

厄洛替尼联合 Survivin siRNA 对人肺腺癌细胞 A549 增殖的影响

林萍萍 谷蕾 吕喜英

【摘要】 目的 探讨厄洛替尼联合 Survivin siRNA 对人肺腺癌细胞 A549 增殖的影响。方法 选用 Survivin siRNA 转染和厄洛替尼单独或联合应用于人肺腺癌细胞 A549, 作用 48 h 后, 应用四甲基偶氮唑蓝比色法检测其对细胞增殖的抑制作用, 免疫组化法观察 Survivin 蛋白表达的变化。结果 Survivin siRNA 转染和厄洛替尼两者单独或联合应用于人肺腺癌细胞 A549 作用 48 h 后, 两种因素单独或联合应用都对细胞增殖有明显的抑制作用, 其抑制率分别为 $(47.68 \pm 4.09)\%$ 、 $(60.28 \pm 3.23)\%$ 、 $(78.14 \pm 4.34)\%$, 较对照组差别有统计学意义 ($P < 0.01$), 并能明显降低细胞内 Survivin 蛋白的表达水平, 联合应用较两者单独应用对细胞增殖的抑制作用更显著 ($P < 0.01$), 对 Survivin 蛋白表达的抑制作用更强。结论 应用 siRNA 沉默 Survivin 表达可以提高肺腺癌细胞对厄洛替尼的敏感性。

【关键词】 厄洛替尼; Survivin; siRNA; A549 细胞

Effect of proliferation of erlotinib combined Survivin siRNA on human lung adenocarcinoma cell lines A549 cell
LIN Ping-ping, GU Lei, LÜ Xi-ying Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Hebei Chengde 067000, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of proliferation of erlotinib combined Survivin siRNA on human lung adenocarcinoma cell lines A549 cell. **Methods** Survivin siRNA transfection and erlotinib alone or in combination used on human lung adenocarcinoma cells A549, after application for 48 hours, to detect inhibition of cell proliferation by 4-methyl-thiazolyl tetrazolium (MTT) assay and to observe the change of expression of Survivin protein by immunohistochemistry. **Results** Survivin siRNA transfection and erlotinib alone or in combination used on human lung adenocarcinoma cell lines A549 cell for 48 hours, the proliferation were inhibited and the expression of Survivin protein was reduced. The inhibition rates were $(47.68 \pm 4.09)\%$, $(60.28 \pm 3.23)\%$, $(78.14 \pm 4.34)\%$ ($P < 0.01$). The inhibition of proliferation and the reduction of expression of Survivin protein were more obviously when Survivin siRNA transfection and erlotinib in combination on cells. **Conclusions** Survivin siRNA silence the expression of Survivin can enhance the sensitivity of lung adenocarcinoma cancer cells to erlotinib.

【Key words】 Erlotinib; Survivin; siRNA; A549 cells

Survivin 表达于包括肺癌在内的几乎所有恶性肿瘤组织内。基因治疗和靶向治疗越来越受到关注。厄洛替尼 (Erlotinib) 属于口服的 I 型人表皮生长因子受体 (HER1/EGFR) 酪氨酸激酶抑制剂 (TKI), 用于化疗方案失败的局部晚期或转移的非小细胞肺癌 (NSCLC) 的二线治疗。本研究将厄洛替尼与 Survivin siRNA 结合起来观察其对入肺腺癌细胞 A549 增殖的体外抑制作用及对 Survivin 基因的抑制作用, 探讨两者联合是否具有协同效应, 分析 Survivin siRNA 对厄洛替尼的敏感性的影响, 并对厄洛替尼治疗肿瘤的作用机制进行更深入的探讨。

材料与方法

一、材料 p53 野生型肺癌细胞株 A549 由河北医科大学第四附属医院提供; Survivin siRNA、siRNA 转染试剂、siRNA 转染培养基、鼠抗人 Survivin 蛋白单克隆抗体、 β -actin 一抗及羊抗鼠二抗均为 Santa Cruz 公司产品; MTT 为上海华舜生物工程有限公司产品; 二甲基亚砜 (DMSO) 为成都天泰公司产品; 二步法免疫组化检测试剂盒购于北京中杉金桥试剂公司; 厄洛替尼购于上海罗氏制药有限公司。

二、方法

1 细胞培养及实验分组 将 A549 细胞接种在 50 ml 培养瓶中, 用含 10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养液, 于 37℃、

5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱内传代培养, 取对数生长期细胞进行实验。实验分组: (1) siRNA-A 转染对照组; (2) 空白对照组; (3) Survivin siRNA 转染组; (4) 厄洛替尼处理组; (5) Survivin siRNA 转染 + 厄洛替尼处理组。

2 Survivin siRNA 转染处理细胞 (以 6 孔板为例) 转染前 1 d 用 0.25% 胰酶消化细胞, 将 A549 细胞以约 2×10^5 个细胞每孔接种于 6 孔板中, 至细胞融合约 60% ~ 80% 时, 按 Santa Cruz 公司 siRNA 转染说明书进行转染, 分别用 Survivin siRNA 及阴性对照 siRNA-A 转染 A549 细胞 (Survivin siRNA 与 siRNA 转染试剂比例为 1 : 1.2), 同时设立未转染 A549 细胞为空白对照组和厄洛替尼处理组。转染后 6 h 换液, 空白对照组、阴性对照 siRNA-A 转染组、Survivin siRNA 转染组换为含 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养液, 厄洛替尼处理组, Survivin siRNA 转染 + 厄洛替尼处理组换为含厄洛替尼终浓度为 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 10% 新生牛血清 RPMI1640 培养液。

3 MTT 比色法检测细胞增殖变化 调节 A549 细胞浓度, 以 3×10^3 /孔接种于 96 孔培养板中, 每组设 6 个复孔, 转染方法和转染后处理同前。转染后 48 h 各组弃培养液, 每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/ml) 20 μl , 37℃ 孵育 4 h, 轻轻吸弃培养液, 每孔加入 150 μl DMSO, 振荡 10 min。选择 490 nm 波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔光密度 (OD) 值, 计算各组细胞抑制率。抑制率 = $[(\text{空白对照组 OD 值} - \text{各实验组 OD 值}) / \text{空白对照组 OD 值}] \times 100\%$ 。

4 免疫组化观察 Survivin 蛋白表达的变化 采用免疫组织化两步法: 细胞爬片后经转染、加药处理, 培养 48 h 后, 按

免疫组化试剂盒说明书操作,固定、冲洗、血清封闭、一抗 4℃ 孵育过夜、冲洗、二抗室温孵育 20 min、冲洗、辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素室温孵育 20 min、冲洗、DAB 显色剂显色 3~5 min、苏木素复染、分化、返蓝、冲洗、脱水、透明、封片。染色过程中以磷酸盐缓冲液代替一抗设立阴性对照。显微镜下观察胞浆和(或)细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性反应。免疫细胞化学染色法结果以阳性细胞百分比及着色强度进行综合分析,每次实验重复 3 次。

三、统计学分析 所有数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS11.5 统计软件统计处理,进行单因素方差分析及 2×2 析因设计的方差分析,组间变量比较采用 q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、厄洛替尼联合 Survivin siRNA 对 A549 细胞的生长抑制情况

MTT 比色法结果显示:与空白对照组及 siRNA-A 转染对照组相比,Survivin siRNA 转染组、厄洛替尼处理组及 Survivin siRNA + 厄洛替尼处理组细胞增殖都明显受到抑制,尤以 Survivin siRNA + 厄洛替尼处理组抑制作用最为显著($P < 0.01$)。同时,空白对照组与 Survivin siRNA 转染对照组之间差异无显著性($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 MTT 比色法检测各组 A549 细胞的光密度值的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值	抑制率(%)
空白对照组	0.656 ± 0.039	100
siRNA-A 转染对照组	0.649 ± 0.054	0.85 ± 8.24
厄洛替尼处理组	0.261 ± 0.031	60.28 ± 3.23
Survivin siRNA 转染组	0.343 ± 0.028	47.68 ± 4.09
Survivin siRNA 转染 + 厄洛替尼处理组	0.143 ± 0.033	78.14 ± 4.34

二、免疫组化法检测各组 Survivin 蛋白的表达

以 PBS 代替一抗的 A549 细胞(免疫组化阴性对照)核呈深蓝色,胞质透明,无棕黄色颗粒。未经处理的正常 A549 细胞胞质和(或)胞核内有大量棕黄色颗粒,转染 siRNA-A 的转染对照细胞胞质和(或)胞核内也有大量棕黄色颗粒,而转染 Survivin siRNA、应用厄洛替尼处理及转染 Survivin siRNA + 厄洛替尼处理后的细胞胞质及胞核内棕黄色颗粒明显减少,有棕黄色颗粒的细胞也明显减少,尤以转染 Survivin siRNA + 厄洛替尼处理后更为显著。

讨 论

逃避凋亡是肿瘤发生、发展和药物抵抗的重要机制^[1]。因此,诱导肿瘤细胞凋亡的策略成为近年来肿瘤治疗方面的重点。大量研究表明 Survivin 高表达肿瘤细胞可耐受化疗、放疗,通过下调表达可增加肿瘤在化疗、放疗的凋亡^[2]。Falleni 等^[3]在 I 期 NSCLC 的手术切除标本的研究中发现,有 96% (76/80) 的标本 Survivin 基因表达阳性,显示 Survivin 基因在肺癌早期诊断中的价值,也是“基因沉默”治疗比较理想的靶点^[4]。研究结果表明,在哺乳类、人类细胞中直接导入

人工合成的 siRNA,一方面避免激活干扰素途径,另一方面使相应序列的靶向基因 mRNA 产生明显的特异性抑制效应^[5]。据此机制,依照靶基因 mRNA 设计序列特异性 siRNA,可起到封闭特异性基因表达的作用。厄洛替尼的主要作用机制为抑制酪氨酸激酶的活性和磷酸化。EGFR 突变与 EGFR TKI 疗效相关,与总生存期有关,限制了此类药物的临床应用。厄洛替尼联合标准含铂一线化疗方案不能额外改善生存率^[6]。由于最终几乎所有的患者都会产生耐药,也限制了其长期疗效。

研究发现,血管内皮生长因子(VEGF)的抗凋亡作用主要是通过诱导 Survivin 在内皮细胞中高表达而实现^[3]。VEGF 是调节血管生成最主要的生长因子之一,并且其受 EGFR 调控。本研究发现应用厄洛替尼处理后的 A549 细胞较未经处理的正常 A549 细胞增殖明显受到抑制,Survivin 蛋白的表达也明显降低,其机制可能是由于 Survivin 表达具有细胞周期依赖性,只在细胞周期的 G2/M 期表达,应用厄洛替尼后可使癌细胞阻滞于 G1 期,从而降低了 Survivin 的表达水平,进而促进细胞凋亡;通过应用厄洛替尼竞争性结合 EGFR 使 EGFR 对 VEGF 的调控能力降低,从而降低了 VEGF 导致的 Survivin 的高表达。本研究通过 Survivin siRNA 沉默 Survivin 的表达,发现应用 Survivin siRNA 转染和厄洛替尼两者联合作用时对细胞增殖的抑制作用显著,并能显著降低细胞内 Survivin 蛋白的表达水平,较厄洛替尼单独作用对细胞增殖的抑制作用更明显,对 Survivin 蛋白表达的抑制作用也更强。Survivin siRNA 转染和厄洛替尼处理两种因素存在交互作用,并且表现为拮抗作用,两者的相互作用有待于进一步研究。由以上结果可以证明,通过转染 Survivin siRNA 沉默 Survivin 的表达可增加细胞对厄洛替尼的敏感性,推断 Survivin 过表达可能参与了厄洛替尼获得性耐药的形成。本实验的研究成果为提高厄洛替尼对 NSCLC 的治疗效果带来了新的希望,为临床提供了新的治疗思路和实验依据。

参考文献

- [1] Reed JC. Bcl-2: prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 1995, 9(2): 451-473.
- [2] Ikeguchi M, Liu J, Kaibara N. Expression of survivin mRNA and protein in gastric cancer cell line(MKN-45) during cisplatin treatment[J]. Apoptosis, 2002, 7(1): 23-29.
- [3] Falleni M, Pellegrini C, Marchetti A, et al. Survivin gene expression in early-stage non-small cell lung cancer[J]. J Pathol, 2003, 200(5): 620-626.
- [4] Jaattela M. Escaping cell death: survival proteins in cancer[J]. Exp Cell Res, 1999(1), 248: 30-43.
- [5] Miao GY, Lu QM, Zhang XL. Downregulation of survivin by RNAi inhibits growth of human gastric carcinoma cells[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(8): 1170-1174.
- [6] Agelaki S, Georgoulas V. Epidermal growth factor receptor inhibitors in the treatment of non-small cell lung cancer[J]. Expert Opin Emerging Drugs, 2005, 10(4): 855-874.

[收稿日期: 2011-03-31]