

hIAP-2 siRNA 表达质粒的构建及其对乳腺癌细胞 MCF-7 的作用

李莉萍¹, 梁念慈^{1*}, 罗超权²

(1. 广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 湛江 524023; 2. 中山大学医学部生物化学教研室, 广州 510089)

[摘要] **目的:** 构建人凋亡抑制蛋白 2(hIAP-2)基因的小分子干扰 RNA(siRNA)的表达质粒,并检测其对乳腺癌细胞 MCF-7 的作用。**方法:** 利用含 U6 启动子的 mU6pro 载体构建 hIAP-2 siRNA 表达质粒,RT-PCR 和 Western 印迹法检验其对 MCF-7 细胞的 RNA 干扰(RNAi)效果。用 MTT 法分析其对细胞增殖,流式细胞仪检测其对细胞周期,以及 Hoechst 染色法观察其对细胞形态的影响。同时,用胱天蛋白酶-3(caspase-3) Ac-DEVD-pNA 底物法检测 caspase-3 活性的变化,Western 印迹法检测一些相关蛋白质的表达变化。**结果:** hIAP-2 siRNA 表达质粒高效而特异地剔除 MCF-7 细胞中 hIAP-2 的表达,抑制肿瘤细胞增殖($P < 0.01$),阻断 MCF-7 细胞在 G₁ 期。随着 hIAP-2 基因被沉默,MCF-7 细胞变得多核化和巨核化,caspase-3 酶原表达升高并被激活($P < 0.01$)。此外,I κ B α 和 p21^{waf1} 蛋白表达升高,NF- κ B(p65)则降低,Cyt C 维持不变。**结论:** RNA 干扰 hIAP-2 对 MCF-7 细胞增殖和细胞周期调控有重要影响,细胞裂亡可能是导致其细胞死亡的主要原因,DNA 受损后其细胞周期阻滞在 G₁ 期可能与上调 p21^{waf1} 有关。

[关键词] 人凋亡抑制蛋白 2; siRNA; 乳腺肿瘤; 细胞裂亡**[中图分类号]** R 737.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)02-0150-06

Construction of hIAP-2 siRNA plasmid and its effects on breast cancer cell line MCF-7

LI Li-ping¹, LIANG Nian-ci^{1*}, LUO Chao-quan² (1. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China; 2. Department of Biochemistry, Zhongshan Medical College, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510089)

[ABSTRACT] **Objective:** To construct an expression plasmid of siRNA against gene hIAP-2 and to assess its effect on breast cancer cell line MCF-7. **Methods:** A hIAP-2 siRNA plasmid was constructed with mU6pro vector containing U6 promoter and its RNAi effect on MCF-7 cells was detected by RT-PCR and Western blot. The effects of the plasmid on MCF-7 proliferation were analyzed by MTT assay, on the cell cycle by flow cytometry, and on the cell morphology by Hoechst staining. The activity of caspase-3 was determined with its substrate Ac-DEVD-pNA and the expression of some related proteins was detected by Western blot. **Results:** The hIAP-2 siRNA plasmid knocked down hIAP-2 expression in MCF-7 cells specifically and obviously, inhibited tumor cell proliferation and arrested the MCF-7 cells at G₁ phase. After hIAP-2 gene was silenced, MCF-7 cells became multinuclear and had macronucleus; procaspase-3 was activated and its expression was increased. The protein levels of I κ B α (p37) and p21^{waf1} increased, of NF- κ B(p65) decreased and Cyt C remained unchanged. **Conclusion:** hIAP-2 in MCF-7 cells plays a crucial role in cell proliferation and cell cycle progression. Mitotic cell death might be the main way of the cell death; G₁ arrest after DNA damage might be associated with the p21^{waf1} increase.

[KEY WORDS] human inhibitor of apoptosis protein 2; siRNA; breast neoplasms; mitotic cell death

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(2): 150-155]

人凋亡抑制蛋白-2 (human inhibitor of apoptosis protein 2, hIAP-2), 又称 c-IAP1、BIRC3、MIHB 等, 属于凋亡抑制蛋白(IAP)家族。hIAP-2 广泛表达于各种肿瘤细胞, 有报道^[1]显示 hIAP-2 在多种肿瘤组织中过表达, 是染色体 11q22 扩增的结果, 其活化可能导致肿瘤恶性转化, 包括侵袭力、转移性和抗药性的改变。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种选择性沉默基因表达的有效工具, 这里, 我们构建了 U6 启动子驱动的 hIAP-2 基因的 siRNA 表达质粒, 剔除 MCF-7 细胞中 hIAP-2 的表达, 初步探讨该质粒对乳腺癌细胞 MCF-7 的作用机制。

1 材料和方法

1.1 试剂 空载体 mU6pro 由美国 Michigan 大学 Dave Turner 博士惠赠; 所有 DNA 引物均由 Bioasia

[基金项目] 广东省教育厅高校重点学科项目(9306); 广东省中医药局科研立项课题(1050051)。Supported by Key Subject of Higher Education of Education Department of Guangdong Province (9306) and Traditional Chinese Medicine Administration Bureau of Guangdong Province(1050051)。

[作者简介] 李莉萍, 博士, 讲师。E-mail: liping-li@tom.com

* Corresponding author. E-mail: nliang@gdmc.edu.cn

公司合成;限制性内切酶 *Bbs* I 购自 New England Biolabs 公司; *Xba* I 购自 SibEnzyme 公司;Survivin (6E4) 单克隆抗体购自 Cell Signaling Technology 公司;抗体 hIAP-2 (N-19)、NF- κ B p65 (F-6)、 κ B α (C-21)、caspase-3 (E-8) 购自 Santa Cruz 公司; p21^{waf1} Ab-5 (HZ52) 购自 NeoMarkers 公司; Cyt C (6H2) 购自 eBioscience 公司; actin 和抗小鼠、抗兔-辣根过氧化物酶标志的 IgG 购自北京中山生物公司; 抗山羊-辣根过氧化物酶标志的 IgG 购自 KPL 公司; ProFection 哺乳类转染系统购自 Promega 公司; Ac-DEVD-pNA caspase-3 底物 Ac-DEVD-pNA 购自 ALEXIS 公司; 碘化丙啶 (PI) 和 Hoechst 33258 购自上海华舜公司; MTT 购自 Amresco 公司; 100 bp DNA markers 购自上海申能博彩公司; TRIzol 试剂购自上海生工生物工程服务有限公司; 乳腺癌 MCF-7 细胞为本室自存。

1.2 设计和构建 siRNA 表达质粒 通过网上 Jack Lin's siRNA finder 在线软件寻找潜在的 RNAi 寡核苷酸序列, 对应 *hIAP-2* 基因的 U45879, 1 925~1 940 bp 设计 siRNA 模板, 合成正义链 5'-TTT GTT CGT TCT TCT TGC AAC CTC C AA GCT TGG AGG TTG CAA GAA GAA CGA ACT TTT T-3' 和反义链 5'-CTA GAA AAA GTT CGT TCT TCT TGC AAC CTC CAA GCT TGG AGG TTG CAA GAA GAA CGA A-3'。等量正义链与反义链模板退火, 进而与 *Bbs* I 和 *Xba* I 双酶切的 mU6pro 质粒连接, 获得的重组质粒即为 hIAP-2 siRNA 表达质粒, 表示为 mU6/hIAP-2. survivin-siRNA 表达质粒 (mU6/survivin) 的构建见文献[2]。

1.3 细胞培养和转染 MCF-7 细胞生长于含 15% 小牛血清、0.5 U/ml 胰岛素、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 RPMI 1640 完全培养液中, 正常人类肝细胞 L-02 和小鼠胚成纤维细胞 NIH3T3 则生长于含 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 RPMI 1640 完全培养液中, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度孵箱内孵育。细胞转染操作按 ProFection 哺乳类转染系统试剂盒说明书进行, 在 60 mm 培养皿上转染 1 μ g 质粒。对照组转染空载体 mU6pro, 实验组转染 mU6/hIAP-2。mU6/hIAP-2 或 mU6pro 质粒与表达绿色荧光蛋白的 pEGFP-N1 质粒以 3:1 的比例共转染 MCF-7、NIH3T3 和 L-02 细胞, 荧光显微镜下计数, 确定其转染效率均超过 80%。

1.4 RT-PCR 按 TRIzol 试剂盒说明书提取细胞的总 RNA。取 0.5 μ g 总 RNA 在 42 $^{\circ}$ C 下恒温 2 h 反转录合成第一链 cDNA。针对 hIAP-2 mRNA 序

列设计引物, 上游引物 P₁: 5'-AAC AGC AAC AAA CAA AAA ATG A-3' 和下游引物 P₂: 5'-CTT CCC ACC ACA GGC AAA-3', 进行 PCR 扩增, 条件为: 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 7 min, 获得一 580 nt 片段。同步扩增 GAPDH 用作内标, 引物 P₁: 5' ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC3' 和 P₂: 5' TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA3', 扩增产物对应于一个 452 nt 片段。

1.5 Western 印迹分析 参照文献[3]。RT-PCR 和 Western 印迹图像经扫描仪扫描后, 用 Scion Image 图像分析软件进行光密度积分值分析。

1.6 细胞增殖实验 采用 MTT 法, 转染前按 0.5×10^4 细胞/孔种植在 96 孔板, 转染 12、36、60、84、108 和 132 h 后, 每孔加入 10 μ l 5 g/L MTT, 继续温育 4 h, 然后加入 100 μ l DMSO, 震荡 15 min, 酶标仪读取光密度值 D_{570}/D_{450} 。按下列公式计算细胞增殖抑制率, 抑制率 = $(1 - A/B) \times 100\%$, 其中, B 为对照组平均 D 值, A 为实验组平均 D 值。

1.7 流式细胞术分析细胞周期和细胞凋亡 收集细胞, 4 $^{\circ}$ C 条件下用 70% 冰冷乙醇固定 24 h, 离心, 细胞重悬于 PBS 中 30 min, 再加 RNase A 室温下处理 30 min, 然后加 PI 至 20 mg/L, 避光染色 30 min 以上, 上样于 EPTCSXL-31240 流式细胞仪进行细胞周期的分析。

1.8 Hoechst 染色观察细胞形态变化 接种 MCF-7 细胞至 60 mm 培养皿中, 转染后 12、36 和 60 h 时, 弃培养液, PBS 洗 3 次, 用体积比 4% 的甲醛-PBS 溶液室温固定 10 min, 弃固定液, 蒸馏水洗 3 次, 加 Hoechst 33258 至 20 μ g/ml 染色, 室温避光 30 min, 蒸馏水洗, 荧光显微镜下观察拍照。

1.9 Ac-DEVD-pNA 发色底物法检测 caspase-3 活性 收集细胞, 用冰冷的 PBS 洗涤后, $1\ 500 \times g$ 离心 5 min, 弃上清, 沉淀中加入 50 μ l 细胞裂解液 (10 mmol/L HEPES, pH 7.5, 42 mmol/L KCl, 5 mmol/L MgCl₂, 2 μ g/ml Aprotinin, 1 mmol/L DTT, Aprotinin 和 DTT 临用前加), -70 $^{\circ}$ C 冻融 3 次后, 4 $^{\circ}$ C, $13\ 000 \times g$ 离心 20 min, 分离上清液。取 10 μ l 上清液, 用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定蛋白质含量。取 4 μ g 蛋白质 (用细胞裂解液调整体积至 10 μ l), 加入 HEPES 缓冲液 (100 mmol/L HEPES, pH 7.5, 体积比 20% 甘油, 5 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L EDTA) 80 μ l, 混匀。加入 caspase-3 底物 Ac-DEVD-pNA 10 μ l, 使其终浓度为 100 μ mol/L。37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后, 转移至 96 孔板, 用酶标免疫测定

仪,以细胞裂解液 10 μl + HEPES 缓冲液 90 μl 调零,测定其 405 nm 波长下的光密度值 (D_{405}),用 D_{405} 来表示其相对活性。实验重复 5 次。

1.10 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验确定组间统计学意义。

2 结果

2.1 RNA 干扰抑制 hIAP-2 基因表达 由图 1 可见,与对照组相比较,mU6/hIAP-2 质粒转染 MCF-7 细胞,其 hIAP-2 的 mRNA 和蛋白质表达均受到抑制,其中转染 36 h 时,其 mRNA 抑制率达到 70%,蛋白质受抑率也超过 50%,而 survivin 的蛋白表达未见改变;相反 mU6/survivin 质粒转染 MCF-7 细胞,其 hIAP-2 蛋白表达未见改变,表明我们构建的 mU6/hIAP-2 质粒可以在 mRNA 和蛋白质水平上特异、高效地使 hIAP-2 表达沉默。

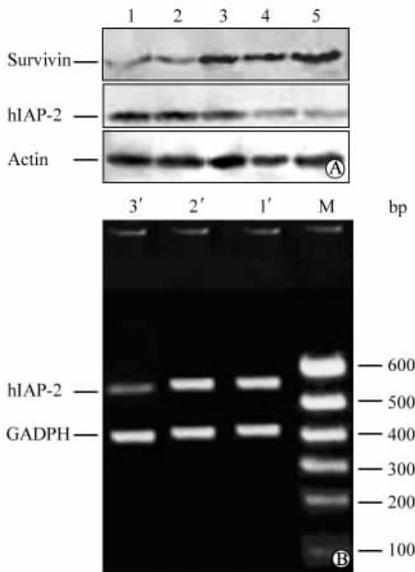


图 1 mU6/hIAP-2 质粒对 MCF-7 细胞的 RNA 干扰效果

Fig 1 RNAi effect of mU6/hIAP-2 on MCF-7 cells

A: Protein expressions of hIAP-2 and survivin in RNAi MCF-7 cells detected by Western blot. 1,2: Transfected with mU6/survivin for 36 h and 12 h, respectively; 4,5: Transfected with mU6/hIAP-2 for 12 h and 36 h, respectively; 3: Control, transfected with mU6pro for 12 h; B: hIAP-2 mRNA expression 36 h after transfection in RNAi MCF-7 cells detected by RT-PCR. 1': Control; 2': Transfected with mU6/survivin; 3': Transfected with mU6/hIAP-2; M: DNA marker

2.2 mU6/hIAP-2 质粒特异地抑制肿瘤细胞增殖

用 mU6/hIAP-2 质粒转染 MCF-7 细胞 12、36、60、84、108 和 132 h 后,相对于相应的对照组,其细胞增殖抑制率分别为 0.83%、12.9% ($P < 0.01$)、27.1% ($P < 0.01$)、46.1% ($P < 0.01$)、44.7%

($P < 0.01$)和 54.4% ($P < 0.01$);而用 mU6/hIAP-2 质粒转染正常人类肝细胞 L-02 和小鼠胚成纤维细胞 NIH3T3,其细胞增殖没有明显改变(图 2)。

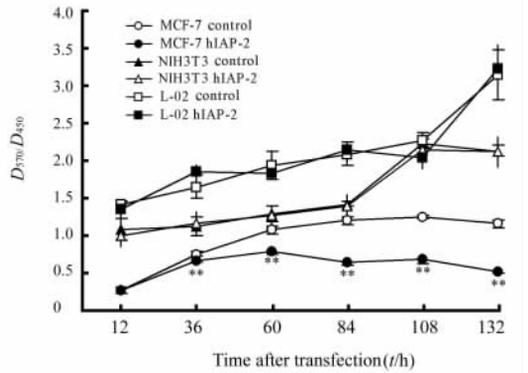


图 2 MTT 法检测 mU6/hIAP-2 质粒对 MCF-7、NIH3T3 和 L-02 细胞增殖的影响

Fig 2 Effect of hIAP-2 siRNA plasmid (mU6/hIAP-2) on cell proliferation of MCF-7, NIH3T3 and L-02 cells accessed by MTT assay

Control: Transfected with plasmid mU6pro; hIAP-2: Transfected with plasmid mU6/hIAP-2. * $P < 0.01$ vs MCF-7 control; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

2.3 细胞周期和细胞凋亡 流式细胞仪分析结果显示,mU6/hIAP-2 质粒转染入 MCF-7 细胞 12 h 和 36 h 时,与对照组相比,其 G_1 期细胞增多,但转染后 60 h 时,实验组与对照组的 G_1 期细胞数已没有明显差异。所有细胞周期图谱均没有发现明显的凋亡峰,但 mU6/hIAP-2 质粒转染 60 h 组在亚 G_1 峰区分布有大量的细胞,见图 3。DNA 琼脂糖电泳,呈涂布分布,未见明显的 DNA ladder 现象。

2.4 细胞形态学变化 与对照组相比,MCF-7 细胞转染 mU6/hIAP-2 质粒后 12 h,在荧光显微镜下就可观察到大量的多核、核胀大细胞出现,随着转染后时间的延长,变形的核肿大细胞增多,当转染后 60 h 时,可看到大量细胞呈现核固缩、核变小和边缘变模糊(图 4)。

2.5 Caspase-3 表达和活性变化 用抗 caspase-3 酶原抗体检测 caspase-3 在 MCF-7 细胞中的表达,发现其在转染 mU6/hIAP-2 质粒后 12、36 和 60 h 时,caspase-3 酶原表达逐渐升高,并可见 17 000 的活性裂解片段;同时,用 caspase-3 底物 AC-DEVD-pNA 检测 caspase-3 活性,发现其活性变化趋势与 caspase-3 酶原表达水平变化趋势一致,即转染 mU6/hIAP-2 质粒后 12、36 和 60 h 时,与对照组相比较,caspase-3 活性逐渐升高($P < 0.01$,图 5)。

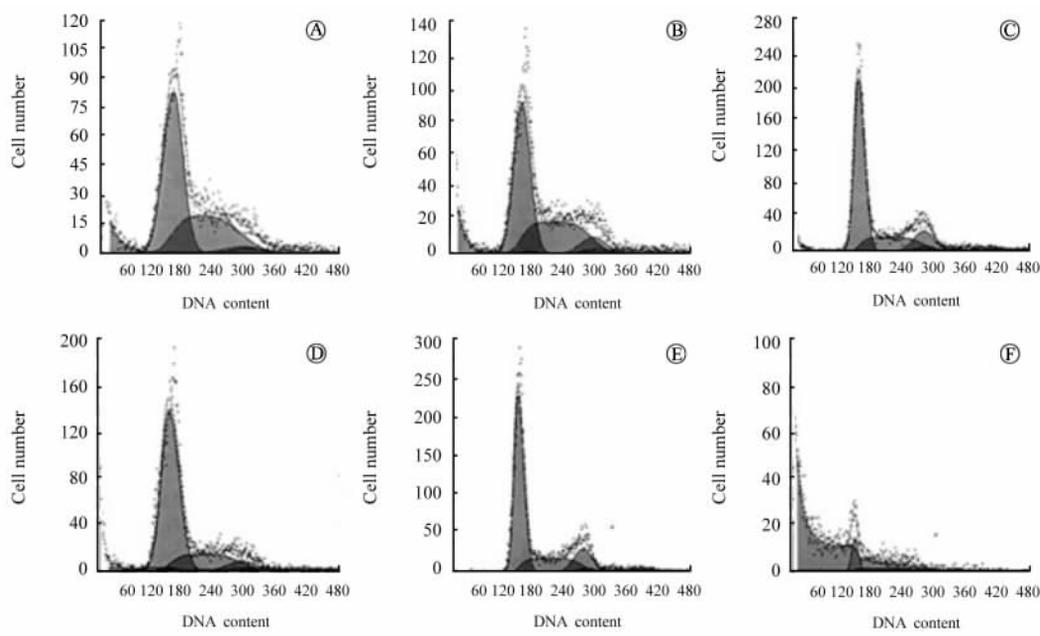


图3 流式细胞仪检测 mU6/hIAP-2 质粒作用前后 MCF-7 细胞周期变化

Fig 3 Cell cycle of MCF-7 cells before and after RNAi analyzed by flow cytometry

A-C: Control, transfected with mU6pro; D-F: Transfected with mU6/hIAP-2; A, D: 12 h after transfection; B, E: 36 h after transfection; C, F: 60 h after transfection

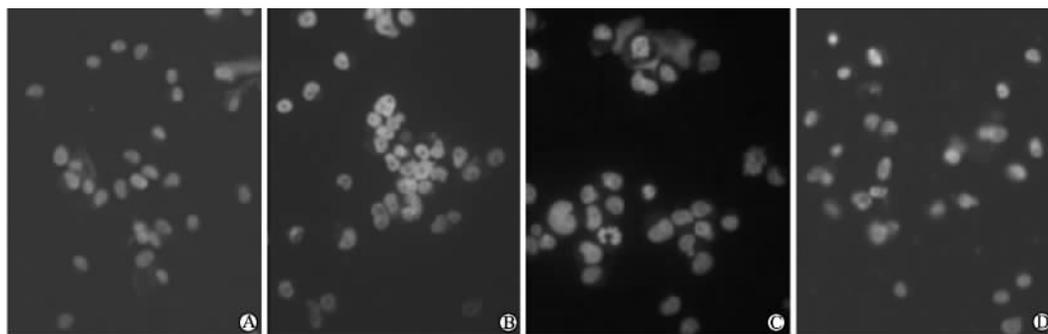


图4 mU6/hIAP-2 质粒作用前后 MCF-7 细胞形态学变化

Fig 4 Morphology changes of MCF-7 cells under fluorescence microscope before and after RNAi ($\times 400$)

A: Control, transfected with plasmid mU6pro; B-D: Transfected with plasmid mU6/hIAP-2 for 12 h, 36 h and 60 h respectively

2.6 相关蛋白质表达水平变化 Western 印迹分析结果显示, mU6/hIAP-2 质粒转染后 12、36 和 60 h 时, MCF-7 细胞中 NF- κ B 蛋白表达明显降低; Cyt C 蛋白表达未见变化; p21^{waf1} 蛋白表达明显升高; 对照组中 I κ B α 蛋白大部分以相对分子质量大于 37 000 的形式存在, 而在实验组中, 随着转染时间的延长, 正常大小的 37 000 I κ B α 蛋白逐渐被诱导 (图 6)。

3 讨论

干扰 hIAP-2 功能可抑制细胞增殖。本实验中, 我们针对 hIAP-2 基因构建了一个 siRNA 表达质粒

(mU6/hIAP-2), 并将之转染到 MCF-7 细胞、正常人类肝细胞 L-02 和小鼠胚成纤维细胞 NIH3T3。它能明显抑制 MCF-7 细胞增殖, 而对正常人类肝细胞 L-02 和小鼠胚成纤维细胞 NIH3T3 的存活没有影响, 提示 mU6/hIAP-2 质粒可能对肿瘤细胞更敏感。

IAPs 介入抑制细胞死亡的自杀方式, 有研究表明^[4]它们涉及干扰染色质的分离和胞质分裂。去除酵母菌中 IAPs 或 RNA 干扰线虫中 IAPs 表达, 引起细胞的多重分裂和有丝分裂异常。细胞裂亡 (mitotic cell death, MCD), 又名有丝分裂灾难 (mitotic catastrophe), 指细胞经过 1 次有丝分裂后

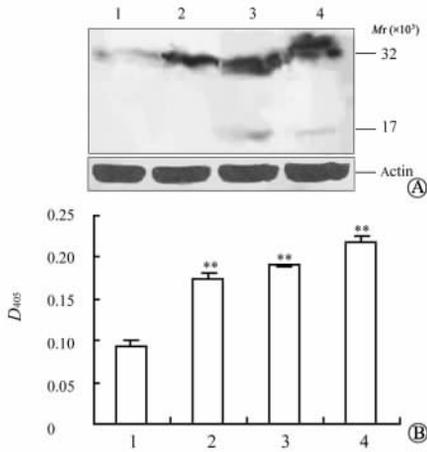


图5 mU6/hIAP-2质粒作用前后MCF-7细胞中 caspase-3蛋白表达及其活性变化

Fig 5 Protein expression and activity of caspase-3 in MCF-7 cells after RNAi

A: Caspase-3 protein expression analyzed by Western blot; B: Caspase-3 activity determined by its substrate Ac-DEVD-pNA; 1: Control, transfected with mU6pro for 12 h; 2,3,4: Transfected with mU6/hIAP-2 for 12 h, 36 h and 60 h, respectively. ** P < 0.01 vs control; n = 5, $\bar{x} \pm s$

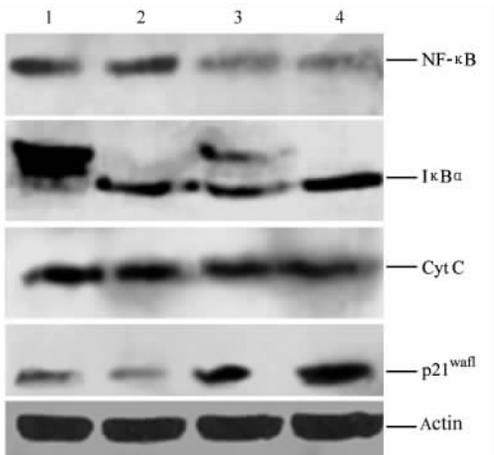


图6 mU6/hIAP-2质粒作用前后MCF-7细胞中多个相关蛋白质表达水平的变化

Fig 6 Expression of several related proteins in MCF-7 cells analysed by Western blot before and after RNAi

1: Control, transfected with mU6pro vector for 12 h; 2,3,4: Transfected with mU6/hIAP-2 for 12 h, 36 h and 60 h, respectively

才开始死亡的现象,表现为细胞多核化、细胞体积变大、DNA多倍体、DNA泳带弥散等特点,与细胞凋亡相比较,其微核均染、不出现亚G₁峰。它与有丝分裂失败密切相关^[5]。本实验结果显示,转染mU6/hIAP-2质粒后,MCF-7细胞呈现出多核化,核肿胀等性征,这一结果还表现在36h时其表观G₂

期细胞数略有增加。虽然转染后60h时可观察到呈浓染的核固缩细胞,但其凋亡现象并不明显,不出现亚G₁峰和DNA ladder,而在亚G₁区有大量细胞,细胞凋亡不像是导致细胞死亡的主要形式,反倒看似由细胞裂亡直接过渡到细胞死亡,提示细胞裂亡可能是导致mU6/hIAP-2质粒抑制MCF-7细胞增殖的主要原因。Tang等^[6]利用H1启动子驱动的hIAP-2 siRNA表达质粒转染HEK 293T细胞,也发现其细胞凋亡率与对照组没有明显区别,本实验结果与之不谋而合。

胞外信号调控哺乳类细胞增殖发生在G₁的中到后期,周期蛋白(cyclin)与细胞周期蛋白依赖激酶(CDKs)相互作用,通过使视网膜细胞瘤蛋白(RB)磷酸化,促进细胞G₁向S期过渡。p21^{waf1},是一组CDKs的蛋白抑制剂,通过结合和抑制CDKs,维持RB低磷酸化^[7]。DNA受损后,发生灾难性有丝分裂,产生四倍体细胞,p21^{waf1}诱导细胞阻滞在G₁期,以制止四倍体后DNA复制^[7,8]。Suzuki等^[9]报道IAPs家族成员之一survivin促进细胞由G₁向S期过渡。Beltrami等^[10]报道survivin丢失诱导p53的同时,p53下游靶标p21^{waf1}的表达上调,并与有丝分裂关卡的激活有关。相类似地,本实验中,hIAP-2表达被mU6/hIAP-2质粒干扰后,流式细胞术结果显示在36h之内,MCF-7细胞细胞周期被阻断在G₁期,并随着转染后时间延长,细胞中p21^{waf1}表达水平逐渐升高。由此可以推测,hIAP-2与survivin可能存在着相似的调节细胞周期的作用机制,即当hIAP-2缺陷时,细胞通过某种机制躲避有丝分裂关卡检查,带着没有完全修复和分离的姐妹染色体步入下一轮的细胞周期,然后经历了灾难性有丝分裂的细胞以p21^{waf1}依赖的方式被阻滞在G₁期。

hIAP-2在调节caspase蛋白酶激活级联反应中起着关键性作用。hIAP-2直接结合和抑制caspase-3、-7、-9,阻断凋亡体的形成^[11]。本实验结果显示,MCF-7细胞转染mU6/hIAP-2质粒,随着转染后时间的延长,其caspase-3酶原表达逐渐增加,并可见到17 000的活化形式,相应地,caspase-3裂解其底物Ac-DEVD-pNA的活性也大大增强。

hIAP-2介入TNF死亡受体途径。本实验结果显示,mU6/hIAP-2质粒转染MCF-7细胞,使其IκBα(p37)蛋白表达升高,NF-κB蛋白表达明显降低;IκBα是丰度最高的NF-κB抑制蛋白,当它被IKK磷酸化时,受泛素/26S蛋白水解酶作用而降解,释放NF-κB活性。泛素化蛋白迁移速度较蛋白质本身慢,对照组中多数IκBα表现为迁移速度较正

常的 I κ B α (p37)慢,这也许与 hIAP-2 的泛肽连接酶的活性有关。hIAP-2 环锌指结构拥有强的 E3 泛肽连接酶活性^[5],介导自身或与之结合的蛋白质如 NEMO (NF- κ B essential modifier)等的泛素化和降解,NEMO 的降解为 IKK 和 NF- κ B 活化所必需^[12]。因此,本实验中,RNAi 剔除内源性 hIAP-2,使 NEMO 泛素化能力降低,削弱 IKK 活性和 I κ B α 泛素化,表现为 I κ B α 水平升高。在此实验中,I κ B α 水平升高和 NF- κ B(p65)表达降低都能导致 NF- κ B 活性降低。hIAPs 在 NF- κ B 活化中起着限速作用^[13],hIAP-2 表达不足,引起 NF- κ B 失活,改变各种死亡相关蛋白质表达量,可能是诱导细胞死亡的机制之一。另外,NF- κ B 活性与 G₁关卡调控有直接关系,NF- κ B 活化受阻能引起 G₁到 S 期过渡的延误。本实验中剔除 hIAP-2 引起的 NF- κ B 失活也可能是使 MCF-7 细胞阻滞在 G₁期的原因。

Cyt C 基因表达增高是凋亡过程的早期事件,Cyt C 从线粒体向胞质释放需要 Cyt C 表达达到某一水平^[14],线粒体通路的凋亡信号从线粒体释放 Cyt C 开始启动^[5]。本实验结果显示,mU6/hIAP-2 质粒转染 MCF-7 细胞后,Cyt C 蛋白水平没有明显的变化。清除内源性 hIAP-2,能否引起细胞线粒体性能改变,尚待进一步研究。

综上所述,本实验通过构建靶向 hIAP-2 基因的 siRNA 表达质粒,剔除 MCF-7 细胞中 hIAP-2 表达,发现 MCF-7 细胞生长明显受到抑制,细胞周期被阻滞在 G₁期,细胞逃逸有丝分裂关卡的检查,引发细胞裂亡,caspase 级联放大过程和 NF- κ B 路径参与了这一调节过程。然而,这些工作仅仅是个开始,其继发反应及其与相关信号网络的关系等仍需通过基因芯片等技术进行深入研究,才能更详尽地了解其作用机制。

[参考文献]

[1] Imoto I, Tsuda H, Hirasawa A, et al. Expression of cIAP1, a target for 11q22 amplification, correlates with resistance of cervical cancers to radiotherapy[J]. *Cancer Res*, 2002, 62: 4860-4866.

- [2] Li LP, Liang NC, Luo CQ. Construction of survivin siRNA expression vector and its regulation on cell cycle and proliferation in MCF-7 cells[J]. *Ai Zheng*, 2004, 23: 742-748.
- [3] 卢圣栋 主编. 现代分子生物学实验技术[M]. 第2版. 北京:高等教育出版社,1999.
- [4] Uren AG, Beilharz T, O'Connell MJ, et al. Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:10170-10175.
- [5] 李电东. 一种细胞新型死亡方式——细胞裂亡[J]. *国外医学·老年医学分册*, 2003, 24: 145-147.
- [6] Tang ED, Wang CY, Xiong Y, et al. A role for NF- κ B essential modifier/I κ B kinase- γ (NEMO/IKK γ) ubiquitination in the activation of the I κ B kinase complex by tumor necrosis factor- α [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 37297-37305.
- [7] Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G₁ cyclin-dependent kinases[J]. *Genes Dev*, 1995, 9: 1149-1163.
- [8] Andreassen PR, Lacroix FB, Lohez OD, et al. Neither p21^{WAF1} nor 14-3-3 κ B prevents G₂ progression to mitotic catastrophe in human colon carcinoma cells after DNA damage, but p21^{WAF1} induces stable G₁ arrest in resulting tetraploid cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61:7660-7668.
- [9] Suzuki A, Hayashida M, Ito T, et al. Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16INK4a and Cdk2/cyclin E complex activation[J]. *Oncogene*, 2000, 19: 3225-3234.
- [10] 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: 2077-2084.
- [11] Herrera B, Fernandez M, Benito M, et al. cIAP-1, but not XIAP, is cleaved by caspases during the apoptosis induced by TGF-beta in fetal rat hepatocytes[J]. *FEBS Lett*, 2002, 520: 93-96.
- [12] Rudolph D, Yeh WC, Wakeham A, et al. Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice[J]. *Genes Dev*, 2000, 14: 854-862.
- [13] Abbas S, Abu-Amer Y. Dominant-negative I κ B facilitates apoptosis of osteoclasts by tumor necrosis factor- α [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 20077-20082.
- [14] Sanchez-Alcazar JA, Khedjakov A, Schneider E. Anticancer drugs induce increased mitochondrial cytochrome C expression that precedes cell death[J]. *Cancer Res*, 2001, 61:1038-1044.

[收稿日期] 2005-09-21

[修回日期] 2005-11-29

[本文编辑] 孙岩