文章编号:1000-5404(2005)23-2307-04

论著

靶向EGFR基因的siRNA表达载体构建及其生物学效应的研究

白 莉,祝 蓉,陈智鸿,白春学,高 磊,张 新 (复旦大学附属中山医院呼吸内科,上海 200032)

提 要:目的 构建靶向表皮生长因子受体(EGFR)基因的小干扰RNA(siRNA)表达载体(pSi-EGFR),并观察其抑制人肺腺癌细胞株A549中EGFR基因表达的效果及生物学效应。**方法** 利用Lipofectamine2000将构建的pSi-EGFR载体转入A549细胞中,应用实时定量荧光PCR、免疫荧光和流式细胞仪检测EGFR基因mRNA和蛋白水平的表达,并采用四甲基偶氮唑蓝显色法(MTT)、集落形成实验观察细胞生长变化。**结果** pSi-EGFR可显著抑制A549细胞中EGFR基因的表达;转染pSi-EGFR细胞生长抑制率为67.8%,集落形成抑制率为59.4%。**结论** pSi-EGFR载体能够在A549细胞中引发RNA干扰(RNAi)效应下调EGFR基因表达来抑制细胞增殖。

关键词:表皮生长因子受体;RNA干扰;肺腺癌;细胞;生长
中图法分类号:Q782;Q786;R73-362 **文献标识码**:A

Construction of small interfering RNA expression vector targeting EGFR gene and its biologic effects

BAI Li, ZHU Rong, CHEN Zhi-hong, BAI Chun-xue, GAO Lei, ZHANG Xin (Department of Respiratory Diseases, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of small interference RNA (siRNA) expression vectors targeting epidermal growth factor receptor (pSi-EGFR) on suppressing the expression of EGFR gene in human lung adenocarcinoma cell strain A549. **Methods** A549 cells were transfected with pSi-EGFR vectors by lipofectamine 2000. The expressions of EGFR mRNA and protein were detected by real time fluorescence quantitative PCR, immunofluorescence and flow cytometry respectively. MTT and colony formation assay were used to measure cell growth. **Results** pSi-EGFR vectors suppressed the expression of EGFR gene significantly, as compared with that of negative control [(0.31 ± 0.17) *vs* (4.41 ± 0.92), $P<0.001$], and the inhibition rate of EGFR mRNA expression was 93%. The expression of EGFR protein by immunofluorescence was enhanced in non-transfected group, significantly decreased in pSi-EGFR group, and of no changes in pSi-nonspecific group. The amount of EGFR expression by flow cytometry was (111.8 ± 11.2), (116.5 ± 12.1), (12.6 ± 3.2) in non-transfected group, pSi-nonspecific group and pSi-EGFR group respectively, and pSi-EGFR group was lower by 88.7% as compared with non-transfected group ($P<0.001$). Cell growth and colony formation of pSi-EGFR geroup were inhibited by 67.8% and 59.4% respectively, as compared with non-transfected group. **Conclusion** pSi-EGFR vectors can inhibit the A549 cell growth by inducing the effects of RNA interference (RNAi).

Key words: epidermal growth factor receptor; RNA interference; lung adenocarcinoma; cell; growth

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)是一种具有酪氨酸激酶活性的膜表面传感器,广泛表达于人体的表皮细胞和基质细胞,并在包括非小细胞肺癌在内的多种上皮源性肿瘤中存在高表达[1]。已证实EGFR的高表达与肿瘤恶性程度、易转移、放化疗敏感度下降密切相关,许多阻滞和下调EGFR的方法被用来抑制肿瘤增殖以改善预后,因此EGFR目前成为公认的肿瘤基因治疗的重要靶点[2]。

基金项目:上海市科委重大科技攻关项目(04DZ19208)
Supported by the Key Sci & Tech Research Project of Scientific Committee of Shanghai (04DZ19208)
作者简介:白 莉(1975-),女,山西省晋城市人,博士,主治医师,主要从事肺癌发生分子机制和治疗方面的研究。电话:(021)64041990-2445
通讯作者:白春学,E-mail:cxbai@zshospital.com
收稿日期:2005-07-08;**修回日期**:2005-10-11

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是新近发现的一种由双链 RNA 引发的特异性高效基因表达抑制途径,与传统的反义技术相比,RNAi 能够更高效、更特异的抑制靶基因表达,产生类似基因敲除的效果[3]。siRNA(short interference RNA, siRNA)是 RNAi 发挥作用的中间效应分子,本实验拟采用靶向 EGFR 基因构建 siRNA 表达载体,并探讨这一载体是否能在人肺腺癌细胞株 A549 细胞中引发 RNAi 效应阻抑 EGFR 基因表达及其生物学效应,期望为开发基于 RNAi 的抗肿瘤药物提供新策略。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

pSilencer2. 1-U6 载体(美国 Ambion 公司);*Eco*R Ⅰ、*Bam*H Ⅰ、*Hind*Ⅲ(美国 MBI 公司);T_4 DNA 连接酶(美国 MBI 公司);小鼠抗人 anti-EGFR(中国科学院上海细胞生物研究所);FITC 标记兔抗小鼠 IgG、Cy3-标记兔抗小鼠 IgG(武汉博士德公司);Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司);EGFR 和 GAPDH 特异性探针和引物序列、标准品(上海奇诺肿瘤生物高新技术有限公司)。

1.2 靶向 EGFR 基因 siRNA 表达载体的构建

1.2.1 短发夹 RNA 结构 DNA 表达模板的设计 利用美国 Dharmacon 公司 siRNA 在线设计软件,获得靶向 EGFR 基因的 siRNA 特异性序列:正义链:5′-GGAGCUGCCCAUGAGAAAU-3′;反义链:5′-AUUUCUCAUGGGCAGCUCC-3′;以此序列为基础,中间加入 TTCAAGAGA 茎环序列将其分隔为反向重复序列,两端加上 *Bam*H Ⅰ和 *Hind*Ⅲ酶切位点,并以 polyT 作为转录终止子,序列全长为 63 bp,送上海生物工程公司合成。

1.2.2 质粒构建 将合成的短发夹 RNA 结构表达模板退火成双链,T_4 连接酶将其定向克隆至线性化的 pSilencer2. 1-U6 Neo 载体载体中,转化至感受态菌 JM109,经氨苄青霉素筛选、酶切鉴定,最后进行测序确认,命名为 pSi2. 1-EGFR。Ambion 公司提供阴性对照质粒,其中含无关序列短发夹 RNA 表达模板,命名为 pSi2. 1-nonspecific。

1.3 细胞培养和基因转染

人肺腺癌细胞株 A549 购自中国科学院上海细胞生物研究所。采用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基,置 37℃,5% CO_2 细胞培养箱常规培养,每 3 d 更换培养液,细胞长满时,以 0.25% 胰酶消化传代。按 Lipofectamine2000 说明书进行转染。实验分为以下 3 组:未转染组;转染 pSi2. 1-nonspecific 组;转染 pSi2. 1-EGFR 组。转染后的细胞加入 400 μg/ml G418 筛选,经 14 d 后形成阳性克隆,扩增培养备用。

1.4 实时定量荧光 PCR 检测 EGFR 基因 mRNA 水平表达

Tripure 试剂盒提取总 RNA,凝胶电泳判断无降解,紫外分光光度计测定纯度并定量,吸光度 $D(260)/D(280)$ 比值均在 1.80 左右。取 2 μg 总 RNA 进行逆转录后各取 2 μl 行 PCR 反应,GAPDH 为内参照,采用 Taqman 技术进行检测。EGFR 和 GAPDH 特异性探针和引物序列及标准品由上海奇诺肿瘤生物高新技术有限公司提供,EGFR 上游引物:5′-CCCAGGGACTGCGTCTCT-3′;下游引物:5′-CACTCTGGGTGGCACTGTATG-3′;探针序列:5′-FAM-CCGGAATGTCAGCCGAGGCAG-TAMERA-3′。GAPDH 上游引物:5′-GGAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3′;下游引物:5′-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3′;探针序列:5′-FAM-TTGGTCGTATTGGGCGCCTGGTTAMERA-3′。在 ABI7000 仪器上进行 PCR 反应,扩增条件:50 ℃保温 3 min;95 ℃变性 5 min;95 ℃ 20 s,60 ℃ 60 s,40 个循环;37 ℃保温 10 min。采用 ABI Prism 7000 SDS Software 对其结果进行分析,计算 EGFR 拷贝数 $\times 10^3$/GAPDH 拷贝数,以此反映 EGFR mRNA 的表达水平。

1.5 免疫荧光法检测 EGFR 蛋白表达

取出盖玻片上用于免疫荧光检测的各组细胞,0.01 mol/L PBS 漂洗 2 次,4% 多聚甲醛固定 20 min;加入一抗小鼠抗人 EGFR(1∶50)37 ℃孵育 1 h;PBS 漂洗 3×5 min;加 FITC 标记二抗 37 ℃避光孵育 1 h;PBS 漂洗 3×5 min;50% 缓和甘油封片,荧光显微镜观察、照相。

1.6 流式细胞仪检测 EGFR 表达数量

取各组约 1×10^5 细胞制备成单细胞悬液,4% 多聚甲醛固定 20 min;加入小鼠抗人 EGFR 一抗 37 ℃孵育 1 h;0.01 mol/L PBS 漂洗;加入 Cy3 标记的兔抗小鼠 IgG,37 ℃避光孵育 1 h,PBS 漂洗,离心,400 μl PBS 重悬,送流式细胞仪检测。EGFR 数量以流式细胞仪检测阳性细胞率与平均荧光强度的乘积来表示。

1.7 细胞生长曲线测定

采用 MTT 法。将对数生长期的各组细胞以 0.5×10^4/孔接种于 96 孔培养板,培养 1 ~ 7 d,设置 3 个平行孔。收获细胞前 4 h,每孔加入 5 mg/ml MTT 20 μl,继续培养 4 h 后弃培养基,每孔加入二甲基亚砜(DMSO)150 μl,室温下振荡 10 min。应用酶标仪,在 570/690 nm 波长测吸光度值。以时间为横轴,细胞吸光度为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.8 集落形成实验

将各组细胞制成单细胞悬液,接种于 6 cm 培养皿,接种密度为 500/皿,加入培养液 8 ml,连续培养 9 d,去除培养液,0.01 mol/L PBS 液漂洗,95% 乙醇固定 10 min,Gimsa 染色 5 min,自来水冲洗,晾干,记录直径大于 0.5 mm 的集落数量,计算集落抑制率。集落形成抑制率% =(对照组集落形成数 - 实验组集落形成数)/对照组集落形成数 ×100%。

1.9 统计学分析

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件进行方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 靶向 EGFR 基因 siRNA 表达质粒的鉴定

2.1.1 质粒的酶切鉴定 根据 pSi 质粒图谱分析,因插入的片段在 *Bam*H Ⅰ和 *Hind*Ⅲ酶切位点之间,*Eco*R Ⅰ酶切位点位于 *Bam*H Ⅰ上游,若插入成功,经 *Eco*R Ⅰ + *Bam*H Ⅰ双酶切后获得 4 187 bp和334 bp 两条带;经 *Eco*R Ⅰ + *Hind*Ⅲ双酶切后获得 4 125 bp和 396 bp 两条带,电泳后出现的两条短片段应分别

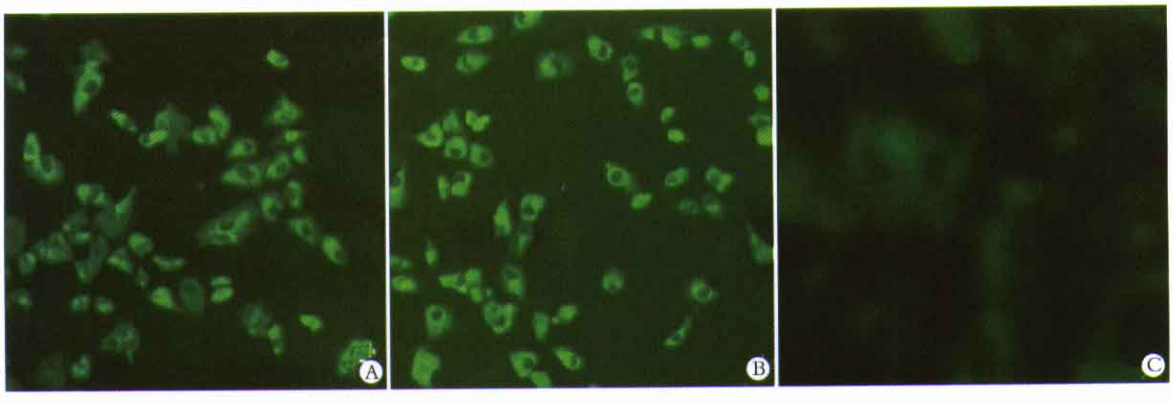
334 bp 和 396 bp，相差的大小正好是插入片段的长度。而未插入片段的线性化 pSi 质粒分别经 *Eco*R Ⅰ + *Bam*H Ⅰ 双酶切及 *Eco*R Ⅰ + *Hind* Ⅲ 双酶切后获得的短片段大小相等均为 334 bp。本实验将获得的阳性细菌克隆扩增后并提取纯化质粒后，进行酶切的片段与预期结果相符。

2.1.2　质粒的测序结果　　将酶切符合实验结果的质粒进行测序，结果证明其中插入片段完全正确。

2.2　转染 pSi2.1-EGFR 后细胞中 EGFR 表达变化

2.2.1　EGFR mRNA 表达变化　　实时荧光定量 PCR 检测结果显示，与未转染组 EGFR mRNA 表达水平（4.41 ± 0.92）相比，转染 pSi2.1-EGFR 组 EGFR mRNA 表达量（0.31 ± 0.17）显著降低（$P < 0.01$），EGFR mRNA 表达的抑制率达 93%；转染 pSi2.1-nonspecific 组 EGFR mRNA 表达量（3.11 ± 0.81）与未转染组无显著差异（$P > 0.05$）。

2.2.2　免疫荧光检测细胞中 EGFR 蛋白表达　　未转染组荧光着色较强，主要分布于细胞膜和胞浆中，转染 pSi2.1-EGFR 组细胞荧光强度明显降低，而转染 pSi2.1-nonspecific 组细胞荧光强度无明显变化，见图 1。

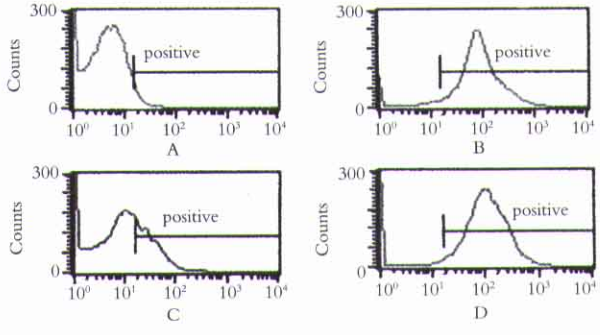


A：Non-transfected group；B：pSi2.1-nonspecific group；C：pSi2.1-EGFR group

图 1　荧光显微镜下观察 EGFR 表达　（×200）

Fig 1　Expression of EGFR protein under fluorescence microscope　（×200）

2.2.3　流式细胞仪检测 EGFR 表达数量　　结果见图 2，未转染组、转染 pSi2.1-nonspecific 组、转染 pSi2.1-EGFR 组 EGFR 表达量分别为（111.8 ± 11.2）、（116.5 ± 12.1）、（12.6 ± 3.2）；与未转染组相比，转染 pSi2.1-EGFR 质粒组 EGFR 数量减少了 88.7%（$P < 0.01$），转染 pSi2.1-nonspectic 质粒组 EGFR 数量降低了 4.2%（$P > 0.05$）。



A：Negative control；B：Non-transfected group；C：pSi2.1-EGFR transfected group；D：pSi2.1-nonspecific transfected group

图 2　流式细胞仪检测 EGFR 表达数量

Fig 2　Expression of EGFR protein by flow cytometry

2.3　细胞生长检测

根据 MTT 比色法结果绘制的生长曲线（图 3），可见 pSi2.1-EGFR 转染组细胞生长明显受到抑制，而 pSi2.1-nonspecific 组细胞生长无明显影响。根据公式：细胞生长抑制率（%）=［对照组（*D*570）－实验组（*D*570）］/对照组（*D*570）× 100%，计算第 5 天的抑制率为 67.8%。

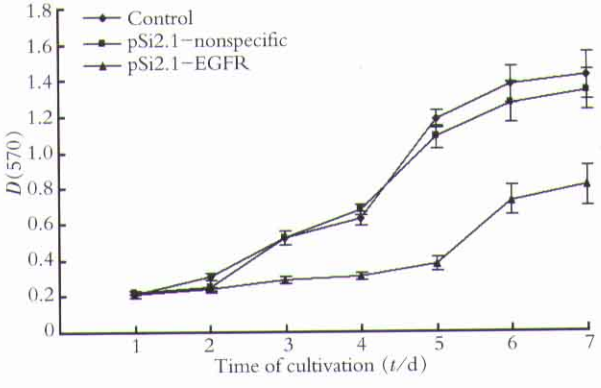


图 3　转染前后 A549 细胞的生长曲线

Fig 3　Growth curve of A549 cells before and after transfection

2.4　集落形成实验

集落分析结果显示，未转染组、转染 pSi2.1-nonspecific 组、转染 pSi2.1-EGFR 组集落形成数分别为（153 ± 13）、（136 ± 6）、（62 ± 6）。转染 pSi2.1-nonspecific 组集落形成数较未转染组细胞无显著差异（$P > 0.05$）；而转染 pSi2.1-EGFR 组集落形成较未转染组细胞显著降低（$P < 0.01$），集落形成抑制率为 59.4%。

3　讨论

表皮生长因子受体（epidermal growth factor recep-

tor, EGFR)是原癌基因 C-erbB-1 编码的膜糖蛋白,由细胞外区、跨膜区和细胞内区组成,其细胞外区与配体表皮生长因子、转化生长因子 α 结合后经跨膜区激活胞内区的酪氨酸激酶,进而通过酪氨酸激酶的级联反应将刺激信号传递至细胞核,促进基因转录,最终参与调控细胞的分化、增殖、凋亡等多种生物学行为[1]。研究表明 EGFR 在人类多种上皮源性肿瘤如非小细胞肺癌、结肠癌、胃癌、肝癌、头颈部癌中存在过度表达,且与肿瘤的恶性程度、转移、放化疗敏感度下降及预后密切相关,因此 EGFR 已成为肿瘤基因治疗的一个重要靶位[4]。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是新近发现的一种由双链 RNA(dsRNA)引发的特异性高效基因表达抑制途径,是转录后基因沉默(posttranscriptional gene silencing, PTGS)的重要机制。RNAi 作用通过 dsRNA 被细胞内核酸酶切割成 21 ~25 核苷酸(nt)的干扰性小 RNA(siRNA)片段,由 siRNA 介导识别细胞内同源性靶基因 mRNA 分子,在 RNA 诱导沉默复合体(RNA induced silencing complex, RISC)作用下切割相应的靶基因 mRNA,阻断翻译过程从而发挥基因沉默效果[5]。近年来这一技术发展迅速,目前已成为基因功能研究的强大工具,并在疾病如艾滋病、白血病和肿瘤的基因治疗中取得了巨大进展[6-8]。RNAi 对基因表达的沉默效应除取决于靶序列位点的选择外,同时也取决于目的基因编码蛋白的半衰期和合成速率,而 EGFR 基因合成速度较快,且合成的蛋白表达相对稳定,RNAi 是否能有效的抑制 EGFR 基因表达尚缺乏此类证据。

本实验以 EGFR 基因为靶位,选用美国 Ambion 公司 pSilencer2.1-U6 载体,其原理是采用人 U6 启动子在体内表达短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA),shRNA 随后在细胞中降解为类似 siRNA 的分子,引发 RNAi 过程[9, 10]。根据设计的 siRNA 序列合成 shRNA 的 DNA 表达模板,序列长度为 63 bp,插入到 pSilencer2.1-U6载体中,成功构建出靶向 EGFR 基因的siRNA表达载体。美国 Ambion 公司提供的载体为线性化载体,连接效率较高,且易筛选出阳性克隆;但由于载体中有发夹结构形成,测序过程中往往会遇到困难,本实验通过重复双向测序才获得测序结果。

利用脂质体 Lipofectamine2000 将构建的靶向 EGFR 基因的 siRNA 表达载体(pSi2.1-EGFR)导入肺腺癌细胞株 A549 中,筛选稳定转染细胞克隆,设立无关序列的 siRNA 表达载体转染组作为阴性对照,结果显示 pSi2.1-EGFR 载体能显著抑制 EGFR 基因 mRNA 和蛋白水平表达,抑制率分别达到 93% 和 88.7%;在 EGFR 基因受到抑制的同时,细胞生长明显受到抑制。本研究结果充分说明 siRNA 序列选择合理,且 pSi2.1-EGFR 载体能够有效在 A549 细胞中引发 RNAi 效应,通过下调 EGFR 基因表达阻断其介导的细胞内信号通路,最终达到抑制肿瘤细胞增殖的目的,证明将 RNAi 技术用于以 EGFR 基因为靶点的肿瘤治疗研究具有一定的可行性。

另外本实验显示瞬时转染该质粒对 EGFR mRNA 和蛋白表达抑制效率在 50% 左右,考虑可能是由于转染效率较低所致,因此下一步实验中拟通过优化转染条件,观察瞬时转染 pSi2.1-EGFR 质粒对 EGFR 基因表达调控的时间效应和剂量效应关系,同时拟多选几个序列进行筛选,以获得抑制作用更强的序列,并进一步从体内外实验评价 siRNA 表达载体对 EGFR 基因的抑制效应和抗肿瘤效应,从而为开发基于 RNAi 的抗肿瘤药物提供新策略。

参考文献:

[1] Marmor M D, Skaria K B, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 58(3): 903 -913.

[2] Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities[J]. Eur J Cancer, 2001, 37(Suppl 4): S3 -S8.

[3] Rye P D, Stigbrand T. Interfering with cancer: a brief outline of advances in RNA interference in oncology[J]. Tumour Biol, 2004, 25(5 -6): 329 -336.

[4] Hirsch F R, Witta S. Biomarkers for prediction of sensitivity to EGFR inhibitors in non-small cell lung cancer[J]. Curr Opin Oncol, 2005, 17(2): 118 -122.

[5] Verma N K, Dey C S. RNA-mediated gene silencing: mechanisms and its therapeutic applications[J]. J Clin Pharm Ther, 2004, 29(5): 395 -404.

[6] Tan F L, Yin J Q. RNAi, a new therapeutic strategy against viral infection[J]. Cell Res, 2004, 14(6): 460 -466.

[7] Pomerantz R J. RNA interference: a potential novel therapeutic combating HIV-1 in the central nervous system[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2004, 52(6): 401 -409.

[8] Yano J, Hirabayashi K, Nakagawa S, *et al*. Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(22): 7721 -7726.

[9] Wadhwa R, Kaul S C, Miyagishi M, *et al*. Vectors for RNA interference[J]. Curr Opin Mol Ther, 2004, 6(4): 367 -372.

[10] Nahreini P, Hanson A J, Andreatta C P, *et al*. Altering cellular signaling pathways enhance gene silencing activity of shRNA, shRNA. ribozyme, and shRNA. antisense in neuroblastoma cells[J]. Cell Mol Neurobiol, 2004, 24(6): 781 -792.

(编辑 张大春)