

腺病毒介导的 BIRC5-shRNA 增强索拉非尼 诱导肝癌细胞凋亡的研究*

350001 福州 南京军区福州总医院肝胆外科

胡还章, 江 艺, 苏长青^{1,2}, 吴孟超¹

【摘要】 目的 研究 BIRC5 靶向基因治疗联合索拉非尼分子靶向治疗肝癌的协同效应以及对肝癌细胞凋亡的诱导作用。方法 构建 BIRC5 特异性小发卡 RNA 的腺病毒 AdEGFP-shBIRC5, 用免疫细胞化学染色法检测其对 BIRC5 的沉默作用。建立肝癌移植瘤模型验证 AdEGFP-shBIRC5 联合索拉非尼治疗的疗效, 采用免疫组化染色法鉴定 AdEGFP-shBIRC5 对癌细胞 BIRC5 基因表达的抑制作用; TUNEL 法标记 AdEGFP-shBIRC5 联合索拉非尼诱导肝癌细胞凋亡。结果 腺病毒介导的 BIRC5-shRNA 表达能有效沉默肝癌细胞 BIRC5 表达, AdEGFP-shCtrl 对照组的 BIRC5 阳性表达率为 $(78.8 \pm 12.6)\%$, AdEGFP-shBIRC5 实验组为 $(20.6 \pm 8.2)\%$, 两组差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。Hep3B 裸鼠移植瘤治疗后 5 周, 与空白对照组相比, AdEGFP-shBIRC5 联合索拉非尼组、单用 AdEGFP-shBIRC5 组、单用索拉非尼组的抑瘤率分别为 61.78% ($P = 0.0032$)、 42.36% ($P = 0.0059$) 和 29.20% ($P = 0.0169$); 与此对应, AdEGFP-shBIRC5 联合索拉非尼组与单用索拉非尼组相比, 肝癌细胞 BIRC5 表达被抑制 ($P = 0.0364$), 细胞凋亡比例明显升高 ($P = 0.0296$)。结论 针对 BIRC5 的基因治疗能提高肝癌细胞对索拉非尼的敏感性, 显著诱导癌细胞凋亡。

【关键词】 肝细胞癌; 肝癌细胞株 Hep3B; BIRC5 基因; 重组腺病毒载体; 索拉非尼; 小干扰 RNA; 凋亡
中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1009-0460(2011)10-0865-05

Effect of BIRC5 small hairpin RNA on sorafenib-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma

HU Huan-zhang, JIANG Yi, SU Chang-qing, WU Meng-chao. Department of Hepatobiliary Surgery, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou 350001, China

Corresponding author: SU Chang-qing, E-mail: suchangqing@gmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the synergistic effect of BIRC5 gene therapy combined with sorafenib and the enhanced efficacy of sorafenib-induced cell apoptosis of hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Adenovirus expressing BIRC5 small hairpin RNA (AdEGFP-shBIRC5) was constructed and used to infect HCC cell line Hep3B. The expression of BIRC5 was determined by immunocytochemistry in AdEGFP-shBIRC5 infected cells. The effect of AdEGFP-shBIRC5 combined with sorafenib on cell apoptosis and tumor growth was observed in Hep3B xenografts in nude mice. TUNEL assay was used to label cancer cell apoptosis. **Results** The adenovirus-mediated expression of BIRC5-shRNA could obviously silence BIRC5 expression. BIRC5 expression rate was $(78.8 \pm 12.6)\%$ in AdEGFP-shCtrl group and $(20.6 \pm 8.2)\%$ in AdEGFP-shBIRC5 group ($P < 0.01$). Five weeks after treatment of Hep3B xenografts in nude mice, the inhibitory rates of tumor growth were 61.78% ($P = 0.0032$), 42.36% ($P = 0.0059$) and 29.20% ($P = 0.0169$) in groups of AdEGFP-shBIRC5 combined with sorafenib, AdEGFP-shBIRC5 and sorafenib respectively. Accordingly, compared with sorafenib group, the expression of BIRC5 was inhibited ($P = 0.0364$), and the cell apoptosis was increased ($P = 0.0296$). **Conclusion** Gene therapy targeting BIRC5 can enhance the sensitivity of HCC cells to sorafenib and induce more cancer cell apoptosis.

【Key Words】 Hepatocellular carcinoma; Hepatocellular carcinoma cell line Hep3B; BIRC5 gene; Recombinant adenovirus vector; Sorafenib; Small hairpin RNA; Apoptosis

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81071866, 81172155)

1 200438 第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤研究室

2 通讯作者, E-mail: suchangqing@gmail.com

分子靶向药物的问世,为治疗肝癌提供了新的选择。索拉非尼(BAY4329006, Sorafenib)为首个获准上市的治疗肝癌的靶向治疗药物,是一种新型信号转导抑制剂,通过抑制 Raf/MEK/ERK 信号转导通路中 Raf 激酶的活化,阻断癌细胞增殖,诱导癌细胞凋亡^[1]。但是,肝癌的发生发展是一个多基因、多阶段的发展过程,涉及一系列分子事件,如信号转导异常、生长因子受体失调、血管生长因子分泌异常、原癌基因激活以及抑癌基因失活等,导致细胞无限生长并产生恶性表型^[2]。单一治疗显然是不够的,需要寻找新的有效治疗靶点,实现多分子、多通路联合治疗才能更有效地提高治疗效果。肝癌细胞高表达生存素(BIRC5, 又称 Survivin),是另一个潜在的治疗靶点^[3]。为深入探讨靶向 BIRC5 基因治疗与索拉非尼分子靶向治疗的协同机制,本研究以裸鼠 Hep3B 肝癌移植瘤为研究对象,探讨 BIRC5 基因治疗与索拉非尼诱导肝癌细胞凋亡之间的关系。

1 材料与方 法

1.1 试剂与细胞系 鼠抗人 BIRC5 单克隆抗体、超敏 SP 试剂盒、TUNEL 试剂盒均购自福州迈新生物技术公司;人肝癌细胞株 Hep3B 购自中国科学院上海细胞所。

1.2 腺病毒载体构建及转染 根据 BIRC5 基因序列设计 19 bp 正义序列 shRNA(BIRC5-shRNA:5'-GAAAGTGGCCCGTGCCATC-3'),同时设计阴性对照序列小发卡 RNA(Ctrl-shRNA:5'-GACTTCATAAGGCGCATGC-3')。将此 DNA 结构序列克隆入腺病毒载体 pDC315EGFP,转染 HEK293 细胞并重组腺病毒 AdEGFP-shBIRC5 和对照病毒 AdEGFP-shCtrl^[4]。

细胞实验设实验病毒 AdEGFP-shBIRC5 组、对照病毒 AdEGFP-shCtrl 组和亲本细胞阴性组。培养 Hep3B 细胞,5 × 10³ 个细胞铺 96 孔板,24h 后按病毒感染强度(MOI) = 20 pfu/细胞,感染实验病毒 AdEGFP-shBIRC5 和对照病毒 AdEGFP-shCtrl。继续培养 48h 后,荧光显微镜下观察病毒携带的绿色荧光蛋白(EGFP)报告基因的表达。收集细胞,涂片做免疫细胞化学染色,计数 BIRC5 的表达。

1.3 裸鼠移植瘤实验 BALB/C 裸鼠由中国科学院上海实验动物中心提供,共 25 只,雄性,4 周龄。

每只裸鼠右侧皮下注射肝癌细胞 Hep3B 悬液(10⁶ 个细胞/100μl)。接种后 5 周出现移植瘤,随机分为 5 组:AdEGFP-shBIRC5 联合索拉非尼组、单用 AdEGFP-shBIRC5 组、单用索拉非尼组、AdEGFP-shCtrl 组和空白对照组,每组 5 只。给药组在移植瘤内直接多点注射相应重组病毒,每只 2 × 10⁸ pfu/100μl,隔日 1 次,共 5 次。索拉非尼的终浓度为 6μmol/L。空白对照组用同体积生理盐水注射。定期测量瘤体大小,以“最大径 × 最小径² × 0.5”公式计算瘤体体积。

1.4 免疫组化检测 自首次治疗开始,观察 35 天后麻醉处死小鼠,取瘤体标本,以 10% 中性缓冲福尔马林固定,石蜡包埋切片。采用免疫组化 SP 法检测肿瘤组织 BIRC5 的表达。石蜡切片常规脱蜡至水,按 SP 试剂盒说明进行免疫组化标记,BIRC5 抗体工作浓度 1:200,DAB 显色。结果判定:取 5 个高倍视野下计数每张切片中阳性细胞所占比例,阳性细胞百分比大于 10% 计为阳性。

1.5 TUNEL 法标记细胞凋亡 采用 TUNEL 法染色定位切片中的细胞凋亡。取小鼠瘤体标本,石蜡包埋切片,常规脱蜡至水,按 TUNEL 试剂盒说明进行染色标记,DAB 显色。结果判定:取 5 个高倍视野下计数每张切片中阳性细胞所占比例,阳性细胞百分比大于 10% 计为阳性。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件进行处理。观察数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用配对资料 *t* 检验,多组之间比较用方差分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 腺病毒感染效率及基因表达的鉴定 以 MOI = 20 pfu/细胞的强度感染重组腺病毒,荧光显微镜下观察显示 Hep3B 细胞 EGFP 的表达效率 > 50%,未感染病毒的亲本细胞无荧光表现。细胞涂片行免疫细胞化学染色显示,AdEGFP-shCtrl 对照组的 BIRC5 阳性表达率为 (78.8 ± 12.6)%,AdEGFP-shBIRC5 实验组为 (20.6 ± 8.2)%,差异有统计学意义(*P* < 0.01)。见图 1、图 2。

2.2 对裸鼠移植瘤的抑制作用 治疗 5 周后,与空白对照组相比,除 AdEGFP-shCtrl 组无效外,其余各组均取得一定疗效。AdEGFP-shBIRC5 联合索拉非

尼组、单用 AdEGFP-shBIRC5 组、单用索拉非尼组的抑瘤率分别为 61.78% ($P=0.0032$)、42.36% ($P=0.0059$) 和 29.20% ($P=0.0169$)。见图 3、图 4。

2.3 基因表达与细胞凋亡 裸鼠移植瘤标本免疫组化检测 BIRC5 表达,采用 TUNEL 染色定位细胞凋亡。AdEGFP-shBIRC5 联合索拉非尼组、单用 AdEGFP-shBIRC5 组、单用索拉非尼组癌细胞 BIRC5 阳性表达率分别为 $(18.61 \pm 3.42)\%$ 、 $(36.43 \pm 12.81)\%$ 和 $(22.68 \pm 11.44)\%$, 而 AdEGFP-shCtrl 组、空白对照组分别为 $(47.35 \pm 21.72)\%$ 和 $(42.88 \pm 16.54)\%$ 。与此对应, AdEGFP-shBIRC5 联合索拉非尼组、单用 AdEGFP-shBIRC5 组、单用索拉非尼组癌细胞凋亡比例分别为 $(38.94 \pm 6.20)\%$ 、 $(26.69 \pm 1.86)\%$ 和 $(32.44 \pm 10.63)\%$, 而 AdEGFP-shCtrl 组、空白对照组癌细胞凋亡比例分别为 $(9.83 \pm 3.75)\%$ 和 $(12.22 \pm 3.84)\%$ 。AdEGFP-shBIRC5 联合索拉非尼组与单用索拉非尼组相比,肝癌细胞 BIRC5 表达被抑制 ($P=0.0364$), 细胞凋亡比例明显升高 ($P=0.0296$); AdEGFP-shBIRC5 联合索拉非尼组与单用 AdEGFP-shBIRC5 组相比, 癌细胞 BIRC5 表达和细胞凋亡比例均无差异, 但两组 BIRC5 表达均被抑制且细胞凋亡率均显著高于对照组 (P 分别为 0.0016 和 0.0028)。见图 5。

3 讨论

原发性肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,对化疗药物敏感性差,病程发展迅速,患者预后不良。索拉非尼作为第 1 个在肝癌治疗中获得生存优势的分子靶向药物,为肝癌治疗提供了新的思路。索拉非尼是一种多激酶抑制剂,不但能够抑制多种受体酪氨酸激酶活性,包括血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR-2)、血小板衍生生长因子受体 (PDGFR) 等,还能够抑制 RAS/RAF/MEK/ERK 信号通路中受体丝氨酸和苏氨酸激酶的活性^[5,6]。已有研究发现,索拉非尼能有效抑制小鼠肝癌切除术后肿瘤的原位复发和腹腔转移,并显著延长小鼠的生存时间。相比原发肿瘤,索拉非尼能更加有效地抑制复发肿瘤的生长。肝癌术后生长因子表达上调导致 ERK 活性增加,进而提高了肝癌细胞对索拉非尼的敏感性。这一研究结果为索拉非尼应用于早期肝癌的治疗(尤

其是早期肝癌术后治疗)提供了有力的实验依据^[7]。索拉非尼单药在肝癌治疗中的疗效已不容置疑,但临床上依然需要将索拉非尼与不同治疗策略联合,探讨不同联合方案对肝癌的疗效,为肝癌的综合治疗提供扎实的理论依据,而现代肿瘤生物治疗模式是肿瘤全新的综合治疗不可缺少的一部分,有必要进行深入的探讨和研究。

研究报道, BIRC5 通过与 Caspase-9 结合抑制细胞凋亡^[8-10]。BIRC5 在各种人体肿瘤组织中呈较高频率的表达,并且与肿瘤细胞的高增殖活性、高转移能力、对化疗的抵抗等特性密切相关^[11-12], 因而使其成为肿瘤治疗的良好靶点。采用 BIRC5 的反义寡核苷酸或者 BIRC5 抑制剂导入癌细胞,可降低细胞 BIRC5 的表达水平,抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡^[13]。有较多研究采用 BIRC5 基因特异性小干扰 RNA (siRNA) 技术,干扰目的基因的表达,抑制肿瘤细胞生长^[14-15]。RNA 干扰技术主要利用双链 RNA 在细胞内经 Dicer 酶的识别、结合、酶切,产生长度为 21~23 nt、具有活性的 siRNA, 这种 siRNA 能够与目的基因 mRNA 特异性结合并使 mRNA 降解,从而抑制目的基因的表达^[16]。因此, BIRC5 是理想的肿瘤生物治疗的靶点。

为深入探讨 BIRC5 基因靶向治疗与肝癌分子靶向药物协同作用的分子机制,本研究以 BIRC5 基因 shRNA 联合索拉非尼,分析特异性沉默 BIRC5 表达对索拉非尼诱导的细胞凋亡的促进作用,探索分子靶向治疗与基因治疗相结合的肿瘤治疗新模式。结果显示,表达 BIRC5-shRNA 和 EGFP 腺病毒感染的 Hep3B 肝癌细胞在 MOI = 20 pfu/细胞的感染强度时,感染效率可达 50% 以上。无论在体外细胞学实验,还是在体内裸鼠移植瘤实验中,本研究均发现 BIRC5-shRNA 能有效沉默癌细胞 BIRC5 表达,并诱导癌细胞凋亡,从而抑制肿瘤细胞的生长。研究证实, BIRC5-shRNA 联合索拉非尼治疗,可进一步提高肝癌细胞的凋亡比例,增强肿瘤治疗的效果,达到协同作用的目的。因此,针对 BIRC5 的基因治疗,安全可靠,且特异性强,能有效抑制 BIRC5 的表达,可以提高肿瘤细胞对分子靶向药物的敏感性,强化治疗效果,最大限度地发挥基因治疗和分子靶向治疗的双重优势。

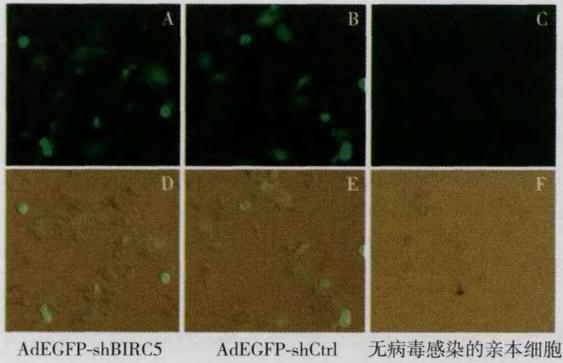


图 1 腺病毒基因表达的鉴定(荧光显微镜 × 200)

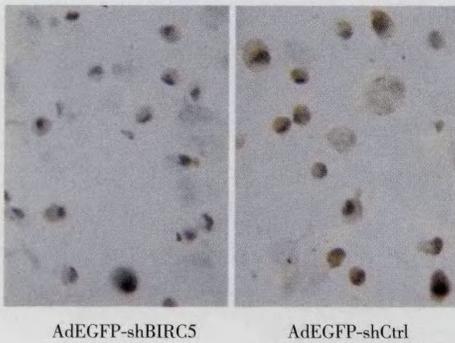


图 2 腺病毒感染效率的鉴定(SP × 200)



图 3 5 组荷瘤裸鼠的大体情况

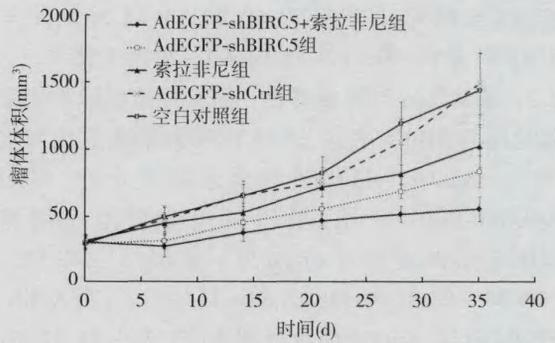


图 4 腺病毒 AdEGFP-shBIRC5 联合索拉非尼对 Hep3B 肝癌移植瘤的抑制作用

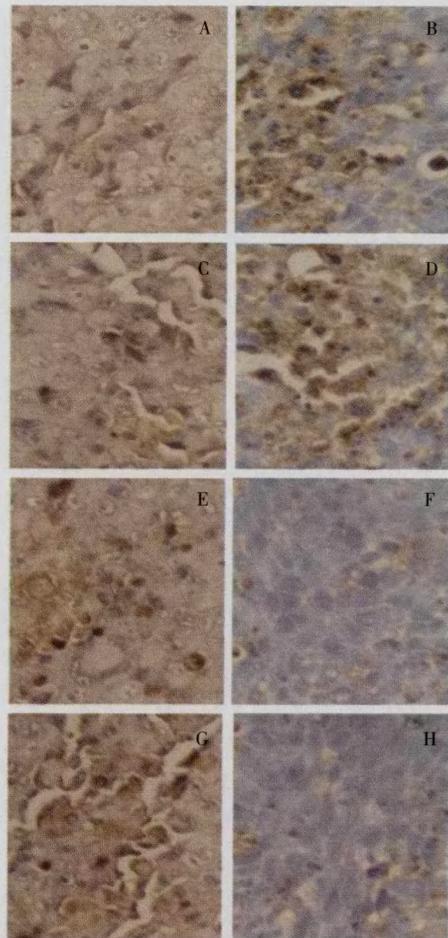


图 5 腺病毒 AdEGFP-shBIRC5 联合索拉非尼对 Hep3B 肝癌移植瘤的抑制作用(TUNEL × 200)

参考文献

- [1] Hong DS, Cabanillas ME, Wheeler J, et al. Inhibition of the Ras/Raf/MEK/ERK and RET kinase pathways with the combination of the multikinase inhibitor sorafenib and the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in medullary and differentiated thyroid malignancies[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(4):997-1005.
- [2] Whittaker S, Marais R, Zhu AX. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *Oncogene*, 2010, 29(36):4989-5005.
- [3] Khan Z, Khan N, Varma AK, et al. Oxaliplatin-mediated inhibition of survivin increases sensitivity of head and neck squamous cell carcinoma cell lines to paclitaxel[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2010, 10(7):660-669.
- [4] 王端明, 刘辰, 姜小清, 等. 肝胆肿瘤细胞转录因子 Oct-4 的表达对 Survivin 抗凋亡作用的调控[J]. *中国细胞生物学学报*, 2010, 32:709-713.
- [5] Kudo M. Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma: bench to bedside[J]. *Dig Dis*, 2011, 29(3):273-277.
- [6] Wiedmann MW, Mössner J. Molecular targeted therapy of hepatocellular carcinoma-results of the first clinical studies[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2011, 11(6):714-733.
- [7] Feng YX, Wang T, Deng YZ, et al. Sorafenib suppresses postsurgical recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma in an orthotopic mouse model[J]. *Hepatology*, 2011, 53(2):483-492.
- [8] Theodoropoulos GE, Michalopoulos NV, Panoussopoulos SG, et al. Effects of caspase-9 and survivin gene polymorphisms in pancreatic cancer risk and tumor characteristics [J]. *Pancreas*, 2010, 39(7):976-980.
- [9] Garcia-Saez I, Lacroix FB, Blot D, et al. Structural characterization of HBXIP: the protein that interacts with the anti-apoptotic protein survivin and the oncogenic viral protein HBx[J]. *J Mol Biol*, 2011, 405(2):331-340.
- [10] Rao YK, Wu AT, Geethangili M, et al. Identification of antrocin from *Antrodia camphorata* as a selective and novel class of small molecule inhibitor of Akt/mTOR signaling in metastatic breast cancer MDA-MB-231 cells[J]. *Chem Res Toxicol*, 2011, 24(2):238-245.
- [11] Rödel F, Reichert S, Sprenger T, et al. The role of survivin for radiation oncology: moving beyond apoptosis inhibition[J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(2):191-199.
- [12] Ryan BM, O'Donovan N, Duffy MJ. Survivin: a new target for anti-cancer therapy[J]. *Cancer Treat Rev*, 2009, 35(7):553-562.
- [13] Yang Y, Gao Y, Chen L, et al. Downregulation of survivin expression and enhanced chemosensitivity of MCF-7 cells to adriamycin by PDMAE/survivin shRNA complex nanoparticles[J]. *Int J Pharm*, 2011, 405(1-2):188-195.
- [14] Kanwar RK, Cheung CH, Chang JY, et al. Recent advances in anti-survivin treatments for cancer[J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17(15):1509-1515.
- [15] Song Y, Dong MM, Yang HF. Effects of RNA interference targeting four different genes on the growth and proliferation of nasopharyngeal carcinoma CNE-2Z cells [J]. *Cancer Gene Ther*, 2011, 18(4):297-304.
- [16] Zhou J, Rossi JJ. Progress in RNAi-based antiviral therapeutics [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 721:67-75.

收稿日期:2011-05-17; 修回日期:2011-06-21