

## RNAi 抑制 Survivin 基因的表达对乳腺癌 SKBr-3 细胞的影响

李昆仑<sup>1,2)</sup>, 崔明<sup>1)</sup>, 刘嘉<sup>1)</sup>, 冯雁康<sup>1)</sup>, 马彦光<sup>1)</sup>, 朱俊<sup>1)</sup>

(1) 成都军区昆明总医院普通外科, 云南昆明 650032; 2) 昆明医学院研究生部, 云南昆明 650031)

**[摘要]** **目的** 应用 RNA 干扰技术抑制人 Survivin 基因表达, 观察其对乳腺癌 SKBr-3 细胞增殖和凋亡的影响。 **方法** 设计、合成靶向 Survivin 基因的 siRNA 基因片段, 应用脂质体包埋转染乳腺癌 SKBr-3 细胞, 采用 MTT 比色法检测细胞增殖率、RT-PCR 和 Western blot 法观察乳腺癌细胞 Survivin mRNA 和蛋白质的表达、流式细胞仪检测细胞凋亡率。 **结果** MTT 检测显示 Survivin-siRNA 组对细胞增殖有明显抑制作用 ( $P < 0.05$ ), 其细胞最高抑制率为  $(43.1 \pm 0.3) \%$ ; RT-PCR 检测显示 Survivin-siRNA 组 mRNA 表达明显下调 ( $P < 0.01$ ), 其相对表达量分别为  $0.203 \pm 0.018$ 、 $0.229 \pm 0.019$ , 抑制率分别为 55.2%、49.4%; Western blot 检测显示 Survivin-siRNA 组蛋白表达下调 ( $P < 0.01$ ), 其蛋白相对表达量分别为  $0.702 \pm 0.007$ 、 $0.684 \pm 0.016$ , 抑制率分别为 34.8%、36.4%; 流式细胞仪检测显示 Survivin-siRNA 组细胞凋亡率明显增高 ( $P < 0.01$ ), 分别为  $(14.2 \pm 1.4) \%$ 、 $(16.8 \pm 0.6) \%$ 。 **结论** Survivin-siRNA 能有效封闭 Survivin 的表达, 抑制 SKBr-3 细胞增殖并诱导细胞凋亡, 推测 Survivin 基因可能成为乳腺癌基因治疗的一个新靶点。

**[关键词]** Survivin; RNAi; 细胞凋亡; 乳腺癌

**[中图分类号]** R737.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 02-0017-06

## Effect of Survivin Gene Expression Inhibition by RNAi on Breast Cancer SKBr-3 Cells

LI Kun-lun<sup>1,2)</sup>, CUI Ming<sup>1)</sup>, LIU Jia<sup>1)</sup>, FENG Yang-kang<sup>1)</sup>, MA Yan-guang<sup>1)</sup>, ZHU Jun<sup>1)</sup>

(1) Dept. of General Surgery, Kunming General Hospital of Chengdu Military Command of Chinese PLA Kunming Yunnan 650032; 2) Dept. of Graduate, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the effect of survivin gene expression inhibition by small RNA interference (siRNA) on the proliferation and apoptosis of the breast cancer SKBr-3 cells. **Methods** We designed and synthesized siRNA targeted survivin gene, and used liposome embedding method to transfect the siRNA into the breast cancer SKBr-3 cells. Then we used MTT method to detect cells proliferation rate, Western blot and RT-PCR to observe survivin mRNA and protein expression; Flow cytometry (FCM) to test cell apoptosis rate. **Results** MTT result showed the proliferation of cells in survivin-siRNA group was inhibited obviously ( $P < 0.01$ ), the highest cell inhibition rate reached  $(43.1 \pm 0.3) \%$ . RT-PCR result showed the survivin mRNA expression in survivin-siRNA groups was downregulated ( $P < 0.01$ ), the relative expression of mRNA was  $0.203 \pm 0.018$  and  $0.229 \pm 0.019$ , the inhibition ratio was 55.2% and 49.4%, respectively. Western blot result showed the survivin protein expression in survivin-siRNA groups was downregulated ( $P < 0.01$ ), the relative expression was  $0.702 \pm 0.007$  and  $0.684 \pm 0.016$ , the inhibition ratio was 34.8% and 36.4%, respectively. Flow cytometry result showed that cell apoptosis rate was increased obviously in survivin-siRNA groups ( $P < 0.01$ ), which was  $(14.2 \pm 1.4) \%$  and  $(16.8 \pm 0.6) \%$ . **Conclusions** Survivin-siRNA can effectively inhibit survivin gene expression, thus inhibit

**[基金项目]** 云南省自然科学基金资助项目 (2010ZC176)

**[作者简介]** 李昆仑 (1979~), 男, 河南周口市人, 在读硕士研究生, 主治医师, 主要从事乳腺癌的早期诊断与治疗工作。

**[通讯作者]** 崔明. E-mail: cuiming83@yahoo.cn

SKBr-3 cell proliferation and induce apoptosis. Survivin gene may be a new target for breast cancer therapy, which provides theory basis for breast cancer gene therapy.

[Key words] Survivin; RNAi; Cell apoptosis; Breast cancer

乳腺癌是当前发病率较高的女性恶性肿瘤,死亡率占所有妇女癌症的17%,居妇女各类恶性肿瘤死亡率的首位,每年全世界约有135万妇女被诊断为乳腺癌,其中42万死亡<sup>[1]</sup>,严重威胁着女性的身体健康。传统治疗以手术治疗为主,辅以化疗、放疗及内分泌治疗,而化疗和放疗对机体毒副作用较大。因此,寻找一种具有靶向促凋亡作用的基因治疗方法越来越受到重视,成为基础和临床研究的重要课题。

Survivin 是凋亡蛋白抑制因子 (inhibitor of apoptosis, IAPs) 家族的新成员,又称生存素或存活素,是经效应细胞蛋白酶受体1 (EPR-1) cDNA 在人类基因组的杂交筛选中分离并克隆出来的,该基因定位3个内含子组成,mRNA长1 619 nt,编码的蛋白含142个氨基酸残基,分子量为16.5 kDa<sup>[2]</sup>。Survivin 独特的特点在于:在正常组织中,除了胚胎及未分化成熟的组织,绝大多数终末分化的组织中检测不到Survivin,且其具有抑制细胞凋亡、参与细胞周期调节和促进血管形成的功能<sup>[3-4]</sup>,并与肿瘤细胞对放化疗的敏感性有关<sup>[5-6]</sup>。为了深入研究Survivin与乳腺癌的关系,本实验采用RNAi技术,选择Survivin作为基因治疗的靶点,利用设计好的靶向Survivin基因表达的siRNA序列,用脂质体包裹技术转染乳腺癌SKBr-3细胞,观察siRNA对肿瘤细胞内源性Survivin表达水平的抑制程度,以及对肿瘤细胞增殖和凋亡的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

细胞系人乳腺癌细胞株SKBr-3细胞,由中国科学院昆明动物所惠赠。

主要试剂:DEME培养基购自北京赛默飞世尔生化公司;Lipofectamine™2 000转染试剂购自Invitrogen公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)购自上海生工公司;一抗兔抗人Survivin多克隆抗体购自Santa Cruze公司;二抗羊抗兔抗体购自Santa Cruze公司;Trizol试剂购自Invitrogen公司;逆转录试剂购自Promega公司;PCR试剂购自Promega公司;Premix Ex Taq购自TaKaRa生物公司;Annexin V-PE/7-AAD细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基

生物公司;人类Survivin基因PCR引物由上海生工合成;靶向Survivin基因的siRNA寡核苷酸由美国Sigma公司化学合成。

### 1.2 方法

**1.2.1 siRNA寡核苷酸的合成** 首先使用NCBI的RrfSeq数据库,在Genebank中查的survivin基因的全序列,其序列号为NM-001168,可以直接被Clontech的软件识别,用国际知名网站<http://bioinfo.clontech.com>提供的siRNA设计软件初筛GC比在35~50间的siRNA,进而应用BLAST软件(Basic Local Alignment Search Tool)剔除与其他编码序列同源的siRNA。最后选出2对目的siRNA,并把其中1对siRNA乱碱基排列顺序,作为阴性对照,用BLAST软件分析,保证它即与Survivin mRNA没有同源性又与其它基因无同源性。把所得序列交Sigma生物公司体外合成。序列如下:survivin-siRNA1 sense: CCUCUACUGUUA-ACAACAdTdT antisense: UUGUUAACAGUAGA-GGdTdT; survivin-siRNA2 sense: GGUUUAUCC-CUGGUGCCAdTdT antisense: UGGCACCAGGGA-AUAAACcdTdT; NC-siRNA sense: ACUACCGUU-GUUAUAGGUG antisense: CACCUAUAACAACGG-UAGU。

**1.2.2 细胞培养及传代** 从液氮中取出冻存的人乳腺癌SKBr-3细胞,迅速放入37℃水浴箱中融化,吸出细胞悬液,注入10 mL离心管中,加入约6 mL培养液,低速离心,弃上清。培养于含10%胎牛血清、100 μg/mL青霉素的DMEM培养液中,置于37℃体积分数为5%CO<sub>2</sub>培养箱培养。当细胞生长贴壁融合度为80%~90%时,则进行传代。

**1.2.3 siRNA转染与分组** 将siRNA加入100 μL不含抗生素的DEME培养基中,然后加入相应比例的阳离子脂质体至培养基中充分混匀,室温放置20 min,以便形成siRNA-阳离子脂质体复合物,将siRNA-阳离子脂质体复合物加入培养板中,在37℃、5%CO<sub>2</sub>孵箱中继续培养,培养24 h后终止转染,换含抗生素培养基复培养至实验所需时间后做相关检测,按siRNA与Lipofectamine™2 000配比说明书进行转染试验操作。分组:siRNA-survivin1组:脂质体+siRNA1+乳腺癌细胞SKBr-3; siRNA-survivin2组:脂质体+siRNA2+乳腺癌细胞

SKBr-3; 阴性对照组: 脂质体 +siRNA (-) + 乳腺癌细胞 SKBr-3; 空白对照组: 乳腺癌细胞 SKBr-3.

**1.2.4 MTT 法检测 RNAi 后的细胞增殖情况** 取几近融合的 SKBr-3 细胞, 胰酶消化后, 制成细胞悬液, 调整细胞密度为  $5 \times 10^4/\text{mL}$ , 接种于 96 孔培养板内, 每组设 3 个复孔, 周边孔用 PBS 液填充. 置  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  饱和湿度孵箱内培养. 第 2 天, 在细胞汇合度约 70% 时开始转染, 转染 12 h 后终止转染, 加含抗生素培养基继续培养. 转染 24 h 后取出 1 块培养板, 吸去上清液, 加  $200 \mu\text{L}$ /孔无血清培养液及  $20 \mu\text{L}$  MTT, 继续培养 4 h. 吸去上清液, 加 DMSO  $200 \mu\text{L}$ /孔, 置于微量震荡器上震荡 5 min, 使甲臞充分溶解. 在全自动酶标仪上测出每孔 A570 值. 分别在转染 48 h、72 h、96 h 后测 A570 值. 本实验重复 3 次, 取平均 A570 值.

$$\text{抑制率} = \frac{1 - \text{实验组 A570 值}}{\text{阴性对照 A570 值}} \times 100\%$$

**1.2.5 半定量 RT-PCR 检测 Survivin 基因 mRNA 的表达** 细胞转染 48 h 后, 参照 Trizol 试剂的说明书提取每孔细胞的总 RNA 并定量. 各取  $1 \mu\text{g}$  总 RNA 为模板逆转录合成 cDNA, 然后用 Survivin 的引物和内参照 GAPDH 的引物进行 PCR 扩增. Survivin PCR 引物: 上游引物 5'-AGG TCA TCT CGG CTG TTC CTG-3', 下游引物 5'-TCA TCC TCA CTG CGG CTG TC-3', 产物长度 148 bp; GAPDH 引物: 上游引物 5'-GGT GAA GGT CGG AGT CAA CG-3', 下游引物 5'-TGG GTG GAA TCA TAT TGG AAC A-3', 产物长度 150 bp, 引物由上海申博公司合成. RT-PCR 一步法参照试剂盒的说明书进行, PCR 的扩增条件为:  $98^\circ\text{C}$  预变性 1 min;  $98^\circ\text{C}$  10 s,  $58^\circ\text{C}$  30 s,  $72^\circ\text{C}$  45 s, 循环 25 次;  $72^\circ\text{C}$  延伸 2 min. PCR 反应结束后, 取  $10 \mu\text{L}$  扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 电泳条带用凝胶成像系统扫描后经 Image 软件进行半定量分析, 将各组的 survivin 条带、GAPDH 条带灰度比值作为 Survivin mRNA 的相对表达量. Survivin mRNA 表达的抑制率:

$$\text{抑制率} = \frac{1 - \frac{\text{siRNA 组 survivin 条带灰度}}{\text{siRNA 组 GAPDH 条带灰度}}}{\frac{\text{空白对照组 survivin 条带灰度}}{\text{空白对照组 GAPDH 条带灰度}}} \times 100\%$$

**1.2.6 Western blot 印迹法检测 survivin 蛋白表达** 各组细胞分别加入蛋白裂解缓冲液提取总蛋白, 全自动酶标仪进行蛋白定量, 用  $32 \mu\text{g}$ /孔上样, 15% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 通过电转移

法将蛋白质转移到 PVDF 膜, 用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 中室温封闭 1 h. 加入一抗 (1:1 000 兔抗人 survivin)  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜, PBST 漂洗 (10 min  $\times$  3 次) 后, 加入二抗 (1:5 000 羊抗兔 IgG) 室温孵育 1 h, PBST 充分漂洗 (10 min  $\times$  3 次), PVDF 膜用 ECL 试剂显色, 凝胶成像系统观察. 用 Image 软件分析条带的灰度值.

$$\text{蛋白质抑制率} = \frac{1 - \frac{\text{Survivin-siRNA 组}}{\beta\text{-actin}}}{\frac{\text{Survivin 空白对照组}}{\beta\text{-actin}}} \times 100\%$$

**1.2.7 Annexin V-PE/7-AAD 法流式细胞仪 (FCM) 检测凋亡率** 转染 48 h 后, 用不含 EDTA 的胰酶消化细胞, 离心  $1\ 000 \text{ r/min} \times 5 \text{ min}$ , PBS 洗 2 次. 取 Binding Buffer  $50 \mu\text{L}$  加入  $5 \mu\text{L}$  7-AAD 染液, 混匀. 在收集细胞中加入上述 7-AAD 染液, 混匀; 室温、避光、反应 15 min. 反应后再加入  $450 \mu\text{L}$  的 Binding Buffer 混匀. 加入  $1 \mu\text{L}$  Annexin V-PE 混匀, 室温、避光、反应 15 min, 上流式细胞仪检测. 用 FCM 自带的 Modifit1.0 软件分析凋亡率, 在二维散点图上, 右下象限表示凋亡率.

### 1.3 统计学处理

应用 SPSS 软件进行统计学处理, 数据用均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示; 两样本均数的比较采用独立样本的 *t* 检验; 多组均数间的比较采用单因素方差分析.

## 2 结果

### 2.1 MTT 法检测细胞增殖

4 个不同时间段细胞增殖情况 (见表 1, 图 1、图 2), 两个 RNA 干扰组的活细胞数与空白对照组和 NC 组有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且 48 h 后差异最大 ( $P = 0.000$ ), 细胞最高抑制率为 ( $43.1 \pm 0.3$ )%. 两个 RNA 干扰组间无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 空白对照组和 NC 组间无统计学意义 ( $P > 0.05$ ). 可见, 转染 48 h 后 siRNA 发挥最大抑制效应. 72 h、96 h 后, 2 个 RNA 干扰组的活细胞数与空白对照组和 NC 组比较虽仍在减少, 但细胞抑制率开始下降, 逐步下降至 ( $19 \pm 0.2$ )%. 说明 72 h、96 h 后 siRNA 在细胞内已逐步开始降解.

### 2.2 RT-PCR 检测 Survivin mRNA 表达水平

从凝胶成像系统摄像 (见图 3) 及 Image 软件分析条带灰度值 (见表 2) 可见: siRNA1 组和 siRNA2 组的条带亮度明显低于空白对照组和 NC-siRNA 组, 空白对照组和 NC-siRNA 组的条带亮度无明显差别, 两 RNA 干扰组条带亮度无明显

差别,内参 GAPDH 在 4 组的条带亮度也无明显差别. Survivin mRNA 相对表达量分别为:  $0.203 \pm 0.018$ 、 $0.229 \pm 0.019$ , 明显低于空白对照组和 NC-siRNA 组 ( $P < 0.01$ ), 其抑制率分别为 55.2%、49.4%. 这表明乳腺癌 SKBr-3 细胞经 siRNA 干扰后,可显著抑制 Survivin 基因的表达.

**2.3 免疫蛋白印记 (Western Blot) 检测 survivin 蛋白表达水平**

siRNA1 组和 siRNA2 组的条带亮度明显低于空白对照组和 NC-siRNA 组, 空白对照组和 NC-siRNA 组的条带亮度无明显差别,  $\beta$ -actin 在 4 组的条带亮度也无明显差别 (图 4, 表 3). siRNA1 组和 siRNA2 组的 Survivin 蛋白相对表达量分

别为:  $0.702 \pm 0.007$ 、 $0.684 \pm 0.016$ , 明显低于空白对照组和 NC-siRNA 组 ( $P < 0.05$ ), 抑制率分别为 34.8%、36.4%. 这表明, 编码表达 Survivin 蛋白的 Survivin 基因受到抑制, siRNA 可诱导 Survivin mRNA 特异性降解.

**2.4 流式细胞仪 (FCM) 检测凋亡率**

转染 48 h 后, siRNA 组细胞凋亡率明显增加, 与空白对照组及阴性对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ). 其中 2 siRNA 干扰组无明显差别 ( $P > 0.05$ ), 凋亡率分别为 ( $14.2 \pm 1.4$ )%、( $16.8 \pm 0.6$ )%; 空白对照组与阴性对照组无明显差别 ( $P > 0.05$ ), 凋亡率分别为 ( $7.6 \pm 0.4$ )%、( $6.7 \pm 0.5$ )%(见表4、图5).

表 1 细胞增殖检测结果 (OD570 及细胞抑制率 IR) [ $(\bar{x} \pm s)$ , n = 4]  
Tab. 1 The cell proliferation test results (OD570 and IR) [ $(\bar{x} \pm s)$ , n = 4]

组别	24 h		48 h		72 h		96 h	
	OD	IR (%)	OD	IR (%)	OD	IR (%)	OD	IR (%)
空白对照	$0.248 \pm 0.006$	-	$1.127 \pm 0.004$	-	$1.324 \pm 0.006$	-	$1.516 \pm 0.013$	-
NC 组	$0.235 \pm 0.005$	$5.1 \pm 0.3$	$1.122 \pm 0.006$	$1.0 \pm 0.2$	$1.276 \pm 0.004$	$3.7 \pm 0.2$	$1.478 \pm 0.017$	$1.8 \pm 0.3$
SiRNA1 组	$0.198 \pm 0.034^{***}$	$20.2 \pm 0.5$	$0.643 \pm 0.006^{**\Delta}$	$43.1 \pm 0.3$	$0.931 \pm 0.006^{**}$	$29.8 \pm 0.2$	$1.207 \pm 0.010^{**}$	$20.0 \pm 0.3$
SiRNA2 组	$0.208 \pm 0.084^{***}$	$16.6 \pm 1.7$	$0.681 \pm 0.006^{**\Delta\blacktriangle}$	$39.5 \pm 2.1$	$0.969 \pm 0.009^{**}$	$26.9 \pm 0.7$	$1.227 \pm 0.007^{**}$	$19.0 \pm 0.2$

与空白对照组比较,  $^{**}P < 0.01$ ; 与 48 h 比较,  $^{\#}P < 0.05$ ; 与 72 h 比较,  $^{\Delta}P < 0.05$ ; 与 96 h 比较,  $^{\blacktriangle}P < 0.05$ .

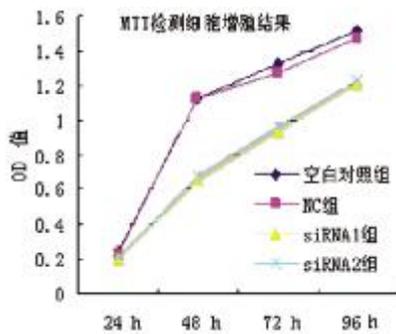


图 1 MTT 检测细胞增殖结果

Fig. 1 The cell proliferation test results by MTT

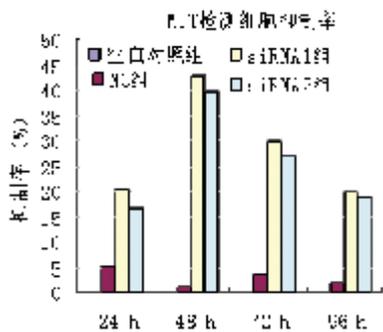


图 2 MTT 检测细胞抑制率

Fig. 2 The cell proliferation inhibiting rate by MTT

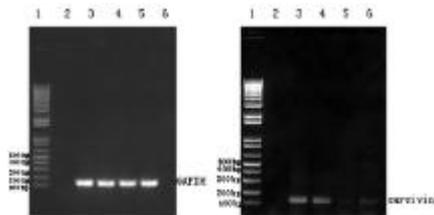


图 3 siRNA 转染 SKBr-3 细胞后 GAPDH 和 survivin mRNA 的表达

Fig. 3 GAPDH and survivin mRNA expression in SKBr-3 cells transfected with siRNA

1:Marker; 2:加水对照组; 3:空白对照组; 4:导入 NC-siRNA 组; 5:导入 siRNA1 组; 6:导入 siRNA2 组.

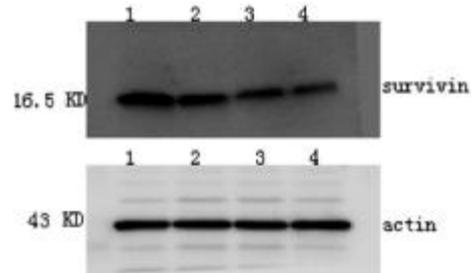


图 4 各实验组 Western Blot 检测 Survivin 蛋白表达水平

Fig. 4 Survivin protein levels in each group tested by Western Blot

Lane1:空白对照组; Lane2:导入 NC-siRNA 组; Lane3:导入 siRNA1 组; Lane4:导入 siRNA2 组.

表 2 各实验组 PCR 检测 Survivin mRNA 结果分析 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab. 2 Survivin mRNA levels in each group tested by PCR ( $\bar{x} \pm s$ )

处理组	Survivin 灰度值	GAPDH 灰度值	Survivin/GAPDH
空白对照组	106.0 ± 3.7	234.3 ± 6.6	0.453 ± 0.007
NC-siRNA 组	95.8 ± 5.4	224.4 ± 7.4	0.427 ± 0.019**
siRNA1 组	45.0 ± 4.1	221.5 ± 8.6	0.203 ± 0.018**
siRNA2 组	53.3 ± 3.1	232.6 ± 9.4	0.229 ± 0.019**

与空白组比较, \*\* $P < 0.01$ .

表 3 各实验组 Western Blot 检测 Survivin 蛋白结果分析 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab. 3 Survivin protein levels in each group tested by Western Blot ( $\bar{x} \pm s$ )

处理组	Survivin 灰度值	$\beta$ -actin 灰度值	Survivin/ $\beta$ -actin
空白对照组	245.6 ± 5.0	228.2 ± 1.7	1.076 ± 0.015
NC-siRNA 组	240.1 ± 4.6	223.5 ± 3.4	1.073 ± 0.005
siRNA1 组	158.6 ± 3.5	225.4 ± 3.8	0.702 ± 0.007*
siRNA2 组	153.5 ± 1.6	228.2 ± 2.2	0.684 ± 0.016*

与空白组比较, \* $P < 0.05$ .

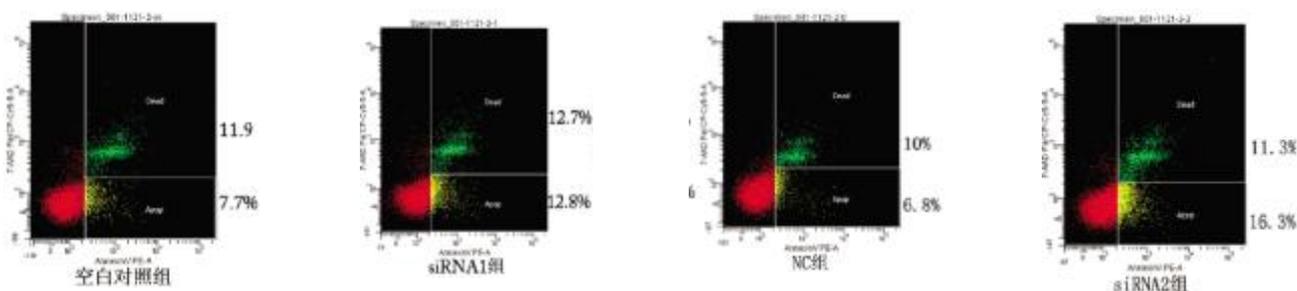


图 5 FCM 检测转染 48 h 后 SKBr-3 细胞的凋亡率

Fig. 5 The apoptosis rate of SKBr-3 cells 48 h after transfection tested by FCM

表 4 FCM 检测转染 48 h 后 SKBr-3 细胞的凋亡率 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 4 The apoptosis rate of SKBr-3 cells 48 h after transfection tested by FCM ( $\bar{x} \pm s$ )

组 别	n	凋亡率 (%)
空白对照组	3	7.6 ± 0.4
NC 组	3	6.7 ± 0.5
SiRNA1 组	3	14.2 ± 1.4**
SiRNA2 组	3	16.8 ± 0.6**

与空白对照组比较, \*\* $P < 0.01$ .

### 3 讨论

目前,我国乳腺癌发病率呈逐年增高趋势,居女性恶性肿瘤发病率的前 2 位,成为严重威胁女性健康与生命的严重疾病,但随着肿瘤学基础和临床理论及相关技术研究的快速发展,乳腺癌的临床诊断和治疗的研究取得了长足的进展,新的个体化综

合治疗模式正在逐渐取代以往的“以手术为主的治疗”理念,化疗、放射治疗和内分泌治疗的科学合理应用,使乳腺癌的治愈率和长期生存率明显提高。以生物基因工程等研究带来的乳腺癌研究的各项重大技术突破使各种肿瘤生物治疗研究越来越接近于临床应用。

Survivin 是凋亡蛋白抑制因子 (IAPs) 家族的新成员,目前发现表达 Survivin 的正常成熟细胞仅有胸腺细胞、CD34<sup>+</sup>骨髓干细胞及结肠上皮基底细胞。与此形成鲜明对比的是, Survivin 高表达于几乎所有常见的人类肿瘤组织中。如肺癌、乳腺癌、结肠癌、胃癌、食管癌、胰腺癌、肝癌、子宫癌、卵巢癌、霍奇金氏病、非霍奇金氏病、白血病、神经纤维肉瘤、软组织肉瘤、神经胶质瘤及黑色素瘤等,而与这些肿瘤相应的正常组织却不表达 Survivin<sup>[7,8]</sup>。目前认为, Survivin 抗凋亡的机制有 2 种:一是可以与半胱天冬酶 (caspase) 家族分子(如活化的 caspase-3、-7)结合,抑制它们的活性

<sup>[9]</sup>; Survivin 还可以直接或间接抑制 caspase-9 的活化, 从而抑制凋亡的线粒体信号途径<sup>[10]</sup>. 另一可能机制是 survivin 与周期蛋白激酶 CDK4 相互作用, 阻断 Fas 引发的凋亡信号转导. 由于 Survivin 表达于几乎所有人类常见肿瘤组织, 以及 Survivin 抑制细胞凋亡的功能在肿瘤发生、发展过程中的关键性作用<sup>[11]</sup>, 它已成为备受关注的肿瘤基因治疗的新靶点<sup>[12]</sup>.

1998 年华盛顿卡耐基研究院 Fire<sup>[13]</sup>等发现了生物秀丽隐杆线虫中由双链 RNA (double stranded RNA, dsRNA) 介导的转录后基因沉默 (post-transcriptional genesilencing, PTGS) 现象, 并称之为 RNAi (RNA interference, RNAi). 自 RNAi 提出后引起了遗传学家和生物化学家们的广泛重视, 从不同角度探讨了 RNAi 的作用机制. 目前的研究主要集中在转录后水平, 其分子机理包括起始阶段和效应阶段<sup>[14]</sup>. 最终在 RNAi 的作用下, 使靶向 mRNA 完全降解. 作为新近发展起来的一项分子生物学技术, RNAi 技术在基因功能研究中成为基因沉默的有力手段.

本实验采用 RNAi 技术, 选择 Survivin 作为基因治疗的靶点, 利用设计好的靶向 Survivin 基因的 siRNA 序列, 用脂质体包裹技术转染乳腺癌 SKBr-3 细胞, 观测其对细胞 Survivin 表达及细胞增殖、凋亡的影响. MTT 法见转染组细胞增殖明显降低, 48 h 转染效率最高, 这可能与瞬时转染的抑制时间短有关; RT-PCR 及 Western blot 结果显示, siRNA 转染后可显著抑制 Survivin mRNA 及蛋白的表达, 证实了应用 RNA 干扰技术抑制 Survivin 表达的可行性; 流式细胞术检测发现, 干扰序列均可抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡. 因此, 本实验针对 Survivin 构建的 2 组 siRNA, 确实能封闭 survivin 的表达, 抑制 SKBr-3 细胞增殖并诱导细胞凋亡, 一方面提示 Survivin 与乳腺癌的发生、发展、治疗及预后有密切的关系; 另一方面提示 RNA 干扰可用于特异性阻断 Survivin 表达, 为靶向诱导乳腺癌细胞凋亡治疗提供了实验依据, 为乳腺癌的基因治疗提供了理论基础.

#### [参考文献]

[1] 孙强. 乳腺癌的早期诊断 [J]. 实用医学杂志,

2007,23(1):165-168.

- [2] LACASSE E C, BAIRD S, KORNELUK R G, et al. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer [J]. *Oncogene*, 1998, 17(25):3 247-3 259.
- [3] LI F, AMBROSINI G, CHU E Y. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin [J]. *Nature*, 1998, 396(6711):580-584.
- [4] OCONNOR D S, SCHECHNER J S, ADID A C, et al. Control of apoptosis during angiogenesis is by survivin expression in endothelial cells [J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(2):393-398.
- [5] ARNAB C, GARY G Z, MIN Z, et al. Survivin enhances radiation resistance in primary human glioblastoma cells via caspase independent mechanisms [J]. *Oncogene*, 2004, 23(45):7 494-5 06.
- [6] MASASHI N, NAOKI T, KOICHI A, et al. Survivin as a predictor of cis-diamminedichloroplatinum sensitivity in gastric cancer patients [J]. *Cancer Sci*, 2004, 95(1):44-51.
- [7] AMBROSINI G, ADIDA C, ALTIERI D C. A novel anti-apoptosis gene survivin expressed in cancer and lymphoma [J]. *Nat Med*, 1997, 3(8):917-921.
- [8] ALTIERI D C, MARCHISIO P C, MARCHISIO C. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer [J]. *Lab Invest*, 1999, 79(11):1 327-1 333.
- [9] SHIN S, SUNG B J, CHOYS. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7 [J]. *Biochemistry*, 2001, 40(4):1 117-1 123.
- [10] OCONNOR D S, WALL N R, PORTER A C, et al. A p34 (cdc2) survival check-point in cancer [J]. *Cancer Cell*, 2002, 2(1):43-54.
- [11] LI F, AMBROSINI G, CHU E Y, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by surviving [J]. *Nature*, 1998, 396(6711):580-584.
- [12] LU B, MU Y, CAO C, et al. Survivin as a therapeutic target for radiation sensitization in lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(8):2 840-2 845.
- [12] FIRE A, XU S, MONTGOMERY M K, et al. Potent and specific genetic interference by Double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669):806-811.
- [14] 任浩, 戚中田. 小干扰RNA与RNA干扰 [J]. 国外医学 (微生物学分册), 2002, 25(6):238-241.

(2011-12-13 收稿)