

ShRNA-survivin 基因对肝癌 Huh7 细胞增殖、迁移和凋亡的影响

林海华¹ 余玉红¹ 张绍敏¹ 陈出新¹ 刘国军² 张丽²

(1 深圳市盐田区人民医院消化内科,广东 深圳 518000; 2 鄂东医疗集团黄石市中心医院(湖北理工学院附属医院)肿瘤外科)

[摘要] 目的 探讨生存素(survivin)基因对肝癌 Huh7 细胞增殖、迁移和凋亡的影响。方法 将肝癌细胞分为空白对照组(A组)、空白载体病毒组(B组)和 ShRNA-survivin 慢病毒组(C组),构建 ShRNA-survivin 慢病毒载体,通过 RT-qPCR 检测凋亡因子半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9(Caspase-9)以及 Caspase-3 mRNA 的表达量;通过 CCK-8 实验检测肝癌 Huh7 细胞增殖能力;通过 Transwell 小室实验检测肝癌 Huh7 细胞迁移能力;通过 AV-PI 凋亡试剂盒检测肝癌 Huh7 细胞的凋亡情况。结果 A、B、C 组 survivin mRNA 的相对表达量分别为 1.000 ± 0.000 、 1.079 ± 0.011 、 0.421 ± 0.097 ,A、B 组与 C 组比较差异具有显著统计学意义($F=15.984$, $q=8.141,3.257$, $P<0.05$),Caspase-3 和 Caspase-9 的 mRNA 表达量与 survivin 的 mRNA 表达量趋势相同;A、B、C 组中透过分子筛的细胞数比较差异有显著性($F=31.982$, $P<0.05$);A、B 组与 C 组比较差异均有显著意义($q=7.153,9.074$, $P<0.05$);A、B、C 组细胞的增殖率比较差异有显著意义($F=23.983$, $P<0.05$);A、B 组与 C 组比较差异均有显著意义($q=10.322,9.886$, $P<0.05$);A、B、C 组细胞的凋亡率比较差异有显著意义($F=30.009$, $P<0.05$);A、B 组与 C 组比较差异均有显著意义($q=9.531,8.001$, $P<0.05$)。结论 ShRNA-survivin 对肝癌 Huh7 细胞的增殖、迁移有抑制作用,对细胞凋亡具有促进作用,可以作为肝癌的潜在治疗靶点。

[关键词] Survivin;凋亡抑制蛋白质类;肝肿瘤;细胞增殖;细胞运动;细胞凋亡;细胞系;肿瘤

[中图分类号] R735.7 **[文献标志码]** A

EFFECTS OF ShRNA-SURVIVIN GENE ON THE PROLIFERATION, MIGRATION, AND APOPTOSIS OF HEPATOMA HUH7 CELLS LIN Haihua, YU Yuhong, ZHANG Shaomin, CHEN Chuxin, LIU Guojun, ZHANG Li (Department of Gastroenterology, Shenzhen Yantian People's Hospital, Shenzhen 518000, China)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the effects of survivin gene on the proliferation, migration, and apoptosis of hepatoma Huh7 cells. **Methods** Hepatoma cells were divided into blank control group (A), empty lentivirus vector group (B), and ShRNA-survivin lentivirus vector group (C). A ShRNA-survivin lentivirus vector was constructed. RT-qPCR was used to determine the mRNA expression of Caspase-9 and Caspase-3. CCK-8 kit, Transwell chamber, and AV-PI apoptosis kit were used to evaluate the proliferation, migration, and apoptosis of hepatoma Huh7 cells, respectively. **Results** There were significant differences between groups A, B, and C in the relative expression of survivin mRNA (1.000 ± 0.000 vs 1.079 ± 0.011 vs 0.421 ± 0.097 , $F=15.984$, $q=8.141,3.257$, $P<0.05$). The mRNA expression of Caspase-3 and Caspase-9 exhibited the same trends as that of survivin. There was a significant difference in the number of cells passing through the molecular sieve between the three groups ($F=31.982$, $P<0.05$), especially between group A/B and group C ($q=7.153,9.074$, $P<0.05$); there was a significant difference in the proliferation rate of cells between the three groups ($F=23.983$, $P<0.05$), especially between group A/B and group C ($q=10.322,9.886$, $P<0.05$); there was also a significant difference in the apoptosis rate between the three groups ($F=30.009$, $P<0.05$), especially between group A/B and group C ($q=9.531,8.001$, $P<0.05$). **Conclusion** The shRNA-survivin can inhibit the proliferation and migration and promote the apoptosis of hepatoma Huh7 cells. It can be used as a potential therapeutic target for hepatocellular carcinoma.

[KEY WORDS] Survivin; Inhibitor of apoptosis proteins; Liver neoplasms; Cell proliferation; Cell movement; Apoptosis; Cell line, tumor

原发性肝癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一。研究表明,近年来原发性肝癌的发病率和致死率明显升高^[1-4]。探讨肝癌的发生发展机制,寻求新的分子治疗靶点是肝癌研究领域的重要任务。肝癌的发生是一长期过程,其中涉及到大量的基因及表

观遗传学的改变^[5-8]。尽管目前对肝癌发生及进展机制的研究已经取得了一定的进展,但其复杂的分子机制尚未完全阐明。生存素(survivin)是细胞抗凋亡基因家族的最小成员,也是目前已知的唯一抗凋亡蛋白,可通过影响半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9(Caspase-9)活性或者抑制 Caspase-3 的下游细胞凋亡共同通路而抑制细胞凋亡^[9-12]。本研究通过构建 ShRNA-survivin 慢病毒载体,探讨 survivin 基因对

肝癌 Huh7 细胞增殖、迁移和凋亡的影响,从而为临床上肝癌的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料来源

人肝癌细胞系 Huh7 细胞购自中科院上海细胞研究院。

1.2 试剂

胎牛血清(Gibco 公司,美国);DMEM 培养液以及 2.5 g/L 胰酶 Trypsin(Invitrogen 公司,美国);TRIZOL(Invitrogen 公司,美国);逆转录试剂盒(ABI Applied Biosystems 公司,美国);Real-time PCR 仪(Bio-Rad 公司,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 肝癌 Huh7 细胞培养 人肝癌细胞系 Huh7 细胞经离心收集以后,以 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度种植于 $25\text{ cm} \times 25\text{ cm}$ 大小的 Thermo Scientific 细胞培养瓶中,加入含体积分数 0.10 胎牛血清的 DMEM 培养液进行培养。

1.3.2 慢病毒 ShRNA-survivin 载体的构建 Survivin 基因慢病毒干扰 ShRNA-survivin 载体由上海吉凯公司合成,选择 pHBLV-U6-ZsGreen-PGK-Puro 作为质粒的克隆载体。过表达载体的克隆切入点为 XhoI/BamHI,编号为 ENST00000003569。经基因测序证实了序列的正确性。

1.3.3 肝癌 Huh7 细胞分组及干预 将第 5 代肝癌细胞分为空白对照组(A 组)、空白载体病毒组(B 组)和 ShRNA-survivin 慢病毒组(C 组)。A 组细胞未经过任何处理,B 组细胞经空白载体慢病毒转染,C 组细胞经 ShRNA-survivin 载体构建的慢病毒转染。利用 ZsGreen 慢病毒荧光探针于荧光显微镜下观察细胞慢病毒的转染效率。

1.3.4 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 Survivin、Caspase-3 和 Caspase-9 mRNA 的表达水平 3 组细胞融合率达 80% 后,经 2.5 g/L 胰蛋白酶消化后置入 15 mL 离心管中,加入 1 mL 的 Trizol RNA iso(Takara,日本),提取细胞总 RNA。根据 Takara 逆转录试剂盒说明书检测细胞总 RNA 纯度,在 1.9~2.0 范围为纯度良好。逆转录的 cDNA 保存于 4 ℃ 冰箱中备用。根据 TaKaRa 荧光定量 PCR 试剂盒的说明书要求,20 μL 的反应体系,加入各样品,进行荧光定量 PCR 的检测。采用 FS2000 系统对 PCR 进行分析,反应条件为:95 ℃ 预变性 30 s;然后 95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,总共进行 40 个循

环。溶解曲线:95 ℃ 5 s,60 ℃ 1 min。降温:50 ℃ 30 s,进行 1 个循环。内参基因 GAPDH、survivin、Caspase-3 和 Caspase-9 引物由上海生工生物工程有限公司生产。见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 的方法计算目的基因的相对表达量。

表 1 目的基因的引物序列

引物名称	引物序列	引物长度 (bp)
survivin	正义链 5'-TAACATTTCTGTCTTCAGAGCG-3'	27
	反义链 5'-ATTGTAACCGTTTCTGGTTTGC-3'	
Caspase-3	正义链 5'-CAAGAGGTCCTGTCTTCAGATGA-3'	32
	反义链 5'-TCTGTTTCCGTTTCTGGTTC-3'	
Caspase-9	正义链 5'-GTGATAAAGGTTTCGGTTGCTG-3'	45
	反义链 5'-TGTTTCTGTGGCTCCTCCTCTGG-3'	
GAPDH	正义链 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	37
	反义链 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'	

1.3.5 肝癌 Huh7 细胞迁移能力的检测 3 组细胞慢病毒转染 72 h 后,加入胰蛋白酶,消化 2 min,收集细胞,制成细胞悬液。按说明书要求,将基底膜的基质原液放在冷藏冰箱(4 ℃)过夜融化,然后与预冷的无血清的 DMEM 培养基按照 1 : 3 的比例配置上室凝胶液体。以每孔 55 μL 的量包被 Transwell 小室的上室,置 37 ℃ 的孵育箱中,2 h 后上室成胶。然后上室每孔接种 200 μL 不含血清的细胞培养液,下室加入体积分数为 0.10 胎牛血清的 DMEM 培养液 500 μL 。然后将 Transwell 板放置在 37 ℃ 的孵育箱中培养 24 h 后用结晶紫染色。使用倒置光学显微镜对 Transwell 板拍照并进行细胞计数。所有实验均重复 3 次取均值。

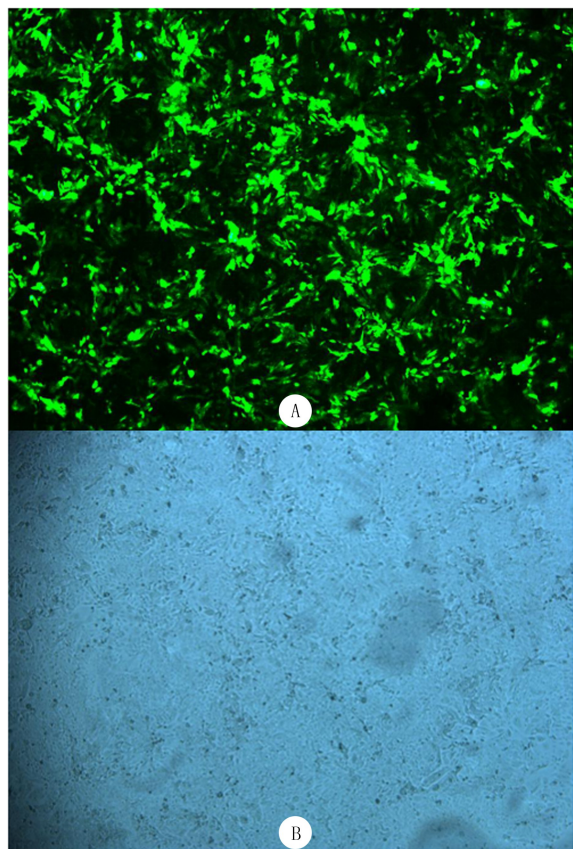
1.3.6 肝癌 Huh7 细胞增殖能力的检测 3 组细胞经胰蛋白酶消化后,接种于 96 孔板中,接种密度每孔 5×10^7 个/L。按照 CCK-8 试剂盒说明书的要求,72 h 后每孔加入 10 μL 的 CCK-8 试剂,置于 37 ℃ 的孵育箱中培养 2 h。酶标仪于 450 nm 波长处测定吸光度值,每组设置 3 个复孔取均值。

1.3.7 肝癌 Huh7 细胞凋亡的检测 3 组细胞经胰蛋白酶消化后,按照 AV-PI 试剂盒说明书检测细胞的凋亡率。流式细胞仪分析各组样本并计算凋亡率。Annexin V+/PI- 为早期凋亡细胞,Annexin V+/PI+ 为晚期凋亡和坏死细胞,Annexin V-/PI+ 为正常细胞。

2 结 果

2.1 ShRNA-survivin 慢病毒载体的构建及转染结果 以绿色荧光蛋白(GFP)为荧光探针,构建成功

了 survivin 沉默表达的慢病毒载体,慢病毒转染效率比较高,ShRNA-survivin 载体慢病毒转染滴度为 3×10^{14} TU/L。以肝癌 Huh7 细胞为靶点种子细胞,转染复数为 50,慢病毒转染率为 92%。见图 1。



A: 荧光下视野; B: 白光下视野。

图 1 ShRNA-survivin 慢病毒载体的构建和转染结果

2.2 各组肝癌 Huh7 细胞 survivin、Caspase-3 及 Caspase-9 mRNA 的表达比较

A、B、C 组 survivin mRNA 的相对表达量分别为 1.000 ± 0.000 、 1.079 ± 0.011 、 0.421 ± 0.097 , A、B 组与 C 组相比较差异均具有显著意义 ($F = 15.984$, $q = 8.141$ 、 3.257 , $P < 0.05$)。A 组、B 组与 C 组 Caspase-3 mRNA 的相对表达量分别为 1.000 ± 0.000 、 1.109 ± 0.027 、 0.342 ± 0.129 , A、B 组与 C 组比较差异均具有显著意义 ($F = 10.007$, $q = 7.656$ 、 2.472 , $P < 0.05$)。A 组、B 组、C 组 Caspase-9 mRNA 的相对表达量分别为 1.092 ± 0.043 、 1.099 ± 0.013 、 0.298 ± 0.241 , A、B 组与 C 组比较差异均有显著性 ($F = 21.672$, $q = 4.979$ 、 2.129 , $P < 0.05$)。

2.3 各组肝癌 Huh7 细胞迁移能力比较

A 组、B 组、C 组中透过分子筛的细胞数分别为 (131.32 ± 18.39) 、 (142.11 ± 14.02) 、 (52.11 ± 4.09) 个, 3 组间比较差异具有显著意义 ($F = 31.982$, $P < 0.05$); A、B 组与 C 组比较差异均具有显著性 ($q =$

7.153 、 9.074 , $P < 0.05$)。

2.4 各组肝癌 Huh7 细胞增殖能力比较

A 组、B 组、C 组细胞的增殖率分别为 $(60.34 \pm 1.24)\%$ 、 $(51.12 \pm 2.47)\%$ 、 $(24.27 \pm 3.11)\%$, 3 组比较差异有显著性 ($F = 23.983$, $P < 0.05$); A、B 组与 C 组比较差异均有显著意义 ($q = 10.322$ 、 9.886 , $P < 0.05$)。

2.5 肝癌 Huh7 细胞凋亡情况比较

A 组、B 组、C 组细胞的凋亡率分别为 $(4.21 \pm 1.24)\%$ 、 $(3.09 \pm 1.13)\%$ 、 $(35.21 \pm 13.31)\%$, 3 组比较差异有显著性 ($F = 30.009$, $P < 0.05$); A、B 组与 C 组比较差异均具有统计学意义 ($q = 9.531$ 、 8.001 , $P < 0.05$)。

3 讨论

survivin 基因是凋亡抑制蛋白家族 (AIP) 中分子量最小的成员,也是迄今为止发现的最强凋亡抑制因子^[13-14]。survivin 基因在大多数的肿瘤组织中特异性表达,比如甲状腺癌、舌癌以及胃癌等疾病中^[15-19],且高表达与肿瘤的复发、淋巴浸润及转移密切相关^[12-15]。近年来研究发现, survivin 基因高表达也与肝癌发生与发展密切相关^[20-23]。本研究通过 RNAi 的方法,构建 ShRNA-survivin 慢病毒载体,转染人肝癌细胞株 Huh7 细胞,检测该细胞中的 survivin 基因表达^[17],探讨 survivin 基因在人肝癌细胞系 Huh7 细胞发生发展中的作用,为肝癌的治疗寻找新的靶向药物。

Caspases 是近年来发现的一组存在于胞质溶胶中的结构上相关的半胱氨酸蛋白酶,它们的一个重要共同点是活性位点都含有半胱氨酸,并特异地断开天冬氨酸残基后的肽键^[24]。Caspase-3 是一种与 ICE/CED-3 活性中心同源的序列,因其编码相对分子质量为 32 000 的半胱氨酸蛋白酶而被称之为 CPP32^[25-27]。随后,其他学者独立地将这一蛋白基因克隆出来,并分别命名为 prICE、apopain (凋亡素) 和 Yama (印度传说中的死亡之神)。最后于 1996 年这种蛋白酶被命名为 Caspase-3^[28-29]。本研究通过 RT-qPCR 方法检测人肝癌细胞系 Huh7 细胞中 Caspase-3 以及 Caspase-9 mRNA 的表达水平, C 组与 B 组比较差异具有显著意义。由此可见 ShRNA-survivin 载体具有明显促进人肝癌细胞系 Huh7 细胞凋亡的作用。

另外,本研究采用 Transwell 方法检测肿瘤细胞的迁移能力, A、B、C 组间比较差异有显著性,其

中 C 组和 B 组比较,差异有显著性。由本研究结果可以推测,ShRNA-survivin 对人肝癌细胞系 Huh7 细胞的迁移具有明显抑制作用。本研究还利用 CCK-8 实验方法检测肿瘤细胞的增殖情况,A、B 和 C 组比较差异有显著性,C 组与 B 组比较差异有显著性。由此可知,ShRNA-survivin 对人肝癌细胞系 Huh7 细胞的增殖具有明显抑制作用。最后本研究还利用 AV-PI 凋亡检测试剂盒检测细胞的凋亡情况,A、B 和 C 组比较差异有显著性,C 组与 B 组比较差异具有显著意义。由此可以推测,ShRNA-survivin 对人肝癌细胞系 Huh7 细胞的过度凋亡具有明显的促进作用。

本研究只是初步探讨了 ShRNA-survivin 在人肝癌细胞系 Huh7 细胞的增殖、侵袭和过度凋亡中的作用,但对其具体发挥作用的分子生物学机制尚需进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 原发性肝癌诊疗规范(2011 年版)[J]. 临床肿瘤学杂志, 2011,16(10):929-946.
- [2] 陈万青,张思维,曾红梅,等. 中国 2010 年恶性肿瘤发病与死亡[J]. 中国肿瘤, 2014,23(1):1-10.
- [3] YANG S Z, ZENG J P, CAI S W, et al. Precision in liver surgery[J]. Semin Liver Dis, 2013,33(3):189-203.
- [4] MA W J, WU L, ZHOU F L, et al. T cell-associated immunotherapy for hepatocellular carcinoma[J]. Cell Physiol Biochem, 2017,41(2):609-622.
- [5] SRIVASTAVA S, RIDDELL S R. Engineering CAR-T cells: Design concepts[J]. Trends Immunol, 2015,36(8):494-502.
- [6] 杨振鹏,邹浩,袁廷东,等. 复发性肝细胞癌病人 RFA 治疗后总体生存危险因素分析[J]. 精准医学杂志, 2018,33(3):210-213.
- [7] LI X F, LU G R, LIU D X, et al. Combination therapy of multiple micro trauma technology on hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Cancer Therapy, 2013,4(3):695-697.
- [8] BOUCHARD-FORTIER A, LAPOINTE R, PERREAULT P, et al. Transcatheter arterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma as a bridge to liver transplantation: A retrospective study[J]. Int J Hepatol, 2011, 2011:974514.
- [9] POOMSAWAT S, PUNYASINGH J, VEJCHAPIPAT P. Overexpression of survivin and caspase 3 in oral carcinogenesis[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2014,22(1):65-71.
- [10] 史永亮. 血清 Survivin 及抗体在甲状腺乳头状癌诊断中的临床价值[J]. 河北医药, 2013,35(12):1854-1855.
- [11] TABRIZIAN P, JIBARA G, SHRAGER B, et al. Recurrence of hepatocellular cancer after resection: Patterns, treatments, and prognosis[J]. Ann Surg, 2015,261(5):947-955.
- [12] YAMASHITA Y, YOSHIDA Y, KURIHARA T, et al. Surgical results for recurrent hepatocellular carcinoma after cura-

- tive hepatectomy: Repeat hepatectomy versus salvage living donor liver transplantation[J]. Liver Transpl, 2015,21(7): 961-968.
- [13] ERRIDGE S, PUCHER P H, MARKAR S R, et al. Meta-analysis of determinants of survival following treatment of recurrent hepatocellular carcinoma[J]. Br J Surg, 2017, 104(11):1433-1442.
- [14] WIEDEMUTH R, KLINK B, TOPFER K, et al. Survivin safeguards chromosome numbers and protects from aneuploidy independently from p53[J]. Mol Cancer, 2014,13:107.
- [15] 田忠成,邵飞飞,党雪菲,等. Survivin 在甲状腺癌中的表达及临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2014,18(3):390-393.
- [16] SHINTANI M, SANGAWA A, YAMAO N, et al. Immunohistochemical expression of nuclear and cytoplasmic survivin in gastrointestinal carcinoma[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013,6(12):2919-2927.
- [17] 成争艳,雷龙春,王洪波,等. Survivin 与 Smac 在食管鳞状细胞癌中的表达及意义[J]. 实用医院临床杂志, 2018,15(2):16-18.
- [18] 牛朝霞,陈洁,彭蕤蕤,等. RNA 干扰 survivin 基因对 Eca-109 细胞体内增殖的影响[J]. 新乡医学院学报, 2016,33(5):352-355.
- [19] 李京云,于征,于洋,等. Survivin 蛋白在乳腺癌中的表达及意义[J]. 现代肿瘤医学, 2015,23(1):65-67.
- [20] GU Y J, JIN S D, WANG F, et al. Clinicopathological significance of PI3K, Akt and survivin expression in gastric cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2014,68(4):471-475.
- [21] BOIDOT R, VEGRAN F, LIZARD-NACOL S. Transcriptional regulation of the survivin gene[J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(1):233-240.
- [22] 郑国文. 大肠癌中 Livin 和 Survivin 的表达及相关性研究[J]. 实用医院临床杂志, 2014,11(2):86-87.
- [23] 常玉珍,李秀梅,封敏,等. Survivin、NF- κ B 和 STAT3 mRNA 在宫颈癌中的表达及其临床意义[J]. 癌变·畸变·突变, 2014,26(3):189-192.
- [24] 王传艳,孟令新,丁兆军. PTEN、Survivin 和 Caspase-3 在食管鳞癌中的表达[J]. 现代肿瘤医学, 2015,23(4):493-496.
- [25] 张丹,吕亮,申兴斌,等. 大肠癌中 survivin、NF- κ B 及 caspase-3 的表达及意义[J]. 中国老年医学杂志, 2017,2(37):549-552.
- [26] 孙红芹,赵长林,胡芳娟,等. 直肠癌组织 Smac 与 Survivin 表达及其临床意义的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011,18(12):956-960.
- [27] 潘克俭,刘小菁,杨春蕾,等. Survivin 反义核酸对 SMMC-7721 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 生物医学工程学杂志, 2006,23(3):625-629.
- [28] 马颖,杨向红,林连捷,等. PTEN 和 Caspase-3 在大肠癌中的表达及临床意义[J]. 中国医科大学学报, 2010,39(4):290-292.
- [29] LIU Y K, CHEN K H, LEU Y L, et al. Ethanol extracts of cinnamomum kanehirai Hayata leaves induce apoptosis in human hepatoma cell through caspase-3 cascade[J]. Onco Targets Ther, 2015,8:99-109. (本文编辑 耿波 厉建强)