

靶向 EGFR 的 siRNA 有效抑制小鼠肺癌移植瘤的生长

汪本助^{1,2}, 李艳¹, 张海燕^{1,2}, 王喆¹, 张必良^{1,2,3}

(1. 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广东广州 510663; 2. 中国科学技术大学生命科学学院, 安徽合肥 230027;
3. 呼吸疾病国家重点实验室, 广东广州 510663)

摘要:采用 RNA 干扰技术来研究靶向 EGFR 的 siRNA 对肺癌皮下移植瘤生长的影响. 化学合成了 3 条针对 EGFR 的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA), 转染不同的 EGFR siRNA 后, A549 细胞(高表达 EGFR)EGFR 的 mRNA 和蛋白表达均有显著降低, 其中 EGFR siRNA_1 的沉默效果最为明显. 转染 EGFR siRNA_1 后 A549 细胞的凋亡率明显增加, 增殖活性明显降低. 最后, 利用稳定表达荧光素酶报告基因的人肺腺癌细胞株(A549-luc)建立裸鼠皮下移植瘤模型, 采用活体动物体内光学成像系统实时检测以及通过检测肿瘤体积来检测对照组和 EGFR siRNA_1 给药组移植瘤的生长情况, 结果发现 EGFR siRNA_1 治疗组肿瘤的生长速度较空白对照组和 Notarget siRNA 对照组明显变慢, 说明干扰 EGFR 基因表达对肺癌皮下移植瘤的生长具有明显的抑制作用.

关键词:RNA 干扰; siRNA; A549 细胞; 表皮生长因子受体; 活体动物体内光学成像系统; 基因治疗
中图分类号:R73-3 **文献标识码:**A

Inhibition of lung tumor growth in nude mice by siRNA targeting on EGFR

WANG Ben-zhu^{1,2}, LI Yan¹, ZHANG Hai-yan^{1,2}, WANG Zhe¹, ZHANG Bi-liang^{1,2,3}

(1. *Guangzhou Institute of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510663, China;*
2. *School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China;*
3. *State Key Laboratory for Respiratory Diseases, Guangzhou 510663, China*)

Abstract: The inhibitory effect of lung tumor growth in nude mice by siRNA targeting on EGFR (epidermal growth factor receptor) was investigated. Three different chemically synthesized small interfering RNAs (siRNAs) targeting on EGFR were utilized to block EGFR gene expression in a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line A549, which overexpresses the EGFR protein. The results demonstrated that EGFR siRNAs potently suppress the expression of EGFR in A549 cells and the most efficacious siRNA is EGFR siRNA_1. Decreasing EGFR expression can notably increase the apoptosis and inhibit the proliferation of A549 cells. In the end, subcutaneous tumor models were established with luciferase expressing lung cancer cell line (A549-luc), and the tumor growth and bioluminescence were non-invasively monitored by an in vivo imaging system in real time. A quantitative analysis of the

收稿日期:2008-07-11;修回日期:2008-11-02

基金项目:中国高技术研究发展(863)计划(2006AA02Z191),广州市科技攻关重大项目(2007Z1-E4041)和广州经济开发区科技项目(2007G-P029)资助.

作者简介:汪本助,男,1983年生,硕士.研究方向:RNA干扰. E-mail: wang_benzhu@gibh.ac.cn

通讯作者:张必良,博士/研究员. E-mail: zhang_biliang@gibh.ac.cn

tumor luciferase gene spatial expression and tumor volume of different treatment groups showed that the growth velocity of EGFR siRNA₁ treatment group is lower than that of the Notarget siRNA treatment group, indicating that siRNA targeting EGFR can inhibit the lung subcutaneous tumor growth in nude mice.

Key words: RNAi; siRNA; A549 cell line; EGFR; optical in vivo imaging; gene therapy

0 引言

EGFR(epidermal growth factor receptor)是当今肺癌治疗最有效的靶标,是具有酪氨酸激酶(TK)活性的膜受体,可被表皮样生长因子(如 EGF, TGF- α 等)磷酸化激活^[1]. 经 Ras-Raf-MAPK 或 PI3K-PPK1-AKT 等多条下游信号通路传递信号至核内,作用靶基因,在癌症发生中具有重要作用.

RNA 干扰(RNA interference, RNAi),又叫基因沉默,是指在进化过程中高度保守的、由双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)诱发的、同源 mRNA 高效特异性降解的现象^[2~6]. RNAi 技术具有特异、高效、快捷、毒性小等特点,可高效、特异地抑制疾病相关基因的过度表达,从而达到治疗疾病的目的. 目前, RNAi 技术已被广泛应用于各种疾病的研究中,为疾病的基因治疗带来新的希望.

活体动物体内光学成像系统是近几年发展起来的新技术. 活体动物体内光学成像(optical in vivo imaging)主要采用生物发光(bioluminescence)与荧光(fluorescence)两种技术. 生物发光是用荧光素酶(luciferase)基因标记细胞或 DNA,而荧光技术则是采用荧光报告基因(GFP, RFP, Cyt 及 dyes 等)进行标记^[7]. 以荧光素酶标记细胞^[8~10],利用皮下、静脉或原位接种后,可实时观察这些细胞在体内的生长、转移以及对药物的反应等. 利用该系统准确的定量性能^[10]和成像特性,根据发光强度和位置判断肿瘤的进程,可以直接快速地测量肿瘤的生长和转移、疾病的发生发展、基因的表达及反应等生物学过程. 在短短的几年内,该系统已广泛应用于生命科学、医学研究及药物研发等领域.

本实验依据 RNA 干扰原理,以人肺腺癌 A549 细胞株为研究对象,首先在体外细胞水平上寻找 EGFR 作为基因治疗靶点时,最佳的 siRNA 靶向序列;然后,通过活体动物体内光学成像系统,检测 siRNA 特异诱导 EGFR 基因沉默后对肺癌异体移植瘤生长的抑制作用,从而探讨 RNA 干扰 EGFR 作为基因治疗手段的可行性.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株与实验动物

人肺腺癌 A549 细胞株由广州生物医药与健康研究院惠赠,常规培养于含 10%胎牛血清的 1640 (美国 HyClone 公司)培养液中. 稳定表达荧光素酶报告基因的人肺腺癌细胞 A549-luc 由本实验室前期筛选,常规培养于含 10%胎牛血清、600 mg/L G418 的 1640 培养液中. 细胞均置于 5%CO₂、37 °C 饱和湿度的孵箱中培养传代,待细胞贴壁生长良好,按 1:3 进行传代,取对数生长期细胞用于实验.

BALB/c 裸鼠,4~5 周龄,体重 20 g 左右,雌性,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,饲养于高度洁净的 SPF 环境下. 实验动物合格证号:0042029.

1.1.2 试剂

Lipofectamine™ 2000 及 Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; M-MLV 逆转录试剂盒为美国 Promega 公司产品; SYBR Premix Ex Taq™ (perfect real time) 试剂盒购自 TaKaRa 公司; AnnexinV-FITC/PI 试剂盒购自晶美公司;兔抗 EGFR 多克隆抗体本实验室自制;兔抗人 β -Actin 多克隆抗体购自 Sigma 公司;碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG 购自 Santa cruz 公司;in vivo jetPEI 购自 Polyplus 公司;G418 购自 Sigma 公司;荧光素酶底物购自北京龙脉得生物技术有限公司.

1.2 方法

1.2.1 siRNA 设计合成

首先在美国国立生物技术信息中心 NCBI 数据库中获取人 EGFR mRNA 的序列全长(序列号: AY588246),使用本实验室自主开发的 siRNA 设计软件,设计 3 条 EGFR siRNA 和一条阴性对照 siRNA (Notarget siRNA). EGFR siRNA₁ 靶序列:

GGCTGGTTATGTCCTCATT (255-273),
正义链(sense strand)序列为

5'-GGCUGGUUAUGUCCUCAUU dTdT-3',
反义链(antisense strand)序列为

5'-AAGAGGACAAACCAGCC dTdT-3'.
EGFR siRNA_2 靶序列:

CAAGCAACATGGTCAGTTT(1290-1308),
正义链序列为

5'-CAAGCAACAUGGUCAGUUU dTdT-3',
反义链序列

5'-AAACUGACCAUGUUGCUUG dTdT-3'.
EGFR siRNA_3 靶序列:

GCTGGATGATAGACGCAGA (2849-2867),
正义链序列为

5'-GCUGGAUGAUAGACGCAGA dTdT-3',
反义链序列为

5'-UCUGCGUCAUCAUCCAGC dTdT-3'.

此外,设计了非靶向性的 Notarget siRNA 作为对照,正义链序列为

5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU dTdT-3',
反义链序列为

5'-ACGUGACACGUUCGGAGAA dTdT-3'.

额外设计了 dTdT 悬挂末端,以增加 siRNA 的稳定性.设计的 siRNA 由广州市锐博生物科技有限公司合成.

1.2.2 细胞转染

取对数生长期的 A549 细胞,转染前 24 h 将细胞接种于 6 孔培养板,接种密度为 1×10^5 /孔,使得次日转染时细胞融合度达 30% ~ 50%. 根据 Lipofectamine™ 2000 试剂操作指南进行转染. 50 nmol/L 浓度的 siRNA 转染方案为:在 250 μ L OPTI-MEM 中加入 5 μ L 20 μ mol/L 的 siRNA,室温孵育 5 min. 在 250 μ L OPTI-MEM 中加入 5 μ L Lipofectamine™ 2000,室温孵育 5 min. 将上述两种稀释液混匀,室温孵育 20 min 后加入细胞板孔中,细胞置于培养箱常规培养.

1.2.3 总 RNA 的抽提和 cDNA 的生成

收集转染后 24 h 的细胞,6 孔板每孔加入 1 mL Trizol,加入氯仿和异丙醇按常规方法抽提细胞总 RNA,所提 RNA 溶于 40 μ L 无 RNA 酶水中,Beckmen 紫外分光光度计检测各处理组 RNA 的含量和纯度,并进行凝胶电泳,观察 RNA 完整性.以 oligo(dT)₁₈ 为引物,1 μ g RNA 为模板,按 Promega 逆转录试剂盒操作生成 cDNA.

1.2.4 Real time PCR 检测 3 条 siRNA 对 EGFR mRNA 表达的干扰效果

各取逆转录的 cDNA 产物 1.6 μ L 做模板,利用 SYBR Green 染料实时定量 PCR 试剂盒检测不同转染组细胞中的 EGFR mRNA 表达,并以无 RNA 酶水作为阴性模板对照,以 β -Actin 作为内参.PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s;94 $^{\circ}$ C 变性 5 s;EGFR 基因 55.6 $^{\circ}$ C 退火 30 s, β -Actin 基因 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,45 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 1 s.引物序列根据 GenBank 公布的 cDNA 序列设计,EGFR 的引物序列为 5'-AGGACCAAGCAACATGGTCA -3' (上游引物)和 5'-CCTTGCAGCTGTTTTTCACCT -3' (下游引物),PCR 产物长 217 bp. β -Actin 的引物序列为 5'-CGTACCACTGGCATCGTGAT-3' (上游引物),5'-GTGTTGGCGTACAGGTCTTTG-3' (下游引物),PCR 产物长 452 bp.用 $2^{-\Delta\text{CT}}$ 法计算和分析 EGFR 基因的相对表达量.确定 EGFR 基因的 mRNA 被 siRNA 沉默的程度.

1.2.5 Western blot 检测 3 条 siRNA 对 EGFR 蛋白表达的抑制效果

收集转染后 48 h 的 6 孔板细胞,PBS 洗两遍,每份加 160 μ L TNE 裂解液,提取细胞总蛋白,再加入 40 μ L 5 \times SDS loading buffer. 各组分别取总蛋白 25 μ g,经 8%SDS-PAGE 电泳后转膜.加 5%的脱脂牛奶封闭液封闭过夜.与特异性一抗(兔抗人 EGFR 多克隆抗体,兔抗人 β -Actin 多克隆抗体)室温孵育 2 h,TBST 洗膜,每次 10 min,洗 3 次.与二抗(碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG)室温孵育 1 h 后,按 1:2 的比例加入底物 BCIP 和 NBT 进行显色,扫描图片.

1.2.6 Real time RT-PCR 检测浓度梯度的 EGFR siRNA_1 干扰效果

收集对数生长期细胞接种于 6 孔板,每孔 1×10^5 个细胞,设立空白对照组(只加培养基)、Notarget siRNA 转染组和 EGFR siRNA_1 转染组,EGFR siRNA_1 转染浓度分别为 50 nmol/L,20 nmol/L,10 nmol/L,1 nmol/L.转染 24 h 后提取各处理组细胞的总 RNA,进行 Real time RT-PCR 检测.

1.2.7 流式细胞仪检测 EGFR siRNA_1 对细胞凋亡的影响

收集对数生长期细胞接种于 6 孔板,每孔 1×10^5 个细胞,设立空白对照组(只加培养基)、

Notarget siRNA 转染组和 EGFR siRNA₁ 转染组,转染浓度为 50 nmol/L,每孔培养基 2 mL,转染 48 h 后收集细胞,按照凋亡检测试剂盒说明书操作,采用 AnnexinV-FITC/PI 双染法标记细胞,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.8 MTT 比色法检测 EGFR siRNA₁ 对细胞增殖的影响

细胞以每孔 4×10^3 细胞接种于 96 孔板中,每孔总体积 100 μ L,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后转染 siRNA,设立空白对照组、Notarget siRNA 转染组和 EGFR siRNA₁ 转染组,转染浓度为 50 nmol/L,每组设 3 个复孔,培养 48 h 后每孔加入 20 μ L MTT 溶液(5 g/L),继续培养 4 h 后,每孔加入 150 μ L DMSO 溶液,振荡溶解后,用酶标仪测定 570 nm 处吸光度(A)值,计算细胞增殖抑制率。抑制率(%)=(1-实验孔 A 值/对照孔 A 值) \times 100%。

1.2.9 肺癌裸鼠皮下移植瘤模型的建立

待 A549-luc 细胞长至对数生长期(60%~80%),用 0.25%胰酶消化收集细胞,以 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,PBS 稀释细胞,血球计数仪计数细胞,用 PBS 调整细胞浓度至 1.5×10^7 /mL。取上述备好的 A549-luc 单细胞悬液 0.2 mL,用微量注射器注射至裸鼠右背侧近腋部皮下。动物接种数 12 只。

1.2.10 动物分组及处理

A549-luc 细胞接种 5 天后,每只裸鼠腹腔注射 150 μ L 30 g/L 荧光素酶底物,底物注射 10~25 min 后采用美国精诺真活体成像系统(IVIS 200),进行活体成像,并定量检测肿瘤接种部位的荧光值大小,根据荧光值大小将动物均匀分为 3 组,每组 3 只。溶剂对照组:瘤体内多点注射 70 μ L 5%葡萄糖溶液,Notarget siRNA 对照组:瘤体内多点注射 jetPEI/Notarget siRNA 复合物(15 μ g Notarget siRNA,2.4 μ L jetPEI),EGFR siRNA 治疗组:瘤体内多点注射 jetPEI/EGFR siRNA 复合物(15 μ g EGFR siRNA,2.4 μ L jetPEI),均每两天给药一次。

1.2.11 移植瘤生长检测

每 4 天采用活体成像系统进行活体成像,并定量分析比较各时间点各组的荧光值;待肿瘤出现表面坏死时,停止活体成像。以肿瘤接种天数为横坐标,肿瘤接种部位单位面积荧光值为纵坐标,绘制各组肿瘤皮下生长曲线。

1.2.12 移植瘤体积测定

给药处理 10 天后,待肿瘤体积达到一定大小,用游标卡尺经皮测量肿瘤的最长径(A)、最短径(B),按公式 $V=1/2AB^2$ (V 为肿瘤近似体积,A 为瘤体的最长径,B 为瘤体的最短径)计算肿瘤体积。每 4 天测量一次,至实验结束,共测量 3 次。以 V_0 、 V_N 分别表示第一次与最后一次测量的肿瘤体积, $DV(DV=V_N-V_0)$ 表示体积差,比较不同处理组肿瘤体积增加的快慢。

1.2.13 统计学处理

数据用 means \pm SD 表示,经 SPSS14.0 统计软件分析,多组间差异显著性检验用单因素方差分析。

2 结果

2.1 EGFR mRNA 表达的变化

结合文献中 siRNA 用量,采用 50 nmol/L 的浓度检测 3 条 siRNA 对 EGFR mRNA 的干扰效果。Real time PCR 结果表明,5 个不同处理组中,细胞内源 β -Actin 基因片段的扩增曲线基本一致,说明 PCR 中加入的模板量基本一致。而目的基因 EGFR 的扩增曲线存在差异。利用 $2^{-\Delta CT}$ 法计算和分析 EGFR 基因的相对表达量及 3 条 EGFR siRNA 的抑制效果,结果如图 1 所示。与 Notarget siRNA 转染组比较,EGFR 的 3 条 siRNA 均有效,对 EGFR mRNA 表达的抑制率分别为 85%($P < 0.005$),84.5%($P < 0.005$),80%($P < 0.005$),Notarget siRNA 转染组与空白对照组无明显差异($P > 0.05$)。该实验独立重复 3 次。

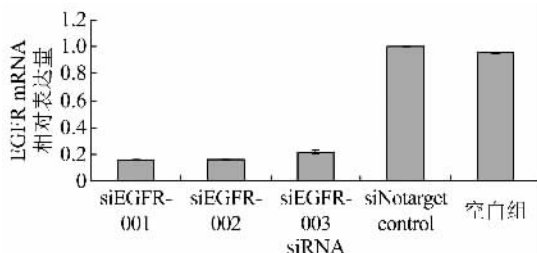


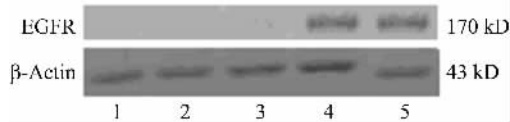
图 1 Real time RT-PCR 检测不同转染组 EGFR mRNA 的表达量

Fig. 1 Real time RT-PCR analysis of EGFR mRNA expression in A549 cells transfected with siRNA

2.2 EGFR 蛋白表达的变化

结合文献中 siRNA 用量,采用 50 nmol/L 的浓度检测 3 条 siRNA 对 EGFR 蛋白表达的影响。Western blot 分析 siRNA 转染后靶基因 EGFR 与

内参基因 β -Actin 的蛋白质表达情况(图 2). 结果表明,不同处理组中的 β -Actin 条带亮度几乎无差异,说明总蛋白量基本一致;Notarget siRNA 转染组和空白对照组的 EGFR 蛋白表达有明显条带,而转染了 EGFR siRNA_1、EGFR siRNA_2、EGFR siRNA_3 的细胞几乎检测不到 EGFR 蛋白的表达. 实验结果进一步证实了 EGFR siRNA 在蛋白水平对靶基因表达的抑制及作用的特异性,与 Real time RT-PCR 检测结果相一致. 该实验独立重复 3 次.



1: EGFR siRNA_1; 2: EGFR siRNA_2;
3: EGFR siRNA_3; 4: Notarget siRNA; 5: control

图 2 Western blot 检测不同转染组 EGFR 蛋白的表达量

Fig. 2 Western blot analysis of EGFR protein expression in A549 cells transfected with siRNA

2.3 浓度梯度的 EGFR siRNA_1 转染后干扰效果检测

为了筛选出 EGFR siRNA_1 的合适浓度为后续实验服务,做了 4 个浓度梯度,即 50 nmol/L, 20 nmol/L, 10 nmol/L 和 1 nmol/L. Real time RT-PCR 结果如图 3 所示,与转染浓度为 50 nmol/L 的 Notarget siRNA 比较,EGFR siRNA_1 转染浓度为 1 nmol/L 时,对 EGFR mRNA 表达的抑制率仍能达到 53.4%. 该实验独立重复 3 次.

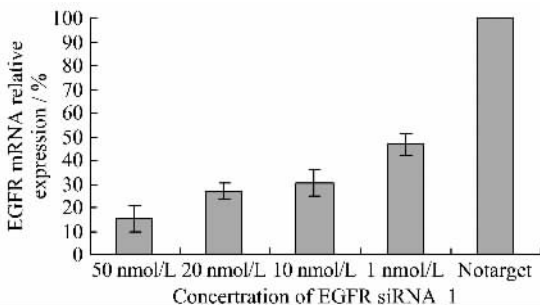


图 3 Real time RT-PCR 检测浓度梯度 EGFR siRNA_1 转染后 EGFR mRNA 表达量

Fig. 3 Detection of EGFR mRNA expression quantity in A549 cells transfected with various concentrations of EGFR siRNA_1 with Real time RT-PCR

2.4 EGFR siRNA_1 对肿瘤细胞凋亡的影响

用以上筛选出的具有最好干扰效果的 EGFR siRNA_1 转染 A549 细胞,流式细胞仪检测细胞凋亡情况. 在双变量流式细胞仪的散点图上,左下象限

显示活细胞,为(FITC-/PI-);右上象限是坏死细胞,为(FITC+/PI+);而右下象限为凋亡细胞,显现(FITC+/PI-). 图 4 显示,空白对照组的细胞凋亡率为 4.93%(图 4(a)),Notarget siRNA 转染组的细胞凋亡率为 4.25%(图 4(b)),EGFR siRNA_1 转染组的细胞凋亡率为 22.98%(图 4(c)). 与 Notarget siRNA 转染组比较,EGFR siRNA_1 转染组的细胞凋亡率明显增加($P < 0.05$);空白对照组与 Notarget siRNA 转染组之间比较无明显差异($P > 0.05$). 该实验独立重复 3 次.

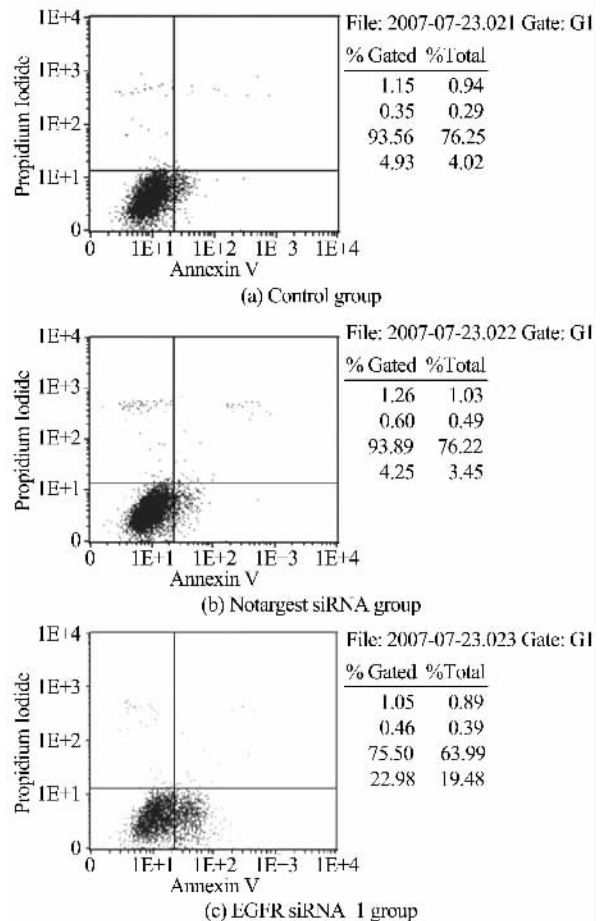
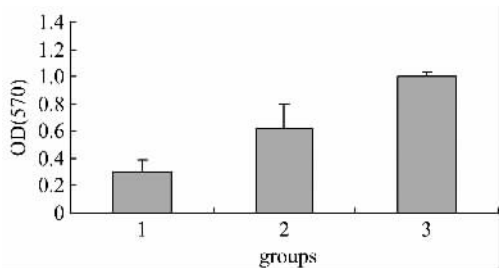


图 4 AnnexinV-FITC/PI 双染法检测细胞早期凋亡

Fig. 4 Cell apoptosis in the early phase were detected by AnnexinV-FITC/PI double staining. Apoptotic cells situated at lower right quadrant

2.5 EGFR siRNA_1 对肿瘤细胞增殖的影响

利用 EGFR siRNA_1 有效降低 EGFR 表达后,采用 MTT 比色法检测细胞增值情况. 如图 5 所示,与 Notarget siRNA 转染组比较,EGFR siRNA_1 转染组细胞生长受到明显抑制($P < 0.05$),抑制率达 51.8%,而 Notarget siRNA 转染组与空白对照



1:EGFR siRNA_1 group; 2:Notarget siRNA group; 3:Control group

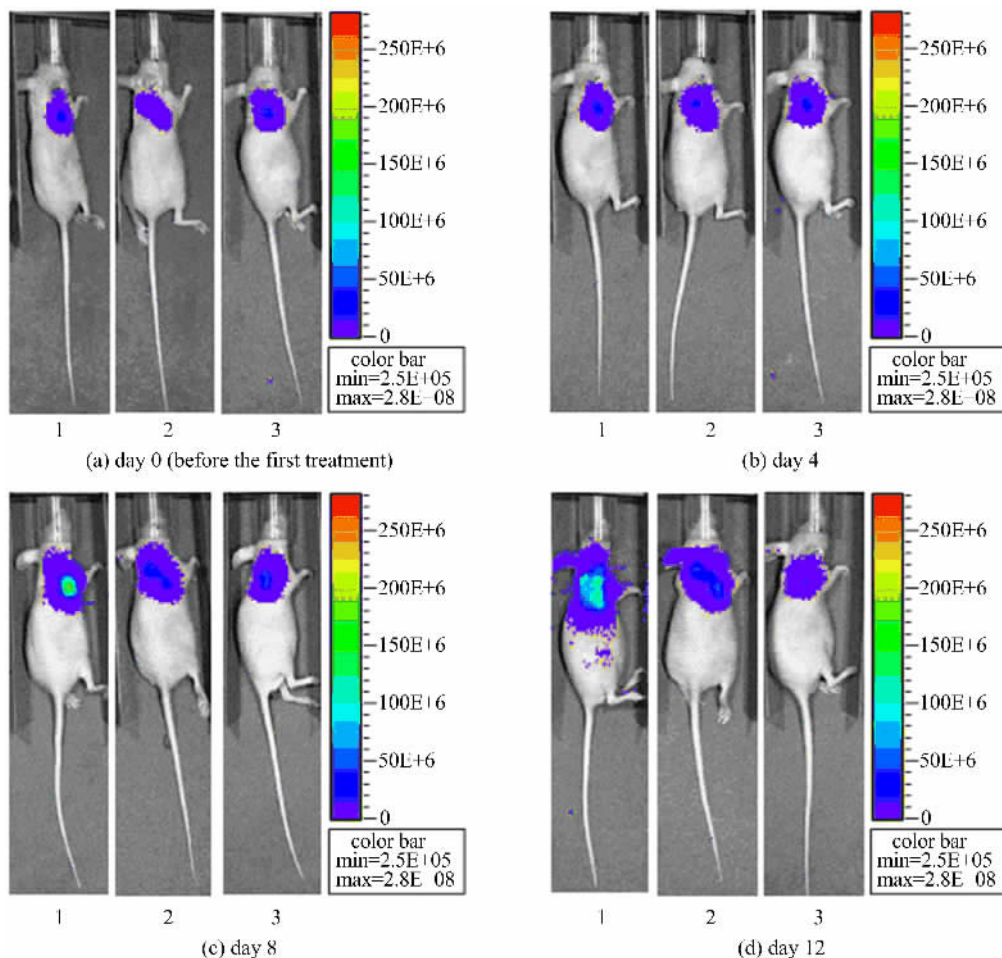
图 5 MTT 法检测 EGFR siRNA_1 转染对 A549 细胞增殖的影响

Fig. 5 Detection of proliferation of A549 cells by MTT colorimetry

组则无明显差异 ($P > 0.05$). 由于转染试剂 Lipofectamine™2000 有一定毒性, 所以空白对照组的细胞数明显多于 Notarget siRNA 转染组. 该实验独立重复 3 次.

2.6 活体成像系统检测的移植瘤生长情况

A549-luc 细胞皮下接种裸鼠 5 天后均可见瘤结节, 成瘤率为 100%, 肿瘤呈进行性生长. 活体成像系统检测的肿瘤生长情况显示, 给药后 0~12 天之内, 各组肿瘤荧光值均呈进行性增加, 但与溶剂对照组和 Notarget siRNA 对照组相比, EGFR siRNA_1 治疗组肿瘤荧光值增加缓慢. EGFR siRNA_1 治疗组从第 8 天与溶剂对照组和 Notarget siRNA 对照组有显著性差异 ($P < 0.05$) (图 6, 图 7), 而溶剂对照组和 Notarget siRNA 对照组相比则无显著性差异 ($P > 0.05$). 给药后第 16 天活体成像时, 溶剂对照组和 Notarget siRNA 对照组肿瘤荧光值开始下降, 而 EGFR siRNA_1 治疗组肿瘤荧光值继续增加, 说明此时对照组肿瘤已出现严重坏死, 不再适用于活体成像系统肿瘤生长检测 (活体成像系统只检测活细胞). 活体成像实验至此结束.



1: Control group; 2: Notarget siRNA group; 3: EGFR siRNA group

图 6 活体成像监测不同处理时间点各组肿瘤生长情况

Fig. 6 Monitoring the bioluminescence of subcutaneous A549-luc tumors of different treatment groups

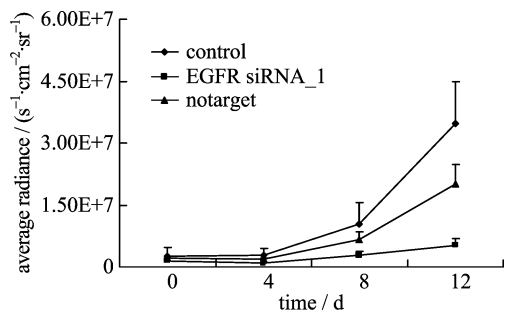


图 7 各时间点不同处理组移植瘤荧光值

Fig. 7 The bioluminescence of different treatment groups in various time points

2.7 移植瘤体积变化情况

移植瘤接种 14 天后,即给药处理 10 天后,各组移植瘤的体积均增加,但 EGFR siRNA_1 治疗组移植瘤体积的增加量显著小于 Notarget siRNA 组和空白对照组 ($P < 0.05$),而 Notarget siRNA 组和空白对照组则无明显差异 ($P > 0.05$) (见表 1)。

表 1 各处理组移植瘤体积

Tab. 1 Caliper measurements of tumor volumes of different treatment groups

	V_0/mm^3	V_N/mm^3	DV/mm^3
空白对照组	711.6±198.2	2 459.9±728.3	1 748.3±665.0
Notarget siRNA 组	418.5±135.6	1 655.8±510.0	1 237.3±379.0
EGFR siRNA_1 组	365.3±133.1	1 162.1±427.6	796.8±294.6

3 讨论

EGFR 是表皮生长因子受体家族中的 4 个成员之一,是分子量为 170 kD 的跨膜糖蛋白,由胞外区、跨膜区及胞内区 3 部分组成. EGFR 被配体激活后启动胞内信号传导,经过细胞质中衔接蛋白、酶的级联反应,调节转录因子激活基因的转录,指导细胞迁移、黏附、增殖、分化、凋亡^[12]. 在头颈癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、食管癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、肺癌、脑瘤中均发现 EGFR 过度表达^[13,14],且有 EGFR 表达的病例往往预示其侵袭度高、进展迅速和预后不良^[15,16].

目前,针对 EGFR 的分子靶向治疗药物大致可分为两大类:一类是酪氨酸激酶抑制剂(TKI),为小分子化合物,与 EGFR 胞内域的酪氨酸激酶结合并使之受抑;一类是人工制备的单克隆抗体(MAb),与 EGFR 的胞外结合区结合,从而阻断配体与 EGFR 的结合和活化. 而 RNAi 技术具有特异、高效、快捷、毒性小等特点,可高效、特异地抑制疾病相

关基因的过度表达,这就为 RNA 干扰技术作为 EGFR 的分子靶向治疗手段提供了必要的前提. 本研究中,首先化学合成了 3 条 EGFR 基因特异的 siRNA,然后通过检测不同处理后 EGFR mRNA 和蛋白水平的差异,筛选出了一条最有效的 siRNA,即 EGFR siRNA_1,干扰率达 85%. EGFR siRNA_1 特异诱导 EGFR 基因沉默后,促进了 A549 细胞的凋亡,并且抑制了 A549 细胞增殖活性,说明 EGFR siRNA_1 可有效抑制肺癌细胞的增生并促进其凋亡,从而阻止其进一步的恶化. 同时我们发现 EGFR siRNA_1 亦可有效抑制肺癌异种移植瘤的生长.

研究不同处理对动物移植瘤的作用,以往多采用检测肿瘤体积和肿瘤重量等方法来检验不同处理后的差异,由于受人为因素影响,会造成比较大的系统误差,从而会导致结果的假阳性或假阴性,特别是在模型范围不够大的情况下更易导致这种结果;而且检测肿瘤重量不可多次检测,不利于检测不同时间点的差异. 而本研究引入活体动物体内光学成像检测系统来检测不同处理对移植瘤的影响,它具有操作简便、结果直观、测量快速、灵敏度高许多独特的优点,它可以多次检测,从而可以检测一个时间梯度不同处理间的差异,这样所得的结果更具有可信性;并且我们结合了测量肿瘤体积来检测各处理组间的差异,进一步确保了动物体内光学成像检测系统所得结果的正确性.

因为不存在外源性基因整合到宿主细胞 DNA 分子的过程,所以,应用化学合成的 siRNA 抑制肿瘤发生相关基因的表达,从而抑制肿瘤的生长,是一种比较安全的方法. 相信随着研究的不断细致深入,在不久的将来, RNAi 技术会真正成为癌症治疗的新手段.

参考文献 (References)

- [1] Putnam E A, Yen N, Gallick G E, et al. Autocrine growth stimulation by transforming growth factor- α in human non-small cell lung cancer [J]. *Surg Oncol*, 1992, 1: 49-60.
- [2] Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-strand RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391: 806-811.
- [3] Hannon G J. RNA interference [J]. *Nature*, 2002, 418: 244-251.
- [4] Hutvagner G, Zamore P D. RNAi: nature abhors a

- double-strand [J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2002, 12(2): 225-232.
- [5] Sharp P A. RNAi and double-strand RNA [J]. *Genes Dev*, 1999, 13: 139-141.
- [6] Hannon G J, Rossi J J. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference [J]. *Nature*, 2004, 431: 371-378.
- [7] Contag P R, Olomu I N, Stenvenson D K, et al. Bioluminescent indicators in living mammals [J]. *Nature Medicine*, 1998, 4(2): 245-247.
- [8] Edinger M, Cao Y A, Hornig Y S, et al. Advancing animal models of neoplasia through in vivo bioluminescence imaging [J]. *Eur J Cancer*, 2002, 38(16): 2 128-2 136.
- [9] Jenkins D E, Oei Y, Hornig Y S, et al. Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2003, 20: 733-744.
- [10] Zeamari S, Rumping G, Floom B, et al. In vivo bioluminescence imaging of locally disseminated colon carcinoma in rats [J]. *Br J Cancer*, 2004, 90: 1 259-1 264.
- [11] Edinger M, Sweeney T J, Tucker A A, et al. Noninvasive assessment of tumor cell proliferation in animal models [J]. *Neoplasia*, 1999, 1(4): 303-310.
- [12] Krause D S, Van Etten R A. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy [J]. *New England Journal of Medicine*, 2005, 353: 172-187.
- [13] Nicholson R I, Gee J M W, Harper M E. EGFR and cancer prognosis [J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37 (Suppl. 4): S9-S15.
- [14] Ohsaki Y, Tanno S, Fujita Y, et al. Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer patients with p53 overexpression [J]. *Oncol Rep*, 2000, 7(3): 603-607.
- [15] Hirsch F R, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas; correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(20): 3 798-3 807.
- [16] Barker A J, Gibson K H, Grundy W, et al. Studies leading to the identification of ZD1839 (IRESSA): An orally active, selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor targeted to the treatment of cancer [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11(14): 1 911-1 914.

(上接第 687 页)

- [20] Liu L B, Wan W X, Lee C C, et al. The low latitude ionospheric effects of the April 2000 magnetic storm near the longitude 120 E [J]. *Earth Planets Space*, 2004, 56: 607-612.
- [21] Liu Li-bo, Wan Wei-xing, Ning Bai-qi, et al. Low latitude ionospheric effects near longitude 120°E during the great geomagnetic storm of July 2000 [J]. *Sci China (A)*, 2002, 45(Supp): 148-155.
刘立波, 万卫星, 宁百齐, 等. 2000 年 7 月磁暴期间 120°E 附近低纬电离层响应 [J]. *中国科学 A*, 2001, 31(增刊): 126-132.
- [22] Yue Xin-an. Modeling and Data assimilation of Mid-and Low-Latitude Ionosphere [D]. Beijing: Institute of Geology and Geophysics, Chinese Academy of Sciences, 2008.
乐新安. 中低纬电离层模拟与数据同化研究 [D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2008.
- [23] Fuller-Rowell T J, Rees D, Quegan S, et al. A coupled thermosphere-ionosphere model (CTIM), in STEP: Handbook of ionospheric models [C] // Schunk R W. *Sci Comm on Sol-Terr Phys*, Boulder, Colo. 1996: 239-279.
- [24] Aranjó-Pradere E A, Fuller-Rowell T J, Codrescu M V. STORM: An empirical storm-time ionospheric correlation model 1. Model description [J]. *Radio Sci*, 2002, 37; doi:10.1029/2001RS002467.