

# siRNA 干扰 *Survivin* 基因对结肠癌生物学特性影响

王晓春,文贤慧

中南大学湘雅医学院医学检验系,长沙 410013

**摘要** 向结肠癌 SW480 细胞中导入针对 *Survivin* 基因的 siRNA,研究 RNA 干扰对 SW480 细胞增殖和凋亡的影响,为结肠癌的基因治疗提供实验依据,同时寻求新的、有效的 RNA 干扰片段。设计 3 条特异性干扰靶向 *Survivin* 基因的 siRNA,转染 24,48,72h 后,Western 蛋白印迹法检测 *Survivin* 蛋白变化,同时噻唑蓝 (MTT) 法检测细胞增殖。3 条 siRNA 分别作用于 SW480 细胞,转染 24,48,72h 后,3 组 *Survivin* 蛋白表达均出现下调 ( $P<0.05$ ),在 48h 时达到顶峰,抑制率分别为  $66.5\% \pm 2.1\%$ ,  $49.6\% \pm 2.8\%$  和  $47.8\% \pm 3.1\%$ ,差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ );MTT 法显示 *Survivin* 基因沉默后,细胞增殖受到明显抑制。脂质体所介导的体外 *Survivin* siRNA,能有效地沉默结肠癌细胞的 *Survivin* 基因,从而抑制结肠癌细胞的增殖和促进细胞的凋亡,特别是针对保守区域设计的靶向 siRNA,干扰效果更为显著。

**关键词** *Survivin*;基因沉默;siRNA;MTT 法;细胞生物学特性

**中图分类号** R735.3

**文献标识码** A

**doi** 10.3981/j.issn.1000-7857.2011.07.002

## Influence of *Survivin* Gene-targeting siRNA on the Biological Features of Colorectal Carcinoma Cells

WANG Xiaochun, WEN Xianhui

Department of Laboratory Medicine, Xiangya Medical School, Central South University, Changsha 410013, China

**Abstract** *Survivin* siRNA is transfected to colon cancer cells SW480 and the interference on proliferation and apoptosis is studied to provide the experimental basis for gene therapy of colon cancer and seek new, effective RNA interference fragment. Three siRNA targeting *Survivin* gene were constructed and transfected into SW480. After 24, 48, and 72h, the change of *Survivin* protein was detected by using Western blot, in the same time, cell proliferation was detected by using MTT assay. The results show that after three siRNA effect on SW480 cells at 24, 48, and 72h, three groups of *Survivin* protein expression are all appeared the decrement ( $P<0.05$ ). The expression of *Survivin* protein reached apex at 48h and the inhibitory rates were  $66.5\% \pm 2.1\%$ ,  $49.6\% \pm 2.8\%$  and  $47.8\% \pm 3.1\%$ , respectively, compared with the control group ( $P<0.05$ ). MTT assay show that the cell proliferation was inhibited after *Survivin* gene silencing. Liposome-mediated *Survivin* siRNA can effectively silence the *Survivin* gene in colon cancer cells, therefore inhibit cancer cell proliferation and promote apoptosis, it is especially designed for targeting conservative regions of siRNA, and interference effects are more significant.

**Keywords** *Survivin*; gene silencing; siRNA; MTT; biological feature

### 0 引言

结肠癌是人类最常见的消化道恶性肿瘤,在全球范围内,结肠癌发病率占第 3 位,在西方发达国家则仅次于肺癌,列于第 2 位。近年来,结肠癌在中国有发病率升高、5 年生存率下降的趋势,严重危害人类健康<sup>[1]</sup>。*Survivin* 基因是迄今为

止发现的最强的凋亡抑制因子,研究认为其通过多个通路控制肿瘤细胞的生物学特性<sup>[2]</sup>,*Survivin* 基因的选择性表达以及它与一种天然的反义 *Survivin* EPR-1 和 Bcl-2 的特殊关系,使其成为目前恶性肿瘤诊断和治疗的新靶点。本文通过化学合成 siRNA 并转染 SW480,分析不同的 siRNA 对 *Survivin* 基

收稿日期:2010-11-08;修回日期:2011-01-19

基金项目:湖南省自然科学基金项目(10JJ5010);长沙市科技局基金项目(k0803143-21)

作者简介:王晓春,教授,研究方向为生化与分子诊断,电子信箱:wxcx@yahoo.com.cn

因沉默的效率和结肠癌细胞株 SW480 细胞增殖、凋亡的影响,为 RNA 干扰 *Survivin* 基因治疗结肠癌提供可行性依据,同时提供新的、有效的 siRNA 干扰序列。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞株与主要试剂

SW480 细胞株由中南大学肿瘤研究所提供。RPMI-1640 培养液(美国 Gbico 公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料公司),Opti-MEM® I 低血清培养基(美国 Ameresco 公司),Lipofectamine™ 2000 试剂(美国 Invitrogen 公司),噻唑兰、二甲基亚砷(美国 Sigma 公司),总蛋白提取试剂盒(美国 ProMab 公司),6 孔、96 孔细胞培养板(美国 CoStar 公司),*Survivin* 抗体(美国 ABT 公司),GAPDH 抗体(美国 ProMab 公司),羊抗鼠二抗、羊抗兔二抗(北京博奥森生物技术有限公司)。

#### 1.1.2 主要仪器

CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(ESPEC-BNA311,日本 Tabai-Espec 公司),倒置显微镜(IX71-F22PH,日本 Olympus 公司),Mini-PROTEAN 3 蛋白电泳仪(Catalog165-3301,美国 Bio-Rad 公司),ECL 半干电转系统(Catalog170-3930,美国 Amersham 公司),酶标仪(ELx-800,美国 Bio-TEK 公司),流式细胞仪(Coulter Epics XL,美国 Beckman-Coulter 公司),凝胶成像系统(GDS-8000,美国 UAP 公司)。

#### 1.1.3 siRNA 合成

从 GeneBank 中查得 *Survivin* 基因的全基因序列,利用 Ambion 网站提供的 siRNA 设计软件设计针对 *Survivin* 基因的 siRNA 片段,应用 BLAST 软件进行同源性别除。与任何基因序列均无同源性的一段植物的 siRNA 序列作为阴性对照,将设计的序列交由上海吉玛生物公司体外合成 3 条靶向 *Survivin* 基因的 siRNA (*Survivin*-389,*Survivin*-217,*Survivin*-1657 表示)和 1 条阴性对照 siRNA (NC 表示)。siRNA-389 (Sense)5'-GAAGCAGUUUGAAAAUUUATT-3', (Antisense)5'-UAAUUCUCAAACUCGUUUCTT-3'。siRNA-217 (Sense)5'-CAUGCAAAGGAAACCAACATT-3', (Antisense)5'-UGUU GG UUUCUUUGCAUGGG-3'。siRNA-1657 (Sense)5'-GGCUGUUCUGAGAAAUAATT-3', (Antisense)5'-UUAUUUCUCAG AACAGCCTT-3'。NC (Sense)5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU TT-3', (Antisense)5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

含有 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 SW480 细胞,倒置显微镜观察生长情况,细胞密度达到 70%~80%时用 0.25%胰酶消化,以 1:3 比例传代,选择 30 代以内的细胞进行转染。

#### 1.2.2 细胞转染

转染前一天,在 6 孔板上加入 2mL 含 FBS 的基础培养基,再加入 1mL 4×10<sup>4</sup>~5×10<sup>4</sup>/mL 细胞液。

选择用于初期接种的细胞数量,应能在 24h 内使细胞密度达到 40%~50%。以 250μL DEPC H<sub>2</sub>O 稀释 5μL Lipofectamine™ 2000,轻轻混匀,室温下孵育 5min。以 250μL DEPC H<sub>2</sub>O 稀释 7.5μL siRNA,轻轻混匀,孵育 5min。混合稀释的 siRNA 和稀释的 Lipofectamine™ 2000,轻轻混合,在室温下孵育 10min,以便允许复合物的形成。将 siRNA Lipofectamine™ 2000 复合物加入到每一个包含细胞和培养基的孔中,通过轻轻地前后摇动培养板使其混合。37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 24~72h,转染 6h 时弃去 Opti-MEM® I 低血清培养基,更换为含有 10%胎牛血清的培养基,同时取 FAM 荧光标记的对照 siRNA 转染孔,放置荧光镜下观察转染效率,96 孔板如上操作。同时不做任何处理的细胞,作为对照组。

#### 1.2.3 Western blot 检测 *Survivin* 蛋白表达

总蛋白抽提试剂盒抽提蛋白质,收集上清液。由于采用内参照法校正,省略根据总蛋白浓度估算点样法。12%SDS-聚丙烯酰胺电泳分离蛋白,半干电转法将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜 55min。封闭液中孵育 2h,加入 1:300 稀释的 *Survivin* 一抗 4°C 过夜, TBST 洗膜 5min,共 5 次,加入 1:30000 HRP 标记的二抗,37°C 孵育 2h 进行增强化学发光法检测。阳性条带以 Gel Pro 4.0 版凝胶光密度分析软件进行分析,测其累积光密度(Integrated Optical Density, IOD)值。

#### 1.2.4 噻唑蓝(MTT)法检测

以 3×10<sup>3</sup>/mL 细胞浓度接种于 96 孔板,每组设 4 个平行孔,分 6 组,分别在转染后 24,48 和 72h 检测各孔 490nm 波长处的吸光度。实验重复 3 次。抑制率为<sup>[3]</sup>

$$\text{抑制率} = (1 - \text{实验组 OD 值} / \text{对照组 OD 值}) \times 100\%$$

### 1.3 统计学处理

所有统计均采用 SPSS 16.0 分析。蛋白表达量组内差异采取重复测量分析进行比较,组间差异采取 One-Way ANOVA 分析;细胞增殖抑制结果采用方差分析,以  $P < 0.05$  具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 转染效率

转染 6h 后取出 siRNA 转染孔,放置荧光镜下观察转染效率,转染效率达到 60%~70%时,进行后续实验,见图 1。

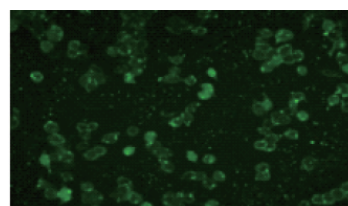


图 1 siRNA 转染效率荧光图

Fig. 1 Fluorescent map of siRNA transfection efficiency

### 2.2 *Survivin* 蛋白表达水平检测

如表 1、表 2 和图 2 所示,siRNA 转染 SW480 细胞后,各组内参蛋白 GAPDH 表达一致,与正常细胞对照组相比,干扰

表 1 转染后不同时间点目标蛋白的表达  
Table 1 Expression of target protein at different transfection time points after transfection ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别              | 转染后时间/h    |            |            |
|-----------------|------------|------------|------------|
|                 | 24         | 48         | 72         |
| Survivin-389 组  | 416.6±2.8  | 352.2±41.6 | 350.6±8.6  |
| Survivin-217 组  | 574.4±37.4 | 498.4±16.8 | 527.2±34.1 |
| Survivin-1657 组 | 600.9±60.3 | 516.6±23.0 | 529.1±31.5 |
| 对照组             | 1027.3±123 | 989.5±55.4 | 1016.8±84  |
| 空脂质体组           | 948.3±89.1 | 957.7±41.1 | 955.3±21.5 |
| 阴性转染组           | 1007.3±103 | 947.3±123  | 997.3±123  |

表 2 不同组别、不同时间点的蛋白抑制率 (%)  
Table 2 Comparison of inhibition rate of protein of different groups at different time points (%)

| 转染后时间/h | Survivin-389 组 | Survivin-217 组 | Survivin-1657 组 | P 值   |
|---------|----------------|----------------|-----------------|-------|
| 24      | 58.5±1.2       | 43.8±2.7       | 41.6±1.9        | <0.05 |
| 48      | 66.5±2.1       | 49.6±2.8       | 47.8±3.1        | <0.05 |
| 72      | 63.5±2.5       | 48.1±2.8       | 47.5±2.1        | <0.05 |

组 Survivin 蛋白的表达出现下调, siRNA 的干扰效率在 48h 最高 ( $P<0.05$ ), 72h 的抑制率与 48h 的无差异 ( $P>0.05$ ); Survivin-389 的抑制率最高 ( $P<0.05$ ), 而 Survivin-217 与 Survivin-1657

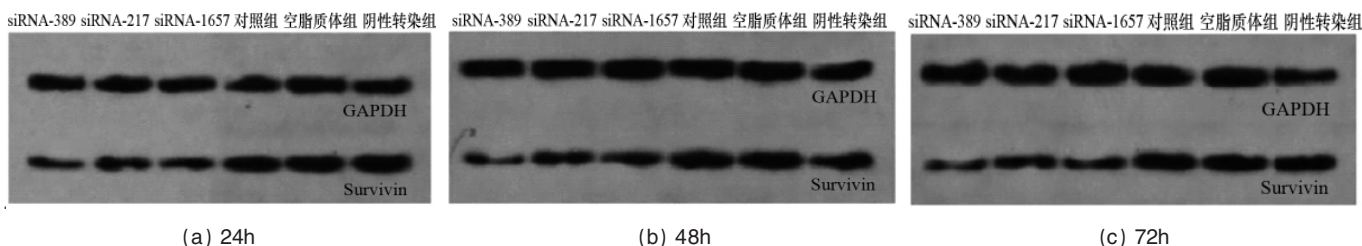


图 2 siRNA 干扰 SW480 24h(a), 48h(b), 72h(c) 时目标蛋白的表达

Fig. 2 Expression of the target protein of SW480 by siRNA interference at 24h(a), 48h(b) and 72h(c)

蛋白下调含量表达无差异 ( $P>0.05$ )。阴性对照组和空脂质体转染组的蛋白含量与正常组相比无差异性 ( $P>0.05$ )。

### 2.3 siRNA 对细胞增殖的影响

MTT 法检测发现, 经 siRNA 作用后的实验组细胞增殖能力明显减弱, 48h 与 72h 抑制作用最强, 干扰组与对照组、空脂质体转染组与阴性对照组之间的差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 96h 后, 5 组细胞的生长速率无明显差异 (图 3)。

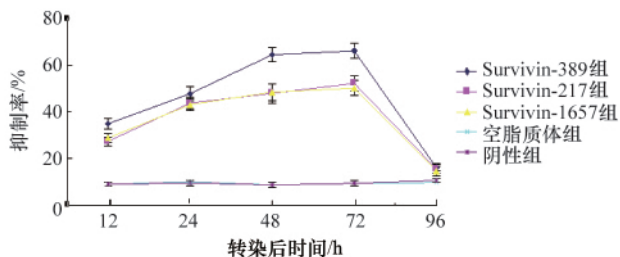


图 3 siRNA 对 SW480 细胞增殖能力的影响

Fig. 3 Effect of siRNA on proliferation of SW480 cells

## 3 讨论

Survivin 是近年来发现的凋亡抑制蛋白 (Inhibitor of Apoptosis Protein, IAP) 家族中结构独特的一个新成员, 是 IAP 家族中唯一具有抑制凋亡和调节有丝分裂双重作用的基因, 同时也是迄今为止发现的最强凋亡抑制因子<sup>[4]</sup>。绝大多数恶性肿瘤的特征是细胞凋亡机制的缺失。研究表明, Survivin 表

达阳性的结肠癌更倾向于出现肝转移、血管浸润等恶性行为, Survivin 基因的表达水平越高, 预后越差。而在已凋亡的细胞中, Survivin mRNA 的表达显著下调<sup>[5]</sup>, 这表明以 Survivin 为靶点的基因治疗可能成为结肠癌患者治疗的探索方向。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是指由小片段的双链 RNA 分子 (double-strand RNA, dsRNA) 介导的生物细胞内同源基因的特异性转录后基因静默现象。在 RNA 干扰技术的应用中, siRNA 的序列设计是一个非常重要的问题。典型哺乳动物的基因长度都有若干 kbp, 而 siRNA 长度仅为 19bp 左右, 因此可供选择作用的位点相当多, 对靶 mRNA 选择不同的作用位点设计 siRNA, 其抑制效果会有很大的区别, 在某些位点抑制效果会很明显, 而某些位点可能基本无抑制。目前, RNAi 对结肠癌 SW480 的干扰效率为 35%~75%<sup>[7-10]</sup>。本实验针对 Survivin 基因不同的 3 条 siRNA 导入结肠癌 SW480 细胞, 通过 Western blot 检测发现 3 组干扰组细胞的 Survivin 蛋白表达量分别比阴性对照组下降 66.5%±2.1%, 49.6%±2.8% 和 47.8%±3.1%, 并且干扰组细胞的生长曲线明显低于正常对照组。一般认为, 如果能够使靶 mRNA 或其蛋白质产物少于未被干扰状态下的 50%, 则认为抑制有效<sup>[11]</sup>, 说明 Survivin 基因已被 siRNA-389 成功抑制, 而 siRNA-217 和 siRNA-1657 的干扰活性较低。Survivin 基因长度为 14.5kbp, 位于 17 号染色体的 q25, 保守区域 (122...550), 有 4 种剪切异构体 SurvivinΔEx3、Survivin2B、Survivin3B 和 Survivin2a, 这解释了报道中 RNA 干扰活性有差异的原因。空脂质体、阴性对照组

的蛋白表达与对照组无差异,生长曲线与对照组也无明显差异,说明利用脂质体 2000 进行转染,对细胞损伤小,几乎不影响细胞的生长;阴性对照的结果,证明了 RNA 干扰的特异性。

本研究还表明,在 mRNA 水平沉默 *Survivin* 基因后,肿瘤细胞的生长受到抑制,转染 48h 和 72h 抑制效应最大,而 96h 细胞增殖速度恢复,逐渐接近对照组的水平。这说明瞬时转染靶向 *Survivin* 基因的 siRNA 片段,确实可以使结肠癌细胞内沉默 *Survivin* 基因,使 *Survivin* 蛋白表达下调,同时细胞凋亡率增加,增殖分裂能力减弱,但由于 siRNA 在细胞内性质不稳定,在细胞内容易被降解,所以在导入细胞后 48~72h 是 RNAi 效果最强时期,超过 96h RNAi 效果逐渐消失<sup>[12]</sup>。

#### 4 结论

本研究通过体外构建靶向 *Survivin* 基因的 siRNA 并转染大肠癌细胞,成功地沉默了 *Survivin* 基因,从而有效地抑制了大肠癌细胞的增殖,延缓了肿瘤细胞的生长,这为结肠癌的基因治疗提供了新的理论依据。同时,本研究结果为下一步构建质粒筛选稳定细胞株提供了前提。

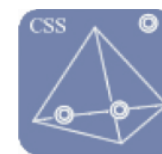
#### 参考文献 (References)

- [1] 王学虎,傅仲学,赵渝,等. *Survivin* 基因的 shRNA 干扰对结肠癌 SW480 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国肿瘤临床, 2010, 37(9): 485-489.  
Wang Xuehu, Fu Zhongxue, Zhao Yu, et al. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2010, 37(9): 485-489.

- [2] Lee S H, Mok H, Jo S, et al. Dual gene targeted multimeric siRNA for combinatorial gene silencing [J]. *Biomaterials*, 2010, doi:10.1016/j.biomaterials.2010.11.062.
- [3] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 355-360.  
Sambrook J, Russell D W. *Molecular cloning a laboratory manual* [M]. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002: 355-360.
- [4] Reed J C. Apoptosis-based therapies [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 1(2): 111-121.
- [5] Beh C W, Seow W Y, Wang Y, et al. Efficient delivery of Bcl-2-targeted siRNA using cationic polymer nanoparticles: Downregulating mRNA expression level and sensitizing cancer cells to anticancer drug [J]. *Biomacromolecules*, 2009, 10(2): 41-48.
- [7] Dario C. *Survivin*, cancer networks and pathway-directed drug discovery [J]. *Altieri Nature Reviews Cancer*, 2008, 8(2): 61-70.
- [8] Diakos C, Zhong S, Xiao Y, et al. TEL-AML1 regulation of *survivin* and apoptosis via miRNA -494 and miRNA -320a [J]. *Blood*, 2010, 116(23): 4885-4893.
- [9] Soo H L, Hyejung M, Sungduk J, et al. Dual gene targeted multimeric siRNA for combinatorial gene silencing[J]. *Biomaterials*, 2010, 1(1): 1-10.
- [10] Pennati M, Folini M, Zaffaroni N. Targeting *survivin* in cancer therapy [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2008, 12(4): 463-476.
- [11] Saito T, Hama S, Izumi H. Centrosome amplification induced by *survivin* suppression enhances both chromosome instability and radiosensitivity in glioma cells[J]. *British Journal of Cancer*, 2008, 15(98): 345-355.
- [12] Jodi A, CKenzie M, Tong L, et al. *Survivin* enhances motility of melanoma cells by supporting Akt activation and  $\alpha 5$  integrin upregulation[J]. *American Association for Cancer Research*, 2010, 8(16): 5048-5056.

(责任编辑 吴晓丽)

#### ·学术动态·



## “第十三届国际体视学大会”征文

由国际体视学会主办,中国体视学学会承办的“第十三届国际体视学大会”将于 2011 年 10 月 19—23 日在北京市召开。

征文内容如下。体视学方法:Stereology, Geometrical and topological tools, Main mathematical and physical transforms, Mathematical morphology, Stochastic geometry, Spatial statistics, Space-time dynamics pattern analysis, Texture evaluation, Fractals, Image enhancement, 3D reconstruction, Color images; 体视学应用: Micro- and nano-structures, Biology and medicine, Biotechnology, Agriculture, Materials tomography, X-ray scanner, PET-scan, High resolution imaging in remote sensing, Vision, Industrial control, Real time aspects, Electronic architectures, Microelectronics, Secure information systems。

全文截止日期:2011 年 7 月 15 日。

联系方式:北京市海淀区清华大学工程物理系刘卿楼 211 室(100084);电话:010-62776336;电子信箱:tscss@mail.tsinghua.edu.cn;会议网址:www.tscss.org。