

[文章编号] 1007-385X(2007)01-0059-05

· 论 著 ·

Survivin 基因特异性 siRNA 腺病毒介导的肿瘤放射增敏作用

张 燕¹, 孙 婷¹, 曹祥荣² (1. 南京市第二医院 肿瘤放疗中心, 南京 210003; 2. 南京师范大学 生命科学学院, 南京 210097)

[摘 要] **目的:** 构建携带沉默 *Survivin* 基因表达特异性 siRNA 的重组腺病毒载体, 观察其在荷瘤动物体内对 *Survivin* 基因的表达以及对瘤细胞放射敏感性的影响。 **方法:** 设计合成针对 *Survivin* 基因序列的 siRNA, 构建并重组腺病毒 AdEGFP-siRNA。建立裸鼠 SMMC 7721 肝癌移植瘤模型, 分 5 组进行实验, siRNA + 放疗组和 siRNA 组以 AdEGFP-siRNA 瘤内多点注射, siRNA(-) 组以 AdEGFP-siRNA(-) 瘤内多点注射, 隔日 1 次, 每次 2×10^8 pfu/100 μ l, 共 5 次; 单纯放疗组和空白对照组以等量生理盐水代替病毒注射; 于第 10、12、14、16 天 siRNA + 放疗组和单纯放疗组给予 5 Gy/次的照射; 定时测量瘤体体积; 观察周期结束, 取瘤组织免疫组化检测 *Survivin* 蛋白的表达。 **结果:** 成功构建并重组表达 *Survivin* 基因特异性 siRNA 序列和绿色荧光蛋白(EGFP)报告基因的腺病毒 AdEGFP-siRNA。裸鼠 SMMC 7721 移植瘤在注射 AdEGFP-siRNA 后生长受到明显抑制, 抑瘤率为 56.2%; AdEGFP-siRNA 病毒治疗和放疗结合, 可将抑瘤率提高到 82.6%。移植瘤组织免疫组化检查显示, 特异性 siRNA 显著降低了肝癌细胞 *Survivin* 的表达。 **结论:** *Survivin* 特异性 siRNA 能够沉默其基因的表达和抑制肿瘤的生长, 同时可以提高肿瘤细胞的放射敏感性, 改善治疗效果。

[关键词] *Survivin* 基因; 腺病毒; RNA 干扰; 放射治疗敏感性; 肿瘤治疗

[中图分类号] R730

[文献标志码] A

Enhancement of cancer cell radiosensitivity by adenovirus vector carrying siRNA of *Survivin* gene

ZHANG Yan¹, SUN Ting¹, CAO Xiang-rong² (1. Radiotherapeutic Center of Oncology, Nanjing Second Hospital, Nanjing 210003, China; 2. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a recombinant adenoviral vector carrying the specific siRNA of *Survivin* gene, and to observe its effect on the expression of *Survivin* gene and on the radiosensitivity of cancer cells in tumor-bearing mice. **Methods:** The specific siRNA of *Survivin* gene was designed and synthesized, and a recombinant adenovirus AdEGFP-siRNA was subsequently constructed. SMMC 7721 xenograft models were established with nude mice and were divided into the following 5 groups: siRNA + radiotherapy and siRNA groups (intratumoral injection of AdEGFP-siRNA), siRNA(-) group (injected every other day with AdEGFP-siRNA[-], 2×10^8 pfu/100 μ l per time, total 5 times), pure radiotherapy group and blank control groups (injected with the same volume of normal saline). On day 10, 12, 14, and 16, the mice in siRNA + radiotherapy and pure radiotherapy groups were given 5 Gy/time radiotherapy. The tumor volumes were measured regularly. The expression of *Survivin* in tumor tissues was determined immunohistochemically. **Results:** Adenovirus AdEGFP-siRNA harboring the specific siRNA of *Survivin* gene and enhanced green fluorescent protein gene (EGFP) was successfully recombined. The growth of SMMC 7721 xenografts in nude mice was inhibited after injecting AdEGFP-siRNA, with the inhibition rate being 56.2%. The inhibition rate in AdEGFP-siRNA therapy + radiotherapy increased to 82.6%. Immunohistochemistry study showed that the specific siRNA markedly silenced the expression of *Survivin* gene in hepatocarcinoma cells. **Conclusion:** The specific siRNA can markedly silence *Survivin* gene and subsequently inhibit the growth of cancer; meanwhile, it can also increase the radiosensitivity of cancer cells so as to improve the treatment effect.

[Key words] *survivin* gene; adenovirus; RNA interference; radiosensitivity; cancer therapy

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(1): 59-63]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30572149)

[作者简介] 张 燕(1966-), 女, 江苏省南京市人, 副主任医师, 主要从事肿瘤放疗基础与临床的研究

[通讯作者] 曹祥荣, E-mail: cao63@126.com

Survivin 基因作为细胞凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的一员,在正常分化的组织中几乎检测不到表达,而在发育中的胚胎组织和具有高度增殖活性的分裂细胞中表达^[1-2]。研究发现,*Survivin* 在多种恶性肿瘤组织中高表达^[3-6]。抑制肿瘤细胞中*Survivin* 的表达就可以促进肿瘤细胞凋亡而起到治疗肿瘤的作用^[7-8],这一领域已成为分子肿瘤学的一个热点。目前已证实,下调*Survivin* 基因表达可以在体外诱导多种肿瘤细胞发生凋亡,在实验动物体内抑制肿瘤发生和减缓肿瘤生长,并且能够提高肿瘤细胞对各种化疗药物的敏感性^[9-10]。但有关*Survivin* 基因表达干扰与放射治疗的关系,国内外报道极少。本实验采用腺病毒介导的 RNA 干扰技术,沉默小鼠移植瘤细胞*Survivin* 的表达,研究*Survivin* 基因的靶向抑制与瘤细胞放射敏感性之间的关系。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人肝癌细胞株 SMMC 7721 由中国科学院上海细胞所提供,在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液、37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养。

1.2 siRNA 设计与合成

根据 GenBank NM001168 的*Survivin* 基因序列设计相应的 siRNA。设计条件:靶点 19 bp 序列,排除含有连续 4 个 G/C 或 A/T 序列,排除两端存在 AA 序列,排除定位在碱基易突变点的序列,排除其他人类基因的同源性序列。据此筛选到 1 个目标基因序列为 5'-gaa agt gcg ccg tgc cat c-3',位于全长*Survivin* 编码序列的第 387~405 bp。合成编码 siRNA 的 DNA 结构为:*Xho* I + U6 + *Bam*H I + Sense DNA(gaa agt gcg ccg tgc cat c) + Loop(ttc aag acg) + Antisense DNA(gat ggc acg gcg cac ttt c) + TTTTTT + *Bgl* II,克隆入 T 载体 pMD-18T,构建成 pMD18T-siRNA。同时设计阴性对照序列 5'-gac ttc ata agg cgc atg c-3',合成的编码阴性对照 siRNA 的 DNA 结构为:*Xho* I + U6 + *Bam*H I + Sense DNA(gac ttc ata agg cgc atg c) + Loop(ttc aag acg) + Antisense DNA(gca tgc gcc tta tga agt c) + TTTTTT + *Bgl* II,克隆入 T 载体 pMD-18T,构建成 pMD18T-siRNA(-)。

1.3 腺病毒载体的构建

将上述构建的 pMD18T-siRNA 和 pMD18T-siRNA(-),*Xho* I + *Bgl* II 酶切(NEB 公司),回收目的基因片段,插入到含有腺病毒同源序列和绿色荧光蛋白(EGFP)基因表达盒序列的载体质粒 pEGFP

中,经酶切鉴定正确后,命名为 pEGFP-siRNA 和 pEGFP-siRNA(-)。

培养 293 细胞(ATCC 公司),对数生长期时用胰酶消化传代,转种于 6 孔培养板。生长 48 h 细胞融合度 60% 时,同时转染 pEGFP-siRNA 和 pB-GHE3,转染方法参考 Invitrogen 公司 Lipofectamine2000 试剂盒说明书。共转染后 12 d 出现病毒空斑,经过空斑纯化,得到重组腺病毒 AdEGFP-siRNA。同样方法得到阴性对照的腺病毒 AdEGFP-siRNA(-)。腺病毒的扩增及纯化采用 293 细胞内扩增及常规氯化铯梯度离心纯化方法。

1.4 动物实验

健康纯种 BALB/c 裸鼠 30 只,4 周龄,中科院上海实验动物中心提供,清洁级动物实验室饲养[实验动物合格证号为 CXK(沪)2003-0003]。取对数生长期的 SMMC 7721 肝癌细胞悬液 $1 \times 10^7/100 \mu\text{l}$ 注射于裸鼠右侧皮下,恒温、通风、无菌条件下饲养;至接种 1 周左右,在接种区皮下出现米粒大小移植瘤。剔除瘤体过大和过小的裸鼠共 5 只,其余 25 只随机分为 5 组:siRNA + 放疗组,siRNA 组,单纯放疗组,siRNA(-)组,空白对照组,每组 5 只。siRNA + 放疗组和 siRNA 组以 2×10^8 pfu/100 μl 的重组病毒 AdEGFP-siRNA 直接瘤内多点注射,隔日 1 次,共 5 次;siRNA(-)组以 2×10^8 pfu/100 μl 的重组病毒 AdEGFP-siRNA(-)直接瘤内多点注射,隔日 1 次,共 5 次;单纯放疗组和空白对照组以生理盐水代替重组病毒注射,100 $\mu\text{l} \times 5$ 次。病毒治疗结束后第 10、12、14、16 天,siRNA + 放疗组和单纯放疗组以 200 mg/kg 的剂量腹腔注射 10% 氯胺酮麻醉小鼠,固定在解剖板上,充分暴露局部肿块,模拟机下定位,射野充分包括肿瘤,机头偏转 15°~20°,以避免照射正常肺组织。定位后体表标记,精确摆位后开始放疗,高能 X 射线能量 6 MV,5 Gy/次,源瘤距 100 cm。自病毒或者放射治疗开始,游标卡尺定时测量瘤体大小,以公式“最大径 \times 最小径² $\times 0.5$ ”计算瘤体体积。

1.5 病理检查

观察周期结束,断颈处死小鼠,取瘤体标本,以 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋切片。采用 SP 法免疫组化检测肿瘤组织中*Survivin* 的表达。鼠抗人*Survivin* 单克隆抗体和 SP 试剂盒购自福州迈新生物技术公司。在 5 个高倍视野下计数每张切片中阳性细胞的比例。

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据两两比较采用配对

资料 *t* 检验, 多组之间比较用 ANOVA 检验。采用 SPSS11.0 统计软件包。

2 结果

2.1 *Survivin* 基因 siRNA 载体的构建

设计并合成 *Survivin* 基因 siRNA 序列, 构建含有腺病毒同源序列和 EGFP 基因表达盒序列的 siRNA 载体质粒(图 1)。经酶切鉴定正确, 命名为 pEGFP-siRNA(图 2)。该载体可同时表达 *Survivin* siRNA 和 EGFP, 便于观察细胞转染及重组的情况。

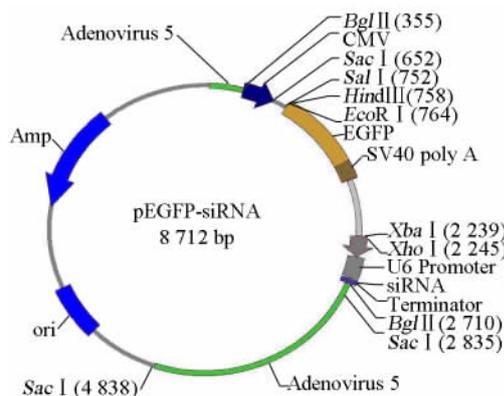


图 1 表达 *Survivin* siRNA 和 EGFP 的腺病毒载体

Fig. 1 The plasmid expressing *Survivin* siRNA and EGFP

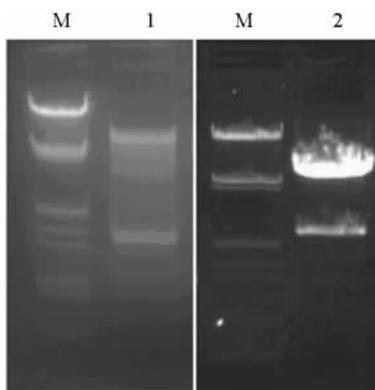


图 2 腺病毒载体 pEGFP-siRNA 的酶切鉴定

Fig. 2 Endonuclease digestion identification of pEGFP-siRNA

M: Lambda DNA/*EcoR* I + *Hind* III Marker;

1: pEGFP-siRNA/*Xho* I + *EcoR* I (1 481 + 7 231 bp);

2: pEGFP-siRNA/*Bgl* II (2 355 + 6 357 bp)

2.2 *Survivin* siRNA 腺病毒的重组与鉴定

pEGFP-siRNA 和 pBGHE3 同时转染 293 细胞, 共转染后 12 d 出现病毒空斑, 可见空斑区部分细胞出现荧光反应(图 3)。经过空斑纯化, 得到重组腺病毒 AdEGFP-siRNA。

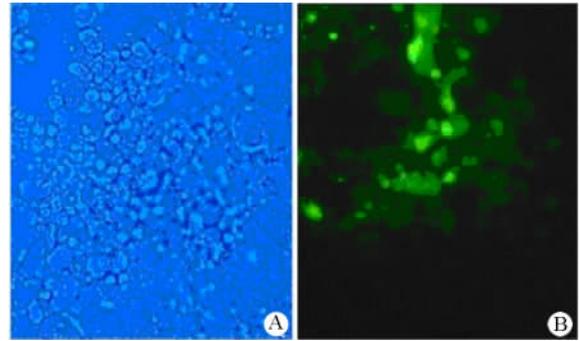


图 3 腺病毒 AdEGFP-siRNA 的重组与鉴定(×100)

Fig. 3 Recombination and identification of adenovirus AdEGFP-siRNA

A: The recombination plaque;

B: Cells in the plaque expressing EGFP

2.3 *Survivin* siRNA 腺病毒抑制裸鼠移植瘤的生长

裸鼠 SMMC-7721 移植瘤在注射携带 *Survivin* 基因特异 siRNA 的腺病毒 AdEGFP-siRNA 后, 其生长受到明显抑制, 与同期生长的空白对照组和携带非特异 siRNA 的 AdEGFP-siRNA(-)病毒对照组相比, 均有非常明显的差异($P < 0.01$)。AdEGFP-siRNA(-)病毒对照组由于病毒作用产生一定程度的抗肿瘤作用, 但与空白对照组相比无明显差异($P > 0.05$)。单独 siRNA 病毒治疗组和单独放疗组的抑瘤率分别为 56.2% 和 29.2%, 而 siRNA + 放疗组的抑瘤率高达 82.6%, 后者明显高于前两者($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。结果显示, siRNA 病毒治疗和放疗结合, 可产生协同疗效(图 4)。

2.4 病理检查

取裸鼠 SMMC 7721 移植瘤标本进行 *Survivin* 免疫组化, 发现空白对照组、单独放疗组和 AdEGFP-siRNA(-)病毒对照组的肿瘤细胞高度表达 *Survivin* 蛋白, 阳性细胞比例分别为(89.5 ± 12.3)%、(92.2 ± 10.8)% 和 (90.4 ± 18.1)%, 3 组之间无明显差异。siRNA + 放疗组和 siRNA 组的 *Survivin* 阳性细胞比例分别为(29.6 ± 8.7)% 和 (22.9 ± 10.8)%, 两组与空白对照组相比有明显差异($P < 0.01$)。结果显示, 特异 siRNA 显著干扰了肝癌细胞 *Survivin* 基因的表达, 而非特异 siRNA 对 *Survivin* 基因的表达无影响(图 5)。

3 讨论

凋亡抑制基因 *Survivin* 定位于 17q25 染色体, 长 14.7 kb, 含 4 个外显子和 3 个内含子, 其基因编码的蛋白由 142 个氨基酸组成^[11]。*Survivin* 基因通过与 Caspase-9 结合, 间接促进凋亡抑制蛋白因子

IAPs 的抗凋亡作用^[12], 或者通过与核因子 NF- κ B 的相互调控^[13], 对促凋亡激酶的抑制或者与丝氨酸/苏氨酸激酶受体的相互作用, 抑制凋亡^[14]。Survivin 基因在正常组织不表达或极少表达, 而在肿瘤组织高表达, 过度表达的 Survivin 因子抑制肿瘤细胞自发性凋亡及放、化疗诱导的肿瘤细胞凋亡, 从而影响肿瘤对放疗、化疗的敏感性^[15-16]。一些临床

研究已经证实了 Survivin 基因表达的高低影响化疗敏感性。一组接受术前辅助化疗的食管癌患者, Survivin mRNA 的表达与肿瘤的 N 分期呈正相关, 且高表达组预后不良, 说明 Survivin mRNA 的高表达与化疗耐药有关^[17]。这种差异性的存在, 使之成为肿瘤诊断和治疗的良好靶点。

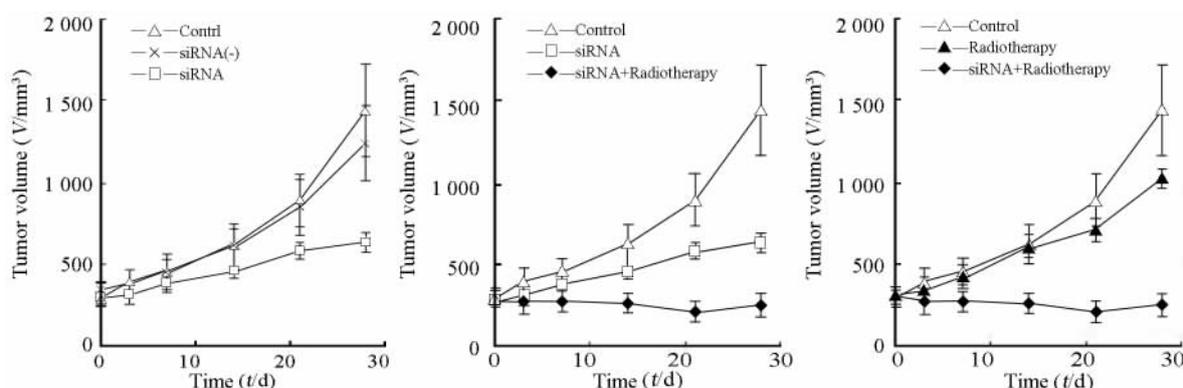


图 4 AdEGFP-siRNA 对 SMMC 7721 移植瘤的抑制作用

Fig. 4 Inhibitory effect of AdEGFP-siRNA on SMMC 7721 xenograft models

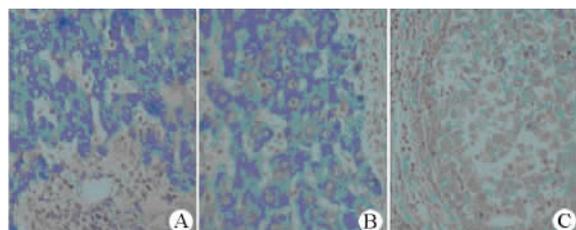


图 5 腺病毒 AdEGFP-siRNA 沉默 Survivin 表达的病理观察(S-P 法, $\times 200$)

Fig. 5 Pathological observation of Survivin silence induced by AdEGFP-siRNA(S-P, $\times 200$)

- A: Positive expression of Survivin in control group;
- B: Positive expression of Survivin in siRNA(-) group;
- C: Survivin expression was inhibited in siRNA group

为了探索靶向 Survivin 基因的肿瘤治疗策略对放疗治疗敏感性的影响, 本研究设计了携带 Survivin 特异性 siRNA 的腺病毒载体。RNA 干扰技术主要利用双链 RNA 在细胞内经 Dicer 酶的识别、结合、酶切, 产生长度为 21 ~ 23 nt、具有活性的小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA)。这种 siRNA 能够与目的基因 mRNA 结合并使 mRNA 降解, 从而抑制目的基因的表达^[18-19]。这种作用又称为转录后基因沉默(post transcription gene silencing)^[20]。本实验首先构建能够表达 siRNA 和 EGFP 的腺病毒质

粒, 再转染包装细胞, 重组出含有 siRNA 表达序列的腺病毒, 最后感染靶细胞发挥基因沉默的作用。Survivin 特异性 siRNA 技术在动物实验中取得了良好抗肿瘤效应, 但其临床效果欠佳。因此, 针对 Survivin 为靶点的细胞毒性治疗方法需要联合放疗或化疗才能起到更好的抗肿瘤效果。

本研究将表达 Survivin 特异性 siRNA 的腺病毒用于肝癌动物模型的治疗。结果表明, Survivin 特异性 siRNA 能够很好地沉默 Survivin 基因的表达, 抑制肿瘤的生长。联合放射治疗, 可进一步增强肿瘤治疗的效果, 达到协同作用的目的。这个结果说明, Survivin 特异性 siRNA 联合放射治疗, 其抗肿瘤效应明显优于单独 Survivin 特异性 siRNA 治疗或放射治疗。由此证实, Survivin 特异性 siRNA 封闭 Survivin 的表达, 可以提高肿瘤细胞的放射敏感性, 改善治疗效果。针对 Survivin 的基因治疗, 具有良好的靶向性、特异性及安全性, 既可以克服反义核苷酸治疗的不足, 又可以联合应用放疗和化疗, 与其他促凋亡治疗方法相结合, 能最大限度地发挥抗肿瘤效应。本研究结果提示, 对 Survivin 特异性 siRNA 技术的研究, 将为探讨肿瘤的发生机制提供新契机, 从而为发展肿瘤的生物治疗奠定基础。

[参 考 文 献]

- [1] Colnaghi R, Connell CM, Barrett RM, *et al.* Separating the anti-apoptotic and mitotic roles of survivin [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(44): 33450-33456.
- [2] Johnson ME, Howerth EW. Survivin: A bifunctional inhibitor of apoptosis protein [J]. *Vet Pathol*, 2004, 41(6): 599-607.
- [3] Invernizzi R, Travaglio E, Benatti C, *et al.* Survivin expression, apoptosis and proliferation in chronic myelomonocytic leukemia [J]. *Eur J Haematol*, 2006, 76(6): 494-501.
- [4] Asanuma H, Torigoe T, Kamiguchi K, *et al.* Survivin expression is regulated by coexpression of human epidermal growth factor receptor 2 and epidermal growth factor receptor via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(23): 11018-11025.
- [5] Branca M, Giorgi C, Santini D, *et al.* Survivin as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus and a predictor of virus clearance and prognosis in cervical cancer [J]. *Am J Clin Pathol*, 2005, 124(1): 113-121.
- [6] Kannangai R, Wang J, Liu QZ, *et al.* Survivin overexpression in hepatocellular carcinoma is associated with p53 dysregulation [J]. *Int J Gastrointest Cancer*, 2005, 35(1): 53-60.
- [7] Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG. Survivin as a target for new anticancer interventions [J]. *J Cell Mol Med*, 2005, 9(2): 360-372.
- [8] Lu B, Mu Y, Cao C, *et al.* Survivin as a therapeutic target for radiation sensitization in lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(8): 2840-2845.
- [9] Kojima H, Iida M, Yaguchi Y, *et al.* Enhancement of cisplatin sensitivity in squamous cell carcinoma of the head and neck transfected with a survivin antisense gene [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2006, 132(6): 682-685.
- [10] Uchida H, Tanaka T, Sasaki K, *et al.* Adenovirus-mediated transfer of siRNA against survivin induced apoptosis and attenuated tumor cell growth *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Ther*, 2004, 10(1): 162-171.
- [11] Islam A, Kageyama H, Hashizume K, *et al.* Role of survivin, whose gene is mapped to 17q25, in human neuroblastoma and identification of a novel dominant-negative isoform, survivin-beta/2B [J]. *Med Pediatr Oncol*, 2000, 35(6): 550-553.
- [12] Zangemeister-Wittke U, Simon HU. An IAP in action: the multiple roles of survivin in differentiation, immunity and malignancy [J]. *Cell Cycle*, 2004, 3(9): 1121-1123.
- [13] Sato A, Oya M, Ito K, *et al.* Survivin associates with cell proliferation in renal cancer cells: Regulation of survivin expression by insulin-like growth factor-1, interferon-gamma and a novel NF-kappa B inhibitor [J]. *Int J Oncol*, 2006, 28(4): 841-846.
- [14] Reed JC. The Survivin saga goes *in vivo* [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(7): 965-969.
- [15] Zhang M, Mukherjee N, Bermudez RS, *et al.* Adenovirus-mediated inhibition of survivin expression sensitizes human prostate cancer cells to paclitaxel *in vitro* and *in vivo* [J]. *Prostate*, 2005, 64(3): 293-302.
- [16] Warnecke-Eberz U, Hokita S, Xi H, *et al.* Overexpression of survivin mRNA is associated with a favorable prognosis following neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer [J]. *Oncol Rep*, 2005, 13(6): 1241-1246.
- [17] Beardsmore DM, Verbeke CS, Davies CL, *et al.* Apoptotic and proliferative indexes in esophageal cancer: Predictors of response to neoadjuvant therapy [J]. *J Gastrointest Surg*, 2003, 7(1): 77-86.
- [18] Huynh T, Walchli S, Sioud M. Transcriptional targeting of small interfering RNAs into cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 350(4): 854-859.
- [19] Aharinejad S, Sioud M, Lucas T, *et al.* Target validation using RNA interference in solid tumors [J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 361(2): 227-238.
- [20] Paduano F, Villa R, Pennati M, *et al.* Silencing of survivin gene by small interfering RNAs produces supra-additive growth suppression in combination with 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in human prostate cancer cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(1): 179-186.

[收稿日期] 2006 - 11 - 06

[修回日期] 2006 - 12 - 19

[本文编辑] 韩 丹

· 简 讯 ·

第一届世界华人免疫学大会征文通知

由中国免疫学会主办、第二军医大学免疫学研究所承办,由第二军医大学曹雪涛、美国约翰霍普金斯大学医学院陈列平、美国 MD 安德森癌症中心刘勇军任共同主席的“第一届世界华人免疫学大会”(The first World Chinese Conference on Immunology)将于 2007 年 7 月 12 日 - 15 日在上海召开,大会将邀请世界著名的免疫学家包括美国科学院院士、世界杰出华人免疫学家、国内著名免疫学学科带头人和免疫学实验室主任作专题报告,报告内容包括基础免疫学、临床免疫学和免疫学技术等领域的研究和应用新进展。大会将为从事免疫学研究的全球华人学者提供一个交流与合作的平台,为国内免疫学学者、学生提供及时了解免疫学国际前沿进展的机会。

征文要求: 凡未在国内外公开刊物发表过的研究资料均可向会议投稿;本次会议采用网络投稿,请将英文摘要(小 4 字号, 1.5 倍行间距, A4 页面 1 页)发送至会务联系人第二军医大学免疫学研究所吴艳峰博士(immunology2007@126.com; 联系电话: 021-55620605; 传真: 021-65382502)。来稿经专家评审后选择优秀论文作会议发言,所接受的论文摘要将录入会议文集。

中国免疫学会