

# 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

杨巍<sup>1</sup> 李艳博<sup>2</sup> 赵敬国<sup>3</sup> 龚守良<sup>2</sup> 曹建平<sup>1</sup> 刘芬菊<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (苏州大学放射医学与公共卫生学院放射生物学教研室 苏州 215123)

<sup>2</sup> (吉林大学公共卫生学院卫生部放射生物学重点实验室 长春 130021)

<sup>3</sup> (中国人民解放军403医院整形外科 大连 116015)

**摘要** 为探讨RNA干扰(RNA interference, RNAi)沉默乏氧诱导因子-1 $\alpha$  (Hypoxia induced factor 1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )和生存素(Survivin)基因联合X射线照射对乏氧人肝癌细胞SMMC-7721的体外抑瘤效应,利用双靶向HIF-1 $\alpha$ 和Survivin基因载体,采用阳离子脂质体介导法转染SMMC-7721细胞,经乏氧培养36h后,分别以RT-PCR和Western blot法检测HIF-1 $\alpha$ 和Survivin基因的mRNA及其蛋白表达,分别以四甲基偶氮唑盐(MTT)法和流式细胞术检测细胞存活分数及细胞凋亡。结果表明,转染质粒pGenesil-Survivin-HIF的SMMC-7721细胞中,HIF-1 $\alpha$ 和Survivin基因mRNA表达水平与对照和阴性干扰组相比明显降低( $p < 0.05$ ),也未检测到HIF-1 $\alpha$ 和Survivin蛋白的表达。单、双干扰联合放疗组存活分数较照射组明显降低( $p < 0.01$ ),双干扰联合放疗组存活分数较其它组也明显降低( $p < 0.01$ )。单、双干扰联合放疗组凋亡细胞百分数较对照组明显升高( $p < 0.01$ ),双干扰联合放疗组凋亡细胞百分数较其它组也明显升高( $p < 0.01$ )。结果提示,质粒pGenesil-Survivin-HIF可有效地干扰乏氧SMMC-7721细胞HIF-1 $\alpha$ 和Survivin基因的mRNA及其蛋白表达。双干扰联合放疗组对乏氧SMMC-7721细胞的体外抑瘤效应明显优于单干扰联合放疗组。

**关键词** RNA干扰, X射线, 乏氧诱导因子-1 $\alpha$ , 生存素

**中图分类号** R730.54, R730.55, R735.7, R811.5

RNA干扰主要通过双链RNA的介导特异地降解靶基因的mRNA,从而实现转录后基因沉默,它具有特异、高效等特点,已成为肿瘤研究的重要工具。乏氧是实体瘤发展过程中的普遍现象,肿瘤为适应乏氧而发生一系列生物学改变,包括肿瘤的侵袭性及远处转移能力的增加,HIF-1 $\alpha$ 是这一系列改变的关键调控因子。因此,阻断HIF-1 $\alpha$ 表达已成为靶向杀伤乏氧肿瘤细胞的重要策略<sup>[1]</sup>。Survivin是一种结构独特的哺乳类凋亡抑制蛋白(Inhibitor of apoptosis protein, IAP),广泛表达于人的胚胎组织和几乎所有人类常见恶性肿瘤组织,而在正常成人组织和终末分化组织内检测不到,鉴于其表达的特异性和抑制细胞凋亡活性,Survivin已成为倍受关注的抗肿瘤治疗靶点<sup>[2]</sup>。本实验在已成功构建靶向HIF-1 $\alpha$ 和Survivin基因的单、双RNA干扰载体的

基础上,探讨其联合X射线照射对乏氧人肝癌细胞SMMC-7721的体外增殖活性和凋亡的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株和主要试剂

人肝癌细胞株SMMC-7721为本室保存;阴性干扰载体pGenesil-negative, Survivin干扰载体pGenesil-Survivin, HIF-1 $\alpha$ 干扰载体pGenesil-HIF和双干扰载体pGenesil-survivin-HIF由本室构建并保存;胎牛血清、RPMI1640培养基购自Gibco公司;阳离子脂质体lipofectamine 2000购自Invitrogen公司;Trizol购自上海生工公司;RT-PCR试剂盒购自杭州博日公司;DL2000 Marker购自大连宝生物公司;PCR引物由大连宝生物公司合成;兔抗人Survivin单克隆抗体、兔抗人HIF-1 $\alpha$ 单克隆抗体和

国家自然科学基金青年项目(30600160)资助

第一作者:杨巍,男,1976年10月出生,2005年毕业于吉林大学放射医学专业获博士学位,讲师,主要从事肿瘤的基因-放射治疗研究

收稿日期:初稿2008-10-06,修回2008-11-07

HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为美国 Santa Cruz 公司产品。其他生化试剂均为国产分析纯。

## 1.2 细胞培养与转染

SMMC-7721 细胞以含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养。细胞转染采用阳离子脂质体介导法, 按 Lipofectamine 2000 说明书进行(质粒与脂质体比例为 1:2.5)。转染 12 h 后, 将化学缺氧剂 CoCl<sub>2</sub> 加入培养液中, 浓度为 150  $\mu$ mol/L, 以模拟肿瘤内部缺氧微环境。

## 1.3 逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测 HIF-1 $\alpha$ 和 Survivin 基因 mRNA 表达

取生长期 SMMC-7721 细胞以  $1 \times 10^5$  /孔接种于 24 孔板, 24 h 后转染质粒, 转染 12 h 后进行乏氧培养, 36 h 后, 按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA, 然后按照 RT-PCR 试剂盒说明将 RNA 逆转录为 cDNA, 以此为模板进行 PCR。RT-PCR 引物序列为: HIF-1 $\alpha$  upper: 5'-GTGAGTTCGCATCTTGATA-3', Lower: 5'-CCATTCTGTGTGTAAGCA-3', 片段大小为 311 bp; Survivin upper: 5'-TTCTCAAGGA-CCACCGCATCT-3', lower: 5'-CGCACTTCTCCG-CAGTT-3', 358 bp。同时以  $\beta$ -actin 为内参照, upper: 5'-AAATCGTGCGTGACATTA-3', Lower: 5'-CTCGTCATACTCCTGCTTG-3', 片段大小为 474 bp。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 56 °C (HIF-1 $\alpha$ ) 或 62 °C (Survivin) 30 s, 72 °C 45 s, 共 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。

## 1.4 Western blot 检测 HIF-1 $\alpha$ 和 Survivin 蛋白表达

SMMC-7721 细胞转染质粒后乏氧培养 36 h 收获细胞, 用单去污剂裂解法提取总蛋白, 每个样品取 10  $\mu$ L 进行 SDS-PAGE 电泳分离。电泳完成后, 通过半干式转移电泳槽将凝胶中的蛋白转移到硝酸纤维素膜 (NC) 上, 电转电压 15 V, 时间 18 min。转移结束后, 将 NC 膜在 3% 脱脂奶粉-PBS 中室温封闭 2 h, 根据蛋白分子量 Marker 在适当位置剪开杂交膜, 分别用 Survivin 和 HIF-1 $\alpha$  单克隆抗体进行杂交, 洗膜, 暗室曝光。实验分组如下: 对照组 (Control)、阴性干扰组 (pGenesil-negative)、Survivin 干扰组 (pGenesil-Survivin)、HIF-1 $\alpha$  干扰组 (pGenesil-HIF)、双干扰组 (pGenesil-Survivin-HIF)。

## 1.5 照射条件

用国产 X 射线深部治疗机对转染 SMMC-7721 细胞进行照射, 电压 200 kV, 电流 10 mA, 滤板 0.5 mm Cu 和 1.0 mm AL, 球靶距 50 cm, 吸收剂量率 0.287 Gy/min。

## 1.6 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法检测细胞增殖

取生长良好的 SMMC 细胞, 在 96 孔细胞培养板中接种  $3 \times 10^3$  细胞/孔, 每组设 6 个复孔, 24 h 后转染重组质粒, 转染 12 h 后进行乏氧培养, 36 h 后给予 5 Gy X 射线照射, 照后 48 h 用 MTT 法检测细胞增殖活性的变化。MTT 具体方法如下: 每个待测孔中加入 20  $\mu$ L 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下继续培养 4 h, 弃掉培养液, 每孔加入 DMSO 150  $\mu$ L, 用酶标仪测定各孔 570 nm 处的光吸收值 (A 值), 计算细胞存活分数。细胞存活分数 = 实验组 A<sub>570</sub> / 对照组 A<sub>570</sub>  $\times 100$  %。实验分组如下: 对照组 (Control)、照射组 (5 Gy)、阴性干扰组 (pGenesil-negative)、Survivin 干扰组 (pGenesil-Survivin)、HIF-1 $\alpha$  干扰组 (pGenesil-HIF)、双干扰组 (pGenesil-Survivin-HIF)、Survivin 干扰联合放疗组 (pGenesil-Survivin+ 5Gy)、HIF-1 $\alpha$  干扰联合放疗组 (pGenesil-HIF+ 5 Gy) 和双干扰联合放疗组 (pGenesil-Survivin-HIF+ 5 Gy)。

## 1.7 流式细胞术 (FCM) 检测细胞凋亡

取生长期 SMMC-7721 细胞以  $1 \times 10^5$  /孔接种于 24 孔板, 24 h 后转染质粒, 转染 12 h 后进行乏氧培养, 36 h 后给予 5 Gy X 射线照射, 照后 48 h 收集细胞, 用 PBS 洗 2 次, 加 50  $\mu$ L RNase (10  $\mu$ g/mL) 和 200  $\mu$ L PI (5  $\mu$ g/mL), 4 °C 避光孵育 30 min, FACS 收取细胞 (每份样品收取  $1 \times 10^4$  细胞), 用 Cellquest 软件分析细胞凋亡, 结果以凋亡细胞百分率表示。

## 1.8 统计学分析

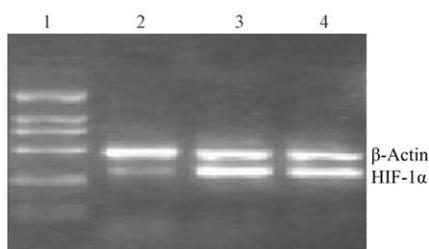
实验结果用 SPSS14.0 统计软件进行分析, 采用单因素方差分析进行检验,  $p < 0.05$  表示有统计学意义。

## 2 结果

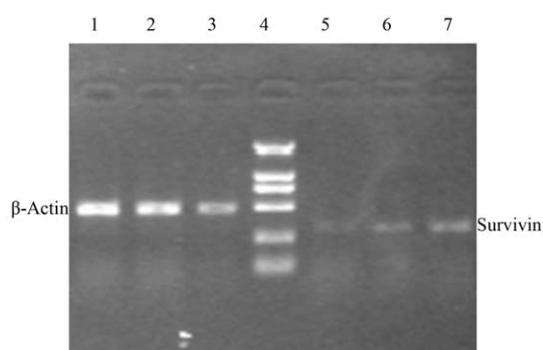
### 2.1 pGenesil-Survivin-HIF 对乏氧 SMMC-7721 细胞 HIF-1 $\alpha$ 和 Survivin 基因 mRNA 表达的干扰作用

转染双基因干扰质粒 pGenesil-Survivin-HIF 的 SMMC-7721 细胞经乏氧培养 36 h 后, 相应的 HIF-1 $\alpha$

和 Survivin 基因的 mRNA 表达水平与对照和阴性干扰组相比明显降低 ( $p < 0.05$ ), 表明所构建的 pGenesil-Survivin-HIF-1 $\alpha$  能同时有效地干扰 HIF-1 $\alpha$  和 Survivin 基因的 mRNA 表达 (见图 1 和图 2)。



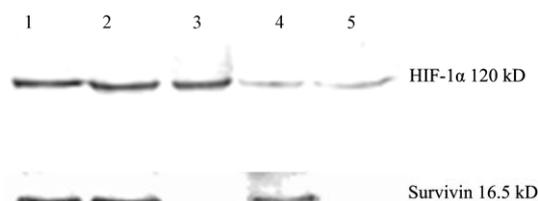
**Fig.1** HIF-1 $\alpha$  mRNA expression in hypoxic SMMC-7721 cells after transfecting pGenesil-Survivin-HIF  
1. DL 2000 Marker; 2. pGenesil-Survivin-HIF;  
3. pGenesil-negative; 4. Control



**Fig.2** Survivin mRNA expression in hypoxic SMMC-7721 cells after transfecting pGenesil-Survivin-HIF  
1 and 5. pGenesil-Survivin-HIF; 2 and 6. pGenesil-negative; 3 and 7. Control; 4. DL 2000 Marker

## 2.2 转染干扰质粒后乏氧 SMMC-7721 细胞 HIF-1 $\alpha$ 和 Survivin 蛋白的表达

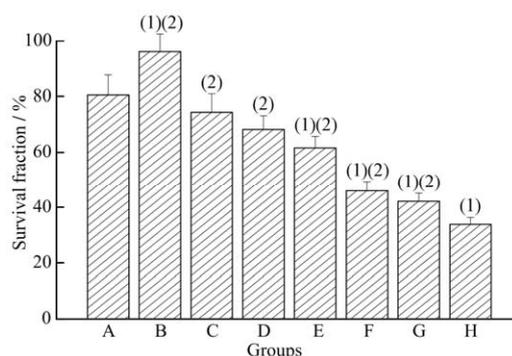
SMMC-7721 细胞分别转染重组质粒 pGenesil-negative、pGenesil-Survivin、pGenesil-HIF 和 pGenesil-Survivin-HIF 12 h 后进行乏氧培养, 36h 后以 Western blot 法检测 HIF-1 $\alpha$  和 Survivin 蛋白的表达, 结果见图 3, 对照组和阴性干扰组均可检测到 HIF-1 $\alpha$  和 Survivin 蛋白的表达, Survivin 干扰组和 HIF-1 $\alpha$  干扰组分别只检测到 HIF-1 $\alpha$  和 Survivin 蛋白的表达, 双干扰组未检测到 HIF-1 $\alpha$  和 Survivin 蛋白的表达, 表明所构建的单、双干扰质粒可有效地干扰乏氧 SMMC-7721 细胞 HIF-1 $\alpha$  和 Survivin 基因的蛋白表达。



**Fig.3** HIF-1 $\alpha$  and Survivin protein expression in hypoxic SMMC-7721 cells after transfection  
1. Control; 2. pGenesil-negative; 3. pGenesil-Survivin;  
4. pGenesil-HIF; 5. pGenesil-Survivin-HIF

## 2.3 RNA 干扰沉默 HIF-1 $\alpha$ 和 Survivin 基因联合 X 射线照射对乏氧 SMMC-7721 细胞体外增殖活性的影响

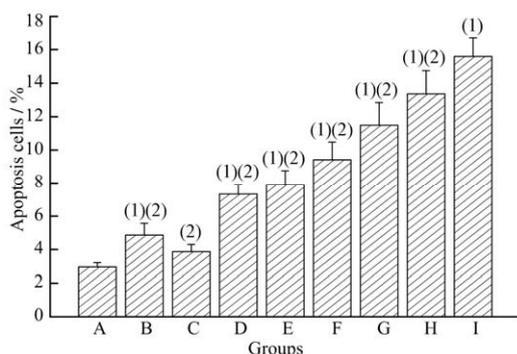
各组细胞于照射后 48 h 用 MTT 法检测细胞存活分数, 结果见图 4。双干扰组, 单、双干扰联合放疗组存活分数较照射组明显降低 ( $p < 0.01$ ), 双干扰联合放疗组存活分数较其它组明显降低 ( $p < 0.01$ ), 约为阴性干扰组的 35%。



**Fig.4** Effects of RNAi targeting HIF-1 $\alpha$  and Survivin genes combined with X-ray irradiation on survival fraction of hypoxic SMMC-7721 cells *in vitro*  
A. 5Gy; B. pGenesil-negative; C. pGenesil-Survivin; D. pGenesil-HIF; E. pGenesil-Survivin-HIF; F. pGenesil-Survivin+5 Gy; G. pGenesil-HIF+5 Gy; H. pGenesil-Survivin-HIF+5 Gy  
 $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ , <sup>(1)</sup>  $p < 0.01$ , vs. 5Gy; <sup>(2)</sup>  $p < 0.01$ , vs. pGenesil-Survivin-HIF+5 Gy

## 2.4 RNA 干扰沉默 HIF-1 $\alpha$ 和 Survivin 基因联合 X 射线照射对乏氧 SMMC-7721 细胞凋亡的影响

各组细胞于照射后 48 h 用流式细胞术检测细胞凋亡, 结果见图 5, 照射组, 单、双干扰组, 单、双干扰联合放疗组凋亡细胞百分数较对照组明显升高 ( $p < 0.01$ ), 双干扰联合放疗组凋亡细胞百分数较其它组明显升高 ( $p < 0.01$ )。



**Fig.5** Effects of RNAi targeting HIF-1 $\alpha$  and Survivin genes combined with X-ray irradiation on apoptosis of hypoxic SMMC-7721 cells *in vitro*

A. Control; B. 5 Gy; C. pGenesil-negative; D. pGenesil-Survivin; E. pGenesil-HIF; F. pGenesil-Survivin-HIF; G. pGenesil-Survivin+5 Gy; H. pGenesil-HIF+5 Gy; I. pGenesil-Survivin-HIF+5 Gy.

$\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ , <sup>(1)</sup>  $p<0.01$ , vs. Control; <sup>(2)</sup>  $p<0.01$ , vs. pGenesil-Survivin-HIF+5 Gy

### 3 讨论

乏氧是实体瘤的一个重要病理特征, 是肿瘤细胞恶性增殖与血液供应失衡的结果。乏氧的存在使肿瘤细胞的一些基因转录活性发生改变, 其表达产物的变化使肿瘤细胞在适应乏氧微环境的同时, 引起肿瘤自身的侵袭性和对放化疗的抗拒性增强, 在这个过程中转录因子 HIF-1 起着中枢纽带作用, HIF-1 发挥作用主要是由 HIF-1 $\alpha$  亚基的表达和活性决定的。乏氧诱导 HIF-1 $\alpha$  转录, HIF-1 $\alpha$  通过专一核定位信号转入核内快速积聚, 稳定性增加, 与靶基因启动子序列中的乏氧反应元件 (Hypoxia response element, HRE) 结合调控其表达。鉴于 HIF-1 $\alpha$  在肿瘤细胞乏氧耐受机制中所起的主导作用, 阻断 HIF-1 $\alpha$  表达成为靶向杀伤乏氧肿瘤细胞的重要策略<sup>[3]</sup>。Xiuwu 等<sup>[4]</sup>向裸鼠体内移植的结肠癌肿瘤局部注射靶向 HIF-1 $\alpha$  的 siRNA, 注射后 24 h 肿瘤局部给予 6 Gy X 射线照射, 结果发现 siRNA 联合放疗组肿瘤生长速率明显低于 siRNA 治疗组和空载体联合放疗组, 提示靶向 HIF-1 $\alpha$  的 siRNA 治疗与放疗相结合可发挥协同抑瘤效应, 取得优于单纯应用 siRNA 治疗与放疗的抗肿瘤作用。

研究表明<sup>[5-7]</sup>, 乏氧条件下 HIF-1 $\alpha$  可上调 Survivin 表达, 进而抑制乏氧肿瘤细胞凋亡, 提高辐射抗性, 抑制 Survivin 基因表达可明显提高肿瘤细胞的放射敏感性。Survivin 是 1997 年由美国的 Ambrosini 发现的一种细胞凋亡抑制因子, Survivin 主要通过 3 种方式直接或间接抑制 Caspase 活性而

抗凋亡: (1) 直接结合 caspase-9, 从而抑制其活性; (2) 可与辅助性线粒体源性 caspase 激活因子 (Second mitochondria-derived activator of caspase, SMAC) 结合, 保护凋亡抑制蛋白 (Inhibitor of apoptosis, IAP) 家族成员免受其抑制; (3) 增强 IAP 家族成员功能, 对抗 SMAC 作用<sup>[8]</sup>。由于 Survivin 表达几乎见之于所有人类常见恶性肿瘤组织, 且能抑制肿瘤细胞凋亡, Survivin 已经成为倍受关注的抗肿瘤治疗的靶点<sup>[9]</sup>。

本研究利用双靶向 HIF-1 $\alpha$  和 Survivin 基因的 RNA 干扰载体, 采用阳离子脂质体介导法转染 SMMC-7721 细胞, 经乏氧培养 36h 后, 分别以 RT-PCR 和 Western blot 法检测 HIF-1 $\alpha$  和 Survivin 基因 mRNA 和蛋白表达, 结果表明该质粒可有效地干扰乏氧 SMMC-7721 细胞 HIF-1 $\alpha$  和 Survivin 基因的 mRNA 和蛋白表达。分别以 MTT 法和流式细胞术检测细胞存活分数和细胞凋亡, 结果表明单、双干扰联合放疗组存活分数较照射组明显降低, 而凋亡细胞百分数较对照组明显升高, 且双干扰联合放疗组体外抑瘤效应明显优于单干扰联合放疗组, 提示双靶向 HIF-1 $\alpha$  和 Survivin 基因的 RNA 干扰治疗联合放疗是一种有效的靶向乏氧肿瘤细胞联合治疗模式, 将进一步探讨其体内抑瘤效应。

### 参考文献

- 1 Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. *Gene Ther*, 2008, **15**(8): 572-582
- 2 Williams N S, Gaynor R B, Scoggin S, *et al.* *Clin Cancer Res*, 2003, **9**(3): 931-946
- 3 Gillespie D L, Whang K, Ragel B T, *et al.* *Clin Cancer Res*, 2007, **13**(8): 2441-2448
- 4 Xiuwu Zhang, Takashi Kon, He Wang, *et al.* *Cancer Res*, 2004, **64**(22): 8139-8142
- 5 Bache M, Holzapfel D, Kappler M, *et al.* *Gynecol Oncol*, 2007, **104**(1): 139-144
- 6 Rodel C, Haas J. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2003, **55**(5): 1341-1347
- 7 Chang Q, Qin R, Huang T, *et al.* *Pancreas*, 2006, **32**(3): 297-305
- 8 A Molla, M Delacour-Larose, A Valette, *et al.* *Euro J Cancer Supple*, 2008, **6**(9): 35-36
- 9 Aki Ogura, Yasuko Watanabe, Daisuke Iizuka, *et al.* *Cancer Lett*, 2008, **259**(1): 71-81

## Anti-tumor effect of silencing Hif-1 $\alpha$ and Survivin genes combined with X-ray irradiation on hypoxic tumor cells *in vitro*

YANG Wei<sup>1</sup> LI Yanbo<sup>2</sup> ZHAO Jingguo<sup>3</sup> GONG Shouliang<sup>2</sup> CAO Jianping<sup>1</sup> LIU Fenju<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(Department of Radiobiology, School of Radiological Medicine and Public Health, Soochow University, Suzhou 215123, China)

<sup>2</sup>(MH Radiobiology Research Unit, School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China)

<sup>3</sup>(Department of orthopedics, PLA 403th Hospital, Dalian 116015, China)

**ABSTRACT** In order to investigate the anti-tumor effect of RNA interference silencing HIF-1 $\alpha$  and Survivin genes combined with X-ray irradiation on hypoxic SMMC-7721 cells *in vitro*, we detected mRNA and protein expression of HIF-1 $\alpha$  and Survivin genes in hypoxic SMMC-7721 cells after transfection with pGenesil-Survivin-HIF carried by liposome by RT-PCR and Western blot respectively. Survival fraction and apoptosis of hypoxic SMMC-7721 cells *in vitro* were detected by MTT and FCM assay respectively. The results show that mRNA expression of HIF-1 $\alpha$  and Survivin genes in hypoxic SMMC-7721 cells transfected with pGenesil-Survivin-HIF is significantly lower than that of control and negative interference group ( $p < 0.05$ ). Protein expression of HIF-1 $\alpha$  and Survivin genes in hypoxic SMMC-7721 cells after transfection with pGenesil-Survivin-HIF can not be detected. Survival fraction of pGenesil-Survivin+5 Gy group, pGenesil-HIF+5 Gy group and pGenesil-Survivin-HIF+5 Gy group is significantly lower than that of 5 Gy group ( $p < 0.01$ ). Survival fraction of pGenesil-Survivin-HIF+5 Gy group is also significantly lower than that of other groups ( $p < 0.01$ ). Percentage of apoptosis of pGenesil-Survivin+5 Gy group, pGenesil-HIF+5 Gy group and pGenesil-Survivin-HIF+5 Gy group is significantly higher than that of control group ( $p < 0.01$ ). Percentage of apoptosis fraction of pGenesil-Survivin-HIF+5 Gy group is significantly higher than that of other groups ( $p < 0.01$ ). These results can be suggested that the pGenesil-Survivin-HIF could silence mRNA and protein expression of HIF-1 $\alpha$  and Survivin genes in hypoxic SMMC-7721 cells. Anti-tumor effect of pGenesil-Survivin-HIF+5 Gy group is more powerful than that of pGenesil-Survivin+5 Gy group or pGenesil-HIF+5 Gy group with hypoxic SMMC-7721 cells *in vitro*.

**KEYWORDS** RNA interference, X-ray, HIF-1 $\alpha$ , Survivin

**CLC** R730.54, R730.55, R735.7, R811.5