

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.04.010

共表达 ENDO-VEGI₁₅₁ 和 survivin-siRNA 双功能质粒的构建及其抗瘤活性

李喆¹, 石林祥¹, 杨生生^{2,Δ}, 常涛¹, 房林¹, 方国恩³(1. 同济大学附属第十人民医院 甲状腺乳腺外科, 上海 200072; 2. 第二军医大学 生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433; 3. 第二军医大学 附属长海医院 普通外科, 上海 200433)

[摘要] 目的: 构建 pCDNA3.1-ENDO-VEGI₁₅₁/survivin-shRNA (pEV/si-survivin) 双功能表达质粒, 观察其对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和人脐静脉血管内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUEVC) 增殖和凋亡的影响, 探讨其治疗肿瘤的可行性。方法: 利用 MDA-MB-231 细胞筛选获得 survivin 的高效 siRNA 序列, 构建 pEV/si-survivin 表达质粒并分别转染 MDA-MB-231 和 HUEVC, 以 real-time PCR 和 Western blotting 检测转染细胞中 ENDO-VEGI₁₅₁ 和 survivin 的表达; MTT 法检测细胞增殖抑制情况, 流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡。结果: 成功构建 pEV/si-survivin 双功能表达质粒, 并能在 MDA-MB-231 和 HUEVC 中正确表达相应基因产物。该质粒可明显抑制 MDA-MB-231 细胞内 survivin 的表达, 并抑制细胞增殖 [48、72 h 的抑制率为 (39.36 ± 4.16)%、(48.43 ± 3.49)%], 促进 MDA-MB-231 细胞凋亡 [(18.33 ± 1.48)% vs (4.80 ± 1.01)%], $P < 0.01$ 和细胞周期阻滞 ($P < 0.05$); 该质粒也明显抑制 HUEVC 的增殖 [(48、72 h 的抑制率为 (38.16 ± 3.37)%、(53.75 ± 4.53)%], 并促进 HUEVC 凋亡和细胞周期阻滞 ($P < 0.05$)。结论: 成功构建的 pEV/si-survivin 双功能表达质粒可以同时发挥抑制新生血管生成和促肿瘤细胞凋亡的作用, 提高抗肿瘤的效果。

[关键词] 乳腺癌; survivin; 抗血管生成; 凋亡; 基因治疗

[中图分类号] R737.9; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)04-0394-06

Construction of dual function plasmid co-expressing ENDO-VEGI₁₅₁ and survivin-siRNA and its anti-tumor activity

LI Zhe¹, SHI Lin-xiang¹, YANG Sheng-sheng^{2,Δ}, CHANG Tao¹, FANG Lin¹, FANG Guo-en³(1. Department of Thyroid and Breast Surgery, The 10th People's Hospital of Shanghai, Tongji University, Shanghai 200072, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a dual function expressional plasmid pCDNA3.1-ENDO-VEGI₁₅₁/survivin-shRNA (pEV/si-survivin), and study its effect on the proliferation and apoptosis of breast cancer MDA-MB-231 cells and vascular endothelial cells (HUEVCs), so as to evaluate its feasibility for gene therapy of cancer. **Methods:** The efficient siRNA sequences targeting survivin was screened in MDA-MB-231 cells; the pEV/si-survivin expression vector was constructed and transfected into MDA-MB-231 and HUEVC cells, and the expression levels of ENDO-VEGI₁₅₁ and survivin were detected by the real-time PCR and Western blotting analysis; MTT assay was used to detect the proliferation inhibition in the cells of the two groups after transfection; and flow cytometry was used to detect the changes of cell cycles and apoptosis. **Results:** The dual function recombinant plasmid pEV/si-survivin was successfully constructed and it was correctly expressed in both MDA-MB-231 and HUEVC cells. The plasmid significantly inhibited the expression of survivin and the cell proliferation (inhibition rate being [39.36 ± 4.16]% at 48 h and [48.43 ± 3.49]% at 72 h); it also significantly promoted cell apoptosis ([18.33 ± 1.48]% vs [4.80 ± 1.01]%, $P < 0.01$) and induced cell cycles arrest ($P < 0.05$) in MDA-MB-231 cells. The

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 51003078); 上海市卫生局科研课题 (No. 2008133)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 51003078), and the Science Research Foundation of Health Bureau of Shanghai (No. 2008133)

[作者简介] 李喆 (1974 -), 男, 天津市人, 博士, 副主任医师, 主要从事乳腺癌的基础和临床研究。E-mail: gsf2005@yahoo.com.cn; 杨生生 (1976 -), 男, 上海市人, 博士生, 主要从事分子生物学研究。E-mail: ysscn@126.com。Δ 为共同第一作者

[通信作者] 石林祥 (SHI Lin-xiang, corresponding author), E-mail: shilx5212@yahoo.com.cn

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110714.1100.005.html>

plasmid also significantly inhibited cell proliferation (inhibition rate being [38. 16 ± 3. 37]%) at 48 h and [53. 75 ± 4. 53]% at 72 h), promoted apoptosis, and arrested the cell cycles ($P < 0.05$) in HUEVC cells. **Conclusion:** The dual function expressional plasmid pEV/si-survivin possess both angiogenesis inhibition and apoptosis promotion functions, and is expected to exert synergistic effect *in vivo* to improve the therapeutic outcome for patients with cancer.

[**Key words**] breast cancer; survivin; anti-angiogenesis; apoptosis; gene therapy

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(4): 394-399]

恶性肿瘤是威胁人类健康的主要疾病,病死率极高,传统治疗方法的效果仍不理想。血管内皮细胞抑制素(endostatin)是细胞外基质胶原Ⅲ羧基末端片段,能够特异性地抑制新生血管内皮细胞增殖、迁移,发挥抗血管生成作用^[1]。血管内皮细胞抑制因子(vascular endothelial cell growth inhibitor, VEGI)是 TNF 超家族成员,为 II 型跨膜蛋白,由 174 个氨基酸组成,可以通过直接杀伤肿瘤细胞、抑制内皮细胞增殖、刺激树突状细胞成熟,而发挥抗癌作用^[2]。课题组前期研究^[3-4]表明,将去除 N 端胞内区及跨膜区 25 个疏水氨基酸后的 VEGI₁₅₁ 和 endostatin 融合表达(ENDO-VEGI₁₅₁),可以阻断肿瘤血管生成的不同环节,获得更强的抗肿瘤血管生成活性。生存素(survivin)是细胞凋亡抑制分子,广泛表达于人类各种肿瘤组织中,且其表达水平与肿瘤的侵袭性和预后有关,是肿瘤基因治疗的理想靶标^[5]。本研究通过构建 ENDO-VEGI₁₅₁ 和 survivin-siRNA 双功能表达质粒来实现抗血管生成和促肿瘤细胞凋亡双重治疗策略的联合作用,探讨有效的联合基因治疗模式。

1 材料与方法

1.1 主要材料

携带有 ENDO-VEGI₁₅₁ 融合基因的腺病毒载体 pCA13-ENDO-VEGI₁₅₁^[3-4] 以及 pSilencerTM 2.1-U6 neo 和 pCDNA3.1 载体由本课题组保存。兔抗人 Survivin 多克隆抗体购于 Santa Cruz 公司,β-actin 抗体购于 Sigma 公司。pMD18-T 载体、限制性内切酶、

反转录和 real-time PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司, TRIzol、LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司, RPMI 1640 培养基和胎牛血清购于 Hyclone 公司。siRNA 由上海吉玛制药技术有限公司合成,PCR 引物和 survivin-shRNA 的 cDNA 由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.2 细胞的培养和转染

人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUEVC)购于上海中科院细胞所,均用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液,在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。细胞转染方法参照转染试剂 LipofectamineTM 2000 的说明书进行。以 6 孔板为例,转染前 24 h,细胞以 1 × 10⁶/孔传代至 6 孔培养板,当细胞汇合度达到 70% 时进行转染,siRNA 或质粒 DNA 与 LipofectamineTM 2000 的使用比例为 4 μg: 8 μl。

1.3 高效 survivin-siRNA 片段的筛选

根据 GenBank 中 survivin mRNA 的全长序列(NM_001168, GeneID_332),遵循 siRNA 的设计原则,利用 ABI 公司的 siRNA Target Finder 软件(http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)设计出 3 对 survivin-siRNA 序列并化学合成。将 3 对 survivin-siRNA 和阴性对照 scramble-siRNA 转染 MDA-MB-231 细胞 36 h 后,利用 real-time PCR 检测 survivin 表达的抑制情况。进一步应用 Western blotting 检测高效 survivin-siRNA 对 survivin 蛋白表达的影响。siRNA 序列和 real-time PCR 引物序列见表 1。

表 1 siRNAs 及 PCR 引物序列
Tab. 1 Sequence of siRNAs and PCR primers

Symbol	Forward 5'—3'	Reverse 5'—3'
Survivin-siRNA-1	GGACCACCGCAUCUCUACATT	UGUAGAGAUGCGGUGGUCCTT
Survivin-siRNA-2	GCAUUCGUCCGGUUGCGCUTT	AGCGCAACCGGACGAAUGCTT
Survivin-siRNA-3	CUGGACAGAGAAAGAGCCATT	UGGCUCUUUCUCUGUCCAGTT
Scramble-siRNA	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
Survivin	TTCTCAAGGACCACCGCATCT	GGTCGTCATCTGGCTCCCA
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

1.4 双功能表达质粒的构建及鉴定

根据筛选出的高效 survivin-siRNA 的序列,设计并合成 survivin shRNA 的 cDNA 序列,并在两端添加 *Bgl* II 和 *Hind* III 酶切位点: 5'-GATCTGCATTCGTCGGTTGCGCTTTCAAGACGAGCGCAACCGGACGAATGCTTTTTTGGAAA-3' 和 5'-AGCTTTTCCAAA AAAGCATTCGTCGGTTGCGCTCGTCTTGAAGCGCAACCGGACGAATGCA-3'; 退火拼接, 插入至质粒 pSilencer™2.1-U6 neo 相应的 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点。以该质粒为模板, PCR 扩增包含 U6 启动子的 survivin-shRNA 的片段(396 bp), 并在两端添加 *Nsi* I 和 *Sal* I 酶切位点, 与 pMD18-T 载体连接。PCR 引物为: P1-CCATGCATCCCCAGTGGAAAGACGC, P2-CGGTCGACTTCCAAAAAGCATTCGTC。利用 *Nsi* I 和 *Sal* I 双酶切获得 U6/survivin-shRNA 表达框, 并插入质粒 pcDNA3.1 相应位点, 构建获得 pcDNA-U6/survivin-shRNA(psi-survivin)质粒。

利用 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切 pCA13-ENDO-VEGI₁₅₁ 质粒^[3-4] 获得 ENDO-VEGI₁₅₁ 的 cDNA 片段, 分别插入至质粒 pcDNA3.1 和已构建好质粒 psi-survivin 的相应酶切位点, 获得 pcDNA-ENDO/VEGI₁₅₁ (pEV) 质粒和 pcDNA-ENDO-VEGI₁₅₁/U6/survivin-shRNA(pEV/si-survivin) 质粒。

将构建好的质粒 psi-survivin、pEV、pEV/si-survivin 和 pcDNA3.1 分别转染 MDA-MB-231 细胞 48 h 后, 抽提细胞总 RNA 和总蛋白, 利用 real-time PCR 和 Western blotting 检测 ENDO-VEGI₁₅₁ 和 survivin 的表达情况。ENDO-VEGI₁₅₁ 的 PCR 引物为 P1-CCATCTACCTCGGAGCCATGT, P2-ACTGACGTTAC CATTAGCTTGTC, survivin 的 PCR 引物同前。兔抗人 VEGI₁₅₁ 多克隆抗体由第二军医大学微生物教研室张珉博士惠赠。

1.5 MTT 法检测 pEV/si-survivin 对 MDA-MB-231 和 HUEVC 增殖的影响

对数生长期 MDA-MB-231 或 HUEVC 细胞以 0.5×10^5 /孔接种 96 孔板, 当细胞融合度达到 80% 左右时进行转染。实验共分为 4 组: pcDNA3.1 组、psi-survivin 组、pEV 组和 pEV/si-survivin 组, 每组设 5 个复孔, 转染方法同前。分别在转染后 48 h 和 72 h, 加入 5 g/L 的 MTT 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 4 h, 弃培养液, 每孔加 100 μ l DMSO, 震荡 10 min, 完全溶解后酶标仪检测 D_{570} 。实验重复 3 次, 计算各组抑制率。抑制率(%) = (对照组 D_{570} - 实验组 D_{570}) / 对照组 $D_{570} \times 100\%$ 。

1.6 流式细胞术检测 pEV/si-survivin 对 MDA-MB-

231 和 HUEVC 细胞周期的影响

对数生长期 MDA-MB-231 或 HUEVC 细胞以 2×10^5 /孔接种 6 孔板, 当细胞融合度达到 80% 进行转染, 实验分组及转染方法同前。细胞转染 48 h 后, 胰酶消化收集细胞, PBS 洗涤 2 次, -20 $^{\circ}$ C 预冷 70% 乙醇固定, 置于 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 洗涤 2 次, 离心, 加入 PI 和 RNase(终质量浓度均为 50 μ g/ml) 避光染色 30 min, 进行流式细胞仪检测。

1.7 流式细胞术检测 MDA-MB-231 和 HUEVC 细胞凋亡

MDA-MB-231 或 HUEVC 细胞培养、实验分组和转染方法同前。收集各组细胞, 用 PBS 洗涤 2 次, 加入 500 μ l 的结合缓冲液悬浮细胞; 加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI 混匀后, 室温避光反应 10 min, 进行流式细胞仪检测。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS14.0 软件, 各组间差异显著性比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 高效 survivin-siRNA 的筛选和鉴定结果

分别将 scramble-siRNA、survivin-siRNA-1、survivin-siRNA-2 和 survivin-siRNA-3 转染 MDA-MB-231 细胞 36 h 后, 以 GAPDH 作为内参基因, 用 real-time PCR 检测细胞内 survivin mRNA 表达变化。结果发现, siRNA-2 的干扰效率最高, 抑制率可达 75%, 故以 siRNA-2 作为有效干扰序列。Western blotting 结果(图 1)表明, 用 siRNA-2 转染 MDA-MB-231 细胞后, 随转染时间延长, survivin 蛋白的表达量明显下降。

2.2 双功能表达质粒的酶切鉴定

将 psi-survivin、pEV、pEV/si-survivin 重组质粒分别用相应限制性内切酶酶切后, 进行琼脂糖凝胶电泳。结果表明, 质粒 psi-survivin 用 *Nsi* I 和 *Sal* I 双酶切得到大小为 3 991 bp 和 396 bp 的片段; 质粒 pEV 经 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切得到大小为 5 410 bp 和 1 114 bp 的片段; 质粒 pEV/si-survivin 经 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切得到大小为 4 369 bp 和 1 114 bp 的片段, 均与预期的一致。

2.3 pEV/si-survivin 质粒转染后 MDA-MB-231 细胞中 survivin 和 ENDO-VEGI₁₅₁ 的表达

质粒 psi-survivin、pEV、pEV/si-survivin 和 pcDNA3.1 分别转染 MDA-MB-231 细胞 48 h 后, real-time PCR 检测结果显示, 与 pcDNA3.1 和 pEV 组比较, psi-

survivin 和 pEV/si-survivin 组 MDA-MB-231 细胞中 survivin mRNA 表达明显减弱 ($P < 0.01$); 与 pcDNA3.1 和 psi-survivin 组比较, pEV 和 pEV/si-survivin 组的 ENDO-VEGI₁₅₁ mRNA 表达明显增加 ($P < 0.01$)。Western blotting 检测结果显示, psi-survivin 和 pEV/si-survivin 能有效抑制 MDA-MB-231 细胞中 survivin 的表达, 仅在 pEV 和 pEV/si-survivin 组中检测到 ENDO-VEGI₁₅₁ 融合蛋白的表达 (图 3)。由此说明, 构建的重组质粒能正确表达相应的基因产物。

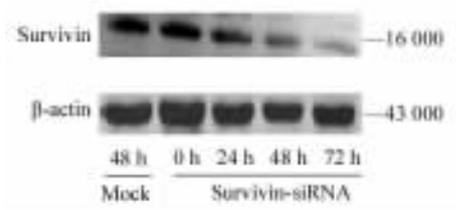


图 1 Survivin-siRNA 抑制 MDA-MB-231 细胞中 survivin 基因的表达

Fig. 1 Survivin-siRNA inhibited survivin gene expression in MDA-MB-231 cells

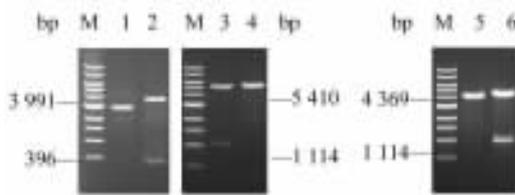


图 2 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmids by restriction enzyme digestion

M: 1kb DNA marker; 1: psi-survivin; 2: psi-survivin digested by *Nsi* I and *Sal* I; 3: pEV digested by *Hind* III and *Bam* H I; 4: pEV; 5: pEV/si-survivin; 6: pEV/si-survivin digested by *Hind* III and *Bam* H I

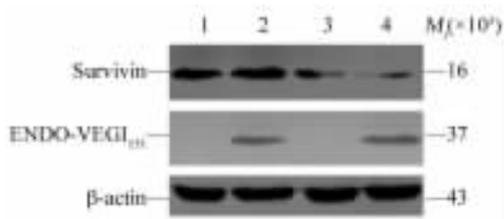


图 3 不同质粒转染后 MDA-MB-231 细胞中 survivin 和 ENDO-VEGI₁₅₁ 的表达

Fig. 3 Expressions of survivin and ENDO-VEGI₁₅₁ in MDA-MB-231 cells transfected with different recombinant plasmids

1: pcDNA3.1; 2: pEV; 3: psi-survivin; 4: pEV/si-survivin

2.4 pEV/si-survivin 转染抑制 MDA-MB-231 和 HUVEC 细胞的增殖

MTT 法检测各重组质粒对 MDA-MB-231 和 HUVEC 细胞增殖的影响, 结果 (图 4) 显示, 转染后 48 h 和 72 h, psi-survivin 组 MDA-MB-231 细胞增殖抑制率分别为 (34.75 ± 3.57)% 和 (62.66 ± 5.18)%, pEV/si-survivin 组为 (39.36 ± 4.16)% 和 (48.43 ± 3.49)%, 两者明显高于 pEV 组的 (7.08 ± 0.82)% 和 (10.96 ± 0.91)% ($P < 0.01$)。转染后 48 h 和 72 h, pEV 组 HUVEC 细胞增殖抑制率分别为 (41.23 ± 2.35)% 和 (58.62 ± 3.17)%, pEV/si-survivin 组为 (38.16 ± 3.37)% 和 (53.75 ± 4.53)%, 两者明显高于 psi-survivin 组的 (6.53 ± 0.84)% 和 (11.29 ± 0.91)% ($P < 0.01$)。由此可见, 双功能质粒 pEV/si-survivin 在 MDA-MB-231 和 HUVEC 细胞中表达出的 survivin siRNA 可以明显抑制乳腺癌细胞的增殖, 表达出的 ENDO-VEGI₁₅₁ 蛋白可以抑制血管内皮细胞增殖, 具有双重活性。

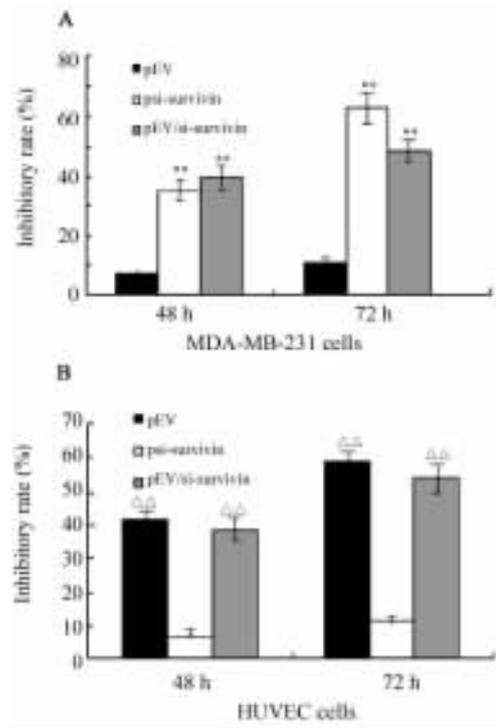


图 4 不同质粒对 MDA-MB-231 和 HUVEC 细胞的抑制作用
Fig. 4 Inhibitory effects of different plasmids on proliferation of MDA-MB-231 and HUVEC cells

** $P < 0.01$ vs pEV group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs psi-survivin group

2.5 pEV/si-survivin 转染抑制 MDA-MB-231 和 HUVEC 细胞的细胞周期

流式细胞术检测不同重组质粒转染 MDA-MB-

231 和 HUVEC 细胞 48 h 后细胞周期的改变, 结果(图 5)显示, 对于 MDA-MB-231 细胞, 转染 psi-survivin 组[(76.35 ± 1.01)%]和 pEV/si-survivin 组[(87.89 ± 0.81)%]的细胞 G₁ 期比例明显高于 pcDNA3.1 组[(54.69 ± 3.50)%], $P < 0.05$, 说明 survivin-siRNA 使 MDA-MB-231 细胞发生 G₁ 期阻滞, 细胞生长受到了抑制(图 5)。对于 HUVEC 细胞, 转染 pEV 组[(65.41 ± 2.38)%]和 pEV/si-survivin 组[(67.41 ± 3.46)%]的细胞 G₁ 期比例明显高于 pcDNA3.1 组[(51.21 ± 7.25)%], $P < 0.05$, 说明 ENDO-VEGI₁₅₁ 蛋白可使 HUVEC 细胞周期阻滞于 G₁ 期。由此可见, 多功能质粒 pEV/si-survivin 能有效地使 MDA-MB-231 和 HUVEC 细胞发生细胞周期阻滞, 从而抑制细胞增殖。

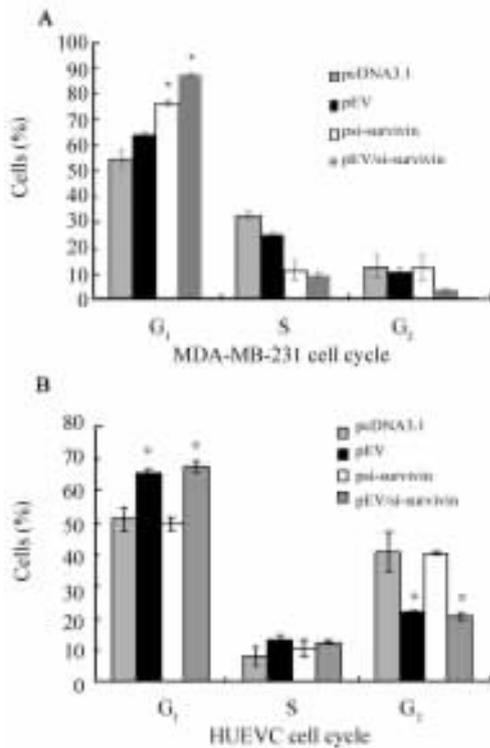


图 5 不同质粒对 MDA-MB-231(A)和 HUVEC(B)细胞周期的影响

Fig. 5 Effects of different plasmids on cell cycles of MDA-MB-231 and HUVEC cells

* $P < 0.05$ vs pcDNA3.1 group

2.6 pEV/si-survivin 促进 MDA-MB-231 和 HUVEC 细胞凋亡

流式细胞术检测不同重组质粒转染 MDA-MB-231 和 HUVEC 细胞 48 h 后细胞凋亡情况, 结果(图 6)表明, psi-survivin 和 pEV/si-survivin 具有促进

MDA-MB-231 细胞凋亡的作用, 其凋亡率[(19.45 ± 0.99)%、(18.33 ± 1.48)%]明显高于 pcDNA3.1 组[(4.8 ± 1.01)%]和 pEV 组[(4.75 ± 1.07)%] ($P < 0.01$)。pEV 和 pEV/si-survivin 具有促进 HUVEC 细胞凋亡的作用, 其凋亡率为(16.67 ± 2.11)%和(14.32 ± 2.48)% , 明显高于 pcDNA3.1 组的(3.37 ± 0.28)% 和 pEV 组的(4.85 ± 0.52)% ($P < 0.01$)。

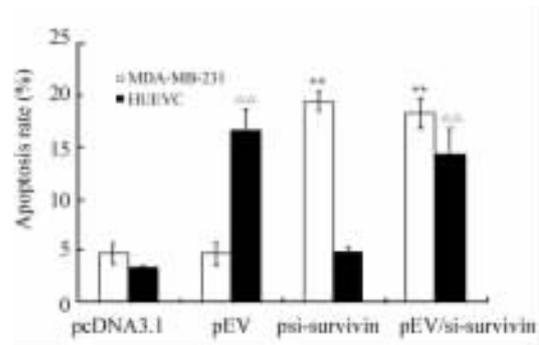


图 6 不同质粒转染后 MDA-MB-231 和 HUVEC 细胞的凋亡

Fig. 6 Apoptosis of MDA-MB-231 and HUVEC cells transfected with different plasmids

** $P < 0.01$ vs pcDNA3.1 group of MDA-MB-231 cells;

△△ $P < 0.01$ vs pcDNA3.1 group of HUVEC

3 讨论

自 1973 年 Folkman 提出“阻断血管, 饿死肿瘤”学说, 新生血管形成在肿瘤发生、发展中的重要地位及其作为治疗靶点的价值已经得到公认^[6]。但抗血管生成治疗不能彻底根除患者体内不依赖血供的残存肿瘤微小转移灶。肿瘤组织中, 肿瘤细胞和血管内皮细胞间存在着相互依存、相互促进的作用^[7-8], 抗血管生成疗法和直接杀伤肿瘤细胞疗法的组合可能具有更好的疗效。但临床试验中发现肿瘤血管生成抑制剂(tumor angiogenesis inhibitor, TAI)和其他疗法特别是化疗药物的联合使用可能会产生某些难以预料的毒性作用^[9]。由于抗血管生成治疗造成的缺氧环境可使肿瘤细胞对凋亡敏感, 因此联合抗血管生成和诱导细胞凋亡两种疗法可能会成为一个新的肿瘤基因治疗的切入点。

血管生成是一个多步骤、复杂调控的过程, 不同阶段有不同的调控因素发挥主导作用, 仅针对某一环节或调控因素的单一靶点 TAI 的疗效必然有限^[10-11]。开发多靶点的直接型 TAI 和不同机制 TAI 的联合治疗是提高抗血管生成疗效的重要手段^[12-13]。研究^[14-15]表明, endostatin 和 VEGI 通过不

同的机制发挥抗血管形成功能。ENDO-VEGI₁₅₁ 是本课题组前期研究^[3-4,16-18]中获得的具有高效抑制新生血管形成的融合蛋白,能保持 endostatin 和 VEGI₁₅₁ 独特的肽链结构和空间构象,并兼具两者不同的作用机制,可促进内皮细胞凋亡、抑制迁移、阻断促血管生成信号等多个环节,协同抑制血管生成过程。

Survivin 是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)家族成员之一,通过直接或间接抑制 caspases 的活性抑制细胞凋亡,是诱导凋亡极好的治疗靶点^[5]。为实现抗肿瘤新生血管形成和诱导肿瘤细胞凋亡的协同效应,本研究通过构建 ENDO-VEGI₁₅₁ 和 survivin-siRNA 的双功能表达质粒来实现这两种疗法的联合。利用高表达 survivin 的 MDA-MB-231 细胞筛选获得高效的 survivin-siRNA 片段,化学合成 shRNA 片段确保 siRNA 的高效性和特异性。并利用质粒 pSilencer™ 2.1-U6 neo 上的 U6 启动子获得 survivin-shRNA 的完整表达框,将其与 ENDO-VEGI₁₅₁ 的 cDNA 克隆至 pcDNA3.1,获得双功能质粒 pEV/si-survivin。转染 MDA-MB-231 细胞后证实,该重组质粒同时表达融合蛋白 ENDO-VEGI₁₅₁ 并能抑制 survivin 的表达,初步证明了双功能质粒 pEV/si-survivin 的效果和用于基因治疗的可行性。

本研究结果显示,双功能表达质粒 pEV/si-survivin 能有效地抑制人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 HUEVC 的增殖。流式细胞术检测结果表明,pEV/si-survivin 是通过诱导细胞 G₁ 期阻滞和促进细胞凋亡来发挥抑制细胞增殖的作用。由此证明 pEV/si-survivin 质粒具有同时表达 ENDO-VEGI₁₅₁ 融合蛋白从而抑制血管内皮细胞生长,以及抑制细胞内 survivin 表达从而促进乳腺癌细胞凋亡的双重生物学活性。本研究为进一步在体内研究联合抗新生血管形成和促肿瘤细胞凋亡策略治疗肿瘤奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] Faye C, Moreau C, Chautard E, et al. Molecular interplay between endostatin, integrins, and heparan sulfate [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(33): 22029-22040.
- [2] Xiao T, Fan JK, Huang HL, et al. VEGI-armed oncolytic adenovirus inhibits tumor neovascularization and directly induces mitochondria-mediated cancer cell apoptosis [J]. *Cell Res*, 2010, 20(3): 367-378.
- [3] 李喆,方国恩,闻兆章,等. 新型血管生成抑制融合基因 hENDO-VEGI₁₅₁ 治疗胃癌的实验研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(2): 230-234.
- [4] 李喆,方国恩,华积德,等. 内皮细胞抑制素-血管内皮细胞

- 生长抑制因子 151 融合基因治疗胃癌的作用及其机制 [J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(10): 1186-1189.
- [5] Ryan BM, O'Donovan N, Duffy MJ. Survivin: A new target for anti-cancer therapy [J]. *Cancer Treat Rev*, 2009, 35(7): 553-562.
- [6] Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine [J]. *Nature*, 2005, 438(7070): 932-936.
- [7] Butler JM, Kobayashi H, Rafii S. Instructive role of the vascular niche in promoting tumor growth and tissue repair by angiocrine factors [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(2): 138-146.
- [8] Weigand M, Hantel P, Kreienberg R, et al. Autocrine vascular endothelial growth factor signalling in breast cancer. Evidence from cell lines and primary breast cancer cultures *in vitro* [J]. *Angiogenesis*, 2005, 8(3): 197-204.
- [9] Leigh NB, Paz-Ares L, Douillard JY, et al. Randomized phase III study of matrix metalloproteinase inhibitor BMS-275291 in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: National cancer institute of Canada-clinical trials group study BR. 18 [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(12): 2831-2839.
- [10] Kerbel RS. Tumor angiogenesis [J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(19): 2039-2049.
- [11] Quesada AR, Medina MA, Alba E. Playing only one instrument may be not enough: Limitations and future of the antiangiogenic treatment of cancer [J]. *Bioassays*, 2007, 29(11): 1159-1168.
- [12] Shen WG, Zhu J, Zhang Y, et al. Synergistic antitumor effects of *in vivo* production of human endostatin and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in mice after subcutaneous implantation of primary fibroblasts transfected by adenovirus-mediated gene delivery [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 123(7): 922-928.
- [13] Chen P, Yin H, Wang Y, et al. Multi-gene targeted antiangiogenic therapies for experimental corneal neovascularization [J]. *Mol Vis*, 2010, 16: 310-319.
- [14] Faye C, Chautard E, Olsen BR, et al. The first draft of the endostatin interaction network [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(33): 22041-22047.
- [15] Zhang N, Sanders AJ, Ye L, et al. Expression of vascular endothelial growth inhibitor (VEGI) in human urothelial cancer of the bladder and its effects on the adhesion and migration of bladder cancer cells *in vitro* [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(1): 87-95.
- [16] 李喆,潘欣,潘卫,等. 内皮抑素-血管内皮细胞生长抑制因子融合基因重组腺病毒的包装与鉴定 [J]. *世界华人消化杂志*, 2003, 11(6): 741-744.
- [17] 潘欣,李喆,张珉,等. 内皮抑素-血管内皮细胞抑制因子重组腺病毒对荷胃癌裸鼠的治疗 [J]. *世界华人消化杂志*, 2003, 11(9): 1282-1285.
- [18] 李喆,方国恩,毕建威,等. 内皮细胞抑制素-血管内皮细胞生长抑制因子 151 融合基因对胃癌抑制作用的比较评价 [J]. *中华现代外科学杂志*, 2006, 3(3): 193-197.

[收稿日期] 2011-03-20

[修回日期] 2011-05-14

[本文编辑] 王莹