

Survivin siRNA 纳米载体的制备及其对胰腺癌细胞生物学特性的影响

潘新亭¹ 朱青云² 吴力群¹ 赵志惠³ 曹景玉¹ 王祖森¹ 胡维昱¹ 韩冰¹

青岛大学医学院附属医院 ¹肝胆外科 ²超声科 (山东 青岛 266003)

³青岛大学 纳米新材料重点实验室 (山东 青岛 266003)

【摘要】目的:利用纳米技术和基因干扰技术设计并合成携带 survivin siRNA 的纳米载体,探讨 survivin siRNA 纳米微粒对人胰腺癌细胞 BXPc-3 增殖和凋亡的影响。方法:体外培养人胰腺癌 BXPc-3 细胞,将 BXPc-3 细胞随机分为4组:生理盐水组、不含基因的纳米微粒组、survivin siRNA 组和 survivin siRNA 纳米微粒组。RT-PCR 检测 survivin mRNA 的表达,Western blot 法检测 survivin 蛋白的表达;流式细胞仪检测细胞凋亡情况,MTT 法检测细胞增殖情况。结果:细胞培养 72 h 后,survivin siRNA 纳米微粒组细胞的 survivin mRNA 和蛋白表达均低于其他3组($P<0.05$)。survivin siRNA 纳米微粒组细胞增殖明显受抑制,生长缓慢,而细胞凋亡率高于其他3组($P<0.05$)。结论:survivin siRNA 纳米微粒能够有效减少胰腺癌 BXPc-3 细胞 survivin mRNA 和蛋白的表达,提高肿瘤细胞的凋亡,显著抑制 BXPc-3 细胞的增殖。

【关键词】纳米载体·RNA 干扰·Survivin·细胞增殖·细胞凋亡·胰腺肿瘤

【中图分类号】R735.9

【文献标识码】A doi:10.3969/j.issn.1009-9905.2012.04.001

【文章编号】1009-9905(2012)04-0253-05

Inhibitory effect of small interference RNA targeting survivin nanospheres on human pancreatic carcinoma BXPc-3 cell growth

PAN Xin-ting¹, ZHU Qing-yun², WU Li-qun¹, ZHAO Zhi-hui³, CAO Jing-yu¹, WANG Zu-sen¹, HU Wei-yu¹, HAN Bing¹

¹Department of Hepatobiliary Surgery, ²Department of Ultrasound, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University(Qingdao 266003, China)

³Nano New Material Key Laboratories of Qingdao University(Qingdao 266003, China)

【基金项目】中国博士后科学基金资助项目(2011M500697)

【作者简介】潘新亭(1974-09~),男,山东青州人,博士,研究方向:胰腺癌的基础与临床。

Tel:15806559602 E-mail:0536pxt@163.com

【通讯作者】吴力群(1958-10~),男,山东青岛人,博士,教授,研究方向:肝胆胰腺外科。

Tel:13589268689 E-mail:wulq5810@126.com

[ABSTRACT] Objective: To used nanotechnology and gene interference to block survivin expression in pancreatic carcinoma cell and to study the inhibitory effect of small interference RNA targeting survivin nanospheres on the proliferation and apoptosis of human pancreatic cancer BXPc-3 cells.

Methods: Human pancreatic cancer BXPc-3 cells cultured in vitro were assigned into four groups: saline, gene-free nanospheres, siRNA-survivin and siRNA-survivin nanospheres groups. Survivin mRNA expression was detected by RT-PCR; Survivin protein expression was detected by Western blot; Apoptosis of BXPc-3 cells was determined by flow cytometry; BXPc-3 cells growth was examined by MTT. **Results:** At 72 hours after treatment, both survivin mRNA expression and survivin protein expression in the siRNA-survivin nanospheres group were significantly less than other three groups ($P<0.05$). BXPc-3 cell growth was remarkably inhibited in the siRNA-survivin nanospheres group, but apoptotic rate was significantly greater than other three groups ($P<0.05$). **Conclusion:** siRNA-survivin nanospheres can specifically reduce both survivin mRNA and survivin protein expressions in human pancreatic cancer BXPc-3 cells, significantly increase tumor cell apoptosis, and remarkably inhibit BXPc-3 cell proliferation.

[KEY WORDS] Nanocarrier · RNA interference · Survivin · Cell proliferation · Cell apoptosis · Pancreatic neoplasms

生存素 (survivin) 是细胞凋亡抑制蛋白 (inhibitors of apoptosis protein, IAP) 家族成员之一, 与肿瘤的发生发展关系密切, 是胰腺癌基因治疗的潜在靶点。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术是一种靶向沉默基因的方法, 能够准确对目标基因进行调控, 封闭目标基因的表达, 因其调控基因表达具有高度选择性与特异性, 近年来该技术已成为肿瘤基因治疗的一个研究热点。纳米技术被认为是 21 世纪最重要的一个科技领域, 纳米微粒作为一种理想的非病毒基因载体, 具有无免疫原性和致癌性等优越性, 在基因传递方面具有显著优势。本研究以纳米微粒为基因载体, survivin 为靶点, 采用 RNAi 技术, 抑制人胰腺癌细胞生长, 促进肿瘤细胞的凋亡, 为靶向基因治疗胰腺癌提供新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料 人胰腺癌 BXPc-3 细胞株 (中科院上海细胞库); survivin 小干扰 RNA (siRNA, 上海生物工程公司合成); RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒 (Takara 公司); Western blot 试剂盒、MTT、Annexin V/PI 检测试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); 小牛血清 (杭州四季青公司); RPMI-1640 培养基、胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); 鼠抗人 survivin 多克隆抗体 (美国 Santa 公司); 纳米制备材料聚乳酸-羟基乙酸 [poly (lactic-co-glycolic acid), PLGA]、泊洛沙姆 (poloxamer) F68 (济南岱罡生物科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 制备包载 survivin siRNA 的纳米载体 按乳

剂溶解扩散法制备 PLGA/poloxamer 纳米载体^[1-2]: 将一定质量的 PLGA 和 poloxamer 溶解在 2 mL 二氯甲烷中, 将含 500 μg siRNA 的质粒 (加入的质粒的量为 PLGA 和 poloxamer 聚合物的 1%~2%) 加入去离子水中, 使最终体积为 200 μL , 而后将质粒溶解物加入二氯甲烷混合溶液中涡漩搅拌。将获得的乳浊液快速倒入 25 mL 无水乙醇, 而后将溶液加入 25 mL 去离子水中并搅拌 10 min。30 $^{\circ}\text{C}$ 真空中旋转蒸发去除乙醇及二氯甲烷, 用 15 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 1 h 后将纳米微粒收集。扫描电子显微镜观察纳米粒子的表面形态。

1.2.2 细胞培养 人胰腺癌 BXPc-3 细胞株用含体积分数为 15% 的小牛血清、100 U 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中进行培养, 0.25% 胰蛋白酶消化传代。细胞融合 70%~80% 时进行转染。

1.2.3 细胞转染 在细胞对数生长期, 经胰酶消化, 用 RPMI-1640 培养液重新悬浮, 细胞计数后以 1×10^5 /孔铺入 96 孔培养板中。将细胞分为 4 组, 分别用生理盐水、不含基因的纳米微粒、survivin siRNA 及 survivin siRNA 纳米微粒处理, 每组 6 个平行孔。survivin siRNA 的处理浓度为 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱内培养, 72 h 后提取样本检测。

1.2.4 RT-PCR 检测 survivin mRNA 表达 使用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 合成 cDNA。PCR 扩增 survivin, 以 GAPDH 作为内参照。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 35 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延

伸 50 s,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外光下显影拍照。通过 Quantity One 图像分析仪扫描电泳条带进行图像分析。

1.2.5 Western blot 检测蛋白表达 4 种不同方法处理后的细胞经胰酶消化、PBS 漂洗后,加细胞裂解液并煮沸提取总蛋白,紫外分光光度计法进行蛋白定量,取 50 μg 蛋白进行 8% SDS-PAGE 凝胶电泳,转移至聚二氟乙烯膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,1% 脱脂牛奶稀释孵育一抗 4 °C 过夜,稀释孵育二抗 37 °C 1 h,暗室显影,拍照。

1.2.6 MTT 法检测细胞增殖 分别收集处于对数生长期的各组细胞,于 96 孔培养板中接种 200 μL 细胞悬液(约 4 000 个细胞/孔);37 °C、5% CO₂ 培养箱及饱和湿度条件下培养,每组接种 6 孔,分别于 12、24、36、48、72 h 后加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μL,继续培养 4 h,吸去上清后每孔加入二甲基亚砜 200 μL,振荡 10 min,在酶标仪上读取 595 nm 处吸光度值。

1.2.7 流式细胞术检测凋亡细胞 (Annexin-V/PI 双标记法) 各组细胞先用 0.25% 胰酶消化,收集细胞悬液,离心,弃上清,细胞用 PBS 洗 3 次,调整细胞浓度为 1×10⁹ L⁻¹,加入 FITC 标记的 Annexin_V 10 μL,室温避光 30 min,再加入 PI 5 μL,避光反应 5 min,上流式细胞仪检测。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件包进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差分析(One-way ANOVA),组间比较采用 *t* 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 观察包载 survivin siRNA 的纳米粒子表面形态 在扫描电子显微镜下观察纳米颗粒的形态结构,粒径为 160~220 nm,大小均匀,纳米微粒表面呈圆形,包封完好(图 1)。

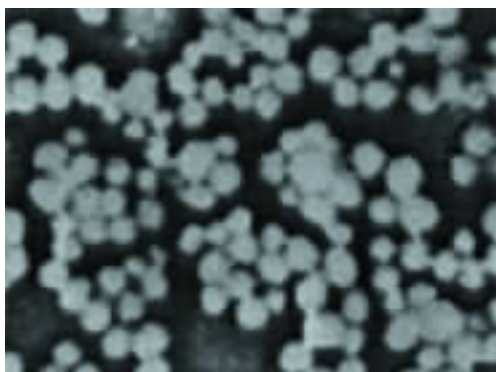


图 1 扫描电子显微镜下包载 survivin siRNA 的纳米微粒(×20 000)

2.2 siRNA 对胰腺癌细胞 survivin mRNA 和蛋白表达的影响 处理后 72 h 检测各组胰腺癌细胞 survivin mRNA 和蛋白的表达量发现,survivin siRNA 组 mRNA 和蛋白表达量明显低于生理盐水组和单纯纳米微粒组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而 survivin siRNA 纳米微粒组的 survivin mRNA 和蛋白表达量与其他 3 组比较,表达量最低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$,图 2、3)。

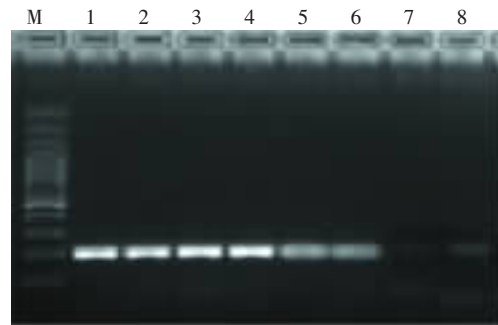


图 2 RT-PCR 检测各组胰腺癌 BXPC-3 细胞 survivin mRNA 表达

M:Marker;1,2:生理盐水组;3,4:单纯纳米微粒组;5,6:survivin siRNA 组;7,8:survivin siRNA 纳米微粒组

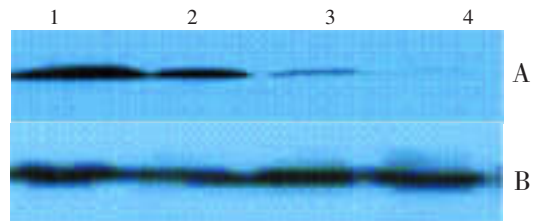


图 3 Western blot 法检测各组胰腺癌 BXPC-3 细胞 survivin 蛋白表达

A:1,生理盐水组;2,单纯纳米微粒组;3,survivin siRNA 组;4,survivin siRNA 纳米微粒组;B:β-actin

2.3 MTT 法检测细胞增殖 从 12 h 开始后的每一个检测时间,survivin siRNA 组、survivin siRNA 纳米微粒组细胞的吸光度值显著低于生理盐水组和单纯纳米微粒组,其中 survivin siRNA 纳米微粒组与其他 3 组之间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$,图 4)。

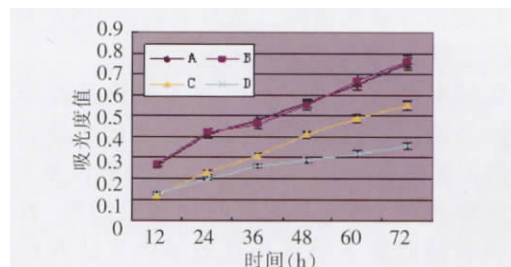
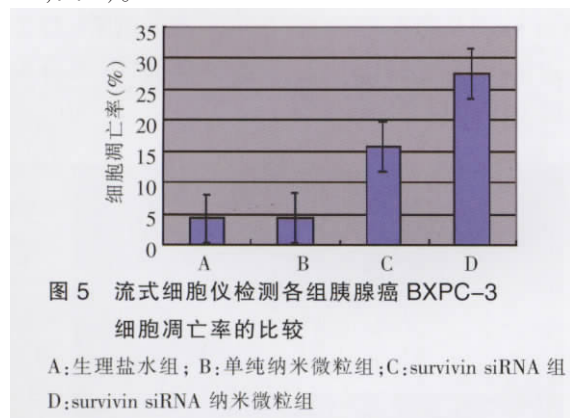


图 4 MTT 检测各组胰腺癌 BXPC-3 细胞的增殖情况

A:生理盐水组;B:单纯纳米微粒组;C:survivin siRNA 组;D:survivin siRNA 纳米微粒组

2.4 survivin siRNA 纳米微粒对胰腺癌 BXPC-3 细胞凋亡的影响 生理盐水组、单纯纳米微粒组、sur-

vivin siRNA 组和 survivin siRNA 纳米微粒组细胞凋亡率分别为 $(4.21 \pm 0.32)\%$ 、 $(4.38 \pm 0.29)\%$ 、 $(15.72 \pm 3.12)\%$ 、 $(27.57 \pm 4.25)\%$ ，其中 survivin siRNA 纳米微粒组与其他 3 组比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 5)。



3 讨论

survivin 基因在胰腺癌的发生、发展中起非常重要的作用,许多研究已经表明 survivin 在胰腺癌组织中高表达,其表达水平与胰腺癌细胞增殖和凋亡密切相关,并且与胰腺癌的分化程度、淋巴结转移相关;研究还表明,survivin 具有抑制细胞凋亡、调控细胞周期、影响有丝分裂过程等生物学作用,并且随着 survivin 蛋白表达的增加,肿瘤细胞也表现一定的辐射耐受性及化学药物耐受性^[3-5]。因此,survivin 成为具有潜在价值的胰腺癌治疗新靶点,沉默该基因可能对胰腺癌细胞生物学行为产生重要影响。

RNAi 是由双链 RNA 介导的转录后基因沉默现象,它通过将双链 RNA 导入细胞后,在 Dicer 酶的作用下产生有活性的 siRNA,引起与该段 RNA 同源的 mRNA 产生特异性降解,从而导致特异基因的转录后基因沉默现象^[6-7]。由于 RNAi 具有高特异性、高效快速等特点,已成为目前基因功能、基因治疗研究的重要技术手段。Uprichard 等^[8]利用腺病毒做 siRNA 载体,设计针对乙型肝炎病毒 RNA 的 siRNA,在体外成功清除乙型肝炎病毒 RNA 并抑制其复制达数天,获得了理想的实验效果。

如何准确高效地将基因导入细胞是肿瘤基因治疗的关键,同时基因治疗应避免基因载体输入人体后对正常细胞产生不良影响。纳米载体是新型的药物缓释系统,具有无免疫原性和致瘤性,有较高的基因转移效率,可延长目的基因表达及作用时间,保护目的基因不易被破坏等优点^[9-10]。本研究所用纳米材料的终产物为 H₂O 和 CO₂,理论上对细胞无任何毒副作用,还能够控制基因释放,延长基因表达时间。

本研究成功构建了携载靶向 survivin 基因的

siRNA 纳米载体,并将 survivin siRNA 导入胰腺癌 BxPC-3 细胞,结果显示 survivin siRNA 对胰腺癌细胞 survivin mRNA 和蛋白表达有明显的抑制作用,胰腺癌细胞行 siRNA 处理后,mRNA 和蛋白表达水平显著下降,survivin siRNA 纳米微粒转染组较其他处理组的基因表达显著降低 ($P < 0.05$),说明纳米微粒能够有效转染 siRNA 进入胰腺癌 BxPC-3 细胞从而发挥基因沉默作用。

目前认为 survivin 是作用最强的凋亡抑制因子,主要通过直接抑制 caspase 级联反应下游的终末子 caspase-3, caspase-7 的活性而发挥抗凋亡作用^[11-12]。本研究 MTT 结果显示,survivin 基因沉默后肿瘤细胞生长速度显著低于对照组 ($P < 0.05$);流式细胞术结果也显示,survivin siRNA 纳米转染组较其他处理组的细胞凋亡数显著增加 ($P < 0.05$),说明 survivin 基因沉默促进了胰腺癌细胞的凋亡,提示 survivin 可能与胰腺癌细胞的凋亡密切相关。

利用纳米技术和基因干扰技术阻断 survivin 在胰腺癌细胞内的表达,能够下调人胰腺癌 BxPC-3 细胞 survivin mRNA 和蛋白水平,促进胰腺癌 BxPC-3 细胞凋亡,从而高效抑制 BxPC-3 细胞生长,为临床靶向 survivin 治疗胰腺癌提供了理论基础,理论上成为能够抑制胰腺癌细胞生长的有效方法。

参 考 文 献

- [1] Parajó Y, d'Angelo I, Horváth A, et al. PLGA: poloxamer blend micro- and nanoparticles as controlled release systems for synthetic proangiogenic factors[J]. Eur J Pharm Sci, 2010,41(5):644-649.
- [2] Luo G, Jin C, Long J, et al. RNA interference of MBD1 in BxPC-3 human pancreatic cancer cells delivered by PLGA-poloxamer nanoparticles[J]. Cancer Biol Ther, 2009,8(7):594-598.
- [3] Sarela AI, Verbeke CS, Ramsdale J, et al. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma[J]. Br J Cancer, 2002,86(6):886-892.
- [4] Lee MA, Park GS, Lee HJ, et al. Survivin expression and its clinical significance in pancreatic cancer[J]. BMC Cancer, 2005,5:127.
- [5] Guan HT, Xue XH, Dai ZJ, et al. Down-regulation of survivin expression by small interfering RNA induces pancreatic cancer cell apoptosis and enhances its radiosensitivity[J]. World J Gastroenterol, 2006,12(18):2901-2907.
- [6] Baker M. RNA interference: Homing in on delivery [J]. Nature, 2010,464(7292):1225-1228.
- [7] Song H, Zhang Z, Wang L. Small interference RNA against PTP-1B reduces hypoxia/reoxygenation induced apoptosis of rat cardiomyocytes[J]. Apoptosis, 2008,13(3):383-393.
- [8] Uprichard SL, Boyd B, Althage A, et al. Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005,102(3):773-778.
- [9] Blanco E, Hsiao A, Mann AP, et al. Nanomedicine in cancer therapy: innovative trends and prospects[J]. Cancer Sci, 2011,102(7):1247-1252.

[10] McNeeley KM, Karathanasis E, Annapragada AV, et al. Masking and triggered unmasking of targeting ligands on nanocarriers to improve drug delivery to brain tumors [J]. *Biomaterials*, 2009,30(23-24):3986-3995.
 [11] Cheung CH, Chen HH, Kuo CC, et al. Survivin counteracts the therapeutic effect of microtubule de-stabilizers by stabilizing tubulin polymers[J]. *Mol Cancer*, 2009,8:43.

[12] Kappler 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.

(收稿日期:2011-12-22)

(本文编辑:周立波)

【文章编号】1009-9905(2012)04-0257-01
 doi:10.3969/j.issn.1009-9905.2012.04.002

结节性甲状腺肿合并甲状腺微小癌 23 例临床分析

王峰 马煜

辽宁省铁岭市中医院 普通外科 (辽宁 铁岭 112000)

结节性甲状腺肿是常见外科疾病,病因复杂,且多病并存。其中合并慢性甲状腺炎占首位,其次为腺瘤样结节、孤立性假囊肿、甲状腺癌^[1]。近年来随着影像学技术的运用及公众常规体检意识的提高,甲状腺结节病例得以早期发现,临床发病率呈逐年上升的趋势,合并甲状腺微小癌(thyroid microcarcinoma, TMC)的病例也随之增多。由于缺乏特异临床表现,结节性甲状腺肿与TMC结节易混淆,诊断困难。本文回顾性分析2006年8月—2011年8月我科收治的23例结节性甲状腺肿合并TMC患者的临床资料,结合文献对其临床特点、诊断及治疗等进行总结。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2006年8月—2011年8月我科收治结节性甲状腺肿病例1783例,其中结节性甲状腺肿合并TMC 23例,占1.29%(23/1783)。男4例,女19例,男女比例1:4.7;年龄37~71岁,中位年龄47岁。所有病例均无声嘶、气促和吞咽困难等临床症状。未触及明显甲状腺内结节,无颈部淋巴结肿大。23例均为体检过程中影像学检查发现,其中双侧多发结节13例,单侧多发结节10例。经1~3次高分辨率彩色超声检查,疑有恶变入院行手术治疗。23例患者均无甲状腺功能亢进、桥本甲状腺炎等其他甲状腺疾病。彩色多普勒超声检查显示所有病例结节内有细小钙化点和(或)形态不规则,其中13例结节内部血流信号 级,5例 级。所有病例术前均未行细针穿刺细胞学检查。

1.2 手术方法 单叶多发结节者行患侧叶全(近全)切除术,双侧多发结节者行双侧叶全(近全)切除+峡部切除术。20例术中快速冰冻切片报告发现TMC, 加行中央区淋巴结清除术。余3例术中快速冰冻切片未发现TMC, 术后连续病理切片证实为TMC。1例由于肿瘤表面有正常腺体组织覆盖,未侵透包膜,无淋巴结转移,未追加二次手术;1例术后1周追加相应手术;1例放弃再次手术。

2 结果

所有病例术后病理学检查均诊断为结节性甲状腺肿合并TMC。TMC直径≤5 mm者12例(52.2%), >5 mm者11例(47.8%)。21例有包膜。2例可见癌细胞浸润或侵透包膜,乳

头状癌21例,滤泡状癌2例。20例术中快速冷冻切片确诊TMC中1例发现淋巴结转移。术后性声音嘶哑1例,15 d基本恢复。所有病例均获随访,随访时间1~4年。随访期间无死亡病例,手术治疗病例无复发,无淋巴结转移。

3 讨论

临床流行病学调查显示,甲状腺可触及结节的发病率为4%~7%,其实际发生率可能更高,尸检发现50%以上患有甲状腺结节^[1]。随着影像学技术的不断提高及常规体检的普及,甲状腺疾病早期检出病例逐渐增多。笔者收集的2006年8月以后病例资料显示,结节性甲状腺肿合并TMC 23例,占有病例的1.29%。23例患者均没有明显的临床症状,体检中未扪及结节,由影像学检查筛查出。由于影像学诊断出的可疑病例手术指征不明显,故如何为此类患者提供一个合理的诊疗方案成为临床医生面临的问题。此类病例的诊断主要依靠影像学检查。超声有助于术前确定可疑病例,提高术中术后诊断准确率^[2]。

有研究认为超声引导下穿刺行针吸细胞学检查是确定甲状腺结节良恶性的最好办法^[3]。但许多临床医生认为针吸活检往往难以取得满意的穿刺结果^[4-5],即使影像科室与经验丰富的病理医师配合,仍然有10%左右的误诊率,有时还要重复多角度穿刺检查,增加血肿、喉返神经及气管损伤的风险。本组病例均未做此项检查。

TMC由于病灶微小隐匿,常在甲状腺其他疾病手术时被发现,诊断较困难,容易漏诊。本组术后病理诊断显示微小癌直径≤5 mm者占79.2%,因此要求医生在术中仔细探查以减少漏诊。同时,术中术后的病理检查也可提高阳性率^[6-7]。有文献报道仅1 mm的TMC病灶在病理检查时被发现^[8]。本组3例术中快速冰冻切片未发现TMC的病例于术后连续病理切片证实。

TMC分为硬化型或非硬化型。硬化型患者多数可终生维持原状,非硬化型则可能发展成为进展性癌。目前对TMC的治疗存有争议。临床上体检不可触及且不伴甲亢等症状、仅影像学检出结节性甲状腺肿的患者,多数选择保守治疗或持

(下转第 286 页)