

利用 siRNA 抑制 HER-2 表达的研究

吴峰¹, 王清明¹, 范国才¹, 陈吉中¹, 陈惠鹏²

The Inhibition of HER-2 Expression by siRNA

WU Feng¹, WANG Qing-ming¹, FAN Guo-cai¹, CHEN Ji-zhong¹, CHEN Hui-peng²

1. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

2. Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences

Corresponding Author: WANG Qing-ming, E-mail: wang6801@yahoo.com

Abstract: **Objective** To inhibit the expression of HER-2 gene in MCF-7 human breast carcinoma cells by siRNA. **Methods** Five siRNAs targeting HER-2 were designed, and their corresponding expression vectors were constructed and transformed into MCF-7 cells. After selection, the stable transfected cells were obtained. The HER-2 mRNA abundance in the stable transfected cells was analyzed by RT-PCR. The HER-2 protein expression in these cells was analyzed by flow cytometry (FCM). The stable transfected cells were transplanted in nude mice, and the HER-2 protein expression in transplant tumor was detected with immunohistochemical method. **Results** siRNA 3P could effectively decrease the HER-2 mRNA expression in MCF-7 cells. The FCM data showed that the HER-2 protein expression in siRNA 2P and 3P transfected MCF-7 cells decreased. All the five siRNAs targeting HER-2 could decrease the tumorigenesis of MCF-7 cells in nude mice. Correspondingly, the HER-2 protein expression in transplant tumors was also reduced. **Conclusion** The siRNAs targeting HER-2 mRNA could effectively inhibit HER-2 expression in vivo and in vitro, and will be useful for gene therapy of breast cancer.

Key words: HER-2; Small interfering RNA (siRNA); Breast cancer

摘要: **目的** 利用 siRNA 抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞中 HER-2 基因的表达。 **方法** 针对 HER-2 mRNA 设计了 5 条 siRNA, 并构建相应的表达质粒, 将质粒转染 MCF-7 乳腺癌细胞, 筛选稳定表达株, 利用 RT-PCR 分析 siRNA 对细胞中 HER-2 mRNA 的降解作用; 利用流式细胞术分析细胞表面 HER-2 蛋白的表达; 利用裸鼠进行体内成瘤性实验, 用免疫组化法检测瘤组织中 HER-2 的表达。 **结果** siRNA 3P 能明显降低 MCF-7 细胞中 HER-2 mRNA 的丰度; 流式细胞分析表明, 其中 siRNA 2P 和 3P 稳定转染的 MCF-7 细胞表面 HER-2 的表达明显降低; 五种表达不同 siRNA 的 MCF-7 细胞在裸鼠体内的成瘤性均有所降低, 并且瘤组织中 HER-2 蛋白的表达也明显减少。 **结论** 靶向 HER-2 mRNA 的 siRNA 能在体内有效抑制 HER-2 的表达, 可用于乳腺癌的基因治疗。

关键词: HER-2; 小干扰 RNA (siRNA); 乳腺癌

中图分类号: R737.9; Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2006)04-0215-04

0 引言

HER-2 在乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、胃癌、肺癌等多种恶性肿瘤中存在基因扩增或过度表达, 而在正常人体腔上皮、腺上皮及胚胎中表达水平很低^[1]。约 30% 的乳腺癌患者伴随 HER-2 的过表达^[2], HER-2 过表达与乳腺癌的发生、发展、转移和不良预后密切相关。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是近年

发展起来的一种快速、高效、易于操作的使特异靶基因失活的技术。本实验利用 RNAi 技术, 以 HER-2 基因为靶点, 设计了 5 条小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA), 并从细胞及实验动物水平, 观察了 siRNA 对 HER-2 表达的特异性抑制作用, 探讨 siRNA 作为肿瘤基因治疗的可行性和特异性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人乳腺癌 MCF-7 细胞株由本室保存, 在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基、37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。

1.1.2 质粒 pSilencerTM 2.1-U6 hygro siRNA 表

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是近年
收稿日期: 2005-04-05; 修回日期: 2005-07-11
作者单位: 1. 100850 北京, 军事医学科学院放射医学研究所; 2. 军事医学科学院生物工程研究所
通讯作者: 王清明, E-mail: wang6801@yahoo.com
作者简介: 吴峰 (1978-), 女, 博士, 主要从事肿瘤基因治疗研究

化:离心收集转染细胞, PBS 洗一次后, 鼠血清(1 200 稀释) 封闭 30min, PBS 洗一次, 以 PBS 稀释 HER-2 单抗(1 20), 室温孵育 30min, 细胞经 PBS 洗一次后, 加入 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG(1 50 稀释), 室温避光孵育 30min, PBS 洗一次, 流式细胞仪检测, 488nm 激发波长下检测细胞表面 HER-2 的表达。

1.2.5 裸鼠皮下移植瘤实验 取稳定转染的细胞 2×10^6 个, 接种于 BALB/c 裸鼠背部皮下。在接种后第 21 天拉颈处死裸鼠, 分离出瘤组织, 测量瘤的长度(a)、宽度(b)和高度(c), 求出肿瘤近似体积(V), $V = 1/6 \times abc^{[4]}$, 单位 mm^3 。采用免疫组织化学方法检测肿瘤中 HER-2 蛋白的表达变化。

1.2.6 统计学处理 实验结果采用方差分析和 t 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 稳定转染 siRNA 表达质粒对 MCF-7 细胞 HER-2 表达的影响

采用半定量 RT-PCR 法检测转染和未转染 MCF-7 细胞中 HER-2 mRNA 的量。mRNA 的相对量以 PCR 产物的琼脂糖电泳条带的亮度来判断。实验结果显示, p-1P、p-2P、p-3P、p-5P、p-6P 稳定转染的 MCF-7 细胞中 HER-2 的 mRNA 表达明显降低, 其中 p-3P 稳定转染细胞中 HER-2 mRNA 量最低, 干涉效果最明显。转染对照质粒(p-N)的 MCF-7 细胞中 mRNA 的量与未转染的 MCF-7 细胞中 mRNA 的量一致, 见图 2。

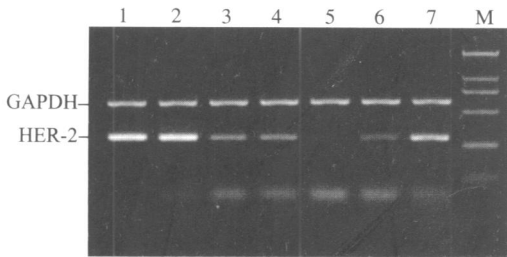


图 2 siRNAs 抑制 MCF-7 细胞中 HER-2 的表达

1: MCF-7 细胞; 2: 转染 p-N 的 MCF-7 细胞; 3: 转染 p-1P 的 MCF-7 细胞; 4: 转染 p-2P 的 MCF-7 细胞; 5: 转染 p-3P 的 MCF-7 细胞; 6: 转染 p-5P 的 MCF-7 细胞; 7: 转染 p-6P 的 MCF-7 细胞; M: DNA markers

采用间接免疫荧光法检测稳定转染的 MCF-7 细胞中 HER-2 蛋白的表达。如果 siRNA 对 HER-

2 的干涉作用强, 则细胞表面表达的 HER-2 蛋白也就少, 那么细胞表面的荧光强度降低, 检测到的峰就会左移。流式检测结果表明, 转染 p-3P、p-2P 的 MCF-7 细胞检测峰明显左移, HER-2 表达明显低于对照组, 其余组的峰形偏移不明显, 见图 3。

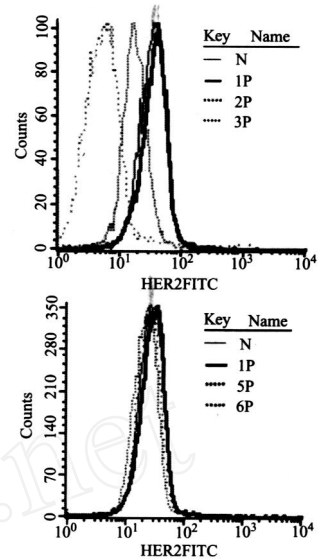


图 3 流式细胞术分析稳定表达 siRNA 的 MCF-7 细胞表面 HER-2 蛋白的表达

N: 转染 p-N 的 MCF-7 细胞; 1P: 转染 p-1P 的 MCF-7 细胞; 2P: 转染 p-2P 的 MCF-7 细胞; 3P: 转染 p-3P 的 MCF-7 细胞; 5P: 转染 p-5P 的 MCF-7 细胞; 6P: 转染 p-6P 的 MCF-7 细胞

2.2 裸鼠皮下移植瘤实验结果

pSilencer-HER-2 转染组裸鼠皮下移植瘤与 p-N 转染组裸鼠皮下移植瘤比较, 瘤体积均减小, 其中 p-1P、p-3P 组减小最明显, 与 p-N 对照组相比, 瘤体积分别减小了 53.5% 和 41.0%, 见图 4。肿瘤组织中 HER-2 蛋白的免疫组织化学检测结果见图 5, 图中细胞核被染成蓝紫色, HER-2 蛋白阳性信号为棕黄色颗粒, 从棕黄色的多少与深浅可以看出 HER-2 蛋白表达的多少, 如图中箭头所示, p-3P 组的移植瘤中 HER-2 蛋白量很少, 干涉效果明显。应用 CMIAS 系统多功能真彩色病理图像分析系统, 以积分光密度(integral optical density, IOD) 值反映免疫组化阳性信号的强度, IOD 值越大, HER-2 阳性越强; IOD 值越小, HER-2 阳性则越弱。对其进行统计分析, 比较结果见表 2。p-1P、p-2P、p-3P 和 p-6P 组与 p-N 对照组比较, 差异均有显著性意义 ($P < 0.01$)。

表 2 免疫组化图像分析裸鼠移植瘤中 HER-2 蛋白的表达

Groups	p-N	p-1P	p-2P	p-3P	p-5P	p-6P
IOD($\bar{x} \pm s$)	1.14 \pm 0.39	0.28 \pm 0.13 *	0.37 \pm 0.13 *	0.10 \pm 0.05 *	1.10 \pm 0.39	0.41 \pm 0.17 *

* 与 p-N 对照组比较 $P < 0.01$

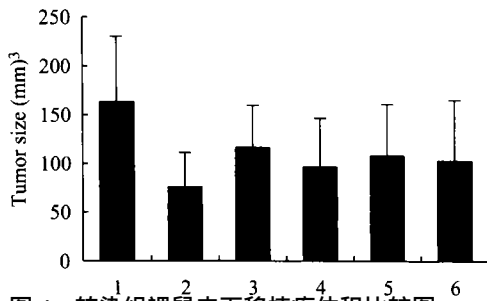


图 4 转染组裸鼠皮下移植瘤体积比较图

1: p-N 组; 2: p-1P 组; 3: p-2P 组; 4: p-3P 组;
5: p-5P 组; 6: p-6P 组。

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,术后复发和转移率较高,全世界每年约有 50 万妇女死于乳腺癌。研究发现,HER-2 在乳腺癌的发生、发展、治疗和预后中发挥重要作用,由此产生以 HER-2 为靶点的治疗理念。人源化单克隆抗体 trastuzumab(商品名 Herceptin)是第一个针对 HER-2 阳性的转移性乳腺癌的治疗药物,也是第一个生物靶向治疗乳腺癌的药物,单药及联合用药已经成功用于临床^[5-7]。虽然 Herceptin 在临床应用中存在心脏毒性的问题^[8],但 Herceptin 仍然是靶向治疗乳腺癌最成功的抗体药物。这说明 HER-2 是目前乳腺癌治疗最理想的药物靶点。

siRNA 是近年来发展起来的特异性基因沉默技术^[9],已成为分子生物学研究的重要技术手段之一,在人类基因功能研究及疾病基因治疗方面已显现出巨大的应用前景。目前,利用 RNAi 对白血病^[10]、乙型肝炎^[11]、丙型肝炎^[12]、艾滋病^[13]的治疗研究已取得一定进展。本研究希望利用 RNAi 技术抑制 HER-2 的表达,以实现 HER-2 过表达乳腺癌的治疗。

在设计靶基因 HER-2 的 siRNA 转录模板时,选择了 HER-2 基因外显子的不同区域,GC 含量为 42%~48%,均为 19bp。并在 HER-2 的 mRNA 和蛋白水平,分别检测了 5 条 siRNA 的抑制效果。体外细胞试验结果显示,p-3P 转染组中 HER-2 的 mRNA 和蛋白表达均显著降低,其余组的抑制效果不很明显。这说明针对靶基因不同位点所设计的 siRNA 诱导 RNAi 的效果是不同的。

裸鼠皮下成瘤实验中,与对照组相比较,siRNA 稳定表达组肿瘤体积均有所减小,HER-2 蛋白的表达也明显下调,这说明 siRNA 的表达降低了肿瘤细胞 HER-2 蛋白质的表达,从而使肿瘤细胞成瘤性降低。从肿瘤组织免疫组织化学图像分析结果看,稳

定表达 p-3P 的肿瘤组织中 HER-2 蛋白的表达几乎被完全抑制,但其肿瘤却不是最小,而 p-1P 组肿瘤组织中 HER-2 蛋白的表达比 p-3P 组高,但该组的肿瘤却最小。这其中的机制尚不清楚。

本研究利用 RNAi 技术,针对 HER-2 基因,构建了表达多种 siRNA 的表达质粒,转染 MCF-7 乳腺癌细胞后得到了 5 种稳定表达细胞株,将这些细胞接种裸鼠后发现,其成瘤性比对照组降低,并且在肿瘤组织中 HER-2 基因的表达也明显降低。这说明 RNAi 有可能成为乳腺癌基因治疗的一种新选择。

(本文图 5 见第 298 页)

参考文献:

- [1] Lohrisch C, Piccart M. An overview of HER-2[J]. *Semin Oncol*, 2001, 28(6 Suppl 18): 3-11.
- [2] M'haard S, Pupa SM, Campiglio M, et al. Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer[J]. *Oncogene*, 2003, 22(42): 6570-6578.
- [3] Krähn G, Leiter U, Kaskel P, et al. Coexpression patterns of EGFR, HER2, HER3 and HER4 in non-melanoma skin cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37(2): 251-259.
- [4] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版公司, 1996. 144-147.
- [5] Vogel C, Cobleigh M, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER-2 overexpressing metastatic breast cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(3): 719-726.
- [6] Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2[J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(11): 783-792.
- [7] Baselga J. Clinical trials of Herceptin (trastuzumab)[J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37(suppl 1): S18-S24.
- [8] Sparano JA. Cardiac toxicity of trastuzumab (Herceptin): implications for the design of adjuvant trials[J]. *Semin Oncol*, 2001, 28(1 suppl 3): 20-27.
- [9] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. *Nature*, 2001, 411(6836): 494-498.
- [10] Wilda M, Fuchs U, Wossmann W, et al. Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference[J]. *Oncogene*, 2002, 21(37): 5716-5724.
- [11] Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression replication by RNA interference[J]. *Hepatology*, 2003, 37(4): 764-770.
- [12] Kapadia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs[J]. *PNAS*, 2003, 100(4): 2014-2018.
- [13] Jacque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference[J]. *Nature*, 2002, 418(6896): 435-438.

[编辑:周永红]

利用 siRNA 抑制 HER-2 表达的研究

(正文见 215 页)

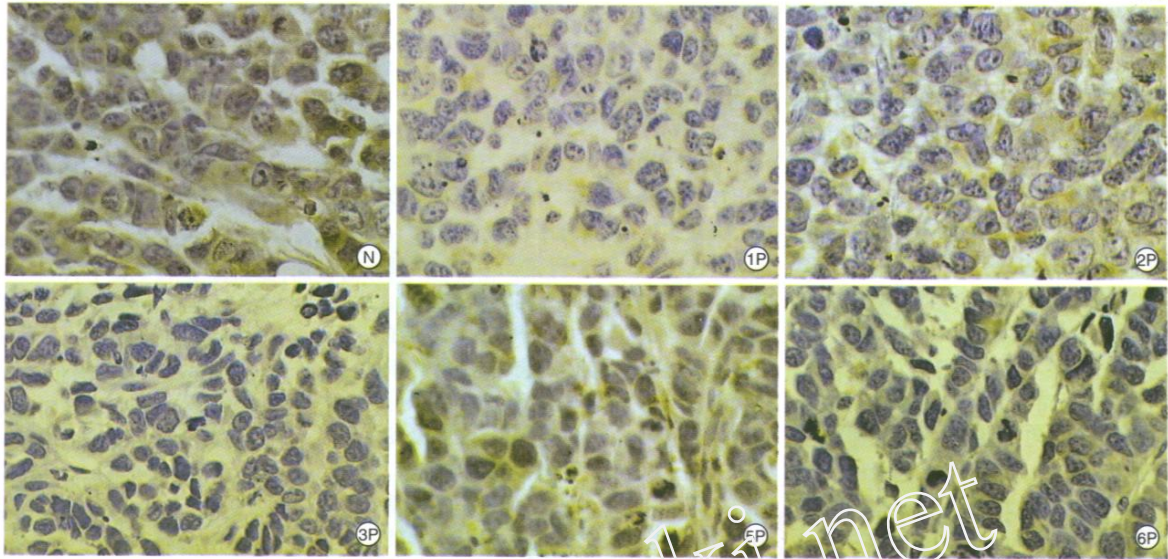


图 5 裸鼠移植瘤中 HER-2 蛋白的表达(SP × 400)
 N:P-N 组; 1P:p-1P 组; 2P:p-2P 组; 3P:p-3P 组; 5P:p-5P 组; 6P:p-6P 组

PTEN 和 survivin 在乳腺癌中的表达及其临床意义

(正文见 219 页)

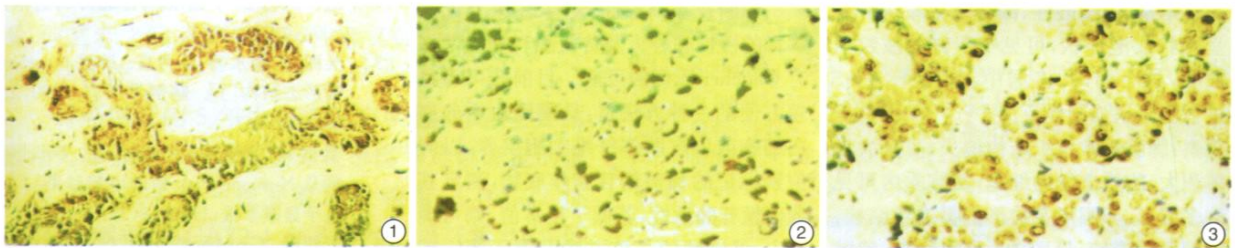


图 1 PTEN 表达阳性的乳腺癌细胞(胞浆黄染, × 400) 图 2 survivin 表达阳性的乳腺癌细胞(胞浆黄染, × 400)
 图 3 PCNA 表达阳性的乳腺癌细胞(胞浆黄染, × 400)

乙酰肝素酶基因表达增强大肠癌转化细胞侵袭能力的实验研究

(正文见 242 页)

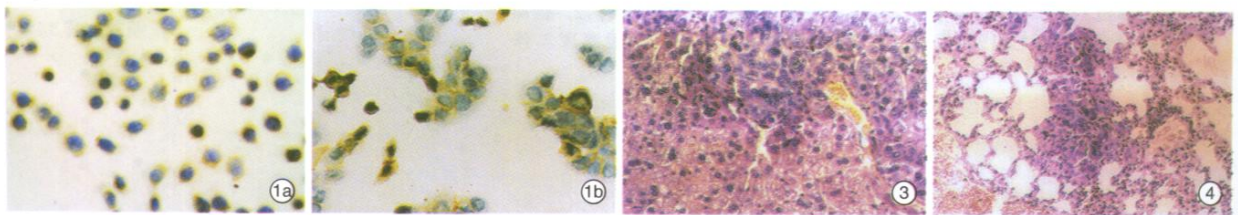


图 1a HT29 细胞中 HPA mRNA 的表达(原位杂交 DAB 显色, × 200) 图 3 HT29-HPa 种植瘤肝转移(HE × 200)
 图 1b HT29-HPa 细胞中 HPAmRNA 的表达(原位杂交 DAB 显色, × 200) 图 4 HT29-HPa 种植瘤肺转移(HE × 200)