

技术前沿

DOI: 10.11699/cyxh20131206

肿瘤特异性启动子 Survivin 调控 shRNA 腺病毒的构建及对 HepG-2 细胞中 CD133 基因表达的抑制

李 芳¹, 邹冬玲², 曹 姝¹, 李少林¹

(1. 重庆医科大学基础医学院放射医学教研室, 重庆 400016; 2. 重庆市肿瘤医院妇产肿瘤科, 重庆 400016)

【摘要】目的:构建肿瘤特异性启动子 Survivin 驱动的小发夹 RNA(shRNA), 通过下调 HepG-2 肝癌细胞中 CD133 的表达, 探讨其对肝癌细胞增殖和侵袭能力的影响。**方法:**①构建 pEntr-Surp-shRNA 真核表达载体, 转染 HepG-2 肝癌细胞, Hela 细胞, 293T 细胞。②设计 shRNA 干扰片段, 筛选干扰最佳干扰效率的 CD133 干扰片段, 重组载体 pAd.Surp-shRNA972, pAd.Surp-shRNA2377, pAd.Surp-shRNA485 并筛选出稳定表达 shRNA 的转染克隆。③Ad.Surp-shRNA972, Ad.Surp-shRNA2377, Ad.Surp-shRNA485 腺病毒分别转染 HepG-2 肝癌细胞株, 建立 Ad.Surp-shRNA972, Ad.Surp-shRNA2377, Ad.Surp-shRNA485 实验组, 未转染腺病毒组为空白组。感染肝癌细胞株, 应用 RT-PCR 和 Western blot 检测 CD133 mRNA 和蛋白的表达, MTT 法和 Transwell 法检测细胞体外增殖和侵袭能力。**结果:**①成功构建了 Survivin 启动子调控的 shRNA 真核表达载体 pEntr-Surp-shRNA, 在 293T 细胞株无荧光, 而在 Hela、HepG-2 细胞株中荧光表达明显, 证实 Survivin 具有肿瘤特异性。②成功包装 Ad.Surp-shRNA972, Ad.Surp-shRNA2377, Ad.Surp-shRNA485 腺病毒。③RT-PCR 和 Western blot 检测显示 Ad.Surp-shRNA972、Ad.Surp-shRNA2377, 有封闭 CD133 mRNA 和蛋白表达的效果; 计算实验组与空白组相比 mRNA 抑制率分别为 $(63.44 \pm 0.02)\%$ 、 $(56.98 \pm 0.03)\%$; Ad.Surp-shRNA972、Ad.Surp-shRNA2377、Ad.Surp-shRNA485 组蛋白抑制率分别为 $(55.43 \pm 0.40)\%$ 、 $(48.65 \pm 0.20)\%$ 、 $(34.67 \pm 0.40)\%$; 实验组细胞的增殖和侵袭能力也受到明显抑制, Ad.Surp-shRNA972 组生长抑制率为 $(72.88 \pm 0.74)\%$, Ad.Surp-shRNA2377 组生长抑制率为 $(59.90 \pm 0.87)\%$, Ad.Surp-shRNA485 组生长抑制率为 $(30.18 \pm 0.95)\%$ 。**结论:**肿瘤特异性启动子 Survivin 调控腺病毒介导的 shRNA 能显著下调 CD133 基因的表达, 抑制肝癌细胞株 HepG-2 的增殖和减弱其侵袭力。

【关键词】Survivin; CD133; 小发夹 RNA; 肝癌**【中国图书分类号】**Q754**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-02-21

Regulation of shRNA adenovirus construction by tumor specific promoter Survivin and inhibitory effect of Survivin on expression of CD133 gene in HepG-2 cells

LI Fang¹, ZOU Dongling², CAO Shu¹, LI Shaolin¹

(1. Teaching and Research Section of Radiology, Basic Medical College, Chongqing Medical University;

2. Department of Maternity Oncology, Chongqing Tumor Hospital)

【Abstract】Objective: To construct small hairpin RNA driven by tumor specific promoter Survivin and to discuss the effects of down-regulating CD133 expression in HepG-2 cells line on proliferative and invasive ability of hepatoma cell. **Methods:** ① pEntr-Surp-shRNA eukaryotic expression vector was built and HepG-2 cells, Hela cells and 293T cells were transfected. ② shRNA interference fragments were designed and CD133 interference fragments with the best effect were screened out. Carriers were reconstructed; Ad.Surp-shRNA972, Ad.Surp-shRNA485, Ad.Surp-shRNA2377 adenovirus were packed; stable expression of shRNA transfection cloning was screened out 972, 2377, 485 experimental groups were established by transfecting HepG-2 cells with Ad.Surp-shRNA972, Ad.Surp-shRNA2377, Ad.Surp-shRNA485; untransfected group was taken as blank control group RT-PCR and Western blot were used to test CD133 mRNA and protein expression; MTT and Transwell method were used to detect the proliferative and invasive ability of cell in vitro. **Results:** ① Survivin promoter regulated shRNA eukaryotic expression vector of pEntr-Surp-shRNA was successful constructed. Fluorescence was seen in Hela and HepG-2 cells but not in 293T cells indicating tumor specificity of Survivin promoter. ②

作者介绍: 李 芳, Email: lifang19878687@163.com,

研究方向: 肿瘤放射。

通信作者: 李少林, Email: Shaolinli202@sina.com,**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81171365)。

Adenovirus of Ad.Surp-shRNA972, Ad.Surp-shRNA2377 and Ad.Surp-shRNA485 were successfully packaged. ③ According to results of RT-PCR and Western blot, mRNA and protein levels were inhibited significantly by Ad.Surp-shRNA972 and

Ad.Surp-shRNA2377 mRNA inhibition rates were $(63.44 \pm 0.02)\%$ and $(56.98 \pm 0.03)\%$ in experiment group and blank group and protein inhibition rates were $(55.43 \pm 0.40)\%$, $(48.65 \pm 0.20)\%$, $(34.67 \pm 0.40)\%$ in Ad.Surp-shRNA972 group, Ad.Surp-shRNA2377 group and Ad.Surp-shRNA485 group. Cell proliferative and invasive abilities of cells in experiment group were inhibited with inhibition rates of $(72.88 \pm 0.74)\%$, $(59.9 \pm 0.87)\%$ and $(30.18 \pm 0.95)\%$ in Ad.Surp-shRNA972 group, Ad.Surp-shRNA2377 group and Ad.Surp-shRNA485 group. **Conclusions:** Tumor specific promoter Survivin regulating adenovirus mediated shRNA can decrease CD133 suppression and inhibit proliferation and invasiveness of HepG-2 hepatoma cell.

【Key words】Survivin; CD133; shRNA; hepatoma

原发性肝细胞癌是一种严重影响人类健康的恶性肿瘤,我国是世界上肝癌高发区之一,位于常见肿瘤的第3位。虽然目前临床上可用于治疗肝癌的手段比较多,包括手术切除、肝移植、血管介入、放化疗等,但效果并不令人满意^[1]。随着分子生物学的飞速发展,分子靶向治疗已成为当今肝癌防治研究的热点。近年研究表明肝细胞癌中存在少量的肿瘤干细胞或肿瘤生成细胞^[2-3]。这种干细胞具有自我增殖和分化成非干细胞的其他肿瘤细胞的能力。与非干细胞的其他肿瘤细胞比较,肿瘤干细胞具有明显的抗化疗特性^[4]。虽然近年来对肿瘤的治疗有了新的进展,但是肿瘤患者术后因耐药而发生的肿瘤转移和复发使得癌症根治成为世界难题。

人 CD133 是由 PROM1 基因编码的 5 次跨膜糖蛋白,其基因定位于人类的 4 号(4p16.12p1)和 2 号染色体上^[5]。Liu 等^[6]研究了从胶质瘤患者体内获取的细胞,发现 CD133⁺细胞比 CD133⁻细胞表达更高水平的神经前体细胞标志物 CD90、CD44、CXCR4、Nestin 等。另有报道^[7],CD133⁺细胞上调表达腺嘌呤核苷三磷酸泵相关 ABCG5。Frank 等^[8]发现 CD133⁺/ABCG5 黑色素瘤对阿霉素不敏感,从患者体内分离的黑色素瘤细胞表达高水平的 CD133 和 ABCG5,而 CD133⁺的肿瘤细胞抗化疗药物的作用明显高于 CD133⁻的肿瘤细胞这种现象与 ABCB5 跨膜转运蛋白的功能增强有关,表明其两者可能是肿瘤耐药的一个关键分子,有可能成为一个治疗的有效靶点^[9]。有研究表明在 CD133⁺肺癌的转移跟 OCT-4 通道有关系^[10]。因此,本研究利用 RNA 干扰技术构建靶向抑制 CD133 的腺病毒并转染 HepG-2 细胞株,观察 CD133 的下调对肝癌细胞增殖、转移、侵袭能力的影响,为靶向 CD133 的基因治疗提供实验基础。

Survivin 是新发现的最强的凋亡抑制蛋白家族成员之一^[11]。Survivin 具有广泛的肿瘤表达谱,它广泛表达于人类各种肿瘤组织,但在正常、分化末期的成人组织中不表达(除正在血管形成期的基底上、内皮细胞、睾丸和分泌期子宫内膜外)。国内外大量

研究表明 Survivin 比人端粒反转录酶具有更广泛的肿瘤表达谱,有更好的肿瘤靶向性并对正常细胞无任何毒副作用^[12],因此设计由 Survivin 启动子驱动腺病毒目的基因的表达,减少对周围正常组织的损伤。

1 材料和方法

1.1 材料

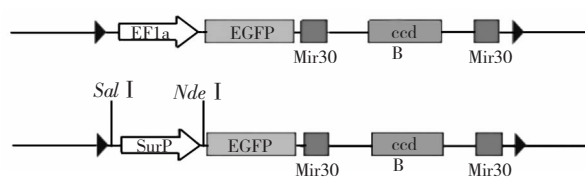
1.1.1 细胞、细菌及质粒 人肝癌细胞株 HepG-2、宫颈癌细胞株 Hela、293T 细胞、pEntr-EF1-shRNA 质粒、感受态细菌 TOP10(军事医学科学院)。

1.1.2 试剂 新生胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、RP-MI1640 及 DMEM 培养(Gibco), Gateway 试剂盒(美国 Life technologies company),各种限制性内切酶、RNA、DNA 试剂提取盒(Promega corporation), MTT 试剂盒、CD133 抗体 (OriGene Company), Transwell 试剂盒(B.D company)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 操作步骤:HepG-2、Hela 细胞株用含 10% FBS 高糖 DMEM 培养液,置于 37℃、体积分数为 5%CO₂ 的细胞培养箱内培养;293T 细胞用含有 10%的 FBS, 100 IU/ml 盘尼西林培养基中培养,倒置显微镜下观察细胞生长情况,每 3 d 用含乙二胺四乙酸的胰酶消化、传代培养。

1.2.2 肿瘤特异性启动子 Survivin 真核载体的构建 操作步骤:参考试剂盒说明书提取 HepG-2 细胞基因组 DNA。根据 GeneBank(-222 到+39)提供的 Survivin 启动子基因序列及 pEntr 载体上的酶切位点设 Sal I 和 Nde I 酶切位扩增片段上游引物序列:5'-GTTCGACGTCAAAAGGCCATAGCGGC-CGC-3',下游引物序列:5'-GGAATTCATATGGAATTCC-3';扩增片段大小 270 bp,将 Survivin 启动子克隆到 pEntr-EF1-shRNA 上,以替换 EF1 启动子,构建 pEntr-Surp-shRNA 真核表达载体^[13](图 1)。pEntr-Surp-shRNA 转染 Hela、HepG-2、293T 细胞株。RT-PCR 检测绿色荧光蛋白,反应引物上序列:5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3';下游引物序列:5'-TTCAGGGTCAGCTTGCCTAGGTG-3',长度 200 bp。反应体系 94℃ 2 min, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 94℃ 2 min 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环, 72℃ 10 min 取出后 4℃ 5 min 后取扩增样品在 1.5%的琼脂糖凝胶电泳 0.5 h,凝胶图像分析仪分析结果。



EGFP:增强型绿色荧光蛋白

图1 pEntr-EF1-shRNA 结构图

Fig.1 Construction of pEntr-EF1-shRNA

1.2.3 设计引物和基因重组 操作步骤:根据 GeneBank 中 CD133 的核苷酸序列,参考 Ambion 公司设计 shRNA 的设计原则,设计 3 条干扰序列 GCTCAGAACTTCATCACAAAC(起始位置 2377)、AAGCCAGAACTGTAATCTTAG(起始位置 485)、ATGAGATTAAGTCCATGGCAAC(起始位置 972),通过 BLAST SEARCH 检索确定 3 个干扰片段与人类的其他基因不同源;将 3 个干扰片段切成 6 个小的片段,送华大基因公司合成 12 条核苷酸片段;切除 pEntr-Surp-shRNA 中的 shRNA,通过 T4 连接酶的作用,将合成好的 shRNA927、shRNA485、shRNA2377 分别连接到 pEntr-Surp 载体上;构建好的 pEntr-Surp-shRNA 通过 Gateway 试剂盒重组腺病毒质粒 pAd.Surp-shRNA,产物转化 TOP10 感受态细菌,卡那霉素, LB 平板,置于 37℃、体积分数为 5%CO₂ 的细胞培养箱内培养 12 h,每个板挑选 3 个阳性克隆摇菌过夜培养,提取质粒, Pac I 酶切鉴定,送华大基因公司测序。

1.2.4 包装腺病毒 操作步骤:在 293A 细胞中包装 Ad.Surp-shRNA;转染前 24 h 以 1×10⁵ 个/孔的密度接种 293A 细胞于 6 孔板。以无抗生素的 10%FBS RPMI1640 培养基,37℃、5% CO₂;培养箱中培养至 50%~70%融合状态备用。Pac I 线性化 pAD-Survivin,Lipofectamine2000 将线性化的 pAd.Surp-shRNA 转染到 293A 细胞,8 d 收集细胞,900 r/min,2 ml 灭菌磷酸盐缓冲液重悬,反复冻融,离心收集上清液,此为低滴度的病毒原液 Ad.Surp-shRNA,取 50%病毒原液反复感染 293A,13 000 r/min 收集上清,可得到高滴度腺病毒。

1.2.5 Western blot 检验目的蛋白表达 操作步骤:收集各组细胞 1×10⁶ 个,加入细胞裂解液提取细胞总蛋白,取 50 μg 总蛋白进行变性,聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转印至聚偏氟乙烯膜,加入 CD133 一抗封闭过夜,再加入辣根过氧化物酶标记的二抗 37℃温育 2 h,TBST 洗 3 次后化学发光显影采集图片结果,GAPDH 设置为内参。

1.2.6 MTT 法分析细胞相对数和相对活力 操作步骤:接种细胞:用含有 10%FBS 培养液配成单个细胞悬液。以每孔 10 000 个细胞接种到 96 孔板,每孔体积 200 μl,培养细胞。培养 2 d 后每孔加入 MTT 溶液,继续孵育 4 h 终止培养。稀释孔内培养上清液,每孔加 200 μl 二甲基亚砜振荡 10 min 使结晶物充分溶解。

1.2.7 RT-PCR 检查 CD133 mRNA 干扰情况 操作步骤:收集各组细胞 1×10⁶ 个,并提取总 RNA;取 2 μl RNA 为模版逆转录为 cDNA 再进行 PCR 反应。扩增条件为室温 10 min 42℃延伸 15 min,95℃延伸 5 min,冰上 5 min,PCR 反应时

间约 4.5 h,25 mmol/L MgCl₂ 2 μl,10 倍 PCR 缓冲液 5 μl,10 mmol/L dNTP 1 μl,CD133 上游引物:5'-GATTCATACTGGT-GGCTGGGTGG-3';下游引物:5'-GCAGGTGAAGAGTCCG-TAAGT-3',产物大小为 436 bp。内参 β-actin 上游引物:5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3';下游引物:5'-GGGCACG-AAGGCTCATCATT-3',大小为 300 bp,取扩增样品在 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳 0.5 h,凝胶图像分析仪分析结果,Quantity one 软件分析抑制率。

1.2.8 Transwell 分析细胞侵袭力的改变 操作步骤:按照 BD 公司 Transwell 小室说明书的步骤,将小室放入培养板中,在上室加入 300 μl 预温的无血清培养基,室温下静置 30 min,使基质胶再水化。再吸去剩余培养液,制备细胞悬浮液,取细胞悬液 200 μl 加入 Transwell 小室,细胞密度为 5×10⁶ 个/ml 24 孔板下室加入 500 μl 含 FBS 的培养基,37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 48 h 结晶紫染色直接细胞计数,光学显微镜(200×)拍照。

1.3 结果判定

1.3.1 Western blot 技术图像分析 显影结果经 Quantity one 软件进行图片分析,计算净光密度值,并以 Bio-image Analysis System 进行半定量分析,结果以相对密度值(relative optical density,ROD)×面积(mm²)表示,蛋白的相对含量=(目的蛋白条带 ROD×mm²)/GAPDH 条带 ROD×mm²。

1.3.2 MTT 细胞抑制率的检测分析 在酶联免疫监测仪上测定各孔光吸收值,比色选择 490 nm 波长,记录结果并按公式计算细胞生长抑制率:生长抑制率(%)=1-实验组 A_{490nm} 值/对照组 A_{490nm} 值,以时间为横坐标,生长抑制率为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.4 统计学处理

实验结果用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,所得计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,均数间比较采用单因素方差分析,以 P≤0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 酶切测序结果

Pac I 酶切显示 2 条切割带,测序结果正确,分子量大小与酶切大小符合证实重组质粒构建成功,结果见图 2。

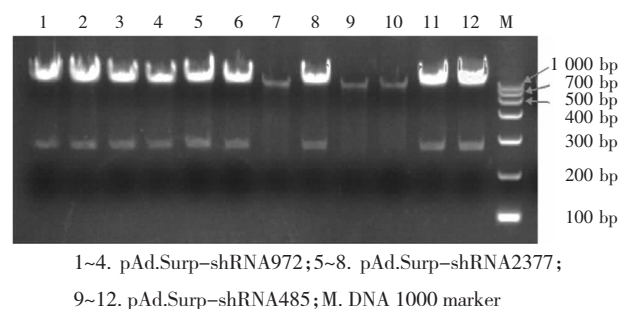


图2 重组质粒 Pac I 酶切鉴定电泳图

Fig.2 Enzyme electrophoresis map for recombinant plasmid

Pac I

2.2 流式细胞仪分析病毒滴度

R60-2 的病毒滴度较高,通过公式计算病毒滴度为 7.01×10^{10} TU/ml 结果见图 3,将包装好的病毒感染 HepG-2、293T 细胞株。培养 72 h 后荧光显微镜观察病毒感染细胞情况。

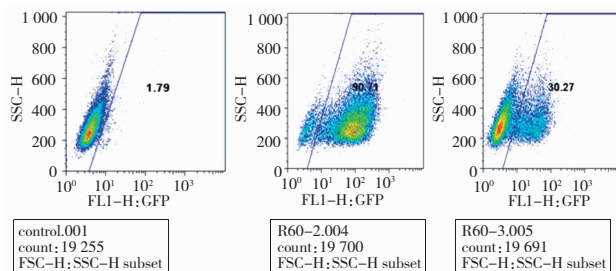


图 3 腺病毒包装流式测滴度

Fig.3 Adenovirus packing titer measured by flow cytometry

2.3 检验 Survivin 特异性启动子

Survivin 启动子在 HeLa、HepG-2 细胞株中启动效果明显,而在 293T 细胞株中无荧光表达,证实 Survivin 基因具有肿瘤特异性,构建的 pEntr-Surv-shRNA 质粒具有肿瘤特异性启动效果,结果见图 4。

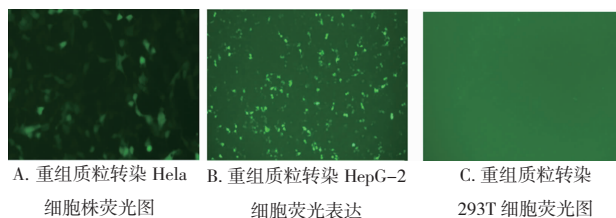


图 4 质粒转染后细胞荧光表达情况 (100 ×)

Fig.4 Fluorescence expressions after plasmid transfection (100 ×)

2.4 腺病毒包装成功

Ad.Surp-shRNA972、Ad.Surp-shRNA2377、Ad.Surp-shRNA485 腺病毒成功在 293T 细胞株中复制扩增且在 HepG-2 细胞中成功表达目的基因,荧光明显,结果见图 5。

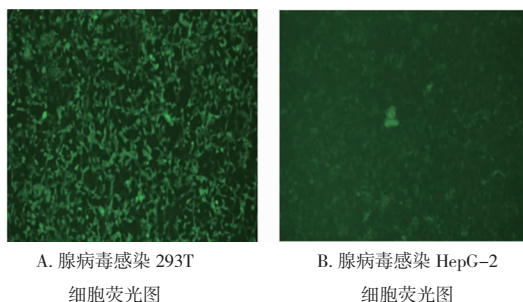


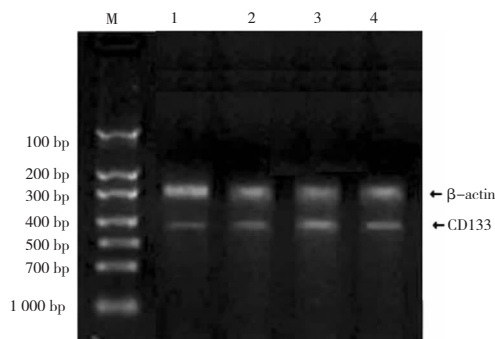
图 5 腺病毒转染后细胞荧光表达情况 (100 ×)

Fig.5 Fluorescence expressions after adenovirus transfection (100 ×)

2.5 RT-PCR 分析各组 CD133 mRNA 表达情况

PR-PCR 结果见图 6, Ad.Surp-shRNA972、Ad.Surp-shRNA2377 组 CD133 mRNA 表达水平和未处理组相比明显降低。

灰度分析结果示 Ad.Surp-shRNA972、Ad.Surp-shRNA2377、Ad.Surp-shRNA485、空白组灰度值分别为 96.60 ± 4.67 、 102.10 ± 3.68 、 167.76 ± 4.51 、 173.10 ± 3.53 ;通过计算实验组与空白组相比 mRNA 抑制率分别为 $(63.44 \pm 0.02)\%$ ($P=0.013$)、 $(56.98 \pm 0.03)\%$ ($P=0.026$),而 Ad.Surp-shRNA485 组 mRNA 表达水平与空白组相比差异无统计学意义 ($P=0.192$),未封闭 CD133 mRNA 表达。

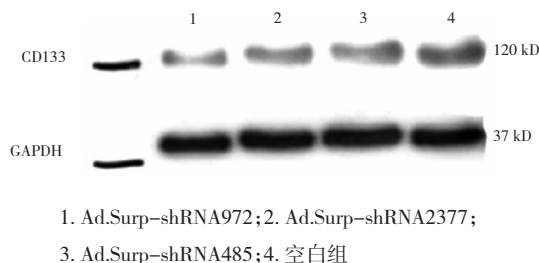


1. Ad.Surp-shRNA972; 2. Ad.Surp-shRNA2377;
3. Ad.Surp-shRNA485; 4. 空白组; M. DNA1000 marker

图 6 RT-PCR 检测 CD133 基因 mRNA 表达情况凝胶电泳图
Fig.6 Gel electrophoresis figure of CD133 mRNA expression detected by RT-PCR

2.6 Western blot 检测各组蛋白表达水平

Western blot 结果见图 7, Ad.Surp-shRNA972、Ad.Surp-shRNA2377、Ad.Surp-shRNA485 实验组与空白组相比,蛋白表达明显降低。通过图像灰度值分析实验组 CD133 蛋白表达水平灰度值分别为 73.34 ± 2.98 、 78.58 ± 3.41 、 83.35 ± 2.45 、 102.95 ± 4.89 ,图像分析结果显示实验组与空白组相比 CD133 蛋白抑制率分别为 $(55.43 \pm 0.40)\%$ ($P=0.024$)、 $(48.65 \pm 0.20)\%$ ($P=0.019$)、 $(34.67 \pm 0.40)\%$ ($P=0.020$),说明腺病毒介导的 CD133 shRNA 能在蛋白水平上下调肝癌细胞中 CD133 的表达。



1. Ad.Surp-shRNA972; 2. Ad.Surp-shRNA2377;
3. Ad.Surp-shRNA485; 4. 空白组

图 7 Western blot 检测 HepG-2 细胞中 CD133 蛋白表达情况
Fig.7 CD133 protein expressions in HepG-2 cells detected by Western blot

2.7 MTT 检测细胞增殖情况

Ad.Surp-shRNA972 组抑制率为 $(72.88 \pm 0.74)\%$, Ad.Surp-shRNA2377 组抑制率为 $(59.9 \pm 0.87)\%$, Ad.Surp-shRNA485 组抑制率为 $(30.18 \pm 0.95)\%$, Ad.Surp-shRNA972 组抑制率 $(72.88 \pm 0.74)\%$ 明显高于 Ad.Surp-shRNA2377、Ad.Surp-shRNA485 组。

($P=0.031$)。实验结果说明实验组抑制细胞生长的作用明显,根据实验数据绘制细胞生长抑制曲线,如图 8 所示。

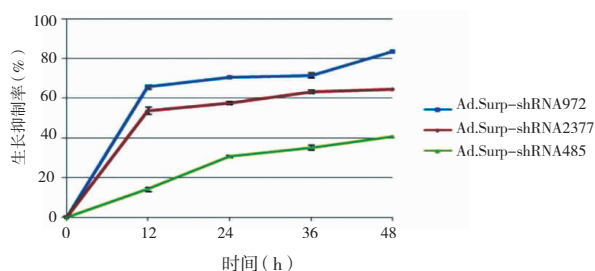


图 8 MTT 检验腺病毒作用下的细胞生长抑制率

Fig.8 Cell growth inhibition rate after adenovirus transfected detected by MTT

2.8 Transwell 检测细胞侵袭力的改变

体外侵袭实验结果见图 9,实验组细胞穿过膜的细胞数明显低于空白组,其中 Ad.Surp-shRNA972 组穿膜细胞数远低于实验组 Ad.Surp-shRNA2377 和 Ad.Surp-shRNA 485,但并未完全抑制肝癌细胞株 HepG-2 的穿膜作用,而实验组

Ad.Surp-shRNA2377 穿膜细胞数少于 Ad.Surp-shRNA 485 组,表明感染腺病毒后细胞侵袭力明显降低。

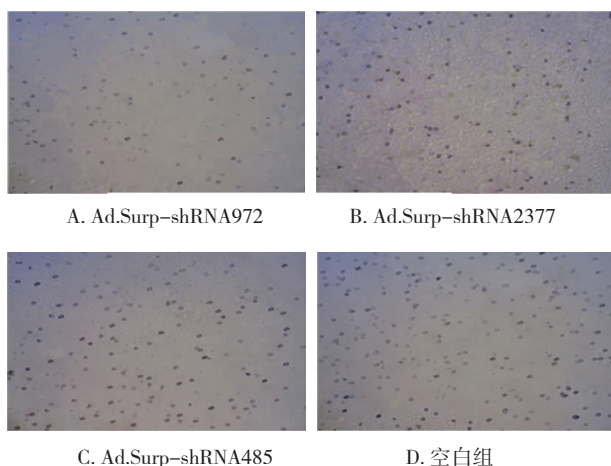


图 9 Transwell 检测细胞侵袭能力 (结晶紫染色,200 ×)

Fig.9 Cell invasion ability detected by Transwell (crystal violet,200 ×)

3 讨论

CD133 最初在造血干细胞中分离得到,在原始细胞中有广泛表达近年来,CD133 为研究最多的在干细胞和多种组织肿瘤干细胞表面独立表达的特异标记分子。文献[14]报道,结直肠癌的产生和增殖是由一小部分未分化、具有肿瘤发生能力的 CD133 阳性细胞所致,而 CD133 阳性细胞具有肿瘤干细胞特性。众多研究表明,CD133+肿瘤细胞与肿瘤的自

我更新、分化潜能、信号传导调控、药物耐受、复发和预后等均有相关性^[15]。本实验通过构建肿瘤特异性启动子 Survivin 驱动 shRNA 沉默 CD133 基因,降低肝癌细胞的侵袭力和增殖能力,为分子靶向治疗提供实验依据。

实验结果通过构建 Survivin 启动的 pEntr-Surp-shRNA 质粒只在 Hela 细胞,HepG-2 细胞中表达荧光,而 293T 细胞不表达,证实 Survivin 启动子具有肿瘤特异性;能很好地介导重组腺病毒在肿瘤细胞中的复制^[16]而对周围正常组织没有影响,减少肿瘤治疗的副作用。研究还表明,Survivin 启动子的长度与其转录活性有着密切的关系^[17]。作者选择了长约 270 bp 的人源 Survivin 启动子来驱动 shRNA 进而构建抗癌重组腺病毒载体 pAd.Surp-shRNA,该启动子序列位于-220 到+39^[18]。根据 shRNA 设计原则,设计了 3 条 shRNA 干扰片段,972、485、2377 干扰长度为 22 个碱基,包装、腺病毒。转染 HepG-2 细胞后通过 Western blot,RT-PCR 等试验证实,CD133 基因成功被沉默,蛋白表达降低而 Ad.Surp-shRNA972 干扰效果明显高于 Ad.Surp-shRNA485、Ad.Surp-shRNA2377,这与 GERMANA RAPP 等报道的 CD133 最佳干扰片段的位置相符合^[19]。MTT、Transwell 实验证实 CD133 基因敲低以后,肿瘤细胞毒性降低,侵袭力变弱,但实验结果显示,单纯干扰 CD133 的表达,并不能完全阻止癌细胞的转移和穿膜功能,猜测 CD133 可能与某些信号通路如 Wnt 有直接的关系,能够改变细胞的电极性,从而使癌细胞的转移和侵袭能力减弱,而作用机制有待进一步实验研究证明^[20]。实验中 485 位置的 mRNA 与空白组无明显差异,但蛋白水平有明显表达差异,推测 485 位置存在的 CD133 蛋白修饰和(或)基因调控与 972、2377 位置有明显差异,具体作用有待进一步研究。目前根据 CD133 干扰后肝癌细胞癌性特征的减弱,研究针对 CD133 基因治疗手段包括:特异性的针对癌细胞的经典信号通路^[21],细胞周期的特异性阻断^[22],转录机制中干扰 RNA 的应用^[23],针对线粒体的特异降解^[23]和相关免疫治疗^[24]。

综上所述,CD133 将在干细胞相关疾病和肿瘤细胞研究中起到十分重要的作用。CD133 作为多种肿瘤共同的细胞表面标志物,通过 CD133 特异性分选干细胞,将更有助于研究肿瘤干细胞的生物学特性、信号传导通路和耐放化疗机制;同时,将有可能以 CD133 作为靶向治疗肿瘤的靶点,为肿瘤治疗带

来重大突破。

参 考 文 献

- [1] Zhou D X, Zheng L Y, Qu H X, et al. Identification and differential expression of human carcinoma-associated antigens in hepatocellular carcinoma tissues[J]. Biol Med, 2013, 238(2): 167-175.
- [2] Hamid A S, Tesfamariam I G, Zhang Y, et al. Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: geographical distribution, mechanism of action and prevention[J]. Oncol Lett, 2013, 5(4): 1087-1092.
- [3] Rosato A, Menin C, Boldrin D, et al. Survivin expression impacts prognostically on NSCLC but not SCLC[J]. Lung Cancer, 2013, 79(2): 180-186.
- [4] Gallet A, Staccini-Lavenant L, Therond P. Cellular trafficking of the glypican Dally-like is required for full-strength Hedgehog signaling and wntless transcytosis[J]. Dev Cell, 2008, 14(5): 712-725.
- [5] Zhang Q, Shi S, Yen Y, et al. A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy[J]. Cancer Lett, 2010, 289(2): 151-160.
- [6] Liu G, Yuan X, Zeng Z, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma[J]. Mol Cancer, 2006, 5: 67.
- [7] Frank N Y, Schatton T, Frank M H. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept[J]. Clin Invest, 2010, 120(1): 41-50.
- [8] Frank N Y, Schatton T, Kim S, et al. VEGFR-1 expressed by malignant melanoma-initiating cells is required for tumor growth[J]. Cancer Research, 2011, 71(4): 1474-1485.
- [9] Bourseau-Guilmain E, Griveau A, Benoit J P, et al. The importance of the stem cell marker prominin-1/CD133 in the uptake of transferrin and in iron metabolism in human colon cancer Caco-2 cells[J]. PLoS one, 2011, 6(9): e25515.
- [10] Rappa G, Fodstad O, Lorico A. The stem cell-associated antigen CD133 (Prominin-1) is a molecular therapeutic target for metastatic melanoma[J]. Stem Cells, 2008, 26(12): 3008-3017.
- [11] Chen X, Wang T, Yang D, et al. Expression of the IAP protein family acts cooperatively to predict prognosis in human bladder cancer patients[J]. Oncol Lett, 2013, 5(4): 1278-1284.
- [12] Hino R, Uozaki H, Inoue Y, et al. Survival advantage of EBV-associated gastric carcinoma: survivin up-regulation by viral latent membrane protein 2A[J]. Cancer research, 2008, 68(5): 1427-1435.
- [13] Huang R, Zhao Z, Ma X, et al. Targeting of tumor radioiodine therapy by expression of the sodium iodide symporter under control of the survivin promoter[J]. Cancer Gene Ther, 2012, 18(2): 144-152.
- [14] Yan M, Li H, Zhu M, et al. G Protein-coupled receptor 87 (GPR87) promotes the growth and metastasis of CD133(+) cancer stem-like cells in hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61056.
- [15] Zaffaroni N, Pennati M, Daidone M G. Survivin as a target for new anticancer interventions[J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(2): 360-372.
- [16] 严泽军, 程 越, 蒋军辉, 等. Survivin 启动子调控腺病毒介导富含亮氨酸重复和免疫球蛋白样结构域 1 基因治疗膀胱癌的实验研究[J]. 中华外科学杂志, 2012, 50(8): 732-736.
- [17] Yan Z J, Cheng Y, Jiang J H, et al. Gene therapy study on bladder cancer with recombinant adenoviral vector carrying LRIG1 gene driven by Survivin promoter[J]. Chinese Journal of Surgery, 2012, 50(8): 732-736.
- [18] Huang H, Fletcher L, Beechey N, et al. Abnormal cytokinesis after X-irradiation in tumor cells that override the G2 DNA damage checkpoint[J]. Cancer research, 2008, 68(10): 3724-3732.
- [19] Qu L, Wang Y, Gong L, et al. Suicide gene therapy for hepatocellular carcinoma cells by survivin promoter-driven expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene[J]. Oncol Rep, 2013, 9(4): 1435-1440.
- [20] Smith L M, Nesterova A, Ryan M C. CD133/prominin-1 is a potential therapeutic target for antibody-drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers[J]. Br J Cancer, 2008, 99(1): 100-109.
- [21] Rappa G, Fodstad O, Lorico A. The stem cell-associated antigen CD133 (Prominin-1) is a molecular therapeutic target for metastatic melanoma[J]. Stem Cells, 2008, 26(12): 3008-3017.
- [22] Clement V, Sanchez P, Tribolet N, et al. Hedgehog-Gli3 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity[J]. Curr Biol, 2007, 17(2): 165-172.
- [23] Bao S, Wu Q, McLendon R E, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response[J]. Nature, 2006, 444(7120): 756-760.
- [24] Thomas M, Gessner A, Vornlocher H P, et al. Targeting MLL-AF4 with short interfering RNAs inhibits clonogenicity and engraftment of t(4;11)-positive human leukemic cells[J]. Blood, 2005, 106(10): 3559-3566.
- [25] Neuzil J, Tomasetti M, Zhao Y, et al. Vitamin E analogs, a novel group of 'mitocans', as anticancer agents: the importance of being redox-silent[J]. Mol Pharmacol, 2007, 71(5): 1185-1199.

(责任编辑: 关蕴良)