

· 基础论著 ·

survivin 基因沉默对“三阴”乳腺癌细胞株中 caspase3 和 caspase7 基因的影响

许鸿雁 高爽 庄庆媛 罗速

【摘要】 目的 探讨“三阴”乳腺癌细胞中沉默 survivin 基因对抑癌基因 caspase3 和 caspase7 的影响。**方法** 针对 survivin 基因设计干扰片段并与真核表达载体 pGCsilencerTMU6/Neo/GFP 进行连接,之后转染“三阴”乳腺癌细胞 MDA-MB-231;通过 RT-PCR 鉴定 survivin 基因 mRNA 水平沉默效果;用 RT-PCR 检测沉默 survivin 基因对 caspase3 和 caspase7 表达及细胞凋亡的影响。**结果** survivin 基因沉默可引起 MDA-MB-231 细胞凋亡;caspase3 和 caspase7 表达升高,灰度分析结果显示差异具有统计学意义($P=0.008$)。**结论** (1) RNAi 技术沉默 MDA-MB-231 细胞中 survivin 基因,达到了对其表达的抑制效果;(2) survivin 基因沉默可上调 caspase3 和 caspase7 的表达;(3) survivin 基因沉默可引起细胞凋亡;(4) survivin 基因可作为“三阴”乳腺癌基因治疗的新靶点。

【关键词】 乳腺肿瘤; 凋亡抑制蛋白质类; RNA,小分子干扰

Effects of gene silencing of survivin on caspase3 and caspase7 in breast cancer cell line MDA-MB-231 XU Hong-yan, GAO Shuang, ZHUANG Qing-yuan, LUO Su. Department of Oncology, Tumor Hospital of Jilin City, Jilin 132002, China

Corresponding author: LUO Su, Email: xuhongyan6666@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To explore the effects of gene silencing of survivin on caspase 3 and caspase7 in breast cancer cell line MDA-MB-231. **Methods** shRNA fragment was designed and inserted to eukaryotic expression vector pGCsilencer TMU6/Neo/GFP, and was transfected into MDA-MB-231 cells. The expression of surviving, caspase3 and caspase7 were detected by RT-PCR and western blot. **Results** Surviving gene silencing in MDA-MB-231 could up regulate the apoptosis ability of cell; survivin silence could increase the expression of caspase 3 and caspase7 ($P=0.008$). **Conclusions** (1) Designed RNAi fragment and transfected it into MDA-MB-231 cell, it could silence surviving gene; (2) Gene silence of survivin could increase expression of caspase 3 and caspase7; (3) Gene silence of survivin could increase the apoptosis ability of cell; (4) Gene silence of survivin could be new target gene in HR- and HER-breast cancer therapy.

【Key words】 Breast neoplasms; Inhibitor of apoptosis proteins; RNA, small interfering

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一,其发病率逐年上升,位居女性恶性肿瘤死因前列,自然生存期为 26.5~39.5 个月^[1]。“三阴”乳腺癌是指雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)及人表皮生长因子受体 2(HER-2)均阴性的乳腺癌。本型乳腺癌预后极差,5 年生存率不到 15%,脑转移、内脏转移率较高,迅速出现远处转移而导致死亡。

survivin 是凋亡抑制蛋白 IAP(inhibitor of apoptosis)家族的一个新成员,免疫组织化学结果显示,在绝

大多数人类肿瘤组织中都有 survivin 表达增高,如肺、脑、直肠、乳腺、前列腺以及约 50% 高分化非霍奇金淋巴瘤中其表达均增高^[2-3]。survivin 基因具有调节细胞周期的作用,例如, Li 等^[4] 研究显示 survivin 的表达主要集中在 G2/M 期,这说明 survivin 可能参与了细胞周期的调节。有学者认为 survivin 可以通过抑制线粒体依赖凋亡途径的上游启动子 caspase9,最终抑制下游的 caspase3、caspase7,发挥抗凋亡作用^[5]。有报道 survivin 在乳腺癌组织中高表达,提示其可能在乳腺癌的发生发展中发挥作用,但有关 survivin 对“三阴”乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 生物学行为的影响尚未见报道。本研究利用 RNAi 技术也可成功阻断 survivin 基因的表达,从而实现细胞水平的基因敲除的目的^[6-7]。有研究显示,在动物肿瘤模型中,利用 RNAi 技术抑制肿瘤生

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.01.038

基金项目:吉林省教育厅基金(吉教科合字 200687)

作者单位:132002 吉林省,吉林市肿瘤医院肿瘤科(许鸿雁、庄庆媛);北华大学基础医学院生物化学教研室(高爽、罗速)

通讯作者:罗速,Email:xuhongyan6666@yahoo.com.cn

长基因的表达可以抑制肿瘤生长^[8]。

在本实验中,我们利用 RNAi 技术沉默 MDA-MB-231 细胞中 survivin 基因,探讨 survivin 对 MDA-MB-231 细胞中 caspase3 和 caspase7 的影响及其机制。

材料与方 法

一、细胞株及主要试剂

MDB-MB-231 细胞由中国协和医大肿瘤研究所樊英教授赠;HBL-100 细胞由吉林大学病理生物学教育部重点实验室全成实教授馈赠;高效感受态 DH5 α 细菌细胞购自中国北京鼎国公司;DMEM 培养基购自美国 GIBCO 公司,PloyFect[®] 转染试剂购自美国 QIAGEN 公司;质粒小提试剂盒购自 TIANGEN 公司;SDS、Tris 购自北京鼎国公司;TUNEL 凋亡原位检测 kit 购自美国 Rocho 公司;鼠抗人 survivin 及 β -actin 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;兔抗人 caspase3 及 caspase7 单克隆抗体购自美国 Cell signaling 公司。

二、方法

1. 细胞培养:MDB-MB-231 和 HBL-100 细胞均培养于含 10% 胎牛血清的 H-DMEM 培养基中,5% CO₂, 37 °C 条件下进行培养,每隔 1 d 换液,取对数生长期的细胞进行实验使用。

2. 干扰片段的设计和干扰质粒的构建:HMGA2-shRNA 沉默表达质粒的构建,以含有 GFP 荧光蛋白标志的 pGCsilencer[™] U6/Neo/GFP 质粒为空载体。根据 GenBank 中 HMGA2 人全长 cDNA 序列(NM_001168),参考文献,选取特异性序列 5'-GCACCACCG-CATCTCTAAC-3' 作为靶点,加入 loop 结构,设计为 Sence + Loop + Antisence,其序列为:5'-CGCCTTCGTTG-CATTTACTTTCAAGAGAAGCGCAACCGGACGAATGC-3',由上海吉玛公司构建,同时该公司提供携带与人类基因无同源性 shRNA 质粒作为阴性对照。

3. 细胞转染:按照 QIAGEN PloyFect[®] 转染试剂说明书对培养的 MDA-MB-231 细胞进行转染,转染前将对数生长期的 MDA-MB-231 细胞以 1×10^5 /ml 接种于 6 孔板中,在含胎牛血清的 DMEM 培养基,5% CO₂, 37 °C 条件下进行培养,细胞融合 50% 以上,按照说明书进行转染。按转染质粒的不同,将细胞分为空白对照组、阴性对照组、实验组。

4. 观察转染效率:由于质粒可以表达带有绿色荧光的蛋白,转入质粒的细胞在荧光显微镜下成绿色,转染 48 h 后根据绿色细胞所占的百分比来估计转染效率。

5. RT-PCR 法检测干扰片段对 survivin 基因沉默效果:分别提取上述各组细胞总 RNA,通过 RT-PCR 方

法检测 survivin 的 mRNA 表达情况,判定沉默效果。

6. TUNEL 法检测细胞凋亡:利用美国 Rocho 公司的 TUNEL 凋亡原位检测试剂盒,按照说明书进行检测,苏木精再复染核后酒精脱水,干燥后用中性树胶封片,显微镜下观察,阳性表现为细胞核呈现棕色,阴性则为蓝色的苏木精着色。

7. 检测转染后 MDA-MB-231 细胞株中 caspase3、caspase7 的表达:采用 RT-PCR 方法检测转染 72 h 后 caspase3 和 caspase7 的表达。细胞转染、RT-PCR 方法均同前。

三、统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行 *t* 检验和方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 转染效率的观察(倒置荧光显微镜):转染 48 h 后转染率约为 70% ~ 80% (图 1)。

2. 沉默效果检测(RT-PCR 法):实验组细胞中 survivin 的表达明显低于空白对照组和阴性对照组($P = 0.009$,图 2)。

3. 检测细胞凋亡(TUNEL 法):对阴性对照组和空白对照组的作用明显低于实验组($P = 0.001$,图 3)。

4. 转染后 MDA-MB-231 中的 caspase3、caspase7 基因表达的检测:与空白对照组和阴性对照组相比,实验组细胞中 caspase3 和 caspase7 的 mRNA 表达水平明显增高($P = 0.008$,图 4)。

讨 论

本研究以“三阴”乳腺癌细胞株 MDA-MB231 为研究对象,利用 shRNA 介导基因沉默的方法,探讨 survivin 在乳腺癌发生发展中的作用及机制,为乳腺癌的治疗提供新靶点,为新药的研发提供新思路。

“三阴”乳腺癌病理组织学分级较差,多为 3 级,细胞增殖比例快,且肿瘤侵袭性强,易发生局部复发及远处转移,“三阴”乳腺癌的预后与肿瘤大小和淋巴结状态关系不大,复发快速,1 ~ 3 年是复发高峰,5 年内是死亡高峰,脑转移发生率高,治疗上主要以手术、化疗为主,临床上尚未发现其特殊的功能基因。

survivin 基因在正常组织与肿瘤组织中存在差异表达,目前的研究提示 survivin 的表达主要受多种因子、转录水平及转录后的调节。雌激素、胃泌素等激素可以参与 survivin 表达的调节作用^[9-10]。Hattori 等^[11]的研究还发现卵巢癌组织中 survivin 的表达受到 DNA 甲基化水平的调节。另外有研究显示野生型 p53 对 survivin 表达的调节有抑制作用^[12]。

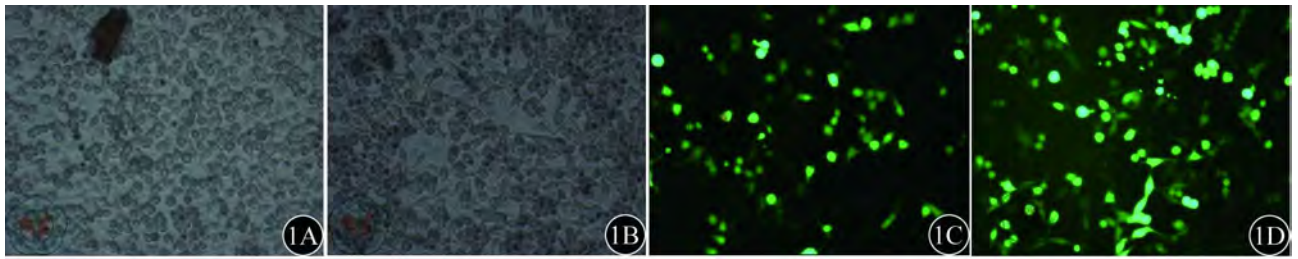
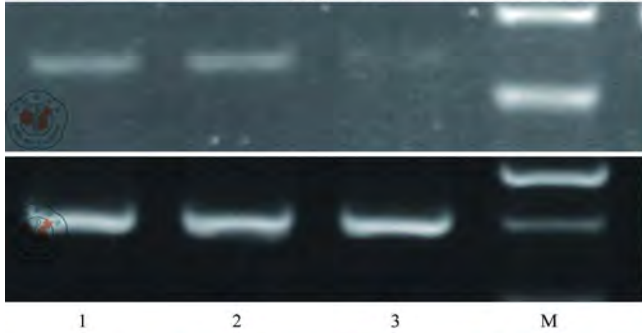


图1 细胞表达绿色荧光情况。
1A: 阴性对照组明场视野; 1B: 阴性对照组荧光视野; 1C: 实验组明场视野; 1D: 实验组荧光视野



survivin (169 bp)

β -actin (500 bp)

图2 各组细胞中survivin mRNA的表达。1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: 实验组; M: marker

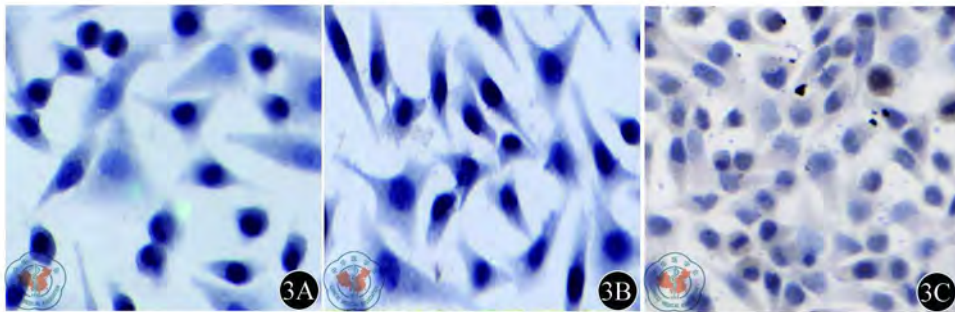
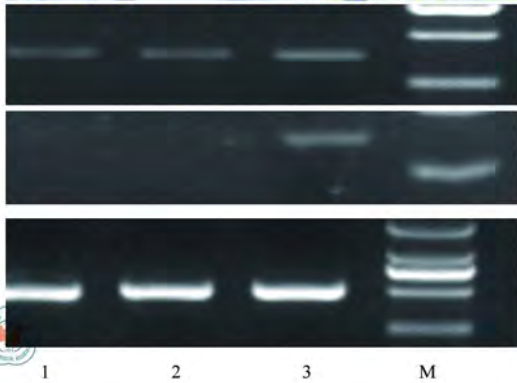


图3 各组细胞凋亡状况。3A: 空白对照组; 3B: 阴性对照组; 3C: 实验组



caspase3 (319 bp)

caspase7 (180 bp)

β -actin (500 bp)

图4 转染后各组细胞caspase3, caspase7 mRNA的表达情况。1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: 实验组; M: marker

在本实验中 TUNEL 检测结果显示在 survivin 存在的 MDA-MB-231 几乎没有凋亡的发生,而沉默 survivin 基因后,就有凋亡的发生,而 survivin 表达集中在细胞周期的 G2/M 期,所以沉默 survivin 可以诱导 G2/M 期 MDA-MB-231 的凋亡,所以 survivin 是抗凋亡基因之一,在肿瘤的永生状态中伴有重要角色,与既往 Li 等^[13]报道相同,本实验沉默 survivin 基因对 caspase3 和 caspase7 表达的影响中,与空白对照组和阴性对照组相比,实验组细胞中 caspase3 和 caspase7 的 mRNA 表达水平明显增高。caspase 是目前公认的细胞凋亡核心机制,通过其级联式激活可以导致一系列的蛋白酶的溶解,这是细胞凋亡及其形态学变化的基础。所以 survivin 可能直接或者间接地抑制下游 caspase3 和

caspase7 的表达,而实现抗凋亡的作用。

本研究我们证实了沉默 survivin 基因可以上调 caspase3 和 caspase7 的表达,本校其他实验组也证实了在 MCF-7 细胞株(受体阳性)中也得出同样的结论,但是这两种不同类型的乳腺癌临床转归截然不同,结合此实验现象,考虑:(1) survivin 基因可能是所有乳腺癌发生机制上的某一控制点,或是肿瘤细胞生长过程中多条信号转导通路中的一条或连接其他途径的关键点,此基因可能成为乳腺癌治疗的新靶点。(2) 目前临床检测乳腺癌细胞的受体状态,主要方法是免疫组织化学染色,检测其蛋白的表达,但在“三阴”MDA-MB-231 细胞中仍可检测出 ERa-36 的表达,由此可以推断出在乳腺癌早期可能都存在激素受体,只是不同的基

因片段表达的时机不同而已,随着病程进展,激素受体的表达呈阴性,肿瘤细胞显示出更高的恶性行为。对于“三阴”乳腺癌细胞信号转导通路中有哪些特异通路或基因,初期携带雌激素受体片段,在信号转导通路上何时被封闭掉,只有从分子机制明了这些问题,才能解决“三阴”乳腺癌的治疗难、生存期短、易复发的问題,这也是今后研究的方向与课题。

参 考 文 献

- [1] 高绍荣,夏海平. 参芪扶正注射液联合化疗对乳腺癌 T 细胞 Ag-NORS 的影响. 临床肿瘤学杂志, 2009, 14:1003-1006.
- [2] Adida C, Corty PL, McGrath J, et al. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene surviving in human and mouse differentiation. *Am J Pathol*, 1998, 152:43.
- [3] Tamm I, Wang Y, Sausville E, et al. IAP-family protein surviving inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res*, 1998, 58:5315-5320.
- [4] Li F, Ambrosini G, Chu EY, et al. Control of apoptosis and mitotic caspase spindle checkpoint by surviving. *Nature*, 1998, 396:580-584.
- [5] Blanc-Brude OP, Mesri M, Wall NR, et al. Therapeutic targeting of the survivin pathway in cancer: Initiation of mitochondrial apoptosis and suppression of tumor-associated angiogenesis. *Clin Cancer Res*, 2003, 9:2683-2692.
- [6] DiTullio RJ, Mochan TA, Venere M, et al. 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer. *Nat Cell Biol*, 2002, 4:998-1002.
- [7] Kawasaki H, Taira K. Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA(Val) promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31:700-707.
- [8] Trülsch B, Davies K, Wood M. Survival of motor neuron gene down-regulation by RNAi: towards a cell culture model of spinal muscular atrophy. *Brain Res Mol Brain Res*, 2004, 120:145-150.
- [9] Frasor J, Danes JM, Komm B, et al. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells; in sight into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology*, 2003, 144:4562-4574.
- [10] Konturek PC, Kania J, Kukharsky V, et al. Influence of gastrin on the expression of cyclooxygenase-2, hepatocyte growth factor and apoptosis-related proteins in gastric epithelial cells. *J Physiol Pharmacol*, 2003, 54:17-32.
- [11] Hatori M, Sakamoto H, Satoh K, et al. DNA demethylase (DNMTase) is expressed in ovarian cancers and the expression correlates with demethylation of CpG sites in the promoter region of c-erbB-2 and surviving genes exon1. *Cancer Lett*, 2001, 169:155-164.
- [12] Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, et al. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*, 2002, 21:2613-2622.
- [13] Li F, Ambrosini G, Chu EY, et al. Control of apoptosis and mitotic Caspase spindle checkpoint by surviving. *Nature*, 1998, 396:580-584.

(收稿日期:2012-09-03)

(本文编辑:马超)

许鸿雁,高爽,庄庆媛,等. survivin 基因沉默对“三阴”乳腺癌细胞株中 caspase3 和 caspase7 基因的影响[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版, 2013, 7(1):186-189.

中 华 临 床 医 生 杂 志