

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)15-1355-04

靶向于 *HER2* 的 siRNA 表达载体在人乳腺癌细胞 SKBr-3 中的表达

鲍 炜¹ 张立红¹ 付海京² 贾林涛² 张 勇¹ 刘家云¹ 任新玲³ 温伟红¹ 孟艳玲¹ 王成济² 杨安钢^{1,2}(第四军医大学¹ 基础部免疫学教研室, ²基础部生物化学与分子生物学教研室, ³西京医院呼吸内科 陕西 西安 710033)

Expression of siRNA vector against *HER2* in the human breast carcinoma SKBr-3 cells

BAO Wei¹, ZHANG Li-Hong¹, FU Hai-Jing², JIA Lin-Tao², ZHANG Yong¹, LIU Jia-Yun¹, REN Xin-Ling³, WEN Wei-Hong¹, MENG Yan-Ling¹, WANG Cheng-Ji², YANG An-Gang^{1,2}¹Department of Immunology, ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, ³Department of Respiratory Diseases, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To investigate the effect of *HER2*-targeted RNA interference (RNAi) on the growth of human breast carcinoma SKBr-3 cells. **METHODS:** *HER2*-targeted hairpin small interfering RNA (siRNA) genes were obtained by oligonucleotide synthesis and annealing of the complementary single strand DNAs. pSUPER vector harboring each of the above genes was transfected into SKBr-3 cells *in vitro*. The expression of *HER2* gene in the transfected cells was examined by RT-PCR and indirect immunofluorescence assay, and the effect of the *HER2*-targeted siRNA on cell growth and proliferation was evaluated by cell counting and morphological observation. **RESULTS:** Both RT-PCR and indirect immunofluorescence assay revealed a remarkable decrease of *HER2* expression in pSUPER-sihe1- and pSUPER-sihe2-transfected cells, but not in pSUPER vector transfected cells. Cell proliferation was dramatically inhibited after the expression of the *HER2*-targeted siRNAs as shown by microscopic observation and cell counting. **CONCLUSION:** *HER2*-targeted RNAi in SKBr-3 cells can effectively inhibit the expression of *HER2* gene and the proliferation of the cells *in vitro*.

【Keywords】 *HER2*; RNA interference; gene therapy**【摘要】**目的 探讨针对 *HER2* 分子的 RNA 干扰对乳腺癌

收稿日期 2007-02-01; 接受日期 2007-06-02

基金项目 国家重点基础研究发展(973)计划项目(2004CB518805) 教育部“长江学者和创新团队发展计划”(IRT0459) 国家自然科学基金(30500592)

通讯作者 杨安钢. Tel (029) 84774528 Email agyang@fmmu.edu.cn

作者简介 鲍 炜. 博士生(导师杨安钢). Tel (029) 84774531 Ext.

805 Email baow1976@yahoo.com.cn

细胞生长的影响. 方法 人工合成 DNA 经退火磷酸化后克隆入 pSUPER 载体. 基因转染后通过观察细胞形态和细胞计数等方法验证发夹状小干扰 RNA (siRNA) 对细胞生长状态的影响, 以激光共聚焦检测基因表达情况. 结果 siRNA 表达载体转染后可以引起 SKBr-3 细胞大量死亡, 间接免疫荧光检测出 *HER2* 蛋白表达降低. 结论 针对 *HER2* 进行 RNA 干扰可在体外抑制 SKBr-3 细胞生长.

【关键词】 *HER2*; RNA 干扰; 基因治疗**【中图分类号】** R730.5 **【文献标识码】** A

0 引言

目前, 乳腺癌的死亡人数占到女性肿瘤的 40%^[1]. 研究表明许多肿瘤的发生都与特定癌基因或酪氨酸激酶受体基因过表达导致的细胞增殖有关. *HER2* 受体已被证实是与乳腺肿瘤发生密切相关的受体^[2]. *HER2* 是由原癌基因 *ErbB2/neu/HER2* 编码的一种受体酪氨酸蛋白激酶, 属表皮生长因子受体家族^[3]. 近年来, *HER2* 受体靶向的乳腺癌治疗倍受关注^[4]. 对于 *HER2* 阳性的乳腺癌患者, 已有针对 *HER2* 的商品化抗体 Trastuzumab 问世, 但近来发现这种抗体具有无法克服的心脏毒性和其它副作用, 因此其作用受到限制^[5]. 将 siRNA 用于肿瘤细胞中可以特异性地抑制目的基因的表达, 从而有可能逆转细胞的恶性表型. 我们据此构建了针对 *erbB2/HER2/neu* 的 siRNA 表达载体, 研究它们对人乳腺癌 SKBr-3 细胞中 *HER2* 表达的抑制作用以及 *HER2* 对细胞生长增殖的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 人乳腺癌细胞系 SKBr-3, 大肠杆菌 DH5 α 及 pSUPER 载体均为本室保存; T4 DNA 连接酶、限制性核酸内切酶和 DL2000 DNA Marker (TaKaRa 公司); 新生牛血清、DMEM 培养基、胰酶及脂质体 lipofectAMINETM2000 (Gibco 公司); RT-PCR 试剂盒 (Invitrogen 公司). 仪器 BX-60 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); Alpha ImagerTM 1220 凝胶成像系统 (Alpha Innotech 公司); SUNRISE 酶标仪 (澳大利亚 TECAN 公司); PE2400 PCR 仪 (美国 Perkin Elmer 公

司) 5417R 台式低温冷冻离心机、5415D Centrifuge 台式高速离心机(德国 Eppendorf 公司)。

1.2 方法

1.2.1 以 *HER2* 为靶分子的 siRNA 的设计及真核表达载体的构建 根据人 *HER2* 基因设计 4 条寡聚脱氧核苷酸链(oligo), 序列为: oligo1: 5'-gatccctgatagacaccaaccgctcttcaagag agagcgggtgtgtctatcattttggaaa-3'; oligo2: 5'-agcttttccaaaatgatagacaccaaccgct ctctcttgaagagcgggtgtgtctatcaggg-3'; oligo3: 5'-gatccctgaaacctgacctctctatt caagagataggagaggtcaggtttcattttggaaa-3'; oligo4: 5'- agcttttccaaaatgaaacctgacc tctctatctcttgaatagagaggtcaggttcaggg-3'。由赛百盛公司合成。取两条 DNA 在退火缓冲液中退火 95°C 4 min 70°C 10 min, 缓慢降温到 4°C。退火缓冲液组分为 100 mmol/L 醋酸钾 30 mmol/L HEPES-KOH, 2 mmol/L 醋酸镁。取退火后的产物磷酸化, 产物与经 *Hind* III 和 *Bgl* II 双酶切的 pSUPER 载体进行连接, 连接产物命名为 pSUPER-sihe1, pSUPER-sihe2, 转化 *E. coli* DH5 α 菌株, 挑阳性克隆酶切鉴定, 测序。

1.2.2 真核表达载体的细胞转染 转染前 24 h 将 SKBr-3 细胞分别铺于 6 孔板, 待细胞生长至约 60% 汇合时, 按照 lipofectAMINETM 2000 使用说明转染 pSUPER-siRNA 及 pSUPER 空载体。倒置显微镜观察细胞状态。

1.2.3 RT-PCR 检测 *HER2* 的表达 RNA 的提取按试剂盒说明书操作进行, 模板总量 5 μ g, 反转录酶 16.67 nkat, 0.5 μ L 引物和 10 mmol/L dNTP 1 μ L, 总体积 20 μ L, 42°C 60 min。取 1 μ L 逆转录产物, 20 μ mol/L 引物 0.5 μ L, 10 mmol/L *Taq* DNA 聚合酶(总体积 50 μ L)进行 PCR。反应参数为 94°C 30 s, 55°C 30 s, 70°C 1 min 30 个循环。检测 *HER2* 的引物为: Mh1: 5'ctgtttgccgtgccaccctgagt 3'; Mh2: 5'cttctgctgccgtcgttgatgag 3'。以 β -actin 为内对照, 引物为: ACTB1 5'tgcgcagaaaacaagatgagatt 3'; ACTB2 5'tgggggacaaaaaggggaagg 3', 以 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 RT-PCR 产物。

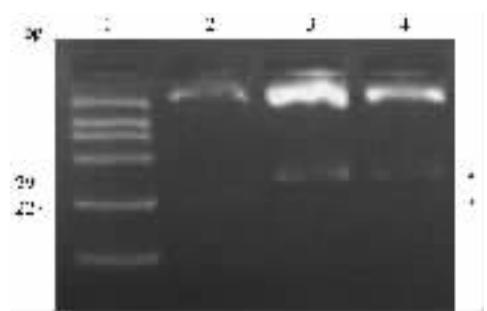
1.2.4 间接免疫荧光检测与激光共聚焦显微镜观察 转染前 24 h 用胰酶消化 SKBr-3 细胞, 加 1~2 滴至 12 孔板中的盖玻片上 37°C 孵箱放置 1 h, 使细胞贴壁, 制成细胞爬片, 待细胞达到 80% 汇合率时进行转染。24 h 后分别用以 *HER2* 为靶点的两个干扰载体及空载体进行瞬时转染, 于转染后 48 h 取出, 用 PBS(pH 7.4)洗 2 次, 加 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min, 再以 PBS 洗 2 次, 经 0.1 mL/L Triton 3 mL/L 双氧水灭活内源性过氧化物酶及血清封闭等处理后, 依

次加入适量稀释的一抗、二抗及 SABC-Cy3; 加一滴 PBS 封片, 用荧光显微镜观察并照相。

1.2.5 细胞计数分析 于转染后 1~4 d 消化细胞, 用血球计数板进行细胞计数。

2 结果

2.1 真核表达载体的鉴定 将退火产物与经双酶切的载体连接, 转化感受态细胞, 挑取单克隆培养, 小量提取质粒 DNA, 将干扰组质粒分别命名为 pSUPER-sihe1 和 pSUPER-sihe2。用 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切, 电泳后见到一条约 291 bp 的片段, 表明退火后的 siRNA 基因已插入 pSUPER 载体中, 测序结果完全正确(图 1)。

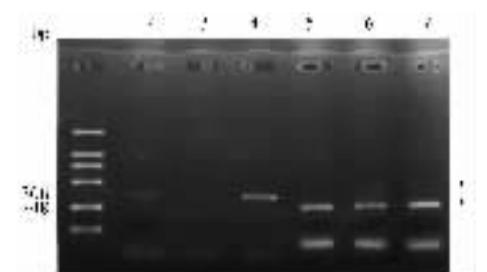


1: DNA marker DL 2000; 2: pSUPER/*Eco*R I + *Hind* III; 3: pSUPER-sihe1/*Eco*R I + *Hind* III; 4: pSUPER-sihe2/*Eco*R I + *Hind* III.

图 1 克隆入 siRNA 载体酶切鉴定

2.2 *HER2* 靶向 siRNA 对目的基因表达的抑制

以构建成功的质粒瞬时转染 SKBr-3 细胞, 48 h 后提取总 RNA, 并取相同量的模板进行反转录 PCR, 干扰组的条带比实验组明显暗淡(图 2)。取干扰效果较好的 pSUPER-sihe2 转染细胞进行间接免疫荧光试验, 激光共聚焦显微镜观察表明实验组细胞表面 *HER2* 分子表达明显减少(图 3)。



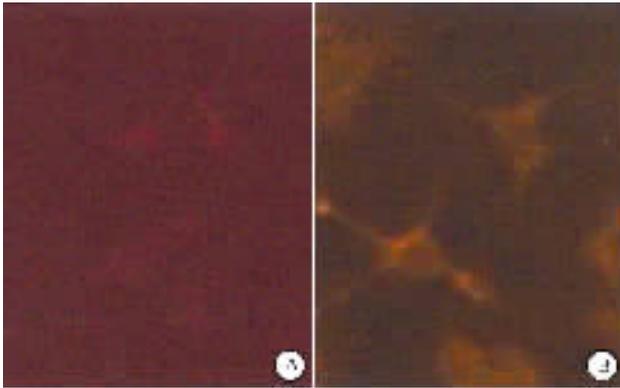
1: DNA marker DL 2000; 2: pSUPER-sihe1; 3: pSUPER-sihe2; 4: pSUPER; 5~7: 内参照 β -actin.

图 2 重组质粒的 RT-PCR 鉴定结果

2.3 *HER2* 靶向 siRNA 表达抑制体外 SKBr-3 细胞生长

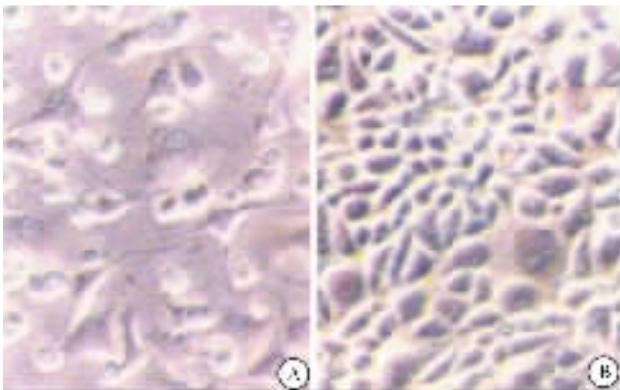
以 pSUPER 空载体作为对照, 用 pSUPER-sihe2

转染后发现,实验组细胞在转染后第2日开始部分细胞形态及折光性变差,有少量细胞死亡(图4)。随着后死亡细胞逐渐增多,漂浮于培养液中。细胞计数结果显示转染实验组细胞生长受到抑制,细胞增殖缓慢(图5)。



A: pSUPER-sihe2; B: pSUPER.

图3 细胞转染重组质粒后的激光共聚焦结果



A: pSUPER-sihe2; B: pSUPER.

图4 转染后第2日 SKBr-3 细胞形态观察 $\times 200$

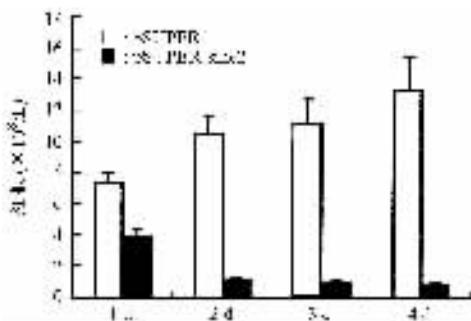


图5 SKBr-3 细胞转染质粒后的计数结果($n=5, \bar{x} \pm s$)

3 讨论

在乳腺癌、卵巢癌及胃癌等多种恶性肿瘤中,由于基因扩增,转录激活等原因,HER2 表达水平高出正常细胞上百倍。成为一种公认的肿瘤标记物(乳腺癌(25%~30%),卵巢癌(25%~32%),肺腺癌

(30%~35%),原发性肾细胞癌(30%~40%)^[6]。研究表明,HER2 的过表达与肿瘤的恶性程度和转移能力密切相关。过表达的 HER2 可以与神经调节蛋白多肽类激素等配体结合。通过激活 Ras,MAPK 等信号分子导致细胞过度增殖和癌变^[7]。因此,通过 RNA 干扰等方法抑制肿瘤细胞中 HER2 的表达,可以在一定程度上逆转细胞的恶性表型,抑制细胞过度增殖。

RNA 干扰是一种广泛存在于高等动植物中的由双链 RNA 介导的转录后基因沉默(PTGS)现象^[8-10]。在肿瘤基因治疗中,通过人工合成特定癌基因靶向的 siRNA,或构建上述 siRNA 的表达载体,并将它们导入肿瘤细胞中,可以特异性地抑制目的基因的表达。我们针对 HER2 mRNA 的 2 个靶点,即 gagcggttgggtctatca 和 taggagaggtcaggtttca 核苷酸序列,设计了 2 个发夹状 siRNA 分子,并构建了该 siRNA 的表达载体 pSUPER-sihe1 和 pSUPER-sihe2。通过脂质体转染进入了人乳腺癌 SKBr-3 细胞后,该载体在 H1 启动子的调控下表达 siRNA^[11]。诱发针对 HER2 的干扰反应。我们通过 RT-PCR 和间接免疫荧光检测证实,转染 siRNA 表达载体的细胞中 HER2 的表达受到显著抑制,其中 RT-PCR 结果显示针对 HER2 mRNA 2 个靶位点的 siRNA 对 HER2 的抑制分别达到了 90% 和 95%。这表明,虽然由于 mRNA 本身存在二级结构等原因,并不是针对 mRNA 所有靶位点的 siRNA 都能有效地诱发针对靶 mRNA 的干扰反应,但我们在研究中选择的针对 HER2 mRNA 靶位点的 siRNA 均可以高效地诱导 HER2 靶向的 RNA 干扰反应。同时,光学显微镜下观察发现,与空载体转染组相比,siRNA 表达载体转染细胞生长状态变差,很多细胞发生死亡。细胞计数结果显示,siRNA 的表达明显抑制了细胞的生长和增殖。

因此,应用 RNA 干扰技术可以有效地抑制人乳腺癌 SKBr-3 细胞等恶性肿瘤细胞中 HER2 的过表达,阻断 HER2 介导的细胞信号转导途径,从而抑制肿瘤过度增殖。本研究可望为 HER2 阳性肿瘤的基因治疗提供一种新思路。

【参考文献】

- [1] Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer [J]. Lancet Oncol, 2001 2: 133-140.
- [2] Clarke R, Liu MC, Bouker KB, et al. Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling [J]. Oncogene, 2003, 22: 7316-7339.
- [3] Tiseo M, Loprevite M, Ardzizoni A. Epidermal growth factor receptor inhibitors: A new perspective in the treatment of lung cancer

[J]. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2004, 4(2):139 - 148.

[4] Meric-Bernstam F, Hung MC. Advances in targeting human epidermal growth factor receptor-2 signaling for cancer therapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(21) 6326 - 6330.

[5] Keefe DL. Trantuzumab-associated cardiotoxicity[J]. *Cancer* 2002, 95 1592 - 1600.

[6] Prowell TM, Armstrong DK. Selecting endocrine therapy for breast cancer : what role does HER-2/neu status play[J]? *Semin Oncol*, 2006, 33(6) 681 - 687.

[7] Jensen EV, Cheng G, Palmieri C, et al. Estrogen receptors and proliferation markers in primary and recurrent breast cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 15197 - 15202.

[8] Novina CD, Sharp PA. The RNAi revolution[J]. *Nature*, 2004, 430(6996) 161 - 164.

[9] 李庆霞, 黄红艳, 刘家云, 等. survivin 基因的 RNA 干涉抑制人乳腺癌 SKBr23 细胞体外增殖的作用[J]. *第四军医大学学报*, 2005 15(2) 101 - 104.

[10] 赵英, 任君琳, 孟艳玲, 等. hTERT siRNA 表达载体的构建及对转染的 HeLa 细胞生长抑制作用[J]. *第四军医大学学报*, 2005 26(9) 828 - 830.

[11] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cell[J]. *Science*, 2002, 296(5567) 550 - 553.

编辑 王 睿

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2007)15-1358-01

微波治疗会厌囊肿 56 例

孙志宏, 王钧鏢

(平顶山市第二人民医院耳鼻喉科, 河南 平顶山 467000)

【关键词】会厌囊肿 微波 麻醉 喉镜检查

【中图分类号】R767.5 【文献标识码】B

1 临床资料 收集 1999-08/2007-03 我院就诊的会厌囊肿患者 56(男 39, 女 17) 例。年龄 19 ~ 62 岁。其中, 首次发病 44 例, 复发 12 例, 复发 1 次者 8 例 2 次者 3 例 3 次者 1 例。囊肿单发 49 例, 多发 7 例。有明显咽异物感 43 例, 无症状而在喉镜检查中偶尔发现 13 例。检查: 会厌囊肿位于会厌舌面 29 例, 位于会厌谷 14 例, 会厌皱襞 3 例。囊肿呈半圆形, 基广或带蒂, 表面光滑, 呈灰白、微黄或淡红色, 少数可见小血管纵横分布, 囊肿大小不等。小的如黄豆, 大的占据整个会厌。术前常规禁食 4 h, 全部病例均在表面麻醉下进行。先用 10 mL/L 卡因液向咽腔喷雾 3 次, 间隔 3 min, 再用无菌纱布牵拉舌体喷雾喉部 2 次, 间隔 3 min, 使咽喉部充分麻醉。患者取坐位, 自己用无菌纱布包裹舌体向外牵拉, 术者左手持间接喉镜, 右手持已弯成间接喉钳状弯的单极或双极微波探头(根据囊肿大小选择单极或双极微波探头)。输出功率为 50 ~ 60 W。将探头直接刺入囊肿进行凝固, 每点 3 ~ 5 s, 视病变大小多点接触。重复热凝, 待囊肿壁变白、囊肿变小即可。如囊肿较大可在 2 wk 后重复治疗。术后常规应用抗生素激素静点预防感染和水肿, 并辅以雾化吸入治疗。术后定期间接喉镜检查复查局部情况。疗效评定标准 ①治愈: 咽异物感、梗阻感症状消失, 会厌黏膜生长良好, 未见囊肿残留复发。②有效: 自觉咽异物感、梗阻感等症减轻或缓解, 会厌黏膜生长良好, 未见囊肿残留。③无

效: 自觉咽异物感、梗阻感等症无改善, 会厌囊肿残留或复发。结果: 一次治愈 53 例, 3 例于 2 wk 后检查有残留, 再次微波后治愈。治疗过程中无出血等并发症发生。术后观察第 1 日有局部肿胀, 除有轻度咽痛外无其它不适。术后 2 ~ 3 d 有白色伪膜形成。2 wk ~ 1 mo 伪膜脱落, 黏膜再生。无出血、会厌水肿引起呼吸困难等严重并发症的病例。随访 6 mo ~ 3 a, 无 1 例再次复发, 喉镜检查示喉部解剖标志正常。

2 讨论 会厌囊肿以往常在间接喉镜或直达喉镜下单纯咬除囊壁, 由于不能完全破坏囊膜, 所以易复发, 另外会厌囊肿常接近舌根部, 该部位血管丰富, 单纯咬除囊肿有可能引起出血^[1]。全身麻醉插管行支撑喉镜或直达喉镜下手术咬除, 能充分满足手术要求, 但有医疗费用高、气管插管妨碍手术视野影响操作等缺点。我们采用表面麻醉间接喉镜下微波治疗会厌囊肿, 通过高温热凝组织, 使表里同时凝固, 囊壁变性萎缩而达到治疗的目的。其特征是在同一辐射场中, 组织的损伤几乎一致, 因此受治疗区域的边界清楚, 深度足够, 组织损伤极小, 也无炭化和气雾形成, 微波能在瞬间使会厌囊肿液凝固, 囊壁破坏, 达到治疗与防止囊肿复发的功效。同时病灶血液中的蛋白质瞬间从里到外被凝固, 血管被阻塞, 有明显止血功能, 故术野清楚不会出血。术者可从容操作, 并且对周围组织反应轻微, 损伤愈合快, 愈后不影响其正常功能。由于会厌前间隙组织疏松, 含有黏液腺, 在微波治疗时功率过大或时间过长会出现副损伤, 如会厌舌面、会厌溪水肿, 会厌软骨部分缺失, 因此治疗上时要控制微波输出功率(一般 50 ~ 60 W) 和每点凝固时间(3 ~ 5 s)。术中操作范围不要超过囊肿, 特别是会厌溪囊肿。表面麻醉要充分, 但要注意的卡因的用量不能过量, 有无过敏史。术中操作一定要熟练、轻柔, 尽量缩短手术时间。我们体会到该方法安全有效, 具有方法简单, 痛苦小, 组织反应轻, 费用低, 不易出血, 患者易于接受等优点值得推广。

【参考文献】

[1] 黄选兆, 汪吉宝. 实用耳鼻咽喉科学[J]. 北京: 人民卫生出版社, 1998 544.

收稿日期 2007-04-05; 接受日期 2007-04-20
 作者简介: 孙志宏, 主治医师. Tel (0375)4975219 Email :szhxs2@163.com

编辑 王 睿