

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2009.05.006

RNA 干扰 HER2 基因对人大肠癌 HT29 细胞株增殖影响的研究

吴爱国¹, 纪术峰¹, 韩明阳², 范应方¹, 谭艺真³, 刘铮², 刘鹏¹

Inhibitory Effects of HER2 RNAi on Proliferation of HT29 Cells

WU Ai-guo¹, JI Shu-feng¹, HAN Ming-yang², FAN Ying-fang¹, TAN Yi-zhen³, LIU Zheng², LIU Peng¹

1. Department of General Surgery, Zhujiang Hospital of Nanfang Medical University, Guangzhou 510282, China; 2. Department of General Surgery, He'nan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, China; 3. Department of Kidney Transplantation, Zhujiang Hospital of Nanfang Medical University, Guangzhou 510282, China

Corresponding Author: WU Ai-Guo, E-mail: wuagjiaoshou@163.com

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of RNAi targeting HER2 on the proliferation of human colorectal cancer cells *in vitro*. **Methods** Human colorectal cancer HT-29 cells were transfected with plasmid expressing shRNA-HER2 by Lipofectamine™ 2000. The mRNA level and expression of HER2 in HT29 cells of each group were detected using semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) and Western blot, respectively. Inhibitory effect on proliferation of each group was measured by MTT assay. **Results** Plasmid mediated shRNA-HER2 can depress both transcriptional and translational level of HER2 in HT29 cells *in vitro*. Compared with control the proliferation of HT-29 cells was inhibited by shRNA-HER2 ($P < 0.01$). **Conclusion** Plasmid mediated shRNA-HER2 can inhibit the proliferation of HT-29 cells by reducing the HER2 gene expression *in vitro*.

Key words: HER2 gene; RNAi; Colorectal cancer cells; shRNA

摘要:目的 研究载体介导的靶向 HER2 基因的 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 对外生长的人大肠癌 HT29 细胞增殖的影响。**方法** 将针对 HER2 基因的短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 表达载体转染体外生长的 HT29 细胞, 分别用半定量 RT-PCR 和 Western blot 检测 HER2 mRNA 和蛋白的表达, MTT 测定各组细胞的增殖差异。**结果** 靶向 HER2 的 shRNA 可以有效地抑制体外生长的人大肠癌 HT29 细胞中 HER2 基因 mRNA 和蛋白表达, 与对照组比较, 实验组细胞增殖明显受到抑制。**结论** 靶向 HER2 的 shRNA 表达载体可以通过降低 HER2 基因的表达, 进而抑制体外生长的大肠癌 HT29 细胞的增殖。

关键词: HER2 基因; RNA 干扰; 大肠癌细胞; 短发夹 RNA

中图分类号: R735.3⁺4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2009)05-0380-04

0 引言

大肠癌是世界范围内第三常见的恶性肿瘤, 围绕手术开展的化学治疗虽然能在一定程度上延长了患者的生存时间, 却无法回避针对性差、毒副作用大等缺陷。因此, 以靶向治疗策略为指导研发新型的抗癌药物显得尤为必要。HER2 是人类癌基因之一, 由 Shih 于 1974 年从大鼠神经母细胞瘤和胶质

母细胞瘤分离出来^[1]。研究表明, 它与多种肿瘤的发生、发展和预后密切相关^[2], HER-2 基因在约 1/3 的大肠癌患者呈高表达, 是大肠癌生物治疗的一个理想靶点^[3]。RNA 干扰 (RNAi) 技术是近年新兴起的一种可导致特定基因沉默的技术。它通过 21-23nt 的双链小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 片断与细胞内相对应的 mRNA 结合, 激活内源 RNA 内切酶, 特异性降解 mRNA, 从而抑制宿主细胞靶蛋白质的表达^[4]。目前主要以可表达短发卡状 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 的质粒或病毒为载体, 转染细胞后可在细胞内获得稳定的 siRNA 表达, 并且这种表达具有可遗传性, 从而在哺乳动物细胞内达到长期抑制目的基因的目

收稿日期: 2008-02-03; 修回日期: 2008-09-16

基金项目: 广东省科技计划项目 (2005B31201011)

作者单位: 1. 510282 广州, 南方医科大学珠江医院普通外科; 2. 河南省人民医院普外科; 3. 南方医科大学珠江医院肾移植科

作者简介: 吴爱国 (1956-), 男, 博士, 主任医师, 主要从事胃肠、乳腺外科的基础与临床研究

的^[5]。本研究根据 RNAi 技术原理,将 shRNA 表达质粒瞬时转染大肠癌细胞系 HT29 细胞,观察靶向 HER2 的 shRNA 对该细胞中 HER2 表达水平和细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RPMI 1640 培养基(美国 Hyclone 公司),胎牛血清(美国 Hyclone 公司),Opti-MEM Medium(美国 Hyclone 公司),转染试剂 LipofectamineTM2000 试剂(Invitrogen 公司),MMLV 反转录酶(NEB 公司),PCR 试剂盒(BD 公司),PCR Marker(NEB 公司),质粒小提试剂盒(Tiangen 公司),HER2 单抗(Cell signal 公司),HRP 标记的羊抗鼠二抗(北京博士德公司),感受态 DH5a(大连 Takara 公司)。

1.2 shRNA 靶序列设计及重组质粒的构建

根据 Gene Bank 报道的 HER2 的核苷酸序列(NO. M11730),用 Ambion web-based insert design tool,参考 siRNA 的设计策略,通过 Blast,挑选长度分别为 20bp 和 21bp 的两个特异性寡核苷酸序列(5'-GCTACGTGCTCATCGCTCACA-3')与(5'-GCAGCAGAAGATCCGGAAGTA-3')。合成其发卡样两端配对 siRNA 寡核苷酸,同时合成互补链,分别在 5'和 3'端引入 *Bam*H I 和 *Bbs* I 酶切位点(由上海生工公司合成)。重组质粒的构建及鉴定参考相关文献^[6]。重组的两个质粒分别命名为重组质粒 1 和重组质粒 2。

1.3 细胞培养

HT29 细胞株由南方医科大学免疫实验室提供,常规培养于含青、链霉素和 15%胎牛血清的 1640 培养基中,置 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。

1.4 细胞转染与分组

转染前 1 天,将对数生长期的 HT29 细胞以 2.5×10^5 /孔的密度接种于 6 孔培养板,每孔加入 2 ml 不含双抗的全培养基,细胞融合达 60%~80%时,按 LipofectamineTM2000 试剂盒说明书进行细胞转染。实验共分 4 组:空白对照(未转染任何质粒的 HT29 细胞);阴性对照(转染了空载体的 HT29 细胞);转染了重组质粒 1 的 HT29 细胞组(shRNA1);转染了重组质粒 2 的 HT29 细胞组(shRNA2)。

1.5 RT-PCR 法检测细胞 HER2 mRNA 的表达

1.5.1 细胞总 RNA 的提取及浓度的测定 细胞转染 48 h 后,按 TRIzol 试剂盒说明书提取总 RNA,经氯仿处理,异丙醇沉淀,75%酒精洗涤后,略干燥,无 RNA 酶水溶解,-70℃保存。以核酸紫外分析仪检测 OD_{260}/OD_{280} 值为 1.91,计算 RNA 浓

度,RNA 浓度($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) = $OD_{260} \times \text{稀释倍数} \times 0.04$ 。用 DEPC 水定量到 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

1.5.2 RT-PCR 提取的 RNA 按照 MMLV 第一链合成试剂盒说明书合成 cDNA。HER2 上游引物:5'-TCTGCTGGAGGAATTGGTGTT-3',下游引物:5'-GACGCTTGTTCCCACCTTGA-3',扩增片段长度为 231 bp。GAPDH 上游引物:5'-ACCA-CAGTCCTGCATGCCATCAC-3',下游引物:5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3',扩增片段长度为 450 bp。反应体系体积为 50 μl ,PCR 反应条件为 94℃,2 min,反转录酶灭活和 RNA/cDNA 引物预变性;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 2 min,39 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min。产物于 2%琼脂糖进行凝胶电泳,拍照记录电泳结果,图像分析仪测定电泳产物灰度值 A,以同一标本的 GAPDH mRNA 作为内参进行校正,对 HER2 PCR 产物相对定量。

1.6 Western Blot 方法检测 HER-2 蛋白表达

转染后 72 h,提取各组细胞的总蛋白质,BCA 蛋白定量试剂盒测蛋白浓度。取 15 μg 蛋白经 8% SDS-PAGE 电泳分离,常规湿法转膜,用小鼠抗人 HER2 单抗 4℃孵育过夜,洗膜,然后用 HRP 标记的二抗室温轻摇 1 h,ECL 化学发光试剂染色 1 min,暗室曝光 30 s,观察结果。

1.7 MTT 比色法测定细胞的增殖活性

将 HT29 细胞以每孔 1×10^4 个的密度接种于 96 孔培养板中,每组设 3 个复孔,每孔体积 200 μl ,将细胞开始贴壁的时间定为 0 h。每 12 h 为一个检测点,用 MTT 法连续测定 96 h 细胞增殖的状况。测定时每孔加入 5g/L MTT 溶液 20 μl ,37℃孵箱中继续孵育 4 h,终止培养。小心吸弃孔内培养上清液后,每孔加入 150 μl DMSO,振荡 10 min,在酶联免疫检测仪上 490 nm 处测定各孔吸光度,记录结果。以时间、吸光度为坐标绘制细胞生长曲线。

1.8 统计学方法

实验数据以 mean \pm s 表示,SPSS 11.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 pGPU6/GFP/Neo/RNAi 质粒的转染

编码 shRNA 的带绿色荧光蛋白的重组载体转染入 HT29 细胞后在绿色荧光激发波长下细胞应显示为绿色,转染后 24 h 荧光显微镜摄片证实转染成功,见图 1。

2.2 重组表达质粒对 HT-29 细胞 HER2 mRNA 表达的影响

各组均成功扩增出相应目的基因的 PCR 产物,

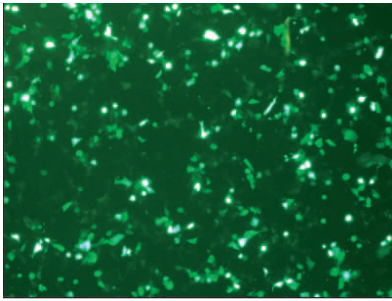
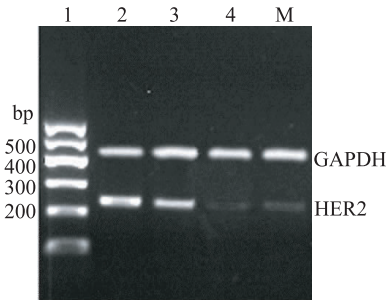


图 1 重组质粒转染 HT29 细胞后绿色荧光蛋白的表达(×100)

Figure 1 The green fluorescent protein expression of HT29 cells after transfected with recombinant plasmid(×100)

条带与 Marker 比较证实扩增的目的片段大小完全吻合,见图 2。电泳条带经凝胶电泳图像扫描仪扫描,测各条带的灰度值,经同一标本的 GAPDH 条带的灰度值校正后进行比较。siRNA1 (0.421 ± 0.007) 和 siRNA2 (0.408 ± 0.015) 对 HT-29 细胞 HER2 mRNA 的表达有明显的抑制作用,与空白对照组 (0.892 ± 0.011) 和空载体组 (0.901 ± 0.002) 比较有统计学意义 ($P < 0.01$)。空白对照组与空载体组之间无显著差异 ($P > 0.05$)。

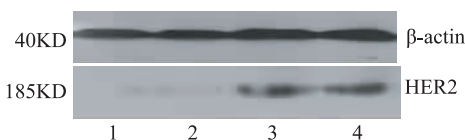


M: Marker; 1: not transfected; 2: plasmid transfected; 3: siRNA1 transfected; 4: siRNA2 transfected

图 2 各组细胞中 HER2 在 mRNA 水平的表达情况
Figure 2 The expression of HER2 in different groups

2.3 Western blot 检测重组表达质粒对 HER2 蛋白表达的影响

空白对照组、空载体组 185 bp 处可见清晰条带。同上对比 shRNA 利用 pGPU6/GFP/Neo 干扰体系瞬时转染人大肠癌 HT29 细胞后条带减弱,表明 HER2 蛋白表达明显减少,见图 3。



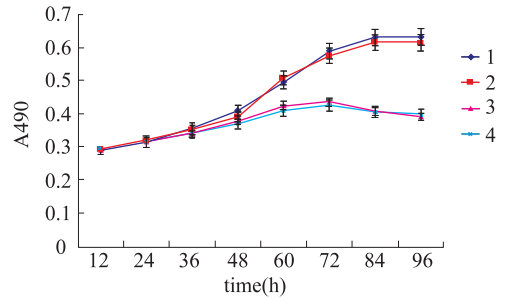
1: siRNA1 transfected; 2: siRNA2 transfected; 3: not transfected; 4: plasmid transfected

图 3 各组细胞中 HER2 在 mRNA 水平的表达情况

Figure 3 The expression level of HER2 in different groups

2.4 MTT 比色实验

检测数据表明,在转染后 36 h 内,各组细胞增殖未见明显差别。转染后 48~96 h, shRNA1 组和 shRNA2 组的细胞增殖明显慢于空白对照组和空载体组 ($P < 0.01$),见图 4。



1: Not transfected; 2: Plasmid transfected; 3: siRNA1 transfected; 4: siRNA2 transfected

图 4 各组细胞增殖活性的差异

Figure 4 The difference of cell growth in each group

3 讨论

HER2 癌基因属生长因子受体家族,这个家族还包括上皮生长因子受体(EGFR, HER1)、HER3 和 HER4^[7]。HER2 基因编码一种分子量为 185 KDa 的跨膜蛋白质(P185HER2),这种蛋白质具有酪氨酸激酶活性,在细胞增殖和分化中起作用^[8]。HER2 在乳腺癌、肺癌、肝癌、肾癌等许多肿瘤组织中呈高表达,在大肠癌中大约 30% 的患者 HER2 呈高表达,并且这种高表达与预后差密切相关^[9-10]。通过阻断癌细胞中 HER2 基因的表达从而达到治疗大肠癌的目的,已成为努力尝试治疗大肠癌的一个方向。人源化的抗 HER2 单克隆抗体 trastuzumab(Herceptin)用于治疗乳腺癌已取得可喜进展。通过反义核酸技术阻断 HER2 在癌细胞的表达,也能诱导细胞凋亡^[11]。但反义核酸技术存在效率低、特异性差的缺点。RNA 干扰技术克服了上述缺点,具有高效、特异性强、可持续表达等优点,因而具有良好的治疗前景^[12]。早期的 RNAi 研究一般应用体外化学合成 siRNA 的方法,但后来研究者发现体外合成的 siRNA 所产生的抑制效应是很短暂的,一般有效期只有几天。后来研究者相继开发出多种可以在哺乳动物细胞内表达 siRNA 的质粒和病毒载体,这些载体可以在哺乳动物细胞内转录出一条由 siRNA 的正义链和反义链以及连接它们的环序列(loop)构成的短发卡 RNA,这些小 RNA 被体内的 dicer 酶切割为 21 bp 长的 siRNA,后者引起特定基因沉默。应用 siRNA 表达载体可以在哺乳动物细胞内长期稳定的抑制目的基因的表达。Brummelkamp 等^[13]研究发现将表达载体导入细胞

内在 U6 启动子的作用下转录产生 shRNA,其发卡环结构被切除后产生 siRNA,具有表达量多、持续时间久的优点;并且还证实以 9 个核苷酸序列环为发卡的 shRNA 产生的抑制效应最强^[14]。因为化学合成的 siRNA 不能在细胞内持续表达,因此我们应用了专门用于 RNA 干扰研究的载体 pGPU6/GFP/Neo。选择靶序列一般应选择几个不同的靶点,根据对基因的抑制效果选择最佳的 siRNA 靶序列^[15]。通过研究可以看出,我们设计的两对 shRNA 均能明显抑制 HT29 细胞中 HER-2 的表达,并能抑制细胞增殖。提示我们可以对其中的一对 shRNA 进行稳定转染,进一步观察其对 HT29 细胞生物学性状的影响,并研究其作用机制,为进一步应用 RNAi 技术治疗大肠癌提供理论依据。

参考文献:

- [1] Shih C, Padhy LC, Murray M, et al. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts[J]. *Nature*, 1981, 290(5803): 261-264.
- [2] Baxevasis CN, Sotiropoulou PA, Sotiriadou NN, et al. Immunobiology of HER-2/neu oncoprotein and its potential application in cancer immunotherapy[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(3): 166-175.
- [3] Friederichs J, Rosenberg R, Mages J, et al. Gene expression profiles of different clinical stages of colorectal carcinoma: toward a molecular genetic understanding of tumor progression [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2005, 20(5): 391-402.
- [4] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.
- [5] Sui G, Soohoo C, Affarel B, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(8): 5515-5520.
- [6] 韩明阳, 吴爱国, 郭爱林, 等. HER2 基因靶向 RNA 干扰重组表达载体的构建及序列分析[J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(31): 3284-3288.
- [7] Zhao J, Zhang LH, Jia LT, et al. Secreted antibody/granzyme B fusion protein stimulates selective killing of HER2-overexpressing tumor cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(20): 21343-21348.
- [8] Tiseo M, Loprevite M, Ardizzoni A, et al. Epidermal growth factor receptor inhibitors: a new prospective in the treatment of lung cancer[J]. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2004, 4(2): 139-148.
- [9] Hellstrom I, Goodman G, Pullman J, et al. Overexpression of HER-2 in ovarian carcinomas[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(6): 2420-2423.
- [10] Hogdall EV, Christensen L, Kjaer S, et al. Distribution of HER-2 overexpression in ovarian carcinoma tissue and its prognostic value in patients with ovarian carcinoma: from the Danish MALOVA Ovarian Cancer Study[J]. *Cancer*, 2003, 98(1): 66-73.
- [11] Roh H, Pippin J, Drebin JA, et al. Down-regulation of HER2/neu expression induces apoptosis in human cancer cells that overexpress HER2/neu[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(3): 560-565.
- [12] McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs[J]. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(10): 737-747.
- [13] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells [J]. *Science*, 2002, 296(5567): 550-553.
- [14] Choudhury A, Charo J, Parapuram SK, et al. Small interfering RNA (siRNA) inhibits the expression of the Her2/neu gene, upregulates HLA class I and induces apoptosis of Her2/neu positive tumor cell lines[J]. *Int J Cancer*, 2004, 108(1): 71-77.
- [15] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. *Nature*, 2001, 411(6836): 494-498.

[编辑校对: 安 凤]