

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2008.05.006

肺癌细胞中 *survivin* 与 *P53* 的相关性

芮萌^{1*}, 刘长庭², 段蕴铀¹, 于晓妤³, 侯春梅³ (1. 海军总医院 干一科, 北京 100073; 2. 解放军总医院 南楼呼吸科, 北京 100853; 3. 解放军军事医学科学院 基础所, 北京 100850)

[摘要] 目的: 观察 *survivin* 特异性小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 对 *P53* 野生型和 *P53* 缺失型肺癌细胞株的生长抑制作用, 分析肺癌细胞中 *survivin* 与 *P53* 的相关性。方法: 以化学合成的 *survivin* siRNA 转染 *P53* 野生型肺癌细胞株 A549 和 *P53* 缺失型肺癌细胞株 H1299, 用 MTT 法检测转染前后肺癌细胞的增殖情况, 流式细胞术分析细胞周期和凋亡的改变, 半定量 RT-PCR 检测转染对 *survivin* mRNA 表达的影响, Western blotting 检测 *survivin*、PARP、P21、P53 等蛋白表达的变化。结果: siRNA 转染前 A549 细胞中 *survivin* 表达量明显低于 H1299 细胞 ($P < 0.05$)。Survivin siRNA 转染组两种细胞 *survivin* 蛋白及 RNA 表达水平均显著低于对照组和无关干扰组 ($P < 0.01$)。Survivin siRNA 对 A549 和 H1299 细胞生长抑制作用均呈浓度依赖性 ($P < 0.05$), 但对 H1299 细胞的抑制起效晚于 A549, 且抑制程度低于 A549 细胞。转染后 A549 和 H1299 细胞均有 G₁ 期比例增加和 S 期比例相应地减少, H1299 细胞的变化更为显著。A549 细胞有一定比例出现凋亡, PARP 发生了裂解, P53、P21 蛋白表达增加, 而 H1299 细胞中上述指标的变化却不明显。结论: *P53* 野生型 A549 细胞内源性 *survivin* 表达明显低于 *P53* 缺失型 H1299 细胞; 抑制 *survivin* 能上调 P53 蛋白表达, 其对 A549 细胞的生长、凋亡和 P21 等蛋白表达的影响明显强于 H1299 细胞; 提示 *survivin* 与 *P53* 之间可能存在着相互抑制作用。

[关键词] 肺肿瘤; *survivin*; *P53*; RNA 干扰; 细胞周期

[中图分类号] R734.2; Q753

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2008)06-0532-06

Relationship between *P53* and *survivin* in human lung cancer cells

RUI Meng^{1*}, LIU Chang-ting², DUAN Yun-you¹, YU Xiao-dan³, HOU Chun-mei³ (1. First Department of Cadre Ward, Naval General Hospital, Beijing 100037, China; 2. Department of Respiratory Diseases, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; 3. Institute of Basic Medical Science, Academy of Military Medical Science of PLA, Beijing 100850, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the inhibitory effects of *survivin*-specific siRNA on human lung cancer cell lines with different *P53* statuses, and to analyse the relationship between *P53* and *survivin* *in vitro*. **Methods:** A549 (wild-type *P53*) and H1299 (*P53* absent) cells were transfected with chemosynthetic *survivin* siRNA. The effect of siRNA on cell proliferation was analysed by MTT assay. The changes of cell cycle and apoptosis were examined by flow cytometry. The expression of *survivin* mRNA was detected by RT-PCR. The protein expression of *survivin*, P53, P21 and PARP was examined by Western blotting. **Results:** Endogenous *survivin* level in A549 cells was lower than that in H1299 cells. The mRNA and protein expression of *survivin* was significantly lower in siRNA group than in blank control group and non-silencing siRNA group ($P < 0.01$). *Survivin*-specific siRNA significantly inhibited the growth and proliferation of both A549 and H1299 cells in a concentration dependent manner ($P < 0.05$), but the inhibitory effect was earlier and more efficient in A549 cells than in H1299 cells. *Survivin*-specific siRNA produced an increase in the G₁ fraction and a decrease in S fraction in the two cell lines, with the changes in the latter more evident. Apoptosis was found in A549 cells; PARP was cleaved and P21 and P53 protein was increased in A549 cells. The above changes were not obvious in H1299 cells. **Conclusion:** Endogenous *survivin* levels in A549 (wild-type *P53*) cells is lower than that in H1299 (without *P53*) cells. Inhibition of *survivin* by transfecting *survivin* siRNA can significantly up-regulate P53 protein expression in A549 cells. The effects of *survivin* siRNA on the cell growth, apoptosis and expression of some proteins are more prominent in A549 than in H1299 cells, suggesting that *survivin* and *P53* might inhibit each other.

[Key words] lung neoplasms; *survivin*; *P53*; RNA interference; cell cycle

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(6): 532-537]

[基金项目] 全军医药科研基金课题 (No. 01MA101)。Supported by the Military Medicine Scientific Research Foundation (No. 01MA101)

[作者简介] 芮萌 (1969-), 女, 安徽省淮南市人, 博士后, 主治医师, 主要从事肺癌的基础与临床研究

* Corresponding author. E-mail: rmxcl102@sohu.com

肺癌与其他肿瘤一样,它的发生发展是一个多因素、多基因变异所致的病变过程,不仅与细胞异常增殖和分化相关,而且与凋亡基因变化亦有密切联系。*P53* 基因突变是肺癌中发生频率最高的遗传改变,45%~75%的非小细胞肺癌和70%以上的小细胞肺癌中均可检测到 *P53* 基因突变。作为核转录因子,抑癌基因 *P53* 能上调 *P21* 等促进细胞死亡和生长抑制基因的表达,同时也可以下调凋亡抑制蛋白 *survivin* 等基因的表达,这种负性调节作用对诱导凋亡具有重要意义^[1]。*Survivin* 属于凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)家族,是肿瘤细胞中最为持续高表达的基因之一,不仅在肿瘤演变过程中起重要促进作用,而且与肿瘤放化疗耐受的产生密切相关^[2,3],因此抑制其表达具有重要的临床意义。由于野生型 *P53* 功能丧失和 *survivin* 表达过量均有利于肿瘤的发生发展,两者之间可能存在着功能性联系。为此,本研究以 *survivin* 特异性 siRNA 分别转染 *P53* 野生型 A549 细胞和 *P53* 缺失型 H1299 细胞,通过分析 *survivin* 沉默后的细胞生物学效应以及不同 *P53* 基因型对这些效应可能的影响,进而了解肺癌细胞中 *survivin* 与 *P53* 之间的联系,以及 *survivin* siRNA 在不同 *P53* 功能状态肺癌中的治疗意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

P53 野生型 A549 细胞和 *P53* 缺失型 H1299 细胞均由军事医学科学院基础所提供。四氮甲基唑蓝、二甲基亚砷为 Sigma 公司产品。脂质体 lipofectamineTM 2000、Opti-MEM[®] I Reduced Serum Medium 购自 invitrogen 公司。EASY-siRNA kit 购自上海基凯公司。一抗兔抗人 *P53* 单克隆抗体、鼠抗人 actin 单克隆抗体购自 Oncogene 公司,兔抗人 *P21* 多克隆抗体购自 Santa-Cruz biotechnology 公司,鼠抗人 *survivin* 单克隆抗体、兔抗人 PARP 单克隆抗体以及二抗 HRP 标记羊抗鼠 IgG、HRP 标记羊抗兔 IgG 均购自 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 siRNA 的合成与细胞转染

参照文献[1,4]的方法设计合成选择性靶向 *survivin* mRNA 外显子 1 的双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)序列,正义 GGACCACCGCAUCU-CUACAtt,反义 UGUAGAGAUGCGGUGGUCct。

A549 和 H1299 细胞各分为 3 组:未转染组、阴性对照 siRNA(N-siRNA)组和 siRNA 转染组,按每孔 2×10^5 个细胞接种至 6 孔板。24 h 后待细胞生

长至占板底约 70%~80% 时,以 lipofectamine 2000 为转染试剂,按照说明书以终浓度 100 nmol/L 的 siRNA 进行转染,6 h 后更换为 DMEM 全培养基,继续培养 48 h 收集细胞。实验重复 2 次。

1.3 MTT 法检测 siRNA 转染对细胞生长的抑制

调节细胞密度,以 $5 \times 10^3/200 \mu\text{l}$ 培养液接种于 96 孔板,每组 3 个复孔。24 h 后,分别以不同终浓度(25、50、100、200 nmol/L)进行转染,并于转染后 12、36、60、84、108、132 h 按常规方法^[5]进行 MTT 分析,以酶标仪在 540 nm 处测光密度(*D*)值。采用曲线回归模型拟合其量效关系,得到各时间点 *survivin* siRNA 半数抑制浓度(IC_{50})。抑制率(%)=(阴性对照组 *D* 值 - 实验组 *D* 值)/阴性对照组 *D* 值 \times 100%。

1.4 Western blotting 检测 siRNA 转染对 *survivin* 蛋白表达的影响

各组细胞分别加入蛋白裂解缓冲液提取总蛋白,以 60 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 上样,15% SDS-PAG 分离,通过电转移法将蛋白质转移到硝酸纤维素膜,在含 5% 脱脂奶粉 TBST 中室温封闭 1 h。加入一抗(*survivin*-1: 1 000、*P53*-1: 1 000、*P21*-1: 1 000、PARP-1: 1 000、 β -actin-1: 3 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 漂洗(10 min \times 3 次)后,加入二抗(HRP 标记羊抗鼠和羊抗兔 IgG,均为 1:2 000)室温孵育 1 h, TBST 充分漂洗(10 min \times 3 次),化学发光试剂反应 5 min, X 线片暗室曝光,常规显影定影。采用上海天能公司 GIS2D 分析软件进行图像分析,蛋白表达相对系数 = 目的蛋白光密度/ β -actin 蛋白光密度,相对抑制率(%) = [1 - (实验样品/实验内参)/(空白对照样品/空白对照内参)] \times 100%。

1.5 半定量 RT-PCR 检测 *survivin* mRNA 表达

采用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,紫外分光光度法检验纯度并定量。以 1 μg 总 RNA 为模板,逆转录合成 cDNA,PCR 扩增。RT-PCR:50 $^{\circ}\text{C}$ 逆转录 30 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,进行 32(*survivin*)或 26(β -actin)个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 充分延伸 10 min。以 β -actin 为内参照。引物均由英俊生物技术有限公司合成。*Survivin*(扩增产物 230 bp)引物序列:上游 5'-AGGTGGATGAG-GAGACAGA-3',下游 5'-GACAGATGTGAAGGTTGGG-3'; β -actin(扩增产物 613 bp)引物序列:上游 5'-GGCATCGTGATGGACTCCG-3',下游 5'-GCTG-GAAGGTGGACAGCGA-3'。取扩增产物 10 μl 行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,条带分析同 Western blotting。

1.6 流式细胞术检测细胞周期及凋亡率

消化收集未转染及以 siRNA(终浓度 100 nmol/L)转染 48 h 的 A549、H1299 细胞,PBS 洗 2 次(800 × g 离心 10 min),重悬细胞于 0.3 ml PBS(含 1% 胎牛血清),加入 0.7 ml 冷乙醇,混匀固定,-20 °C 保存。检测当天,离心去除冷乙醇,PBS 洗涤 2 次,用 300 μl PBS 重悬沉淀,加入 5 μl RNase A(1 mg/ml)37 °C 水浴 30 min,冰上终止反应,加入 400 μl PI(150 μg/ml)混匀,室温避光反应 20 min,上机检测。

1.7 统计学处理

应用 SPSS11.0 统计软件,单因素方差分析(one-way ANOVA)分析各组间差异的显著性。

2 结果

2.1 肺癌细胞株中 survivin 蛋白的表达

Western blotting 检测显示,A549 细胞中 survivin 表达量明显低于 H1299 细胞(图 1)。Survivin 蛋白相对系数分别为 A549(0.73 ± 0.003);H1299(2.7 ± 0.041),差异有统计学意义(P < 0.05)。



图 1 Western blotting 检测肺癌细胞中 survivin 蛋白表达

Fig.1 Expression of survivin protein in A549 and H1299 cells detected by Western blotting

1: A549 cells; 2: H1299 cells

2.2 Survivin siRNA 转染对肺癌细胞生长的抑制

根据表 1 和 2 结果计算,36 ~ 132 h 各时段 A549

细胞 IC₅₀ 值分别为 152.37、151.22、135.97、144.14、150.43 nmol/L,无明显差异;H1299 细胞 IC₅₀ 值分别为 348.27、244.82、167.55、161.4、154.15 nmol/L,36 ~ 60 h 的 IC₅₀ 值明显高于 84 ~ 132 h。两株细胞均以 200 nmol/L siRNA 抑制率最高,持续时间亦最长。不同浓度 survivin siRNA 对 A549 和 H1299 细胞生长抑制作用存在显著差异(P < 0.05)。A549 细胞在转染 12 h 时即表现出明显抑制效应(抑制率为 37.59%),36 h 时抑制率已接近最高(为 71.46%),持续至 132 h 时抑制率仍高达 79.29%,增殖几乎处于停滞状态。H1299 细胞 36 h 时抑制率只有 30.05%,84 h 才超过半数抑制时间,此后一直以大于 50% 的抑制率持续至 132 h(84、108、132 h 的抑制率分别为 55.73%、56.50%、58.19%)。

2.3 siRNA 对肺癌细胞中 survivin mRNA 的抑制

RT-PCR 结果显示,各组细胞于 230 bp 处均可见 survivin 电泳条带,但亮度存在明显差异,siRNA 组电泳条带亮度明显弱于未转染组以及 N-siRNA 组,siRNA 组的 A549 细胞和 H1299 细胞 survivin mRNA 抑制率分别为 53.72%、42.81%,而各组内参 β-actin 表达相似(图 2)。

2.4 siRNA 对肺癌细胞中 survivin、P53、P21 和 PARP 等蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果显示,A549 和 H1299 各组细胞 β-actin 杂交带亮度相似,siRNA 转染组的 survivin 蛋白条带明显弱于未转染组及 N-siRNA 组(P < 0.05),A549 细胞和 H1299 细胞表达抑制率分别为 100% 和 85.44%。Survivin siRNA 作用后 A549 细胞中野生型 P53、P21 蛋白表达明显增加,PARP 发生了部分裂解;H1299 细胞中这些表达变化却不明显(图 3)。

表 1 不同浓度 survivin siRNA 转染 A549 细胞 12 ~ 132 h 的 D₅₀ 值

Tab. 1 D₅₀ values of A549 treated by survivin siRNA at different concentrations 12-132 h after transfection (x̄ ± s)

Group	0 h	12 h	36 h	60 h	84 h	108 h	132 h
Control	0.25 ± 0.02	0.41 ± 0.02	0.48 ± 0.01	0.55 ± 0.01	0.69 ± 0.02	0.85 ± 0.02	1.00 ± 0.05
25 nmol/L	0.25 ± 0.02	0.35 ± 0.03	0.54 ± 0.03	0.64 ± 0.02	0.80 ± 0.03	0.92 ± 0.04	1.11 ± 0.04
50 nmol/L	0.25 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.45 ± 0.02	0.51 ± 0.04	0.66 ± 0.02	0.77 ± 0.03	0.94 ± 0.05
100 nmol/L	0.25 ± 0.02	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.35 ± 0.02*	0.37 ± 0.02**	0.46 ± 0.02*	0.64 ± 0.01*
200 nmol/L	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01**	0.11 ± 0.02**	0.13 ± 0.01**	0.20 ± 0.02**

* P < 0.05, ** P < 0.01 vs control group

表 2 不同浓度 *survivin* siRNA 转染 H1299 细胞 12~132 h 的 D_{540} 值

Tab. 2 D_{540} values of H1299 treated by *survivin* siRNA at different concentrations 12-132 h after transfection($\bar{x} \pm s$)

Group	0 h	12 h	36 h	60 h	84 h	108 h	132 h
Control	0.51 ± 0.01	0.59 ± 0.02	0.93 ± 0.03	1.17 ± 0.02	1.41 ± 0.05	1.50 ± 0.02	1.58 ± 0.04
25 nmol/L	0.51 ± 0.01	0.54 ± 0.02	0.85 ± 0.03	1.04 ± 0.05	1.19 ± 0.04	1.23 ± 0.04	1.30 ± 0.07
50 nmol/L	0.51 ± 0.01	0.56 ± 0.02	0.82 ± 0.02	0.99 ± 0.03	1.04 ± 0.03	1.08 ± 0.01	1.10 ± 0.02
100 nmol/L	0.51 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.76 ± 0.02	0.91 ± 0.03	0.93 ± 0.03*	0.94 ± 0.04*	0.96 ± 0.05*
200 nmol/L	0.51 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.66 ± 0.03*	0.70 ± 0.02*	0.63 ± 0.02**	0.65 ± 0.02**	0.66 ± 0.03**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

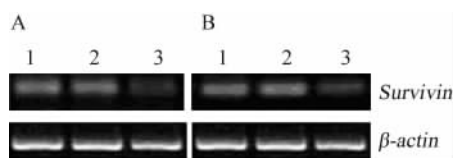


图 2 RT-PCR 检测 siRNA 干扰前后肺癌细胞中 *survivin* 基因转录水平

Fig. 2 Effect of siRNA on endogenous *survivin* mRNA level in lung cancer cells detected by RT-PCR

A: A549 cells; B: H1299 cells; 1: Control group; 2: N-siRNA group; 3: siRNA group

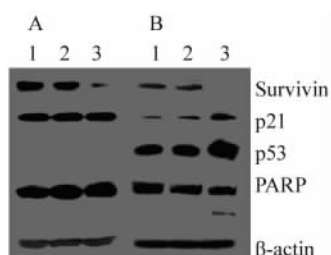


图 3 Western blotting 检测 siRNA 干扰前后 *survivin*、*P53*、*P21* 和 *PARP* 等蛋白的表达

Fig. 3 Expressions of *survivin*, *P53*, *P21* and *PARP* protein in different groups detected by Western blotting

A: H1299 cells; B: A549 cells; 1: Control group; 2: N-siRNA group; 3: siRNA group

2.5 siRNA 对肺癌细胞周期与凋亡的影响

如图 4 所示, 100 nmol/L siRNA 转染 24 h 后, A549 细胞有一定比例亚二倍峰即凋亡峰出现(对照组 0.47%, 转染组 4.78%); G_1 期、 G_2/M 期比例分别由 59.02%、8.76% 增至 71.38%、12.98%; S 期比例有所减少, 由 32.22% 降至 15.65%。

H1299 细胞 S 期比例减少较为显著, 由 44.28% 降至 15.35%, G_1 期比率由 44.6% 增至 75.81%, 但 G_2/M 期比例却有所减少, 由 11.12% 降

至 8.84%, 亚二倍峰比例几乎没有改变。*Survivin* siRNA 对 H1299 的作用可能主要是通过影响细胞周期实现的。

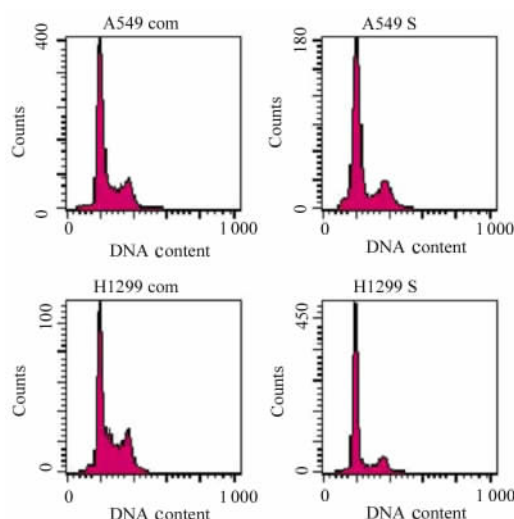


图 4 *Survivin* siRNA 转染 24 h A549 和 H1299 细胞周期及细胞凋亡的改变

Fig. 4 Effect of *survivin* siRNA on apoptosis and cell cycle of A549 and H1299 cells at 24 h after transfection

3 讨论

P53、*survivin* 在肺癌组织中的表达及临床意义已得到许多研究的证实。非小细胞肺癌中 *P53* 表达异常高达 60%, 不仅参与了恶性肿瘤形成, 亦参与了肿瘤细胞的耐药, 可以作为判定肿瘤疗效和预后的指标^[6]。*Survivin* 与肺癌细胞的凋亡与增殖密切相关, 其阳性表达患者亦存在生存期短、复发率高、对放化疗耐受的现象^[7-9]。已有报道^[7,10], *Survivin* 过表达和野生型 *P53* 功能丧失是与肿瘤发生发展相关的共同事件, 两者间可能存在功能性联系, 在肺癌组织中有明确的相关性。

研究证明 *survivin* 启动子区域的两个 *P53* 结合位点: -1317 ~ -1294 和 -29 ~ -7, 它们是体内转录抑制 *survivin* 所必须, *P53* 能以序列特异性方式结合 *survivin* 启动子。Xia 等^[11] 同时在 *P53* 阳性和阴性的 HCT116 细胞中转染同等量 *survivin*, 结果表明 *P53* 阴性细胞中 *survivin* 表达量的增加是 *P53* 阳性细胞的 10 倍, 重新转染野生型 *P53* 可使 *P53* 阴性细胞中, *survivin* 的表达大幅度减少。Ikeda 等^[12] 也报道紫外线诱导的 A549 细胞中, *survivin* 表达下调有赖于 *P53* 的积聚。本研究亦发现 *P53* 野生型 A549 细胞中内源性 *survivin* 表达量明显低于 *P53* 缺失的 H1299 细胞; 以同样条件转染有效浓度的 *survivin* siRNA, A549 细胞生长能被迅速抑制, 而 H1299 细胞则起效较缓, 但是一定作用时间后, 两株细胞的增殖均呈现出持续抑制状态。结果提示 *P53* 基因型对 *survivin* siRNA 干扰效果有一定影响, 但 *survivin* siRNA 对肺癌细胞的生长抑制作用并不完全受 *P53* 功能状态调控, 它亦可引起非 *P53* 依赖性生长抑制, 从而增强了靶向 *survivin* 治疗肺癌的适应性。

利用流式细胞术分析干扰 *survivin* 表达对肺癌细胞周期影响时发现, 不同细胞中比较一致的结果是 G_1 期比例的增加和 S 期比例相应地减少。Suzuki 等^[13] 曾报道 *survivin* 能置换 Cdk4/p16NK4a 复合物中的 p16NK4a, 形成 *survivin*/Cdk4 复合物, 进而激活 Cdk2/Cyclin E, 导致 Rb 蛋白磷酸化, 以启动细胞周期, 并使细胞迅速从 G_1 期过渡到 S 期, 从而促进细胞增殖。Yang 等^[14] 也指出 *survivin* 是细胞增殖而不是细胞生存所必需的。*Survivin* 基因表达沉默后, 可能正是这种驱动细胞快速分裂作用的丧失, 在细胞生长抑制中起了关键性作用。

虽然 *survivin* 是作为凋亡抑制蛋白被认识的, 但沉默 *survivin* 表达对凋亡产生的效应却不尽相同。Uchida 等^[15] 的研究证明, 干扰 *survivin* 能使多种肿瘤细胞凋亡加速。Lu 等^[16] 亦表明 *survivin* siRNA 能有效诱导肿瘤细胞凋亡。但 Ling 等^[17] 得出的结论却是 *survivin* 表达受抑只能选择性诱导转染肿瘤细胞的凋亡。Okada 等^[18] 更是对 *survivin* 的调节凋亡作用提出质疑, 他们认为 *survivin* 缺失并不能诱导前列腺癌细胞 DN3E 自发性凋亡, 也不能增加细胞对外源性凋亡刺激物的敏感性, 只能触发高增殖状态 DN 细胞的死亡。Carvalho 等^[4] 的实验亦表明 *survivin* 是细胞有效完成细胞分裂所必需的, 但对阻止凋亡的作用很有限。本实验中, siRNA 介导的 *survivin* 表达下调就其本身而言可能不足以诱导肿瘤细胞凋亡, 但是可通过激活 *P53* 依赖性凋亡途径引

发凋亡。具体表现为 H1299 细胞在 *survivin* siRNA 作用后, 不论是流式细胞术检测凋亡比例, 还是 Western blotting 检测 PARP 裂解情况, 都没有发现明显变化, 而 A549 却有一定数量细胞出现凋亡。提示在肿瘤细胞凋亡过程中, 影响因素较多, 诱使不同细胞株凋亡的途径也不尽相同, 即使针对同一靶标位点的 siRNA 所能发挥的效应也可能不同。

不同的 *P53* 基因对 *survivin* siRNA 抑制肺癌细胞生长和诱导凋亡的影响不仅反映了野生型 *P53* 对 *survivin* 具有负调控作用, 同时也反映了 *survivin* 可能也存在对 *P53* 的反向调节作用。与这一推论相对应的是 Western blotting 结果也表明, 随着 *survivin* 表达下调, 野生型 *P53* 蛋白表达明显增加。可能的解释是 siRNA 作用后, 解除了 *survivin* 对 *P53* 表达的抑制, 激活了 *P53* 依赖性反应, 进一步阻滞细胞增殖, 诱导肿瘤细胞凋亡。同时从另一个角度也提示 *survivin* 至少参与了 *P53* 依赖的细胞增殖和凋亡通路。*Survivin* 与 *P53* 之间可能存在一个调节环路, 两者互为影响因素^[7]。

本实验结果中, 细胞周期抑制因子 P21 表达与 *P53* 是平行的, *survivin* siRNA 在引起 *P53* 增量的同时也上调了 P21 的表达, 这与 Okada 等^[18] 的研究是相似的。提示 P21 可能在 *P53* 与 *survivin* 的相互调节中起了一定作用。已有研究指出, *P53* 可以通过间接诱导 P21 表达, 抑制 RB 蛋白磷酸化, 进而结合转录激活因子 E2F, 形成 pRB-E2F 复合物, 以抑制 *survivin* 表达。但 *P53* 与 *survivin* 之间相互作用的确切机制还不很清楚, 对此机制的进一步了解, 可能为肿瘤诊断、预后和治疗方法的选择提供重要线索。

总之, 本实验中化学合成的 *survivin* siRNA 能有效下调 *survivin* 基因和蛋白表达, 从而显著抑制了肿瘤细胞体外增殖, 对肿瘤细胞凋亡亦有一定诱导作用。*P53* 基因型对 *survivin* siRNA 干扰效果有一定影响, 但是 *survivin* siRNA 对肺癌细胞生长抑制作用并不完全受 *P53* 功能状态控制, 不仅可以触发 *P53* 介导的细胞死亡, 也可以引起非 *P53* 依赖性生长阻滞, 在肺癌治疗中具有重要的临床意义。

[参 考 文 献]

- [1] Beltrami E, Plescia J, Wilkinson JC, et al. Acute ablation of *survivin* uncovers p53-dependent mitotic checkpoint functions and control of mitochondrial apoptosis[J]. J Biol Chem, 2004, 279 (3): 2077-2084.
- [2] Chen W, Wang X, Zhuang J, et al. Induction of death receptor 5 and suppression of *survivin* contribute to sensitization of TRAIL-induced cytotoxicity by quercetin in non-small cell lung cancer

- cells[J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(10): 2114-2121.
- [3] Saito T, Hama S, Izumi H, *et al.* Centrosome amplification induced by survivin suppression enhances both chromosome instability and radiosensitivity in glioma cells[J]. *Br J Cancer*, 2008, 98(2): 345-355.
- [4] Carvalho A, Carmena M, Sambade C, *et al.* Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells[J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(14): 2987-2998.
- [5] 张 辉, 赵 群, 左连富, 等. CIK 细胞联合顺铂对卵巢癌耐药细胞 SKOV3/CDDP 的杀伤作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14(4): 381-384.
- [6] 芮 萌, 李龙芸, 刘长庭. 几项生物学指标与肺癌患者 5 年生存率的相关性分析[J]. *中国临床康复*, 2006, 28(10): 67-69.
- [7] Wang Z, Fukuda S, Pelus LM. Survivin regulates the p53 tumor suppressor gene family[J]. *Oncogene*, 2004, 23(49): 8146-8153.
- [8] Ulukus EC, Kargi HA, Sis B, *et al.* Survivin expression in non-small-cell lung carcinomas: correlation with apoptosis and other apoptosis-related proteins, clinicopathologic prognostic factors and prognosis[J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2007, 15(1): 31-37.
- [9] Akyürek N, Memis L, Ekinci O, *et al.* Survivin expression in pre-invasive lesions and non-small cell lung carcinoma[J]. *Virchows Arch*, 2006, 449(2): 164-170.
- [10] Nakanishi K, Kawai T, Kumaki F, *et al.* Survivin expression in atypical adenomatous hyperplasia of the lung[J]. *Am J Clin Pathol*, 2003, 120(5): 712-719.
- [11] Xia F, Altieri DC. Mitosis-independent survivin gene expression *in vivo* and regulation by p53[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(7): 3392-3395.
- [12] Ikeda M, Okamoto I, Tamura K, *et al.* Down-regulation of survivin by ultraviolet C radiation is dependent on p53 and results in G₂-M arrest in A549 cells[J]. *Cancer Lett*, 2007, 248(2): 292-298.
- [13] Suzuki A, Hayashida M, Ito T, *et al.* Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16INK4 and Cdk2/Cyclin E complex activation[J]. *Oncogene*, 2000, 19(29): 3225-3234.
- [14] Yang D, Welm A, Bishop JM. Cell division and cell survival in the absence of survivin[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(42): 15100-15105.
- [15] 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.
- [16] Lu YH, Luo XG, Tao X. Survivin gene RNA interference induces apoptosis in human HL60 leukemia cell lines[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2007, 22(6): 819-825.
- [17] Ling X, Li F. Silencing of antiapoptotic survivin gene by multiple approaches of RNA interference technology[J]. *Biotechniques*, 2004, 36(3): 450-454, 456-460.
- [18] Okada H, Bakal C, Shahinian A, *et al.* Survivin loss in thymocytes triggers p53-mediated growth arrest and p53-independent cell death[J]. *J Exp Med*, 2004, 199(3): 399-410.
- [收稿日期] 2008 - 08 - 24 [修回日期] 2008 - 10 - 26
[本文编辑] 郁晓路

· 科技动态 ·

宿主细胞 microRNAs 对潜伏于静息初始 CD4⁺ T 细胞中 HIV-1 病毒的作用

microRNAs 是参与靶基因转录后调控的一类非编码小 RNA, 它们可分别来源于宿主细胞 RNA 或病毒 RNA。研究证实, 病毒编码的 microRNAs 可靶向宿主细胞或病毒自身基因, 调控其表达而实现免疫逃逸和相关致病作用; 而宿主细胞编码的 microRNAs 在抗病毒感染过程存在防御作用, 但亦有研究发现宿主细胞 microRNAs 在病毒感染复制中起促进作用, 如 miR-122 和 HCV 感染。艾滋病患者的临床治疗是个世界难题。HIV-1 病毒潜伏于静息性初始 CD4⁺ T 淋巴细胞是艾滋病患者接受临床治疗方案 HAART 最终失败的主要原因。其中, HIV-1 的潜伏存在作用于病毒生命周期多个环节的多种因素的影响。本论文作者向我们展示了在基因转录后水平宿主细胞 microRNAs 在其中发挥的作用。

作者通过一系列的实验证明静息初始 CD4⁺ T 细胞中存在一组细胞特异性高表达的细胞 microRNAs(与活化 CD4⁺ T 细胞相比较), 它们可抑制感染细胞中 HIV-1 病毒的产生。HIV-1 病毒基因组 RNA 的 3' 末端区域存在一些 microRNAs(包括 miR-28、miR-125b、miR-223 和 miR-382) 的作用靶点, 这些小 RNA 可通过翻译抑制的作用机制实现对 HIV-1 复制的负向调节。进一步实验显示, 在模拟 HIV-1 感染模型中(静息 CD4⁺ T 细胞转染包含 HIV-1 基因组克隆载体) 使用 microRNAs 的特异性抑制剂消除这些小 RNA 的抑制效应之后, 可检测到 HIV-1 相关蛋白翻译上调, HIV-1 复制和产生增加, 从而破除了 HIV-1 的潜伏现象。更重要的是, 此结果在确证存有 HIV-1 前病毒插入的临床接受 HAART 治疗的艾滋病患者来源细胞中也得到了重复和验证。

综上所述, 作者首次发现了宿主细胞 microRNAs 在 HIV-1 感染潜伏中参与的重要作用, 并为寻找治疗艾滋病新的作用靶点提供了重要依据。

[林 莉摘译, 侯 晋审阅. Huang JL, Wang FX, Argyris EA, *et al.* *Nat Med*, 2007, 13(10): 1241-1247]