

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.12.006

· 基础研究 ·

RNA 干扰 *Livin* 基因表达增强骨肉瘤 MG-63 耐药细胞对多柔比星的化疗敏感性

孙廓¹, 袁初平², 李怀强¹, 廖琦¹ (1. 南昌大学第二附属医院 骨科, 江西 南昌 330006; 2. 江西省都昌县中医院 骨科, 江西 都昌 332600)

[摘要] **目的:** 研究凋亡抑制蛋白基因 *Livin* 在逆转骨肉瘤耐药中的作用。**方法:** 应用多柔比星逐步诱导法诱导人骨肉瘤 MG-63 细胞建立耐药细胞株, MTT 实验检测耐药细胞株的耐药指数, Western blotting 法检测 MG-63 细胞和耐药细胞中 *Livin* 蛋白表达的差异。构建 *Livin* shRNA 真核表达载体, 应用 Lipofectmine™ 2000 转染至耐药骨肉瘤细胞中, Real-time PCR 和 Western blotting 分别检测 *Livin* shRNA 转染前后 MG-63 耐药细胞中 *Livin* 基因和蛋白表达的变化, 流式细胞术检测细胞凋亡的变化, MTT 法检测对多柔比星化疗敏感性的变化。**结果:** 成功构建重组质粒 pSilencer3.1-H1 neo-*Livin* si。诱导的耐药细胞 MG-63/R 对多柔比星的耐药指数为 81.32 ± 5.33 。*Livin* shRNA 可抑制 MG-63 细胞中 *Livin* 基因和蛋白表达, 明显低于空白对照组和非特异性转染组 (分别下调 72% 和 69%, $P < 0.05$)。特异性转染 *Livin* shRNA 组 MG-63/R 细胞的凋亡率显著高于未转染组和非特异性转染组 [$(22.4 \pm 3.2)\%$ vs $(4.2 \pm 1.1)\%$ 、 $(4.7 \pm 0.6)\%$, $P < 0.05$]。3 组细胞在加入多柔比星后增殖均受到不同程度的抑制, 且呈明显的时间-效应关系, 但特异性转染组细胞的存活率均显著低于其他两组 ($P < 0.05$)。**结论:** 应用 RNA 干扰技术下调 *Livin* 的基因表达可有效促进耐药 MG-63 骨肉瘤细胞的凋亡, 从而增加其对化疗药物的敏感性。

[关键词] 骨肉瘤; *Livin* 基因; RNA 干扰; 多柔比星; 耐药

[中图分类号] R738.1; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)012-1375-06

Livin gene silence by RNA interference enhances the chemotherapeutic sensitivity of drug resistant MG-63 osteosarcoma cells to doxorubicin

SUN Kuo¹, YUAN Chuping², LI Huaiqiang¹, LIAO Qi¹ (1. Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China; 2. Department of Orthopedics, Duchang County Hospital of Traditional Chinese Medicine, Duchang 332600, Jiangxi, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of *Livin* gene (an inhibitor of apoptosis protein) on reversing the drug-resistance of osteosarcoma. **Methods:** Drug-resistant MG-63 cell strain was established *in vitro* by continuous exposure to doxorubicin at gradually increased concentrations. The resistance index of drug-resistant MG-63 cells was examined by MTT method; *Livin* protein expressions in MG-63 cells and drug-resistant MG-63 cells were determined by Western blotting. *Livin* shRNA eukaryotic expression vector (pSilencer3.1-H1 neo-*Livin* si) was constructed and then transfected into drug-resistant MG-63 cells by using Lipofectmine 2000. Expression change of *Livin* mRNA and protein in drug-resistant MG-63 cells before and after the transfection was respectively measured by Real-time PCR and Western blotting. The distribution of cell cycle and apoptosis were determined by flow cytometry. The analysis of chemotherapeutic sensitivity of drug-resistant MG-63 cell to doxorubicin was performed by MTT. **Results:** The recombinant eukaryotic expression vector pSilencer3.1-H1 neo-*Livin* si was successfully constructed. Resistance index to doxorubicin of drug-resistant MG-63 cells (MG-63/R) was 81.32 ± 5.33 . *Livin* shRNA could significantly inhibit the mRNA and protein expression of *Livin* in MG-63/R cells compared with untransfect-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No.81660443); 江西省卫计委科技项目资助 (No. 20155278)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81660443), and the Health and Family Planning Commission of Jiangxi Province (No. 20155278)

[作者简介] 孙廓 (1982-), 男, 博士, 副主任医师, 主要从事骨肿瘤生物治疗的临床研究, E-mail: sunkuo1111@163.com

[通信作者] 廖琦 (LIAO Qi, corresponding author), 硕士, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 主要从事骨肿瘤生物治疗的临床研究, E-mail: liaoqi@medmail.com.cn

ed group and non-specific transfected group (down-regulated by 72% and 69% at mRNA and protein level respectively, all $P<0.05$). The flow cytometry analysis showed there was significantly higher apoptosis rate in Livin shRNA transfected group than that of untransfected group and non-specific transfected group ($[22.4\pm 3.2]\%$ vs $[4.2\pm 1.1]\%$, $[4.7\pm 0.6]\%$, $P<0.05$). After adding doxorubicin, the proliferation of three groups of cells was all inhibited at different levels in time-dependent manner; However, the cell survival rate in Livin shRNA transfected group was significantly lower than that in other two groups ($P<0.05$). **Conclusion:** Livin shRNA could efficiently promote the apoptosis of drug-resistant MG-63 cells, and thus increase its sensitivity to chemotherapy drugs.

[Key word] osteosarcoma; *Livin* gene; RNA interference; doxorubicin; drug resistance

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(12): 1375-1380. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.12.006]

骨肉瘤是一种临床常见的成骨性恶性肿瘤,约占所有骨肿瘤的20%,多见于青少年,好发于生长活跃的干骺端,恶性程度高,易复发和转移,预后较差,其治疗是目前骨科面临的棘手难题。自20世纪80年代新辅助化疗手段运用以来,骨肉瘤患者的生存率得以明显提高,化疗药物的疗效随浓度的递增而增高,但其毒副作用也随之增大,并且骨肉瘤对化疗药物的多药耐药也限制了化疗药物的临床应用^[1]。一些原癌基因在肿瘤细胞中的高表达直接导致肿瘤细胞对化疗药物敏感性下降,并最终造成肿瘤细胞耐药,这也是目前导致骨肉瘤化疗疗效不佳的主要原因^[2]。*Livin*是近年来发现的人类凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的新成员,特异性高表达于某些实体肿瘤组织和肿瘤细胞系,能抑制许多凋亡刺激剂诱发的细胞凋亡^[3-4],目前尚无有关其在逆转骨肉瘤耐药中的研究报道。因此,本研究通过多柔比星(doxorubicin, ADM)逐步诱导建立骨肉瘤耐药细胞,利用RNA干扰技术下调*Livin*的基因表达,检测细胞对化疗药物的治疗敏感性,探讨*Livin*在逆转骨肉瘤耐药中的作用及可能的分子机制,为骨肉瘤耐药的综合治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人骨肉瘤MG-63细胞由中国科学院上海细胞与生物化学研究所提供,含荧光素的RNA干扰真核表达载体pEGFP-N1购自上海吉凯基因有限公司,胎牛血清、DMEM高糖培养基和0.25%胰蛋白酶购自美国GIBCO公司,Reverse Transcription System和GoTaq[®] qPCR Master Mix购自美国Promega公司,Lipofectamine[™] 2000和TRIzol Reagent购自美国Invitrogen公司,DEPC和琼脂糖购自美国Sigma公司,引物由生工生物(上海)有限公司合成,SYBR Master Mixture、DNA Loading buffer和DNA marker购自宝生物工程(大连)有限公司,兔抗人*Livin*多克隆抗体购自台湾Abnova公司,BCA蛋白测定试剂盒购自美国

Pierce公司,Turbilin抗体、ECL试剂盒和HRP标记山羊抗兔的二抗购自上海碧云天生物技术研究,ADM购自浙江海正药业有限公司。

1.2 *Livin* shRNA真核表达载体的构建及测序

利用Ambion公司提供的RNAi设计工具在人类*Livin*基因cDNA序列中设计两条寡核苷酸序列(正义:5'-GTCTGGCCTCCTTCTATGA-3';反义:5'-CAGACCGGAGGAAGATACT-3'),两者逆向互补。将该双链在连接酶的作用下连入线性化的pSilencer3.1-H1 neo质粒即得到重组质粒pSilencer3.1-H1 neo-*Livin* si。将该重组质粒转入细胞即可在细胞内转录出发夹结构的干扰片段。将构建的重组质粒pSilencer3.1-H1 neo-*Livin* si转化大肠杆菌,经氨苄青霉素筛选,挑取不同的克隆进行测序。

1.3 MG-63细胞培养及*Livin* shRNA真核表达载体转染

MG-63细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养液置于37℃、5%CO₂饱和湿度的培养箱中常规培养,每2~3 d更换1次培养液,当细胞达到合适汇合度时消化传代培养。以ADM为诱导剂,采用逐步增加药物剂量诱导法,待细胞增殖至铺满培养皿底80%的对数期状态时,加入起始浓度为0.1 mg/L的ADM,24 h后用37℃的1×PBS液洗2次,待细胞增殖至正常状态后,重复上述药物冲击方法,每种药物浓度冲击6次。ADM药物递增浓度为0.1、0.4、1.0、4.0 mg/L,耐药诱导历时6个月,诱导MG-63细胞建立耐药细胞。将对数生长期的MG-63、MG-63/R细胞以1×10⁴/ml细胞密度分别接种于96孔培养板,培养24 h后弃培养液,参照化疗药物ADM、甲氨蝶呤、环磷酰胺和顺铂的血浆峰密度(peak plasma concentration, PPC),配制成5个药物密度梯度实验孔,药物浓度分别为100、10、1、0.1和0.01 PPC,继续培养48 h,加入5 mg/ml的MTT 20 μl,4 h后加入DMSO 100 μl,振荡混匀15 min,用酶标仪测定570 nm处每孔光密度(*D*)值,取其平均值,计算药物对肿瘤细胞的抑制率(%)=(1-药物组*D*值/对照组*D*值)×100%。每个浓度设3复孔,以无药物培养液为对照组。采用对数计量作图法计

算各种药物对细胞达50%抑制率时的药物浓度(IC₅₀),并计算耐药指数(resistance index, RI)=IC₅₀耐药细胞/IC₅₀亲代细胞。

转染前1 d将细胞以4×10⁵个/孔接种于6孔板,细胞铺板在2 ml培养基中,待细胞汇合达60%~80%时,按照Lipofectmine™ 2000说明书进行转染,G418筛选稳定表达的细胞。转染后48 h进行RNA干扰效应的检测,实验分为以下3组:空白对照组(未转染组)、阴性对照组(空白转染组)和实验组(Livin siRNA转染组),用倒置荧光显微镜对转染Livin shRNA前后的耐药MG-63细胞进行形态学观察。

1.4 Real-time PCR检测转染Livin shRNA对耐药MG-63细胞Livin基因表达的影响

将各组细胞以(1×10⁴)个/cm²的密度接种于培养皿中,达到90%汇合时收集细胞,使用TRIzol一步法抽提细胞内总RNA,紫外分光光度计测量其浓度和纯度。根据所测浓度取2 μg RNA,加入逆转录酶于37 °C进行逆转录反应,得到细胞总cDNA。以所得的cDNA为模板进行Real-time PCR反应。进行荧光数据采集和实时定量分析,溶解曲线数据的收集和分析各组各样本均进行3复孔检测,计算出平均CT值,然后根据2^{-ΔΔCT}计算出各样品的浓度,并与对照组进行比较。*Livin*正向引物:5'-AAGGAAGAGACTTTGTCCACAGTGT-3';*Livin*反向引物:5'-GGCTGCGTCTTCCGGTT-3'。Real-time PCR反应条件:预变性95 °C、15 s;之后每一步变性95 °C、5 s;退火延伸60 °C、30 s;共进行45个循环。每次在延伸阶段读取荧光值。PCR结束后,95 °C变性1 min,然后冷却至55 °C,使DNA双链充分结合。从55 °C开始到95 °C,每一步增加0.5 °C,保持4 s,同时读取荧光值。

1.5 Western blotting检测干扰Livin对耐药MG-63细胞内Livin蛋白表达变化

收集各组细胞后,预冷的PBS液洗细胞2次,加入细胞裂解液和蛋白酶抑制剂,提取的细胞总蛋白样品经Lowry法定量,取30 μg蛋白行SDS-PAGE。待溴酚蓝进入凝胶底部后,将蛋白质印迹到硝酸纤维素膜上,用含5%脱脂奶粉的TBS在室温下将膜封闭1 h,加入1:100稀释的兔抗人Livin抗体,4 °C孵育过夜。TBS洗3次,再加入1:5 000稀释的HRP标记的相应二抗进行显色反应。以Turbilin为内参照,用Livin与Turbilin灰度值的比值表示各组样本目的蛋白的表达水平(Quantity One分析软件)。

1.6 流式细胞术检测干扰Livin基因对耐药MG-63细胞凋亡的影响

收集未转染组、非特异性转染组、特异性转染

Livin shRNA组耐药细胞后转入5 ml离心管中,1 000×g、4 °C离心10 min,收集细胞,弃上清。用预冷PBS液洗细胞2次,用250 μl结合缓冲液重新悬浮细胞,并使其密度为1×10⁶/ml。加入5 μl Annexin-FITC和10 μl 20 μg/ml的碘化丙锭(PI)溶液,混匀后于室温避光孵育15 min。在反应管中加100 μl PBS,流式细胞术分析各组细胞凋亡情况。

1.7 MTT法检测干扰Livin基因对耐药MG-63细胞ADM化疗敏感性的影响

各组细胞以0.25%胰蛋白酶消化后分别接种到96孔板,待细胞贴壁后,除去旧培养液,PBS洗涤1次,分别加入200 μl含ADM(4 mg/L)的DMEM培养液,每个浓度均设4个复孔。给药后12、24、36、48和72 h后分别取出相应的细胞培养板测定D值。

1.8 统计学处理

用SPSS 22.0软件进行统计分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,对多组间均数比较用方差分析,两组间均数比较采用t检验,以P<0.05或P<0.01表示差异具有统计学意义。

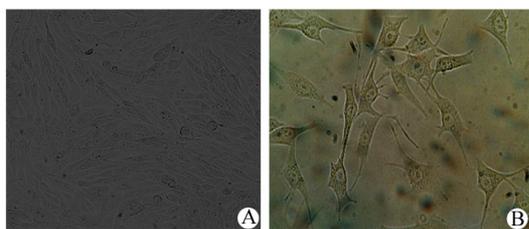
2 结果

2.1 成功构建重组质粒pSilencer3.1-H1 neo-Livin si

将构建的重组质粒pSilencer3.1-H1 neo-Livin si转化大肠杆菌,经氨苄青霉素筛选,挑取不同的克隆进行测序。取重组质粒的B链进行反向测序,所测结果与Livin shRNA的B链反向序列完全一致,两端为预期的pSilencer3.1-H1 neo序列,说明设计的siRNA片段已成功连入pSilencer3.1-H1 neo载体中,重组质粒pSilencer3.1-H1 neo-Livin si构建成功。

2.2 成功诱导多柔比星耐药细胞MG-63/R

倒置显微镜观察显示MG-63细胞排列较规则,形态近似梭型,核仁较大、清晰;耐药MG-63/R细胞排列不规则,形态多样,三角形、多角形多见,核仁大、清晰(图1)。MTT实验表明,MG-63/R对多柔比星的耐药指数为81.32±5.33,对环磷酰胺、甲氨蝶呤和顺铂亦产生不同程度的交叉耐药(表1)。未转染组、非特异性转染组、特异性转染Livin shRNA组细胞生长旺盛,细胞边缘折光性强。随着时间的延长,特异性转染组中部分细胞变圆,折光性降低,死亡细胞增多,失去附壁能力,脱落至培养液中,形态变圆。由于质粒中携带绿色荧光蛋白的基因序列,转染24 h后即可在细胞内表达绿色荧光蛋白,可在倒置荧光显微镜下直观观察基因转染效率,结果提示高倍视野下约60%细胞表达绿色荧光蛋白(图2)。



A: Normal MG-63 cell; B: Drug resistance MG-63/R cell
 图1 倒置显微镜观察正常/耐药MG-63细胞的形态(×400)
 Fig. 1 Cellular morphology of normal/ drug resistance MG-63 cell observed by inverted microscope(×400)

2.3 转染 Livin shRNA 抑制 MG-63/R 细胞 Livin 基因表达

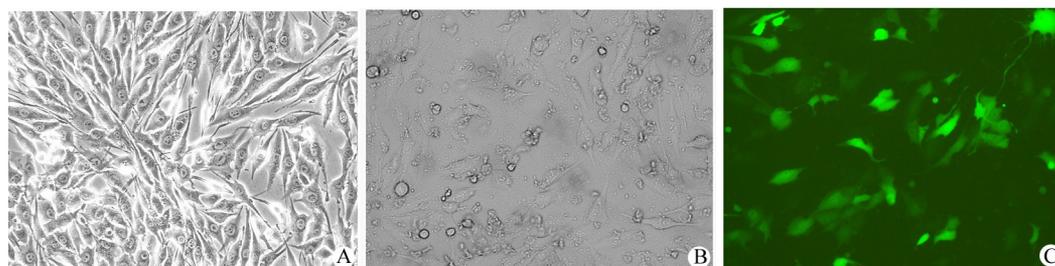
Livin shRNA 有抑制 MG-63/R 细胞中 Livin 基因表达的作用, 干扰效率达 72%; Livin shRNA 转染组

细胞中的 Livin 基因表达水平明显低于未转染组和非特异性转染组[(28.4±1.39)% vs (98.06±1.02)%、(97.9±1.34)%、 $P < 0.01$]。而未转染组和非特异性转染组相比, Livin 基因表达水平的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表1 MG-63 和 MG-63/R 细胞的 IC₅₀ 和耐药指数(n=3)

Tab.1 Multidrug resistance index and IC₅₀ for MG-63 and MG-63/R cell lines(n=3)

Drug	IC ₅₀ [$\rho_B / (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$]		RI
	MG-63	MG-63/R	
Doxorubicin	1.21±0.01	98.39±5.59	81.32±5.33
Cisplatin	3.12±0.04	28.42±2.12	9.11±1.21
Methotrexate	1.67±0.02	8.92±1.32	5.34±0.32
Cyclophosphamide	0.76±0.01	3.88±0.72	5.11±0.21



A: Untransfected group MG-63 cells (light microscope); B: Transfected group MG-63 cells (light microscope); C: Transfected group MG-63 cells (inverted fluorescence microscope)

图2 Livin shRNA 重组质粒成功转染 MG-63 细胞(×400)

Fig.2 Livin shRNA recombinant plasmid were successfully transfected into the MG-63 cells (×400)

2.4 干扰 Livin 基因抑制耐药 MG-63/R 内 Livin 蛋白表达

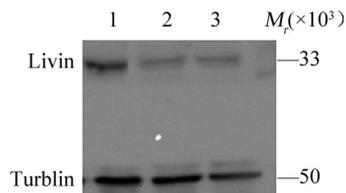
MG-63/R 细胞中 Livin 的蛋白染色条带增强, 其表达水平明显高于空白对照组(未诱导 MG-63 细胞)和阴性对照组(未添加 ADM 的诱导组 MG-63 细胞), 说明 ADM 诱导骨肉瘤 MG-63 细胞耐药后可导致 Livin 蛋白表达增加(图3)。Livin shRNA 转染有下调 MG-63/R 细胞中 Livin 蛋白表达的作用, 干扰效率达 69%, Livin shRNA 转染组 Livin 蛋白表达水平明显低于未转染组和非特异性转染组 [(30.1±2.21)% vs (97.21±1.21)%、(97.45±1.22)%、 $P < 0.05$]。而未转染组和非特异性转染组相比, Livin 蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)(图4)。

Livin shRNA 组的凋亡率显著高于未转染组和非特异性转染组 [(22.4±3.2)% vs (4.2±1.1)%、(4.7±0.6)%、 $P < 0.05$] (图5), 而未转染组和非特异性转染组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.5 干扰 Livin 基因促进 MG-63/R 细胞凋亡

流式细胞仪检测发现, Livin shRNA 转染 48 h 后的实验组细胞出现明显的凋亡现象。特异性转染

2.6 干扰 Livin 基因增强 MG-63/R 细胞对 ADM 的化



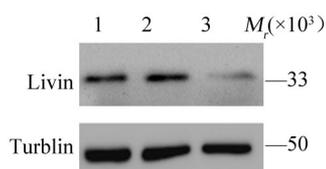
1: Drug resistance; 2: Negative control; 3: Blank control

图3 MG-63/R 细胞内 Livin 蛋白表达水平升高

Fig. 3 Expression of Livin protein was upregulated in MG-63/R cell

疗敏感性

MTT 实验结果(图6)显示,未转染组、非特异性转染组、特异性转染 *Livin* shRNA 组在加入 ADM 后,细胞的增殖均具受到不同程度的抑制,且呈明显的时间-效应关系。在各个观察时间点,特异性转染 *Livin* shRNA 组细胞的存活率均显著低于其他两组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。而空白对照组和阴性对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。



1: Untransfected; 2: Non-specific transfected;
3: Specific transfected

图4 *Livin* shRNA 转染下调MG-63/R 细胞内*Livin*蛋白表达
Fig. 4 The expression of *Livin* protein was decreased in the *Livin* shRNA transfected MG-63/R cell

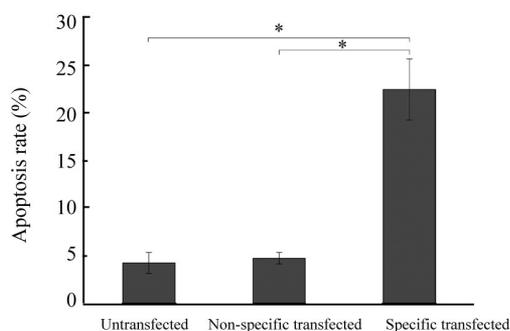
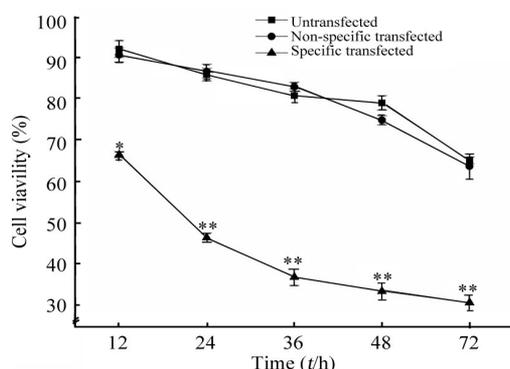


图5 *Livin* shRNA 转染提高MG-63/R 细胞凋亡率
Fig. 5 Apoptosis rate of MG-63/R cell was increased after the *Livin* shRNA transfection



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs negative control or blank control

图6 干扰 *Livin* 基因增强MG-63/R 细胞对ADM的化疗敏感性

Fig. 6 Interference of *Livin* expression in MG-63/R cells increased the chemosensitivity to doxorubicin

3 讨论

骨肉瘤起源于间叶组织,其治疗是目前骨科学界关注的非常棘手的难题。近20年,尽管国内外诸多机构进行了大量的努力,但临床治疗仍然面临复发率高和5年生存率难以提高的问题^[5]。通常认为肿瘤的发生是细胞增殖与凋亡失衡所致,而且凋亡紊乱还导致肿瘤细胞对放化疗的抵抗,目前肿瘤治疗的生物学基础也大多是通过凋亡消除肿瘤细胞^[6]。

凋亡的调节机制非常复杂,近年发现的IAP家族是一类结构上相似的蛋白质,是抑制细胞凋亡的重要调节分子。IAP主要通过直接结合或抑制特定的胱天蛋白酶来抑制细胞凋亡,是调控启动胱天蛋白酶和效应胱天蛋白酶的唯一内源性蛋白质,其抗凋亡功能远强于Bcl-2家族,在肿瘤的发病机制中起着重要作用^[7]。IAP的调控失调可导致肿瘤形成和对化疗药物耐受,在多种人类肿瘤中可以检测到IAP病理性的过表达^[8]。*Livin*是多个科学家小组^[9-11]几乎同时于2000年发现的,均采用IAP同源序列(BIR或RING)寻找方法,分别从人类基因组cDNA文库中克隆得到。*Livin*在正常成人大多数终末分化组织中(除胎盘)表达极低甚至不表达,但在多种胚胎组织和恶性肿瘤中存在高表达^[12]。研究^[13]表明,*Livin*基因表达与肿瘤发生有密切关系,并与肿瘤的高侵袭性相关,可能作为诱导肿瘤细胞凋亡的新靶点。*Livin*抑制肿瘤细胞凋亡的作用使肿瘤组织对放化疗作用变得耐受,许多以IAP为靶点的抗肿瘤研究多聚焦于*Livin*,通过调控*Livin*基因也许可为肿瘤的治疗提供新靶点。Yuan等^[14]研究发现,在非小细胞肺癌细胞株中利用RNA干扰敲除*Livin*后,可以增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,促进肿瘤细胞的凋亡,从而认为联合应用有助于非小细胞肺癌的治疗。另有研究^[15-16]报道,*Livin*抑制大肠癌以及非小细胞肺癌细胞凋亡,利用小分子干扰RNA降低*Livin*的表达可促进肿瘤细胞的凋亡。

在骨肉瘤方面,本课题组报道^[17-18]过*Livin*在骨肉瘤标本和细胞中呈现过表达,其表达水平明显高于正常骨组织,与患者的年龄、性别和肿瘤部位等一般特征无明确相关性,但是与患者肿瘤大小、Ennking分期和5年生存率等存在明确相关性,因此认为*Livin*的表达可以作为评估骨肉瘤预后的一项有效指标。但是目前还未见干预*Livin*的表达在逆转骨肉瘤耐药中的作用相关研究。基因治疗联合化疗是一个很有前景的研究方向。基因干预可能提高化疗的疗效,减少对化疗药物的耐药性,同时化疗药物亦可能增强肿瘤对基因干预的敏感性,二者产生协同作用,其关键是寻找肿瘤分子靶点^[19-20]。本研究运用脂质体将真核表达载体*Livin* shRNA转染至人骨肉瘤耐药

MG-63 细胞中,通过 G418 筛选得到稳定低表达 *Livin* 基因的细胞株。转染后细胞中 *Livin* 的 mRNA 和蛋白表达明显降低,细胞凋亡增加,同时对 ADM 等化疗药物的敏感性明显增加。本研究结果提示,应用 RNA 干扰技术下调 *Livin* 的基因表达后,显著增加 MG-63 骨肉瘤细胞凋亡,可有效抑制其增殖,从而增加其对化疗药物的敏感性, *Livin* 基因高表达可能是导致骨肉瘤耐药的重要原因之一。

综上所述,本研究为解决骨肉瘤化疗耐药问题提供了有益的实验依据。随着对 *Livin* 研究的进一步深入,本课题小组拟进一步研究 *Livin* 在逆转骨肉瘤耐药中的具体分子机制,探索 *Livin* 基因作为靶向肿瘤新疗法和针对性开发新的抗肿瘤药物的可能性。

[参 考 文 献]

- [1] TU B, ZHU J, LIU S, et al. Mesenchymal stem cells promote osteosarcoma cell survival and drug resistance through activation of STAT3[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(30): 48296-48308. DOI: 10.18632/oncotarget.10219.
- [2] LIU T, LI Z, ZHANG Q, et al. Targeting ABCB1 (MDR1) in multi-drug resistant osteosarcoma cells using the CRISPR-Cas9 system to reverse drug resistance[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(50): 83502-83513. DOI: 10.18632/oncotarget.13148.
- [3] YOON T M, KIM S A, LEE D H, et al. *Livin* enhances chemoresistance in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(6): 3667-3673. DOI: 10.3892/or.2017.5584.
- [4] ALTIERI B, SBIERA S, DELLA CASA S, et al. *Livin*/BIRC7 expression as malignancy marker in adrenocortical tumors[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(6): 9323-9338. DOI: 10.18632/oncotarget.14067.
- [5] ZHAO Z, JIA Q, WU M S, et al. Degalactotigonin, a natural compound from *Solanum nigrum* L, inhibits growth and metastasis of osteosarcoma through GSK3 β inactivation-mediated repression of the Hedgehog/Gli1 pathway[J/OL]. *Clin Cancer Res*, 2017 [Epub ahead of print][2017-08-20]. <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/early/2017/09/26/1078-0432.CCR-17-0692.long>. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0692.
- [6] WANG J H, WANG X W, QU D, et al. Upregulation of microRNA-143 reverses drug resistance in human breast cancer cells via inhibition of cytokine-induced apoptosis inhibitor 1[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(6): 4695-4700. DOI: 10.3892/ol.2017.6078.
- [7] DERAKHSHAN A, CHEN Z, VAN WAES C. Therapeutic small molecules target inhibitor of apoptosis proteins in cancers with deregulation of extrinsic and intrinsic cell death pathways[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(6): 1379-1387. DOI: 10.1158/1078-0432.
- [8] FULDA S. Targeting inhibitor of apoptosis proteins for cancer therapy: a double-edge sword? [J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(28): 3190-3191. DOI: 10.1200/JCO.2014.56.8741.
- [9] LIN J H, DENG G, HUANG Q, et al. KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 279(3): 820-831. DOI: 10.1006/bbrc.2000.4027.
- [10] VUCIC D, STENNICKE H R, PISABARRO M T, et al. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas [J]. *Curr Biol*, 2000, 10(21):1359-1366.
- [11] KASOF G M, GOMES B C. *Livin* a novel inhibitor of apoptosis protein family member [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(5): 3238-3246. DOI:10.1074/jbc.M003670200
- [12] YOON T M, KIM S A, LEE D H, et al. *Livin* enhances chemoresistance in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(6): 3667-3673. DOI: 10.3892/or.2017.5584.
- [13] KIM S A, YOON T M, LEE D H, et al. *Livin* enhances tumorigenesis by regulating the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human hypopharyngeal squamous cell carcinoma[J]. *Mol Med Rep*, 2016;14(1):515-520. DOI: 10.3892/mmr.2016.5242.
- [14] YUAN D, LIU L, XU H, et al. The effects on cell growth and chemosensitivity by *livin* RNAi in non-small cell lung cancer [J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 320(1/2): 133-140. DOI: 10.1007/s11010-008-9915-1.
- [15] 陈榆生,李鸿茹,林明,等.慢病毒介导 shRNA 特异性沉默 *livin* 基因促进 SPC-A1 细胞凋亡[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16(5): 469-473. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.5.009.
- [16] 何文静,黎军和,赵清梅,等. siRNA 沉默 *livin* 的表达对人结肠癌 HT-29 细胞增殖、凋亡及侵袭的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2012, 19(4): 392-396. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.4.009.
- [17] 孙廓,张键,陈统一,等. *Livin* 和 PIGF 在骨肉瘤中的表达及临床意义[J]. *中国癌症杂志*, 2010, 20(11):622-626.
- [18] 李怀强,孙廓,蔡凤,等.人骨肉瘤组织中 *Livin* 和 Caspase-7 蛋白的表达及其临床意义[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2014, 21(3): 320-324. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.03.015.
- [19] XIONG Q, CUI M, BAI Y. A supramolecular nanoparticle system based on β -cyclodextrin-conjugated poly-L-lysine and hyaluronic acid for co-delivery of gene and chemotherapy agent targeting hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 155: 93-103[2017-08-20]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927-7765\(17\)30193-5](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927-7765(17)30193-5). DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.04.008.
- [20] LI Z, XIANG J, ZHANG W. Nanoparticle delivery of anti-metastatic NM23-H1 gene improves chemotherapy in a mouse tumor model [J]. *Cancer Gene Ther*, 2009, 16(5): 423-429. DOI: 10.1038/cgt.2008.97.

[收稿日期] 2017-07-26

[修回日期] 2017-11-24

[本文编辑] 黄静怡