

文章编号:1005-6947(2006)11-0816-05

· 基础研究 ·

RNA 干扰抑制胰腺癌细胞 XIAP 表达对化疗敏感性的影响

菅远志¹, 李宜雄², 吕新生², 李小刚², 兰明银¹

(1. 郧阳医学院附属太和医院 肝胆外科, 湖北 十堰 442000; 2. 中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南 长沙 410008)

摘要:目的 探讨运用载体介导的 RNA 干扰技术对 X-连锁的凋亡抑制蛋白的抑制效率, 以及观察抑制 XIAP 后胰腺癌细胞对化疗药物敏感性的变化。**方法** 应用 PBShi 质粒构建针对 XIAP 的 RNA 干扰载体, 转染胰腺癌细胞系 SW1990; 用 RT-PCR 和 Western blot 检测 XIAP 的抑制效率, 以 gemcitabine 处理细胞, 流式细胞仪和荧光显微镜观察细胞凋亡的变化; 分析 XIAP 的表达与细胞凋亡之间的关系。**结果** 成功构建 4 个 XIAP 的 RNA 干扰载体, 其中 2 个载体对 XIAP 的瞬时抑制效率达 50% 以上。XIAP 被抑制后, 细胞对化疗药物诱导的凋亡敏感性增强 ($P < 0.05$), XIAP 的表达水平与细胞的凋亡指数之间呈负相关性 ($r = -0.809, P < 0.05$)。**结论** 运用针对 XIAP 的 RNA 干扰载体可以有效地抑制 XIAP 的表达, 提高胰腺癌细胞对化疗药物的敏感性。

关键词: RNA, 小分子干扰; 胰腺肿瘤/药物疗法; 凋亡抑制蛋白; 细胞凋亡

中图分类号: R341.6; R735.9

文献标识码: A

Suppression of pancreatic cancer cell expression of XIAP by RNAi and its effect on sensitivity to chemotherapeutics

JIAN Zhi-yuan¹, LI Yi-xiong², LU Xin-sheng², LI Xiao-gang², LAN Ming-yin¹

(1. Department of Hepatic and Biliary Surgery Taihe Hospital, Yunyang Medical College, Yunyang, Hubei 442000, Shiyang, China; 2. Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: Objective To investigate the possibility of XIAP inhibition by RNA interference (RNAi) vectors, and the chemotherapeutic sensitivity change of pancreatic carcinoma cells of SW1990 after XIAP inhibition.

Methods RNA interference vectors against XIAP was constructed and transfected into the pancreatic carcinoma cell line SW1990, the expression of XIAP was determined by RT-PCR and Western blot, while flow cytometry and Hoechst 33258 stain were employed to examine the apoptosis index of SW1990 induced by gemcitabine. The relationship between XIAP and apoptosis index was analyzed by linear regression. **Results**

Four RNAi vectors against XIAP were constructed, two of the four RNAi vectors could instantaneous inhibit XIAP expression more than 50%, The sensitivity of SW1990 to gemcitabine increased after XIAP was inhibited ($P < 0.05$), and the expression level of XIAP was negatively related to the apoptosis index ($P < 0.05$). **Conclusions** RNAi vectors could effectively suppress the expression of XIAP, and enhance the sensitivity of pancreatic cancer cells to chemotherapeutic drugs.

Key words: RNA, Small Interference; Pancreatic Neoplasms/drug ther; XIAP; Apoptosis

CLC number: R341.6; R735.9

Document code: A

胰腺癌是腹部常见的恶性肿瘤, 手术切除率低,

对化疗不敏感, 预后差。目前的研究显示, X-连锁的凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis, XIAP)在癌组织中的高表达可能是导致肿瘤产生化疗耐药性的主要原因之一。笔者运用 RNA 干扰的方法抑制胰腺癌细胞 SW1990 的 XIAP 基因表达, 观察癌细胞对化疗药物敏感性的变化, 为胰腺癌的治疗寻找可能的途径。

基金项目: 湖南科技厅基金资助项目(04HK3012, 04SK3043-2)。

收稿日期: 2005-08-10; **修订日期:** 2006-03-02。

作者简介: 菅远志, 男, 河南许昌人, 郧阳医学院附属太和医院医师, 主要从事肝胆胰腺疾病临床与基础方面的研究。

通讯作者: 菅远志 E-mail: jzyuan@tom.com。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

SW1990 细胞系购自中山大学细胞中心,由中南大学医学遗传学国家重点实验室保存。RMIP1640 培养基购自 Sigma 公司;PBSHHI 质粒由中南大学医学遗传学国家重点实验室惠赠;逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自 Promega 公司;山羊抗人 XIAP 多克隆抗体购自 R&D 公司;鼠抗人 β -Tublin 单克隆抗体购自 Sigma 公司;辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊和兔抗鼠 IgG 均购自 Pierce 公司;Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自晶美生物技术公司;Hoechst33258 凋亡检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所。

1.2 试验方法

1.2.1 RNA 干扰载体的构建 根据 XIAP 的 cDNA 序列(HSU45880),在起始密码子 100 位后面,随机选择 G + C 含量在 40% ~ 55% 之间 19 个核苷酸的片段,经 Blast 筛选与其他人类基因无同源性。根据上述这些原则,应用 Oligoengine 公司提供的软件筛选后,在 3' 和 5' 端分别加上 Hind III 和 Bgl II 的酶切位点(附表)。片段以及互补链由上海博雅生物公司合成。PBSHHI 质粒是在 pBluescript II SK(-)质粒的基础上将人的 HI 启动子插到 EcoRI 和 Hind III 酶切位点之间而构建的大小为 3.176Kb 载体。经酶切鉴定正确后,将 PBSHHI 经 Hind III 和 Bgl II 双酶切,将靶片段及其互补链的等摩尔退火产物克隆到酶切后的质粒。酶切和测序证实载体构建正确后,大量抽提备用。

附表 构建 RNA 干扰载体所用的靶片段序列

名称	筛选的靶片段	合成的靶片段
XIAP-R1	GTGGTAGCTCTGTTTCAGC	F:5'gacccccggtgtagtctctgtttcagcttcaagagagctgaaacaggactaccac ttttggaaa 3' R:5'agcttttcaaaaagtggtagtctctgtttcagctcttgaagctgaaacaggactaccacggg 3'
XIAP-R2	GCAAGTGCTGGACTCTACT	F:5'gatccccgcaagtgtggactctactttcaagagaagtagagtcacagcacttgc ttttggaaa 3' R:5'agcttttcaaaaagcaagtgtggactctacttcttgaagtagagtcacagcacttgcggg 3'
XIAP-R3	TGGTATCCAGGGTGCAAAT	F:5'gacccccggtatccagggtgcaaattcaagagaattgcacctggatacca ttttggaaa 3' R:5'agcttttcaaaaatggtatccagggtgcaaattcttgaattgcacctggataccaggg 3
XIAP-R4	GCAGTTGACAACCTGTCCCA	F:5'gatccccgcagttgacaagtgtccattcaagagatgggacacttgtcaactgc ttttggaaa 3' R:5'agcttttcaaaaagcagttgacaagtgtccattcttgaalgggacacttgtcaactgcggg 3'

1.2.2 细胞培养及转染 置于含 10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养基中,在 37℃ 5% CO₂ 的培养箱培养 SW1990 细胞。细胞生长状态良好后,以 2 × 10⁵ 和 1 × 10⁵ 分别接种于 6 孔板和 12 孔板中。第 2 天细胞融合率在 80% 左右时更换为无血清培养基。将质粒 DNA 与 lipofectamine 按 1.0 μg : 2.5 μL 转染细胞,6 孔板和 12 孔板中分别转染质粒 4.0 μg 和 1.6 μg,转染 5 h 后,更换为含 10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养基中培养。转染 24,48,72 h 后,分别行 RT-PCR 和免疫印迹检测 XIAP 的表达水平。

1.2.3 RT-PCR 按 Invitrogen 公司的 Trizol 裂解液的说明书进行细胞 RNA 的抽提,按照 Promega 公司的逆转录试剂盒说明进行 RT。取 1 μgRNA,用随机引物,室温下 10 min,42℃ 15 min,95℃ 5 min,4℃ 5 min 进行逆转录。XIAP 的上游引物序列为 5' Tg-

gCACgAgCAGggTTTCTTTA 3',下游引物序列为 5' TggggTTAggTgAgCATAgTC Tgg 3';扩增长度为 404 bp。 β -actin 的上游引物序列为 5' Tgg TgggCATggT-CAGAAg 3',下游引物序列为 5' CATgATggAgTTgAAgg-TAgTT 3';扩增长度为 719 bp。PCR 反应体系为每 20 μL 体系含 2 μL 模板 cDNA,XIAP 与 β -actin 的引物各 50 ng,3 U 的 Taq 酶,2 μL 的 10 × PCR 缓冲液,2 μL 的 20 mM dNTP。反应条件为 95℃ 3 min,95℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min;30 个循环,72℃ 10 min。反应完毕经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,Bio-Rad 公司提供的凝胶分析系统经 Del100 软件分析并照相。运用 Quantity one 图像分析系统测吸光度进行半定量分析,相同条件下重复试验 3 次。

1.2.4 Western blot 用细胞裂解缓冲液裂解细胞,BCA 蛋白定量试剂盒检测总蛋白浓度。取 20 μg

蛋白经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 120V 恒定电压转膜 2h, 室温封闭 1h, 4℃ 封闭过夜。XIAP 一抗工作浓度为 0.5 μg/mL, 作用 1h; 二抗工作浓度 180 000, 作用 50 min, β-tublin 一抗工作浓度为 1:1 000, 二抗工作浓度为 11 000, 抗体的反应时间同 XIAP。然后按说明书滴加 ECL 发光液, 反应 5 min 后, 入暗室曝光 10 min, 显影。照相, 运用 Quantity one 分析系统进行 XIAP 蛋白半定量, 相同条件下重复试验 3 次。

1.2.5 流式细胞术检测 细胞在转染后 24h 更换培养基时, 分为 2 组; 一组加入 gemcitabine, 5 μg/mL, 另一组只转染, 不加任何药物。均继续培养 48h 后, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤细胞, 消化计数。取 1×10^5 细胞, 按 Annexin V - FITC 凋亡检测试剂盒说明染色, 经 Becton Dickinson 公司的流式细胞仪检测各组的细胞凋亡指数。在相同条件及处理方法下设 3 个复孔进行检测。

1.2.6 凋亡细胞 Hoechst33258 染色形态学观察

将盖玻片置入 12 孔板, 转染细胞后 24h, 分别加入终浓度为 0.5 μg/mL 的 gemcitabine, 再培养 24h 后, 弃培养基; 按试剂盒说明书加入缓冲液, Hoechst33258 染色 5 min; 在载玻片上滴加抗猝灭封闭液; 取出盖玻片, 将有细胞的一面接触抗猝灭液置载玻片上, 立即在荧光显微镜下观察。

试验均采用未克隆靶片段的空 PBSHH I 及以 PBS 代替质粒 DNA 为阴性对照。

1.3 统计学处理

计数资料的比较采用成组资料的方差分析, XIAP 蛋白表达水平与细胞凋亡指数之间的关系采用

直线相关分析。所有统计分析均采用 SPSS10.0 统计软件完成。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 RNA 干扰载体对 XIAP 基因的抑制作用

本试验成功构建了 4 个 RNA 干扰载体 (XIAP-R1, 2, 3, 4), 经酶切 (图 1) 测序证实 (测序结果略)。其中 3 个 (XIAP-R1, 3, 4) 对 XIAP 基因的表达有抑制作用, 对 XIAPmRNA 及蛋白的最强抑制时间均发生在转染后 48h, XIAP-R1 和 XIAP-R3 对两者的抑制效率均为 50% ~ 60% 之间 (图 2-3), 而 XIAP-R4 的抑制效率在 30% 左右 (图 2-3)。XIAP-R2 和空 PBSHH1 未见对 XIAP 的抑制作用 (图 2-3), 两者与 β-actinmRNA 和 β-tublin 蛋白的相对值之间无统计学的差异。

1-4: XIAP-R1, XIAP-R2, XIAP-R3 和 XIAP-R4; 5: PBSHH1。阳性克隆切出约 280bp 左右的片段, 阴性克隆切出约 220bp 左右的片段

图 1 构建的 RNAi 质粒用 ECOR I 和 Hind III 双酶切鉴定结果

1-6: 为转染 XIAP-R1, XIAP-R2, XIAP-R4, PBSHH1 48h 后和未转染任何质粒的 SW1990 的检测结果。可见 XIAP-R1 和 XIAP-R3 对 XIAP 基因的抑制率较高

图 2 用 RT-PCR 检测 XIAP 的抑制率

1-6: 分别为转染 XIAP-R1, XIAP-R2, XIAP-R4, PBSHH1 48h 后和未转染任何质粒的 SW1990 的检测结果。可见 XIAP-R1 和 XIAP-R3 对 XIAP 蛋白有较高的抑制率

图 3 Western blot 检测对 XIAP 蛋白的抑制率

2.2 抑制 XIAP 基因后对细胞凋亡指数的影响

XIAP-R1 和 XIAP-R3 转染 72 h 后,细胞流式细胞术检测显示 SW1990 凋亡指数高于用 XIAP-R2 和空 PBSHH1 转染细胞的凋亡指数(图 4),两者无统计学的差异($P > 0.05$)。将 XIAP 的蛋白质的相对含量与不加药物是 SW1990 的细胞凋亡指数之间行直线相关分析,显示两者之间有负相关性($r = -0.809, P < 0.05$)(图 5)。

2.3 抑制 XIAP 基因后细胞对化疗药物敏感性的变化

在 gemcitabine 的作用下,部分细胞脱壁死亡。

XIAP-R1 和 XIAP-R3 转染的细胞凋亡指数分别为 $(32.85 \pm 2.5)\%$ 和 $(31.61 \pm 0.20)\%$,高于用 PBSHH1 转染细胞的凋亡指数 $(27.43 \pm 2.05)\%$,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 4)。经 gemcitabine 处理后的凋亡指数与蛋白含量之间存在负相关性($r = -0.930, P < 0.01$)(图 5)。

2.4 凋亡细胞的形态学变化

在转染 XIAP-R1 和 XIAP-R3 的细胞中,有较多核浓缩、破裂的细胞,凋亡细胞数明显多于用 PBSHH1 转染的细胞(图 6)。

图 4 转染不同的质粒 72h 后 SW1990 凋亡指数的变化

图 5 转染 RNAi 载体后, XIAP 蛋白的水平与细胞凋亡指数关系

A B C D

A, B, C 分别为转染 XIAP-R1, XIAP-R3 和 PBSHH1 加入 gemcitabine 作用 24 h, 进行 Hoechst33258 染色, D 为 SW1990 未经任何处理进行染色

图 6 经 Hoechst33258 染色后荧光显微镜观察结果($\times 400$)

3 讨论

在目前发现的凋亡抑制蛋白家族的 8 个成员中, XIAP 被认为是作用最强的一种^[1-2], 它可直接抑制凋亡起始分子 caspase-9 及效应分子 caspase-3 和 caspase-7 的活性^[3], 并可通过其他多种途径参与

对细胞凋亡的抑制过程^[4]。多项研究^[1,2,5]认为, XIAP 在肿瘤中的高表达是导致肿瘤细胞对化疗药物和其它凋亡激发因子敏感性下降的一个重要因子, 笔者等^[6-7]前期的研究工作也证实了这一点。因此, 抑制 XIAP 的表达, 可能提高胰腺癌细胞对化疗药物的敏感性。RNA 干扰技术 Elbashir 证实了在哺

乳动物细胞存在后^[8], Brummelkamp 等^[9]运用 pSuper 为载体,有 9 个核酸连接起来的发卡形 shRNA 实现了在哺乳动物细胞中基因的高效抑制。笔者应用的 PBSHHI 是在 pSuper 质粒大小结构功能完全相同的质粒载体,是有 3 167 个碱基形成的环状载体,已被证实可以实现高效的转染效率。

本研究应用 Oligoengine 公司提供的软件,在 XIAP 起始密码后 100 位开始,即在基因的编码区,随机选择 G + C 含量在 40% ~ 55% 的 19 个核苷酸作为靶片段;在筛选的 4 个靶片段中,有 3 个可以发挥对 XIAP 的抑制作用,其中 2 个的作用较强。认为这种筛选方法是一种有效的 RNA 干扰片段措施。两个载体对 XIAP 的最高抑制效率在 50% ~ 60% 之间,远远低于 Brummelkamp^[9] 瞬时表达的 90% 抑制效率。这可能与应用的细胞系、转染效率以及靶片段本身有关。最近 Mccanus^[2] 以 pcDNA3 为基础构建了针对 XIAP 的 RNA 干扰载体,转染乳腺癌细胞,经筛选获得稳定表达的细胞后,发现对 XIAP 的抑制效率为 80% ~ 90% 之间。笔者认为,临床应用 RNA 干扰治疗肿瘤的关键是要获得高效的转染率和靶片段的高效抑制,筛选稳定表达的细胞对试验研究意义可能更大。获得高的转染效率和靶片段的高效抑制,仍是应用 RNA 干扰治疗肿瘤的尚待深入研究的问题。

阻断 XIAP 后,采用流式细胞仪检测术检测了 SW1990 凋亡指数的变化,发现在未用化疗药物前,抑制 XIAP 后细胞的凋亡指数较对照组略有升高,但无统计学意义,加入 gemcitabine 后,细胞凋亡率之间的差异增大。我们的结果与 Mccanus^[2] 和 Lima 等^[10] 的研究结果相符。可能的原因是,化疗药物诱导细胞凋亡需要大量 caspase 的激活,XIAP 的抑制为 Caspase-3, 7 的激活提供了条件^[1-2];同时, caspase-3, 7 活化后可进一步激活上游的凋亡起始分子,使凋亡效应分子的作用进一步放大^[11]。通过形态学观察,进一步肯定 gemcitabine 是通过诱导细胞凋亡以达到杀灭肿瘤的目的,降低 XIAP 的表达可以使 gemcitabine 对肿瘤细胞的杀伤作用增强。

总之,应用 RNA 干扰可有效地抑制 XIAP 基因

在 SW1990 细胞中的表达,增加细胞对化疗药物的敏感性;对其进行深入研究,可能会提高胰腺癌的化疗敏感性,为胰腺癌的治疗提供一种新的措施。

参考文献:

- [1] Yang L, Cao Z, Yan H, *et al.* Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(20):6815-6824.
- [2] Mccanus DC, Lefebvre CA, Cherton-Horvat G, *et al.* Loss of XIAP protein expression by RNAi and antisense approaches sensitize cancer cells to functionally diverse chemotherapeutics [J]. *Oncogene*, 2004, 23(49):8105-8177.
- [3] Sun C, Cai M, Gunasekera AH, *et al.* NMR structure and mutagenesis of the inhibitor of apoptosis protein XIAP [J]. *Nature*, 1999, 401(6755):818-822.
- [4] Lewis J, Burstein E, Reffey SB, *et al.* Uncoupling of the signaling and caspase-inhibitory properties of X-linked inhibitor of apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(10):9023-9029.
- [5] Trauzold A, Schmiedel S, Roder C, *et al.* Multiple and synergistic deregulations of apoptosis controlling genes in pancreatic carcinoma cells [J]. *Br J Cancer*, 2003, 89(9):1714-1721.
- [6] 菅志远,李宜雄,李小刚,等. XIAP 在胰腺癌组织及细胞中的表达及与化疗耐药关系的研究 [J]. *中华消化杂志*, 2006, 26(2):76-79.
- [7] 菅志远,李宜雄,李小刚,等. XIAP 在胰腺癌组织中的表达及其意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(5):385-387.
- [8] Elbashir SM, Harborth J, Lendackel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. *Nature*, 2001, 411(6836):494-498.
- [9] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells [J]. *Science*, 2002, 296(19):550-553.
- [10] Lima RT, Martins LM, Guimaraes JE, *et al.* Specific downregulation of bcl-2 and XIAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells [J]. *Cancer Gene Ther*, 2004, 11(5):309-316.
- [11] von Haefen C, Wieder T, Essmann F, *et al.* Paclitaxel-induced apoptosis in BJAB cells proceeds via a death receptor-independent, caspases-3/-8-driven mitochondrial amplification loop [J]. *Oncogene*, 2003, 22(15):2236-2247.