

• 基础研究 •

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.06.007

沉默 *Livin* 基因表达对结肠癌 LoVo 细胞生物学特性的影响

邹爱民¹, 高文香¹, 朱文芳¹, 沈建军² (1. 西安市长安医院 检验科, 陕西 西安 710016; 2. 第四军医大学唐都医院 检验科, 陕西 西安 710038)

[摘要] 目的: 运用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术沉默结肠癌细胞株 LoVo 中 *Livin* 基因的表达, 研究 *Livin* 对 LoVo 细胞增殖和凋亡等生物学特性的影响。方法: 构建针对 *Livin* 基因的干扰质粒 pSilencer4.1-L1 和 pSilencer4.1-L2, 转染 LoVo 细胞, 通过 RT-PCR、Western blotting 检测转染后 LoVo 细胞 *Livin* 的表达, 并用流式细胞术、克隆形成实验、MTT 法检测转染后 LoVo 细胞的凋亡、细胞周期、克隆形成、增殖以及对顺铂的敏感性。结果: 成功构建 pSilencer4.1-L1、pSilencer4.1-L2 干扰质粒, pSilencer4.1-L1 可有效沉默 LoVo 细胞中 *Livin* mRNA 和蛋白的表达 ($P < 0.01$), 但 pSilencer4.1-L2 效果不明显。与对照组相比, pSilencer4.1-L1 转染后 LoVo 细胞的凋亡率增加 [$(24.2 \pm 3.2)\%$ vs $(8.1 \pm 1.4)\%$, $P < 0.01$]; 细胞增殖明显抑制, 转染后 72 h 增殖抑制率约 70%; 细胞的克隆形成率明显下降 [$(15 \pm 4.6)\%$ vs $(85 \pm 5.8)\%$, $P < 0.01$]; S 期细胞明显增加 [$(45.7 \pm 4.9)\%$ vs $(28.0 \pm 3.0)\%$, $P < 0.01$], G_1 期细胞明显减少 [$(43.0 \pm 5.2)\%$ vs $(62.8 \pm 5.1)\%$, $P < 0.01$]; 对顺铂的敏感性增加, 细胞凋亡率增加 [$(65.3 \pm 6.2)\%$ vs $(43.4 \pm 6.9)\%$, $P < 0.01$]。结论: pSilencer4.1-L1 可有效沉默结肠癌 LoVo 细胞中 *Livin* 基因的表达, 抑制细胞增殖和克隆形成、诱导细胞凋亡、增加细胞对顺铂的敏感性。

[关键词] RNA 干扰; *Livin* 基因; 结肠癌; LoVo 细胞; 凋亡

[中图分类号] R735.3⁺5; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)06-0624-06

Effects of *Livin* gene silencing on biological characteristics of colon cancer LoVo cells

ZOU Ai-min¹, GAO Wen-xiang¹, ZHU Wen-fang¹, SHEN Jian-jun² (1. Department of Clinical Laboratory, Chang'an Hospital, Xi'an 710016, Shaanxi, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of *Livin* on biology characteristics, such as proliferation and apoptosis, of colon cancer LoVo cells by RNA interference (RNAi) targeting *Livin* gene. **Methods:** Interference vectors pSilencer4.1-L1 and pSilencer4.1-L2 targeting *Livin* gene were constructed and transfected into LoVo cells. Then the expression of *Livin* was detected by RT-PCR and Western blotting. And the apoptosis, cell cycle, colony formation, proliferation of LoVo cells, as well as sensitivity of LoVo cells to cisplatin, were detected by flow cytometry, colony formation assay, and MTT. **Results:** Interference vectors pSilencer4.1-L1 and pSilencer4.1-L2 were successfully constructed. pSilencer4.1-L1, but not pSilencer4.1-L2, effectively silenced the *Livin* mRNA and protein expression in LoVo cells ($P < 0.01$). Compared with the control group, LoVo cells in pSilencer4.1-L1 transfection group showed an increased apoptosis rate [$(24.2 \pm 3.2)\%$ vs $(8.1 \pm 1.4)\%$, $P < 0.01$], a decreased cell proliferation (inhibitory rate: about 70% after 72 h), a decreased colony formation rate [$(15 \pm 4.6)\%$ vs $(85 \pm 5.8)\%$, $P < 0.01$], increased S phase cells [$(45.7 \pm 4.9)\%$ vs $(28.0 \pm 3.0)\%$, $P < 0.01$], decreased G_1 phase cells [$(43.0 \pm 5.2)\%$ vs $(62.8 \pm 5.1)\%$, $P < 0.01$], and an increased sensitivity to cisplatin (apoptosis rate increased from $(43.4 \pm 6.9)\%$ to $(65.3 \pm 6.2)\%$, $P < 0.01$). **Conclusion:** pSilencer4.1-L1 can effectively silence *Livin* gene expression in colon cancer LoVo cells, inhibit proliferation and

[基金项目] 西安市科技攻关计划项目[No. HM1124(2)]。Project supported by the Science and Technology Development Foundation of Xi'an [No. HM1124(2)]

[作者简介] 邹爱民(1969-),女,四川省自贡市人,硕士,副主任技师,主要从事肿瘤分子生物学方面的研究工作。E-mail: aiminzou2001@sina.com

[通信作者] 沈建军(SHEN Jian-jun, corresponding author),E-mail: shjjleo@163.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20111111.1118.005.html>

colony formation, induce apoptosis, and enhance sensitivity of LoVo cells to cisplatin.

[**Key words**] RNA interference; *Livin* gene; colon cancer; LoVo cells; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(6): 624-629]

结肠癌是常见的消化道恶性肿瘤,其发病率占胃肠道肿瘤的第3位。在我国,结肠癌的发病率呈逐年上升趋势。除了早期结肠癌可以手术治疗外,对于中、晚期的结肠癌患者,放、化疗仍然是目前常用的治疗手段,但结肠癌细胞对放、化疗的耐受始终影响着治疗效果。

Livin 是凋亡抑制蛋白家族(inhibitor of apoptosis protein family, IAP)的新成员^[1-2]。研究^[3-5]表明, *Livin* 在多数肿瘤中高表达,而在正常组织中表达甚微。*Livin* 基因表达与肿瘤发生有密切关系,具有很强的抗凋亡作用,其表达水平与肿瘤细胞对放、化疗的耐受程度密切相关,可能成为诱导肿瘤细胞凋亡新的治疗靶点^[6-9]。*Livin* 在结肠癌细胞中的作用及功能如何,国内外相关文献报道甚少。本研究用RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术阻断结肠癌细胞 LoVo 中 *Livin* 基因的表达,观察 *Livin* 基因沉默后 LoVo 细胞在细胞凋亡、细胞周期、细胞增殖、对顺铂的敏感性、克隆形成方面的变化,为结肠癌的治疗探索新途径。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

pSilencer4.1-CMV neo 载体为美国 Ambion 公司产品, TaqDNA 聚合酶、DNA 酶 1、DGL2000 DNA Marker、限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Hind*III 购自大连宝生物公司, MTT 和去内毒素质粒提取试剂盒购自美国 Promega 公司, 琼脂糖凝胶胶自鼎国生物技术有限公司。转染试剂 Lipofectamine 2000、RPMI 1640 培养基、RT-PCR 试剂盒及 RNA 提取的 TRIzol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。LoVo 细胞株、pEGFPN2 质粒、DH5a 菌种为本室保存。山羊抗人 β -actin、山羊抗人 *Livin* 多抗购自美国 Santa Cruz 公司, 兔抗羊二抗和 DAB 显色液为北京中山公司生产。Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒、CycleTEST™ PLUS DNA 细胞周期检测试剂盒、FACS Calibur 流式细胞仪、酶联免疫分析仪均为美国 BD 公司产品。图像分析系统 Labworks 4.5 为美国 Transilluminator 公司产品。PCR 引物由上海英骏生物有限公司合成。

1.2 *Livin* 基因特异性 shRNA 片段的设计及载体构建

根据 shRNA 设计原则及 *Livin* cDNA 序列,使用

美国 Ambion 公司在线设计软件,设计并选取 *Livin* 基因特异性 shRNA 片段序列:序列 1 为 5'-GATC-CTCTTCCACACAGGCCATCATTCAAGAGATGATGG CCTGTGTGGAAGATTA-3', 互补链为 5'-AGCTTA-ATCTTCCACACAGGCCATCATCTCTTGAATGATGG CCTGTGTGGAAGAG-3'; 序列 2 为 5'-GATC-CGAGACTTTGTCCACAGTGTTCGAAGAGAACA CTG TGGACAAAGTCTCTTA-3', 互补链为 5'-AGCTTA-AGAGACTTTTGTCCACAGTGTTCCTTGAACA CTG TGGACAAAGTCTCG-3'; 下划线部分为 *Livin* 基因特异性序列。合成的单链 DNA 置 PCR 仪 95 °C 变性 5 min 后,冷却至 37 °C 孵育 1 h,形成双链 DNA 后,与 pSilencer™ 4.1-CMVneo 质粒连接,连接产物转化 DH5a 感受态菌。LB 平板(AMP⁺)筛选阳性克隆,提取质粒进行 *Bam*HI、*Hind* III 双酶切及琼脂糖电泳鉴定,并提交大连宝生物公司进行 DNA 序列测定。重组质粒分别命名为 pSilencer 4.1-L1、pSilencer 4.1-L2,阴性对照质粒命名为 pSilencer 4.1-NC。

1.3 重组质粒转染 LoVo 细胞

将 LoVo 细胞按 1.0×10^5 个/孔的数量转种于 6 孔培养板,培养至细胞密度 80% 左右,更换无抗生素、无血清的 RPMI 1640 培养液,继续培养 6 h,用去内毒素的重组质粒 pSilencer 4.1-L1、pSilencer 4.1-L2 及阴性对照载体 pSilencer 4.1-NC 转染 LoVo 细胞,设未转染对照组。质粒用量为 2 μ g/孔,脂质体用量为 5 μ l/孔。以 pEGFPN2 质粒同步转染,检测转染效率。转染后 6 h 将培养液更换为含 20% 小牛血清、无抗生素 RPMI 1640 培养液,进行后续实验。

1.4 RT-PCR 检测转染后 LoVo 细胞中 *Livin* mRNA 的表达

转染后 48 h,提取总 RNA 并定量,用 DNA 酶 I 处理总 RNA 以去除 DNA 污染,各实验组取同等量的 RNA 反转录后进行 PCR,每组做 5 个平行管。*Livin* 的反转录引物为:正义 5'-TGAGGAGTT-GCGTCTGGC-3', 反义 5'-GCACGGCACAAAGACGAT-3',产物长度 492 bp; β -actin 引物为:正义 5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3', 反义 5'-CAAA-CATGATCT GGGTCATCTTCTC-3',产物长度 353 bp。PCR 反应条件:95 °C 变性 5 min;95 °C 30 s,57 °C 30 s,72 °C 1 min,循环 35 次;72 °C 延伸 7 min,分别于 15、20、25、30、35 min 各终止 1 个实验管,PCR 产物

经琼脂糖电泳后以 Labworks 4.5 图像分析系统分析。实验重复 3 次。

1.5 Western blotting 检测转染后 LoVo 细胞中 Livin 蛋白的表达

转染后 72 h 提取细胞总蛋白并定量, 行 SDS-PAGE, 电泳完毕后, marker 条带进行考马斯亮蓝染色, 余下的胶按操作说明装入电转印仪, 100 V 电转 45 min 后加 5% 脱脂奶粉封闭。加 1:500 PBS 稀释的 β -actin、Livin 抗体, 4 °C 过夜。PBS-Tween 洗涤, 加 1:300 稀释的二抗, 室温 60 min。PBS-Tween 洗涤后 DAB 显色 30 min, 图像分析系统分析结果。实验共重复 3 次。

1.6 流式细胞术检测转染后 LoVo 细胞周期和凋亡

转染后 48 h, 消化各孔 LoVo 细胞, 冷 PBS 洗涤, 调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 以未转染 LoVo 细胞为空白, 使用 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒按操作说明进行凋亡染色, 上流式细胞仪检测细胞凋亡, 计数 1.5×10^4 个细胞, 实验共重复 3 次。

检测细胞周期时, 使用 CycleTEST™ PLUS DNA 细胞周期检测试剂盒, 按操作说明检测细胞周期, 计数 1.5×10^4 个细胞, 实验共重复 3 次。

1.7 MTT 法检测转染后 LoVo 细胞的增殖

转染后 24 h, 消化各孔 LoVo 细胞, 按 $5 \times 10^3/\text{孔}$ 的数量转种于 96 孔培养板, 设 6 个时间点(24、36、48、60、72、84 h), 每个点设 4 个孔, RPMI 1640 培养液(含 10% 小牛血清, 无抗生素)37 °C、5% CO₂ 培养至各时间点, MTT 法检测光密度值(D)。增殖抑制率(%) = $(D_{\text{对照组}} - D_{\text{实验组}})/D_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。实验共重复 3 次。

检测 LoVo 细胞对顺铂的敏感性时, LoVo 细胞按 $5 \times 10^3/\text{孔}$ 的数量转种于 96 孔培养板, 生长至 90% 后用各重组质粒进行转染, 质粒用量为 0.1 $\mu\text{g}/\text{孔}$, 脂质体用量为 0.25 $\mu\text{l}/\text{孔}$, 转染后 48 h 按 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 加入顺铂, 设 5 个时间点(12、24、48、72、96 h), 每个点设 3 个孔, 37 °C、5% CO₂ 培养至各时间点, MTT 法检测光密度值(D)。增殖抑制率(%) = $(D_{\text{对照组}} - D_{\text{实验组}})/D_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。实验共重复 3 次。

1.8 克隆形成实验检测 LoVo 细胞克隆形成能力

转染各重组质粒后 48 h, 消化各孔 LoVo 细胞, 每组细胞分别按 50、100、200 个/孔接种于含 2 ml 预温 37 °C 培养液的 6 孔板中, 每个浓度做 2 个平行孔, 静止培养 2~3 周, 姬姆萨染色 30 min, 肉眼计数克隆数, 计算克隆形成率。克隆形成率(%) = 克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.9 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件, 各实验组率的比较使用 χ^2 检验, 定量数据进行方差分析, 实验组间的多重比较使用 SNK-q 检验。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒的酶切鉴定及测序结果

酶切后琼脂糖电泳可见一大小为 55 bp 左右的酶切片段, 与设计合成的 Livin 基因特异性序列大小相符(图 1)。DNA 序列测定结果表明, 各序列已成功插入了 pSilencer™4.1-CMV neo 载体。

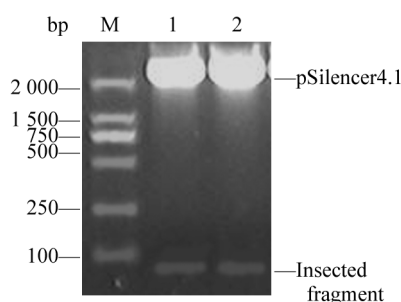


图 1 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant vector by endonuclease digestion

M: DNA marker; 1: pSilencer 4.1-L1; 2: pSilencer 4.1-L2

2.2 质粒转染 LoVo 细胞的效率

转染后 24 h, 荧光倒置显微镜下观察 pEGFPN2 质粒同步转染的 LoVo 细胞, 结果(图 2)显示, 转染效率为 60%~70%。由此可见, pEGFPN2 质粒同步转染 LoVo 细胞可以取得较高的转染效率, 符合实验要求。

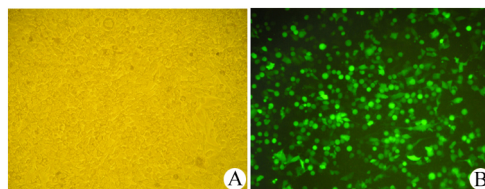


图 2 pEGFPN2 质粒转染 LoVo 细胞的效率($\times 200$)

Fig. 2 Transfection efficiency of pEGFPN2 plasmid in LoVo cells($\times 200$)

A: Under light microscope; B: Under fluorescence microscope

2.3 质粒转染抑制 LoVo 细胞中 Livin mRNA 表达

图像分析系统结果(图 3)显示, 在 20~35 个

PCR 循环后,与 pSilencer 4.1-NC 对照质粒转染的 LoVo 细胞相比,pSilencer4.1-L1 转染的 LoVo 细胞中 *Livin* mRNA 的表达下降了 60%~70% ($P<0.01$),pSilencer4.1-L2 转染的 LoVo 细胞 *Livin* mRNA 水平变化不明显。因此,pSilencer4.1-L1 质粒可以有效地干扰 LoVo 细胞中 *Livin* mRNA 的表达。

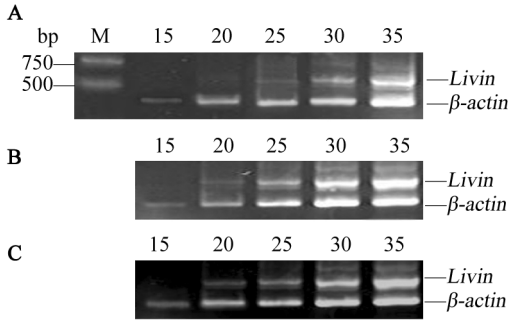


图 3 RT-PCR 检测转染干扰质粒后 LoVo 细胞中 *Livin* mRNA 的表达

Fig. 3 Expression of *Livin* mRNA in LoVo cells after interference plasmid transfection as detected by RT-PCR

M: Marker; 15-35: Number of amplification cycles are indicated above each lane; A: LoVo cells transfected with pSilencer4.1-L1; B: LoVo cells transfected with pSilencer4.2-L2; C: LoVo cells transfected with pSilencer4.1-NC

2.4 质粒转染后 LoVo 细胞中 *Livin* 蛋白的表达

pSilencer4.1-L1 转染 LoVo 细胞的 *Livin* 蛋白总量明显下调,而 pSilencer 4.1-L2 重组质粒和 pSilencer4.1-NC 质粒转染的 LoVo 细胞 *Livin* 蛋白总量水平与未转染对照组相比无明显差别(图 4)。由此可见,pSilencer4.1-L1 重组质粒可以有效地抑制 LoVo 细胞中 *Livin* 蛋白的表达。

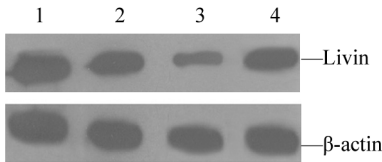


图 4 Western blotting 检测转染干扰质粒后 LoVo 细胞中 *Livin* 蛋白的表达

Fig. 4 *Livin* protein expression in LoVo cells after interference plasmid transfection as detected by Western blotting

1: Negative control; 2: pSilencer4.1-NC; 3: pSilencer4.1-L1; 4: pSilencer4.1-L2

2.5 *Livin* 基因表达沉默促进 LoVo 细胞凋亡

流式细胞仪检测结果(图 5)显示,转染后 48 h,

pSilencer4.1-L1 重组质粒转染的 LoVo 细胞的凋亡率约为 $(24.2 \pm 3.2)\%$,pSilencer4.1-L2 组为 $(8.8 \pm 1.6)\%$,pSilencer4.1-NC 组为 $(8.1 \pm 1.4)\%$,未转染组为 $(3.6 \pm 0.9)\%$ 。由此可见,pSilencer4.1-L1 能明显促进 LoVo 细胞的凋亡 ($P<0.01$)。

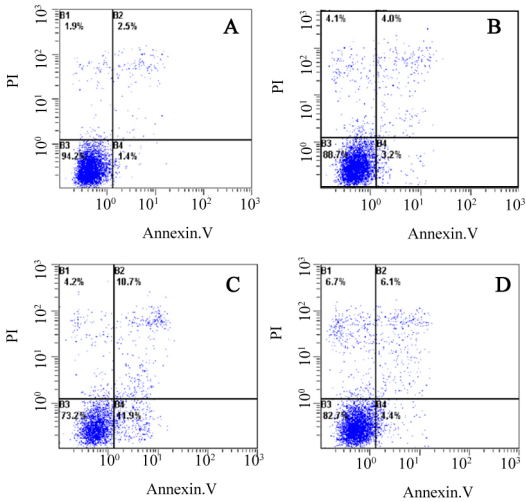


图 5 流式细胞术检测干扰质粒转染后 LoVo 细胞的凋亡

Fig. 5 Apoptosis of LoVo cells after interference plasmid transfection as detected by flow cytometry

A: Negative control; B: pSilencer4.1-NC; C: pSilencer4.1-L1; D: pSilencer4.1-L2

2.6 *Livin* 基因表达沉默抑制 LoVo 细胞的增殖

与未转染对照组相比,pSilencer4.1-L1 重组质粒转染组的 LoVo 细胞在 72 h 时增殖抑制率约为 69% ($P<0.05$),pSilencer4.1-L2、pSilencer4.1-NC 组 LoVo 细胞增殖无明显变化(图 6)。可见,pSilencer4.1-L1 重组质粒导致的 *Livin* 基因表达沉默可以有效抑制 LoVo 细胞的增殖。

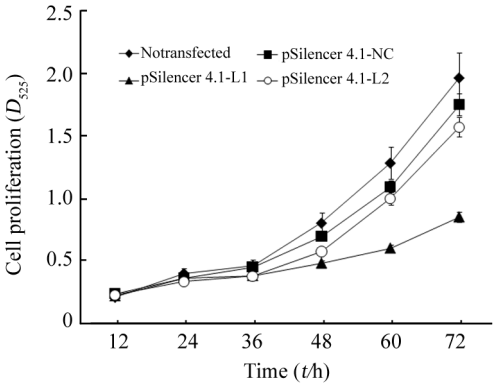


图 6 沉默 *Livin* 基因表达抑制 LoVo 细胞的增殖

Fig. 6 Silencing *Livin* gene expression inhibited proliferation of LoVo cells

2.7 *Livin* 基因表达沉默后 LoVo 细胞周期的变化

实验结果(表 1)显示, pSilencer4.1-L1 重组质粒转染组 LoVo 细胞的 S 期比例为(45.7 ± 4.9)%, G₁ 期比例为(43.0 ± 5.2)%; pSilencer4.1-NC 转染组 S 期细胞比例为(28.0 ± 3.0)%, G₁ 期细胞比例为(62.8 ± 5.1)%。由此可见, pSilencer4.1-L1 重组质粒可以阻滞细胞停滞于 S 期($P < 0.05$)。

表 1 *Livin* 基因表达沉默后 LoVo 细胞周期的变化(%)

Tab.1 Cell cycle change of LoVo cells after *Livin* gene silencing (%)

Group	G ₁	G ₂	S
pSilencer4.1-L1	43.0 ± 5.2	11.3 ± 2.2	45.7 ± 4.9*
pSilencer4.1-L2	54.3 ± 4.5	8.9 ± 2.4	36.8 ± 3.7
pSilencer4.1-NC	62.8 ± 5.1	9.2 ± 2.1	28.0 ± 3.0
Negative control	70.2 ± 4.4	7.9 ± 3.6	21.9 ± 2.3

* $P < 0.05$ vs pSilencer4.1-NC

2.8 *Livin* 基因表达沉默后 LoVo 细胞克隆形成率的变化

克隆形成实验结果(图 7)显示, pSilencer4.1-L1 重组质粒转染的 LoVo 细胞的克隆形成率为(15 ± 4.6)%, 而 pSilencer4.1-NC 和 pSilencer4.1-L2 重组质粒转染的 LoVo 细胞的克隆形成率为(85 ± 5.8)%和(54 ± 7.5)%; pSilencer4.1-L1 重组质粒转染组最低($P < 0.01$)。因此, pSilencer4.1-L1 重组质粒转染后引起的 *Livin* 基因表达沉默可以明显降低 LoVo 细胞的克隆形成能力。

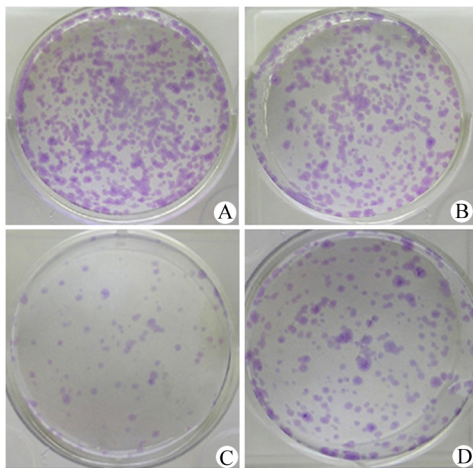


图 7 *Livin* 基因表达沉默后 LoVo 细胞的克隆形成能力(×200)

Fig.7 Colony formation ability of LoVo cells after *Livin* gene silencing (×200)

A: Negative control; B: pSilencer4.1-NC;
C: pSilencer4.1-L1; D: pSilencer4.1-L2

2.9 *Livin* 基因表达沉默后 LoVo 细胞对顺铂的敏感性变化

加入顺铂后 24 h, 与单用顺铂对照组相比, pSilencer4.1-L1 重组质粒转染后顺铂处理 LoVo 细胞的增殖明显下降(图 8), 48 和 72 h 时, LoVo 细胞增殖抑制最明显, 约为 56% ($P < 0.05$)。由此可见, pSilencer4.1-L1 重组质粒转染 LoVo 细胞导致的 *Livin* 基因表达沉默可以增强 LoVo 细胞对顺铂的敏感性。

2.10 *Livin* 基因表达沉默促进顺铂诱导的 LoVo 细胞的凋亡

加入顺铂后 48 h, pSilencer4.1-L1 重组质粒转染的 LoVo 细胞的凋亡率为(65.3 ± 6.2)%, pSilencer4.1-L2 重组质粒转染组的凋亡率为(48.8 ± 5.7)%, pSilencer4.1-NC 转染组的细胞凋亡率为(42.2 ± 5.1)%, 未转染组的凋亡率为(43.4 ± 6.9)%; 与其他三组比较, pSilencer4.1-L1 重组质粒转染的 LoVo 细胞的凋亡率明显增高($P < 0.05$)。结果说明, pSilencer4.1-L1 质粒可以有效地促进顺铂诱导的 LoVo 细胞的凋亡。

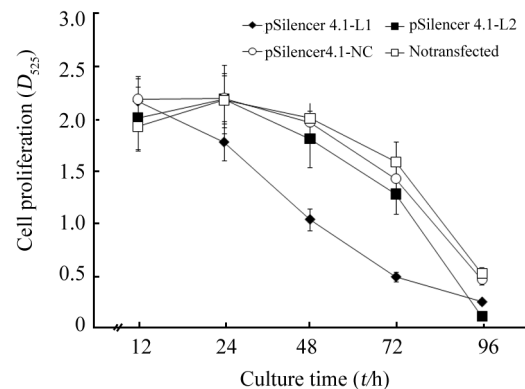


图 8 沉默 *Livin* 基因的表达增强 LoVo 细胞对顺铂的敏感性

Fig.8 Silencing *Livin* gene expression enhanced sensitivity of LoVo cells to cisplatin

3 讨论

Livin 是新发现的凋亡抑制蛋白, 包含一个单独的 IAP 重复结构域和一个羧基末端锌指结构。*Livin* 存在两种异构体: *Livin* α 和 *Livin* β, 前者 cDNA 全长 897 bp, 后者 cDNA 全长 843 bp。两种异构体差异微小, 仅后者的外显子 6 缺失了 54 bp 的片段; 然而两者不仅抗凋亡功能有差异, 而且具有不同的组织表达谱^[1-2,6]。

Livin 基因只在黑素瘤、结肠癌、前列腺癌和膀

肺癌等肿瘤细胞中及在胎盘、胚胎组织中表达,在多数正常成人组织中不表达。由于 *Livin* 基因在肿瘤的发生、发展中起重要的作用,使得 *Livin* 基因成为目前抗肿瘤研究的热点^[14,10]。当前对 *Livin* 基因的抗凋亡的作用的研究^[1,11]显示,*Livin* 基因的抗凋亡机制主要有以下几个方面:① *Livin* 基因可以和 caspase-3 和 caspase-7 直接作用,也可以抑制 caspase-9 蛋白的水解过程^[7]。② XIAP、NIAP 和 *Livin* 通过选择性激活由 TAB1/TAK1 介导的 MAP 激酶 JNK1,明显抑制由 TNF- α 和 ICE 诱导的凋亡,这种抗凋亡途径独立于 caspase 途径^[12]。③ *Livin* 可靶向降解 Smac/DIABLO 复合物,解除 Smac/DIABLO 复合物通过抑制 IAP-caspase 的交互作用所发挥的促凋亡功能。

本研究构建的重组载体 pSilencer4.1-L1 有效地干扰了 LoVo 细胞中 *Livin* 基因在 mRNA 和蛋白水平上的表达。pSilencer4.1-L1 转染 LoVo 细胞后能明显促进 LoVo 细胞的凋亡,并抑制 LoVo 细胞的增殖和克隆形成。此外,pSilencer4.1-L1 质粒可以阻滞细胞于 S 期,并有效地促进顺铂诱导的细胞凋亡。这些结果与相关报道的研究结果相一致^[13-14]。

本实验初步阐明了 *Livin* 基因在结肠癌细胞的增殖、凋亡、克隆形成等方面所起的重要作用,初步证明了 RNAi 沉默 *Livin* 的表达对 LoVo 细胞的生长抑制、促凋亡作用及对化疗药物的增敏作用,为进一步阐明 *Livin* 基因与结肠癌的关系,以及以 *Livin* 基因为靶点的结肠癌基因治疗研究奠定了基础。RNAi 技术是目前 *Livin* 基因功能研究中应用较多的技术^[15-16],pSilencer4.1 真核 RNAi 载体虽然使用简单,但对不同的细胞转染效率差异很大,如本研究的转染效率只有 70%,对实验结果有一定影响。由于 *Livin* 基因对 LoVo 细胞的增殖至关重要,因而难以通过抗性筛选来挑取稳定转染的克隆,开发新一代的 RNAi 载体或使用高转染效率的病毒载体有望解决这一技术瓶颈^[17]。

[参 考 文 献]

- [1] Liu B, Han M, Wen JK, et al. Livin/ML-IAP as a new target for cancer treatment [J]. Cancer Lett, 2007, 250(2): 168-176.
- [2] Wang L, Zhang Q, Liu B, et al. Challenge and promise: Roles for Livin in progression and therapy of cancer [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(12): 3661-3669.
- [3] El-Mesallamy HO, Hegab HM, Kamal AM. Expression of inhibitor of apoptosis protein (IAP) livin/BIRC7 in acute leukemia in

adults: Correlation with prognostic factors and outcome [J]. Leuk Res, 2011, 35(12): 1616-1622.

- [4] Dasgupta A, Alvarado CS, Xu Z, et al. Expression and functional role of inhibitor-of-apoptosis protein livin (BIRC7) in neuroblastoma [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 400(1): 53-59.
- [5] Augello C, Caruso L, Maggioni M, et al. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) expression and their prognostic significance in hepatocellular carcinoma [J]. BMC Cancer, 2009, 9: 125.
- [6] Crnković-Mertens I, Semzow J, Hoppe-Seyler F, et al. Isoform-specific silencing of the livin gene by RNA interference defines livin beta as keymediator of apoptosis inhibition in HeLa cell [J]. J Mol Med (Berl), 2006, 84(3): 232-240.
- [7] Boaz N, Yaqoub AS, Vered B, et al. Caspase-mediated cleavage converts Livin from an antiapoptotic to a roapoptotic factor: Implications for drug-resistant melanoma [J]. Cancer Res, 2003, 63(19): 6340-6349.
- [8] Liu C, Wu Xh, Luo Cl, et al. Antisense oligonucleotide targeting Livin induces apoptosis of human bladder cancer cell via a mechanism involving caspase 3 [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29(1): 63.
- [9] Sun JG, Liao RX, Zhang SX, et al. Role of inhibitor of apoptosis protein livin in radiation resistance in non-small cell lung cancer [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2011, 26(5): 585-592.
- [10] 邹爱民, 沈建军, 高萍, 等. 恶性肿瘤细胞及组织中凋亡抑制蛋白 Livin 的表达及其临床意义 [J]. 肿瘤, 2007, (7): 570-572.
- [11] Yan B. Research progress on Livin protein: An inhibitor of apoptosis [J]. Mol Cell Biochem, 2011. [Epub ahead of print]
- [12] Chen YS, Li HR, Lin M, et al. Livin abrogates apoptosis of SPC-A1 cell by regulating JNK1 signaling pathway [J]. Mol Biol Rep, 2010, 37(5): 2241-2247.
- [13] Ye L, Song X, Li S, et al. Livin- α promotes cell proliferation by regulating G₁-S cell cycle transition in prostate cancer [J]. Prostate, 2011, 71(1): 42-51.
- [14] Abd-Elrahman I, Hershko K, Neuman T, et al. The inhibitor of apoptosis protein Livin (ML-IAP) plays a dual role in tumorigenicity [J]. Cancer Res, 2009, 69(13): 5475-5480.
- [15] Oh BY, Lee RA, Kim KH. siRNA targeting Livin decreases tumor in a xenograft model for colon cancer [J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(20): 2563-2571.
- [16] Liu H, Wang S, Sun H, et al. Inhibition of tumorigenesis and invasion of hepatocellular carcinoma by siRNA-mediated silencing of the livin gene [J]. Mol Med Rep, 2010, 3(6): 903-907.
- [17] Xie J, Xiong L, Tao X, et al. Antitumor effects of murine bone marrow -derived dendritic cells infected with xenogeneic livin alpha recombinant adenoviral vectors against Lewis lung carcinoma [J]. Lung Cancer, 2010, 68(3): 338-345.

[收稿日期] 2011-08-22

[修回日期] 2011-10-15

[本文编辑] 王莹