

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)15-1345-04

针对 ER α 的 RNA 干涉对人乳腺癌 Bcap-37 细胞生长的抑制作用

付海京¹, 贾林涛¹, 鲍 炜², 赵 晶¹, 孟艳玲², 王成济¹, 杨安钢²(第四军医大学基础部¹: 生物化学与分子生物学教研室², 免疫学教研室 陕西 西安 710033)

Inhibitory effect of ER α -targeted RNA interference on the growth of human breast cancer cell line Bcap-37

FU Hai-Jing¹, JIA Lin-Tao¹, BAO Wei², ZHAO Jing¹, MENG Yan-Ling², WANG Cheng-Ji¹, YANG An-Gang²¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, ²Department of Immunology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To investigate the inhibitory effect of ER α -targeted RNA interference (RNAi) on the growth of human breast cancer cell line Bcap-37. METHODS: ER α -targeted hairpin small interfering RNA (siRNA) genes, sier1 and sier2, were obtained by oligonucleotide synthesis and annealing of the complementary single strand DNAs. pcDNA3 vector harboring each of the above genes was transfected into Bcap-37 cells *in vitro*. The expression of ER α gene in the transfected cells was examined by reverse transcriptase PCR (RT-PCR) and indirect immunofluorescence assay, and the effect of the targeted siRNA on cell growth and proliferation was evaluated by MTT assay. RESULTS: Both RT-PCR and indirect immunofluorescence assay revealed a remarkable decrease of ER α expression in pcDNA3-sier1-transfected cells, but not in pcDNA3 vector transfected cells. Cell proliferation was strongly inhibited after the expression of the ER α -targeted siRNAs as shown by microscopic observation and MTT. CONCLUSION: ER α -targeted RNAi in Bcap-37 cells can effectively inhibit the expression of ER α gene and the proliferation of the cells *in vitro*.

【Keywords】 ER α ; RNA interference; gene therapy

【摘要】目的 探讨针对雌激素受体(ER α)分子的 RNA 干涉对肿瘤细胞生长的影响。方法 人工合成编码 siRNA 的脱氧寡核苷酸链,经磷酸化后退火连接进 pSUPER 载体。挑取和

收稿日期 2005-11-30; 接受日期 2005-12-13

基金项目 国家重点基础研究发展(973)计划(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(30500274)

通讯作者 杨安钢。Tel (029) 84774528 Email agyang@fmmu.edu.cn
作者简介 付海京。硕士生(导师杨安钢)。Tel (029) 84774531 Ext. 805 Email hear_f@msn.com

扩增序列正确的重组载体,稳定转染 Bcap-37 细胞后分别以 RT-PCR 和间接免疫荧光检测 mRNA 及蛋白质的表达情况,MTT 法检测 RNAi 对细胞生长的影响。结果 siRNA 表达载体转染后 ER α 表达水平明显降低,细胞增殖减慢。结论:针对 ER α 的 RNA 干涉可在体外抑制 Bcap-37 细胞生长。

【关键词】 雌激素受体 α RNA 干涉 基因治疗

【中图分类号】 R730.5 **【文献标识码】** A

0 引言

雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α) 是甾体类激素受体的一种,主要定位于细胞核中,部分位于细胞质中,成熟蛋白包含 6 个结构域。临床上 ER α 过表达与乳腺癌和其他妇科肿瘤的发生相关,同时也是化疗时肿瘤产生耐药性的重要原因。在乳腺癌中,ER α 阳性率达到 50% 以上^[1]。ER α 与雌激素结合后成为具有活性的转录因子,激活多种与生长增殖相关基因的表达^[2]。研究表明 ER α 分子与肿瘤细胞的生长有关。我们据此构建了针对 ER α 的 siRNA 表达载体,以研究它们对人乳腺癌 Bcap-37 细胞中 ER α 表达的抑制作用以及 ER α 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 Bcap-37,大肠杆菌 DH5 α 以及 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) 新生小牛血清、DMEM 培养基、胰酶及脂质体 lipofectAMINETM 2000 (Gibco 公司);RT-PCR 试剂盒 (Invitrogen 公司)。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 ER α 为靶分子的 siRNA 的设计及真核表达载体的构建 根据人 ER α 基因设计两对寡聚脱氧核苷酸链 (oligo),序列为 shRNA1a: 5'-gatccccccagtg-caccattgataaattcaagagattatcaatggtgcactggttttggaaa-3'; sh-

RNA1b : 5'-agcttttccaaaaaccagtcaccattgataaatctcttgaattatcaatgggtgactggggg-3'; shRNA2a : 5'-gatccccgactactgtt-gctcctaactcaagagagtaggagcaaacagtagcttttggaaa-3'; shRNA2b : 5'-agcttttccaaaaagctactgttctcctaactctcttgaagttaggagcaaacagtagcggg-3'。由赛百盛公司合成。以上序列在 GenBank 中检索未发现与其他 mRNA 序列同源。取两条 DNA 在退火缓冲液 (100 mmol/L 醋酸钾, 30 mmol/L HEPES-KOH, 2 mmol/L 醋酸镁, pH 7.4) 中经 95℃ 4 min, 70℃ 10 min 缓慢降温到 4℃。取退火后的产物与经 *Hind* III 和 *Bgl* II 双酶切的 pSUPER 载体进行连接, 将其转化 *E. coli* DH5 α 菌株, 挑阳性克隆扩大培养, 提取质粒进行酶切鉴定, 经测序确认插入片段 shRNA1, shRNA2 序列正确。将两个真核表达载体分别命名为 pSUPER-sier1 和 pSUPER-sier2。

1.2.2 筛选标记载体的构建 由于 pSUPER 载体不带有真核筛选标记且 pcDNA3 载体有两个 *Spe* I 位, 恰好位于其 CMV 启动子两端, 故将 pcDNA3 以 *Spe* I 酶切, 去除 CMV 启动子序列, 之后用 T4 连接酶将载体自身环化。再将之前构建好的 pSUPER-sier1, pSUPER-sier2 和环化后的 pcDNA3 分别以 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切, 将 siRNA 以及 H1 启动子连入改建后的 pcDNA3 中, 使 siRNA 表达载体具有 Neo 筛选标记, 命名为 pcDNA3-sier1 和 pcDNA3-sier2。

1.2.3 细胞培养和转染 将 Bcap-37 细胞培养于含 100 mL/L 新生小牛血清的 1640 培养液中, 置于含 50 mL/L CO₂, 37℃ 细胞培养箱内培养。采用 LipofectAMINE™ 2000 介导细胞转染, 操作参考说明书。转染后细胞用含 600 mg/L G418 的培养液筛选, 直至未转染质粒的空白对照细胞完全死亡。挑选形成的单克隆细胞株, 用含 300 mg/L G418 的培养液维持培养。

1.2.4 RT-PCR 检测 ER α 的表达 用 TriZOL 试剂提取细胞总 RNA, 采用半定量 RT-PCR 分析 ER α mRNA 表达。引物序列如下 5'-TGATCCTACCAGAC-CCTTCA-3'; 5'-TCCTGTCCAAGAGCAAGTT-3'。模板总量 1 μ g, 反转录酶 41.68 nkat, 引物 0.5 μ L 和 10 mmol/L dNTP 1 μ L, 总体积 20 μ L, 42℃ 60 min。取 1 μ L 逆转录产物 0.5 μ L 引物 (20 μ mol/L), *Taq* DNA 聚合酶及 dNTP (10 mmol/L) (总体积 50 μ L) 进行 PCR。反应参数为 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 70℃ 1 min, 25 个循环。以 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RT-PCR 产物。

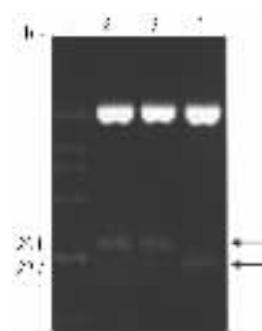
1.2.5 间接免疫荧光检测 转染前 24 h 用胰酶消化细胞, 铺于 12 孔板中的盖玻片上, 37℃ 孵箱放置 1 h, 使细胞贴壁, 制成细胞爬片, 待细胞贴壁后取出, 用 PBS (pH 7.4) 洗 2 次, 加 40 g/L 多聚甲醛固定 30

min, 再以 PBS 洗 2 次, 经 0.1 g/L Triton 处理, 3 g/L 双氧水灭活内源性过氧化物酶及血清封闭后依次加入适量稀释的一抗、二抗及 SABC-Cy3; 加一滴 PBS 封片, 于荧光显微镜观察并照相。

1.2.6 MTT 检测 细胞制成单细胞悬液后接种于 96 孔培养板, 接种密度为 1×10^3 /孔。每孔分别于不同时间点加入 20 μ L 新配制的 0.5 g/L MTT, 37℃ 继续孵育 4 h, 弃 MTT 液, 加 150 μ L DMSO 混匀, 酶联免疫检测仪测定各孔 $A_{490\text{nm}}$ 值。

2 结果

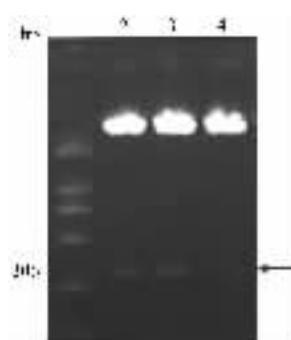
2.1 真核表达载体的鉴定 用 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切电泳后见到一条约 291 bp 的片段, 表明退火后的 siRNA 基因已插入 pSUPER 载体中, 测序结果完全正确 (图 1)。



1 : DNA marker DL 2000 ; 2 : pSUPER-sier1 ; 3 : pSUPER-sier2 ; 4 : pSUPER.

图 1 siRNA 克隆入 pSUPER 载体的酶切鉴定

2.2 pcDNA3-sier1, pcDNA3-sier2 载体的构建 提取质粒用 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切, 电泳后见到一条约 306 bp 的片段, 表明 siRNA 基因以及 H1 启动子已插入 pcDNA3 载体中 (图 2)。

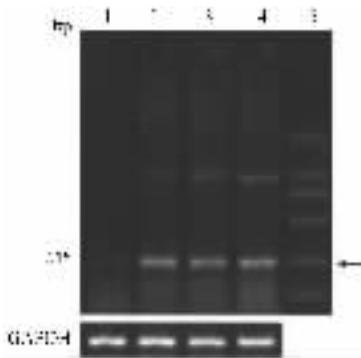


1 DNA marker DL 2000 ; 2 : pcDNA3-sier1 ; 3 : pcDNA3-sier2 ; 4 : pcDNA3.

图 2 pcDNA3-sier1, pcDNA3-sier2 载体的酶切鉴定

2.3 RNAi 对 Bcap-37 细胞中 ER α 基因的抑制作用

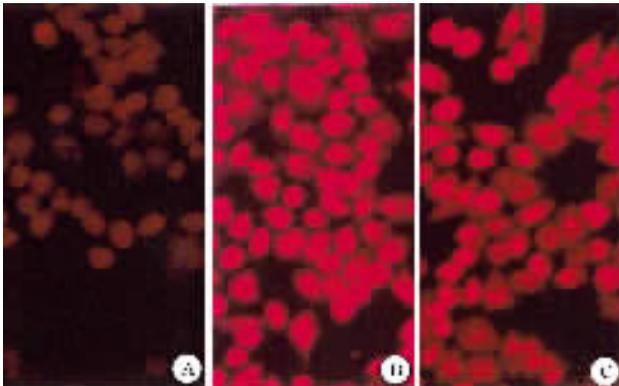
稳定转染 pcDNA3-sier1 的细胞株与转染空载体的对照细胞株相比, ER α mRNA 表达明显降低, 而转染 pcDNA3-sier2 的细胞株的表达水平无显著差异. 后续的实验组均采用 pcDNA3-sier1 细胞株(图3).



1 pcDNA3-sier1 ; 2 pcDNA3-sier2 ; 3 pcDNA3-mock ; 4 mock ; 5 DNA marker DL 2000.

图3 稳定转染后雌激素受体 α mRNA 表达水平的改变

2.4 间接免疫荧光 在转染了空载体以及未转染的细胞中, ER α 的表达水平较高, 转染了重组质粒 pcDNA3-sier1 的细胞中, 荧光强度明显减弱, 说明 ER α 分子的表达水平明显下调(图4).



A : pcDNA3-sier1 ; B : pcDNA3-mock ; C : mock.

图4 稳定转染后雌激素受体 α 蛋白质表达水平的改变 荧光染色 $\times 200$

2.5 ER α 靶向 siRNA 表达对体外 Bcap-37 细胞生长的抑制 ER α 干扰组细胞的 $A_{490\text{nm}}$ 值从第5日开始明显低于两组对照细胞, 表明 ER α 的表达降低使 Bcap-37 细胞生长受到抑制, 细胞增殖减慢(图5).

3 讨论

RNA 干扰现已普遍应用于替代基因敲除来作为下调特定基因功能的方法^[3-5]. 通过基于载体的 siRNA 策略, 能够在细胞中持续地产生特异的 siRNA, 并且维持 RNA 干扰的效果, 这可以克服瞬时转

染化学合成 siRNA 作用短暂的不足^[6]. 我们研究了在乳腺癌细胞中干扰 ER α 的表达. 我们应用了 pSUPER 载体, 它能在 H1 启动子的作用下转录出小发夹状 RNA (shRNA), 然后经过剪切形成长度为 21 ~ 23 个核苷酸的 siRNA 而发挥作用^[7]. 我们采用依赖于 DNA 载体的 siRNA 表达系统成功地抑制了细胞内 ER α 基因表达.

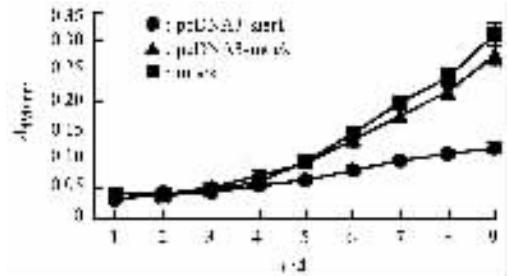


图5 MTT 实验检测稳定转染 ER α 对细胞增殖的影响 ($n = 5 \bar{x} \pm s$)

正常细胞发生恶性转化是一个多阶段综合性过程, 在此过程中恶性转化细胞逐渐获得了与正常细胞不同的新的生物学特性, 包括细胞染色体数目和结构的改变、具有克隆形成能力增加和在适当的宿主体内形成肿瘤等表现, 而后两个指标具有良好的平行关系, 是衡量细胞是否发生恶性转化的重要标志. 而且, 凋亡机制缺陷是很多肿瘤细胞的共同特征, 也是这些肿瘤对于放化疗不敏感或治疗耐药的基础. 以往的研究表明, 雌激素以及它的受体在乳腺细胞的恶性转化过程中发挥重要作用. 有文献报道一些凋亡蛋白如 Bcl-2, Bcl-XL, 当应答于 JNK (c-Jun N-terminal kinase) 活化后被磷酸化, 而在 ER α 过表达的细胞中 JNK 的表达被抑制, 导致 Bcl-2, Bcl-XL 的失活以及随后的刺激凋亡酶瀑布式反应和细胞死亡被抑制^[8]. 因此, 在乳腺癌的治疗中, ER α 可作为一个很有希望的靶点.

本实验中基于载体的 RNA 干扰策略被用于抑制乳腺癌 Bcap-37 细胞系中 ER α 基因的表达. 实验显示 ER α 的下调能够显著地抑制肿瘤细胞体外增殖能力. 由于 RNA 干扰介导的基因沉默高效并且更加精确, ER α 靶向的小干扰 RNA 能够避免化疗中一些明显的缺点, 如耐药以及某些药物如他莫昔芬长期应用可能引起的雌激素样的副作用^[9]. 虽然 ER α 基因表达下调抑制乳腺癌细胞生长涉及到的众多分子还不完全清楚, 但本研究已显示出以 RNAi 中介的 ER α 表达下调可以作为 ER α 阳性乳腺癌治疗的一种新的手段.

【参考文献】

[1] Jensen EV, Cheng G, Palmieri C, et al. Estrogen receptors and proliferation markers in primary and recurrent breast cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(26) 15197 - 15202.

[2] Metivier R, Penot G, Hubner MR, et al. Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter[J]. Cell, 2003, 115(6): 751 - 763.

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

[4] 李庆霞, 黄红艳, 刘家云, 等. survivin 基因的 RNA 干扰抑制人乳腺癌 SKBr23 细胞体外增殖的作用[J]. 第四军医大学学报, 2005 26(2) 101 - 104.

[5] 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.

[6] Sui G, Soohoo C, Affar el B, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(8) 5515 - 5520.

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

[8] Razandi M, Pedram A, Greene GL, et al. Cell membrane and nuclear estrogen receptors derive from a single transcript: studies of ER α and ER β expressed in CHO cells[J]. Mol Endocrinol, 1999, 13(2): 307 - 319.

[9] Norris JD, Paige LA, Christensen DJ, et al. Peptide antagonists of the human estrogen receptor[J]. Science, 1999, 285(5428): 744 - 746.

编辑 王 睿

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2006)15-1348-01

胸膜间皮瘤 11 例临床分析

王 刚 杨 利 仙登沁

(武警四川总队成都医院外二科 四川 成都 610041)

【关键词】间皮瘤; 诊断; 治疗

【中图分类号】R561 【文献标识码】B

1 临床资料 ①一般资料: 我院 1999-10/2005-06 共收治经手术、胸膜活检及胸液细胞学检查确诊的胸膜间皮瘤 11(男 8 女 3)例, 男女之比为 2.7:1. 平均年龄 47.6(23 ~ 78)岁. 其中工人 5 例, 干部 2 例, 农民 3 例, 战士 1 例. 接触石棉者 1 例, 接触时间 9 a. ②临床表现: 有症状者 10 例, 其中胸痛 9 例, 气短 7 例, 咳嗽 7 例, 发热 6 例, 呼吸困难 4 例, 心慌 3 例, 咯血 1 例, 每例可出现上述症状的 1 项或几项; 无症状者 1 例, 体检示左下胸部阴影, 误诊肺癌行开胸手术. ③胸片检查: 有 9 例胸廓未见异常, 2 例胸廓轻度变窄. 10(左侧 7, 右侧 4)例有单侧中等量到大量胸腔积液. 多见胸膜增厚和胸膜结节, 胸膜增厚者胸膜厚薄不均, 最厚者达 17 mm, 和手术病例所见情形相符. 胸膜结节 8(单发结节 3, 多发性结节 5)例, 其中呈典型驼峰状改变者 6 例. ④CT 检查: 根据 CT 扫描所见分为弥漫结节型 8 例, 沿胸膜面有多个小结节影, 结节大小为 0.5 ~ 3.5 cm, 弥漫增厚型 2 例, 胸膜弥漫不规则增厚包绕肺组织. 肿块型 1 例. ⑤胸液检查: 有 4 例为持续性血性胸液, 3 例为持续性淡黄色浆液, 4 例先为淡黄色浆液后为血性胸液. 在 9 例胸液中, 共查到 4 例有瘤细胞. ⑥病理类型^[1]: 病理组织学 上皮型 6 例, 肉瘤型 3 例, 混合型 1 例, 未能分型 1 例, 病理解剖学 局限性 4 例, 弥漫性 7 例. ⑦结果: 4 例

局限型经手术切除, 5 例弥漫型单用顺铂、阿霉素化疗, 1 例院外行伽玛刀局部治疗, 1 例未治疗自动出院. 随访结果表明, 局限型恶性 3 例生存 8 ~ 14 mo, 弥漫型单纯化疗后 4 例生存 5 ~ 12 mo, 1 例未经治疗者生存 3 mo.

2 讨论 胸膜间皮瘤系胸膜原发性肿瘤, 早期诊断困难, 恶性程度高, 缺乏有效的治疗, 愈后差. 自 1960 年 Wegnet 报道胸膜间皮瘤发病与石棉粉尘有密切关系以来, 许多报道支持这种观点. 但本组患者绝大多数无石棉接触史, 发病可能与其他原因或因素有关. 有报道亚硝酸胺、玻璃纤维、放射线、沸石、铍、氢氰酸及其他肺部疾患也可导致胸膜间皮瘤发生. 本组 1 例就有长期亚硝酸胺接触史. 胸膜间皮瘤的典型症状为胸痛、气短或二者并存. 有石棉接触史对诊断有帮助. 但无职业史者不能排除本病. 胸腔镜对于胸膜间皮瘤的诊断及治疗有重要意义, 不仅可在较大的视野内取到病变组织活检, 而且对适宜的患者可直接施行胸膜剥脱术. 胸膜间皮瘤易误诊为结核性胸膜炎、包裹性胸腔积液、原发性周围型肺癌及胸膜转移性肿瘤. 结合临床、X 线、CT、胸膜活检、穿刺, 特别是胸腔镜检查鉴别诊断不难. 王洪云等^[2]采用免疫组化检测间皮细胞抗原、癌胚抗原等在瘤组织中的阳性定位表达, 是目前较好的鉴别诊断方法. 良性胸膜间皮瘤手术可获得较好效果; 恶性胸膜间皮瘤单一的手术、放疗或化疗治疗方案疗效均欠佳. 尤其是放疗、化疗. 现多作为手术治疗的辅助治疗或应用于 III, IV 期不能完整手术切除或全身情况无法耐受手术治疗者, 以改善局部症状、提高生活质量.

【参考文献】

[1] 贺伯伟, 梁景仁. 恶性胸膜间皮瘤诊治进展[J]. 现代肿瘤医学, 2005, 13(5) 710 - 711.

[2] 王洪云, 林均义, 李怀臣. 胸膜间皮瘤的间皮细胞抗原癌胚抗原表达特征及鉴别诊断价值[J]. 中华肿瘤杂志, 2000, 22(5): 410.

编辑 王 睿

收稿日期 2006-05-23; 接受日期 2006-05-29

作者简介: 王 刚, 硕士生(导师赵 渝), 住院医师. Tel: (028)

86308393 Email: wg316@tom.com