论著

文章编号:1000-5404(2008)02-0170-04

TSG101-siRNA 对肝癌耐药细胞株 QGY/CDDP 的逆转作用

向 征,张才全,汤为学 (重庆医科大学附属第一医院普通外科,重庆市普通外科学重点实验室,重庆 400016)

摘 要:**目的** 构建 TSG101(tumor susceptibility gene101)小干扰 RNA(TSG101-siRNA)的真核表达载体,观察 RNA 干扰沉默 TSG101 基因后化疗药物顺铂(CDDP)对肝癌耐药细胞株 QGY/CDDP 增殖的影响。**方法** 根据小干扰 RNA 的设计原则由计算机软件辅助设计 TSG101 的靶序列,应用 DNA 重组技术将目的序列克隆入小干扰 RNA 的表达载体;RT-PCR 检测 TSG101-siRNA 对 QGY/CDDP 细胞 tsg101mRNA 表达的影响;Western blot 检测 TSG101-siRNA 对 TSG101 基因表达蛋白的抑制效率;采用 MTT 法测定 TSG101-siRNA 联合化疗药物 CDDP 对 QGY/CDDP 的增殖抑制作用。**结果** 测序显示干扰载体构建成功,TSG101-siRNA 能抑制 tsg101mRNA 表达,使 QGY/CDDP 细胞 TSG101 蛋白的表达下降,抑制 QGY/CDDP 细胞的增殖,明显增强 CDDP 对 QGY/CDDP 的增殖抑制。**结论** TSG101-siRNA 的真核表达载体能有效地抑制 QGY/CDDP 细胞的增殖,提高化疗药物 CDDP 对 QGY/CDDP 的抑制率,能逆转肝癌耐药细胞株 QGY/CDDP 对 CDDP 的耐药性。

关键词:肝癌;耐药;小干扰 RNA;TSG101

中图法分类号:R394-33;R73-362;R735.7 **文献标识码**:A

Effect of tumor susceptibitity gene 101-siRNA eukaryotic expression vector and cisplatin on proliferation of QGY/CDDP

XIANG Zheng, ZHANG Cai-quan, TANG Wei-xue (Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of General Surgery, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To construct the eukaryotic expression plasmids of tumor susceptibitity gene(TSG) 101-siRNA and investigate the effect of RNA interference targeting tsg101 gene and cisplatin on liver cancer resistant strain QGY/CDDP. Methods The targeting fragments specifically against TSG101 were designed according to the principle of small interfering RNA designation using computer software. The sequences were cloned into siRNA expression plasmids through DNA recombinant technology. The expressions of tsg101mRNA and TSG101 after TSG101-siRNA transfection was detected by RT-PCR and Western blot respectively. MTT test were applied to measure the proliferation of QGY/CDDP strain. Results The fragments of interest were obtained by digestion and further confirmed by DNA sequencing. TSG101-siRNA inhibited the expressions of tsg101mRNA and TSG101 and the proliferation of QGY/CDDP, especially in combination with cisplatin. Conclusion The eukaryotic expression vector of TSG101-siRNA combined with cisplatin inhibits the proliferation of QGY/CDDP and increases the sensitivity of liver cancer resistant strain QGY/CDDP to chemotherapy.

Key words: liver cancer; multidrug resistance; small interfering RNA; TSG101 gene

肿瘤是多基因、多因素疾病,是多个基因相互作用的基因网络调控的结果,是具有无限生长的克隆选择的结果。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)相关技术作为一种基因沉默的新工具,能够同时抑制多个不同基因,而且抑制效果互不干扰,能够快速、高效、特异地抑制靶基因表达,适用于各种生物[1]。人肝癌细胞恶性程度高,化疗作用有效率低,一直是困扰临床抗癌治疗的难题。本实验选用 TSG101 基因编码区序列,构建小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)重组质粒载体,转染耐药的肝癌细胞株 QGY/CDDP,联合化疗药物顺铂(cisplatin, CDDP),研究其对耐药肿瘤细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

编码 $shRNA_S$ 质粒表达载体 pGenSil-1 购于武汉晶赛生物工程技术有限公司,寡核苷酸由北京三博生物技术有限公司合成,*Bam*HⅠ及 *Hind*Ⅲ内切酶购自东洋仿(上海)生物科技有限

作者简介:向 征,男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事消化道肿瘤的基础和临床方面的研究。电话:(023)89011014,E-mail:xzly@medmail.com.cn.

收稿日期:2007-10-26;修回日期:2007-11-14

公司,凝胶回收试验盒为 Omega 公司生产(美国)。所有测序反应在上海生工完成。TSG101(M-19)抗体购自 Santa Cruz 公司。脂质体转染试剂 Tfx™ Reagent 和 Reverse Transcription System 使用 Promega 产品。无内毒素质粒大提试剂盒使用 TIANGEN 产品。硝酸纤维素滤膜为 Sigma 公司产品。DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2　TSG101-siRNA 真核表达载体的构建

设计中将潜在的序列和相应的人类基因组数据库进行比较,排除那些和其他编码序列或表达序列标签(expressed sequence tags, EST)同源的序列,同时剔除掉有可能引起免疫反应的序列,共设计 3 条寡核苷酸,2 条为有效序列,1 条为无关对照,序列如:$siRNA_1$:5′-AGTAGCCCGAGGTTGATAAA-3′;$siRNA_2$:5′-CCTAACTGTACGTGAAACT-3′;$siRNA_N$:5′-ACTACCGTTGTATAGGTGT-3′(无关对照)。根据 siRNA 表达载体的要求合成具有回文结构的长链寡核苷酸:$siRNA_1$ 正向序列:5′-GATCGAGTAGCCGAGGTTGATAAATTCAAGACGTT-TATCAACCTCGGCTACTTTTTTTA-3′;$siRNA_2$ 正向序列:5′-GATCCCTAACTGTACGTGAAACTTTCAAGACGAGTTTCACGTACAGTTAGGTTTTTTA-3′;$siRNA_N$正向序列:5′-GATCCACTACCGTTGTATAGGTGTTCAAGAGACACCTATAACAACGGTAGTTTTTTGG-3′。载体质粒的酶切和回收操作按照胶回收试剂盒说明。每个连接产物挑取 3 个单克隆菌落,抽提质粒后,送测序。

1.3　细胞培养及转染

细胞系为人肝癌细胞株 QGY/CDDP,由本校超声研究所赠送,生长在含 10% 灭活小牛血清的 1640(HyClone)培养基中,于 37 ℃,5% CO_2 条件下培养,细胞培养液中加入 CDDP 0.05 μg/ml 以维持其相应的耐药表型。实验前无药培养 1 周,取对数生长期细胞,按 Tfx™ Reagent(Promega,E2391)脂质体转染操作手册进行转染,转染 48 h 后收获细胞进行实验。

1.4　RT-PCR 实验检测 TSG101 mRNA

实验分 4 组细胞,分别为 QGY/CDDP、QGY/CDDP + $TSG101\text{-}siRNA_N$、QGY/CDDP + $TSG101\text{-}siRNA_1$ 和 QGY/CDDP + $TSG101\text{-}siRNA_2$ 组,从未转染和转染 TSG101-siRNA 48 h 后的细胞中提取细胞总 RNA,按逆转录(RT)试剂盒(Promega 产品)说明进行逆转录合成 cDNA。聚合酶链(PCR)反应,上游引物:5′-ATCCCTGTGCCTTATAGAGG-3′,下游引物:5′-AACGGGTAACCATCTCTTCC-3′,扩增片段约为 654 bp。PCR 反应体系 20 μl,反应条件:95 ℃ 5 min,95 ℃变性 50 s,58 ℃退火 50 s,72 ℃延伸 50 s,28 个循环,末次延伸 10 min。实验以 GAPDH 为内参照,其上游引物:5′-CGACCACTTTGTCAAGCTCA-3′,下游引物:5′-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3′,扩增片段约为 223 bp。扩增产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶中电泳观察。

1.5　Western blot 检测 TSG101 蛋白表达

实验分组同 1.4,未转染和转染 TSG101-siRNA 48 h 后的细胞加入 300 μl RIPA 蛋白提取液提取细胞总蛋白,煮沸 5 min 并离心,测定蛋白浓度后取 20 μg 蛋白于含 0.1% SDS 的不连续缓冲系统中电泳并电转移至硝酸纤维素膜,用 5% 脱脂奶粉(5 g 脱脂奶粉溶入 100 ml 0.01 mol/L PBS 中)封闭硝酸纤维素膜 1h 后,TBST(25 mmol/L Tris,0.01 mol/L PBS,0.1% Tween-20)漂洗膜 3 次,每次 10 min。将膜与特异性第一抗体(1∶1 000)4 ℃条件下共孵育过夜,TBST 漂洗。特异性辣根过氧化酶标记的第二抗体(1∶2 000)室温孵育 1 h,TBST 漂洗 3 次后行增强化学发光。

1.6　MTT 比色法[2] 检测抑制细胞增殖作用

未转染和转染 $TSG101\text{-}siRNA_N$ 和 $TSG101\text{-}siRNA_1$ 48 h 后收集细胞,制备成细胞数为 $5\times10^4\,ml^{-1}$ 的细胞悬液,接种于 96 孔培养板中,每孔 200 μl。实验设 3 组:QGY/CDDP 组,QGY/CDDP + $TSG101\text{-}siRNA_N$ 和 QGY/CDDP + $TSG101\text{-}siRNA_1$ 组。每组又分为试剂对照行、未加药对照行及 5 个加药实验行,每行设 8 个平行孔,5 个加药实验行加入 20 μl/孔顺铂,使其终浓度分别为 0.125、0.25、0.5、1、2 μmol/L。于 37 ℃、5% CO_2 条件下培养,48 h 后加 MTT(5 mg/ml)20 μl,继续培养 4 h 后在自动酶标读数仪上的 570 nm 波长测定各孔吸光度值 $D(570)$,计算顺铂对各组细胞的抑制率。

抑制率 = [1 − 实验组平均 $D(570)$ 值/细胞对照组平均 $D(570)$ 值] × 100%

1.7　统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两样本均数比较采用成组 t 检验,计数资料比较采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　TSG101-siRNA 重组质粒的测序鉴定

质粒载体含有与预期设计一致的干扰序列片段,测序结果 100% 吻合,显示干扰载体构建成功。RNAi 载体图谱见图 1。

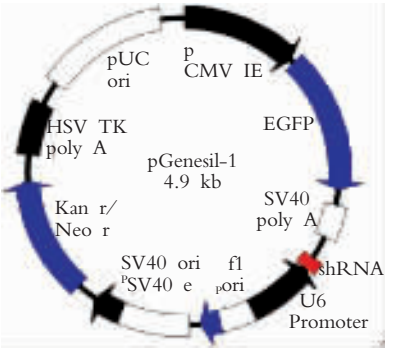


图 1　RNAi 载体图谱

2.2　稳定转染 QKY/CDDP 细胞株的筛选

TSG101-siRNA 采用脂质体 Tfx™-20 转染,转染 48 h 后在荧光显微镜下观察 80% 细胞有绿色荧光表达(图 2)。

2.3　转染后 QGY/CDDP 细胞内 tsg101 mRNA 的表达

转染 siRNA 对 QGY/CDDP 细胞 tsg101 mRNA 的表达有抑制(图 3)。$TSG101\text{-}siRNA_N$ 对 tsg101 mRNA 的表达无明显的抑制,表达强度是对照组的97.7%;$TSG101\text{-}siRNA_1$ 对 tsg101 mRNA 的表达有抑制,表达强度是对照组的 72.8%;$TSG101\text{-}siRNA_2$ 对 tsg101 mRNA 的表达抑制较弱,表达强度是对照组的 90.3%。

2.4　转染 siRNA 细胞株 TSG101 蛋白的表达

Western blot 结果显示,QGY/CDDP 高表达 TSG101 蛋白,转染无关序列对照干扰载体($siRNA_N$)对靶蛋白表达没有明显影响,而 $TSG101\text{-}siRNA_1$ 转染可显著使靶蛋白表达下降,表达强度仅为对照组的 36.2%。$TSG101\text{-}siRNA_2$ 干扰载体也能抑制靶

蛋白的表达,但干扰效果不太理想,表达强度为对照组的74.3%(图4)。

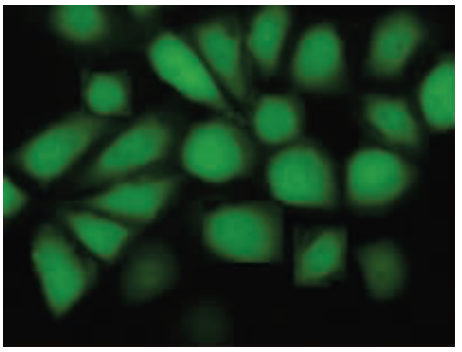
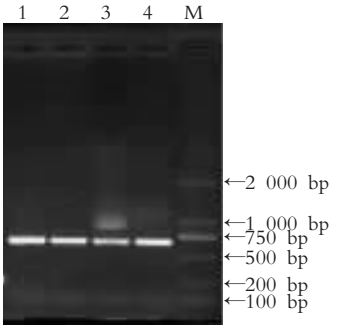
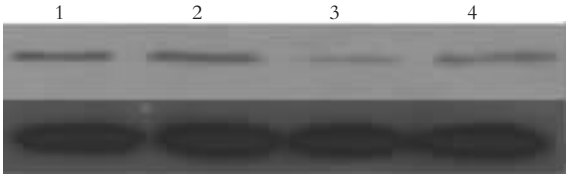


图2 TSG101-siRNA$_1$转染QGY/CDDP细胞株后的绿色荧光表达(荧光显微镜×400)



1:QGY/CDDP 对照; 2:QGY/CDDP + siRNA$_N$; 3:QGY/CDDP + siRNA$_1$; 4:QGY/CDDP + siRNA$_2$; M:DNA 标准(DL 2000)

图3 转染siRNA对QGY/CDDP细胞tsg101 mRNA表达的影响



1:QGY/CDDP 对照; 2:QGY/CDDP + siRNA$_N$; 3:QGY/CDDP + siRNA$_1$; 4:QGY/CDDP + siRNA$_2$

图4 转染siRNA对TSG101蛋白表达的影响

2.5 转染siRNA对QGY/CDDP细胞增殖的影响

转染TSG101-siRNA$_1$的QGY/CDDP细胞对化疗药物顺铂抑制细胞生长的作用明显增强,QGY/CDDP细胞对各药物浓度的顺铂的抑制率均小于50%,表明耐药细胞具有较强的抗药性;转染TSG101-siRNA$_1$后其对细胞的抑制率增强,两者相比差异具有显著性($P<0.05$)(表1)。

3 讨论

RNAi技术是近几年发展起来的一项特异性抑制基因表达的新方法。siRNA操作的简单性和对靶基因表达抑制的高效性使其成为基因功能研究的有力手段,从而为肿瘤等人类疾病基因治疗带来新的方法。RNAi现象的机制与内源性RNA降解有关[3],siRNA介导同源mRNA降解包括起始阶段和效应阶段,使用小量的双链RNA(double strain RNA, dsRNA)也能够使大量的靶RNA沉默,沉默信号可以遍及整个机体,且可以遗传给下一代。在RNAi途径中可能存在信号扩增的步骤,复制外源注入的dsRNA从而产生更多的siRNA,或者直接扩增siRNA本身。另外,siRNA除了导致mRNA降解外,还可以导致对应的DNA甲基化。这一过程扩大了原有的甲基化,加强了基因沉默效应[4]。

TSG101基因最初由Li等[5]在1996年通过一种新的方法即随机纯合子敲除法在小鼠细胞内发现,把敲除该基因获得的转化克隆置于0.5%琼脂中,生长后移植于裸鼠体内,形成了转移瘤,因此认为破坏该基因的纯合子功能可以导致细胞发生转化。恢复该基因的功能,细胞则恢复正常生长。此基因被命名为肿瘤易感基因101(tumor susceptibility gene 101,TSG101)。人的TSG 101基因(hTSG101)定位于染色体11p15.1~2区,与小鼠TSG101基因cDNA有86%的同源,全长1 494 bp,有6个外显子,包括一段1 140 bp长的开放阅读框。Zhu等[6]用RNA干扰技术使前列腺癌PC3细胞株和乳腺癌MDA-MB-231细胞株的TSG101蛋白水平得以下调,导致部分细胞阻滞在G_1到S期的边界,减少了G_2期经过有丝分裂返回G_1期的细胞比率,并减弱了两种细胞株的集落形成能力,认为TSG101蛋白水平下调对肿瘤细胞生长具有负面影响。Shen等[7]将体外构建的TSG101 siRNA真核表达载体转染于对长春新碱耐药的胃癌SGC-7901细胞后发现,TSG101的表达明显下调,且增加了所转染细胞对长春新碱和阿霉素的敏感性。结果表明,TSG101基因可能与胃癌的多药耐药有关。

表1 RNA干扰CDDP作用下QGY/CDDP细胞抑制率的影响

CDDP(μg/ml)	QGY/CDDP		QGY/CDDP + siRNA$_N$		QGY/CDDP + TSG101 + siRNA$_1$	
	D(570)	抑制率($\bar{x}\pm s$)%	D(570)	抑制率($\bar{x}\pm s$)%	D(570)	抑制率($\bar{x}\pm s$)%
0	1.110 7±0.001 0		1.109 0±0.001 1		0.855 0±0.002 7	
0.125	0.956 0±0.001 2	0.139 3±0.001 3	0.949 3±0.003 2	0.144 0±0.000 7	0.633 7±0.003 6	0.258 8±0.001 6[a]
0.25	0.840 1±0.002 2	0.243 6±0.000 6	0.838 3±0.001 2	0.244 1±0.002 0	0.528 9±0.002 7	0.381 4±0.001 7[a]
0.5	0.757 2±0.003 0	0.318 3±0.002 3	0.756 6±0.005 0	0.317 8±0.003 3	0.433 2±0.001 8	0.493 3±0.002 6[a]
1	0.668 3±0.001 7	0.398 3±0.001 6	0.656 5±0.003 2	0.408 0±0.001 7	0.345 3±0.004 3	0.596 1±0.002 8[a]
2	0.560 3±0.001 3	0.495 5±0.001 3	0.551 3±0.003 2	0.502 9±0.001 2	0.255 0±0.002 0	0.701 8±0.003 1[a]

a: $P<0.05$,与相同浓度CDDP以及GT/CDDP细胞比较

肿瘤的多药耐药是导致化疗效果不满意、有效率低的一个原因。本实验中成功地构建了TSG101基因的小干扰RNA(TSG101-siRNA)的真核表达载体,并成功转染于QGY/CDDP细胞,RT-PCR实验结果表明TSG101-siRNA能有效抑制TSG101基因的转录,阻断mRNA向蛋白质的信息传导,进而达到对目的蛋白表达的抑制。通过Western blot实验,我们观察到其对TSG101基因蛋白表达有明显的下调作用,MTT检测结果显示TSG101-siRNA$_1$对转染的QGY/CDDP细胞的增殖有抑制作用,对各种药物浓度顺铂的反应性明显增强,加强了化疗药物对细胞增殖的抑制作用,逆转QGY/CDDP对顺铂的耐药性。

总之,通过成功构建TSG101-siRNA表达载体,沉默TSG101基因后,能逆转QGY/CDDP对顺铂的耐药性,发现TSG101基因与肝癌细胞株QGY/CDDP的耐药相关。

参考文献:

[1] Gupta S, Schoer R A, Egan J E, *et al*. Inducible, reversible, and stable RNA interference in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(7): 1927-1932.

[2] 向 征, 张才全, 汤为学. 奥沙利铂抗人结肠癌细胞株HT29增殖及其机制的研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(7): 606-609.

[3] Fresno-Vara J A, Casado E, De-Castro J, *et al*. PI3K/Akt signalling pathway and cancer[J]. Cancer Treat Rev, 2004, 30(2): 193-204.

[4] Bergstrom C T, McKittrick E, Antia R. Mathematical models of RNA silencing: unidirectional amplification limits accidental self-directed reactions[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(20): 11511-11516.

[5] Li L, Cohen S N. Tsg101: a novel tumor susceptibility gene isolated by controlled homozygous functional knockout of allelic loci in mammalian cells[J]. Cell, 1996, 85(3): 319-329.

[6] Zhu G, Gilchrist R, Borley N, *et al*. Reduction of TSG101 protein has a negative impact on tumor cell growth[J]. Int J Cancer, 2004, 109(4): 541-547.

[7] Shen H, Pan Y, Han Z, *et al*. Reversal of multidrug resistance of gastric cancer cells by downregulation of TSG101 with TSG101siRNA[J]. Cancer Biol Ther, 2004, 3(6): 561-565.

(编辑 龙 亮)

文章编号:1000-5404(2008)02-0173-01

个案与短篇

垂体促甲状腺素瘤1例

张星光,吕肖锋,焦秀敏 (北京军区总医院内分泌科,北京 100700)

垂体促甲状腺素(thyroid-stimulating hormone,TSH)瘤是一种罕见的垂体肿瘤。我院确诊垂体TSH瘤1例,现报告如下。

1 临床资料

患者,男性,18岁,以"间断性头痛、视力下降2个月"于2006-04-12入院。患者入院2个月前出现头痛症状,呈间断性,可自行缓解,无发热、恶心、呕吐、抽搐及肢体功能障碍,伴右眼视力减退。查体:体温36.2 ℃,脉搏96次/min,呼吸18次/min,血压115/70 mmHg。神志清楚,语言功能无障碍。视力:左眼1.2,右眼0.15,视野粗测正常。心率96次/min,律齐,肺、腹未见明确异常,腋毛及阴毛明显减少。双下肢无浮肿。神经系统无明显阳性体征。甲状腺功能检查结果:TSH 7.8(0.35~5.50) μIU/ml,FT_3 4.8(2.3~4.2) pg/ml, FT_4 2.69(0.89~1.76) ng/dl。头颅CT可见直径约3.0 cm略高密度影。诊断:垂体瘤。2006-04-21行全麻下经额颞入路开颅垂体瘤切除术。术后病理免疫组化:TSH(+)。最后诊断:垂体促甲状腺素(TSH)瘤。

作者简介:张星光,男,吉林省榆树市人,硕士,主治医师,主要从事糖尿病大血管并发症及骨质疏松发病机制方面的研究,发表论文7篇。
E-mail:star88@126.com

收稿日期:2007-08-30;修回日期:2007-11-20

2 结果

患者术后精神、饮食差,考虑为垂体功能低下。甲状腺功能检查结果:TSH 0.29(0.35~5.50) μIU/ml,TT_3 0.19(0.61~1.81) ng/ml, TT_4 5.7(4.5~10.9) μg/dl, FT_3 1.16(2.3~4.2) pg/ml, FT_4 0.73(0.89~1.76) ng/dl。皮质醇节律正常,给予甲状腺片20 mg,1次/d,口服。患者病情逐步平稳,精神、饮食恢复,于2006-05-08好转出院。

3 讨论

垂体TSH瘤是罕见的垂体糖蛋白激素分泌瘤。垂体TSH瘤可发生于任何年龄,无性别差异,占垂体腺瘤的比例不到1%,总体人群发病率约为百万分之一[1]。本病在临床上大多的症状和体征与Graves病相似,多数患者病程较长,抗甲状腺药物疗效差,经常误诊为Graves病,但一般无突眼及胫前黏液水肿。国外文献[2]报道,与Graves病不同,94%的垂体TSH患者有甲状腺肿大,甲状腺球蛋白抗体和过氧化酶抗体出现较少,仅有8%,74例中仅有3例出现TSH受体抗体,突眼的发生率也较低,约占6%。垂体TSH瘤临床诊断主要条件:抗甲状

(下转178页)