

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)09-0828-04

针对 HER2/neu 的 siRNA 对非小细胞肺癌细胞生长的抑制作用

任新玲¹, 钱桂生¹, 鲍 炜², 付海京³, 贾林涛³, 张 瑞³, 王 涛³, 许彦鸣³, 杨安钢² (¹第三军医大学新桥医院全军呼吸病研究所, 重庆 400037, ²第四军医大学基础部²免疫学教研室, ³生物化学与分子生物学教研室, 陕西 西安 710033)

Inhibition of tumor growth of non-small cell lung cancer by small interfering RNA targeting to HER2/neu gene

REN Xin-Ling¹, QIAN Gui-Sheng¹, BAO Wei², FU Hai-Jing³, JIA Lin-Tao³, ZHANG Rui³, WANG Tao³, XU Yan-Ming³, YANG An-Gang²

¹Chinese PLA Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China, ²Department of Immunology, ³Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM :To construct RNA interference (RNAi) vector to down-regulate HER2/neu gene and study the RNAi effect on the cell cycle and tumor growth of non-small cell lung cancer. **METHODS** :Oligonucleotides of 64 base pairs for hairpin RNA targeting HER2/neu were designed, chemically synthesized and annealed, and cloned into pSUPER vector. After identified by restriction digestion, the right vectors were transiently transfected into SPC-A-1 cells, a human lung adenocarcinoma cell line. The HER2 mRNA was detected by RT-PCR, and the protein detected by Western blot and indirect immunofluorescence staining. FCM analysis and MTT method were applied to measure cell cycle and cell growth respectively. **RESULTS** :SPC-A-1 cells had an over-expression of HER2. The vector of RNAi which can interfere HER2/neu gene was successfully constructed, and compared with parent cells, the vector can increase the number of cells in G0/G1 phase by 9.9%, and inhibit the tumor cell growth ($P < 0.05$). **CONCLUSION** : We successfully constructed an expressing hairpin RNA against HER2/neu vector. The vector can effectively silence HER2/neu gene, increase the number of cells in G0/G1 phase, and then slow down the growth of tumor cells. This may be a useful therapeutic strategy for NSCLC over-expressing HER2/neu.

收稿日期 2005-12-21; 接受日期 2006-03-01

基金项目 国家重大基础研究计划项目“973”(2004CB518805), 教育部“长江学者和创新团队发展计划”项目(IRT0459)

通讯作者 杨安钢. Tel (029)84774528 Email agyang@fmmu.edu.cn
作者简介 任新玲, 博士生(导师钱桂生), 主治医师, 讲师. Tel (029) 84774386 Email rxnjl@fmmu.edu.cn

【Keywords】 siRNA; RNAi; carcinoma, non-small-cell lung; HER2/neu

【摘要】目的 构建针对 HER2/neu 的 RNA 干扰载体, 观察对 HER2/neu 表达抑制及抑制后对非小细胞肺癌生长的影响. 方法 设计和合成长度为 64nt 的脱氧寡核苷酸链, 退火互补成双链, 克隆至 pSUPER 质粒载体, 转化 DH5 α 菌株, 提取质粒, 转染过表达 HER2/neu 的肺腺癌细胞系 SPC-A-1, RT-PCR 检测 HER2/neu 的 mRNA 表达, Western blot 和间接免疫荧光法检测 HER2/neu 的蛋白表达, FCM 分析细胞周期变化, MTT 法观察细胞生长. 结果 肺腺癌细胞系 SPC-A-1 存在 HER2/neu 过表达, 成功构建了 HER2/neu 特异性 RNA 干扰载体 pSUPER-siHER2, 瞬时转染 SPC-A-1 细胞, HER2/neu 的 mRNA 及蛋白表达均降低; G1 期细胞较亲代增加 9.9%; 肿瘤细胞增殖速度减慢 ($P < 0.05$). 结论 成功构建了 HER2/neu RNA 干扰载体, 转染后可有效降低肺腺癌细胞系 SPC-A-1 HER2/neu 的 mRNA 转录及蛋白水平表达, 阻滞转染细胞于 G1 期, 造成转染细胞生长速度减慢, 这有望为肺癌基因治疗提供一种选择手段.

【关键词】 siRNA; RNA 干扰; 癌; 非小细胞肺; HER2/neu

【中图分类号】 R734.2 **【文献标识码】** A

0 引言

HER2/neu 是由癌基因 ErbB2/neu 编码的具有酪氨酸蛋白激酶活性的跨膜糖蛋白, 分子量为 185 ku, 属表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 家族, 具有自动磷酸化作用. 乳腺癌、非小细胞肺癌 (non small cell lung cancer, NSCLC) 等恶性肿瘤存在 HER2/neu 过表达, 与肿瘤的发生、转移、血管形成及化疗耐药等有关^[1-4], 本研究采用合成的编码针对 HER2/neu siRNA 的脱氧寡核苷酸模板序列, 插入线性化 pSUPER 载体, 把重组质粒转染过表达 HER2/neu 的肺腺癌细胞系 SPC-A-1, 观察转染后对 HER2/neu mRNA 转录和蛋白表达的抑制, 及其对肺癌细胞周期及生长的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 pSUPER 质粒和大肠杆菌 DH5 α 菌种由第四军医大学生物化学与分子生物学教研室保存, 肺

腺癌细胞系 SPC-A-1 由第四军医大学免疫学教研室保存; DNA Marker DL2000, Lipofectamine™ 2000 为 Takara 公司产品; 细胞培养试剂、逆转录试剂盒、TRIZOL Reagent、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、Concert™ Plasmid Midiprep System 购自 Gibco BRL 公司; HER2/neu 特异性单抗(小鼠抗人)购自 neomarkers 公司; FITC-二抗(羊抗鼠)、辣根过氧化物酶(HRP)-二抗(羊抗鼠, IgG)购自 Transduction Laboratories 公司。

1.2 方法

1.2.1 间接免疫荧光染色 取制备好的过夜 SPC-A-1 细胞爬片, PBS 洗涤, 40 g/L 多聚甲醛固定, 3 g/L Triton-100 室温 10 min, 依次加入 HER2-单抗(含 10 g/L BSA 的 PBS 按 1:200 稀释) 4℃ 过夜, FITC-二抗(1:200 稀释) 室温 1 h, DAPI 室温 3 min, 荧光显微镜观察并照相。

1.2.2 序列设计 在 NCBI 数据库中查找人 HER2/neu 的 mRNA 全序列, 提交发夹状 RNA 设计网站选择最佳干涉位点, 本研究选取的靶位点是 547~566。针对靶位点设计脱氧寡核苷酸序列如下: oligo1: 5' gatcccctgatagacaccaaccgctcttcaagagagcgggtggtctatcattttggaaa 3', oligo2: 是针对来源于深海水母的绿色荧光蛋白的一段序列, 与人无同源性, 做为无关序列对照(序列略), 由上海生工生物工程技术服务公司合成。

1.2.3 脱氧寡核苷酸与 pSUPER 的连接与转化 将合成的脱氧寡核苷酸序列退火、磷酸化成双链 DNA; Bgl II 和 Hind III 双酶切 pSUPER; 连接酶连接 pSUPER 和磷酸化产物, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 铺于带有氨苄青霉素抗性的培养皿, 37℃ 过夜, 挑取重组质粒进行双酶切和 DNA 序列分析鉴定。

1.2.4 细胞培养和质粒转染 SPC-A-1 细胞常规培养于含 100 g/L FBS 的 RPMI 1640 液, 常规加 5 \times 10⁷ U/L 青霉素, 50 g/L 链霉素。取对数生长期贴壁细胞, 使用 Lipofectamine™ 2000 进行基因转染, 按照说明书进行操作。

1.2.5 RT-PCR 收集转染后 72 h SPC-A-1 细胞, Trizol reagent 提取总 RNA, 用 SuperScript™ First Strand System for RT-PCR 试剂盒反转录, 按照说明书进行操作。以 cDNA 为模板对 HER2/neu 进行 PCR 扩增, 扩增片段位于 181~606 bp, 按天为时代公司的一管便携式 PCR 试剂盒说明操作。使用 PCR 上游引物 P1 5' ctgtttgcccgtgccaccctgagt 3', 下游引物 P2: 5' cttctgctgccctgcgcttgatgag 3'。反应条件 95℃ 30 s 变性, 56℃ 20 s 退火, 72℃ 30 s 延伸, 30 个循环。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.2.6 Western blot 收集转染后 72 h SPC-A-1 细胞, 用含 RIPA 的裂解液提取总蛋白, BCA 法蛋白定量, 上样量 40 μ g/道, 80 g/L SDS-PAGE 电泳, 转移至 NC 膜, 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 依次加入特异性 HER2-单抗(1:800 稀释) 4℃ 过夜, HRP-二抗室温孵育 1 h, 增强化学发光法检测 HER2/neu 表达^[5]。

1.2.7 FCM 检测细胞周期 用 10 g/L FBS 培养细胞, 收集转染后 72 h SPC-A-1 细胞, 制成 1 \times 10⁹/L 单细胞悬液, PBS 洗涤后注入 750 mL/L 的 4℃ 乙醇固定, 用含 RNA 裂解酶的 PI 对样品 DNA 荧光染色 15 min, 流式细胞仪(FCM)检测细胞周期。

1.2.8 MTT 法检测细胞增殖 取对数生长期细胞, 制成单细胞悬液, 调整细胞浓度至 2 \times 10⁷/L, 按 4 \times 10³/孔接种于 96 孔培养板, 终体积 200 μ L/孔, 100 g/L FBS 培养细胞, 分别于转染后 24, 48, 72, 96 和 120 h 加入 20 μ L MTT(5 g/L)/孔, 4 h 弃上清, 加 DMSO 150 μ L, 20 min 振荡, 15 min 在 ELISA 读数仪 490 nm 波长处测各孔吸光值(A)。每组设 5 个复孔, 实验重复 3 次, 绘制细胞增殖曲线。

统计学处理: 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 SPSS 软件包进行方差分析, 两两间比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HER2/neu 过表达 以高表达 HER2/neu 的乳腺癌 SKBr3 作阳性对照, DAPI 染细胞核, FITC-二抗间接免疫荧光染色检测 SPC-A-1 细胞 HER2/neu 的表达。免疫荧光显微镜下细胞核蓝染, 乳腺癌细胞 SPC-A-1 绿色荧光强度与 SKBr3 的相近, 表明 SPC-A-1 存在 HER2/neu 的过表达(图 1)。Western blot 方法检测上述细胞 HER2/neu 蛋白, 以肌动蛋白 β -actin 做内参照, 结果与免疫荧光法所得结论一致(图 2)。

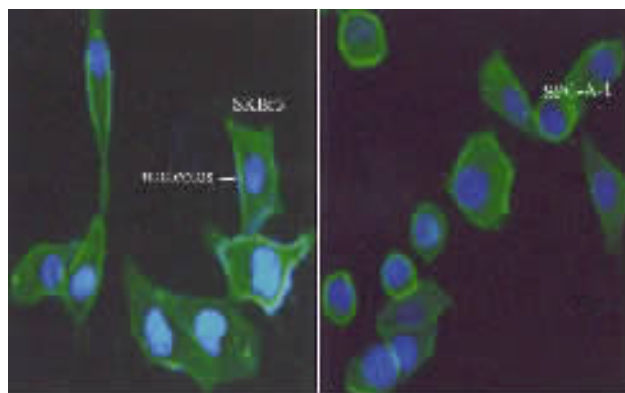
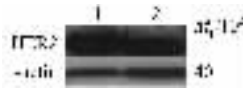


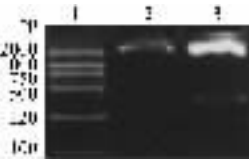
图 1 FITC 标记的 HER2/neu 间接免疫荧光染色 $\times 400$



1 :SKBr3 ; 2 :SPC-A-1.

图2 HER2/neu 蛋白表达的 Western blot 检测

2.2 载体构建与鉴定 挑取重组质粒用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定和 DNA 序列分析,序列与预期完全相符,证明克隆构建正确.将鉴定正确的重组质粒命名为 pSUPER-siHER2,无关序列重组质粒为 pSUPER-nsRNA(图3).



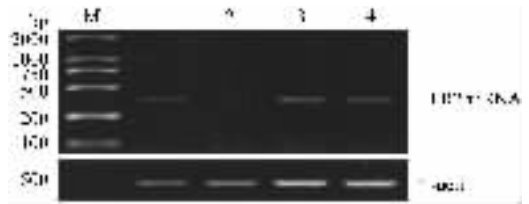
1 DNA Marker DL 2000 ; 2 pSUPER ; 3 :pSUPER-siHER2.

图3 重组质粒酶切鉴定

2.3 siRNA 下调 HER2/neu mRNA 转录 收集重组质粒 pSUPER-siHER2 瞬时转染 SPC-A-1 后 72 h 细胞,提取 RNA 进行 RT-PCR,以 β -actin 作为内参照,检测 HER2/neu 的 mRNA 表达.结果转染后的细胞 HER2/neu mRNA 表达显著下降,说明针对 HER2/neu 的 siRNA 在真核细胞中表达,可以显著抑制 HER2/neu 的 mRNA 表达(图4).

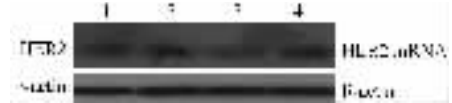
2.4 siRNA 下调 HER2/neu 蛋白表达 收集 pSUPER-siHER2 瞬时转染 SPC-A-1 后 72 h 细胞,提取总蛋白,BAC 法蛋白定量,上样量为 40 μ g/道,并以 β -

actin 作为内参照,Western blot 结果显示,SPC-A-1 的 HER2/neu 蛋白表达水平有下降,表明针对 HER2/neu 的 siRNA 可以抑制 HER2/neu 蛋白表达(图5).



M :DNA Maker DL2000 ; 1 :亲代 SPC-A-1 ; 2 :转染 pSUPER-siHER2 SPC-A-1 ; 3 :转染 pSUPER-nsRNA SPC-A-1 ; 4 :转染空载体 pSUPER SPC-A-1.

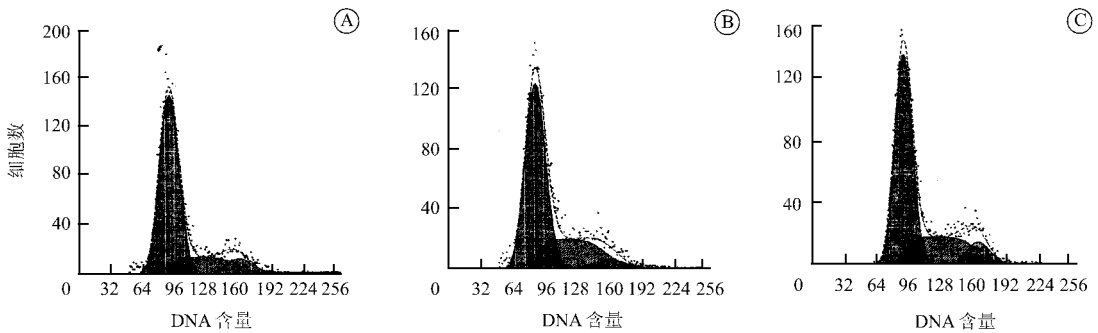
图4 HER2/neu mRNA 表达的 RT-PCR 检测



1 亲代 SPC-A-1 2 :转染 pSUPER-siHER2 SPC-A-1 3 :转染 pSUPER-nsRNA SPC-A-1 4 转染空载体 pSUPER SPC-A-1.

图5 HER2/neu 蛋白表达的 Western blot 检测

2.5 siRNA 影响细胞周期 收集 pSUPER-siHER2 瞬时转染 72 h 后的 SPC-A-1,以亲代和转染 pSUPER 的细胞为对照,FCM 检测细胞周期变化,结果转染 pSUPER-siHER2 的细胞 G1 期较亲代细胞增加 9.9%、较转染 pSUPER 的细胞增加 7.6% ,S 期细胞较亲代细胞减少 8.6%、较转染 pSUPER 的细胞减少 10.6% ,G2-M 期变化不明显,表明 siRNA 主要阻滞细胞于 G1 期(图6).



A :转染 pSUPER-siHER2 的 SPC-A-1 ; B :转染空载体 pSUPER 的 SPC-A-1 ; C 亲代 SPC-A-1.

图6 FCM 检测细胞周期分布

2.6 siRNA 抑制细胞增殖 收集重组质粒瞬时转染 SPC-A-1 细胞,连续 5 天检测细胞 A 值.结果显示,转染重组质粒的 SPC-A-1 细胞生长速度较亲代细胞减慢($P < 0.05$),转染无关序列和空载体质粒的细胞生长速度较亲代略有减慢($P > 0.05$),表明针对 HER2/neu 的重组质粒转染 SPC-A-1 细胞,可有效抑制肿瘤

细胞生长(图7).

3 讨论

肺癌的发病率和死亡率已居恶性肿瘤首位.晚期 NSCLC 治疗采取化疗为主的模式,然而 2/3 NSCLC 对化疗不敏感,晚期肺癌 5 a 生存率 $< 1\%$.

HER2/neu 在肺癌、乳腺癌等多种肿瘤组织过表达,与肿瘤的发生、发展、转移、肿瘤血管形成及化疗耐药等有关,使其成为肿瘤靶向和基因治疗的理想靶点。针对 HER2/neu 开展的乳腺癌等肿瘤治疗研究展示了良好前景^[2,4,6],然而应用 HER2 单抗 Herceptin (trastuzumab) 单独或联合化疗药物治疗 NSCLC 的几个 II 期临床研究,未获得类似乳腺癌、前列腺癌那样的预期疗效,使研究者对 HER2/neu 是否在 NSCLC 的发生、发展中扮演重要角色产生怀疑^[7-8]。

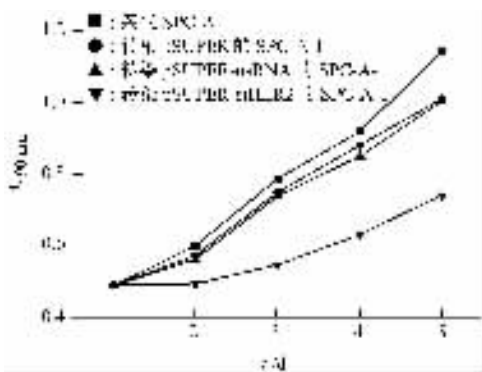


图7 针对 HER2/neu 的 siRNA 抑制 SPC-A-1 细胞增殖

基于转录后沉默效应(PTGS)的 RNAi 技术具有严格的序列特异性、高效性,基因抑制效果明确、治疗的针对性强、副作用小等优势,已日益发展成为研究基因功能和肿瘤基因治疗的重要工具^[9-11]。近年发展的 DNA 载体在体内表达 siRNA 的技术具有产生 siRNA 简便、快速、成本低廉等优点,极大地促进了 RNAi 技术在哺乳动物细胞中的应用^[12-13]。这种载体可以是质粒、病毒或者 DNA 片段。本研究使用 pSUPER 载体,全长 3176 bp,其优势在于具有 H1 III 型聚合酶启动子,能够精确高效地转录出发夹状 RNA,进而在体内被切割成可以发挥 RNAi 效应的 siRNA,该系统已广泛用于基因表达调节的研究^[14]。

我们将构建好的能够转录出发夹状 siRNA 的 pSUPER-siHER2 重组质粒转染过表达 HER2/neu 的 SPC-A-1 肺癌细胞,RT-PCR 和 Western blot 显示抑制了 HER2/neu 表达,证明针对 HER2/neu 的重组质粒转染 SPC-A-1 细胞后可以有效抑制 HER2/neu 表达,使靶细胞出现 G0/G1 期阻滞,造成细胞生长速度减慢,表明 HER2 分子参与了 SPC-A-1 细胞周期和增殖调控,在 NSCLC 的发展中具有重要作用,针对 HER2/neu 分子的 siRNA 可以用来治疗 HER2/neu 过表达 NSCLC。然而,瞬时转染存在基因沉默效应短

暂、转染效率低等不足,还需要构建带筛选标记的 siRNA 表达质粒,进行稳定转染,以获得较长时间的基因沉默效应和更为理想的干涉效果。

【参考文献】

- [1] Tsai CM, Chang KT. Interrelationship between cellular nucleotide excision repair, cisplatin cytotoxicity and EGFR in NSCLC [J]. J Cancer Res 2000 91(2) 213-222.
- [2] Atalay G, Cardoso F, Awada A, et al. Novel therapeutic strategies targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR) family and its downstream effectors in breast cancer [J]. Ann Oncol, 2003, 14(9) 1346-1363.
- [3] Turken O, Kunter E, Cermik H, et al. Prevalence and prognostic value of c-erbB2 expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. Neoplasma, 2003 50(4) 257-261.
- [4] Perez-Soler R. HER1/EGFR targeting: Refining the strategy [J]. Oncologist 2004 9(1) 58-67.
- [5] Ma J, Kahwaji CI, Ni Z, et al. Effects of simulated microgravity on arterial nitric oxide synthase and nitrate and nitrite content [J]. J Appl Physiol 2003 94(1) 83-92.
- [6] Zhao J, Zhang LH, Jia LT, et al. Secreted antibody/granzyme B fusion protein stimulates selective killing of HER2-overexpressing tumor cells [J]. J Biol Chem 2004 279(20) 21343-21348.
- [7] Krug LM, Miller VA, Patel J, et al. Randomized phase II study of weekly docetaxel plus trastuzumab versus weekly paclitaxel plus trastuzumab in patients with previously untreated advanced non small cell lung carcinoma [J]. Cancer 2005 104(10) 2149-2155.
- [8] Clamon G, Herndon J, Kern J, et al. Lack of trastuzumab activity in non small cell lung carcinoma with overexpression of erb-B2 :39810: A phase II trial of Cancer and Leukemia Group B [J]. Cancer, 2005 103(8) 1670-1675.
- [9] Milhavet O, Gary DS, Mattson MP. RNA interference in biology and medicine [J]. Pharmacol Rev 2003 55(4) 629-648.
- [10] Scherr M, Battmer K, Schuhheis B, et al. Stable RNA interference (RNAi) and an option for anti-bcr-abl therapy [J]. Gene Ther 2005, 12(1) 12-21.
- [11] Wohlbold L, van der Kuip H, Miething C, et al. Inhibition of berabl gene expression by small interfering RNA sensitizes for imatinib mesylate (ST1571) [J]. Blood 2003 102(6) 2236-2239.
- [12] DaRoeha W D, Otsu K, Teixeira SM, et al. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in Trypanosome cruzi [J]. Mol Biochem Parasitol, 2004 133(2) 175-186.
- [13] Sui GCH, Soohoo C, Afar EB, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells [J]. PNAS, 2002 99 5515-5520.
- [14] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R, et al. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells [J]. Science 2002 296 550-553.