

RNAi 抑制鼻咽癌细胞表皮生长因子受体表达对细胞生长的影响

鼻咽癌是中国南方数省高发的鼻咽部恶性上皮源性肿瘤。目前的研究表明,鼻咽癌发病是一个多因素、多阶段的过程。在鼻咽癌患者中表皮生长因子受体(EGFR)表达阳性率明显高于对照组,并且肿瘤分化越差,EGFR表达阳性率越高;鼻咽癌有颈淋巴结转移者EGFR表达明显高于无颈淋巴结转移者[1][2]。说明EGFR与鼻咽癌的发生、癌细胞分化和肿瘤进展有一定关系。5-8F是鼻咽低分化鳞状细胞癌细胞株SUNE-1的亚株,它的成瘤性强,转移潜能高[3]。RNA干扰(RNAi)技术的基因特异阻断性能使人类快速了解生物体内某基因的功能,同时为基因治疗提供了有益的探索。本研究利用这一崭新的技术使鼻咽癌细胞5-8F EGFR表达沉默,观察细胞水平变化,探讨EGFR与鼻咽癌之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

低分化鼻咽癌细胞系5-8F由南方医科大学肿瘤研究所保存。Trizol(Invitrogen)、AMV Reverse Transcriptase (Promega)、Random Primer(Promega)、Silencer™ siRNA Construction Kit(Ambion)、Opti MEM(Ambion)I均购自上海吉泰公司,Rnasin、DEPC为北京华美公司产品。引物(上海博亚生物技术有限公司合成)序列分别为: GAPDH(产物为580 bp) P1: 5'-AATCCCATCACCATCTTCCA-3'; P2: 5'-CCTGCT TCACCACCTTCTTG- 3'; EGFR(产物为826 bp) P1: 5'-AACTGTGAGGTGGTCCTTGG-3'; P2: 5'-GCCCTT CGCACTTCTTACA- 3'。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 5-8F细胞在RPMI 1640加10%新生小牛血清培养液中常规培养,3 d传代1次。选用对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 siRNA的合成、纯化与鉴定 查找出EGFR mRNA序列(Gene Bank No. AF125253),在www.oligoengine.com进行在线设计siRNA序列。按照Silencer™ siRNA Construction Kit说明书合成DNA模板: siRNA合成试剂盒提供看家基因GAPDH特异性siRNA模板。阴性对照通过打乱活性siRNA的核苷酸顺序设计而得,并进行BLAST同源比较确保与其他基因没有同源性。按说明书进行siRNA的合成、纯化与鉴定。

1.2.3 siRNA瞬时转染鼻咽癌细胞5-8F 将细胞接种于六孔板内,每孔约 2×10^5 个,待细胞80%汇合后即可进行转染。以Opti MEMI稀释siRNA,使其终浓度分别为10、20、40、60 nmol/L。将siPORT Lipid及siRNA 加入孔内,吹打混匀。置37℃培养4 h后每孔内加入2 ml含血清的完全培养基,使细胞得到充分生长。收集转染后24、48、96、144 h细胞备用。

1.2.4 RNA干扰后EGFR表达水平检测 采用半定量RT-PCR法。按Promega 逆转录试剂盒说明书进行,反应条件为94℃ 45 s、59.2℃ 45 s、72℃ 60 s,25个循环,72℃延伸10 min。

1.2.5 蛋白水平测定采用Western blotting。收集转染后细胞,PBS洗涤2次,加入裂解液400 μ l(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1 mmol/L EDTA, pH 8.0; 5 mmol/L DTT; 2% SDS),超声波粉碎30 s,沸水浴5 min,置冰上5 min,13 000 r/min离心10 min,吸取含蛋白的上清液。BCA法测定蛋白浓度后取50 μ g蛋白在6%SDS-PAGE胶上140 V恒压电泳分离3 h。50 V 4℃电转过夜。硝酸纤维素膜放入装有封闭液的平皿中,室温封闭1.5 h。用封闭液稀释一抗(0.1 ml/cm²膜面积,抗GAPDH 4 g/ml,抗EGFR 2 g/ml),置杂交袋中与膜4℃杂交8 h。取出膜TTBS洗4次 \times 5 min,加入用封闭液稀释的二抗(4 g/ml)室温作用60 min。TTBS洗3次 \times 5 min,TBS洗3次 \times 5 min。将硝酸纤维素膜用发光液(Pierce, A、B各100 μ l)充分润湿后作用5 min,保鲜膜覆盖,置暗盒中曝光5 min。显影、水洗、定影后观察结果。

1.2.6 应用1D Advanced图像分析软件对RT-PCR电泳条带及Western blot杂交条带进行密度扫描,以EGFR条带密度与GAPDH条带密度比值表示各肿瘤细胞EGFR的表达水平(设空白对照相对密度值为100%)。用独立样本t检验对数据进行统计学分析,P<0.05时认为有统计学意义。

1.2.7 细胞生长曲线绘制 在24孔板内接种细胞(104/孔),24 h后以上述3对EGFR siRNA转染细胞。每天取细胞用胰蛋白酶消化,共计取7 d。将细胞悬液和台盼蓝染液按1:1体积比混合,1 min后滴加于细胞计数板计数。每孔重复3次。记录结

果，绘制生长曲线。

1.2.8 流式细胞仪测定细胞生长周期 收集转染siRNA后24、48 h细胞。用胰蛋白酶将细胞消化并收集在离心管中。以预冷的0.01 mol/L PBS冲洗细胞3次，每次均需完全打散细胞。用0.5 ml PBS重悬细胞，逐滴加入预冷的75%酒精中固定。置-20 °C保存。以DNA Con3 Flow Cytometry Staining Kit(Consults, Italy)标记细胞，上机检测，106细胞/次，重复3次。用ModFit LT软件分析结果。

2 结果

2.1 RNA干扰后EGFR基因表达水平变化

本实验共合成3对EGFR特异性siRNA，瞬时转染细胞后，仅有1对siRNA发挥了作用，使得5-8F EGFR表达最多下降67.5% ($P < 0.05$)，另外两对则未能有效抑制靶基因表达 ($P > 0.05$)，如图1所示。有效siRNA序列为：反义链：5' - CUCUGGAGGAAAAGAAAG Uuu-3'；正义链：5' -uuACUUUCUUUCCUCCAGA G-3' (对应于cDNA碱基316~334 bp)。

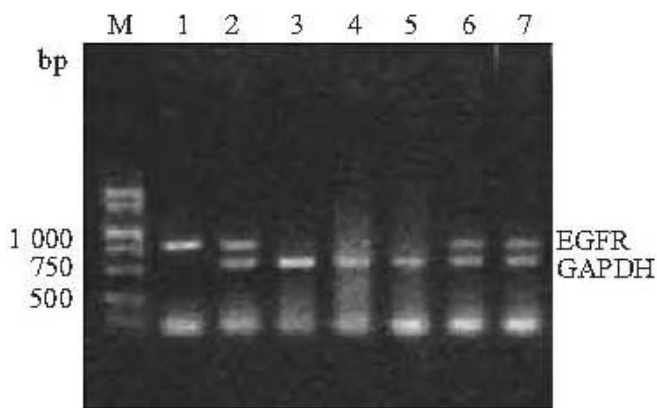


图1 siRNA1转染5-8F后24 h EGFR RT-PCR 1% 琼脂糖电泳

Fig.1 1% agarose electrophoresis of RT-PCR products of EGFR in nasopharyngeal carcinoma cell 5-8F 24 h after siRNA1 transfection

Lane 1: GAPDH specific siRNA; Lane 2: 10 nmol/L EGFR siRNA; Lane 3: 20 nmol/L EGFR siRNA; Lane 4: 40 nmol/L EGFR siRNA; Lane 5: 60 nmol/L EGFR siRNA; Lane 6: Negative control; Lane M: Marker.

Western blot结果显示(图2)，5-8 F EGFR蛋白表达受到抑制，抑制效率达77.0% ($P < 0.05$)。

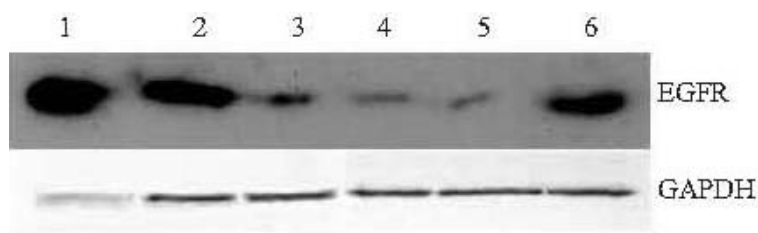


图2 siRNA1转染后24 h EGFR蛋白表达水平

Fig.2 Western blotting for EGFR expression in 5-8F cells 24 h after siRNA1 transfection
Lane 1: GAPDH-specific siRNA; Lane 2: 10 nmol/L EGFR siRNA; Lane 3: 20 nmol/L EGFR siRNA; Lane 4: 40 nmol/L EGFR siRNA; Lane 5: 60 nmol/L EGFR siRNA; Lane 6: Blank control

2.2 EGFR对细胞生长的影响

转染siRNA1抑制EGFR表达能够使鼻咽癌细胞5-8F的生长速度减慢。用重复测量数据的方差分析法进行统计分析，与空白对照比较，5-8F的增殖速度明显下降，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 EGFR对鼻咽癌细胞生长周期的影响

EGFR和它的配体在正常的细胞周期和细胞分裂中起到举足轻重的作用。我们的实验利用RNAi下调鼻咽癌细胞的EGFR表达，通过流式细胞仪检测，发现该方法能够诱导鼻咽癌细胞周期停止在G1期：转染后24 h，5-8F处于G1期的细胞由32.0%上升到56.3%，S期细胞则由37%降至21.1%。提示EGFR可促进鼻咽癌细胞的分裂增殖。但并未观察到G1期前的凋亡峰，未能证明EGFR与鼻咽癌细胞凋亡间的关系(图3)。

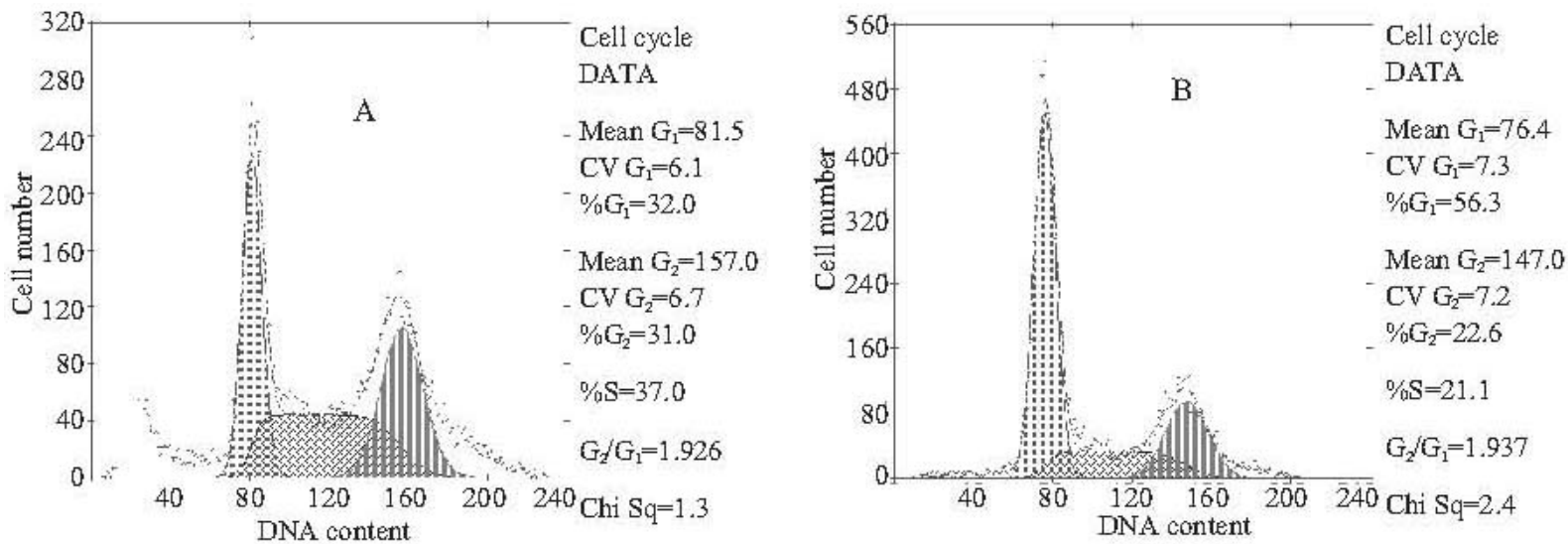


图3 EGFR siRNA1对5-8F生长周期的影响
 Fig.3 Effect of EGFR siRNA1 on cell cycle of 5-8F cells
 A: Blank control; B: 5-8F cells 24 h after siRNA1 transfection

3 讨论

肿瘤的发生发展是多步骤多阶段的过程，关于肿瘤的研究目前已获得许多成果。在肿瘤的发生发展过程中，每一阶段都受着许多特殊基因的调控，它们或被激活，或被抑制，相互协同或拮抗，最终影响肿瘤细胞的生物学特性，如Nicoson等[4]所述，高度恶性的细胞表型可因某些关键控制基因特殊量的变化而迅速产生。

在哺乳动物细胞中用siRNA能特异阻断某个特定基因的表达，用于研究肿瘤中过表达基因的功能具有便捷、高效的优点。Butz等[5]利用RNAi技术特异地抑制了人乳头状瘤病毒(HPV)E6基因的表达，发现HPV阳性的宫颈癌细胞凋亡率明显上升，而HPV阴性的癌细胞则不受影响，证实E6是HPV阳性肿瘤细胞抗凋亡的重要基因，可作为治疗宫颈癌的靶点。这些研究进一步证实了肿瘤相关基因的作用，并为基因治疗提供了新的方向。同以往的导致基因沉默的方法比较，RNAi更加高效特异。

利用RNAi进行鼻咽癌相关基因的研究目前才刚刚开始。李刚等[6][7]将连接LMP1 shRNA的载体转染入鼻咽癌细胞C611中，稳定地抑制了该基因在611中的表达，并使该细胞的转移能力明显下降。在本课题中，我们将EGFR特异性siRNA转染低分化细胞株5-8F，成功地抑制了该基因在细胞中的表达。利用RNAi技术来进行鼻咽癌细胞EGFR功能的研究，在国内外尚未见报道。我们的实验为方便快捷地研究此基因在鼻咽癌中的作用进行了有益的探讨。在线虫、果蝇中siRNA具有自我扩增的能力，但在哺乳动物中并未观察到这种现象，因此不论是化学合成还是体外转录合成的短片段siRNA都会随着细胞分裂而降解，导致抑制基因表达的功能只能维持短暂的几天。因此，这种方法所进行的研究只是初步的。在筛选出有效的EGFR siRNA序列后，我们的目标是将其连入载体中稳定地抑制EGFR的表达，从而更加明确该基因与鼻咽癌的关系。

表皮生长因子(EGF)的受体和配体是有酪氨酸激酶活性的受体家族的基本成员，EGFR在很多细胞中都有表达，包括源于上皮和间充质的细胞。EGFR家族的成员在正常发育中起了重要的作用，但在人类肿瘤中经常过度表达并失去控制，研究表明头颈部恶性肿瘤、肾癌、子宫体/颈癌、乳腺癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、胶质瘤、食道癌和胃癌等多种肿瘤中EGFR均处于高表达状态[8]。在一些恶性肿瘤的发生过程中EGFR水平的改变促进了肿瘤的发展和转移。

关于EGFR的研究开展得已经非常广泛，但运用RNAi技术来抑制肿瘤细胞EGFR表达的报道却很少。Nagy等[9]利用EGFR siRNA成功将表皮样癌细胞A431 erbB1表达水平下降90%，这是对EGFR进行RNAi的首次报道。Zhang M等[10]在肺癌细胞A549细胞中进行EGFR的RNA干扰，使A549细胞生长和侵袭能力明显降低。这两项研究所使用的siRNA均为化学合成。我们在鼻咽癌细胞株中进行EGFR的RNAi研究，利用较经济的体外转录法合成所需干扰片段。结果成功地抑制了5-8F的EGFR表达，并发现EGFR表达沉默通过诱导细胞停止在G1期使细胞生长速度降低。提示在鼻咽癌中，EGFR的过度表达破坏了细胞周期中的负调控，从而促进鼻咽癌细胞的生长和分裂。

有研究证明，EGFR反义核酸能够诱导CNE2细胞产生凋亡[11]，但我们的研究并未得到这样的结果，这可能是由于siRNA只能短暂抑制基因表达有关。

- [1]Sheen TS, Huang YT, Chang YL, et al. Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 co-expressed with epidermal growth factor receptor in nasopharyngeal carcinoma[J]. Jpn J Cancer Res, 1999, 90(2): 1285-90.
- [2]傅江涛, 赵碧芬. 表皮生长因子受体在鼻咽癌中的表达及意义[J]. 浙江医学, 2000, 22(4): 253-54.
- [3]宋立兵, 汪慧民, 曾木圣, 等. 鼻咽癌细胞株SUNE-1异质性研究[J]. 癌症, 1998, 17(5): 324-27.
- [4]Nicolson GL. Breast cancer metastasis-associated genes: role in tumor progression to the metastatic state[J]. Biochem Soc Symp, 1998, 63:231-43.
- [5]Butz K, Ristriani T, Hoppe-Seyler S, et al. siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells[J]. Oncogene, 2003, 22(38):5938-945.
- [6]Li XP, LI G, Peng Y, et al. Suppression of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 by RNA interference inhibits the metastatic potential of nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 315(1): 212-18.
- [7]李刚, 李湘平, 彭英, 等. 应用RNA干扰抑制EB病毒潜伏膜蛋白-1表达对鼻咽癌细胞生长的影响[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(3): 241-44.
- Li G, Li XP, Peng Y, et al. Effect of inhibition of EBV-encoded latent membrane protein-1 by small interfering RNA on EBV-positive nasopharyngeal carcinoma cell growth[J]. J First Mil Med Univ/ Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2004, 24(3): 241-44.
- [8]Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, et al. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies[J]. Crit Rev Oncol/Haemat, 1995, 19: 183-232.
- [9]Nagy P, Arndt-Jovin DJ, Jovin TM. Small interfering RNAs suppress the expression of endogenous and GFP-fused epidermal growth factor receptor (erbB1) and induce apoptosis in erbB1-overexpressing cells [J]. Exp Cell Res, 2003, 285(1): 39-49.
- [10]Zhang M, Zhang X, Bai CX, et al. Inhibition of epidermal growth factor receptor expression by RNA interference in A549 cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(1): 61-67.
- [11]He Y, Zeng Q, Drenning SD, et al. Inhibition of human squamous cell carcinoma growth in vivo by epidermal growth factor receptor antisense RNA transcribed from the U6 promoter[J]. J Natl Cancer Inst, 1998, 90 (14): 1080-87.