

· 论 著 ·

Survivin shRNA-APC 双基因共表达稳转株对人 HT-29 结肠癌细胞中 PCNA、Ki-67 表达的影响

袁喜先¹, 张蒙蒙², 曲若梅¹, 张玉健², 孙元佳², 陈月², 张书娟², 袁晓岚²

1. 佳木斯大学附属第一医院, 黑龙江 佳木斯 154003; 2. 佳木斯大学临床医学院, 黑龙江 佳木斯 154007

摘要: **目的** 探讨生存素短发夹 RNA-腺瘤性结肠息肉病(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细胞中增殖细胞核抗原(PCNA)、Ki-67 表达的影响。**方法** 将 30 只 SPF 级裸鼠随机分为 5 组,为 Survivin shRNA-APC 双基因组、Survivin shRNA 及 APC 单基因组、空载组和阴性对照组,对各组稳转株及 HT-29 结肠癌细胞分别进行培养,PBS 重悬使癌细胞浓度达到 $2 \times 10^6/\text{ml}$,于每只裸鼠右前腋下分别接种相对应的细胞悬液,构建移植瘤模型,每 6 天测量移植瘤体积,待 7 周后统一处死所有裸鼠,剥离移植瘤,将瘤体组织用多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,根据免疫组化检测人 HT-29 结肠癌细胞裸鼠皮下移植瘤组织细胞中 PCNA、Ki-67 表达。**结果** 免疫组化结果显示,Ki-67 蛋白及 PCNA 蛋白主要定位于移植瘤组织细胞的胞核内;在阴性对照组和空载组均可见较多棕黄色或棕褐色颗粒,双基因组细胞内可见极少量黄色或淡黄色细颗粒,APC 组及 Survivin shRNA 组染色程度介于二者之间。APC 组、Survivin shRNA 组、双基因组 PCNA、Ki-67 蛋白表达积分分别低于阴性对照组及空载组($P < 0.01$);双基因组 PCNA、Ki-67 蛋白表达积分分别低于 APC 组、Survivin shRNA 组($P < 0.01$);阴性对照组与空载组比较、APC 组与 Survivin shRNA 组比较,PCNA、Ki-67 蛋白表达积分差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** Survivin shRNA-APC 双基因共表达稳转株可通过下调 HT-29 结肠癌细胞裸鼠皮下移植瘤组织细胞中 PCNA、Ki-67 的表达,抑制移植瘤细胞增殖,其效果较单基因稳转株更为显著。

关键词: 结肠癌; 增殖; 增殖细胞核抗原; Ki-67; 生存素; 生存素短发夹 RNA; 腺瘤性结肠息肉病

中图分类号: R 735.35 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2019)05-0597-04

Effects of Survivin shRNA-APC co-expression stable transfected strain on the expression of PCNA and Ki-67 in human HT-29 colon cancer cells

YUAN Xi-xian*, ZHANG Meng-meng, QU Ruo-mei, ZHANG Yu-jian,

SUN Yuan-jia, CHEN Yue, ZHANG Shu-juan, YUAN Xiao-lan

* First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154003, China

Corresponding author: ZHANG Meng-meng, E-mail: 1525436413@qq.com

Abstract: Objective To investigate the effect Survivin shRNA-APC co-expression stable transfected strain on the expression of PCNA and Ki-67 in HT-29 colon cancer xenograft cells in nude mice. **Methods** Thirty SPF-grade nude mice were randomly divided into five groups: Survivin shRNA-APC double genome group, Survivin shRNA group, APC group, blank group and control group. Steady transfected lines and HT-29 colon cancer cells were cultured in five groups, respectively. Resuspend cancer cells in PBS to achieve a concentration of $2 \times 10^6/\text{ml}$. Cell suspension was inoculated into the right anterior axilla of each nude mouse to construct the transplanted tumor model. The volume of transplanted tumors was measured every 6 days. After 7 weeks, all nude mice were executed. The transplanted tumors were peeled off and fixed with paraformaldehyde. The expression of PCNA and Ki-67 in human HT-29 colon cancer cells was detected by immunohistochemistry. **Results** Immunohistochemical results showed that Ki-67 protein and PCNA protein were mainly located in the nucleus of transplanted tumor cells; brown or brown granules could be seen in both control group and blank group; a small amount of yellow or light yellow fine granules could be seen in survivin shRNA-APC double genome group; the staining degree of APC group and Survivin shRNA group was between the two groups. The expression of PCNA and Ki-67 protein increased in the order of double genome group \rightarrow APC group, Survivin shRNA group \rightarrow blank group and control group ($P < 0.01$). **Conclusion** Survivin shRNA-APC co-expressing stable transfection could significantly inhibit the

proliferation of transplanted tumor cells by down-regulating the expression of PCNA and Ki-67 in HT-29 colon cancer cells subcutaneously transplanted in nude mice, and its effect is more significant than that of single gene stable transfection.

Key words: Colon cancer; Proliferation; Proliferating cell nucleus antigen; Ki-67; Survivin; Survivin shRNA; Adenomatous polyposis coli

增殖细胞核抗原(PCNA)、Ki-67 是一种与结肠癌细胞增殖相关的核抗原,其表达与细胞周期密切相关^[1]。本课题组前期已成功构建并筛选出生存素短发夹 RNA-腺瘤性结肠息肉病(Survivin shRNA-APC)双基因共表达稳转株,通过体内外实验均已证实 Survivin shRNA-APC 双基因共表达稳转株可以促进 HT-29 结肠癌细胞凋亡,抑制细胞增殖,较 Survivin shRNA 组、APC 组单基因稳转株更显著^[2]。但 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细胞中增殖情况的具体机制,尚未明确。故在前期实验的基础上,根据结肠癌细胞中 PCNA、Ki-67 的表达,进一步研究 Survivin shRNA-APC 双基因共表达稳转株对结肠癌细胞增殖的影响,以期对结肠癌的预防、诊断、治疗及改善患者的预后提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂 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, 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(中科院上海细胞所); 兔抗人 PCNA、Ki-67 抗体、免疫组化试剂盒(武汉博士德生物公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养采用常规操作方法 将 Survivin shRNA-APC 双基因共表达稳转株、Survivin shRNA 及 APC 单基因稳转株、空载稳转株及 HT-29 结肠癌细胞培养于添加 DMEM 的培养液中,于培养箱中培养,选取生长处于对数期的细胞, PBS 重悬使稳转株及 HT-29 结肠癌细胞浓度为 $2 \times 10^6/\text{ml}$ ^[3]。

1.2.2 裸鼠移植瘤实验 雄性无胸腺裸鼠 30 只, 3 周龄, 体重 (19.7 ± 1.1) g, 饲养于佳木斯大学动物中心无菌层流房中两周, 30 只裸鼠, 随机分为 5 组, 分别为阴性对照组(即 HT-29 结肠癌细胞)、空载组、Survivin shRNA 组、APC 组和 Survivin shRNA-APC 双基因组, 每组 6 只裸鼠。皮肤消毒后用 1 ml 注射器分别于左前腋下接种密度为 2×10^6 个/ml 的相对应的细胞悬液 0.1 ml, 在相同条件下饲养裸鼠并观察其成瘤情况, 待接种 7 周后全部裸鼠采用脊髓离断法处死, 剥离移植瘤, 除去胞膜, 将瘤体组织用多聚甲醛固

定, 石蜡包埋切片, 用于后续免疫组化检测 PCNA、Ki-67 表达情况。

1.2.3 免疫组化检测各组移植瘤组织细胞中 PCNA、Ki-67 蛋白表达情况 按照免疫组化试剂盒说明书操作步骤常规进行 PCNA、Ki-67 染色。用 PBS 替代一抗作为阴性对照。PCNA、Ki-67 结果判定标准: 按相关文献报道的方法进行, 采用半定量积分法, 以棕褐色或棕黄色颗粒为阳性细胞^[4]; (1) 按染色强度计分, 未着色(0 分)、淡黄色(1 分)、棕黄色(2 分)、棕褐色(3 分); (2) 按着色细胞占总细胞百分比计分, 在切片中选取 5 个不同的视野, 每个视野选取 200 个结肠癌细胞进行计数, $\leq 5\%$ (0 分)、 $6\% \sim 25\%$ (1 分)、 $26\% \sim 50\%$ (2 分)、 $51\% \sim 75\%$ (3 分)、 $\geq 76\%$ (4 分)。每例标本积分结果(1) × (2)。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。半定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单基因方差分析法进行多组间数据总体比较, 采用 LSD-*t* 检验进行组间两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

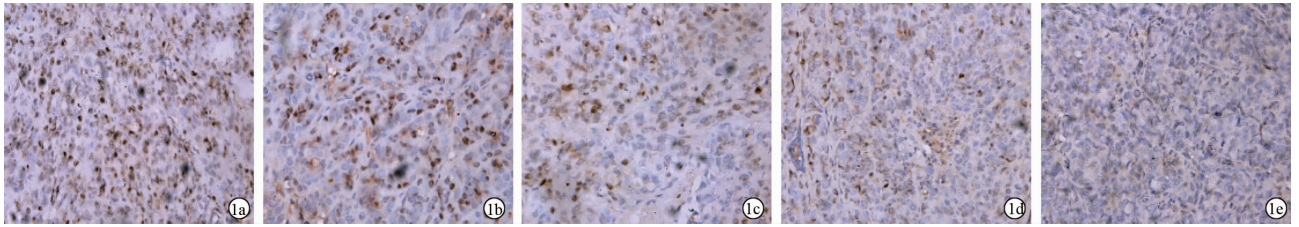
2 结果

2.1 各组荷瘤裸鼠的一般情况及移植瘤的生长情况

各组裸鼠在实验观察期无死亡, 完成预期实验观察, 其中空白组和空载组裸鼠反应灵敏度有所下降, 活动有所减少, 形态逐渐消瘦; 单基因及双基因实验组裸鼠无明显异常。在各组裸鼠移植瘤的生长方面, 全部成瘤, 成瘤率达 100%。

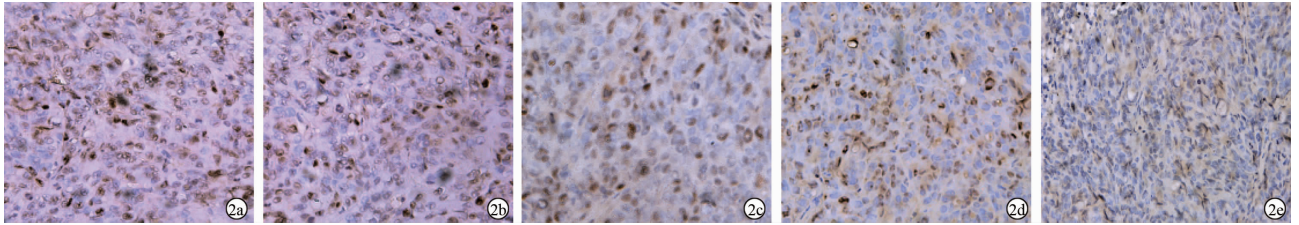
2.2 各组结肠癌细胞中 Ki-67、PCNA 蛋白的表达

免疫组化结果显示, Ki-67 蛋白主要定位于移植瘤组织细胞的胞核内, 见图 1。PCNA 蛋白亦主要定位于移植瘤组织细胞的胞核内, 见图 2。在阴性对照组和空载组均可见较多棕黄色或棕褐色颗粒, 双基因组细胞内可见极少量黄色或淡黄色细颗粒, APC 组及 Survivin shRNA 组染色程度介于二者之间。APC 组、Survivin shRNA 组、双基因组 PCNA、Ki-67 蛋白表达积分分别低于阴性对照组及空载组 ($P < 0.01$); 双基因组 PCNA、Ki-67 蛋白表达积分分别低于 APC 组、Survivin shRNA 组 ($P < 0.01$); 阴性对照组与空载组比较、APC 组与 Survivin shRNA 组比较其 PCNA、Ki-67 蛋白表达积分差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。



注:1a:阴性对照组;1b:空载组;1c:APC 组;1d:Survivin shRNA 组;1e:双基因组。

图 1 镜下观察各组移植瘤组织 Ki-67 蛋白的表达(SABC, ×200)



注:2a:阴性对照组;2b:空载组;2c:APC 组;2d:Survivin shRNA 组;2e:双基因组。

图 2 镜下观察各组移植瘤组织 PCNA 蛋白的表达(SABC, ×200)

表 1 各组移植瘤组织细胞中 PCNA、Ki-67 蛋白表达
半定量积分结果比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | PCNA 蛋白 | Ki-67 蛋白 |
|------------------|----|-----------------------------|-----------------------------|
| 阴性对照组 | 6 | 9.86 ± 0.63 | 10.01 ± 0.61 |
| 空载组 | 6 | 9.94 ± 1.05 | 10.01 ± 0.57 |
| APC 组 | 6 | 5.97 ± 1.43 ^{ab} | 5.80 ± 1.27 ^{ab} |
| Survivin shRNA 组 | 6 | 5.74 ± 1.13 ^{ab} | 5.53 ± 1.15 ^{ab} |
| 双基因组 | 6 | 1.99 ± 0.99 ^{abcd} | 2.15 ± 0.99 ^{abcd} |
| F 值 | | 57.060 | 72.080 |
| P 值 | | 0.000 | 0.000 |

注:与阴性对照组比较,^a $P < 0.01$;与空载组比较,^b $P < 0.01$;与 APC 组比较,^c $P < 0.01$;与 Survivin shRNA 组比较,^d $P < 0.01$ 。

3 讨论

PCNA 及 Ki-67 是目前科研应用最广泛的细胞增殖标记物^[5]。可利用 PCNA 及 Ki-67 标记指数来检测肿瘤的增殖率,对协助诊断,治疗及评估预后均有重要意义。大量研究表明,Ki-67 是一种存在于增殖细胞中的核抗原,通过对它的表达情况的研究,推断 Ki-67 的功能与染色质相连,并与细胞有丝分裂相关^[6]。Ki-67 抗原的分布也是细胞周期依赖性的,不在 G0 期细胞表达,在 G1 期细胞中表达于核仁周边,在 S、G2 期表达于整个细胞核内,在 M 早期细胞中表达于染色体上,在 M 期后的细胞中 Ki-67 抗原迅速消失,因此,Ki-67 可作为评价细胞增殖的一个敏感指标。研究表明,PCNA 是一种仅出现在增殖状态细胞核内的酸性蛋白,于 G0 期及 G1 早期均不表达,G1 晚期开始表达,逐渐增加,至 S 期达高峰,G2 期和 M 期表达明显减少^[1]。PCNA 是细胞 DNA 合成的必须,其合成和表达与细胞增殖状态密切相关,是目前反映细胞增殖状态特征的一个较好指标,通过免疫组化染色检测其在细胞中的表达,反映细胞增殖情况,阳性表达愈强,说明其增殖指数愈强,增殖也愈旺盛,

可作为评价细胞增殖状态的一个指标^[7]。

本课题组前期已成功构建并筛选出 Survivin shRNA-APC 双基因共表达稳转株,并已证实其能明显下调 HT-29 结肠癌细胞中 Survivin 基因的表达水平,且能抑制结肠癌细胞增殖,具体机制尚不明确^[8]。本实验结果显示,Survivin shRNA 及 APC 单基因组、Survivin shRNA-APC 双基因组中 Ki-67、PCNA 蛋白表达水平均有明显降低,并且双基因组 Ki-67、PCNA 蛋白降低程度较其余各组更为显著,说明 Survivin shRNA-APC 双基因共表达稳转株在蛋白水平上对移植瘤组织细胞中 Ki-67、PCNA 的表达均有明显的抑制作用,且抑制效果明显优于 APC 及 Survivin shRNA 单基因稳转株。根据实验结果及相关文献推测,可能是双基因下调了 HT-29 细胞中 Ki-67、PCNA 等因子的表达,从而诱导细胞凋亡,抑制肿瘤细胞增殖。但其具体的作用途径、机制等尚未完全了解,需要我们在今后的实验及临床应用中进一步进行探索。

综上,Survivin shRNA-APC 双基因共表达稳转株可以在蛋白水平上有效抑制 HT-29 结肠癌细胞裸鼠皮下移植瘤组织细胞中的 PCNA、Ki-67 表达水平,抑制结肠癌细胞增殖,并且其抑制效果较单基因稳转株更为显著。表明双基因可能通过下调结肠癌细胞中 PCNA、Ki-67 表达来抑制结肠癌细胞增殖,从而为结肠癌的靶向治疗提供新的治疗方案。同时 PCNA、Ki-67 异常表达呈一定的相关性,可能两者之间的表达受到其他因素的影响,仍需进一步实验进行研究。

参考文献

[1] 侯宝洲,孙剑经. β -catenin、Topo II 和 ki67 在恶性肿瘤中的作用研究进展[J]. 河北北方学院学报(自然科学版), 2013, 29(5): 109-113. (下转第 603 页)

外还有研究表明,手术前后对患者进行营养评估,对存在营养风险者,若预测其在 5 d 内无法进食,或经口摄入量过少等,均应给予肠内营养治疗^[19-20]。

本研究结果显示,肠内营养组血清内毒素、血浆 DAO 水平明显优于对照组,表明 TACE 术后进行肠内营养支持治疗可改善肠屏障功能,减少肠道毒素的吸收。肠内营养组 Hb、ALT、Alb、APTT、FIB 及 NRS-2002 评分等均明显优于对照组,表明肠内营养支持治疗对患者术后营养状态有明显促进作用,同时一定程度上保护了患者肝功能以及凝血功能,有效避免肝破裂出血及消化道出血等并发症的发生。同时护肝作用可有效减缓肝功能失代偿,进而降低腹膜炎、胸腹水及肝性脑病等的发生率。而肠屏障功能的改善,一定程度上改善了患者的自身免疫水平,对免疫力有提高作用,因此肠内营养组的 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 水平要优于对照组。

综上所述,TACE 术后的原发性肝癌患者应用肠内营养支持治疗有利于其术后的恢复,可改善营养状况和肠屏障功能,增强患者自身免疫力,减少术后并发症的发生。

参考文献

[1] 王前程,陈炜,陈大庆,等. 动脉灌注蟾酥、丹参、苦参碱联合 TACE 对肝癌患者免疫功能的影响[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2013,22(7):632-634.

[2] 王庆华,管清海. 生态免疫肠内营养支持对高位肠痿病人免疫和肠黏膜屏障功能的影响[J]. 肠外与肠内营养,2014,21(5):260-262,266.

[3] Yu G, Chen G, Huang B, et al. Effect of early enteral nutrition on postoperative nutritional status and immune function in elderly patients with esophageal cancer or cardiac cancer[J]. Chin J Cancer Res, 2013, 25(3):299-305.

[4] 马英,孙韬,李玉苓,等. 原发性肝癌 TACE 术后射频消融联合生物治疗对免疫功能及血管内皮生长因子的影响研究[J]. 河北医药,2016,38(12):1828-1832.

[5] 张海鸣,潘瑞蓉,周科军. 早期谷氨酰胺强化联合百普力肠内营养支持对老年胃癌患者术后营养、免疫功能及肠黏膜屏障功能的影响[J]. 中国现代医学杂志,2015,25(21):107-110.

[6] 沈凌鸿,郑贵军,袁亚松,等. 重症急性胰腺炎早期肠内营养的临床研究[J]. 中国临床研究,2014,27(12):1494-1496.

[7] 王伟林.《原发性肝癌诊疗规范(2017年版)》解读[J]. 华西医学,2018,33(4):385-387.

[8] 顾良军,詹斯·康卓普,雷米·梅耶,等. 营养风险筛查 2002 改善临床结局[J]. 中华临床营养杂志,2013,21(3):133-139.

[9] 张俊烁,周家德,彭淮都,等. 益生菌联合早期肠内营养对重症急性胰腺炎患者肠道免疫功能的影响[J]. 中国临床研究,2016,29(1):55-58.

[10] 苗同国,马立伟,王立静,等. 中药联合 TACE 对原发性肝癌患者免疫功能的影响[J]. 武警医学,2016,27(9):928-931.

[11] 孙羽. 不同营养方式对严重腹部创伤术后患者营养状态和肠屏障功能的影响[J]. 重庆医学,2016,45(1):97-99.

[12] 雍伟. 早期肠内免疫微生态营养对原发性肝癌患者术后临床疗效的影响[J]. 实用肝脏病杂志,2017,20(3):328-332.

[13] 唐梅,邓天芝,陈忠礼,等. 肝动脉灌注(TACE)术后使用小牛脾提取物对晚期肝癌患者免疫功能影响研究[J]. 陕西医学杂志,2015,44(11):1476-1478.

[14] 熊睿. 大鼠应激后接受肠内营养联合双歧杆菌黏附素干预的实验研究[J]. 海南医学院学报,2016,22(4):324-327.

[15] 郭世奎,王昆华,陈嘉勇,等. 肠内营养对 AIDS 患者肠屏障功能影响的研究[J]. 实用医学杂志,2014,30(12):2011-2012.

[16] 刘萍,宋春华,田丽. 两种营养评估方法在原发性肝癌病人中的应用比较[J]. 肠外与肠内营养,2015,22(1):26-28.

[17] 鱼晓波,阮征,黄海龙,等. 食管癌术后早期肠内营养对肠黏膜屏障功能及免疫功能的影响[J]. 临床外科杂志,2013,21(1):39-42.

[18] 刁红亮,佟箫兵,吴鹏,等. 进展期胃癌术后早期肠内营养对免疫功能和肠功能恢复的影响[J]. 实用临床医药杂志,2014,18(9):156-157.

[19] 李荣振. 早期免疫型肠内营养对老年胃癌手术患者免疫功能的影响[J]. 中国临床研究,2014,27(7):816-817.

[20] 王瑛. 肠内营养支持治疗原发性肝癌肝动脉化疗栓塞术后病人的营养状况变化[J]. 肠外与肠内营养,2015,22(5):282-284.

收稿日期:2018-11-20 修回日期:2018-12-22 编辑:王国品

(上接第 599 页)

[2] 袁禧先,张蒙蒙,曹雅,等. 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新生血管形成的影响[J]. 中国综合临床,2018,34(3):223-227.

[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] 吐尔逊阿衣·买买提明,马春华,王琳. 子宫内膜癌中 ER、PR、Ki67 的表达及其临床意义[J]. 新疆医学,2016,46(11):1384-1386.

[5] 马志君,吉洁. Ki67 与肿瘤关系的研究进展[J]. 中国医疗前沿,2012,7(7):15-17.

[6] 秦娟,晏伟,王三喜,等. Ki67、p53 及 EGFR 在胃癌组织中的表达水平及临床意义[J]. 实用癌症杂志,2017,32(1):37-39,43.

[7] 余苗萃,姜毅,刘涛,等. 肠艾舒对小鼠 CT-26 大肠癌组织 Ki67 和 PCNA 表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2014,21(4):52-54,58.

[8] 袁禧先,温超,曹雅,等. Survivin shRNA-APC 双基因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.

收稿日期:2018-12-25 修回日期:2019-01-26 编辑:王国品