甚至完全“剔除”,能够非常特异地降解与之序列相应的单个内源基因的mRNA。因此,XIAPsiRNA可以比反义核苷酸技术更有效地降低细胞的XIAPmRNA的表达,为进一步研究提供了可靠的保障。

以上我们的研究表明XIAP的过度表达在肺癌的发生、发展及化疗耐药中发挥重要的作用;应用RNAi方法可特异性外下调NSCLC的XIAP表达,抑制NSCLC的细胞增殖,促进细胞凋亡,提高化疗药物敏感性;XIAPsiRNA可能是治疗肺癌的靶点;亦可以结合传统的化疗治疗NSCLC,为NSCLC的治疗提供新思路和新方法。

参 考 文 献

- 1 Sun C, Cai M, Gunasekera AH, et al. NMR structure and muta-gene-sis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature*. 1999. 401: 818-822.
- 2 Holcik M, Korneluk RG. XIAP, the guardian angel. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2001, 2(7): 550-556.
- 3 Du C, Fang M, Li Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 2000, 102(1): 33-42.
- 4 Hofmann HS, Simm A, Hammer A, et al. Expression of inhibitor of apoptosis (IAP) proteins in non-small cell human lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2002, 128(10): 554-560.
- 5 Ramp U, Krieg T, Caliskan E, et al. XIAP expression is an independent prognostic marker in clear-cell renal carcinomas. *Hum Pathol*, 2004, 35(8): 1022-1028.
- 6 Tamm I, Kornblau SM, Segall H, et al. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(5): 1796-1803.
- 7 Bilim V, Kasahara T, Hara N, et al. Role of XIAP in the malignant phenotype of transitional cell cancer (TCC) and therapeutic activity of XIAP antisense oligonucleotides against multidrug resistant TCC *in vitro*. *Int J Cancer*, 2003, 103(1): 29-37.
- 8 Carter BZ, Milella M, Tsao T, et al. Regulation and targeting of antiapoptotic XIAP in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2003, 17(11): 2081-2089.
- 9 Li J, Feng Q, Kim JM, et al. Human ovarian cancer and cisplatin resistance: possible role of inhibitor of apoptosis proteins. *Endocrinology*, 2001, 142(1): 370-380.
- 10 Yang L, Cao Z, Yan H, et al. Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy. *Cancer Res*, 2003, 63(20): 6815-6824.
- 11 Hu Y, Cherton-Horvat G, Dragowska V, et al. Antisense oligonucleotides targeting XIAP induce apoptosis and enhance chemotherapeutic activity against human lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(7): 2826-2836.
- 12 Lima RT, Martin LM, Guimaraes JE, et al. Specific downregulation of bcl-2 and XIAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Gene Ther*, 2004, 11(4): 309-316.
- 13 McManus DC, Lefebvre CA, Cherton HG, et al. Loss of XIAP protein expression by RNAi and antisense approaches sensitizes cancer cell to functionally diverse chemotherapeutics. *Oncogene*, 2004, 23(49): 8105-8117.

(收稿: 2008-03-31 修回: 2008-04-21)

(本文编辑 南娟)