

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.10.002
文章编号: 1005-8982 (2019) 10-0010-05

Survivin shRNA-APC 双基因对结肠癌细胞中 P21 和 FHIT 表达的影响

袁喜先¹, 袁晓岚², 陈鸿³, 张玉健², 张书娟², 张蒙蒙²

(1. 佳木斯大学附属第一医院 消化二科, 黑龙江 佳木斯 154003; 2. 佳木斯大学临床医学学院, 黑龙江 佳木斯 154003; 3. 中国人民武装警察部队福建省总队医院, 福建 福州 350003)

摘要: 目的 探究 Survivin shRNA-APC 双基因共表达稳转株对 HT-29 结肠癌细胞裸鼠皮下移植瘤组织中 P21 和 FHIT 表达的影响。**方法** 选取 35 只雌性裸鼠分为双基因组、Survivin shRNA 组、APC 组、空载组及阴性对照组, 每组 7 只。培养构建成功的 Survivin shRNA-APC 双基因共表达稳转株、Survivin shRNA 稳转株、APC 稳转株、空载稳转株及 HT-29 结肠癌细胞, 在每只裸鼠右腋下接种相应的细胞悬液复制移植瘤模型。测量每组瘤重、计算瘤重抑制率; 采用免疫组织化学法测定 P21 和 FHIT 蛋白的表达。**结果** 所有裸鼠腋下产生肿瘤。APC 组、Survivin shRNA 组、双基因组 P21、FHIT 蛋白表达量较阴性对照组、空载组升高 ($P < 0.05$), 双基因组的蛋白表达量较 APC 组、Survivin shRNA 组升高 ($P < 0.05$)。APC 组、Survivin shRNA 组、双基因组的平均瘤重较阴性对照组和空载组降低 ($P < 0.05$)。双基因组平均瘤重较 APC 组、Survivin shRNA 组降低 ($P < 0.05$)。APC 组、Survivin shRNA 组、双基因组的瘤重抑制率较空载组升高 ($P < 0.05$)。双基因组瘤重抑制率较 APC 组、Survivin shRNA 组升高 ($P < 0.05$)。**结论** Survivin shRNA-APC 双基因共表达稳转株可能通过上调 P21 和 FHIT 蛋白的表达来调节细胞周期, 抑制细胞增殖, 进而抑制肿瘤生长。其抑制细胞增殖效果比 Survivin shRNA、APC 单基因稳转株更显著。

关键词: 结肠癌; Survivin shRNA-APC 双基因; 细胞周期; P21; FHIT

中图分类号: R735.35

文献标识码: A

Effects of Survivin shRNA-APC double gene on the expressions of P21 and FHIT in colon cancer cells

Xi-xian Yuan¹, Xiao-lan Yuan², Hong Chen³, Yu-jian Zhang², Shu-juan Zhang², Meng-meng Zhang²

(1. Department of Digestive Disease, the First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154003, China; 2. Clinical Medical College of Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154003, China; 3. Fujian Provincial Corps Hospital of Chinese People's Armed Police Force, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of co-expression stably transfected cell lines of Survivin shRNA-APC double gene on the expressions of P21 and FHIT in subcutaneous transplanted tumor tissues cell of HT-29 colon cancer in nude mice. **Methods** A total of 35 female nude mice were randomly divided into five equal groups, namely double-gene group, Survivin shRNA group, APC group, empty vector group, and negative control group. These constructed Survivin shRNA-APC double-gene co-expression stably transfected cell lines, Survivin shRNA stably transfected cell lines, APC stably transfected cell lines, empty vector stably transfected cell lines, and HT-29 colon cancer cells were injected into the right axillary of nude mice respectively to establish SXT models.

收稿日期: 2018-11-21

[通信作者] 袁晓岚, E-mail: 544399645@qq.com; Tel: 18645270393

Tumor weight was measured and the tumor weight inhibitory rate was calculated. P21 and FHIT protein expression were detected by immunohistochemical method. **Results** Every nude mouse developed tumors. The expressed quantity of protein in the APC group, Survivin shRNA group, and double-gene group, as compared with those in the empty vector group and negative control group, was increased ($P < 0.05$). The expressed quantity of protein in the double-gene group, as compared with those in the APC group and Survivin shRNA group, was increased ($P < 0.05$). The average tumor weight in the APC group, Survivin shRNA group, and double-gene group, as compared with those of empty vector group and negative control group, was reduced ($P < 0.05$). The average tumor weight in the double-gene group, as compared with those in the APC group and Survivin shRNA group, was reduced ($P < 0.05$). The tumor weight inhibition rate in the APC group, Survivin shRNA group, and double-gene group, as compared with those of empty vector group, was increased ($P < 0.05$). The tumor weight inhibition rate in the double-gene group, as compared with APC group and Survivin shRNA group, was increased ($P < 0.05$). **Conclusions** co-expression stably transfected cell lines of Survivin shRNA-APC double gene can adjust cell cycle, inhibit cell proliferation, and inhibit tumor growth by upregulating expression of P21 and FHIT. Its effects of inhibiting were more noticeable than those of Survivin shRNA or APC single gene stable strain.

Keywords: colonic neoplasms; Survivin shRNA-APC double gene; cell cycle; P21; FHIT

细胞周期限制点的异常将导致细胞失控性增殖,这与肿瘤的发生、发展关系密切^[1]。因此,细胞周期限制点的关键调控因子对结肠癌靶向治疗已成为研究热点。前期证实双基因可以抑制 Survivin 的表达,并抑制细胞增殖^[2]。然而,双基因联合对细胞周期限制点的调控作用未见报道。基于前期实验,本研究以 P21 和 FHIT 作为研究对象,观察双基因对细胞周期限制点调控因子 P21 和 FHIT 的影响,为结肠癌细胞周期限制点靶基因的治疗提供依据^[2-4]。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Survivin shRNA-APC 双基因稳转株: Survivin 干扰片段与 APC 基因补偿片段两者构成的双基因共表达慢病毒载体转染到 HT-29 结肠癌细胞中,筛选出稳转株; Survivin shRNA 稳转株: Survivin shRNA 慢病毒载体转染 HT-29 结肠癌细胞后筛选出稳转株; APC (aal020-1698) 稳转株: APC 慢病毒载体转染 HT-29 结肠癌细胞后筛选出稳转株; 空载稳转株: 单纯慢病毒载体转染 HT-29 结肠癌细胞后筛选出稳转株,以上均由本课题组前期实验成功构建并筛选^[3]。人 HT-29 结肠癌细胞(中国科学院上海研究所)。兔抗人 P21、FHIT 免疫组织化学试剂盒、链霉抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶复合物(streptavidin-biotin-peroxidase complex method, SABC)试剂盒、二氨基联苯胺显色剂均购自武汉博士德生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 *Survivin shRNA-APC* 双基因稳

转株、Survivin shRNA 稳转株、APC 稳转株、空载稳转株及 HT-29 结肠癌细胞分别在 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养。将培养基置于培养箱中定期换液。当各组细胞生长至对数期时备用。

1.2.2 实验动物分组 45 只雌性 SPF 级裸鼠,4 周龄,体重 (20.0 ± 1.5) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。相同条件下饲养 2 周后,选取 35 只无病态、发育正常、营养良好的裸鼠。根据随机数字表法分为阴性对照组、空载组、Survivin shRNA 组、APC 组及双基因组,每组 7 只。

1.2.3 动物模型的复制 将各组稳转株及结肠癌细胞重悬于 PBS 中至浓度为 2×10^6 个/ml。阴性对照组接种 HT-29 结肠癌细胞,空载组接种空载稳转株, Survivin shRNA 组接种 Survivin shRNA 稳转株, APC 组接种 APC 稳转株,双基因组接种 *Survivin shRNA-APC* 双基因共表达稳转株,均为右腋下接种 0.2 ml。相同条件下饲养裸鼠,观察肿瘤形成情况,于接种 7 周后全部处死,取下移植瘤,测量每组瘤重、计算瘤重抑制率。将移植瘤组织用中性甲醛固定,石蜡包埋切片,采用免疫组织化学法检测确定 P21 和 FHIT 蛋白表达情况。

1.2.4 组织细胞中 P21 和 FHIT 蛋白的表达 根据免疫组织化学试剂盒说明书进行实验。以 PBS 代替一抗作为空白对照。P21 蛋白表达主要定位于细胞核。FHIT 蛋白主要定位于细胞质中。呈棕黄色或棕褐色为阳性表达。

应用半定量积分法计算: ①根据切片中癌细胞染色强度统计,棕褐色为 3 分,棕黄色为 2 分,淡黄

色为 1 分,无染色为 0 分;②根据着色细胞占细胞总数的百分比计分,选取 5 个不同视野在高倍显微镜下(200 倍)计数。 $\geq 76\%$ 为 4 分、 $51\% \sim 75\%$ 为 3 分、 $26\% \sim 50\%$ 为 2 分、 $\leq 25\%$ 为 1 分、无阳性细胞表达为 0 分。①与②的乘积计算出每个标本积分。蛋白表达指数是每组 7 只裸鼠移植瘤切片中 P21、FHIT 蛋白表达强度的总平均值。

1.2.5 瘤重及瘤重抑制率 测量各组肿瘤重量,计算瘤重抑制率。瘤重抑制率 = $(1 - \text{阴性对照组移植瘤的瘤重} / \text{空载组移植瘤的瘤重}) \times 100\%$ 。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较用单因素方差分析,进一步的两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组移植瘤平均瘤重及瘤重抑制率比较

各组平均瘤重比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。APC 组、Survivin shRNA 组、双基因组低于阴性对照组和空载组 ($P < 0.05$),双基因组低于 APC 组、Survivin shRNA 组 ($P < 0.05$)。空载组、APC 组、Survivin shRNA 组及双基因组的瘤重抑制率分别为 $(0.00 \pm 0.00)\%$ 、 $(35.51 \pm 1.38)\%$ 、 $(35.11 \pm 1.30)\%$ 和 $(69.25 \pm 0.13)\%$,差异有统计学意义 ($\chi^2 = 6201.530$,

$P = 0.000$)。APC 组、Survivin shRNA 组、双基因组高于空载组 ($P < 0.05$),双基因组瘤高于 APC 组、Survivin shRNA 组 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 各组 P21、FHIT 蛋白表达水平比较

各组 P21、FHIT 蛋白表达水平比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。APC 组、Survivin shRNA 组、双基因组高于阴性对照组和空载组 ($P < 0.05$),双基因组高于 APC 组、Survivin shRNA 组 ($P < 0.05$)。见表 1。

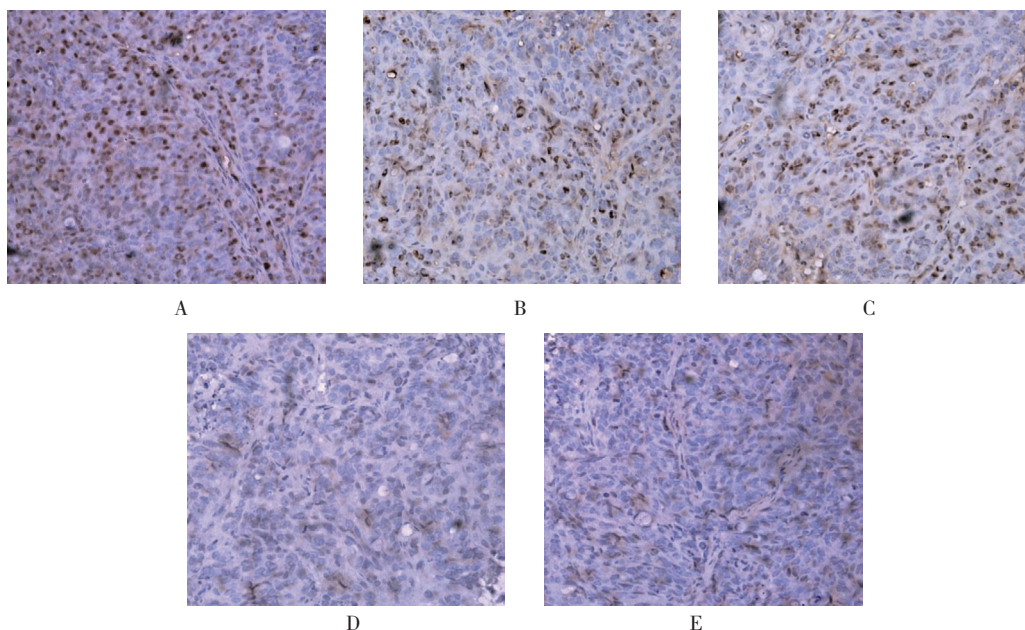
表 1 各组瘤重、P21、FHIT 蛋白表达水平比较

($n=7, \bar{x} \pm s$)

组别	瘤重/g	P21	FHIT
阴性对照组	3.98 ± 0.01	1.58 ± 0.78	1.54 ± 0.75
空载组	3.98 ± 0.01	1.45 ± 0.48	1.46 ± 0.41
APC 组	2.56 ± 0.05	4.84 ± 0.99	4.86 ± 1.11
Survivin shRNA 组	2.58 ± 0.06	4.84 ± 0.87	5.10 ± 1.01
双基因组	1.22 ± 0.00	8.06 ± 0.57	8.49 ± 0.59
<i>F</i> 值	8 156.964	91.601	89.735
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

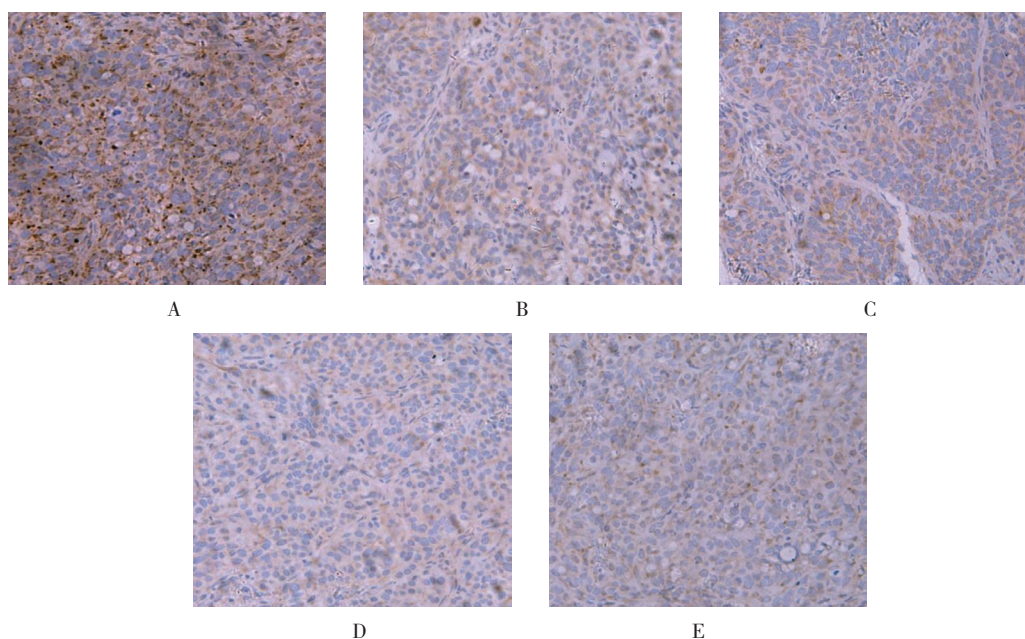
2.3 各组免疫组织化学染色结果

阴性对照组及空载组中 P21、FHIT 蛋白呈较少的淡黄色颗粒。双基因组中 P21、FHIT 蛋白呈现较多棕黄色及棕褐色颗粒。APC 组、Survivin shRNA 组 P21、FHIT 蛋白表达量及着色强度居中。见图 1、2。



A: 双基因组; B: APC 组; C: Survivin shRNA 组; D: 阴性对照组; E: 空载组

图 1 各组移植瘤 P21 蛋白表达 (SABC $\times 200$)



A: 双基因组; B: APC 组; C: Survivin shRNA 组; D: 阴性对照组; E: 空载组

图 2 各组移植瘤 FHIT 的蛋白表达 (SABC × 200)

3 讨论

细胞周期的调控异常将导致细胞增殖过多或凋亡过少^[5]。组织细胞主要通过 G1/S 和 G2/M 2 个限制点来维持细胞周期的正常进行, 而 G1/S 期和 / 或 G2/M 期转换异常, 细胞周期的转换将会失去时序性调控, 发展为细胞增殖过度或凋亡受阻, 导致肿瘤的发生、发展^[6-8]。有研究显示通过影响细胞周期限制点相关因子, 可阻滞细胞周期, 阻止肿瘤的发生、发展^[9-11]。因此, 细胞周期限制点异常可能在结直肠癌发生、发展中起重要作用。

P21 是一种细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白, 对细胞周期起负调控作用^[12-13]。P21 蛋白作为 G1/S 期限制点的调节因子, 抑制细胞周期 G1 至 S 期的转化, 细胞生长停滞在 G1 期^[13-14]。另有研究发现, P21 还可以阻断 G2/M 期限限制点, 导致细胞生长受抑制, 但其机制尚不明确^[15]。FHIT 是抑癌基因, FHIT 蛋白可抑制细胞通过 G1/S 限制点, 并能激活 Caspase-8 产生的 Caspase 酶介导的凋亡级联反应^[16-17]。因此, P21 和 FHIT 可作为细胞周期限制点负性调控的重要因子。

梁素美^[18]、孟茜^[19]和王佩飞等^[20]研究显示 Survivin 可能抑制 P21、FHIT 的表达, 缩短细胞周期, 抑制细胞凋亡, 促进癌细胞增殖。其机制可能是由于 Survivin 基因高表达下调结肠癌细胞中细胞周期调控

因子 P21 和 FHIT 的表达, 引起细胞周期转换异常、凋亡受抑, 失去了对肿瘤细胞的监控, 是肿瘤进展的重要机制之一。

课题组在之前实验中成功构建和挑选出稳定表达的 *Survivin shRNA-APC* 双基因共表达稳转株, 即干扰异常表达的 *Survivin* 基因和补偿 APC 的异常失活相结合, 并分别在体内和体外均证实双基因共表达稳转株有效抑制 HT-29 结肠癌细胞中 *Survivin* 的表达, *Survivin* 基因下调, 可有效促进肿瘤细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞增殖^[2-4]。然而, 尚未见 *Survivin shRNA-APC* 双基因对细胞周期限制点的调控作用研究的有关报道。笔者复制 HT-29 结肠癌细胞裸鼠皮下移植瘤模型, 选择细胞周期相关因子 P21、FHIT 作为研究对象, 探究 *Survivin shRNA-APC* 双基因共表达稳转株对细胞周期限制点关键调控因子的影响。

本实验成功复制 HT-29 结肠癌细胞裸鼠皮下移植瘤模型。实验结果显示, 在蛋白水平上 *Survivin shRNA-APC* 双基因共表达稳转株对移植瘤组织细胞中 P21、FHIT 表达的抑制作用减小, 且效果优于 APC 及 *Survivin shRNA* 单基因稳转株。*Survivin shRNA-APC* 双基因组中 P21、FHIT 的蛋白表达水平最高, 瘤重最小, 瘤重抑制率最高, 均优于其余组。结果提示双基因组较其余组升高细胞周期限制点调控因子 P21、FHIT 的表达水平, 并且对肿瘤生长的抑制作用

最强。

综上所述, *Survivin shRNA-APC* 双基因可能通过下调 *Survivin* 基因表达, 上调 P21、FHIT 在移植瘤组织中的表达, 从而在抑制细胞周期限制点的过度转化、抑制结肠癌移植瘤的生长及促进细胞凋亡等方面发挥作用。并且双基因比单基因作用效果更好。因此, 联合检测 P21、FHIT 的表达水平可能有利于判断结肠癌的预后。*Survivin shRNA-APC* 双基因对细胞周期相关因子 P21、FHIT 调控机制的研究可能为结肠癌细胞周期限制点靶向治疗提供新思路。

参 考 文 献:

- [1] 谭慧心, 董彦宏, 关文辉, 等. 细胞周期调控与肿瘤发生和治疗的关系研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2015, 31(6): 667-670.
- [2] 袁禧先, 隋子奇, 孙理婷, 等. 慢病毒介导 *Survivin shRNA* 与结肠腺瘤息肉易感基因片段联合对 HT-29 细胞的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2015(14): 2250-2255.
- [3] 袁禧先, 段厚羽, 曹锋, 等. *Survivin shRNA* 和 APC 片段双基因的载体构建及其在 HT-29 细胞的表达[J]. 医学研究生学报, 2016, 29(4): 369-374.
- [4] 袁禧先, 温超, 曹雅, 等. *Survivin shRNA-APC* 双基因组共表达慢病毒载体对 HT-29 结肠癌细胞裸鼠皮下移植瘤生长情况的影响[J]. 医学研究生学报, 2017, 30(6): 584-590.
- [5] LIM S, KALDIS P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation[J]. Development, 2013, 140(15): 3079-3093.
- [6] 刘文音. 对细胞周期时程补偿和同步化机制的计算研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2013: 24-28.
- [7] 孙阳, 史默怡, 王亚贤. 中药对肿瘤细胞周期影响的研究进展[J]. 中医药信息, 2013, 29(6): 109-111.
- [8] 张铃, 方翌, 蔡巧燕, 等. 半枝莲阻滞人结肠癌细胞周期的机制[J]. 福建中医药, 2017, 48(1): 24-25.
- [9] 朱翠敏, 高菲菲, 连相尧, 等. 丙戊酸钠联合紫杉醇对人肺腺癌 A549 细胞周期影响及其机制[J]. 兰州大学学报(医学版), 2017, 43(2): 28-32.
- [10] 秦晓平, 詹雄宇, 陈奇彪, 等. 小檗碱增强丝裂霉素 C 诱导的膀胱癌 T24 细胞周期阻滞及凋亡[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(6): 1025-1030.
- [11] 戈佳云, 杨筱燕, 李晓, 等. 慢病毒介导的 FHIT 基因过表达调控人肝癌细胞株生长实验研究[J]. 昆明医科大学学报, 2016, 37(8): 19-23.
- [12] JUNIKU-SHKOLOLLI A, MANXHUKA-KERLIU S, AHMETAJ H, et al. Expression of immunohistochemical markers of progression in pre-cancerous and cancerous human colon: correlation with serum vitamin D level[J]. Anticancer Res, 2015, 35(3): 1513-1520.
- [13] 宋其蔓, 孙洞箫. 细胞凋亡与 p21 关系的研究进展[J]. 医学综述, 2008(6): 816-818.
- [14] 李秋华, 钟军, 郑智. p21(WAF1/CIP1) 介导肿瘤化疗耐药机制的研究进展[J]. 实用癌症杂志, 2014, 29(9): 1193-1195.
- [15] 张芳, 刘铭球, 夏和顺. p21WAF1, *survivin* 与肿瘤[J]. 湖北民族学院学报(医学版), 2007, 24(4): 67-71.
- [16] OHTA M, INOUE H, COTTICELLI M G, et al. The *fhit* gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3; 8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers[J]. Cell, 1996, 84(4): 587-597.
- [17] WATERS C E, SALDIVAR J C, HOSSEINI S A, et al. The FHIT gene product: tumor suppressor and genome "caretaker"[J]. Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS, 2014, 71(23): 4577-4587.
- [18] 梁素美, 文欣轩, 方细堂. 结直肠癌中 *survivin*, caspase-3, p21WAF1 的蛋白表达及其意义[J]. 肿瘤防治研究, 2007(8): 596-599.
- [19] 孟茜. 放射性 ^{125}I 粒子对人肺腺癌裸鼠移植瘤生长抑制及细胞凋亡机制研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2018: 30-32.
- [20] 王佩飞, 陈建武, 郑佩赞, 等. *Survivin*, *fhit* 在结直肠良恶性肿瘤变中的表达及意义[J]. 医学研究杂志, 2008(1): 37-40.

(李科 编辑)