

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00603

Livin siRNA 重组腺病毒对胶质瘤 U251 细胞增殖和凋亡的影响

陈宏颖^{1,2}, 曹磊¹, 王守森¹, 郑兆聪¹

1. 南京军区福州总医院神经外科, 福州 350025
2. 福建医科大学福州总医院临床医学院, 福州 350025

[摘要] 目的 通过小分子干扰 RNA(siRNA)沉默 livin 的表达,探讨其对胶质瘤 U251 细胞增殖及凋亡的影响。方法 制备 livin siRNA 重组腺病毒后感染 U251 细胞,采用 RT-PCR、蛋白质印迹法检测 livin 基因的干扰效果,用 MTT 法和流式细胞术检测 U251 细胞的增殖和凋亡情况。同时观察重组腺病毒对荷瘤小鼠的治疗效应。结果 重组腺病毒 Ad-livin siRNA 能有效抑制 U251 细胞的 livin mRNA 和蛋白水平的表达;抑制 U251 细胞增殖,促进凋亡;在小鼠体内有效抑制 U251 细胞的生长和提高荷瘤小鼠的平均生存期($P < 0.05$)。结论 用 livin siRNA 重组腺病毒介导抑制 livin 基因的表达,可抑制 U251 细胞增殖,促进凋亡,为胶质瘤的治疗提供了新策略。

[关键词] 重组腺病毒; RNA 干扰; livin; 神经胶质瘤

[中图分类号] R 730.264 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)06-0603-04

Effect of recombinant adenovirus livin siRNA on proliferation and apoptosis of U251 cells

CHEN Hong-jie^{1,2}, CAO Lei¹, WANG Shou-sen¹, ZHENG Zhao-cong¹

1. Department of Neurosurgery, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350025, Fujian, China
2. Clinical Medicine College, Fuzhou General Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350025, Fujian, China

[Abstract] **Objective** To investigate the silencing effect of siRNA targeting livin gene on the proliferation and apoptosis of U251 cells. **Methods** Adenoviral vector of siRNA targeting livin was constructed and transfected into U251 cells. The gene silencing efficiency was monitored by RT-PCR and Western blotting analysis; the proliferation and apoptosis of U251 cells were detected by MTT assays and flow cytometry, respectively. Meanwhile, the therapeutic effect of the recombinant adenovirus was also observed in tumor-bearing mice. **Results** The constructed recombinant adenovirus effectively inhibited the expression of livin at both mRNA and protein levels; it also inhibited the proliferation and promoted the apoptosis of U251 cells. In addition, the recombinant adenovirus effectively inhibited the tumor growth in mice and improved the mean survival period of tumor-bearing mice. **Conclusion** Silencing livin gene expression with recombination adenovirus carrying siRNA targeting livin can inhibit the proliferation and promote the apoptosis of U251 cells, which casts new lights on the treatment of glioma.

[Key words] recombinant adenovirus; RNA interference; livin; glioma

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(6):603-606]

Livin 是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族新成员,在大多数正常成人组织(胎盘除外)中不表达或低表达^[1]。但研究表明, livin mRNA 在人多种类型的肿瘤细胞系中高表达,包括黑色素瘤、淋巴瘤、大肠癌、前列腺癌、宫颈癌、乳腺癌等^[2-4]。由于 livin 特异性表达于肿瘤细胞,可能作为诱导肿瘤细胞凋亡治疗的一个新靶点而备受关注。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是近年发展起来的一种新的分子生物学技术,具有特异性强、抑制效率高、细胞摄取较容易等优点,目前已成为优于反

义核酸和核酶的技术,为肿瘤的基因治疗提供了更好的手段^[5-6]。本研究拟构建靶向 livin RNAi 的重组腺病毒,观察其对胶质瘤 U251 细胞增殖、凋亡的影响,以及对荷瘤小鼠的治疗效应,为进一步探索胶质瘤的基因治疗提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 大肠杆菌 DH5 α 和 BJ-Adeasy 菌株、人胚肾(HEK293)细胞、胶质瘤 U251 细胞由本实验室保存,裸鼠购自北京医科大学动物

[收稿日期] 2010-12-11 [接受日期] 2011-01-24

[作者简介] 陈宏颖,副主任医师. E-mail: hongjiechen99@163.com

中心。Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司,抗 livin 抗体购自 Abcam 公司、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自 Santa Cruz 公司,Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司,其他均为常用试剂。凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司,流式细胞仪购自 Beckman 公司。

1.2 重组腺病毒 Ad-livin siRNA 的制备及滴度测定

1.2.1 Ad-livin siRNA 的制备

靶向 livin 基因的特异性 siRNA 序列由 TaKaRa 公司合成;正义链 5'-GTG GTT CCC CAG CTG TCA G-3',反义链 5'-CTG ACA GCT GGG GAA CCA C-3';将酶切载体和 siRNA 连接,转化入感受态细菌 DH5 α ,挑选中等大小克隆,进行酶切鉴定及正确测序,筛选出所需阳性克隆。将重组腺病毒质粒转染 HEK293 细胞,进行扩增和包装。25~28 d 后,收集细胞,重复冻融细胞 3 次,收集上清得病毒原液。取病毒原液感染 HEK293 细胞,大量扩增重组腺病毒,即为高滴度的 Ad-livin siRNA 腺病毒,-80 $^{\circ}$ C 保存待用。

1.2.2 Ad-livin siRNA 滴度的测定

将 HEK293 细胞接种于 24 孔板,4 h 后以 400 μ l/孔病毒感染细胞,培养 24 h 后,在荧光显微镜下计数表达 RFP 的阳性细胞数。按公式计算重组腺病毒滴度。病毒滴度 (pfu/ml) = (RFP 阳性细胞数 \times 病毒上清稀释倍数) / 0.4。

1.3 RT-PCR 检测 livin mRNA 的表达

将 U251 细胞分为 PBS 对照组、感染重组腺病毒空载体组、感染 Ad-siRNA 组。在感染后 72 h 用 RNA 提取试剂盒(上海基迈生物科技有限公司)提取 RNA,反转录为 cDNA,用 RT-PCR 试剂盒(博日科技有限公司)和扩增仪进行扩增。内参 β -actin 上游引物:5'-AGT GTG ACG TTG ACA TCC GT-3',下游引物:5'-TGC TAG GAG CCA GAG CAG TA-3';livin 上游引物:5'-CGG CCC CTG ACA GAG GAG GA-3',下游引物:5'-AGG CCA GAC GCA ACT CCT CA-3'。扩增条件:95 $^{\circ}$ C 7 min;95 $^{\circ}$ C 20 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,共 30 个循环。2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,凝胶成像系统拍照,Labwork 软件分析测定灰度值。将目的条带与 β -actin 产物的灰度比值作为 livin mRNA 的相对表达量。

1.4 蛋白质印迹法检测 livin 蛋白表达

U251 细胞分组同 1.3 项。收集感染 72 h 各组细胞,提取总蛋白。取 40 μ g 蛋白样品进行 12% SDS-PAGE,半干转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 2 h。封闭后的膜与 1:100 稀释的 livin 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TTBS 洗膜,与 1:2 000 稀释的 livin 二抗孵育 120 h。TTBS 洗膜,化学发光试剂盒反应 3 min,胶片

曝光,拍照。实验中以 β -actin 作为内参。凝胶成像系统拍照,Labwork 软件分析测定灰度值。将目的条带与 β -actin 产物的灰度比值作为 livin 蛋白的相对表达量。

1.5 Ad-livin siRNA 对 U251 细胞增殖和凋亡的影响

1.5.1 细胞增殖率的检测

将 U251 细胞分为 PBS 对照组、感染重组腺病毒空载体组、感染 Ad-siRNA 组,同时设只加培养液的空白对照组。将各组细胞以 2×10^3 /孔的细胞数接种于 96 孔板,在感染后 2 d 加 5 mg/ml MTT 20 μ l,继续培养 4 h 后离心,弃上清,加 150 μ l 二甲亚砜(DMSO),振荡混匀,酶标仪检测 450 nm 波长处的光密度 (D_{450})值,计算细胞增殖抑制率:增殖抑制率(%) = [1 - (实验组 D_{450} /空白对照组 D_{450})] \times 100%。

1.5.2 细胞凋亡率的检测

U251 细胞分组同上。各组细胞以 2×10^3 /孔的细胞数接种于 96 孔板,在感染后 2 d 以 500 μ l 结合缓冲液悬浮细胞,加 5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI 充分混匀,室温避光反应 15 min,1 h 内上流式细胞仪检测凋亡率。

1.6 Ad-livin siRNA 对裸鼠体内胶质瘤 U251 细胞的生长抑制作用

将胶质瘤 U251 细胞消化重悬,取 0.1 ml 接种于裸鼠的右侧皮下,约 1×10^6 个细胞。1 周后,对肿瘤成功者进行随机分组,每组 7 只,共分为 3 组:Ad-siRNA 治疗组、腺病毒空载体组和 PBS 对照组,根据分组情况瘤内注射 1×10^9 pfu/只的重组腺病毒 100 μ l,或 1×10^9 pfu/只的腺病毒空载体 100 μ l,或 PBS 100 μ l/只,每周 1 次,共 3 次。每 5 d 用游标卡尺测量肿瘤长、短径 2 次。计算肿瘤体积: $V = L \times W^2 / 2$ (V 为肿瘤体积, L 为肿瘤长径, W 为肿瘤短径)。同时观察各组小鼠的平均生存率。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件,组间比较用方差分析,生存率曲线用时序检验(Log-rank test)做比较。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 Ad-livin siRNA 对 livin 表达的影响

RT-PCR 检测结果如图 1 所示;经计算可知,感染 Ad-siRNA 后 U251 细胞的 livin mRNA 相对表达量为 0.461 ± 0.057 ,感染腺病毒空载体后 livin mRNA 相对表达量为 0.936 ± 0.084 ,PBS 组的 livin mRNA 相对表达量为 0.984 ± 0.076 ,组间比较,感染 Ad-siRNA 组与两个对照组的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。蛋白质印迹分析结果如图 2 所示;感染 Ad-siRNA 后 livin 蛋白相对表达量为 0.526 ± 0.047 ,感染腺病毒空载体后 livin 蛋白相对

表达量为 0.915 ± 0.082 , PBS 组的 livin 蛋白相对表达量为 0.928 ± 0.065 , 组间比较, 感染 Ad-siRNA 组与两个对照组的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果证实 Ad-livin siRNA 可有效降低 U251 细胞的 livin mRNA 和蛋白表达水平。

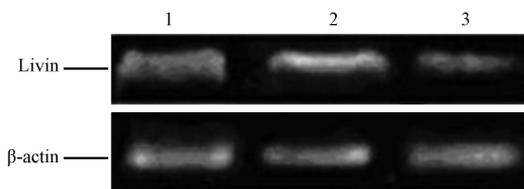


图 1 RT-PCR 检测 RNA 干扰后 livin mRNA 的表达

Fig 1 Detection of livin mRNA by RT-PCR assay

1: PBS group; 2: Ad-empty group; 3: Ad-siRNA group

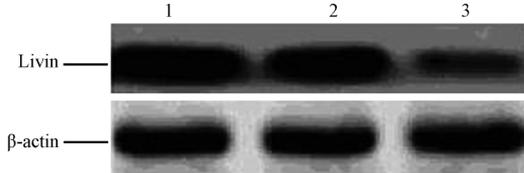


图 2 蛋白质印迹分析检测 RNA 干扰后 livin 蛋白的表达

Fig 2 Detection of livin protein by Western blotting analysis

1: PBS group; 2: Ad-empty group; 3: Ad-siRNA group

2.2 Ad-livin siRNA 对 U251 细胞增殖和凋亡的影响 用 MTT 法检测 Ad-siRNA 对 U251 细胞增殖的影响, 结果如图 3 所示: 感染 Ad-siRNA 对 U251 细胞的增殖抑制率为 $(46.2\% \pm 7.3\%)$, 感染腺

病毒空载体对 U251 细胞的增殖抑制率为 $(7.1\% \pm 1.2\%)$, 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。用 Annexin V 法检测 U251 细胞的凋亡情况, 结果如图 4 所示: 感染 Ad-siRNA 后 U251 细胞的凋亡率为 $(26.8\% \pm 6.1\%)$, 感染腺病毒空载体后 U251 细胞的凋亡率为 $(4.1\% \pm 1.6\%)$, 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果证实 Ad-livin siRNA 可有效抑制 U251 细胞增殖, 诱导 U251 细胞凋亡。

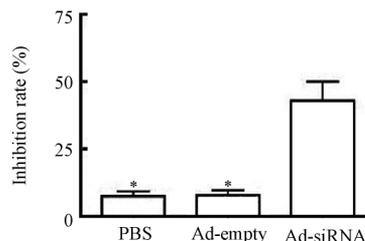


图 3 U251 细胞的增殖抑制率检测

Fig 3 Proliferation inhibition rate of U251 cells

* $P < 0.05$ vs Ad-siRNA group; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.3 Ad-siRNA 对裸鼠体内胶质瘤 U251 细胞生长的影响 PBS 和腺病毒空载体组中, 接种肿瘤 20 d 后, 肿瘤体积迅速增大; 与之相比, 25、30 d 时 Ad-siRNA 组的肿瘤体积增长较慢 ($P < 0.05$, 图 5)。荷瘤后 20 d, PBS 组开始出现小鼠死亡, 并在荷瘤后的 30 d 内全部死亡; 而 Ad-siRNA 组裸鼠死亡的速率明显降低, 60 d 后存活率仍然达到 60% ($P < 0.05$, 图 6)。

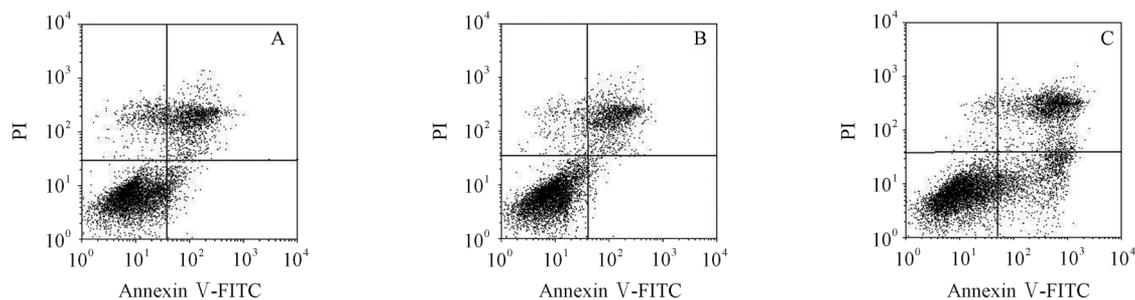


图 4 U251 细胞凋亡率检测

Fig 4 Apoptosis rate of U251 cells in each group

A: PBS group; B: Ad-empty group; C: Ad-siRNA group

3 讨论

神经胶质瘤是神经外科的常见疾病, 即使采用包括手术、放射治疗以及化学治疗等在内的综合疗法仍难以取得满意疗效。近年来生物治疗已逐渐成为胶质瘤治疗的一种新策略。细胞凋亡是由多因子介导的细胞主动死亡过程, 凋亡抑制是肿瘤发生的重要

机制, 凋亡紊乱还导致肿瘤细胞对化疗药物的抵抗。Livin 是新近发现的一个 IAPs 家族的新成员, 其 N 端含有一个高度保守的长约 70 个氨基酸的杆状病毒 IAP 重复序列 (BIR), 此结构域是结合和抑制死亡蛋白酶的关键部位; C 端含有一个 RING 环指结构^[7]。Livin 作为一种新发现的 IAP, 通过多种途径抑制细胞凋亡, 与肿瘤的发生、发展及耐药密切相关^[8-9]。

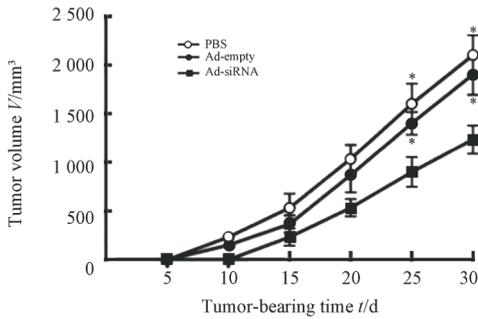


图5 各实验组小鼠的肿瘤生长曲线

Fig 5 Tumor growth in mice of each group

* P<0.05 vs Ad-siRNA group; n=10, $\bar{x} \pm s$

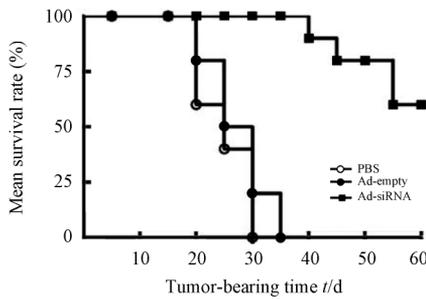


图6 各实验组小鼠的生存率

Fig 6 Mean survival period of mice in each group

siRNA 技术是由 siRNA 特异性地抑制相应基因的表达,是真核生物中基因转录后沉默的重要机制之一^[10]。siRNA 是一类长约 21~25 个核苷酸 (nt) 的特殊双链 RNA(dsRNA) 分子,具有特征性结构,即 siRNA 序列与所作用的靶 mRNA 序列具有同源性; siRNA 两条单链末端为 5'端磷酸和 3'端羟基。dsRNA 被核酸酶切割成 21~25 nt 的干扰性小 RNA(siRNA),由 siRNA 介导识别并靶向切割同源性靶 mRNA 分子^[11-12]。为了探讨 livin 在胶质瘤中的作用,本实验制备了 livin siRNA 的腺病毒,并在体内外转染胶质瘤 U251 细胞,观察对其生物学效应的影响。通过 RT-PCR 检测发现, livin siRNA 腺病毒能下调 U251 细胞的 livin mRNA 的表达,同时蛋白质印迹检测发现 Livin 蛋白水平的表达明显降低,与 RT-PCR 检测结果一致。应用 MTT、Annexin V 法检测发现 livin siRNA 腺病毒可抑制 U251 细胞增殖,促进凋亡。另外, livin siRNA 腺病毒还能有效抑制 U251 细胞在体内的增殖,并提高荷瘤小鼠的平均生存期。

细胞凋亡存在 3 条通路:死亡受体通路、线粒体通路和内质网通路,它们最终都通过 Caspase 起作用。IAP 家族具有 BIR 结构域能与 Caspase 结合,抑制后者活性,从而抑制细胞凋亡。在 8 个 IAPs 家族成员中,仅 livin 具有 α 和 β 两个亚基,每个亚基

各有 1 个 BIR 序列, Livin 可通过 BIR 结构域与 Caspase-3 结合,发挥抑制细胞凋亡的功能。前期研究表明, Livin 表达下降后, Caspase-3 的表达随之升高,提示 Livin 靶向 RNA 干扰后可能通过减少了这两个亚基的 BIR 序列与 Caspase-3 结合,导致 Caspase-3 表达升高,活性增加而使肿瘤细胞的早期凋亡增加^[13-15]。

综上所述,本研究初步证实了通过构建含特异性 livin siRNA 的重组腺病毒,可有效抑制 U251 细胞 Livin 蛋白的表达,抑制增殖,诱导凋亡,为胶质瘤的治疗提供了新靶点。

[参考文献]

- [1] Kasof G M, Gomes B C. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member[J]. J Biol Chem, 2001, 276: 3238-3246.
- [2] Liu B, Han M, Wen J K, Wang L. Livin/ML-IAP as a new target for cancer treatment[J]. Cancer Lett, 2007, 250: 168-176.
- [3] Choi J, Hwang Y K, Sung K W, Lee S H, Yoo K H, Jung H L, et al. Expression of Livin, an antiapoptotic protein, is an independent favorable prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. Blood, 2007, 109: 471-477.
- [4] Xiang Y, Yao H, Wang S, Hong M, He J, Cao S, et al. Prognostic value of Survivin and Livin in nasopharyngeal carcinoma[J]. Laryngoscope, 2006, 116: 126-130.
- [5] Ameyar-Zazoua M, Guasconi V, Ait-Si-Ali S. siRNA as a route to new cancer therapies[J]. Expert Opin Biol Ther, 2005, 5: 221-224.
- [6] Devi G R. siRNA-based approaches in cancer therapy[J]. Cancer Gene Ther, 2006, 13: 819-829.
- [7] Ma L, Huang Y, Song Z, Feng S, Tian X, Du W, et al. Livin promotes Smac/DIABLO degradation by ubiquitin-proteasome pathway[J]. Cell Death Differ, 2006, 13: 2079-2088.
- [8] Crnkovic-Mertens I, Hoppe-Seyley F, Butz K. Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML-IAP/KIAP gene[J]. Oncogene, 2003, 22: 8330-8336.
- [9] Nachmias B, Ashhab Y, Bucholtz V, Drize O, Kadouri L, Lotem M, et al. Caspase-mediated cleavage converts Livin from an antiapoptotic to a proapoptotic factor: implications for drug-resistant melanoma[J]. Cancer Res, 2003, 63: 6340-6349.
- [10] Pushparaj P N, Melendez A J. Short interfering RNA (siRNA) as a novel therapeutic[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006, 33(5-6): 504-510.
- [11] Pushparaj P N, Aarthi J J, Manikandan J, Kumar S D. siRNA, miRNA, and shRNA: *in vivo* applications [J]. J Dent Res, 2008, 87: 992-1003.
- [12] Ryther R C, Flynt A S, Phillips J A 3rd, Patton J G. siRNA therapeutics: big potential from small RNAs[J]. Gene Ther, 2005, 12: 5-11.
- [13] 周保国, 乔海泉, 孙学溥, 魏争, 王毓利. 靶向抑制 livin 基因后结肠癌细胞对伊立替康敏感性的变化[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2010, 44: 334-336.
- [14] 冯丽华, 陈毅德. RNAi 技术沉默 Livin 基因在肿瘤中的研究进展[J]. 福建医药志, 2010, 32: 83-85.
- [15] 蔡明, 王国斌, 陶凯雄, 韩高雄, 蔡昌学. Livin 靶向 siRNA 对大肠癌细胞凋亡的诱导作用[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17: 890-893.

[本文编辑] 孙岩