

shRNA 介导 Ku80 基因沉默对食管癌细胞及裸鼠移植瘤生长的抑制作用

杨青山*, 樊飞跃

Inhibitory Effect of Silencing Ku80 by shRNA on Esophageal Carcinoma Cells and Its Transplanted Models in Nude Mice

YANG Qing-shan*, FAN Fei-yue

Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tian jin 300192, Chian (Present: Department of Oncology, The First Affiliated Hospital, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China)*

Abstract :Objective To investigate effect of Ku80 on esophageal carcinoma cells and its transplanted models in nude mice , inhibition of Ku80 expression by shRNA vector was used. **Methods** shRNA- Ku80 vector was constructed , using RNA interference technology. The effectiveness and feasibility of RNA interference were confirmed by Western blot and RT-PCR methods. Effects of silencing Ku80 by shRNA on esophageal carcinoma cells and its transplanted models in nude mice were investigated by MTT assay , Colony formation assay and inhibition of tumor assay *in vivo*. Effects of silencing Ku80 by shRNA on cell cycle and apoptosis were observed by Flow cytometry analysis. **Results** ShRNA- Ku80 vector was constructed successfully. Silencing Ku80 by shRNA inhibited esophageal cells growth *in vitro* and *in vivo*. Silencing Ku80 by shRNA made cell cycle arrest in G₂/M phase and enhanced apoptosis induced by radiation. **Conclusion** Ku80 plays a role in occurrence and development of esophageal cancer , inhibition of Ku80 expression by shRNA may become a target of gene therapy of tumor.

Key words :shRNA ; Ku80 ; proliferation ; Apoptosis

摘要 :目的 利用 shRNA 抑制 Ku80 蛋白表达来研究 Ku80 对食管癌细胞和裸鼠移植瘤生长的影响。方法 采用 RNA 干扰技术 ,构建 shRNA- Ku80 载体。用 Western blot 和 RT-PCR 方法证实 RNA 干扰的有效性和可行性。用 MTT 法、克隆形成实验和体内抑瘤实验来研究 shRNA 抑制 Ku80 表达对食管癌细胞和裸鼠移植瘤生长的影响。用流式分析法来研究 shRNA 抑制 Ku80 表达对细胞周期和凋亡的影响。结果 成功构建了 shRNA- Ku80 载体。shRNA 抑制 Ku80 表达在体内外抑制食管癌细胞的生长。shRNA 抑制 Ku80 表达使细胞周期阻滞于 G₂/M 期,促进射线引起的凋亡。结论 Ku80 在食管癌的发生、发展中起作用 ,shRNA 抑制 Ku80 表达有望成为肿瘤基因治疗的靶点。

关键词 :shRNA ; Ku80 ; 细胞增殖 ; 凋亡

中图分类号 :R735.1 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8578(2008)12-0862-04

0 引言

Ku80 是 Ku70/80 异源二聚体的一个组成单位 ,广泛存在于哺乳动物细胞内 ,最初是作为一种自身抗原发现于硬皮病患者的血清中^[1]。目前已知 Ku80 的生物学功能有 :参与 DNA 双链断裂的非同源末端连接(NHEJ)、V(D)J 重组和维护端粒结构、调控特定基因转录等^[2]。近年来 ,发现 Ku80 蛋白的活性与肿瘤的发生、发展相关^[3]。为进一步探讨其在食管癌中

的作用及其机制 ,本研究应用 shRNA 表达载体介导 Ku80 基因转染人食管癌细胞株 ,对其蛋白表达情况和体内外抑瘤作用进行了实验研究 ,为今后以 Ku80 为靶点的基因治疗提供实验依据。对其蛋白表达情况和体内外抑瘤作用进行了实验研究 ,为今后以 Ku80 为靶点的基因治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

RPMI1640 培养基 (Gibco) ,胎牛血清 (Biowhittaker) ,Lipofectamine2000 (Invitrogen) ,BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天) ,兔抗人 Ku80 单克隆抗体 (Cell signal) ,兔抗人 α -actin 单克隆抗体和兔抗兔辣根过氧化物酶标记的二抗 (博士德) ,shR-

收稿日期 :2008-01-24 ;修回日期 :2008-05-17
作者单位 :300192 天津 ,中国医学科学院放射医学研究所 (* 现工作单位 :121001 辽宁锦州 ,辽宁医科大学附属第一医院肿瘤科)
作者简介 :杨青山 (1975-) ,男 ,博士在读 ,主要从事 DNA 损伤的修复与肿瘤防治研究

NA-Ku80 由上海吉凯生物公司合成。合成的序列分别为: shRNA-H: 5'-CCAAA TCCTCGA TTTC A GA TTCAA GAGA TCTGAAA TCGA GGA TTTG G-3', shRNA-K: 5'-GGAA TTACCGAACAGCAA A TTCAA GAGA TTTGCTGTTCGGTAATTCC-3' 目的片段分别作用于 Ku80 编码区的 619~639 位和 1480~1500 位。同时试剂盒含有与人类基因无同源性的无关序列作为阴性对照。shRNA-SC: 5'-ACGTGACACGTTCGGA GAA TTCAA GAGA TT CTCCGAACGTGTCACGT-3'。

1.2 细胞培养

人食管癌细胞株 EC9706 由中科院肿瘤所惠赠, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液在 37℃、5% CO₂ 条件下常规培养传代。

1.3 shRNA 表达载体转染细胞与稳定筛选

在 24 孔培养板中常规接种 EC9706 细胞 (2 × 10⁵), 培养 24 h 后换无血清培养基 opti-MEM 100 μl/孔 孵育 1 h, 经 Lipofectamine2000 介导 shRNA 质粒转染 EC9706 细胞 (按试剂盒说明书操作), 转染后 48 h, 每孔加入 600 μg/ml G418 筛选阳性克隆, 每 3 天更换一次培养液, 10 天后单克隆化扩大培养于含 300 μg/ml G418 培养液中。同时设一阴性对照转染细胞。

1.4 Western blot 检测 Ku80 蛋白表达变化

收集各组细胞, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度, 上样量 30 μg 总蛋白, 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将蛋白质转移到 PVDF 膜上, 用含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBS-T 4 封闭过夜, 分别加入兔抗人 Ku80 单克隆抗体 (1:1 000 稀释) 或兔抗人 -actin 单克隆抗体 (1:400 稀释) 4℃ 孵育过夜。TBS-T 洗 10 min ×3 次, 兔抗兔辣根过氧化物酶标记二抗 (1:5 000 稀释) 室温孵育 2 h, TBS-T 洗 10 min ×3 次, 用化学增强发光试剂盒 (ECL) 曝光底片显影、定影。

1.5 RT-PCR 检测 Ku80 mRNA 变化

用 RT-PCR 法扩增各组细胞中的 Ku80 mRNA, -actin 作为内参。Ku80 上游引物为 5'-GGGGTACCA TGGTGCGGTCGGGGAA T-3'; 下游引物为 5'-GCTCTA GATCCCCA TACATC-CACGAC-3'。产物 2 200 bp。-actin 上游引物为 5'-ACCGTGGG AAG A GCTACGA-3'; 下游引物为 5'-GTA CTTGCGCTCA GCGGA G-3'。产物 482 bp。94℃ 变性, 60℃ 退火, 72℃ 延伸, 共 35 个循环。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.6 Ku80 基因沉默对食管癌细胞增殖的影响

(1) MTT 法: 选择各组细胞, 调整细胞数为 2 ×

10⁵/ml 接种于 96 孔培养板, 每孔 200 μl, 另设不加细胞的培养液为本底, 分别培养 1、3、5、7 天, 到时间点后每孔加入 20 μl (5 mg/ml) MTT, 继续培养 4 h 后终止培养, 每孔加入 DMSO 150 μl, 充分振荡 10 min, 选择 570 nm 波长, 酶标仪测定各孔的吸光度值 (A)。(2) 克隆形成实验: 各组细胞 (10³) 室温下分别接种在 100 mm 培养皿中, 培养 14 天后, 肉眼可见克隆形成。经甲醇固定, 0.5% 结晶紫染色。在显微镜下计数细胞克隆数 (至少含 50 个细胞)。

1.7 Ku80 基因沉默对食管癌细胞周期和凋亡的影响

各组细胞培养 24 h 后, 用胰酶消化并收集, PBS 清洗, 用预冷的 75% 乙醇于 4℃ 固定过夜, 离心, 弃去固定液, PBS 洗 2 次, 加入含 0.2 mg/ml RNaseA PI 染液 (50 μg/ml), 4℃ 避光孵育 30 min 后, 用流式细胞仪检测细胞周期。用 8 Gy ¹³⁷Cs 照射各组细胞作为凋亡诱导剂, 照射后继续孵育 24 h, 然后收集各组细胞, 用 GENMED-TUNEL FACS 试剂盒检测细胞凋亡情况。

1.8 Ku80 基因沉默对食管癌裸鼠移植瘤生长的抑制作用

SPF 级 Balb/C 裸鼠共 15 只, 由中国医学科学院基础所提供, 裸鼠雌雄兼用, 4 周龄。随机分为 3 组。取各组细胞, 用 PBS 调整细胞浓度到 1 × 10⁷/ml。在裸鼠腋下接种肿瘤细胞 0.2 ml, 观察裸鼠皮下肿瘤生长情况, 每 4 天测量一次瘤体长短径, 按 V = 1/2ab² (V 为体积, a 为长径, b 为短径) 计算肿瘤体积。

1.9 统计学方法

所有实验重复 3 次。数据用均数 ± 标准差表示, 进行多个实验组的均数与一个对照组均数比较的方差分析, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 shRNA 有效抑制内源性 Ku80 蛋白表达

Western bolt 结果表明, 稳定转染的 shRNA-H2 和 shRNA-K3 细胞 Ku80 表达被明显抑制, 可达 63% 和 50% (P < 0.01)。其余转染细胞 Ku80 蛋白无明显变化。RT-PCR 结果也显示 shRNA-K3, H2 的 Ku80 mRNA 含量明显减少 (P < 0.01), 抑制率为 58% 和 84%, 见图 1。我们用 shRNA-H2 细胞进行后续实验。

2.2 ShRNA-H2 对食管癌细胞体外生长的影响

MTT 法检测结果显示 shRNA-H2 细胞生长明显受抑制, 且随时间延长抑制作用逐渐增强, 而 shRNA-SC 对食管癌细胞生长无明显影响, 见图

2a。克隆形成实验显示:与对照组细胞相比,shRNA-H2 细胞克隆形成率明显受到抑制 ($P < 0.01$),而 shRNA-SC 细胞差异无统计学意义,见图 2b。

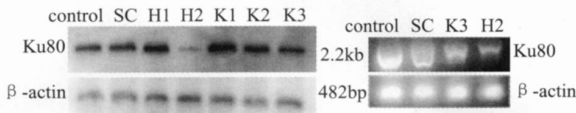


图 1 shRNA 抑制 Ku80 蛋白表达和 Ku80mRNA 含量
Fig 1 Expression of Ku80 protein and content of Ku80 mRNA was inhibited by shRNA

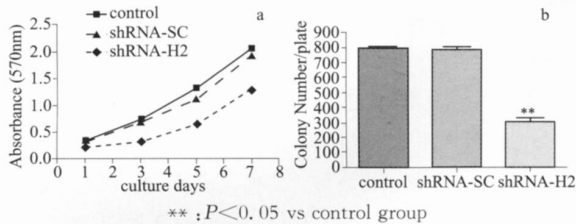


图 2 shRNA-H2 抑制食管癌细胞生长
Fig 2 Growth of esophageal cancer cells was inhibited by shRNA-H2

2.3 shRNA-H2 对食管癌细胞周期和凋亡的影响

流式结果显示 shRNA-H2 细胞 S 期降低,明显阻滞于 G₂/M 期,与对照组比 ($P < 0.05$),而 shRNA-SC 无明显变化,见图 3a。当经过 8 Gy 射线照射后继续培养 24 h,shRNA-H2 组细胞凋亡率为 (55.6 ± 5.52)%,对照组为 (14.7 ± 2.55)%,shRNA-SC 组为 (15.9 ± 3.75)%,shRNA-H2 组凋亡率较对照组增加了 3.8 倍 ($P < 0.01$),而 shRNA-SC 组与对照组间相比差异无统计学意义,见图 3b。

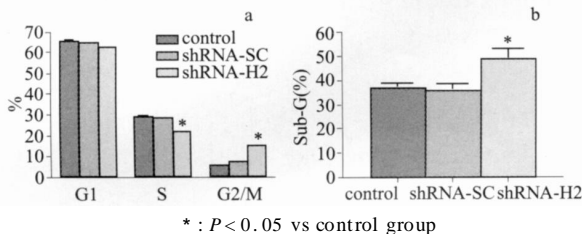


图 3 shRNA-H2 对食管癌细胞周期和凋亡的影响
Fig 3 Effect of shRNA-H2 on cell cycle and apoptosis of esophageal cancer cells

2.4 shRNA-H2 对食管癌裸鼠移植瘤生长的抑制作用

ShRNA-H2 组肿瘤生长显著慢于对照组 ($P < 0.01$),而 shRNA-SC 组则与对照组无明显差异,见图 4a。shRNA-H2 组瘤体重量也显著低于对照组,肿瘤生长抑制率达 66% ($P < 0.01$),而 shRNA-SC 组无明显变化,见图 4b。

3 讨论

为了探讨 Ku80 在食管癌中的作用,我们成功构建了 shRNA-Ku80 表达载体,挑选出有效的靶序

列抑制了内源性 Ku80 蛋白的表达。

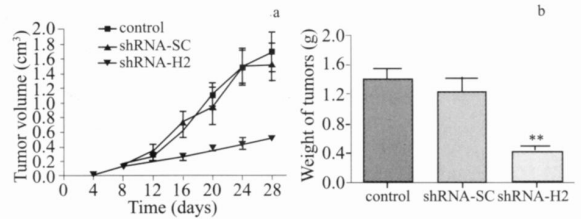


图 4 shRNA-H2 对食管癌裸鼠移植瘤生长的影响
Fig 4 Effect of shRNA-H2 on growth of esophageal cancer xenografts in nude mice

结果发现 shRNA 沉默 Ku80 蛋白在体外显著抑制食管癌细胞的增殖,同时也抑制了体内裸鼠移植瘤生长。这一结果与 Zhuang 等^[4]用 siRNA 干扰 Ku80 蛋白表达抑制宫颈癌细胞增殖所得的结果相似。然而与 Uegaki 等^[5]研究 Ku80 失活不影响人体细胞的生长相矛盾。Ku80 蛋白沉默抑制细胞增殖可能的机制是:(1)细胞周期调控失调促进细胞增殖。本研究结果显示 Ku80 蛋白沉默使细胞周期逃逸 G₁ 期,而阻滞于 G₂/M 期,细胞增殖受到抑制。在正常情况下,Ku80 的功能主要发生于 G₀、G₁ 及早 S 期,以参与 NHEJ 途径修复双链断裂^[6]。当 Ku80 基因沉默后,降低了其与 DNA 末端的结合和修复能力,使细胞逃过 G₁、S 期进入 G₂/M 期。同时,细胞内其他修复途径发挥作用如同源重组,使细胞阻滞于 G₂/M 期,抑制细胞的增殖。(2)逃避细胞凋亡机制,促进细胞增殖。本研究显示 Ku80 蛋白沉默后促进射线诱导的细胞凋亡,从而使细胞增殖受抑制。(3)Ku80 与维持端粒结构稳定性密切相关,且与端粒酶的活性正相关^[7]。当 Ku80 蛋白受抑制后,可降低端粒酶的活性,使端粒末端逐渐缩短,促进细胞衰老和凋亡。(4)Ku80 作为转录因子的调控者,其可调控 HER-2、NF-κB、EGFR、P50 基因转录,这些基因均促进细胞的增殖^[8]。关于 Ku80 蛋白沉默抑制细胞增殖的具体机制还有待于进一步研究。

总之,shRNA 使 Ku80 蛋白沉默抑制食管癌细胞的增殖和裸鼠移植瘤的生长,同时使细胞周期阻滞于 G₂/M 期,促进细胞凋亡可能成为癌症治疗的一种方法,为今后以 Ku80 为靶点的基因治疗提供实验依据。

参考文献:

[1] Mimori T, Akizuki M, Yamagata H, et al. Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap[J]. J Clin Invest, 1981, 68(3):611-620.
 [2] Skorokhod OM, Kravchuk IV, Teleheiev HD, et al. Role of

- Ku protein in normal and cancer cells[J]. Ukr Biokhim Zh, 2006, 78(5): 5-15.
- [3] Gullo C, Au M, Feng G, et al. The biology of Ku and its potential oncogenic role in cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1765(2): 223-234.
- [4] Zhuang L, Yu SY, Huang XY, et al. Effect of Ku80 expression inhibition by RNA interference on proliferation of cervical carcinoma cell line HeLa[J]. Ai Zheng, 2007, 26(3): 252-257.
- [5] Uegaki K, Adachi N, So S, et al. Heterozygous inactivation of human Ku70/ Ku86 heterodimer does not affect cell growth, double-strand break repair, or genome integrity[J]. DNA Repair (Amst), 2006, 5(3): 303-311.
- [6] Thacker J, Zdzienicka MZ. The XRCC genes: expanding roles in DNA double-strand break repair[J]. DNA Repair (Amst), 2004, 3(8-9): 1081-1090.
- [7] Bailey SM, Brenneman MA, Halbrook J, et al. The kinase activity of DNA-PK is required to protect mammalian telomeres[J]. DNA Repair (Amst), 2004, 3(3): 225-233.
- [8] Kim H. DNA repair Ku proteins in gastric cancer cells and pancreatic acinar cells[J]. Amino Acids, 2006. DoI 10.1007/s00726-006-0411-1 (Minireview Article) 2008, 34(2): 195-202.

[编辑:刘红武;校对:马福元]

· 简讯 ·

《肿瘤防治研究》杂志诚聘审稿专家

《肿瘤防治研究》杂志是由中华人民共和国卫生部主管、中国抗癌协会主办的肿瘤医学学术期刊,是传播我国肿瘤学领域最新科研成果和学术进展的重要载体,是外界了解我国肿瘤学领域的一个重要窗口。多年来,本刊一直以“百花齐放、百家争鸣”为办刊的指导原则,严格执行同行审稿、编审专家组集体定稿的制度。本刊审稿专家队伍以编委为主体,由近百位具有较深学术造诣的肿瘤学各专业学者组成,这支高水平的审稿专家队伍对于《肿瘤防治研究》杂志保持学术权威性和领先地位发挥着重要的作用。

为了进一步提高审稿质量,加快审稿速度,缩短论文发表时差,提高论文发表时效性,满足广大作者与读者的热切需求,本刊决定面向全国公开遴选肿瘤学领域各学科(专业)审稿专家,使更多有学识、有水平,并热心期刊工作的优秀专家参与到本刊审稿工作中来,从而进一步提高本刊学术质量,更好地发挥《肿瘤防治研究》杂志作为我国肿瘤学领域主流学术期刊应有的作用。凡具备下述条件者,请和我们联系:

1. 作风正派,学风严谨,关心并支持《肿瘤防治研究》杂志的各项工作;
2. 热心审稿工作并对此项工作有一定了解,有充裕的时间和充沛的精力,能承诺按时反馈审稿意见;
3. 有较高的学术水平,较深的学术造诣并取得了一定的学术成就,熟悉并了解肿瘤学相关领域在国内外的现状和发展趋势;
4. 精于科学研究和论文写作,特别是近年来在国内外知名学术期刊上发表过多篇学术论文或曾主编出版过学术专著;
5. 具有高级技术职称或博士以上学历(含博士);
6. 有较好的英文水平,系统掌握统计学知识;
7. 有相对固定的工作单位,通讯方便、快捷,懂电脑操作,能进行网络审稿。

具备以上条件,并愿意承担《肿瘤防治研究》杂志审稿工作的肿瘤学各学科专家,请向编辑部索取并填写《肿瘤防治研究杂志审稿专家登记表》,连同个人简历一份,通过电子邮件发送到编辑部邮箱(hongwu1222@126.com),经审查合格后予以确认。

凡本刊审稿专家,均可享受以下待遇:(1) 您撰写的论文免收审稿费,一经留用,优先发表;(2) 您推荐的论文,其推荐意见可作为定稿讨论时的参考;(3) 每期赠送杂志一册;(4) 对审稿工作酌致酬劳。

通信地址:武汉武昌卓刀泉南路 116 号《肿瘤防治研究》编辑部

邮政编码:430079

电话/传真:027-87670126

联系人:刘红武

E-mail: hongwu1222@126.com

网址: http://www.zlfzyj.com

《肿瘤防治研究》编辑部