

[文章编号] 1007-385X(2004)04-0277-04

表达的 siRNA 对人乳腺癌 SKBr-3 细胞中 survivin 基因的干涉作用

李庆霞^{1,3}, 刘家云², 黄红艳¹, 许彦鸣¹, 贾林涛¹, 赵晶¹, 王成济¹, 杨安钢^{1,2}(1. 第四军医大学生物化学与分子生物学教研室, 西安 710032; 2. 第四军医大学免疫学教研室, 西安 710032; 3. 河北省人民医院肿瘤科, 石家庄 050051)

[摘要] **目的:** 构建针对人 survivin 基因的 siRNA 真核表达载体, 检测其对人乳腺癌 SKBr-3 细胞中 survivin 基因表达的干涉作用。**方法:** 将合成的寡核苷酸链退火形成双链, 接入经 Hind III 和 Bgl II 双酶切后的 pSUPER 真核表达载体。对重组质粒进行酶切分析和测序鉴定。通过脂质体介导, 把重组质粒稳定转染入 SKBr-3 细胞, RT-PCR、Western blot 印记杂交和细胞免疫化学法检测其对 mRNA 和蛋白表达的干涉效果。**结果:** 经酶切鉴定及基因测序证实, 重组质粒中已插入目的基因片段。RT-PCR 显示两个干涉载体均抑制了目的基因的转录; Western blot 印记杂交和细胞免疫化学检测结果显示 pSUPER-S1 对蛋白表达的抑制作用更强。**结论:** 成功地构建了针对人 survivin 基因的 RNA 干涉真核表达载体 pSUPER-S1 和 pSUPER-S2, 并在人乳腺癌细胞株 SKBR-3 中有效发挥了对 survivin 基因的干涉作用。

[关键词] survivin; RNA 干涉; 真核表达载体; 乳腺癌细胞

[中图分类号] R730.59; Q255 [文献标识码] A

The Interference Effect of Vector-based siRNA on Survivin Gene of Human Breast Cancer SKBr-3 Cells

LI Qing-xia^{1,3}, LIU Jia-yun², HUANG Hong-yan¹, XU Yan-ming¹, JIA Lin-tao¹, ZHAO Jing¹, WANG Cheng-ji¹, YANG An-gang^{1,2}(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Xi'an 710032, China; 2. Department of Immunology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 3. Department of Oncology, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang 050051, China)

[Abstract] **Objective:** To construct the eukaryotic expression vector for RNA interfering human survivin gene and detect its interference effect in human breast cancer cell line(SKBr-3). **Methods:** Two target gene segments were synthesized and cloned into pSUPER vector respectively to construct two recombinant eukaryotic expression vectors: pSUPER-S1 and pSUPER-S2. The two recombinant vectors were identified by enzyme digestion analysis and DNA sequencing. Then SKBr-3 cells were transfected with pSUPER-S1 or pSUPER-S2, together with pCDNA3 plasmid, and subjected to G418 selection. In G418-resistant cells, the interference effect was detected by RT-PCR, Western blot and immunocytochemical staining. **Results:** Enzyme digestion analysis and DNA sequencing showed that the target segments were cloned into pSUPER vector respectively. The results of RT-PCR, Western blot and immunocytochemical staining indicated that both vectors could knock down the transcription and expression of survivin gene, and that pSUPER-S1 had better interference effect than pSUPER-S2. **Conclusion:** The transcription and expression of survivin gene were inhibited effectively by the constructed RNAi eukaryotic expression vectors in the breast cancer cells.

[Key words] survivin; RNA interference; eukaryotic expression vector; breast cancer cells

* 细胞凋亡和细胞周期的调控异常是恶性肿瘤无限增殖的主要原因, 而 survivin 是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAP)家族中目前发现的唯一与细胞凋亡和周期调控都相关的成员, 对维持快速增殖的细胞以及肿瘤细胞的功能具有非常重要的作用。与其

[基金项目] 国家 863 高科技发展基金资助项目 (2001AA217101)

[作者简介] 李庆霞(1973-), 女, 河北临漳县人, 主治医师, 博士, 主要从事肿瘤基因治疗研究

[通讯作者] 杨安钢, E-mail: agyang@fmmu.edu.cn

它凋亡抑制因子显著不同, *survivin* 的表达具有明显的组织特异性: 它主要表达于胚胎和发育的胎儿组织, 但未见于终末分化的成人组织(胸腺和生殖腺除外), 而大多数肿瘤有不同程度表达^[1,2]。因此它有望成为肿瘤基因治疗的一个新的有意义的靶标。

RNA 干扰 (RNAi) 是一项新兴的基因阻断技术, 具有特异性和高效性, 能够降解与之序列相应的细胞内 mRNA, 使基因转录后沉默; 同时, 相对很少量的双链 RNA (dsRNA) 就可以使表型达到缺失突变体的程度。本文构建了特异性针对 *survivin* 基因进行 RNA 干扰的真核表达载体, 以降低肿瘤细胞内 *survivin* 的表达, 为诱导其细胞凋亡提供有效的手段。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RNAi 的真核表达载体 pSUPER、neo⁺ 的真核表达载体 pCDNA3 及人乳腺癌细胞系 SKBr-3 (该细胞系高表达 *survivin* 基因) 均由本室保存。限制性内切酶 EcoR I, Hind III, Bgl II, T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司。Taq DNA 聚合酶为 Promega 公司产品。逆转录试剂盒、Trizol RNA 分离试剂、Lipofect AmineTM 2000 为 Invitrogen 公司产品。RPMI-1640, G418 均购自 GIBCO 公司。*survivin* 兔抗人 IgG 为 abcam 公司产品。生物素化的二抗购自博士德公司。ABC 免疫组化检测试剂盒为华美公司产品。

1.2 针对 *survivin* 基因的寡核苷酸的设计和制备

根据 Genbank 中 *survivin* 基因的序列, 在编码区内选择 2 段 19 nt (分别位于基因序列中: 359-377; 430-448) 作为不同的干涉区域, 分别进行 BLAST 比较, 以避免与其它基因同源。根据 RNA 干扰载体 pSUPER 的要求, 每段各设计一对各长 64 个碱基的序列, 由大连宝生物公司合成。序列如下: 5'-GATCCCCCTGGA-CAGAGAAAGAGCCATTCAAGAGATGGCTCTTTCTCTGTCCAGTTTTGGAAA-3', 互补链为 5'-AGCTTTTC-CAAAAAGTGGACAGAGAAAGAGCCATCTCTTGAATGGCTCTTTCTCTGTCCAGGGG-3'; 另一对为 5'-GATC-CCCTGCGAAGAAAGTGC GCCGTTTCAAGAGAACGGCGCACTTTCTTCGCATTTTTGGAAA-3'; 互补链为: 5'-AGCTTTTCCAAAATGCGAAGAAAGTGC GCCGTTCTCTTGAAACGGCGCACTTTCTTCGCAGGG-3'。两端包含 Hind III 和 Bgl II 的识别位点。

1.3 构建 siRNA 的 pSUPER 表达载体

用 Hind III 和 Bgl II 双酶切 pSUPER 载体, 37℃, 3 h, 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 胶回收载体大片段 (上海华舜公司试剂盒); 将合成的互补链分别退火, 形成带有

黏端的双链, 用 T4 连接酶分别连接入 pSUPER 载体中 Hind III 和 Bgl II 的酶切位点之间。转化大肠杆菌 DH5 α , 挑选 Amp 抗性克隆, 培养并制备质粒, 用 EcoR I, Hind III 双酶切 (因 Bgl II 酶切位点已不存在) 鉴定。酶切鉴定正确的克隆送上海基康公司测序, 分别命名为 pSUPER-S1 和 pSUPER-S2。

1.4 脂质体介导的 SKBr-3 细胞的稳定转染

在 6 孔板内按 1×10^6 细胞/孔接种细胞, 第 2 天 2 个重组质粒及 pSUPER 载体质粒分别与 pCDNA3 载体质粒按 10:1 的浓度共转染 SKBr-3 细胞, 操作步骤按 LipofectAmineTM 2000 说明书进行。转染后 48 h 换为含 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 的选择培养基继续培养, 10 ~ 15 d 后获得 3 种质粒分别与 pCDNA3 质粒共转染后的 SKBr-3 细胞稳定克隆。

1.5 转染重组质粒的细胞 *survivin* 基因表达的检测

RT-PCR: 从 mRNA 水平检测 *survivin* 的表达。分别收集 3 种共转染后的 SKBr-3 细胞和未转染的 SKBr-3 细胞各 5×10^6 , 采用 Trizol RNA 分离试剂提取细胞的 RNA。取 5 μg 总 RNA, 加入 1 μl 的 oligo(dT)₁₂₋₁₈ (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 按照 Super-Script II RT 逆转录试剂盒产品说明书操作, 合成 cDNA 第 1 链。PCR 引物自行设计 (基因序列中 87 ~ 445, 片段长 359 bp, 包含了 2 个干涉区域), 上游引物为: 5'-TTCTCAAGGACCACCGCATCT-3'; 下游引物为: 5'-GCGCACTTCTTCGCAGTTTC-3'。取 2 μl 逆转录产物作为模板。反应条件为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环后, 于 72℃ 延伸 7 min。并以 β -actin 为内参照, 各取 10 μl 反应产物, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

Western blot 印记杂交: 从蛋白质水平检测 *survivin* 的表达。抗为 1:1 000 稀释的兔抗人 *survivin* 多克隆抗体, 抗为 1:200 稀释的生物素标记的羊抗兔 IgG 多克隆抗体, DAB 显色。SDS-PAGE 电泳、电转移采用常规方法。

1.6 *survivin* 蛋白的免疫细胞化学检测

将 3 种共转染后的 SKBr-3 细胞和未转染的 SKBr-3 细胞用胰酶消化, 加 1 ~ 2 滴至培养板中的盖玻片上, 37℃, 5% CO₂ 条件下培养过夜, 使细胞贴壁, 制备细胞爬片。次日取出爬片, PBS (pH 7.4) 洗 2 次后, 加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, 再以 PBS 洗 2 遍。经 0.01% Triton 处理、0.3% 双氧水灭活内源性过氧化物酶等处理后, 按免疫组化试剂盒说明操作。

2 结果

2.1 针对 *survivin* 基因干涉载体的构建

将筛选到的 pSUPER-S1, pSUPER-S2 质粒小量快

速提取后,用限制性内切酶 EcoR I, Hind III 双酶切鉴定,切成 2 949 bp 的大片段和 291 bp 的小片段,证明插入片段和载体的大小均正确(图 1)。将菌种送上海基康公司测序,结果完全正确,证实干涉载体构建成功。

PER-S1 与 pCDNA3 共转染的 SKBr-3 细胞中 survivin 蛋白表达与对照相比显著减少;而 pSUPER-S2 与 pCDNA3 共转染的 SKBr-3 细胞中 survivin 蛋白仍有少量表达。

图 1 重组质粒 pSUPER-S1, pSUPER-S2 的酶切鉴定

Fig. 1 Enzyme digestion analysis of recombinant plasmid pSUPER-S1 and pSUPER-S2

M: DL2000; 1: pSUPER-EcoR I /Hind III;

2: pSUPER-EcoR I /Hind III; 3: pSUPER-EcoR I /Hind III

2.2 转染重组质粒的细胞中 survivin 基因的表达

RT-PCR 产物电泳(图 2A)及 Western blot 印记杂交结果(图 2B)显示,转染 pSUPER-S1 或 pSUPER-S2 后,SKBr-3 细胞中 survivin 基因的 mRNA 水平明显降低,内参照 β -actin 的 mRNA 不受影响;在蛋白质水平上,真核表达载体 pSUPER-S1 的干涉作用更具有特异性和高效性,几乎完全抑制了 survivin 蛋白的表达,而未影响 α -tubulin 的表达。

2.3 survivin 蛋白的免疫细胞化学检测

按照试剂盒说明进行操作,依次加入适量稀释的一抗、二抗及 SABC 复合物,辣根过氧化物酶标记, DAB 显色,脱水透明、封片照相显示(图 3):经 pSU-

图 2 RT-PCR 和 Western blot 检测转染干涉载体的细胞中 survivin 基因的表达明显下降

Fig. 2 The expression of survivin gene tested by RT-PCR and Western blot

A: The transcription of survivin gene was inhibited in transfected cells (tested by RT-PCR); B: The expression of survivin protein was reduced in transfected cells (tested by WB); 1: Untreated SKBr-3 cells; 2: SKBr-3 cells co-transfected with pSUPER and pCDNA3 vectors; 3: SKBr-3 cells co-transfected with pSUPER-S1 and pCDNA3 vectors; 4: SKBr-3 cells co-transfected with pSUPER-S2 and pCDNA3 vectors

图 3 免疫细胞化学染色显示 pSUPER-S1 更显著地抑制了 survivin 蛋白的表达

Fig. 3 pSUPER-S1 is more effective in inhibiting the expression of survivin protein

A: Untreated SKBr-3 cells; B: SKBr-3 cells co-transfected with pSUPER and pCDNA3 vectors; C: SKBr-3 cells co-transfected with pSUPER-S1 and pCDNA 3 vectors; D: SKBr-3 cells co-transfected with pSUPER-S2 and pCDNA3 vectors

3 讨论

目前 RNAi 作为基因功能研究的新手段,已被广泛运用于生命科学研究的多个领域。根据文献报道,

用双链 RNA(dsRNA)抑制基因表达的效率比单链 RNA 至少高 2 个数量级^[3],也就是说:RNAi 比传统的反义核酸技术能更有效地抑制基因表达;而且,若将表达 dsRNA 的载体转入哺乳动物细胞,比直接转染 dsR-

NA 更能长期有效地抑制靶基因的表达^[4],因此我们选择 RNA 干涉的真核表达载体 pSUPER,可以在细胞内形成 dsRNA,使基因转录后沉默,丧失其原有的功能。

细胞凋亡受凋亡促进因子和凋亡抑制因子的共同调节。caspase 是细胞凋亡的核心机制,其级联反应的激活导致了细胞凋亡的起始和执行。survivin 不但能特异性地抑制 pro-caspase3 或 pro-caspase7 酶原转变为有活性的 caspases^[5],也能与有活性的 caspase-3 或 caspase-7 结合,从而阻止细胞凋亡的进行。此外, survivin 也可通过 p21 间接抑制 caspase,其机制是 survivin 与 CDK4 形成 survivin CDK4 复合体,释放出 CDK4 复合体中的 p21, p21 进一步与线粒体 caspase-3 结合,抑制其活性,阻断细胞凋亡。survivin 的表达还存在着严格的细胞周期特异性,即:在 G2/M 期高表达,而在其它阶段表达水平较低。另外它在细胞内可能还参与中心体的装配,在细胞周期纺锤体组装检查点(spindle assembly check point)机制中发挥重要功能^[6]。除此之外,控制由 survivin 介导的抗凋亡途径可增加化疗药 DDP 诱导细胞死亡的作用,有利于肿瘤治疗^[7];化疗药物 VP16 也能通过抑制 survivin 基因的表达而达到抑制细胞的生长、促进凋亡的作用,从而补充了某些抗肿瘤药物的作用机理^[8]。因此,将 survivin 基因作为 RNA 干涉的靶点对诱导细胞凋亡和阻断细胞周期非常有意义。

由于 RNA 可能存在二级结构,从而可能导致某一靶序列无法充分暴露,影响干涉效果,因此我们选择了两段靶序列,以防止出现干涉无效。从实验结果看,用重组质粒转染后,人乳腺癌 SKBr-3 细胞中 survivin mRNA 的表达明显受抑制,而 pSUPER-S1 在蛋白水平的

抑制作用更强一些,表明我们构建的 siRNA 成功发挥了干涉效应。从而为进一步研究 survivin 在肿瘤细胞中的作用及生物学意义打下了基础,为肿瘤的基因治疗提供了新的思路。

[参 考 文 献]

[1] Gianani R, Jarboe E, Orlicky D, *et al.* Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa [J]. *Hum Pathol*, 2001, 32(1): 119-125.

[2] Shinozawa I, Inokuchi K, Wakabayashi I, *et al.* Disturbed expression of the antiapoptosis gene, survivin, and EPRI in hematological malignancies [J]. *Leuk Res*, 2000, 24(11): 965-970.

[3] Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.

[4] Brummelkamp TR, Bernads R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells [J]. *Science*, 2002, 296(5567): 550-553.

[5] Shins S, Sung BJ, Cho YS, *et al.* An antiapoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase3 and 7 [J]. *Biochemistry*, 2001, 40(4): 1117-1123.

[6] Li FZ, Ambrosini G, Altieri DC, *et al.* Control of apoptosis and mitotic spindle check point by survivin [J]. *Nature*, 1998, 396 (6711): 580-584.

[7] Grossman D, Kim PJ, Schechner JS, *et al.* Inhibition of melanoma tumor growth *in vivo* by survivin targeting [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98(2): 635-640.

[8] 王孝养, 张珍祥, 李西融. Survivin 基因在化疗药物诱导的肺癌细胞凋亡中的作用 [J]. *中国药理学通报*, 2002, 18(2): 144-148.

[收稿日期] 2004 - 08 - 15 [修回日期] 2004 - 10 - 12

《中国肿瘤生物治疗杂志》征订启事

《中国肿瘤生物治疗杂志》创刊于 1994 年,经国家科委和国家新闻出版署正式批准,由中国免疫学会和中国抗癌协会联合主办的国家正式医学期刊(刊号为 CN31 - 1725/R)。本刊旨在交流学术、促进科研、面向应用,主要刊登与肿瘤生物治疗有关的基础理论与临床的研究论文、新实验技术及其研究成果等。《中国肿瘤生物治疗杂志》每期定价: 8.00 元,全年定价: 32.00 元,邮发代号: 4 - 576,请通过邮局订阅。也可从本刊编辑部订阅,请将 40.00 元(含邮资)寄本刊编辑部并注明详细通讯地址及邮政编码,本刊编辑部将负责如期寄至您的手中。

联系地址:上海市翔殷路 800 号第二军医大学免疫楼

《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部

联系人:王莹

邮政编码: 200433

联系电话: 021 - 55620605 × 22; 021 - 25070316 × 22