

# 沉默生存素基因联合放疗对裸鼠移植人肝癌的抑瘤效应

孙 婷<sup>1</sup>, 杨 巍<sup>2</sup>, 曹建平<sup>2</sup> 刘芬菊<sup>2</sup>

中图分类号: R730.5 R811.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2010)04-0398-03

**【摘要】** 目的 探讨 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 生存素 (Survivin) 基因联合 X 射线照射对裸鼠移植人肝癌细胞 SMMC-7721 的抑瘤效应。方法 肿瘤局部注射脂质体包裹的靶向 Survivin 基因的 RNA 干扰质粒后, 接受 5 Gy X 射线照射, 观察各组裸鼠治疗后不同时间肿瘤体积和平均存活时间, 以免疫组化染色法检测肿瘤组织 Survivin 增殖细胞核抗原 (Proliferation Cell Nuclear Antigen, PCNA) 表达和肿瘤间质微血管密度, 以 TUNEL 法检测肝癌细胞凋亡。结果 治疗后第 3~21 d RNA 干扰联合放疗组肿瘤体积明显低于对照组、RNA 干扰组和放疗组。RNA 干扰联合放疗组裸鼠平均存活时间明显长于对照组、RNA 干扰组和放疗组。治疗结束后第 1 天, RNA 干扰联合放疗组裸鼠肿瘤增殖活性和微血管密度明显低于 RNA 干扰组和放疗组, 且凋亡细胞百分数明显升高。结论 RNA 干扰 Survivin 基因联合放疗可有效地抑制裸鼠移植人肝癌细胞增殖和血管生成, 促进细胞凋亡, 其抑瘤效应明显优于放疗和 RNA 干扰治疗。

**【关键词】** RNA 干扰; X 射线; 生存素; 肝癌

Anti-tumor Effect of RNA Interference Silencing Survivin Gene Combined with X-ray Irradiation on Human Hepatoma Xenograft in Nude Mice. SUN Ting, YANG Wei, CAO Jian-ping, et al. Brain and Nerve Laboratory, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006 China

**【Abstract】** Objective To investigate the anti-tumor effect of RNA interference silencing Survivin gene combined with X-ray irradiation on human hepatoma xenograft in nude mice. Methods sRNA expression plasmids targeting Survivin genes packed by liposome were injected into human hepatoma xenograft which were irradiated with 5 Gy X-ray later. Tumor volumes at different time points and mean survival period of mice were observed. Expression level of Survivin, PCNA and intratumoral microvessel density were detected by immunohistochemical staining. Apoptotic cells in tumor tissue were detected by TUNEL method. Results Tumor volumes of RGenesil-survivin+5 Gy group were significantly lower than those of the control, RGenesil-survivin and 5 Gy groups 3~21 days after the beginning of therapy. Mean survival period of mice in RGenesil-survivin+5 Gy group was the longest. Expression level of PCNA and intratumoral microvessel density in RGenesil-survivin+5 Gy group were significantly lower than those of RGenesil-survivin group and radiotherapy group 1 day after therapy. Percentage of apoptotic cells in tumor tissue in RGenesil-survivin+5 Gy group was significantly higher than other groups. Conclusion RNA interference silencing Survivin gene combined with radiotherapy could effectively inhibit cell proliferation and tumor angiogenesis, enhance apoptosis in tumor xenograft and its anti-tumor effect was more powerful than that of radiotherapy or RNA interference silencing Survivin gene.

**【Key words】** RNA Interference; X-ray; Survivin; Hepatoma

肝细胞癌具有手术切除后复发率高, 对化疗和放疗不敏感等特点, 提高其治疗效果一直是肿瘤研究的热点。Survivin 是凋亡抑制蛋白家族中的一员, 在转化细胞系和大多数人类肿瘤组织中高表达, 而在癌旁组织和成人分化组织中不表达。Survivin 能抑制细胞凋亡和调控有丝分裂, 提高肿瘤细胞放射抗性<sup>[1]</sup>。本研究在已成功构建靶向 Survivin 基因的 RNA 干扰载体, 并检测其联合 X 射线照射对人肝癌细胞 SMMC-7721 的体外抑瘤效应的基础上<sup>[2]</sup>, 进一步探讨 RNA 干扰 Survivin 基因联合放射治疗对裸鼠移植人肝癌的体内抑瘤效应及机制。

基金项目: 国家自然科学基金青年项目资助 (30600160)

作者单位: 1 苏州大学附属第一医院脑神经研究室, 江苏 苏州 215006 2 苏州大学放射医学与公共卫生学院放射生物学教研室, 江苏 苏州 215123

作者简介: 孙婷 (1979~), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事肿瘤基因治疗研究。

通讯作者: 杨巍, detachedx@yahoo.com.cn

## 3 结论

使用国内生产的多层铝箔组合材料吸收体能够甄别 8~78 MeV 的  $\alpha$  粒子, 其能量甄别性能完全可达到美国复合材料吸收体的甄别性能。使用国内价廉的铝薄多层组合材料吸收体可以替代价格昂贵的专用甄别 8~78 MeV 的  $\alpha$  粒子特制材料, 方便实验, 节约经费。

## 1 材料与方法

1.1 实验材料 人肝癌细胞株 SMMC-7721 为本室保存, 以含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养; Survivin 干扰载体 pGenesil-survivin 由本室构建并保存; 胎牛血清、RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司; 阳离子脂质体 lipofectamine 2000 购自 invitrogen 公司; UltraSensitive<sup>TM</sup> SP (MAIXN-BD) 免疫组化试剂盒购自福州迈新生物技术公司; 兔抗人 Survivin 单克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品; 小鼠抗人 PCNA 单克隆抗体和 TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; 兔抗鼠 CD34 单克隆抗体为美国 eBioscience 公司产品。

## 1.2 实验方法

1.2.1 荷瘤裸鼠模型的建立及分组 Balb/c 裸鼠, 雌性, 6~8 周龄, 健康, 购自上海生命科学研究院实验动物中心。于每只

## 参考文献:

- [1] 肖德涛, 赵桂芝, 肖拥军, 等. <sup>220</sup>Rn 累积测量的吸收体法及其应用[J]. 核技术, 2005, 9: 688-692
- [2] 肖德涛著. 的被动积分测量和剂量估算[M]. 北京: 原子能出版社, 2002
- [3] 许家昂, 陈英民, 张远, 等. 小型 <sup>222</sup>Rn <sup>220</sup>Rn 室的测试分析[J]. 中国辐射卫生, 2009, 18(2): 218-219

(收稿日期: 2010-03-24)

小鼠右后肢皮下接种 0.1 ml浓度为  $5 \times 10^6$ /ml的 SMMC-7721 细胞悬液,待肿瘤生长至直径约 5 mm时,将动物随机分组:① 对照组 (Control);② RNA干扰组 (pGenesil-survivin);③ 放疗组 (5 Gy);④ RNA干扰联合放疗组 (pGenesil-survivin+5 Gy)。分组后第 1天和第 4天,对照组注射 0.1 ml PBS 治疗组每只裸鼠肿瘤局部注射 0.1 ml 质粒溶液 (50  $\mu$ g 质粒 +100  $\mu$ l 阳离子脂质体),于第 3天和第 6天肿瘤局部给予两次 5 Gy X射线照射,其他部位铅板屏蔽。观察各组小鼠治疗开始后不同时间肿瘤体积和平均存活时间。

1.2.2 照射条件 德国西门子医用直线加速器,6 MV X射线,球靶距 100 cm 剂量率 2 Gy/min

1.2.3 肿瘤体积测定 用游标卡尺测量肿瘤最长径 (L)和垂直方向最大横径 (W),每 3 d测量 1次,肿瘤体积  $V = \frac{1}{2} LW^2$

1.2.4 免疫组化检测移植瘤组织 Survivin和 PCNA表达 治疗结束后 1d杀鼠,取肿瘤组织,按常规方法制作病理切片,HE染色,在光镜下检查肿瘤组织结构,利用 UltraSensitiveTM S-P(MAXIM-Bio)试剂盒按操作说明进行免疫组化染色,相应一抗为 Survivin和 PCNA抗体。每例随机观察 9个高倍视野 ( $\times 400$ ),计数每个视野中阳性细胞百分数。

1.2.5 移植瘤组织细胞凋亡检测 移植瘤组织依照 TUNEL细胞凋亡原位检测试剂盒说明书标记细胞,每例随机观察 9个高倍视野 ( $\times 400$ ),计数每个视野中阳性细胞百分数。

1.2.6 移植瘤组织微血管密度检测 以 CD34 单抗为一抗对瘤组织进行免疫组化染色,光镜下观察肿瘤血管内皮细胞染色情况,单个内皮细胞着色 (棕黄)即作为一个计数单位,不形成血管管腔或管腔内是否有红细胞作为计数标准,计数每例肿瘤组织单位视野内的平均血管数,即肿瘤间质微血管密度 (Intratumor micro-vessel density MVD)。每例随机观察 9个高倍视野 ( $\times 400$ ),计数每个视野内 100个细胞中的阳性细胞数。

1.2.7 统计学分析 实验结果用 SPSS14.0统计软件进行分析,采用单因素方差分析进行检验,  $P < 0.05$  表示有统计学意义。

2 结果

2.1 沉默 survivin基因联合 X射线照射对裸鼠移植人肝癌的生长抑制效应 治疗开始后不同时间点测量各组裸鼠肿瘤体积,结果见图 1 第 3~21天, RNA干扰联合放疗组肿瘤体积明显低于对照组 ( $P < 0.001$ ), RNA干扰组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )和放疗组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )第 21天, RNA干扰组、放疗组和 RNA干扰联合放疗组抑瘤率分别为 45.89%、41.30%和 59.26%。

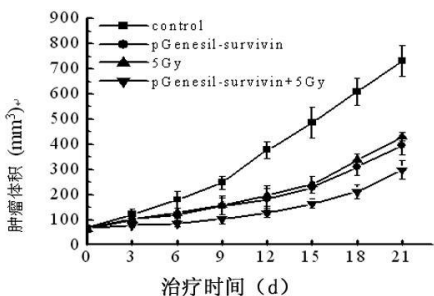


图 1 治疗后不同时间各组裸鼠肿瘤体积

2.2 沉默 survivin基因联合 X射线照射对荷瘤裸鼠存活时间的影响 观察各组动物存活情况,结果见表 1 RNA干扰组、放

疗组和 RNA干扰联合放疗组裸鼠平均存活时间明显长于对照组 ( $P < 0.001$ ), RNA干扰联合放疗组裸鼠平均存活时间最长,明显长于 RNA干扰组 ( $P < 0.001$ )和放疗组 ( $P < 0.001$ )。

表 1 各组裸鼠平均存活时间

组别	平均存活时间 (d)
Control	35.0 ± 3.35
pGenesil-survivin	45.0 ± 5.22 <sup>1)</sup>
5 Gy	43.33 ± 4.86 <sup>1)</sup>
pGenesil-survivin+5 Gy	60.50 ± 5.36 <sup>1)</sup>

注: 1)  $P < 0.001$ 与对照组比较。  
2.3 治疗结束后 1天各组裸鼠肿瘤组织 Survivin的表达 以免疫组化染色法检测各组裸鼠肿瘤组织 Survivin的表达水平,胞浆和/或细胞核内含棕黄色颗粒为阳性,结果见图 2和表 2 各治疗组 Survivin表达水平明显低于对照组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), RNA干扰联合放疗组 survivin表达水平最低,但与 RNA干扰组相比无明显统计学差异。

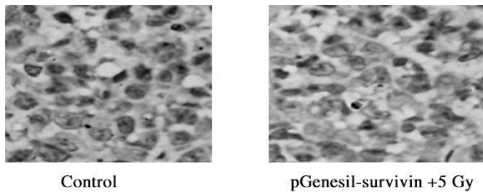


图 2 免疫组化染色法检测裸鼠肿瘤组织 Survivin的表达

表 2 各组裸鼠肿瘤组织 Survivin的表达

组别	Survivin阳性细胞百分数
Control	67.22 ± 6.24
pGenesil-survivin	44.11 ± 5.73 <sup>2)</sup>
5 Gy	60.44 ± 5.08 <sup>1)</sup>
pGenesil-survivin+5 Gy	41.78 ± 4.35 <sup>2)</sup>

注: 1)  $P < 0.05$ 与对照组比较; 2)  $P < 0.01$ 与对照组比较。  
2.4 沉默 survivin基因联合 X射线照射对裸鼠移植人肝癌增殖活性的影响 以肿瘤组织 PCNA表达水平为指标检测各组裸鼠移植人肝癌的体内增殖活性,胞核染成深棕色为阳性,结果见图 3和表 3 各治疗组 PCNA表达水平明显低于对照组 ( $P < 0.05$   $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ), RNA干扰联合放疗组 PCNA表达水平最低。

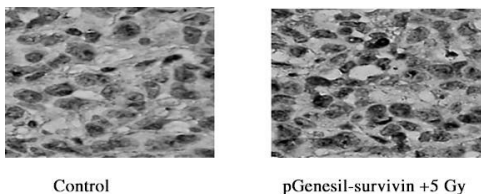


图 3 免疫组化染色法检测裸鼠肿瘤组织 PCNA的表达

表 3 各组裸鼠肿瘤组织 PCNA的表达

组别	PCNA阳性细胞百分数
Control	35.33 ± 4.27
pGenesil-survivin	28.67 ± 3.02 <sup>2)</sup>
5 Gy	30.78 ± 4.35 <sup>1)</sup>
pGenesil-survivin+5 Gy	23.11 ± 2.40 <sup>3)</sup>

注: 1)  $P < 0.05$ 与对照组比较; 2)  $P < 0.01$ 与对照组比较; 3)  $P < 0.001$ 与对照组比较。

2.5 沉默 survivin基因联合 X射线照射对裸鼠移植人肝癌凋亡的影响 TUNEL法检测各组裸鼠移植人肝癌细胞凋亡,胞

核染成棕黄色为阳性,结果见图 4和表 4 各治疗组凋亡细胞百分数明显高于对照组 ( $P<0.001$ ),RNA干扰联合放疗组凋亡细胞百分数最高。

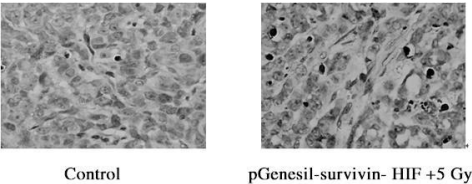


图 4 TUNEL法检测裸鼠肝癌细胞凋亡  
表 4 各组裸鼠移植人肝癌细胞凋亡的变化

组别	凋亡细胞百分数
Control	3.22±1.48
IGenesil-survivin	10.67±3.0 <sup>1)</sup>
5 Gy	8.89±2.76 <sup>1)</sup>
IGenesil-survivin+5 Gy	17.22±3.19 <sup>1)</sup>

注: 1)  $P<0.001$ 与对照组比较。

2.6 沉默 survivin基因联合 X射线照射对荷瘤裸鼠肿瘤组织微血管密度的影响 各组裸鼠肿瘤组织微血管密度检测结果见图 5和表 5 各治疗组裸鼠肿瘤组织微血管密度明显低于对照组 ( $P<0.05$   $P<0.01$ 或  $P<0.01$ ),RNA干扰联合放疗组肿瘤组织微血管密度最低。

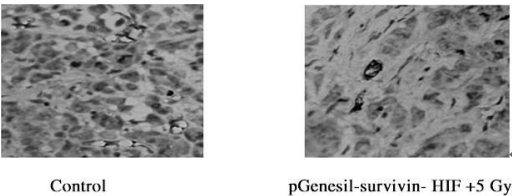


图 5 免疫组化染色法检测裸鼠  
肿瘤组织微血管密度

表 5 各组裸鼠肿瘤组织微血管密度

组别	微血管密度 (n)
Control	16.0±4.30
IGenesil-survivin	10.22±3.42 <sup>2)</sup>
5 Gy	12.22±2.82 <sup>1)</sup>
IGenesil-survivin+5 Gy	6.0±2.29 <sup>3)</sup>

注: 1)  $P<0.05$ 与对照组比较; 2)  $P<0.01$ 与对照组比较; 3)  $P<0.001$ 与对照组比较。

3 讨论

RNA干扰技术是利用具有同源性的双链 RNA诱导序列特异的目标基因转录后沉默 抑制其蛋白表达和生物学活性 具有特异、高效等特点,在肿瘤基因治疗方面显示出巨大的潜力<sup>[3]</sup>。

Survivin是凋亡抑制蛋白家族分子量最小的成员,主要通过直接抑制凋亡信号传导途径中最下游的效应分子 caspase-3和 caspase-7的活性而发挥抑凋亡作用, Survivin还与微管蛋白相互作用调控细胞有丝分裂以及参与血管形成<sup>[4-5]</sup>。由于 Survivin特异性表达于恶性肿瘤组织且具有强大的抑制凋亡活性,已成为倍受关注的抗肿瘤治疗的靶点<sup>[6]</sup>。

本实验以脂质体包裹的 siRNA表达质粒为基因治疗载体,采取瘤体内多点注射方式,探讨 RNA干扰 Survivin基因联合放疗治疗对裸鼠移植人肝癌的抑瘤效应及其机制。结果表明,从治疗开始后第 3天起, RNA干扰联合放疗组肿瘤体积明显低于对照组、RNA干扰组和放疗组,且 RNA干扰联合放疗组裸鼠平均存活时间最长,明显长于 RNA干扰组和放疗组。治疗结束后第 1天, RNA干扰联合放疗组裸鼠肿瘤增殖活性和微血管密度明显低于 RNA干扰组和放疗组,且凋亡细胞百分数明显升高,提示靶向 Survivin基因的 RNA干扰治疗联合放疗体内抑瘤效应明显优于单纯 RNA干扰治疗或放射治疗,其抑瘤效应机制可能是协同发挥放疗和 RNA干扰治疗两者对肿瘤细胞的抗增殖、促凋亡和抑制血管生成作用。本研究结果提示,以 Survivin基因为靶点的 RNA干扰治疗联合放疗可明显提高人肝癌细胞的治疗效果,该综合治疗模式值得深入研究。

参考文献:

[ 1 ] Altieri DC. Survivin: cancer networks and pathway— directed drug discovery[ J]. Nat Rev Cancer 2008 8 (1): 61— 70  
[ 2 ] 杨巍, 李艳博, 赵敬国, 等. 沉默乏氧诱导因子-1 $\alpha$ 和生存素基因联合 X射线照射对乏氧细胞的体外抑瘤效应[ J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2009 27 (2): 120— 124  
[ 3 ] Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: Principles, prospects and challenges[ J]. Adv Drug Deliv Rev 2007 59 (2— 3): 75— 86  
[ 4 ] Kappeler M, Taubert H, Bartel F, et al. Radiosensitization after a combined treatment of survivin siRNA and irradiation is correlated with the activation of caspases 3 and 7 in a wt- P53 sarcoma cell line but not in a mt- P53 sarcoma cell line[ J]. Oncol Rep 2005 13 (1): 167— 172  
[ 5 ] Roedel F, Frey B, Leimann W, et al. Survivin antisense oligonucleotides effectively radiosensitize colorectal cancer cells in both tissue culture and murine xenograft models[ J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2008 71 (1): 247— 255  
[ 6 ] Song H, Xin XY, Xiao F, et al. Survivin gene RNA interference inhibits proliferation, induces apoptosis and enhances radiosensitivity in Hela cells[ J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2008 136 (1): 83— 89

(收稿日期: 2010—03—20)

科技论文的关键词

科技论文的关键词是从其题名、层次标题和正文中选出来的、能反映论文主题概念的词和词组,是表达文献主题概念的自然语言词汇,是科技论文的文献检索标识。

每篇论文需给出 3~8个关键词,其中主题词应尽可能多一些,请尽量使用综合性主题词表(如《汉语主题词表》)和专业主题词表(如 NASA词、NIS词表、TEST词表等)中进行标引,如果尚无相应的词,可采用习用的自由词,但要置于最后。

关键词中不能用缩写。同时要求给出与中文相应的英文关键词。关键词包括两类词: 1叙词(正式主题词)指收入《汉语主题词表》(叙词表)中可用于标引文献主题概念的即经过规范化的词组; 2直接从文章的题名、摘要、层次标题或文章的其他内容中抽出来的,能反映该文主题概念的词或词组,即汉语主题词表中的上位词、下位词、替代词等非正式主题词和词表中找不到的自由词。