

# RNAi抑制结肠癌细胞系DcR3的表达及对癌细胞生长的影响

王鲁平, 杨善明, 徐学明, 陈健, 杨光之, 张鲁榕

王鲁平, 陈健, 杨光之, 中国人民解放军北京军区总医院病理科 北京市 100700  
杨善明, 徐学明, 张鲁榕, Department of Oncology, Lombardi Cancer Center, Georgetown University, 20007 Washington DC, USA  
国家自然科学基金资助项目, No. 30340064  
作者贡献分布: 课题由王鲁平, 杨善明及张鲁榕设计; 王鲁平与杨善明贡献均等; 王鲁平, 杨善明及徐学明完成实验操作; 陈健与杨光之完成资料及图片整理; 论文写作由王鲁平完成。  
通讯作者: 王鲁平, 100700, 北京市, 中国人民解放军北京军区总医院病理科. bzwlp@yahoo.com  
电话: 010-66721576 传真: 010-88551277  
收稿日期: 2007-11-29 修回日期: 2008-07-02  
接受日期: 2008-07-10 在线出版日期: 2008-07-18

## Depressed DcR3 expression induced by RNA interference and its effect on growth of colonic cancer cells

Lu-Ping Wang, Shan-Ming Yang, Xue-Ming Xu, Jian Chen, Guang-Zhi Yang, Lu-Rong Zhang

Lu-Ping Wang, Jian Chen, Guang-Zhi Yang, Department of Pathology, General Hospital of Chinese PLA Beijing Military Area, Beijing 100700, China  
Shan-Ming Yang, Xue-Ming Xu, Lu-Rong Zhang, Department of Oncology, Lombardi Cancer Center, Georgetown University, 20007 Washington DC, USA  
Supported by: National Nature Science Foundation, No. 30340064  
Correspondence to: Lu-Ping Wang, Department of Pathology, General Hospital of Chinese PLA Beijing Military Area, Beijing 100700, China. bzwlp@yahoo.com  
Received: 2007-11-29 Revised: 2008-07-02  
Accepted: 2008-07-10 Published online: 2008-07-18

### Abstract

**AIM:** To study relationship between depressed DcR3 gene expression and changes of malignant phenotype on SW480 colonic carcinoma cells line.

**METHODS:** Using RNAi method, we constructed a small interfering double-strand DcR3-RNA, then cloned it into vector "pSilencer 2.1 Hygro", and finally transfected the vector into SW480 colonic cancer cells expressing a high level of DcR3. The small double-strand RNA was recognized and the DcR3 mRNA was reduced. The DcR3 low-expression cancer cells were screened and their growth and apoptosis were measured.

**RESULTS:** In comparison with that in the con-

trol group, the expression of DcR3 mRNA was down-regulated remarkably in the cells transfected with DcR3-RNAi (F1R1). Group comparison results showed that the quantity of SW480 cells was markedly decreased in the DcR3-RNAi (F1R1)-transfected group than that in the DcR3 group or control group ( $P < 0.001$ ). The expression levels of Caspase3 and PARP product were increased in the DcR3-RNAi-transfected group as compared with those in the control group.

**CONCLUSION:** DcR3-RNAi down-regulates the expression of DcR3 mRNA in SW480 colonic carcinoma cells, which leads to inhibition of cell growth and enhancement of cell apoptosis.

**Key Words:** DcR3; RNA interference; SW480 colonic cells line

Wang LP, Yang SM, Xu XM, Chen J, Yang GZ, Zhang LR. Depressed DcR3 expression induced by RNA interference and its effect on growth of colonic cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2285-2288

### 摘要

**目的:** 观察抑制DcR3基因表达的人SW480结肠癌细胞其恶性表型的改变。

**方法:** 应用RNA干扰(RNAi)技术, 构建小双链DNA, 克隆入表达载体, 转染进入SW480结肠癌细胞系(DcR3高表达细胞), 在细胞内形成小干扰双链RNA; 识别并降解DcR3 mRNA. 筛选DcR3低表达转染癌细胞, 观测其体外DcR3-SW480-RNAi转染细胞的增殖率及凋亡表达。

**结果:** 与对照组相比, 转染DcR3-RNAi(F1R1)的SW480细胞, DcR3 mRNA的表达明显降低, 各组相比, 加入DcR3-RNAi(F1R1)组的SW480细胞数量明显减少, 而仅加入DcR3及对照组细胞数量明显增加。统计学处理差异显著( $P < 0.001$ )。与对照组相比, 经DcR3-RNAi处理组凋亡抗体Caspase3及PARP产物表达增加。

**结论:** 经转染的DcR3-RNAi-SW480结肠癌细胞其DcR3 mRNA表达降低。肿瘤细胞的生长数量减少, 凋亡增加, 有一定可探索性抗癌前景。

### 背景资料

DcR3基因位于染色体20q13.3, 成熟DcR3分子质量为35 kDa, cDNA编码为约1 kb核苷酸, 为分泌性、可溶性多肽。目前认为是一个具有拮抗凋亡, 促进细胞生长, 调节免疫功能的新基因, 对肿瘤的生长分化有较大影响。

**同行评议者**  
姜春萌, 教授, 大连医科大学附属第二医院消化科

## ■相关报道

本课题组前期研究发现通过阻断外源性及内源性FasL, DcR3可保护乳腺癌细胞生长;伴有淋巴结转移的癌DcR3表达明显增高。

## 关键词: DcR3; RNA干扰技术; SW480结肠癌细胞系

王鲁平, 杨善明, 徐学明, 陈健, 杨光之, 张鲁榕. RNAi抑制结肠癌细胞系DcR3的表达及对癌细胞生长的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(20): 2285-2288

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2285.asp>

## 0 引言

DcR3(又称TR6)属肿瘤坏死因子受体家族,被认为是阻断细胞凋亡,保护肿瘤细胞生长的新基因<sup>[1-3]</sup>.一些恶性肿瘤中DcR3 mRNA表达明显升高<sup>[4-8]</sup>.我们的前期研究发现通过阻断外源性及内源性FasL, DcR3可保护乳腺癌细胞生长;伴有淋巴结转移的癌DcR3表达明显增高<sup>[4]</sup>.在上述研究的基础上,我们应用RNA干扰(RNAi)技术,阻断DcR3基因表达,探讨阻断DcR3基因表达的人SW480结肠癌细胞是否降低其恶性表型,是否有治疗肿瘤的前景。

## 1 材料和方法

1.1 材料 pSilencer 2.1-U6nHygro-DcR3-dsDNA质粒(含沉默DcR3基因片段)由王鲁平医师在美国Gerogetown1大学Lombardi癌症研究中心构建,并经测序与GenBank中的序列一致. Silencer siRNA Cocktail试剂盒购自美国Ambion公司;胎牛血清、DMEM细胞培养液和G418购自Gibco公司; TRIzol试剂购自Life Technologies公司; RT-PCR试剂盒购自Promega公司;鼠抗DcR3一抗由Sunghee Kim和张鲁榕教授惠赠; Caspase 3和PARP一抗购自Dako公司; BCA蛋白检测试剂盒购自Pierce, Rockford IL公司; Western印记化学发光物购自Amersham公司. 结肠癌细胞系SW480来自美国Gerogetown大学Lombardi癌症研究中心细胞库;培养基为含有100 mL/L胎牛血清的DMEM细胞培养液. 转染后的SW480细胞培养条件为在上述培养基中加入G418(800 mg/L).

### 1.2 方法

1.2.1 DcR3-RNA基因克隆,质粒构建及SW480细胞转染、鉴定、筛选:使用“Silencer siRNA Cocktail试剂盒”选择2个siRNA靶位点,靶位点1(F1R1)核苷酸95-123,靶位点2(F2R2)核苷酸247-265.使用online BLAST软件与GenBank中其他基因进行比较,排除所选择靶序列与其他基因有显著性同源. F1R1 ACACCCACCTACCCTGGC(95-123), F2R2 CTACCTGGAGCGCTGCCGC(247-265).每一个包括正义和反义靶序列,中间以9个核苷酸的环状区,末端有一RNA

多聚酶III的中止信号序列.其正向、反向两链被合成,以形成一个双链DNA,其末端有BamH I和HindIII位点.经基因测序证实片段序列无误.将双链DNA分别克隆进入载体,具体步骤: F1R1和F2R2双链DNA, pSilencer 2.1-U6nHygro各2-3 g/L,加入50 μL competent细胞(大肠杆菌),4℃ 30 min,42℃ 15 s,放置冰上1-2 min,加入9倍体积SOC,37℃震荡1 h,铺于Agarose+LB培养板上,震荡37℃过夜.次日挑选1个克隆加入100 mL LB及卡那霉素30 mg/L,震荡37℃过夜.将上清弃之,应用试剂盒纯化沉淀物中DNA,琼脂糖凝胶电泳检测纯化物.限制性内切酶切上述质粒,(BamH I+HindIII),纯化酶切产物.连接酶连接载体及DcR3-DNA片段.碱裂解法大量提取纯化该质粒DNA. A测量DNA浓度. pSilencer 2.1-U6nHygro-DcR3-dsDNA稳定转染进入SW480结肠癌细胞系.转染前16-20 h用胰酶消化对数生长期细胞,将细胞移置100 mm培养皿中,细胞数 $1 \times 10^6$ 在100 mL/L的胎牛血清DMEM中.转染前4 h,再次换培养液.配置转染液:依次加入H<sub>2</sub>O, DNA, CaCl<sub>2</sub>,及2×BBS,缓慢小心混合,静置45 min,缓慢加入细胞内,30 mL/L CO<sub>2</sub>孵育箱中培养.第3天加入G418(800 mg/L FBS-DMEM),培养筛选.挑选可在G418环境下生长的转染SW480细胞集落,行RT-PCR分析:应用TRIzol试剂提取转染后SW480细胞的RNA,琼脂糖凝胶电泳检测RNA产物.应用RT-PCR试剂盒反转录、扩增检测其cDNA含量.从人DcR3基因序列中选择合成两段引物: F1正义: 5-CCTGGCGGGACGAGACA-3, R1反义: 5-TGGCACTGCGAGTTCTGGCT-3; F2正义: 5-TGCCAGGCTCTTCCTCCCAT-3, R2反义: 5-TCACGGACGCTCCGCTCCAG-3;经RT-PCR后,不同组DNA经琼脂糖电泳检测,紫外光下显示并摄影.

1.2.2 DcR3-SW480-RNAi转染细胞:检测DcR3-SW480-RNAi转染细胞对体外肿瘤细胞生长的作用.  $1.5-2 \times 10^4$ /孔SW480细胞系培养于96孔板,分为不同组分加入不同物质48 h后,加入<sup>3</sup>H TdR(0, 3 μCi/well)过夜. EDTA消化液收获细胞.应用β-counter计算<sup>3</sup>H TdR掺入结合率.统计学处理比较各组细胞的掺入结合率.

1.2.3 Western印记检测凋亡活性:应用细胞裂解液对6孔板培养DcR3-SW480-RNAi培养细胞及对照组细胞进行收获. BCA蛋白检测试剂盒检测其蛋白浓度.每孔加30 μg蛋白入SDS聚丙烯酰

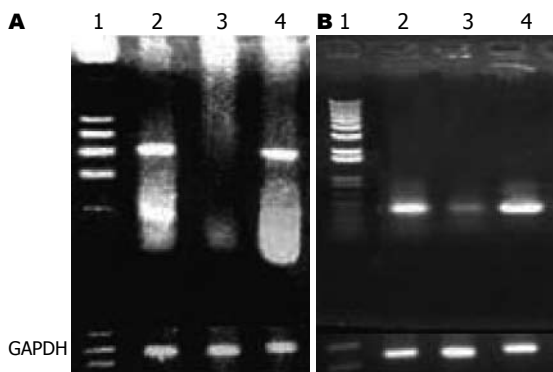


图 1 应用RT-PCR观察DcR3-siRNA-SW480对DcR3 mRNA的表达. A: 转染后48 h; B: 转染后72 h. 1: marker; 2, 4: 空白质粒对照组; 3: DcR3-RNAi处理组.

胺凝胶, 电泳之后, 4℃、50 V下湿式电转移仪将蛋白质转入PVDF膜. 50 g/L脱脂奶粉封闭PVDF膜2 h, 一抗包括鼠抗人活性Caspase3, PARP (1:5000)孵育PVDF膜4℃过夜, PBS-T充分洗涤, HRP-抗鼠二抗(1:10 000)1 h, PBS-T充分洗涤后化学发光底物孵育1 min, 暗室中将膜贴于增色胶片曝光、显影、洗相. 直至出现条带.

**统计学处理** 应用SPSS12.0统计学软件进行资料处理, 定量结果以mean±SD表示, 应用t检验分析,  $P<0.05$ 具有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 转染后的DcR3-RNAi-SW480细胞中DcR3 mRNA的表达** 应用RT-PCR观察DcR3-siRNA-SW480对DcR3 mRNA的表达(图1). 与对照组相比, 转染DcR3-RNAi(F1R1)的WS480细胞, DcR3 mRNA的表达明显降低.

**2.2 DcR3-RNAi-SW480细胞对体外肿瘤细胞生长的影响** <sup>3</sup>H掺入法检测经不同处理各组SW480细胞数量的变化(图2), 各组相比, 加入DcR3 RNAiF1R1组其SW480细胞数量明显减少, 而仅加入DcR3及对对照组细胞数量明显增加. 统计学处理差异显著( $P<0.001$ ).

**2.3 Western印记检测** 应用活性Caspase3及PARP的免疫印记法, 与对照组相比, 经DcR3-RNAi处理组的活性Caspase3表达凋亡条带增强(图3A), 同样与对照组相比, 经DcR3-RNAi处理组PARP产物表达明显增强(图3B).

## 3 讨论

DcR3基因位于染色体20q13.3, 成熟DcR3分子质量为35 kDa, cDNA编码为约1 kb核苷酸, 为分泌性、可溶性多肽<sup>[6]</sup>. 目前认为是一个具有拮抗凋亡, 促进细胞生长, 调节免疫功能的新基因, 对

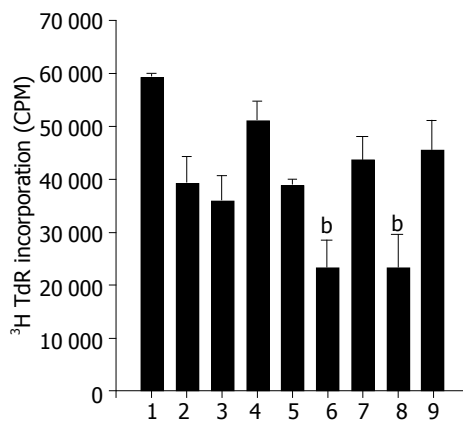


图 2 DcR3-RNAi对SW480细胞生长的影响. 1: 空白质粒组; 2-3: 空白质粒组+转染液; 4: DcR3组; 5: DcR3组+DcR3-RNAiF2R2; 6, 8: DcR3-RNAiF1R1; 7, 9: 空白质粒+DcR3(煮沸). <sup>b</sup> $P<0.001$  vs 其他组.

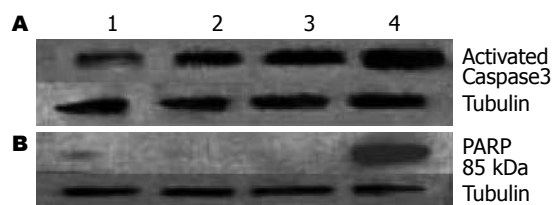


图 3 Western印记法检测Caspase3、PARP. A: Caspase3检测; B: PARP检测; 1-2: 单纯SW480细胞; 3: DcR3SW480细胞; 4: DcR3-RNAi-SW480SW480细胞.

肿瘤的生长分化有较大影响. 研究表明DcR3发挥其重要生物学功能, 是因其可结合3个重要的凋亡配基: FasL, LIGHT, TLIA, 与其竞争死亡受体, 阻断其诱导凋亡的作用<sup>[1-2]</sup>. 研究发现, 正常人体组织中胃、脊髓、淋巴结、气管、脾、结肠和肺有低水平DcR3 mRNA表达<sup>[3-4]</sup>. 胃肠道癌、结肠癌<sup>[3]</sup>、肺癌<sup>[5]</sup>、肝癌<sup>[6]</sup>. EBV/HTLV-1阳性的淋巴瘤均伴有DcR3基因扩增或蛋白水平高表达<sup>[7]</sup>. 对146例肿瘤, 19例急性感染和29例正常健康人的血清DcR3检测结果显示, 56%、2%的肿瘤患者血清DcR3阳性, 其中98%、8%为恶性肿瘤患者, 当肿瘤被切除后, 血清DcR3浓度下降. 97%的急性感染和正常健康人(47/48)血清DcR3阴性. 22/31(71%)例胃癌患者血清DcR3阳性, 其阳性率与胃癌TNM分期有关. 提示血清DcR3的检测将成为恶性病变的有意义的诊断、治疗、预后参数<sup>[6-8]</sup>. 我们的研究结果提示DcR3在乳腺癌中的表达率为62%, 而乳腺良性病变无表达, 伴有淋巴结转移的乳腺癌DcR3表达率明显升高达80%<sup>[14]</sup>. 上述结果提示DcR3对肿瘤发生、发展起着上调作用, 恶性肿瘤显示DcR3 mRNA及蛋白水平过表达.

**应用要点**  
本研究应用RNAi技术, 抑制SW480结肠癌细胞中mRNA的表达, 其结果发现DcR3 mRNA表达下降后, 人结肠癌SW480细胞数量减少, 凋亡表达增加. DcR3-RNAi技术可能有一定抗癌前景.

### ■同行评价

本研究内容较先进, 实验设计合理, 研究方法适当, 具有重要的参考价值。

基于上述发现, 本研究应用RNA干扰(RNAi)技术, 阻断DcR3基因表达, 观察阻断DcR3基因表达的人SW480结肠癌细胞恶性表型的影响。双链RNA介导的基因阻断机制是1998年发现的<sup>[9]</sup>。他通过双链RNA的介导特异性地降解相应序列的mRNA, 从而导致转录后水平的基因沉默。抑制基因表达的效率至少比传统反义技术高2个数量级。RNA降解过程涉及两个步骤: 双链RNA被名为Dicer的RNaseIII样蛋白加工成21-25 nt长度的小干扰RNA(siRNA); 反义链RNA引导核酸内切酶复合体(RISC)去除单链的同源mRNA。RISC在小干扰RNA的引导下, 切断序列特异的mRNA, mRNA进一步降解<sup>[10-11]</sup>。已有证据表明siRNA介导的RNAi能特异性抵御病毒的入侵, 拮抗植物肿瘤发生。同时也为抗癌治疗提供了新的基因研究策略。

我们应用双链RNAi技术特异性降解DcR3 mRNA, 从而阻断DcR3基因的表达。首先在DcR3基因序列中选择小干扰RNA(siRNA)靶位点, 每一个包括正义和反义靶序列片段, 中间间以9个核苷酸的环状区, 末端有一RNA多聚酶III的中止信号序列, 合成一个有环状结构的双链DNA, 其末端有BamH I和HindIII位点。克隆入载体pSilencer 2.1-U6 Hygro; 转染进入SW480人结肠癌细胞(DcR3高表达细胞)<sup>[12]</sup>, 在细胞内形成小干扰双链RNA; 识别并降解DcR3 mRNA; 筛选DcR3 mRNA及蛋白低表达转染癌细胞, 并以空质粒转染SW480细胞作为对照, 观测其体外细胞增殖率, 各组增殖细胞的蛋白表达率, 探讨抑制DcR3基因表达的的人SW480结肠癌细胞是否可降低其生长速度及恶性表型。结果表明, 转染的DcR3-RNAi-SW480-F1R1细胞DcR3 mRNA表达明显降低。与对照组相比, 转染的DcR3-RNAi-F1R1 SW480肿瘤细胞数量明显减少。肿瘤细胞中DcR3蛋白含量明显减少。经统计学处理差异显著( $P < 0.05$ )。经DcR3-RNAi(DcR3-siRNA)处理的细胞, PARP及Caspase3的表达增强。PARP是细胞程序死亡的一个早期分子标志, Caspase被认为是凋亡的中心实施者, 细胞经多因子多途径的相互作用, Caspase活化降解其作用底物, 引起其特征性形态学生物化学改变, 完成细胞的凋亡过程。PARP作为基因组监测和DNA修复酶, 是第一个在凋亡中由Caspase3和其他系列Caspase降解的底物, 被称为细胞凋亡的死亡底物<sup>[13]</sup>。应用DcR3-RNAi技术, 阻断了DcR3的基因表达, 使其不能与3个重要的凋亡配基

Fas-l, LIGHT, TLIA结合, 由此介导肿瘤细胞产生凋亡, 肿瘤细胞的生长数量减少, 有一定可探索性抗癌基因治疗前景, 尚有待于动物体内实验的证实。

### 4 参考文献

- 1 Connolly K, Cho YH, Duan R, Fikes J, Gregorio T, LaFleur DW, Okoye Z, Salcedo TW, Santiago G, Ullrich S, Wei P, Windle K, Wong E, Yao XT, Zhang YQ, Zheng G, Moore PA. In vivo inhibition of Fas ligand-mediated killing by TR6, a Fas ligand decoy receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 25-33
- 2 Timmer T, de Vries EG, de Jong S. Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application? *J Pathol* 2002; 196: 125-134
- 3 Yu KY, Kwon B, Ni J, Zhai Y, Ebner R, Kwon BS. A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 1999; 274: 13733-13736
- 4 Bai C, Connolly B, Metzker ML, Hilliard CA, Liu X, Sandig V, Soderman A, Galloway SM, Liu Q, Austin CP, Caskey CT. Overexpression of M68/DcR3 in human gastrointestinal tract tumors independent of gene amplification and its location in a four-gene cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 1230-1235
- 5 Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, Dowd P, Huang A, Donahue CJ, Sherwood SW, Baldwin DT, Godowski PJ, Wood WI, Gurney AL, Hillan KJ, Cohen RL, Goddard AD, Botstein D, Ashkenazi A. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 1998; 396: 699-703
- 6 Wu Y, Han B, Sheng H, Lin M, Moore PA, Zhang J, Wu J. Clinical significance of detecting elevated serum DcR3/TR6/M68 in malignant tumor patients. *Int J Cancer* 2003; 105: 724-732
- 7 Ohshima K, Haraoka S, Sugihara M, Suzumiya J, Kawasaki C, Kanda M, Kikuchi M. Amplification and expression of a decoy receptor for fas ligand (DcR3) in virus (EBV or HTLV-I) associated lymphomas. *Cancer Lett* 2000; 160: 89-97
- 8 Wu YL, Yu JX, Shen HW, Han B, Gao SL. [Clinical significance and correlation between elevated serum TR6 and lympho-metastasis in gastric cancer] *Zhonghua Waikex Zazhi* 2003; 41: 928-931
- 9 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811
- 10 Plasterk RH. RNA silencing: the genome's immune system. *Science* 2002; 296: 1263-1265
- 11 Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002; 418: 244-251
- 12 Zhang J, Salcedo TW, Wan X, Ullrich S, Hu B, Gregorio T, Feng P, Qi S, Chen H, Cho YH, Li Y, Moore PA, Wu J. Modulation of T-cell responses to alloantigens by TR6/DcR3. *J Clin Invest* 2001; 107: 1459-1468
- 13 Goyeneche AA, Harmon JM, Telleria CM. Cell death induced by serum deprivation in luteal cells involves the intrinsic pathway of apoptosis. *Reproduction* 2006; 131: 103-111
- 14 王鲁平, 陈键, 宁浩勇, 刘光, 丁华野, 虞积耀, Charles B, Underhill, 张鲁榕. TR6在人乳腺癌中的功能、表达和意义. *诊断病理学杂志* 2005; 12: 133-136