

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.28.001

文章编号: 1005-8982 (2018) 28-0001-07

基础研究 · 论著

Survivin-shRNA 对 A431 皮肤鳞状细胞癌 抑制作用的实验研究 *

郝玉琴¹, 刘侠², 康淑霞², 张鑫², 张坤², 朱永蒙³

[1. 内蒙古医科大学第三附属医院(包钢医院)皮肤科, 内蒙古包头 014010; 2. 内蒙古医科大学, 内蒙古呼和浩特 010110; 3. 内蒙古医科大学第三附属医院(包钢医院)生殖中心, 内蒙古包头 014010]

摘要: 目的 观察 Survivin-shRNA 对 A431 皮肤鳞状细胞癌的作用效果, 探讨核因子 κ B (NF- κ B) 在 Survivin-shRNA 对皮肤鳞状细胞癌 (SCC) 抑制作用中的分子生物学机制。**方法** 构建 Survivin-shRNA 腺病毒载体, 筛选最佳干扰序列。将培养好的 A431 细胞混悬液皮下接种于裸鼠, 复制 A431 裸鼠移植瘤模型, 随机分为空白对照组、阴性对照组、Survivin-shRNA 转染组和 Res 阳性对照组, 每组 5 只, 瘤内注射相应试剂, 第 20 天处死所有裸鼠, 取瘤组织分别测量瘤体积、瘤重, 绘制肿瘤生长曲线, 计算抑瘤率; HE 染色观察细胞形态; TUNEL 检测细胞凋亡情况; Western blot 法测定 Survivin、I κ B、P65、P53、Caspase-3 蛋白的表达。**结果** Survivin-shRNA 转染组或 Res 阳性对照组的裸鼠移植瘤, 瘤体积及瘤重降低, 与空白对照组及阴性对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); TUNEL 检测结果示 Survivin-shRNA 转染组、Res 阳性对照组的裸鼠移植瘤, 细胞凋亡率增高, 与空白对照组及阴性对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Survivin-shRNA 转染组及 Res 阳性对照组可见肿瘤细胞较少, 分布稀疏, 有变性的液化坏死灶, 癌细胞皱缩变圆, 胞核固缩; Survivin-shRNA 转染组或 Res 阳性对照组裸鼠移植瘤, Survivin、P65 蛋白的表达均降低, 与空白对照组及阴性对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), I κ B、P53、Caspase-3 蛋白表达增高, 与空白对照组及阴性对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** Survivin-shRNA 可以抑制皮肤鳞状细胞癌裸鼠移植瘤的生长, 其机制之一可能是通过抑制 NF- κ B 信号通路, 活化抑癌基因 P53, 进而促进肿瘤细胞凋亡, 抑制 SCC 移植瘤的生长。

关键词: Survivin-shRNA; NF- κ B; 皮肤鳞状细胞癌; 抑制作用

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Inhibitory effect of survivin-shRNA on A431 skin squamous cell carcinoma*

Yu-qin Hao¹, Xia Liu², Shu-xia Kang², Xin Zhang², Kun Zhang², Yong-meng Zhu³

(1. Department of Dermatology, Baogang Hospital, Inner Mongolia Medical College, Baotou, Inner Mongolia Autonomous Region 014010, China; 2. Inner Mongolia Medical College, Hohhot, Inner Mongolia Autonomous Region 010110, China; 3. Reproductive Medical Center, Baogang Hospital, Inner Mongolia Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014010, China)

Abstract: Objective To observe the effect of survivin-shRNA on skin squamous cell carcinoma (SCC) A431 cells, to and explore the molecular biological mechanism of NF- κ B in the inhibition of survivin-shRNA on skin SCC.

Methods Survivin-shRNA adenovirus vector was constructed to screen the best interference sequence. The cultured

收稿日期: 2018-03-27

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81260407)

[通信作者] 朱永蒙, E-mail: bgzyym555@163.com

A431 cell suspension was subcutaneously inoculated in nude mice to construct the transplanted tumor model of A431. The nude mice were randomly divided into a blank group, a rAd-EGFP negative control group, a rAd-survivin-shRNA transfection group and a Res positive control group, with 5 rats in each group. The corresponding reagents were injected into the tumors. All the mice were sacrificed on the 20th day. The tumors were isolated, the volume and weight of the tumors were measured, the tumor growth curves were drawn, the tumor inhibition rate was calculated. HE staining was used to observe the morphology of the tumor cells. TUNEL was used to detect cell apoptosis. Western blot was applied to test the protein expression levels of survivin, I κ B, p65, p53 and caspase3. ANOVA was used to analyze the results. **Results** After survivin-shRNA or Res treatment in the nude mice, the tumor volume and weight decreased significantly, there were significant differences compared with the blank group and the rAd-EGFP negative group ($P < 0.05$). The results of TUNEL showed that the apoptosis rates were significantly increased in the rAd-survivin-shRNA transfection group and the Res positive control group, the two groups had significant differences from the blank group and the rAd-EGFP negative group ($P < 0.05$). In the survivin-shRNA transfection group and the Res positive control group, microscopic observation showed that decreased and sparse tumor cells, degenerative liquefaction necrotic foci, cancer cell shrinkage and becoming round, and karyopycnosis. After survivin-shRNA or Res treatment of nude mice, the expressions of survivin and p65 protein were decreased, the differences were statistically significant compared with the blank and rAd-EGFP negative groups ($P < 0.05$), while the expressions of I κ B, p53 and caspase3 proteins were significantly increased compared with the blank control group and the rAd-EGFP negative control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Survivin-shRNA can inhibit the growth of skin SCC xenografts in nude mice, one of the mechanisms may be through inhibition of the NF- κ B signaling pathway, activation of tumor suppressor gene P53, and promoting apoptosis of tumor cells, eventually leading to inhibited growth of SCC xenografts.

Keywords: survivin-shRNA; NF- κ B; squamous cell carcinoma; inhibition

皮肤鳞状细胞癌 (squamous cell carcinoma, SCC) 为皮肤科常见恶性肿瘤, 且发病率逐年上升^[1], 传统治疗 SCC 的方法包括手术切除、放疗、光动力治疗、激光、冷冻等, 然而这些方法对于发生在暴露部位、特殊部位以及较大的肿瘤疗效欠佳。靶向 Survivin-shRNA 有抑制肿瘤细胞增殖, 促进肿瘤细胞凋亡等作用。NF- κ B 对肿瘤的发生、发展有重大意义, 其传导通路可通过调控 *Bax*、*Survivin* 等多种下游凋亡基因, 从而控制肿瘤细胞的凋亡^[2-3]。生存素 (Survivin) 是近年发现的最新凋亡抑制因子, 本研究通过观察 Survivin-shRNA 对人 SCC A431 细胞株裸鼠移植瘤生长情况的影响, 探讨 NF- κ B 信号通路在 Survivin-shRNA 诱导 SCC 移植瘤凋亡中的作用。

1 材料与方 法

1.1 材料与动物

人皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞由长沙赢润生物技术有限公司提供, HeLa 细胞由长沙赢润生物技术有限公司代购, rAd-EGFP、shRNA 表达载体 pYr-1.1 由长沙赢润生物技术有限公司提供, rAd-Survivin-shRNA 腺病毒由长沙赢润生物技术有限公司构建, 包装细胞 HEK 293 购自美国 ATCC 公司, DMEM (高糖型) 培养基、胎牛血清、胰酶、抗生素购自

美国 Invitrogen 公司, 凯基 Annexin-V-FITC 细胞凋亡试剂盒购自深圳晶美生物有限公司, β -actin 购自美国 Abgent 公司, ECL 化学发光试剂盒购自美国 Pierce 公司。SPF 级 BALB/c-nu 裸鼠, 6 ~ 8 周龄, 18 ~ 22 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物质量合格许可证编号为: SCXK (湘) 2011-0003。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 A431 细胞培养在含 10% 小牛血清、青霉素和链霉素各 100 u/ml 的高糖 DMEM 培养液中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。当细胞生长处于对数生长期时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞成单细胞悬液, 血细胞平板计数, 调整细胞密度为 5×10^7 个/ml, 4 ml, 备用。

1.2.2 构建 Survivin-shRNA 腺病毒载体, 筛选最佳干扰序列 根据 shRNA 靶位点的选择原则, 从赢润 shRNA 数据库中择优选取 3 条 Survivin shRNA 序列作为待筛靶序列, 以便开展后续实验。靶序列 1: GAGGCTGGCTTCATCCACTGC, 靶序列 2: GAGCCAA GAACAAAATTGC, 靶序列 3: GAAAGTGCCCGTGCC AT。以上述靶序列为基础, 设计 Survivin-shRNA 引物: 正向 Survivin-sh1: 5'-CACCCGAGGCTGGCTTCAT CCACTGCCTCGAGGCAGTGGATGAAGCCAGCCTCTTT

TTTG-3', 反向 Survivin-sh1 : 5'-AGCTCAAAAAAGAG GCTGGCTTCATCCACTGCCTCGAGGCAGTGGATGAAG CCAGCCTC-3'; 正向 Survivin-sh2 : 5'-CACCGAGCCAA GAACAAAATTGCTTCAAGAGAGCAATTTTGTCTTGG CTCTTTTTTTG-3', 反向 Survivin-sh2 : 5'-AGCTCAAAAA AGAGCCAAGAACAAAATTGCTCTCTTGAAGCAATTTT GTTCTTGGCTC-3'; 正向 Survivin-sh3 : 5'-CACCGAA AGTGCGCCGTGCCATCTTCAAGAGAGATGCCACGGC GCACTTTCTTTTTTTC-3', 反向 Survivin-sh3 : 5'-AGCTC AAAAAAGAAAGTGCGCCGTGCCATCTCTTGAAGA TGGCAGGGCGCACTTTC-3'。shRNA 表达载体构建合成上述引物, 用退火 Buffer 分别溶解引物, 然后置于沸水中, 自然退火。(退火 Buffer 的配方为: 10 mmol Tris-HCl pH8.0、50 mmol NaCl、1 mmol EDTA)。pYr-1.1 原载体上有 1 个 *Sac I* 酶切位点 (GAGCTC), 当外源的 shRNA 片段成功插入, 则会带入 1 个新的 *Sac I* 酶切位点, 2 个 *Sac I* 之间的片段长度约为 930 bp。因此, pYr-1.1-Survivin-shRNA 可以用 *Sac I* 来进行酶切鉴定。将培养好的 HeLa 细胞分为 5 组: ① KB 组: 空白细胞组; ② NC 组: 转染 pYr-1.1-NC 质粒的 HeLa 细胞; ③ Survivin-1 组: 转染 pYr-1.1-Survivin-sh1 质粒的 HeLa 细胞; ④ Survivin-2 组: 转染 pYr-1.1-Survivin-sh2 质粒的 HeLa 细胞; ⑤ Survivin-3 组: 转染 pYr-1.1-Survivin-sh3 质粒的 HeLa 细胞。在转染后的 48 h 收集细胞用于实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 和 Western blot 检测。

1.2.3 复制 A431 裸鼠移植瘤模型 将培养好的 A431 细胞混悬液以 1 ml 注射器分别抽取细胞悬液, 接种于 SPF 级 BALB/c-nu 裸鼠, 每只裸鼠接种 0.2 ml, 接种细胞量约为 1×10^7 个, 接种部位为裸鼠右侧腋窝皮下, 接种前用碘伏消毒皮肤, 观察裸鼠生活状况。接种后第 12 天, 选择肿瘤体积为 100 ~ 200 mm³ 左右的裸鼠为实验模型。

1.2.4 实验分组及处理 将 20 只成瘤后的裸鼠随机分为空白对照组、阴性对照组、Survivin-shRNA 转染组及 Res 阳性对照组, 每组 5 只, 瘤内注射相应试剂 0.15 ml, 1 次/2 d, 共 6 次。瘤鼠药物处理后, 每 4 d 记录肿瘤生长情况, 并于开始药物处理后的第 20 天颈椎脱臼法处死所有裸鼠, 取瘤组织行后续实验。①空白对照组: 单纯注射无血清无抗生素的 DMEM 培养液; ②阴性对照组: rAd-EGFP; ③ Survivin-shRNA 转染组: rAd-Survivin-shRNA; ④ Res 阳性对

照组: 注射 50 mg/kg Res。

1.2.5 瘤体积、瘤重测量及抑瘤率计算 用数字游标卡尺测量肿瘤体积。BALB/c-nu 裸鼠腋下皮下接种人 A431 细胞后, 第 8 天开始观察到肿瘤生长, 随后各组肿瘤逐天增长, 第 12 天体积基本达到 100 mm³ 以上, 根据瘤体积及接种时间绘制肿瘤生长曲线。药物处理后 20 d, 分离被处死的裸鼠肿瘤, 称瘤重, 计算抑瘤率。瘤重抑瘤率 % = (阴性对照组瘤重 - 实验组瘤重) / 阴性对照组瘤重 × 100%; 瘤体积抑瘤率 % = (阴性对照组瘤体积 - 实验组瘤体积) / 阴性对照组瘤体积 × 100%。瘤体积使用如下公式计算: $V = L \times S^2 / 2$, V 为肿瘤体积 (mm³), L 为肿瘤长径 (mm), S 为肿瘤短径 (mm)。形状不规则肿瘤: L 按最长直径计, S 按与最长直径垂直的短径中间值计。

1.2.6 HE 染色 将裸鼠成瘤组织经脱蜡、水化后, 用苏木精伊红常规染色, 滴加中性树脂, 盖片封片, 镜下观察细胞形态。

1.2.7 TUNEL 检测细胞凋亡情况 荧光素 (Fluorescein) 标记的 dUTP 在脱氧核糖核苷酸末端转移酶 (TdT Enzyme) 的作用下, 可以连接到凋亡细胞中断裂的 DNA 的 3'-OH 末端, 可用荧光显微镜检测。由于正常的或正在增殖的细胞几乎没有 DNA 的断裂, 因而没有 3'-OH 形成, 很少能被标记。TUNEL 结果判读: 凋亡细胞核呈绿色, 每张切片在高倍镜 (400 倍) 下选取其中 5 个视野, 在每个视野计数 100 个细胞中凋亡细胞数, 取 5 个视野 (>500 个细胞), 检测阳性表达率 (阳性核占视野中总细胞核百分比) 作为细胞凋亡指数 (apoptosis index, AI)。

1.2.8 Western blot 法测定 Survivin、P53、IKB、P65、Caspase-3 蛋白的表达水平 倒尽培养瓶中的培养液, 再往培养瓶中加入适量的生理盐水, 轻轻摇动培养瓶洗涤细胞, 弃去洗液, 根据样品数量, 按 50 体积 Solution A 加 1 体积 Solution B (50 : 1) 配置适量 BCA 工作液, 经 SDS-PAGE 电泳及转膜, 将膜移至含有 5% 脱脂牛奶 (用 TBST 溶解牛奶) 封闭液的平皿中, 室温下脱色摇床上摇动封闭 1 h, 将底物 A 和 B 在 EP 管中等体积混合, 1 min 后, 将膜蛋白面朝上放在杂交袋中, 再将混合好的 A、B 底物滴加在膜上, 去尽残液, 包好, 放入 X 射线片夹中, 将胶片进行扫描或拍照, 用凝胶图像处理系统进行灰度分析。

1.3 统计学方法

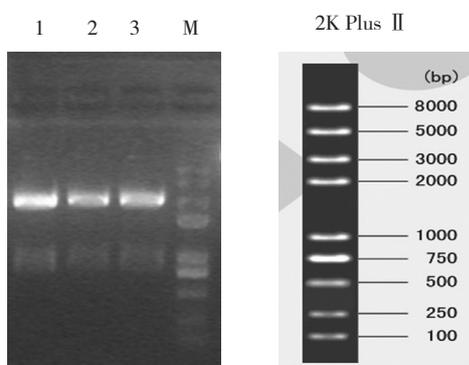
数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以

均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验, 计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 酶切鉴定、测序及最佳干扰序列筛选结果

pYr-1.1-Survivin-shRNA *Sac* I 酶切鉴定结果见图 1。由酶切结果可知, 此 pYr-1.1-Survivin-sh1、pYr-1.1-survivin-sh2、pYr-1.1-Survivin-sh3 克隆是正确的。将上述 pYr-1.1-Survivin-sh1、pYr-1.1-Survivin-sh2、pYr-1.1-Survivin-sh3 克隆送去测序。测序引物为: hU6-5' Sequencing primer: 5'-GACTATCATATGCTTACCGT-3'。



1: pYr-1.1-survivin-sh1 经 *Sac* I 酶切; 2: pYr-1.1-survivin-sh2 经 *Sac* I 酶切; 3: pYr-1.1-survivin-sh3 经 *Sac* I 酶切; M: 2K Plus II

图 1 pYr-1.1-Survivin-shRNA 酶切鉴定图

pYr-1.1-Survivin-sh1 测序结果见图 2。Sequence 0: 欲获得 Survivin-shRNA-1 序列, Sequence 1: pYr-1.1-Survivin-sh1.ab1 测序序列, 比对软件: DNAssist。

pYr-1.1-Survivin-sh2 测序结果见图 3。Sequence 2: 欲获得 Survivin-shRNA-2 序列, Sequence 3: pYr-1.1-survivin-sh2.ab1 测序序列, 比对软件: DNAssist。

pYr-1.1-Survivin-sh3 测序结果见图 4。Sequence 7: 欲获得 survivin-shRNA-3 序列, Sequence 9: pYr-1.1-Survivin-sh3.ab1 测序序列, 比对软件: DNAssist。

由以上结果可知, pYr-1.1-Survivin-sh1、pYr-



图 2 pYr-1.1-Survivin-sh1 测序结果

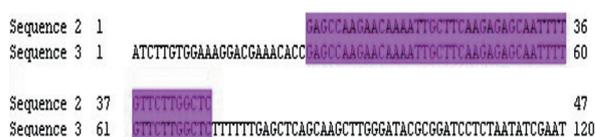


图 3 pYr-1.1-Survivin-sh2 测序结果

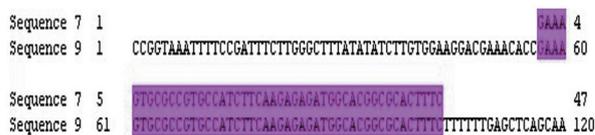
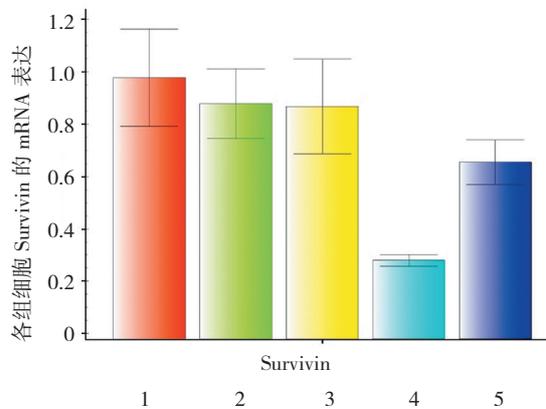


图 4 pYr-1.1-Survivin-sh3 测序结果

1.1-Survivin-sh2、pYr-1.1-survivin-sh3 构建成功。经 qRT-PCR 和 Western-blot 检测, Survivin-sh2 干扰效果最明显, 选为最佳干扰序列。qRT-PCR 检测各组细胞中 Survivin mRNA 表达情况, 见图 5。Western blot 检测各组细胞中 Survivin 蛋白表达情况, 见图 6。

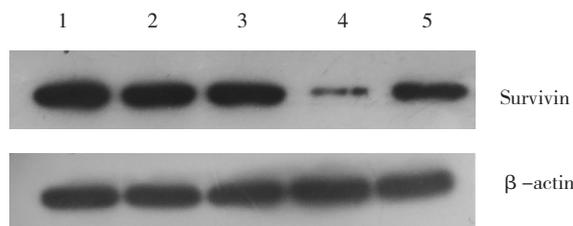
2.2 各组肿瘤生长曲线、移植瘤体积、瘤重、及抑瘤率比较

各组动物至实验结束无一死亡, 均全部进入指标检测。从各组肿瘤生长曲线 (见图 7) 可以看出,



1: KB 组; 2: NC 组; 3: Survivin-1 组; 4: Survivin-2 组; 5: Survivin-3 组

图 5 各组细胞 mRNA 表达



1: KB 组; 2: NC 组; 3: Survivin-1 组; 4: Survivin-2 组; 5: Survivin-3 组

图 6 各组细胞 Survivin 的蛋白表达

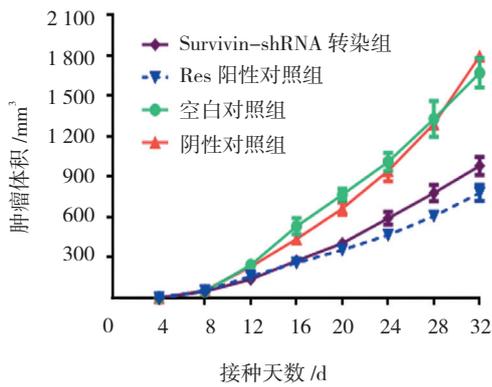


图 7 各组裸鼠移植瘤生长曲线图

与空白对照组及阴性对照组比较, Survivin-shRNA 转染组及 Res 阳性对照组在相应干预后移植瘤生长均有不同程度的抑制。干预结束时, Survivin-shRNA 转染组及 Res 阳性对照组与空白对照组及阴性对照组的瘤体积、瘤重比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Survivin-shRNA 转染组及 Res 阳性对照组均有较高抑瘤率, 其瘤体积抑瘤率分别为 45.39% 和 56.55%, 瘤重抑瘤率分别为 41.25% 和 56.25%。见表 1。

2.3 各组移植瘤组织 HE 染色结果

光镜下观察 HE 染色切片可见各组移植瘤组织内有坏死, 坏死灶与瘤组织界限较清晰。其中空白对照

组及阴性对照组每张切片仅有少许坏死, 大部分为肿瘤组织, 肿瘤细胞密集成群、生长旺盛、细胞多为多边形, 核大深染; Survivin-shRNA 转染组及 Res 阳性对照组坏死细胞较多, 肿瘤组织较少, 肿瘤细胞分布稀疏, 有变性的液化坏死灶, 癌细胞皱缩变圆, 胞核固缩。见图 8。

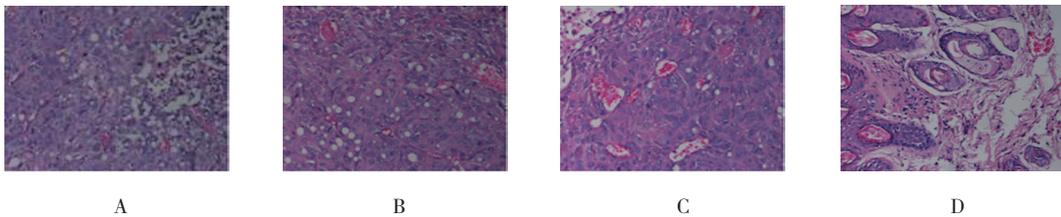
2.4 各组移植瘤组织 TUNEL 检测结果

TUNEL 检测细胞凋亡阳性表达率水平, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 22.177, P = 0.000$),

表 1 各组瘤体积及瘤重抑瘤率比较结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	瘤体积 / mm ³	瘤体积抑瘤率 / %	瘤重 / g	瘤重抑瘤率 / %
空白对照组	1 668.98 ± 242.56	-	1.06 ± 0.23	-
阴性对照组	1 792.36 ± 55.10	-	1.60 ± 0.29	-
Survivin-shRNA 转染组	978.86 ± 150.61 ¹⁾	45.39	0.94 ± 0.32 ¹⁾²⁾	41.25
Res 阳性对照组	778.73 ± 131.80 ¹⁾²⁾	56.55	0.7 ± 0.23 ¹⁾²⁾	56.25
F 值	49.273	-	9.791	-
P 值	0.000	-	0.010	-

注: 1) 与阴性对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与空白对照组比较, $P < 0.05$

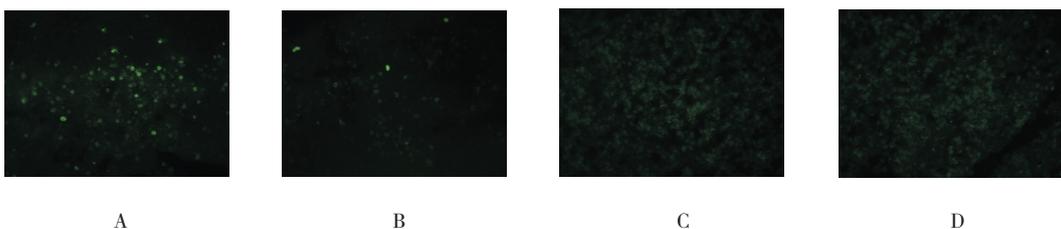


A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: Survivin-shRNA 转染组; D: Res 阳性对照组

图 8 各组移植瘤组织学改变 (显微镜 × 200)

各组细胞凋亡阳性表达率有差异; 与 Res 阳性对照组比较, Survivin-shRNA 转染组细胞凋亡阳性表达率差异无统计学意义 ($t = 1.569, P = 0.169$); 与空白对照组及阴性对照组比较, Survivin-shRNA 转染组细胞凋

亡阳性表达率增高, 差异有统计学意义 ($t = 4.769$ 和 $6.289, P = 0.001$ 和 0.000)。荧光显微镜下调亡细胞阳性表达见图 9。



A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: Survivin-shRNA 转染组; D: Res 阳性对照组

图 9 各组凋亡细胞阳性表达 (荧光显微镜 × 400)

2.5 各组凋亡相关因子蛋白表达

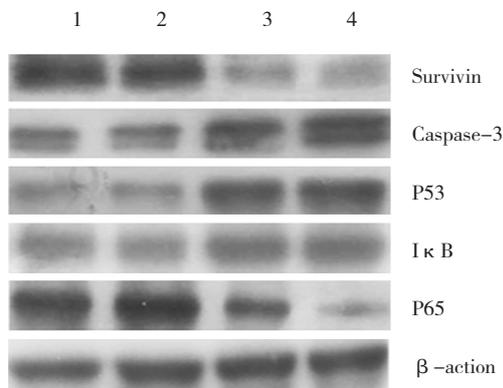
Western blot 法检测各组 Survivin、P65、P53、IκB、Caspase-3 蛋白表达,经单因素方差分析,差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 各组 Survivin、P65、P53、IκB、Caspase-3 蛋白表达有差异。与 Res 阳性对照组比较, Survivin-shRNA 转染组 Survivin、P65、IκB 的蛋白表达差异无统计学意义 ($t = 0.045$ 、1.451 和 0.369, $P = 0.965$ 、0.185 和 0.722); P53、Caspase-3 蛋白表达降低, 差异有统计学意义 ($t = 3.476$ 和 3.041,

$P = 0.020$ 和 0.023)。与空白对照组及阴性对照组比较, Survivin-shRNA 转染组 Survivin、P65 蛋白的表达均降低, 差异有统计学意义 ($t_{Survivin} = 16.974$ 和 19.594, $t_{P65} = 9.808$ 和 8.385, 均 $P = 0.000$), P53、IκB、Caspase-3 蛋白表达均增高, 差异有统计学意义 ($t_{P53} = 14.645$ 和 15.236, 均 $P_{P53} = 0.000$; $t_{IκB} = 2.795$ 和 2.807, 均 $P_{IκB} = 0.023$; $t_{Caspase-3} = 6.206$ 和 6.731, 均 $P_{Caspase-3} = 0.000$) (见表 2)。各组凋亡相关因子蛋白表达检测结果见图 10。

表 2 各组凋亡相关因子蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Survivin	P65	P53	IκB	Caspase-3
空白对照组	0.95 ± 0.06	0.92 ± 0.09	0.34 ± 0.07	0.45 ± 0.22	0.41 ± 0.08
阴性对照组	0.99 ± 0.05	0.97 ± 0.93	0.36 ± 0.06	0.43 ± 0.23	0.39 ± 0.12
Survivin-shRNA 转染组	0.25 ± 0.07 ¹⁾²⁾	0.34 ± 0.10 ¹⁾²⁾	0.94 ± 0.06 ¹⁾²⁾	0.86 ± 0.24 ¹⁾²⁾	0.81 ± 0.12 ¹⁾²⁾
Res 阳性对照组	0.25 ± 0.07 ¹⁾²⁾	0.72 ± 0.03 ¹⁾²⁾	1.25 ± 0.02 ¹⁾²⁾	0.92 ± 0.30 ¹⁾²⁾	1.18 ± 0.24 ¹⁾²⁾
F 值	218.075	72.588	75.904	5.362	33.298
P 值	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000

注: 1) 与阴性对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与空白对照组比较, $P < 0.05$



1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: Survivin-shRNA 转染组; 4: Res 阳性对照组

图 10 各组凋亡相关因子蛋白表达

3 讨论

Survivin 是凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 家族中分子量最小且作用最强的凋亡抑制因子, 不同于 IAP 家族的其他成员, Survivin 在多种人类恶性肿瘤中高表达, 而在分化成熟的组织中不表达或低表达, 这一特性使它成为研究肿瘤标记和抗肿瘤治疗的标志性蛋白^[4]。

肿瘤是多种基因相互作用调控的结果, RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术是通过小干扰 RNA

(small interfering RNA, siRNA) 引起目的信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 特异性降解, 从而使基因转录后沉默的一种现象。RNA 干扰技术可以同时沉默多个肿瘤相关基因, 因此成为目前肿瘤治疗的研究热点。载体介导 shRNA 表达技术能长期和稳定地抑制目的基因的表达, 可用于构建理想的实验细胞模型, 因此, shRNA 表达载体技术已成为肿瘤基因治疗的强大工具^[5]。

P53 是一种核转录因子, 可通过一系列的应激因素如 DNA 损伤、低氧和癌基因活化后可被激活。P53 的关键作用之一就是参与细胞周期检查点的调控来维持遗传的稳定性; 同时作为肿瘤抑制基因, P53 在肿瘤发生的预防中也发挥着关键作用。其对 Survivin 的调节也有细胞周期依赖性。Survivin 作为在 G2/M 期特异性表达的凋亡抑制蛋白参与细胞周期和凋亡的调控, P53 作为凋亡活化基因通过在细胞周期的检查点抑制 Survivin 的活性而发挥其生物学功能, 而 Survivin 又可以在转录后水平对 P53 进行调节。二者通过调控细胞周期和细胞凋亡来参与肿瘤发生的调控^[6-7]。

核因子 κB (NF-κB) 是一个在肿瘤的发生和发展中存在的核转录因子, 它参与多种细胞生物反应, 其活化后可进入细胞核, 调节编码细胞因子、生

长因子、细胞黏附分子和细胞凋亡相关蛋白的表达。NF- κ B 家族包括 5 个成员: NF- κ B1 (P50 及其前体 P105)、NF- κ B2 (P52 及其前体 P100)、RelA (P65)、RelB、c-Rel, 形成不同的同源和异源二聚体。不同的信号通路导致不同的二聚体 NF- κ B 的激活, 导致不同的生物学结果^[8]。其中 RelA (P65) 主要参与细胞增殖和有效的免疫应答。I κ B (inhibitor of NF- κ B) 是 NF- κ B 的抑制蛋白, 在未受刺激的细胞中, NF- κ B 与 I κ B 的结合被隔离在细胞质外, 防止 NF- κ B 与 DNA 结合, 从而抑制 NF- κ B 的生物学功能。NF- κ B 信号的激活是由细胞外刺激启动的, 这些刺激被受体识别并传递到细胞中, 将导致 I κ B 激酶 (IKK) 激活, 使 I κ B 磷酸化并泛素化, 最后 I κ B 降解, 释放的 NF- κ B 蛋白被运入细胞核, 结合到相应的靶序列上激活基因并启动转录^[9]。在 B 细胞淋巴瘤、结直肠癌和 T 细胞白血病中, 已报道了 NF- κ B 与 Survivin 基因启动子区结合并增强转录^[10]。

CUI 等^[11]研究表明, 在膀胱癌中, NF- κ B 可以促进细胞周期进程, 并且活化的 NF- κ B 信号通路有助于 Survivin 表达上调, 并通过上调 Survivin 的表达, 减少细胞凋亡, 从而增加细胞的增殖。ZENG 等^[10]在食道癌的研究发现, 上调 Survivin 的表达可以增加 P65 的上游基因 IKK 在转录水平上表达增高, 并可以促进 P65 的蛋白表达增加, 反之则抑制 P65 的蛋白表达, Survivin 可以与 IKK 的启动子区域结合。过表达的 Survivin 可以激活 P65 的活性, 抑制细胞凋亡, 促进细胞增殖。鲍聚喜等^[12]发现, 在结肠癌中, 靶向沉默 P65 基因, 可以降低 Survivin 基因的表达。

本实验结果显示, 靶向 Survivin-shRNA 可以抑制裸鼠移植瘤体积及瘤重的生长; 在显微镜下 Survivin-shRNA 组移植瘤组织细胞较少, 分布稀疏, 有变性的液化坏死灶, 癌细胞皱缩变圆, 胞核固缩; 通过 TUNEL 检测 Survivin-shRNA 组细胞凋亡率增高。靶向 Survivin-shRNA 可以抑制 SCC 裸鼠移植瘤的生长, 并促进肿瘤细胞凋亡, 再次证明靶向 Survivin-shRNA 对肿瘤的抑制作用。通过 Western blot 法检测 Survivin、P53、I κ B、P65、Caspase-3 蛋白的表达, 结果显示, Survivin-shRNA 组 P53、I κ B、Caspase-3 蛋白的表达增加, 而 Survivin、P65 蛋白的表达降低, 这与相关文献结果是一致的^[10]。因此推测, Survivin-shRNA 抑制 SCC 裸鼠移植瘤生长的机制之一, 可能是靶向 Survivin-shRNA 抑制 Survivin 表达, 从而抑制

P65 的上游基因 IKK 表达, 促使 I κ B 与 P65 的结合, 抑制了 P65 的表达, 进而促进肿瘤细胞凋亡, 最终导致 SCC 移植瘤的生长受到抑制。其次靶向 Survivin-shRNA 使 Survivin 的表达降低, 激活 Caspase-3, 从而促使细胞凋亡, 而形成的凋亡蛋白又进一步激活 P53, 从而进一步扩大凋亡效应。

综上所述, 靶向 Survivin-shRNA 对 A431 SCC 抑制作用机制之一, 可能是通过抑制 NF- κ B 信号通路的表达来实现的。

参 考 文 献:

- [1] MISIAKOS E P, DAMASKOU V, KOUMARIANOU A, et al. A giant squamous cell carcinoma of the skin of the thoracic wall: a case report and review of the literature[J]. J Med Case Rep, 2017, 11(1): 136.
- [2] BARITAKI S, BONAVIDA B. Viral infection and cancer: the NF-kappaB/Snail/RKIP loop regulates target cell sensitivity to apoptosis by cytotoxic lymphocytes[J]. Crit Rev Immunol, 2010, 30(1): 31-46.
- [3] STARENKI D V, NAMBA H, SAENKO V A, et al. Induction of thyroid cancer cell apoptosis by a novel nuclear factor kappa B inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(20): 6821-6829.
- [4] 张鑫, 郝玉琴. 靶向 survivin shRNA 在肿瘤治疗中的研究进展[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2016, 32 (1): 58-60.
- [5] 张鑫, 郝玉琴. RNA 干扰技术的研究进展[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2016, 32(2): 117-119.
- [6] CHEN X, DUAN N, ZHANG C, et al. Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies[J]. J Cancer, 2016, 7(3): 314-323.
- [7] SHAIKH Z, NIRANJAN K C. Cell cycle aberration in ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumor: As evidenced by the expression of p53 and survivin[J]. Indian J Dent Res, 2015, 26(6): 565-570.
- [8] WU D, WU P, ZHAO L, et al. NF-kappa B expression and outcomes in solid tumors: a systematic review and meta-analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94(40): 1687.
- [9] NAPETSCHNIG J, WU H. Molecular basis of NF-kappaB signaling[J]. Annu Rev Biophys, 2013, 42(11): 443-468.
- [10] ZENG W, LI H, CHEN Y, et al. Survivin activates NF kappa B p65 via the IKK beta promoter in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(2): 1869-1880.
- [11] CUI X, SHEN D, KONG C, et al. NF-kappa B suppresses apoptosis and promotes bladder cancer cell proliferation by upregulating survivin expression in vitro and in vivo[J]. Sci Rep, 2017, 31(7): 40723.
- [12] 鲍聚喜, 马存林, 邓海军. NF- κ B p65 基因沉默条件下 HT29 细胞中 Survivin 表达活性的研究[J]. 内蒙古中医药, 2011, 30(18): 40-45.

(张蕾 编辑)