课题研究 · 论著

RNA 干扰 Cdx2 基因沉默对人胃癌裸鼠耐药模型 Survivin 和 C-myc 表达的影响

韦尉元， 孔凡彪， 王晓通， 肖 强

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81060201）；广西自然科学基金资助项目（编号：2011GXNSFA018273）；广西重大疾病防治新技术研究开发项目（编号：桂科攻 1298003-2-6）

作者单位：530021 南宁，广西医科大学第一附属医院胃肠腺体外科
作者简介：韦尉元（1986 - ），男，在读硕士研究生，研究方向：胃癌生物分子学。E-mail：406221047@ qq. com
通讯作者：肖 强（1957 - ），男，主任医师，教授，博士生导师，研究方向：胃癌临床与基础。E-mail：xiaoqiang20050@ yahoo. com. cn

［**摘要**］ **目的** 观察携带人尾型同源盒转录因子 2（Cdx2）基因沉默的重组慢病毒颗粒（Cdx2-RNAi-LV）对人胃癌耐顺铂细胞 SGC-7901/DDP 裸鼠皮下移植瘤中 Survivin 和 C-myc 表达的影响。**方法** 建立人胃癌耐顺铂细胞 SGC-7901/DDP 裸鼠皮下移植瘤模型，36 只裸鼠随机分成 3 组（$n = 12$）：PBS 组、LV-RNAi 组、Cdx2-RNAi-LV 组；各组瘤体内分别注射磷酸盐缓冲液、慢病毒颗粒（0.5×10^8 TU/ml）、含 Cdx2 基因重组慢病毒颗粒（0.5×10^8 TU/ml）相应药物 100 μl，1 次/3 d，共 6 次；同时所有裸鼠腹腔注射药物顺铂（25 mg/kg），隔天 1 次，共 10 次；注射 Cdx2-RNAi-LV 病毒颗粒第 20 天后脱颈椎法处死裸鼠，完整切取肿瘤组织，并应用 PT-PCR 和 Western blot 技术检测移植瘤中 Survivin 和 C-myc 基因的表达。**结果** Cdx2-RNAi-LV 组、LV-RNAi 组和 PBS 组的细胞均有 Survivin、C-myc 的 mRNA 和蛋白的表达，但各组细胞对应的 Survivin、C-myc 的 mRNA 和蛋白的表达水平有差别；Cdx2-RNAi-LV 组 Survivin、C-myc 的 mRNA 和蛋白的表达量较 PBS 组和 LV-RNAi 组明显下调（$P < 0.05$），而 PBS 组和 LV-RNAi 组比较差异无统计学意义（$P > 0.05$）。**结论** Cdx2 基因沉默重组慢病毒颗粒瘤内注射下调人胃癌耐顺铂细胞裸鼠移植瘤 Survivin 和 C-myc 表达，可能是 Cdx2 基因沉默逆转肿瘤的耐药性机制之一。

［**关键词**］ 胃癌； 慢病毒； Cdx2； Survivin； C-myc
［**中图分类号**］ R 332 ［**文献标识码**］ A ［**文章编号**］ 1674 - 3806（2013）02 - 0095 - 04
doi：10. 3969/j. issn. 1674 - 3806. 2013. 02. 01

Effects of RNAi-mediated Cdx2 gene silencing on the expression of Survivin and C-myc in nude mice model of human gastric cancer

WEI Wei-yuan, KONG Fan-biao, WANG Xiao-tong, et al. Department of Gastrointestinal and Gland Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, *China*

［**Abstract**］ **Objective** To investigate the effect of Cdx2 gene silencing of recombinant lentivirus particles (Cdx2-RNAi-LV) on expression of Survivin and C-myc in human gastric cancer SGC-7901/DDP resistant cells transplanted subcutaneously in nude mice. **Methods** The subcutaneous transplantated tumor models in nude mice were established with cell line SGC-7901/DDP of human gastric cancer. The 36 of model mice were randomly divided into 3 groups ($n = 12$): PBS group, LV-RNAi group, Cdx2-RNAi-LV group, each group of tumors were respectively injected with phosphate buffer, the lentivirus particles (0.5×10^8 TU/ml), containing Cdx2 gene recombinant lentiviral particles (0.5×10^8 TU/ml), the corresponding volume of drugs which were all equivalent 100 μl, once every three days for six times. And all mice were intraperitoneally injected with the drug cisplatin (25 mg/kg), once every two days for ten times. After 20 days, all mice were sacrificed and subcutaneous tumors were taken out. Survivin and C-myc mRNA and protein were detected by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. **Results** Among groups of Cdx2-RNAi-LV, LV-RNAi and PBS, the mRNA and protein of Survivin and C-myc were all expressed in cells, but the corresponding expression levels of mRNA and protein in each group cells were not all the same. Compared with LV-RNAi group and PBS group, Survivin and C-myc mRNA and

万方数据

protein were downregulated in Cdx2-RNAi-LV group ($P < 0.05$). However, no significant difference was found between LV-RNAi group and PBS group ($P > 0.05$). **Conclusion** The Cdx2 Gene Silencing of recombinant lentivirus particles intratumorally injected could significantly downregulate the expression of Survivin and C-myc in gastric carcinoma transplanted tumor carried by nude mice, and the down-regulation of Survivin and C-myc expression perhaps is one of the Cdx2 gene silencing reversal of tumor resistance mechanisms.

[**Key words**] Gastric cancer; Lentivirus; Cdx2; Survivin; C-myc

胃癌是最常见的消化道恶性肿瘤,化学药物治疗是其主要的治疗方法之一。然而,对化疗产生耐药是胃癌化疗失败的主要原因。近年来研究发现,肿瘤细胞多药耐药性除与某些耐药基因密切相关外,还与凋亡调控基因如 Survivin 和 C-myc 的异常引起药物耐受性增加有关[1,2]。Takakura 等[3]研究发现,特异性核转录因子尾型同源基因 2(Cdx2)沉默可促进结肠癌细胞凋亡,逆转肿瘤多药耐药的耐药性,但 Cdx2 沉默在肿瘤多药耐药中的作用机制尚不明确。因此,本实验通过 RNA 干扰慢病毒颗粒介导 Cdx2 基因沉默转染人胃癌耐顺铂细胞 SGC-7901/DDP 裸鼠皮下移植瘤,观察 Cdx2 沉默后对 Survivin 和 C-myc 基因表达的影响,探索 Cdx2 基因沉默在胃癌多药耐药中的作用机制。

1　材料与方法

1.1　材料　含 Cdx2 基因沉默的重组慢病毒颗粒由上海 Genechem 公司构建。兔抗人一抗 HA 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,羊抗兔二抗 IgG 抗体购自美国 Pierce 公司。人胃癌耐顺铂细胞株 SGC-7901/DDP 购自中国科学院细胞库(上海)。Trizol 试剂由美国 Invitrogen 公司提供,逆转录试剂盒购自中国上海生工生物公司。40 只 4 ~ 5 周龄雌性 BALB/c 裸鼠,体重 16 ~ 20 g,SPF 级,购自北京维通利华公司[动物许可证编号:scxk(京)2007-0010],在广西医科大学动物实验中心 SPF 级实验室饲养。细胞培养基 RPMI1640 及胎牛血清购自美国 Gibco 公司。

1.2　细胞培养　人胃癌耐顺铂细胞 SGC-7901/DDP,用含 10%(体积分数)胎牛血清培养液并在培养液中加入终浓度为 5 μmol/L 的 DDP 以维持细胞的耐药性,在 37 ℃、5%(体积分数)的 CO_2 孵箱内培养,以 0.25%(质量分数)胰酶和 0.02%(质量分数)的 EDTA 的混合液消化传代。

1.3　人胃癌耐顺铂细胞制备　SGC-7901/DDP 裸鼠皮下移植瘤模型的建立分组及体内转染体外培养人胃癌耐顺铂细胞 SGC-7901/DDP,用无血清的培养基制备浓度为 5×10^6 个/ml 的单细胞悬液;取 4 ~ 5周龄的裸鼠 40 只,选取所有裸鼠左前肢腋窝作为种植部位,缓慢进针至皮下推注人胃癌耐顺铂细胞 SGC-7901/DDP 悬液 0.2 ml(1 × 106 个细胞)/只,正常喂养。40 只裸鼠中移植成瘤 36 只,待所有皮下瘤生长至最大直径≥5 mm 时,随机分为 3 组:PBS 组、LV-RNAi 组和 Cdx2-RNAi-LV 组,每组 12 只,继续饲养。待所有裸鼠皮下瘤生长至最大直径≥10 mm 时,各组瘤体内分别注射磷酸盐缓冲液、病毒颗粒(0.5×10^8 TU/ml)、含 Cdx2 基因病毒颗粒(0.5×10^8 TU/ml)相应药物 100 μl,1 次/3 d,共 6 次;同时所有裸鼠腹腔注射药物顺铂(25 mg/kg),隔天 1 次,共 10 次。注射 Cdx2-RNAi-LV 病毒颗粒第 20 天后脱颈椎法处死裸鼠,完整切取肿瘤组织。

1.4　人胃癌耐顺铂细胞 SGC-7901/DDP 裸鼠皮下移植中 Survivin 和 C-myc mRNA 表达的 RT-PCR 检测　用 Trizol 法提取移植瘤组织总 RNA,按逆转录试剂盒说明逆转录获取 cDNA,PCR 仪扩增。Survivin 上游引物:5′-AAATGCACTCCAGCCTCTGT-3′,下游引物:5′-TGTCGAGGAAGCTTTCAGGT-3′,长度为 311 bp;C-myc 上游引物:5′-TTCTCTCCGTCCTCGGATTC-3′,下游引物:5′-GTAGTTGTGCTGATGTGTGG-3′,长度为 282 bp;内参 DAPDH 上游引物:5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′,下游引物:5′-TCACCACCCTGTTGCTGTA-3′,长度为 450 bp。反应条件:94 ℃预变性 4 min;30 个循环,94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s;72 ℃延伸 5 min。取 3 μl PCR 产物经 2% 非变性琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像获取图片经 Quantity One 软件分析,对 Survivin 和 C-myc 基因与其内参灰度值的比值进行半定量比较,然后在组间相互比较。

1.5　人胃癌耐顺铂细胞的 Western blot 检测　SGC-7901/DDP 裸鼠皮下移植中 Survivin 和 C-myc 基因蛋白的表达取 0.1 g 瘤体使用组织裂解液提取总蛋白,用 BCA 法测定蛋白含量。取 100 ~ 125 μg 蛋白在 10% SDS-PAGE 胶上电泳,后转移至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF 膜),用 TBST 配制 5% 脱脂奶分别加入兔抗人 Survivin、C-myc 抗体,于常温孵育 1.5 h;加入羊抗兔抗体 IgG(1∶12 000),

万方数据

常温孵育30 min,胶片曝光显影,以 GAPDH 为内参照。

1.6 统计学方法 应用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较采用 t 检验,多组比较采用单因素方差分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

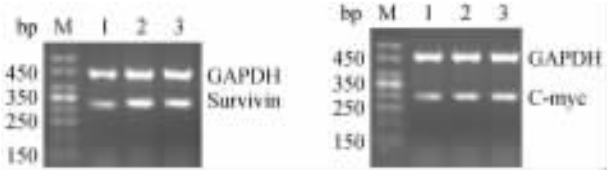
2 结果

2.1 Cdx2 基因沉默对裸鼠人胃癌耐顺铂细胞 SGC-7901/DDP 移植瘤 Survivin 和 C-myc mRNA 表达量的影响 RT-PCR 结果表明,Cdx2-RNAi-LV 组、LV-RNAi 组和 PBS 组的细胞均有 Survivin 和 C-myc mRNA 的表达,但各组细胞对应的 Survivin 和 C-myc mRNA 的表达水平有差别;Cdx2-RNAi-LV 组 Survivin mRNA 的表达量明显低于 LV-RNAi 组及 PBS 组(P 均 <0.05),C-myc mRNA 的表达量低于 LV-RNAi 组及 PBS 组(P 均 <0.05);PBS 组与 LV-RNAi 组各自的 Survivin、C-myc mRNA 的表达量比较,差异无统计学意义(P 均 >0.05)。见表 1,图 1。

表 1 三组两种基因 mRNA 表达量的比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	例数	Survivin mRNA 表达量	C-myc mRNA 表达量
PBS 组	10	0.28 ± 0.05	0.92 ± 0.18
LV-RNAi 组	10	0.26 ± 0.06#	0.98 ± 0.21#
Cdx2-RNAi-LV 组	10	0.14 ± 0.03※▲	0.21 ± 0.12※▲
F	–	10.92	14.43
P	–	0.000	0.000

注:与 PBS 组比较,※$P<0.05$,#$P>0.05$;与 LV-RNAi 组比较,▲$P<0.05$



M,500 bp marker; 1 Cdx2-RNAi-LV 组; 2 LV-RNAi 组; 3 PBS 组

图 1 RT-PCR 检测 Survivin 和 C-myc mRNA 的表达

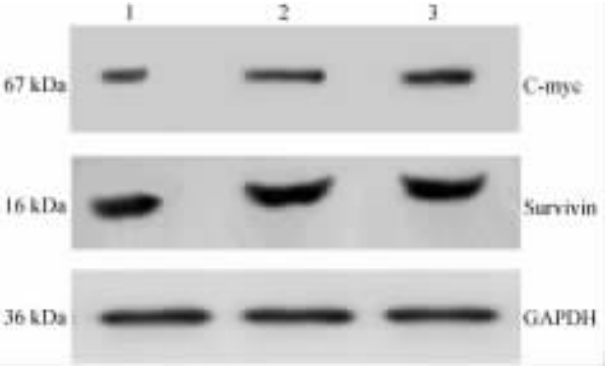
2.2 Cdx2 基因沉默对裸鼠人胃癌耐顺铂细胞 SGC-7901/DDP 移植瘤 Survivin 和 C-myc 蛋白表达量的影响 Western blotting 检测结果显示,Cdx2-RNAi-LV 组、LV-RNAi 组和 PBS 组的细胞均有 Survivin 和 C-myc 蛋白的表达,但各组细胞对应的 Survivin 和 C-myc 蛋白的表达水平有差别;Cdx2-RNAi-LV 组 Survivin 蛋白表达量低于 LV-RNAi 组及 PBS 组(P 均 <0.05),C-myc 蛋白表达量低于 LV-RNAi 组及 PBS 组(P 均 <0.05);PBS 组与 LV-RNAi 组各自的 Survivin、C-myc 蛋白表达比较,差异无统计学意义(P 均 >0.05)。见表 2,图 2。

万方数据

表 2 三组两种基因蛋白表达量的比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	例数	Survivin 蛋白表达量	C-myc 蛋白表达量
PBS 组	10	0.77 ± 0.08	1.72 ± 0.26
LV-RNAi 组	10	0.82 ± 0.09#	1.76 ± 0.35#
Cdx2-RNAi-LV 组	10	0.26 ± 0.02※▲	1.03 ± 0.12※▲
F	–	20.51	13.32
P	–	0.000	0.000

注:与 PBS 组比较,※$P<0.05$,#$P>0.05$;与 LV-RNAi 组比较,▲$P<0.05$



1 Cdx2-RNAi-LV 组; 2 LV-RNAi 组; 3 PBS 组

图 2 Western blot 检测 Survivin 和 C-myc 蛋白的表达

3 讨论

3.1 Cdx2 基因是尾型同源盒基因家族的成员之一,研究发现 Cdx2 的高表达可阻碍化疗药物甲氨蝶呤(MTX)破坏细胞,与肿瘤耐药密切相关[4]。Survivin 是今年发现的一种凋亡抑制蛋白家族成员,其具有抑制细胞凋亡和促进细胞异常增殖的作用[5]。C-myc 属于核蛋白类调控基因,已证明其基因产物 C-myc 蛋白在许多肿瘤中存在着异常表达[6]。我们前期研究显示,Cdx2 沉默抑制 Survivin 的表达,诱导胃癌细胞的凋亡[7]。近年来研究也表明,Survivin、C-myc 过表达可使肿瘤细胞能耐受抗癌药物诱导细胞凋亡[8,9],而凋亡是多种抗癌药物发挥作用的一个共同途径,能耐受抗癌药物诱导凋亡的细胞最终形成了对化疗药物耐药。因此,探索 Cdx2 沉默对凋亡抑制基因 Survivin、C-myc 表达的影响,研究其逆转肿瘤耐药可能的机制具有重要意义。

3.2 研究结果表明,在各组同时应用化疗药物顺铂腹腔注射治疗,经含 RNA 干扰 Cdx2 基因沉默慢病毒颗粒对瘤体进行感染 20 天后的 Cdx2-RNAi-LV 组与 LV-scrRNAi 组和 PBS 组比较,肿瘤体积生长明

显减小,肿瘤细胞凋亡明显增多,Cdx2 的蛋白表达明显下降(另文发表)。本研究表明,Cdx2-RNAi-LV 组 Survivin、C-myc 的 mRNA 和蛋白的表达量显著降低,提示 Cdx2 基因沉默可使 Survivin、C-myc 表达下调,进而增加人胃癌耐顺铂细胞对顺铂药物的敏感性。而 Cdx2 基因沉默使 Survivin、C-myc 表达下调逆转耐药的机制主要解释为:(1)Survivin 的表达水平下降,在 mRNA 和蛋白水平上 Caspase-3、Caspase-9 和 Bax 表达增加[10,11],从而间接解除了 Survivin 过表达对 Caspase-9、Caspase-3、Bax 基因表达的抑制作用,启动了凋亡的信号通路,诱导肿瘤细胞凋亡;(2)SPK2 癌基因是 C-myc 的直接靶基因,C-myc 表达下调引起 SKP2 表达下降,从而解除了 SKP2 对 p27 的抑制[12],而 p27 基因高表达通过 EGFR/PI3K/Akt 信号通路可使细胞 DNA 合成受抑制,细胞停止于 G 期,从而抑制细胞的分裂和增殖,最终抑制肿瘤细胞增殖[13]。因此,本实验中,Cdx2 基因沉默在体内可促进耐药细胞凋亡和抑制肿瘤的生长,逆转胃癌耐药性,极有可能与下调 Survivin 和 C-myc 的表达,并间接通过启动肿瘤多药耐药细胞凋亡程序而发挥作用有关。

3.3　综上所述,本实验成功构建人胃癌耐顺铂细胞 SGC-7901/DDP 裸鼠皮下移植瘤模型,Cdx2 基因沉默能够有效抑制 Survivin 和 C-myc 的表达,从而逆转胃癌耐药性,很可能与通过进一步间接调节 Caspase-9、Caspase-3、Bax 和 p27 凋亡信号有关,但以上的具体机制需要进一步实验证实。因此,我们将会在未来的实验中,进一步探讨 Cdx2 基因沉默逆转胃癌细胞多药耐药性的可能具体作用机制。

参考文献

1 Choudhuri S, Klaassen CD. Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters [J]. Int J Toxicol, 2006, 25(4): 231 – 259.

2 He Y, Zhang J, Zhang J. Study on the relationship between the abnormal expression of c-myc and multidrug resistance in KB cell lines [J]. Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi, 2000, 35(6): 454 – 456.

3 Takakura Y, Hinoi T, Oue N, et al. Cdx2 regulates Multidrug Resistance 1 gene expression in malignant intestinal epithelium[J]. Cancer Res, 2010, 70(17): 6767 – 6778.

4 de Koning BA, Lindenbergh-Kortleve DJ, Pieters R, et al. The effect of cytostatic drug treatment on intestine-specific transcription factors Cdx2, GATA-4 and HNF-1alpha in mice [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2006, 57(6): 801 – 810.

5 Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, surviving, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917 – 921.

6 Hatakeyama S, Watanabe M, Fujii Y, et al. Targeted Destruction of c-Myc by an Engineered Ubiquit in Ligase Suppresses Cell Transformation and Tumor Formation[J]. Cancer Res, 2005, 65(17): 7874 – 7879.

7 杨　杰,王晓通,谢玉波,等. Cdx2-siRNA 对胃癌细胞 Survivin 和 Caspase-9 表达的影响[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(3): 345 – 347.

8 Tsubaki M, Satou T, Itoh T, et al. Overexpression of MDR1 and survivin, and decreased Bim expression mediate multidrug-resistance in multiple myeloma cells[J]. Leuk Res, 2012, 36(10): 1315 – 1322.

9 He Y, Zhang J, Zhang J, et al. The role of c-myc in regulating mdr1 gene expression in tumor cell line KB[J]. Chin Med J (Engl), 2000, 113(9): 848 – 851.

10 Wang XT, Xie YB, Xiao Q. siRNA targeting of Cdx2 inhibits growth of human gastric cancer MGC-803 cells[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(16): 1903 – 1914.

11 Li J, Wang H, Ma Z, et al. TAT-Apoptin induces apoptosis in the human bladder cancer EJ cell line and regulates Bax, Bcl-2, caspase-3 and survivin expression[J]. Exp Ther Med, 2012, 3(6): 1033 – 1038.

12 Bretones G, Acosta JC, Caraballo JM, et al. SKP2 oncogene is a direct MYC target gene and MYC down-regulates p27(KIP1) through SKP2 in human leukemia cells[J]. J Biol Chem, 2011, 286(11): 9815 – 9825.

13 Chen J, Xia D, Luo JD, et al. Exogenous p27KIP1 expression induces anti-tumour effects and inhibits the EGFR/PI3K/Akt signalling pathway in PC3 cells[J]. Asian J Androl, 2009, 11(6): 669 – 677.

[收稿日期　2012 – 11 – 12][本文编辑　黄晓红　韦　颖]

《中国临床新医学》杂志编辑部启事

为了加强与市、县医疗单位的交流与合作,提高广大业务技术人员医学论文的写作水平,《中国临床新医学》杂志编辑部的有关专家将分期分批赴各市、县医疗卫生单位进行“医学论文写作”、“医学文献检索”和“医学统计学应用”等有关方面的学术讲课。各医疗卫生单位如有这方面的需求,敬请与编辑部联系。联系电话:0771 – 2186013。

· 本刊编辑部 ·

万方数据