

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2006.03.03

· 基础研究 ·

抗MDM2 小干扰RNA 对辐射诱导 A549 肺癌细胞死亡的影响

郭万峰 郭国祯

【摘要】 背景与目的 在辐射反应不同的肺癌细胞 A549 和 NCF H446 中,照射后 MDM2 的表达模式是明显不同的,这可能与细胞的辐射抗性有关。本研究的目的是利用靶向 MDM2 的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 验证 MDM2 对 A549 细胞辐射反应的影响。方法 利用 pPUR/ U6 载体构建针对 MDM2 的质粒,采用 Lipofectamine™ 2000 脂质体转染 A549 细胞,通过 RT-PCR 和 Western blot 检测转染细胞 MDM2 表达情况,通过流式细胞仪观察转染细胞受 5 Gy 照射后的细胞死亡情况。结果 成功构建了两个抗 MDM2 的质粒。细胞转染 72 h 后 MDM2 在 A549 细胞中的表达明显降低。转染 siRNA 后,辐射诱导的 A549 细胞死亡明显增加。结论 MDM2 可能参与了 A549 细胞辐射抗性的形成,靶向 MDM2 的 siRNA 可以增加辐射诱导的 A549 细胞死亡。

【关键词】 肺癌细胞 辐射诱导的细胞死亡 小干扰 RNA MDM2 基因

【中图分类号】 R734.2;R811

Effects of anti-MDM2 siRNA on radiation-mediated cell killing in lung cancer cell line A549 GUO Wanfeng, GUO Guozhen. Department of Radiation Medicine, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shannxi 710032, P. R. China

Corresponding author: GUO Guozhen, E-mail: guozhengg@hotmail.com

【Abstract】 **Background and objective** Lung cancer cell lines A549 and NCF H446 with different radio-sensitivity to ionizing radiation (IR) have different MDM2 gene expression status, which may contribute to the radioresistance of cells. The aim of this study is to use small interfering RNA (siRNA) targeting MDM2 to investigate the influence of MDM2 gene silencing on radioresponse of A549 cell. **Methods** Plasmid targeting MDM2 was constructed with pPUR/ U6 vector and oligonucleotide designed according to the sequence of effective antisense oligonucleotides and principles of siRNA design. A549 cells were transfected by Lipofectamine™ 2000. MDM2 expression in A549 cells was detected by RT-PCR and Western blot. Radiation-mediated cell killing was detected by flow cytometry. **Results** Two out of three siRNA plasmids were constructed successfully. siRNA transfection resulted in downregulation of MDM2 expression of A549 cells on mRNA and protein levels. After treated with siRNA, radiation-mediated cell killing of A549 cells was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** The results support the hypothesis that MDM2 gene is a candidate for radioresistance in A549 cells. siRNA targeting to MDM2 can enhance the radiation-mediated cell killing of A549 cells.

【Key words】 Lung cancer cell Radiation-mediated cell killing Small interfering RNA MDM2 gene

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,具有很高的死亡率。大多数患者在诊断时都已达中晚期,不能进行手术,只能进行放疗和/或化疗。但是,放射治疗的治愈率仍较低。Spira 等^[1]对肺癌的治疗现状进行了综合分析,认为多种治疗相结合,尤其是结合针对基因靶分子的治疗可能是将来治疗肺癌的方向。鼠双微粒体

2 (murine double minutes 2, MDM2) 是一个促进细胞生长转化的癌基因,在肺癌中的表达是一个常见现象^[2,3]。紫外线和电离辐射 (ionizing radiation, IR) 可以诱导 MDM2 基因的表达,MDM2 在阻断这两种辐射诱导细胞死亡过程中具有关键性的作用^[4,5]。在我们^[6,7]以前的研究中发现,照射 5 Gy 后,使用寡核苷酸基因芯片动态检测不同辐射敏感性肺癌细胞的基因表达谱,发现 MDM2 基因在辐射抗性的 A549 细胞中是高表达的,而在辐射敏感性的 NCF H446 细胞中是低

作者单位:710032 西安,第四军医大学放射医学教研室(郭万峰现在 100071 北京,解放军第 307 医院肿瘤一科)(通讯作者:郭国祯, E-mail: guozhengg@hotmail.com)

表达的,MDM2 可能是一个潜在的参与肺癌细胞 A549 辐射抗性的基因。RNAi(RNA interference)是新近发展起来的一种封闭基因表达的有效方法^[8,9]。因此,实验中设计了以 MDM2 基因为靶标的小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)的表达载体,观察其对辐射抗性 A549 细胞 MDM2 的表达及其功能的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 肺腺癌细胞 A549 由本室保存。Wizard Plus SV 小量制备 DNA 纯化系统和 ImPromTM 逆转录系统购自 Promega, Apa / EcoR 购自 TaKaRa 生物公司, T4 连接酶购自 Stratagene, LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen, 抗 MDM2 抗体和 β -actin 一抗购自 Santa Cruz 公司, 二抗购自中山公司。

1.2 细胞培养 取本室保存的 A549 细胞, 培养于含有 10% 小牛血清和抗生素的 RPMF1640 培养液中, 置于 37^o、5% CO₂ 的孵箱中进行培养。

1.3 抗 MDM2 siRNA 载体的构建 pPUR/U6 质粒由沈志渊教授(University of New Mexico school of Medicine)惠赠。插入片段的 DNA 模板序列参照我们以前筛选的反义核酸有效序列^[7], 结合 siRNA 的设计原则, 分别合成: siRNA1: 正义: 5'-AGT GCT GGG ATT ACA GGC A TTCAAGAGA TGC CTG TAA TCC CAG CAC T TTTT-3', 反义: 5'-AAT TAA AAA A AGT GCT GGG ATT ACA GGC A TCTCTTGAA TGC CTG TAA TCC CAG CAC T GGCC-3'; siRNA2: 正义: 5'-GTG CTG GGA TTA CAG GCA T TT CAA GAG A ATG CCT GTA ATC CCA GCA C TTT TTT-3', 反义: 5'-AAT TAA AAA A GTG CTG GGA TTA CAG GCA T TCTCTTGAA ATG CCT GTA ATC CCA GCA C GGCC-3'; siRNA3: 正义: 5'-TCA CCT TGA AGG TGG GAG T TT CAA GAG A ACT CCC ACC TTC AAG GTG A TTT TTT-3', 反义: 5'-AAT TAA AAA A TCA CCT TGA AGG TGG GAG T TCTCTTGAA ACT CCC ACC TTC AAG GTG A GGCC-3'。

将合成的两条链溶解, 等物质的量的两条链混匀, 共 16 μ L, 加入 5 \times Buffer 4 μ L, 总共 20 μ L 体系, 95^o 水浴 5 min, 然后降至室温。质粒采用 Apa 和 EcoR 酶切后, 回收纯化后得到线性化载体。然后与退火形成的双链模板 DNA 经 T4 DNA 连接酶连接过夜。转化感受态细菌 DH5⁺, 在含氨苄青霉素的 LB 平板中

培养 16 h 后挑选菌落, PCR 筛选阳性克隆。筛选引物分别为: 正向引物(在 U6 启动子区): 5'-CAC AGA CTT GTG GGA GAA GC-3'; 反向引物为插入的靶序列。用无菌的牙签挑菌, 溶于 10 μ L 水, 沸水 10 min 使细菌裂解作为模板, 条件为: 94^o 4 min, 然后 94^o 30 s, 55^o 30 s, 72^o 30 s, 共 30 循环, 72^o 5 min。取 5 μ L PCR 产物在 2% 琼脂糖上进行电泳, 溴化乙啶染色, Quantity one (Bio-Rad) 软件进行分析。

1.4 质粒的提取和细胞转染 按照 Wizard Plus SV 小量制备 DNA 纯化系统的方法步骤提取质粒。胰酶消化培养瓶中的细胞, 用无双抗含 10% 小牛血清的 RPMF1640 稀释细胞, 浓度约为 5 $\times 10^4$ /mL, 35 mm 直径的六孔板每孔加入 2 mL 细胞悬液, 培养 24 h 左右, 细胞丰度约为 80%。采用 LipofectamineTM 2000 (Invitrogen) 脂质体以无血清和无双抗 RPMF1640 转染 3 μ g 重组质粒, 同时转染 3 μ g 空白质粒 pPUR/U6 作为对照组。一部分进行瞬时转染, 培养 72 h, 在蛋白和 RNA 水平上检测抑制效率; 一部分进行稳定的转染, 质粒转染 24 h 后, 将六孔板中的细胞消化至培养瓶中, 继续培养 24 h 后, 加入嘌呤霉素使终浓度为 2 mg/L, 进行抗生素压力筛选至细胞生长密度为 70% ~ 80% (约需两周时间), 完成细胞筛选及富集。

1.5 细胞照射 用⁶⁰Co 放射源对细胞进行 5 Gy 照射, 剂量率为 1.51 ~ 1.68 Gy/min, 假暴露组作为对照组。

1.6 RT-PCR 检测 siRNA 的抑制效率 使用 Trizol (Invitrogen) 提取各实验组 A549 细胞的总 RNA, 使用 ImPromTM 逆转录系统进行逆转录和 PCR 扩增, PCR 引物为: MDM2, 上游: 5'-AAG ACT ATT CTC AGC CAT CA-3'; 下游: 5'-CAT ACT GGG CAG GGC ATT-3'。GAPDH: 上游: 5'-ATC CCA TCA CCA TCT TCC AG-3'; 下游: 5'-CCA TCA CGC CAC AGT TTC C-3'。条件为: 94^o 5 min, 然后 94^o 30 s, 55^o ~ 58^o 30 s, 72^o 40 s, 共 28 ~ 30 个循环, 72^o 5 min。取 5 μ L PCR 产物在 2% 琼脂糖上进行电泳, 溴化乙啶染色, Quantity one (Bio-Rad) 软件进行分析。

1.7 Western blot 检测 MDM2 蛋白表达 取经脂质体转染 siRNA1 72 h 以及未转染的 A549 细胞, 经 IR 处理 48 h 后收集细胞, 加入 60 μ L 预冷的 RIPA-PIC 细胞裂解液, 置冰上 40 min。4^o、10 000 g 离心 15 min, 取上清进行蛋白定量 (Lowrey 酚试剂法)。取 40 μ g 蛋白加入 2 \times 上样缓冲液, 经 100^o 5 min 变性, 用 12% 的 SDS-PAGE 胶分离。凝胶经半干转移至 PVDF 膜上 (Millipore, Bedford, MA)。用含 5% 奶粉

的 TBST 缓冲液 4 封闭过夜。加入 1 500 稀释的 MDM2 一抗(鼠抗)和 1 1000 稀释的 β -actin 一抗(羊抗)室温 1 h, TBST 洗涤三次,加入 1 2500 稀释的 MDM2 二抗(羊抗鼠)和 1 3000 稀释的 β -actin 二抗(兔抗羊)室温 1 h, TBST 洗涤四次。加 ECL 显色剂(北京中山)1 min, X 线胶片曝光成像。

1.8 细胞凋亡的检测 A549 细胞在 RPMI1640 中培养 48 h, 然后加入 3 μ g siRNA1, 在存有 Lipofectamine™2000(5 mg/L)的无血清和无抗生素的培养液中孵育 6 h, 然后更换完全培养液。24 h 后, 转染和未转染细胞照射 5 Gy, 48 h 后收集细胞。按照 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(北京宝赛)操作步骤进行。

1.9 统计学处理 用 SPSS10.0 软件进行统计分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, ANOVA 分析流式细胞仪检测的细胞死亡情况。

2 结果

2.1 抗 MDM2 siRNA 表达质粒构建 将构建的质粒转化感受态细菌 DH5, 在含氨苄青霉素的 LB 平板中培养 16 h 后挑选菌落, PCR 筛选阳性克隆。筛选克隆见图 1。在多次实验后, 我们筛选到 siRNA1 和 siRNA3 的阳性克隆, 没有筛选到 siRNA2 的阳性克隆。随后将阳性菌落扩增培养提取质粒, DNA 测序以确定插入序列正确(资料没有显示)。将测序正确的质粒置 -20 保存。

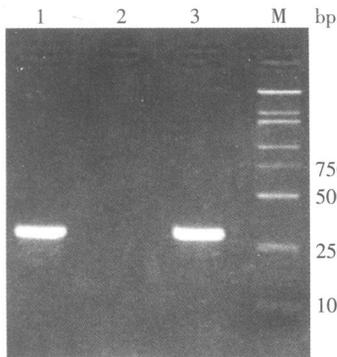


图 1 PCR 筛选阳性克隆

Fig 1 Screening of the ampicillin (+) resistant clones by PCR
Lane 1: siRNA1; Lane 2: siRNA2; Lane 3: siRNA3; M: DNA Marker

2.2 siRNA 转染对 A549 MDM2 表达的影响 A549 细胞经 3 μ g 抗 MDM2 siRNA 转染后 72 h, MDM2 表达量显著降低, 以 siRNA1 最为显著(图 2)。在 RNA 和蛋白水平检测 siRNA1 处理和 IR 处理后的 MDM2

水平。图 3 和图 4 显示在照射后 48 h, MDM2 的水平有所增加, 而在给予 siRNA1 后, MDM2 表达显著降低。但是, 对于稳定转染的 A549 细胞, 没有发现明显的改变(资料未显示), 发生了脱靶现象。

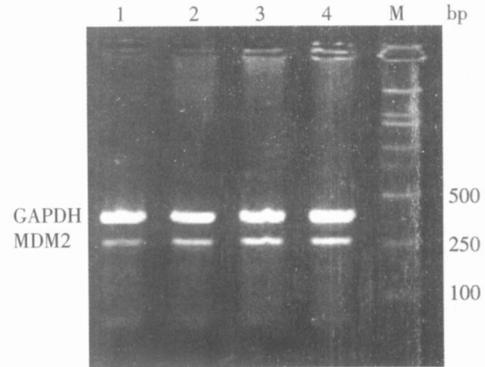


图 2 RT-PCR 分析 siRNA 转染 A549 细胞后 MDM2 的表达情况
Fig 2 RT-PCR analysis of MDM2 expression in A549 cells treated with siRNAs

Lane 1: siRNA1; Lane 2: siRNA3; Lane 3: pPUR/U6; Lane 4: A549 control; M: DNA marker

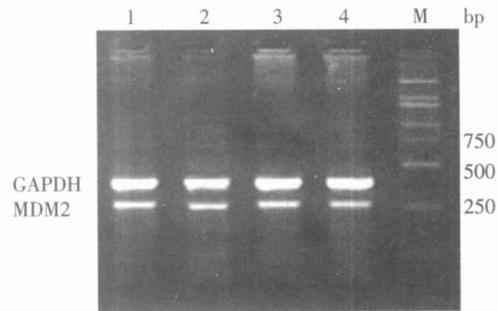


图 3 RT-PCR 分析各组 A549 细胞中 MDM2 mRNA 的表达

Fig 3 RT-PCR analysis of MDM2 mRNA expression in A549 cells with different treatment

Lane 1: IR; Lane 2: IR + Lipofectamine; Lane 3: A549 control; Lane 4: IR + siRNA1

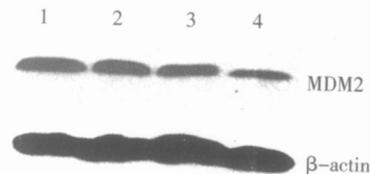


图 4 Western blot 分析各组 A549 细胞中 MDM2 蛋白的表达

Fig 4 Western blot analysis of MDM2 protein expression in A549 cells with different treatment

Lane 1: IR; Lane 2: IR + Lipofectamine; Lane 3: A549 control; Lane 4: IR + siRNA1

2.3 IR 和 siRNA1 处理后 A549 细胞的死亡情况

A549 细胞是肺腺癌细胞系, 辐射抗性较强, 经过流式细胞检测发现(图 5、表 1), 照射 5 Gy 后, 其细胞凋亡率仅为 2.6% ± 0.6%, 坏死率为 14.4% ± 3.5%; 而经过 siRNA1 处理后, 细胞凋亡率为 30.1% ± 7.5%, 坏死率为 12.7% ± 4.8%; siRNA1 与 IR 联合处理后, 细胞凋亡率为 45.9% ± 8.2%, 坏死率为 15.2% ± 6.3%。siRNA1 组和 IR + siRNA1 组与未经处理的 A549 细胞比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。IR + siRNA1 组与 IR 组比较, 细胞凋亡率差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 而坏死率差异则无统计学意义。

表 1 流式细胞术检测 siRNA1 和 IR 对 A549 细胞死亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 1 Effects of siRNA1 and IR on cell death of A549 cells by FCM ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Group	Apoptosis (%)	Necrosis (%)
A549 control	0.8 ± 0.2	2.1 ± 0.6
IR	2.6 ± 0.6	14.4 ± 3.5 *
pPUR/U6	3.62 ± 1.1	4.8 ± 0.8
siRNA1	30.1 ± 7.5 *	12.7 ± 4.8 *
IR + siRNA1	45.9 ± 8.2 *	15.2 ± 6.3 *

* : $P < 0.01$, compared with the A549 control group ;

: $P < 0.01$, compared with the IR group

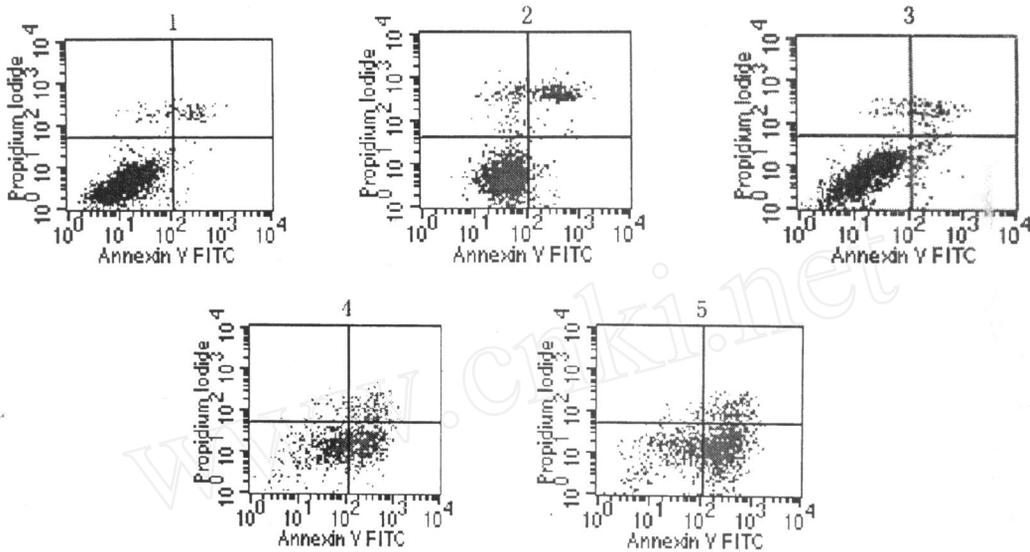


图 5 流式细胞术检测 siRNA1 和/或 IR 处理后 A549 细胞死亡情况

Fig 5 Cell death of A549 cells treated with siRNA1 and/or IR by FCM

1: A549 control; 2: IR; 3: pPUR/U6; 4: siRNA1; 5: IR + siRNA1

3 讨论

RNAi 是新近发展起来的一种封闭基因表达的有效方法^[8,9]。它与靶基因同源的含 21~23 个核苷酸的 siRNA 被转染至靶细胞, 与细胞内的内切酶形成诱导沉默复合体 RISC。RISC 以 siRNA 为模板, 特异性地识别其同源基因 mRNA 并对其进行递进式剪切, 形成瀑布效应, 诱导序列特异性的 mRNA 降解, 从而抑制基因表达。RNAi 具有高效性和高度特异性等特点, 是一种全新的基因治疗手段。目前, 基于 siRNA 的治疗方法正在被大量研究^[10,11]。恶性肿瘤可能有多重关键的致癌机制, 因此用靶标药物作为辅助治疗, 将是一个很好的方法, 尤其是作为肿瘤辐射增敏剂将是一个很好的研究方向。研究发现 siRNA 可以沉默 DNA 修复因子, 被认为是提高肿瘤放疗和化疗的致敏

剂^[12]。

MDM2 是一个促进细胞生长转化的癌基因。正常情况下, MDM2 和野生型 p53 有着精确的平衡, 其相互调节形成一种负反馈回路^[13]。MDM2 是 IR 和紫外线照射时的重要反应基因, 过表达 MDM2 影响了野生型 p53 激活所产生的细胞毒性作用, 它可能是一个提高肿瘤辐射敏感性的靶基因^[4,5]。MDM2 在肺癌中的表达是一个常见现象。因此, 抗 MDM2 的 siRNA 应该是提高肺癌辐射敏感性的一种有效方法。关于 RNAi 的有效序列选择, 有一些基本的原则, 但还缺少十分有效的生物信息学方法^[14]。最近的研究显示 siRNA 和反义寡核苷酸具有相似的位置依赖性, 两者具有相关性^[15,16]。所以, 我们依靠 MDM2 反义寡核苷酸的有效序列, 结合 siRNA 的一些基本原则, 设计了三条 siRNA, 但是 siRNA2 没有筛选到阳性克隆,

只对两个质粒进行了实验。将成功构建的两个质粒载体,以 Lipofectamine™ 2000 转染 A549 细胞,一部分进行瞬时转染,转染 72 h 后通过 RT-PCR 和 Western blot 观察其在 RNA 和蛋白水平上的抑制效果,发现 MDM2 基因的表达被明显地抑制,流式细胞检测显示细胞死亡率明显增高。这说明 siRNA 和反义寡核苷酸有相似的作用靶区,避免了随机设计 siRNA 的盲目性。但是,一部分细胞使用嘌呤霉素筛选进行稳定转染,出现了长期抑制丢失的现象(资料没有显示)。

上述结果表明,针对 MDM2 的 siRNA 分子可以抑制 MDM2 的表达,增强了 A549 细胞经辐射诱导的细胞死亡。抗 MDM2 siRNA 分子能增强 A549 细胞的辐射反应,辐射诱导的细胞死亡率明显增高,但将它作为辐射增敏的药物仍需要进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 Spira A, Ettinger DS. Multidisciplinary management of lung cancer. *N Engl J Med*, 2004, 350(4): 379-392.
- 2 Eymen B, Gazzeri S, Brambilla C, et al. Mdm2 overexpression and p14(ARF) inactivation are two mutually exclusive events in primary human lung tumors. *Oncogene*, 2002, 21(17): 2750-2761.
- 3 Gorgoulis VG, Zacharatos P, Kotsinas A, et al. Altered expression of the cell cycle regulatory molecules pRb, p53 and MDM2 exert a synergetic effect on tumor growth and chromosomal instability in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs). *Mol Med*, 2000, 6(3): 208-237. Erratum in: *Mol Med*, 2001, 7(12): 861.
- 4 Mu Z, Hachem P, Agrawal S, et al. Antisense MDM2 sensitizes prostate cancer cells to androgen deprivation, radiation, and the combination. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, 58(2): 336-343.
- 5 Perry ME. Mdm2 in the response to radiation. *Mol Cancer Res*, 2004, 2(1): 9-19.
- 6 Guo WF, Lin RX, Huang J, et al. Preparation of oligonucleotide microarray for radiation-associated gene expression detection and its ap-

plication in lung cancer cell lines. *Chin J of Radiol Med Protec*, 2005, 25(2): 107-111. [郭万峰, 林汝仙, 黄坚, 等. 辐射相关基因芯片的制备及其在肺癌细胞中的应用. *中华放射医学与防护杂志*, 2005, 25(2): 107-111.]

- 7 Guo WF, Lin RX, Huang J, et al. Identification of differentially expressed genes contributing to radioresistance in lung cancer cells using microarray analysis. *Radiat Res*, 2005, 164(1): 27-35.
- 8 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, 411(6836): 494-498.
- 9 Clayton J. RNA interference: the silent treatment. *Nature*, 2004, 431(7008): 599-605.
- 10 Ryther RC, Flynt AS, Phillips JA 3rd, et al. siRNA therapeutics: big potential from small RNAs. *Gene Ther*, 2005, 12(1): 5-11.
- 11 Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 2004, 432(7014): 173-178.
- 12 Collis SJ, Swartz MJ, Nelson WG, et al. Enhanced radiation and chemotherapy-mediated cell killing of human cancer cells by small inhibitory RNA silencing of DNA repair factors. *Cancer Res*, 2003, 63(7): 1550-1554.
- 13 Picksley SM, Lane DP. The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53? *Bioessays*, 1993, 15(10): 689-690.
- 14 Saetrom P, Snove O Jr. A comparison of siRNA efficacy predictors. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 321(1): 247-253.
- 15 Kretschmer-Kazemi Far R, Sczakiel G. The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(15): 4417-4424.
- 16 Kurreck J. Antisense and RNA interference approaches to target validation in pain research. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2004, 7(2): 179-187.

(收稿:2005-04-27 修回:2005-06-29)

(本文编辑 李蓓兰)

· 启 事 ·

致作者

为了确保图片制版的效果,请作者向本刊投稿时,尤其是经网上投稿时,务必通过邮局寄来相关的插图,特别是电泳图、X光片或CT片、组织学照片、荧光照片等。电泳图需由原始凝胶电泳图拍摄而成,并标注各条带的名称或编码,以及Marker上各迁移带的片段大小,请勿剪切图片。X光片及CT片应要求部位明确。组织学照片及荧光照片应注明内部标尺比例或放大倍数及染色法等。大体标本照片在图中应有尺度标记。所有图片必须平整光滑,具有良好的清晰度和对比度,不能有折痕或缺损,背面均应贴上标签,注明图序、作者姓名、图的上下方向及其他相关信息。