

网络出版时间: 2016-1-20 10:32:26 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160120.1032.016.html>

# Survivin 基因沉默抑制食管癌 Eca-109 细胞的侵袭与迁移

牛朝霞 张秀芝 陈洁 杨红梅 王黎 裴瑞

**摘要** 目的 应用 RNA 干扰 (RNAi) 技术沉默食管癌细胞 Eca-109 内源性 survivin 的表达, 探讨 survivin 基因在食管癌细胞侵袭与迁移过程中的作用。方法 构建靶向 survivin 基因的 siRNA 表达载体并借助脂质体稳定转染食管癌细胞; Western blot 检测 survivin 蛋白表达水平观察基因沉默效果, 同法观察细胞内基质金属蛋白酶-2 (MMP2)、基质金属蛋白酶-9 (MMP9) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 蛋白水平的变化; Transwell 小室法检测细胞侵袭能力的变化, 细胞划痕实验观察细胞迁移能力的改变。结果 与对照组相比, 干扰组 survivin 蛋白表达水平明显降低, 抑制率可达 85%; 干扰组细胞 MMP2、MMP9 和 VEGF 蛋白表达受到明显抑制 ( $P < 0.05$ ), 同时观察到干扰组细胞的侵袭与迁移能力也明显下降 ( $P < 0.05$ )。结论 survivin 基因与食管癌细胞的侵袭迁移潜能相关, 特异性沉默 survivin 基因可能通过下调 MMP2、MMP9 和 VEGF 的表达显著抑制食管癌细胞 Eca-109 的侵袭与迁移能力。

关键词 RNA 干扰; survivin; 侵袭与迁移; Eca-109

中图分类号 R 735.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)02-0185-05

食管癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一, 而中国是全球食管癌高发地区之一, 平均每年有数十万人死于食管癌<sup>[1]</sup>。近年来随着外科技术的进展和新辅助治疗手段的应用, 部分患者的病情得到了相当的改善, 但术后 5 年生存率依然较低, 因此食管癌仍是一种预后较差的恶性疾病<sup>[2]</sup>。究其原因主要是缺乏对食管癌高侵袭性和高转移能力的恶性生物学行为的认识, 进而缺乏针对食管癌患者有效的早期诊疗手段。因此, 对食管癌细胞侵袭与迁移能力的相关研究将有助于进一步提高食管癌患者的疗效及预后。Survivin 作为近年研究的热点基因之一, 其主要功能是抑制细胞凋亡、保护细胞生存, 参与肿瘤血管形成, 并与肿瘤的浸润、转移相关<sup>[3-4]</sup>。目前已证实 survivin 基因在正常成人组织中表达甚少, 而

在绝大多数肿瘤组织中存在高表达, 并且该基因表达与食管癌的诊断、治疗及预后密切相关<sup>[5]</sup>。因此, 抑制 survivin 基因表达将可能成为食管癌的诊疗新靶点, 从而减少食管癌的转移复发, 提高患者的术后生存率。该研究利用 RNA 干扰技术将设计合成好的靶向 survivin 基因的 siRNA 转染食管癌细胞 Eca-109, 从体外实验中探讨抑制 survivin 基因对食管癌细胞侵袭与转移能力的影响, 以期获得有意义的实验结果。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** 人食管癌 Eca-109 细胞由上海细胞生物研究所建; RPMI1640 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清 (FBS) 购自美国 Gibco 公司; 脂质体购自美国 Invitrogen 公司; 引物 DNA、BamH1/Hand III 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶均购自大连宝生物公司 (中国 TaKaRa 公司); 蛋白质分子量标准购自美国 Promega 公司; BCA 蛋白浓度检测试剂盒、ECL 化学发光检测试剂盒均购自美国 Pierce 公司; 质粒抽提试剂盒购自上海华舜生物工程公司; Survivin 和  $\beta$ -actin 抗体购自美国 Santa Cruze 公司; 干扰质粒 pRNAT-U6.1/Neo、阴性对照干扰质粒 siRNA 购自美国 Gencrypt 公司; pRNAT-siRNA-survivin 干扰质粒由本室构建; Transwell 小室购自美国 Corning 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 人食管癌 Eca-109 细胞培养于含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基中, 置于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养, 待细胞融合度达约 70% ~ 80% 时, 以 0.25% 胰蛋白酶进行消化与传代。

**1.2.2 靶向 survivin 的寡核苷酸序列的设计** 利用生物信息学软件, 本研究针对 survivin 基因 487 ~ 505 bp 的靶位点设计两条互补的 DNA 链, 其序列分别为 5'-GATCCAGAATTTGAGGAACTGCGCTGTGAGCCACAGATGGGCGCAGTTTCCTCAAATTCCTTTT TA-3' 和 3'-GTCTTAAACTCCTTTGACGCGACACTTCGGTGTCTACCCGCGCTCAAAGGAGTTTAAGAAAAAATTCGA-5', 两条 DNA 链的结构均为 BamH1 + 正义

2015-11-06 接收

基金项目: 河南省教育厅科学技术研究重点项目 (编号: 14B310002)

作者单位: 河南医学高等专科学校病理生理学教研室, 郑州 451191

作者简介: 牛朝霞, 女, 硕士, 讲师, 责任作者, E-mail: nzx99@163.com

com

序列 + 茎环序列 + 反义序列 + 转录终止子 + Hind III, 在细胞内形成所谓的“发夹结构”。

**1.2.3 siRNA 表达质粒的构建** 载体 pRNAT-U6.1/Neo 经 BamHI 和 Hind III 双酶切后与由公司合成的靶向 survivin 的寡核苷酸退火后连接, 并进行转化、挑克隆、质粒抽提、菌落 PCR 鉴定及测序, 得到针对 survivin 的 siRNA 表达质粒: pRNAT-siRNA-survivin, 同法构建无关干扰阴性对照质粒: pRNAT-siRNA-control, 最后两质粒分别大量抽提后备用。

**1.2.4 细胞转染** 待 Eca-109 细胞至对数生长期即细胞生长融合度约 90% 时, 将干扰质粒 pRNAT-siRNA-survivin 和阴性对照质粒 pRNAT-siRNA-control 按照 Lipofectamine 2000 转染试剂盒说明分别转染 Eca-109 细胞 48 h 后用 G418 筛选 2~3 周, 可见典型的抗性克隆, 扩大培养, 建成稳定转染细胞系, 可分别命名为 Eca-109/si-survivin 和 Eca-109/si-control。

**1.2.5 Western blot 检测 survivin 基因沉默效果** 将对数生长期的干扰组 Eca-109/si-survivin、阴性对照组 Eca-109/si-control 及未转染空白对照组 Eca-109 细胞按蛋白抽提要求进行处置, 取各组细胞 0.05 mg 总蛋白进行不连续 SDS-聚丙烯酰胺电泳; 电泳结束后, 用半干石墨电转移 2 h 将分离出的蛋白质转移至硝酸纤维素膜上, 用 1 × PBS 配制的 5% 脱脂奶粉在室温摇床上封闭 1~2 h, 加入鼠抗人单克隆一抗 4 °C 过夜孵育, 洗膜, 再加入相应二抗, 室温孵育 1.5 h, 再洗膜, 经 ECL 化学发光检测和拍照, 其中以  $\beta$ -actin 作为内对照, 结果通过灰度扫描从蛋白表达水平对比观察干扰前后 survivin 的不同表达。

**1.2.6 Western blot 检测 survivin 基因沉默后对基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP2)、基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP9) 及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 蛋白表达的影响** 取对数生长期的干扰组 Eca-109/si-survivin、阴性对照组 Eca-109/si-control 及未转染空白对照组 Eca-109 细胞, 参照上述 1.2.5 中所述 Western blot 实验步骤分析干扰 survivin 基因表达后对 MMP2、MMP9 及 VEGF 蛋白表达水平的影响。

**1.2.7 Transwell 小室法体外检测细胞侵袭能力** 将 Transwell 小室置于 24 孔培养板中, 取 Matrigel 基质胶按 1:3 进行稀释后均匀铺于微孔滤膜的上室 (50  $\mu$ l/孔), 37 °C 孵育箱过夜; 取对数生长期的干

扰组 Eca-109/si-survivin、阴性对照组 Eca-109/si-control 及未转染空白对照组 Eca-109 细胞, 常规进行胰酶消化, 调整细胞密度为  $2.5 \times 10^4$  个/ml, 取 200  $\mu$ l 细胞悬液小心加入滤膜上室, 并加入无血清培养基, 然后将 800  $\mu$ l 含 2% 小牛血清的 RPMI1640 加入滤膜下室, 常规培养 36~40 h 后取出滤膜, 置于 10% 多聚甲醛固定 10 min, 进行 HE 染色, 随后用棉签轻轻擦拭掉滤膜上表面的细胞, 用清水浸洗 Transwell, 将其置于 24 孔板中, 盖上盖, 保持潮湿, 显微镜下计数 5 个高倍视野 ( $\times 200$ ) 下穿过滤膜的细胞数并拍照。实验重复 2 次。

**1.2.8 划痕实验检测细胞迁移能力** 将干扰组 Eca-109/si-survivin、阴性对照组 Eca-109/si-control 及未转染空白对照组 Eca-109 细胞分别接种于 6 孔板待之长至临近饱和, 用 10  $\mu$ l Eppendorf Tip 在细胞板上划痕, 同时将细胞洗涤 2 遍; 加 5% 小牛血清的 RPMI1640, 用倒置 Nikon 显微镜观察 18~24 h, 24 h 显示转染和非转染细胞的最大差别, 数码相机成像; 测量各组细胞任意 3 个部位不同伤口的宽度, 计算 3 次实验细胞迁移距离的平均值。

**1.3 统计学处理** 通过 SPSS 统计学软件进行单因素方差分析, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 稳定转染细胞株的筛选** 转染 pRNAT-siRNA-survivin 表达质粒的 Eca-109 细胞, 分别经 G418 不同质量浓度的培养液进行抗性筛选, 约 2 周后未转染细胞几乎全部死亡, 继续维持抗性筛选 3 周后在荧光显微镜下观察形成带有绿色荧光 GFP 的阳性克隆, 后扩增培养备用, 最终筛选维持质量浓度为 400 mg/L。见图 1。

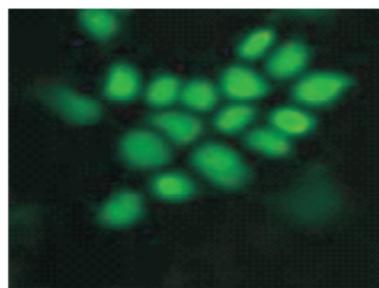


图 1 稳定转染 pRNAT-siRNA-survivin 质粒的 Eca-109 细胞形成的阳性克隆  $\times 100$

**2.2 Western blot 检测干扰后 survivin 蛋白的表**

达水平 以  $\beta$ -actin 为内对照 结果显示阴性干扰对照组 Eca-109/si-control 及未转染空白对照组 Eca-109 细胞 survivin 蛋白表达未明显受到抑制,两者比较无显著性差异,而与两对照组相比干扰组 Eca-109/si-survivin 细胞 survivin 蛋白表达明显受到抑制,灰度扫描显示沉默效率达 85%。见图 2。

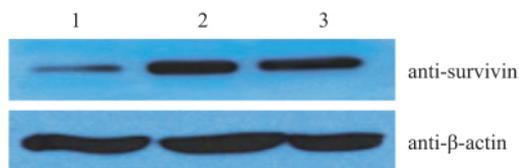


图2 Western blot 检测干扰前后 survivin 蛋白的表达  
1: Eca-109/si-survivin; 2: Eca-109 /si-control; 3: Eca-109

### 2.3 Western blot 检测沉默 survivin 基因对 Eca-109 细胞 MMP2、MMP9 及 VEGF 蛋白表达的影响

以  $\beta$ -actin 为内参 结果显示 Eca-109/si-control 和 Eca-109 两对照组细胞 MMP2、MMP9 及 VEGF 蛋白表达水平未明显受抑,两者比较差异无统计学意义;而与两对照组相比干扰组 Eca-109/si-survivin 细胞 MMP2、MMP9 及 VEGF 蛋白表达明显降低,灰度扫描显示下降水平达 80% 以上。见图 3。

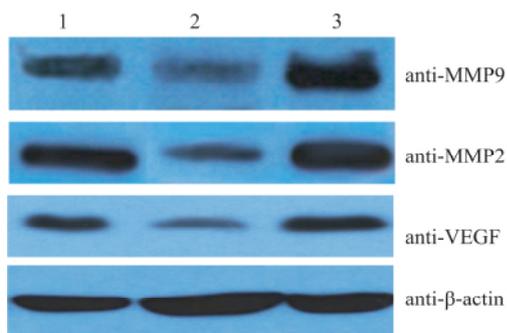


图3 Survivin 基因干扰前后 Eca-109 细胞 MMP2、MMP9 及 VEGF 蛋白的表达

1: Eca-109; 2: Eca-109/si-survivin; 3: Eca-109 /si-control

2.4 Transewell 小室检测干扰前后对 Eca-109 细胞侵袭能力的影响 实验中通过镜下计数 5 个高倍视野肿瘤细胞从上室向下室侵袭基底膜的平均细胞数目来衡量其侵袭转移能力 结果显示:与阴性对照组 Eca-109/si-control 及空白对照组 Eca-109 相比,转染 pRNAT-siRNA-survivin 的干扰组 Eca-109 细胞侵袭穿透基底膜的细胞数目明显减少,差异有统计学意义( $F = 110.97$ ,  $P < 0.05$ )。见图 4。

2.5 细胞划痕实验检测干扰前后对 Eca-109 细胞

迁移能力的影响 统计分析结果显示:划痕 24 h 时阴性对照组细胞 Eca-109/si-control 与空白对照组细胞 Eca-109 均检测到明显的划痕间距缩短,二者对比无显著性差异;而干扰组细胞 Eca-109/si-survivin 未检测到明显的划痕间距减小,与两对照组相比差异有统计学意义( $F = 3.85$ ,  $P < 0.05$ )。见图 5。

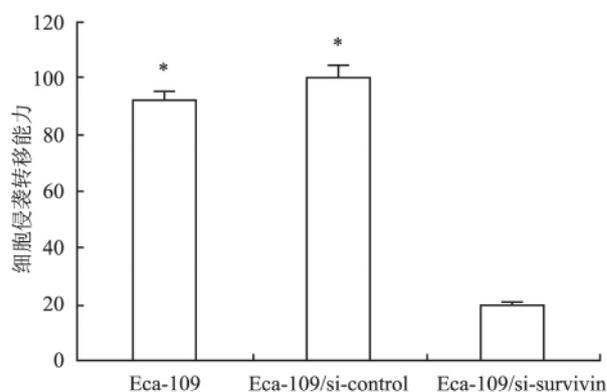
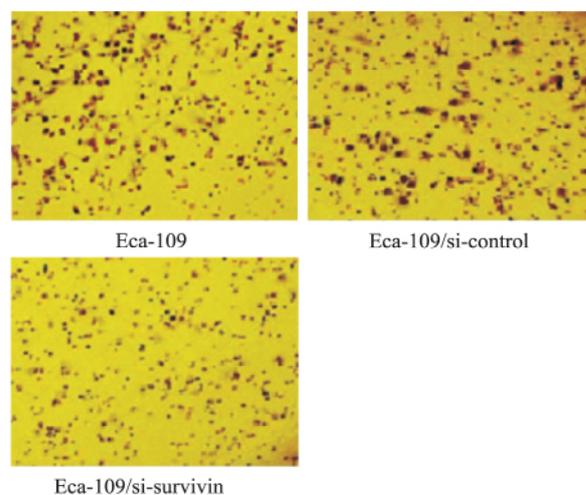


图4 Survivin 干扰前后各组 Eca-109 细胞侵袭能力的改变及数据统计分析  
与 Eca-109/si-survivin 比较: \*  $P < 0.05$

### 3 讨论

食管癌是最常见的消化系统恶性肿瘤之一,严重威胁人类健康。近年来随着外科技术的发展完善,新的综合治疗手段不断应用于食管癌患者,但其术后 5 年生存率依然较低。研究<sup>[6]</sup>表明,食管癌患者预后不良的原因很可能与微病灶的复发转移密切相关,因此阐明食管癌侵袭转移的重要原因与相关机制将有利于提高患者的诊断、治疗及预后。

在恶性肿瘤细胞侵袭转移的过程中,肿瘤血管生成与细胞外基质被肿瘤细胞释放的蛋白水解酶降解是中心环节。基质金属蛋白酶家族(MMPs)成员

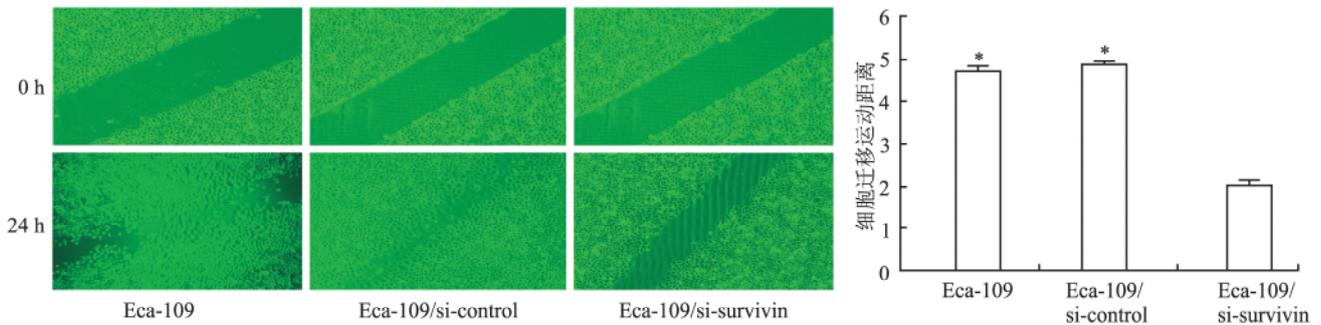


图5 Survivin 干扰前后各组 Eca-109 细胞迁移运动能力的改变及细胞迁移距离的数据统计分析  
与 Eca-109/si-survivin 组比较: \*  $P < 0.05$

作为 wnt/ $\beta$ -catenin 信号转导通路中重要的下游调控因子,在肿瘤细胞浸润转移中扮演重要角色,可通过降解细胞外基质的不同蛋白成分促进肿瘤细胞的移动<sup>[7]</sup>。在众多刺激微血管生成的因子中血管 VEGF 能够明显诱导肿瘤新生毛细血管的生成,其过表达能促进血管内皮细胞分裂增殖与迁移,导致血管重建,进而加速恶性肿瘤的生长和转移潜能<sup>[8]</sup>。研究<sup>[9]</sup>提示 MMPs 的高表达与肿瘤微血管生成也密切相关,二者共同作用促使肿瘤细胞穿过基底膜屏障进入血液循环向远处浸润转移。RNAi 技术作为近年来研究哺乳动物细胞功能基因组学的一个新工具,具有高度序列专一性,可以特异地产生由双链 DNA 介导的转录后特定基因沉默的效果<sup>[10]</sup>;依据该原理,针对 siRNA 的 RNA 干扰技术当今已经广泛应用于生物学、医学及工程学等众多研究领域,同时也为临床众多恶性肿瘤尤其是晚期患者开辟了基因治疗的新路径,给患者将带来新的希望,食管癌患者当然也不例外。

本研究利用 RNAi 和重组体技术构建靶向 survivin 基因的 siRNA 表达质粒 pRNAT-siRNA-survivin,并成功转染食管癌 Eca-109 细胞;通过 Western blot 分析显示干扰后 survivin 蛋白表达水平较对照组明显下调,表明 RNA 干扰技术成功抑制了 Eca-109 细胞的 survivin 基因表达;通过 Western blot 实验结果显示抑制 survivin 基因表达后能显著下调肿瘤转移相关蛋白 MMP2、MMP9 及 VEGF 的表达水平,提示 survivin 基因在肿瘤转移相关蛋白表达调控中发挥重要作用,参与恶性肿瘤的侵袭转移。

为进一步探究 survivin 基因对食管癌 Eca-109 细胞侵袭转移的影响,又开展了 Transwell 体外侵袭实验和细胞划痕实验;前者可模拟反映肿瘤细胞的侵袭能力,后者能较好地检测肿瘤细胞的迁移能力。检测结果显示,与对照组相比靶向抑制 survivin 基因的表达能显著降低干扰组 Eca-109 细胞的体外侵

袭与迁移能力,再次证实 survivin 基因在食管癌细胞侵袭转移中扮演重要角色。

综上所述, survivin 基因在食管癌的侵袭转移中发挥着重要作用, survivin 基因有望成为食管癌患者分子靶向基因治疗的新靶点,从而减少食管癌的转移复发,提高患者的术后生存率。

### 参考文献

- [1] 李朝阳,徐致祥,谭家驹. p16 基因甲基化与食管癌相关研究进展[J]. 医学研究杂志 2012 41(1): 157-61.
- [2] 于长华,王万伟,魏荣荣. 70 岁以上老年早期食管癌放射治疗分析[J]. 实用老年医学 2008 22(2): 157-9.
- [3] Sun B, Xu H, Zhang G, et al. Basic fibroblast growth factor upregulates surviving expression in hepatocellular carcinoma cells via a protein kinase B-dependent pathway [J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(1): 385-90.
- [4] 刘杰文,路喜安,郝利芬,等. 凋亡抑制蛋白 Survivin 和缺氧诱导因子-1 $\alpha$  在前列腺癌中的表达及其相关性[J]. *肿瘤研究与临床* 2014 26(1): 36-8 41.
- [5] Yang L, Zhu H, Liu D, et al. Aspirin suppresses growth of human gastric carcinoma cell by inhibiting survivin expression [J]. *J Biomed Res* 2011 25(4): 246-53.
- [6] Bharat A, Crabtree T. Management of advanced-stage operable esophageal cancer [J]. *Surg Clin North Am* 2012, 92(5): 1179-97.
- [7] Kwon M, Lee S J, Wang Y, et al. Filamin A interacting protein 1-like inhibits WNT signaling and MMP expression to suppress cancer cell invasion and metastasis [J]. *Int J Cancer* 2014, 135(1): 48-60.
- [8] 王官成. VEGF 在肿瘤血管及淋巴管生成中的研究[J]. *中国现代普通外科进展* 2013, 16(3): 240-4.
- [9] 吴秋玲. 水蛭、斑蝥对肿瘤血管生成及 VEGF、MMP 表达的影响[D]. 湖北: 湖北中医药大学 2011.
- [10] Zhang Y, Fang L, Zhang Q, et al. An oncolytic adenovirus regulated by a radiation-inducible promoter selectively mediates hSulf-1 gene expression and mutually reinforces antitumor activity of I131-metuximab in hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Oncol*, 2013, 7(3): 346-58.

网络出版时间: 2016-1-20 10:32:26 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160120.1032.018.html>

## MicroRNA-133b-5p 通过靶向调控 Fas 基因影响 H9c2 心肌细胞凋亡

程洁, 何淑芳, 韩正怡, 朱海娟, 张野

**摘要** 目的 研究 microRNA(miR)-133b-5p 在 H9c2 心肌细胞凋亡中发挥的作用及其靶向调控 Fas 基因的机制。方法 取对数生长期大鼠 H9c2 胚胎心肌细胞, 分为空白对照组、miR-133b-5p 抑制剂组、抑制剂阴性对照组。分别转染 48 h 后收集细胞, 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 检测 miR-133b-5p 表达, 微板法检测细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)活性, Annexin V-FITC 联合 PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡。双荧光素酶报告基因系统验证 miR-133b-5p 与 Fas mRNA 的 3'UTR 区的靶向结合。最后运用 qRT-PCR 和 Western

blot 分别检测各组 Fas mRNA 与 Fas 蛋白表达水平。结果 miR-133b-5p 抑制剂组细胞内 miR-133b-5p 表达水平下调至空白对照组的 33% ( $P < 0.05$ ); LDH 活性升高, 细胞凋亡率增加, 均明显高于空白对照组与抑制剂阴性对照组 ( $P < 0.05$ )。双荧光素酶报告基因证明 Fas 是 miR-133b-5p 的一个靶基因; miR-133b-5p inhibitor 显著上调 Fas mRNA 和 Fas 蛋白水平 ( $P < 0.05$ )。结论 利用化学合成 miR-133b-5p inhibitor 抑制大鼠 H9c2 心肌细胞中 miR-133b-5p 表达, 可诱导心肌细胞损伤和凋亡, 其机制可能与调控靶基因 Fas 表达有关。

**关键词** 心肌细胞; 微小 RNAs; 乳酸脱氢酶; 凋亡; Fas

中图分类号 R 363

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)02-0189-06

2015-11-23 接收

基金项目: 安徽高校省级自然科学基金研究重大项目(编号: KJ2014ZD16); 安徽省科技厅年度重点项目(编号: 1301043030)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院麻醉科, 合肥 230601

作者简介: 程洁, 女, 硕士研究生;

张野, 男, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者,

E-mail: zhangye\_hassan@sina.com

凋亡是心肌细胞的一种程序性死亡, 其在心脏发育、心力衰竭、原发性高血压、动脉粥样硬化、心肌梗死等心脏疾病的疾病生理中发挥着重要的作用<sup>[1]</sup>。抑制心肌细胞凋亡可以减轻心肌缺血再灌

## Survivin gene silencing inhibits the invasion and migration of esophageal carcinoma Eca-109 cell

Niu Zhaoxia, Zhang Xiuzhi, Chen Jie, et al

(Dept of Pathophysiology, Henan Medical College, Zhengzhou 451191)

**Abstract Objective** To investigate the effect of survivin on Eca-109 cell invasion and migration by silencing endogenous survivin expression by RNA interference technology. **Methods** A siRNA expressing vector targeting survivin was constructed and transfected into Eca-109 cells via lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 to establish stable transfection cell line; the expression level of survivin protein was detected by Western blot to observe the interference effect; the expressions of MMP2, MMP9 and VEGF proteins were also observed by Western blot; the changes of cell invasion and migration abilities were respectively detected by Transwell Matrigel invasion assay and cell wound-healing scrape assay. **Results** Compared with the control groups, the expression level of survivin protein was significantly reduced and the inhibition rate was 85%; the expressions of MMP2, MMP9 and VEGF proteins of survivin interference group were also distinctly suppressed ( $P < 0.05$ ); at the same time, the cell invasion and migration abilities of survivin interference group were obviously reduced ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Survivin gene expression is correlated with the invasion and migration potential of esophageal carcinoma cell; specifically silencing survivin can effectively inhibit the cell invasion and migration abilities of Eca-109 cells possibly by down-regulating the expressions of MMP2, MMP9 and VEGF proteins.

**Key words** RNA interference; survivin; invasion and migration; Eca-109