

[文章编号] 1000-1182(2013)04-0345-03

采用RNA干扰技术沉默survivin基因对 口腔鳞状细胞癌细胞凋亡的影响

刘世锋 梁新华 包崇云

口腔疾病研究国家重点实验室 华西口腔医院(四川大学), 成都 610041

[摘要] 目的 应用RNA干扰(RNAi)技术抑制口腔鳞状细胞癌细胞株HSC-3细胞凋亡抑制因子survivin基因的表达,促进HSC-3细胞的凋亡。方法 合成针对survivin基因的小干扰RNA(siRNA),转染对数生长期的HSC-3细胞。采用半定量逆转录聚合酶链反应检测HSC-3细胞中survivin mRNA的表达,MTT法测定细胞活性,tunnel分析和流式细胞术检测HSC-3细胞的凋亡,并设阴性对照组和空白对照组。结果 转染siRNA组survivin mRNA的表达明显低于阴性对照组和空白对照组;MTT法测定细胞活性,阴性对照组和空白对照组没有明显差别,但siRNA组的细胞活性明显下降;tunnel分析显示,转染siRNA组的凋亡细胞明显多于阴性对照组和空白对照组;流式细胞术分析,转染siRNA组的凋亡率($24.99\% \pm 1.33\%$)明显高于阴性对照组($1.24\% \pm 0.13\%$)和空白对照组($0.10\% \pm 0.02\%$)。结论 采用siRNA沉默survivin基因能促进口腔鳞状细胞癌细胞的凋亡,survivin siRNA基因治疗有可能成为口腔鳞状细胞癌治疗的新技术。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌; RNA干扰; survivin基因; 凋亡

[中图分类号] R 730.5 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2013.04.004

Effects of survivin gene silencing by small interfering RNA on apoptosis of oral squamous cell carcinoma

Liu Shifeng, Liang Xinhua, Bao Chongyun. (State Key Laboratory of Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To apply the small interfering RNA(siRNA) targeting survivin to inhibit expression of survivin gene in HSC-3 oral squamous cell carcinoma and to increase the apoptosis of HSC-3 cells. **Methods** siRNA was synthesized and transfected into oral squamous cell carcinoma HSC-3 cells. Compared with negative control group and blank control group, semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) was used to detect survivin mRNA. Cellular viability was detected by MTT and HSC-3 cell apoptosis was determined by tunnel and flow cytometry. **Results** Expression of survivin mRNA was decreased significantly in siRNA group compared with negative control group and blank control group. Cellular viability was not affected in negative control group and blank control group, but cellular viability in siRNA group was significantly decreased. As to the cellular apoptosis rate, the transfected group($24.99\% \pm 1.33\%$) was significantly higher than negative control group($1.24\% \pm 0.13\%$) and blank control group($0.10\% \pm 0.02\%$). **Conclusion** Survivin gene silenced by siRNA might promote apoptosis of oral squamous cell carcinoma. Survivin siRNA gene therapy would become a new target point for oral squamous cell carcinoma.

[Key words] oral squamous cell carcinoma; RNA interference; survivin gene; apoptosis

Survivin是一种核穿梭蛋白,在细胞核中为染色体信使蛋白,在细胞质中是微管结合蛋白,正常表达于细胞周期的G₂/M期,对细胞周期有调节的作用。若Survivin过度表达,可使细胞迅速通过G₂/M期,快速进入有丝分裂期,使细胞异常增殖,在肿瘤的发

展中起着重要作用^[1-3]。RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术是近几年发展起来的一种沉默基因表达的新方法,其原理是以双链RNA为中介降解具有相同序列的RNA。

Survivin在正常成人分化成熟的组织中表达缺失,在多种常见恶性肿瘤中的表达稳定上调,并与肿瘤的生物学行为密切相关^[4]。Survivin主要通过直接抑制caspase级联反应下游的终末子caspase-3和caspase-7的活性从而发挥抗凋亡作用^[2-3,5],survivin基因可通过加快肿瘤细胞由G₁期到S期的转换,并使肿瘤细胞在

[收稿日期] 2012-10-13; [修回日期] 2013-03-25

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81171005);高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20100181110058)

[作者简介] 刘世锋(1979—),男,四川人,主治医师,硕士

[通讯作者] 包崇云, Tel: 13076089779

G₂/M期逃避对凋亡的识别而促进肿瘤细胞的增殖和分化。Lo Muzio等^[6]报道, Survivin在正常口腔组织中不表达, 而在大多数口腔鳞状细胞癌中高表达, 因此本研究采用小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)技术, 通过干扰survivin基因的表达式来治疗口腔鳞状细胞癌, 为survivin在口腔癌治疗中的应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

口腔鳞状细胞癌细胞株HSC-3, 由口腔疾病研究国家重点实验室(四川大学)提供; Lipofectamine™ 2000脂质体转染试剂和Trizol试剂(美国Invitrogen公司), 逆转录试剂盒和聚合酶链反应试剂(美国Promega公司), siRNA片段(上海吉玛制药技术有限公司)。

1.2 细胞培养

HSC-3细胞培养于含10%小牛血清的RPMI-1640培养基中, 置于37℃ 5%CO₂培养箱中培养, 每2 d传代1次, 取对数生长期细胞用于实验。

1.3 survivin siRNA序列转染

survivin siRNA序列实验分3组。空白对照组: 即正常组; 阴性对照组: 即转染阴性对照的siRNA序列; 实验组(siRNA组): 即成功转染survivin siRNA序列。收集HSC-3细胞(细胞密度为每毫升 5×10^5 个)铺在6孔板内过夜, 取5 μ L siRNA和100 μ L不含血清的RPMI-1640培养基共同孵育5 min, 同时取5 μ L Lipofectamine™ 2000 siRNA和100 μ L不含血清的RPMI-1640培养基孵育5 min, 然后再把这两份混合液孵育20 min。把6孔板中的培养基换成每孔800 μ L不含血清的RPMI-1640培养基, 加入上述混合液, 4 h后换液, 48 h后做后续分析。

1.4 半定量逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)测定survivin mRNA的表达

收集处于对数生长期的细胞(细胞密度为每毫升 1×10^6 个), 按Trizol Reagent说明提取总RNA, 琼脂糖凝胶电泳初步评价RNA质量。按Promega两步法试剂盒提供的说明书进行RT-PCR, 测定survivin mRNA的相对表达量。survivin上游引物序列为5'-CAGG-CGGTGATGTGGATC-3', 下游引物序列为5'-GTT-TGGCTT'GCTGGTCTC-3', 扩增产物为398 bp; 内参 β -actin的上游引物序列为5'-ATCTGGCACCACA-CCT-3', 下游引物序列为5'-CGTCATACTCCTGC-TT-3', 产物大小为838 bp。

1.5 MTT法检测细胞活性

取HSC-3细胞(细胞密度为每毫升 5×10^3 个)铺在

96孔板内, 过夜后进行转染, 转染48 h后加入MTT, 用酶标仪在570 nm下检测吸光度值。

1.6 tunnel分析和流式细胞术检测细胞凋亡

采用常规方法制备细胞爬片, 用体积分数为95%的乙醇固定10 min, PBS冲洗3次, 每次3 min; 根据tunnel试剂盒说明, 观察细胞凋亡情况。通过流式细胞术测定细胞凋亡率。

1.7 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件, 进行单因素方差分析及两个独立样本的t检验, 检验水准为双侧 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞转染

细胞转染结果见图1: 转染红色荧光标记的siRNA 6 h后, 荧光显微镜下观察, 80%的细胞都发红色荧光, 说明多数细胞都已经转染了survivin siRNA。

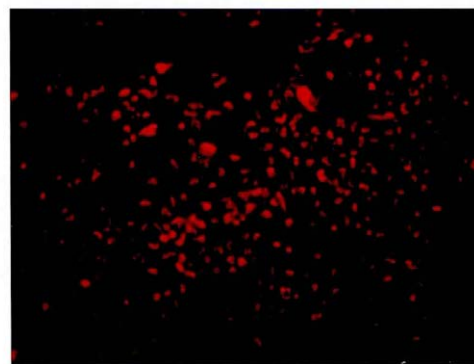
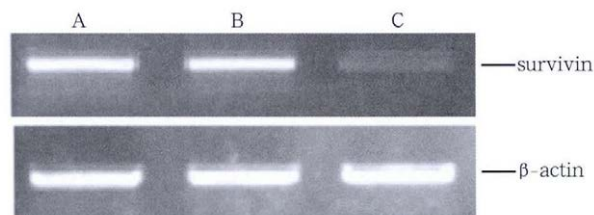


图1 细胞转染 荧光显微镜 $\times 10$

Fig 1 Cell transfection fluorescence microscope $\times 10$

2.2 半定量RT-PCR检测细胞中survivin mRNA的表达情况

半定量RT-PCR检测细胞中survivin mRNA的电泳结果见图2, 空白对照组、阴性对照组和实验组的相对表达量分别为0.65、0.64和0.05。实验组转染siRNA后, survivin mRNA的相对表达量明显低于阴性对照组和空白对照组($P<0.05$), 干扰效率高达 $92.2\% \pm 1.53\%$ 。



A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: 实验组。

图2 干扰效率的测定

Fig 2 Determination of the interference efficiency

2.3 MTT法检测细胞生长活性

MTT法测定结果见图3。

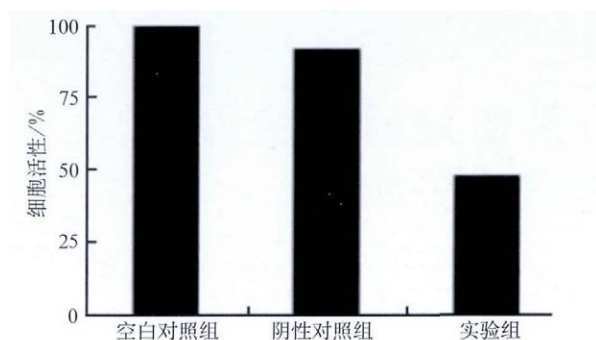


图3 细胞活性的测定

Fig 3 Determination of the cellular viability

阴性对照组与空白对照组相比, 转染后48 h细胞生长未受影响, 而实验组细胞生长受到明显抑制(图3), 细胞活性下降至 $47.16\% \pm 3.19\%$ 。

2.4 细胞凋亡检测结果

tunnel分析结果见图4: 与阴性对照组和空白对照组比较, 实验组转染siRNA后, 细胞中出现很多绿色亮点, 表明有大量的细胞凋亡。实验组、阴性对照组和空白对照组的细胞凋亡率分别为 $24.99\% \pm 1.33\%$ 、 $1.24\% \pm 0.13\%$ 和 $0.10\% \pm 0.02\%$, 实验组的细胞凋亡率明显增加, 高于其他两组($P < 0.05$), 说明沉默survivin的表达可增加细胞凋亡。



A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: 实验组。

图4 细胞凋亡的观察结果 荧光显微镜 $\times 10$

Fig 4 Observation of the cell apoptosis fluorescence microscope $\times 10$

3 讨论

本实验成功转染了siRNA, 并成功干扰了survivin基因的表达; 采用MTT法测定细胞活性发现, 干扰survivin基因可以降低口腔鳞状细胞癌的细胞活性; tunnel和流式细胞术测定结果可见, 干扰survivin基因可以诱导癌细胞凋亡。

口腔鳞状细胞癌是口腔最常见的恶性肿瘤。目前, 诱导凋亡已成为癌症研究中的基本工具, 可以据此建立新的抗癌策略。凋亡或程序性细胞死亡是一种基因控制的过程, 它保持有机体形态的发生发展^[7], 通过消除不必要的或者危险的细胞来保持生物体的动态平衡。诱导凋亡的方法有很多, 本研究采用RNA干扰的方法, 经过tunnel和流式细胞术检测, 结果发现干扰survivin基因可以明显诱导口腔鳞状细胞癌细胞的凋亡。

Survivin是凋亡抑制蛋白家族的新成员。1997年由Ambrosini等^[8]在人类基因组数据库的杂交筛选中首先分离出来。与凋亡抑制蛋白家族的其他成员一样, Survivin有杆状病毒重复结构, 是其发挥抗凋亡作用的必需结构^[9]。Survivin的组织分布有特异性, 仅表达于胚胎和发育期的胎儿组织, 终末分化的成人组织(胸腺、生殖腺除外)不表达, 而在大多数肿瘤组织中均有表达^[10]。研究^[6]证实, survivin基因在口腔鳞状细胞癌中高度表达, 并且明显高于正常黏膜

组织。有文献^[11-12]报道, survivin可能在肿瘤细胞凋亡抑制的过程中发挥重要作用。survivin基因持续高表达可促进细胞表型的恶性转化, 可能是某些恶性肿瘤发生的关键因素。综合上述研究的结果, 本研究选择survivin作为本实验的靶基因。

RNAi作为近年来发展起来的一种在mRNA水平上诱导特异性序列基因沉默的基因调控技术, 可作为哺乳动物基因功能研究的工具, 在功能基因组学研究领域得到越来越多的重视。近年的研究也表明, 利用RNAi技术是使survivin基因沉默的有效手段。Kappler等^[13]应用siRNA技术分别降低5种具有野生型及突变p53基因的肉瘤细胞的survivin表达, 结果提示, 不论肉瘤细胞是否表达野生型p53基因, 靶向survivin的siRNA均可以将其特异性杀灭。

Williams等^[14]发现, 无论是体外的结肠癌细胞HCT116还是体内的HCT116异种移植物, 应用RNAi技术阻断survivin基因表达可显著抑制其生长。目前应用RNAi靶向survivin来促进口腔鳞状细胞癌细胞凋亡的研究还较少。本研究发现, 阻断survivin基因可以诱导癌细胞凋亡, 抑制癌细胞的生长和增殖, 提示survivin是治疗口腔鳞状细胞癌极有潜力的肿瘤分子标记和治疗靶点; 但是RNAi如何有效应用于人体内干扰survivin的表达以治疗口腔鳞状细胞癌及预防复发尚需进一步研究。通过RNAi靶向包括survivin

的应力保护作用有很大区别,当根管口处牙体组织较为薄弱时,为避免其发生劈裂,建议采用弹性模量较大的粘接剂,如磷酸锌,使应力更多分布于根管壁,从而减少根管口处的应力负荷;当根管口处牙体组织抗力形较好时,而残根较细或弯曲时,建议采用弹性模量较小的粘接剂,如Superbond C&B,使应力更多分布于根管口处牙体组织,以减少根管壁的应力负荷,从而避免根折的发生。

[参考文献]

- [1] Jung SH, Min KS, Chang HS, et al. Microleakage and fracture patterns of teeth restored with different posts under dynamic loading[J]. J Prosthet Dent, 2007, 98(4) 270-276.
- [2] Torabi K, Fattahi F. Fracture resistance of endodontically treated teeth restored by different FRC posts: An *in vitro* study[J]. Indian J Dent Res, 2009, 20(3) 282-287.
- [3] Vasconcellos WA, Cimini CA Jr, Albuquerque RC. Effect of thpost geometry and material on the stress distribution of restored upper central incisors using 3D finite element models. Stress distribution on incisors with posts[J]. J Indian Prosthodontic Society, 2006, 6(3) :139-144.
- [4] Asmussen E, Peutzfeldt A, Sahafi A. Finite element analysis of stresses in endodontically treated, dowel-restored teeth[J]. J Pros-

thet Dent, 2005, 94(4) 321-329.

- [5] Okada D, Miura H, Suzuki C, et al. Stress distribution in roots restored with different types of post systems with composite resin [J]. Dent Mater J, 2008, 27(4) :605-611.
- [6] Maceri F, Martignoni M, Vairo G. Mechanical behaviour of endodontic restorations with multiple prefabricated posts: A finite-element approach[J]. J Biomech, 2007, 40(11) 2386-2398.
- [7] Su KC, Chang CH, Chuang SF. Biomechanical evaluation of endodontic posts-finite element analysis[J]. J Biomech, 2007, 40(S2) : S463-S464.
- [8] Sorrentino R, Aversa R, Ferro V, et al. Three-dimensional finite element analysis of strain and stress distributions in endodontically treated maxillary central incisors restored with different post, core and crown materials[J]. Dent Mater, 2007, 23(8) 983-993.
- [9] Adanir N, Belli S. Stress analysis of a maxillary central incisor restored with different posts[J]. Eur J Dent, 2007, 1(2) :67-71.
- [10] Eskitaşcioğlu G, Belli S, Kalkan M. Evaluation of two post core systems using two different methods(fracture strength test and a finite elemental stress analysis)[J]. J Endod, 2002, 28(9) :629-633.
- [11] Nissan J, Dmitry Y, Assif D. The use of reinforced composite resin cement as compensation for reduced post length[J]. J Prosthet Dent, 2001, 86(3) 304-308.

(本文编辑 杜冰)

(上接第347页)

在内的多个靶点,从多基因角度治疗口腔鳞状细胞癌也是今后研究工作的重点。

[参考文献]

- [1] Li F, Brattain MG. Role of the survivin gene in pathophysiology [J]. Am J Pathol, 2006, 169(1) :1-11.
- [2] Shin S, Sung BJ, Cho YS, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7[J]. Biochemistry, 2001, 40(4) :1117-1123.
- [3] Suzuki A, Ito T, Kawano H, et al. Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death[J]. Oncogene, 2000, 19(10) :1346-1353.
- [4] Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, et al. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(1) :127-134.
- [5] Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, et al. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases[J]. Nature, 1997, 388(6639) : 300-304.
- [6] Lo Muzio L, Pannone G, Staibano S, et al. Survivin expression in oral squamous cell carcinoma[J]. Br J Cancer, 2003, 89(12) 2244-2248.
- [7] Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on

apoptosis[J]. Cell, 1994, 76(5) :777-779.

- [8] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3(8) 917-921.
- [9] Sohn J, Khaoustov VI, Xie Q, et al. The effect of ursodeoxycholic acid on the survivin in thapsigargin-induced apoptosis[J]. Cancer Lett, 2003, 191(1) 83-92.
- [10] Li F, Ambrosini G, Chu EY, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin[J]. Nature, 1998, 396(6711) : 580-584.
- [11] Idenoue S, Hirohashi Y, Torigoe T, et al. A potent immunogenic general cancer vaccine that targets survivin, an inhibitor of apoptosis proteins[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(4) :1474-1482.
- [12] Cong XL, Han ZC. Survivin and leukemia[J]. Int J Hematol, 2004, 80(3) 232-238.
- [13] Kappler M, Bache M, Bartel F, et al. Knockdown of survivin expression by small interfering RNA reduces the clonogenic survival of human sarcoma cell lines independently of p53[J]. Cancer Gene Ther, 2004, 11(3) :186-193.
- [14] Williams NS, Gaynor RB, Scoggins S, et al. Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(3) 931-946.

(本文编辑 吴爱华)