文章编号:1000-5404(2009)12-1151-04

论著

人 Snail 基因 RNAi 慢病毒载体对鼻咽癌 5-8F 细胞增殖和侵袭的影响

陈 丽,刘求真,邱际华,焦 锋,姚开泰 (南方医科大学肿瘤研究所,广州 510515)

摘 要:目的 构建人 Snail 基因慢病毒干扰载体及观察干扰前后对鼻咽癌 5-8F 细胞增殖和侵袭的影响。**方法** 设计 Snail 基因特异性 RNAi 靶序列,克隆至经双酶切后的 plVTHM 线性化载体,测序鉴定正确后,用病毒上清感染鼻咽癌细胞 5-8F,流式细胞仪分选获得稳定干扰 Snail 基因的细胞亚系。荧光定量 PCR 检测 mRNA 表达情况;MTT 法和体外侵袭实验分别测定对细胞增殖和侵袭的影响。**结果** plVTHM-siSnail 慢病毒干扰载体构建正确。荧光定量 PCR 结果表明分选后的细胞 Snail mRNA 水平表达显著降低。干扰后的细胞增殖减慢,穿透基膜的细胞数量减少,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** plVTHM-siSnail 表达质粒可显著下调 Snail 基因在 5-8F 中的表达,在一定程度上抑制鼻咽癌细胞的增殖和侵袭。

关键词: Snail; RNA 干扰; 鼻咽癌;增殖;侵袭
中图法分类号: R394.3;R73-362;R739.63 **文献标识码**: A

Lentiviral vector for RNA interference of human Snail gene inhibits proliferation and invasion of nasopharyngeal carcinoma 5-8F cell line

CHEN Li, LIU Qiu-zhen, QIU Ji-hua, JIAO Feng, YAO Kai-tai (Institute of Cancer Research, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To construct a recombinant lentiviral expression vector for RNA interference (RNAi) of human Snail gene and to study its effects on the proliferation and invasion of nasopharyngeal carcinoma cell line 5-8F. **Methods** The effective sequence of short hairpin RNAs (shRNA) targeting Snail gene was designed and cloned into the linear pLVTHM vector after enzyme digestion. After confirmation by DNA sequencing, 5-8F cells were infected with the viral supernatants. The cells with stable Snail gene knock-down were separated by fluorescence activated cell sorter (FASC). The expression of Snail mRNA was detected by real time RT-PCR. MTT and cell invasion assay were used to detect the proliferation and invasion of 5-8F cells after plVTHM-siSnail transfection. **Results** The lentivirus vector plVTHM-siSnail was constructed successfully. The separated 5-8F-plVTHM-siSnail exhibited significant knock-down of Snail mRNA expression. Slower proliferation and decreased cells to permeate through the Matrigel were found after plVTHM-siSnail transfection ($P<0.05$). **Conclusion** plVTHM-siSnail vector could down-regulate Snail gene expression in human nasopharyngeal carcinoma 5-8F cells and suppress its invasion and proliferation to some extent.

Key words: Snail; RNA interference; nasopharyngeal carcinoma; proliferation; invasion

Snail 是一种锌指蛋白转录因子,可以介导上皮细胞向间充质细胞的转化,在转录水平抑制 E-钙粘蛋白(E-cadherin)的表达,促进肿瘤的侵袭和复发转移[1]。鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma,NPC)是我国南方及东南亚地区常见的一种恶性肿瘤。鼻咽癌起病隐匿,转移早,易复发,因此探索鼻咽癌病因及其癌变的分子机制具有重要意义[2]。本研究通过 RNA 干扰的方法高效、特异性地抑制 Snail 基因表达并建立稳定干扰的鼻咽癌细胞亚系,进一步观察 Snail 基因表达沉默后对鼻咽癌细胞增殖和侵袭的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

慢病毒包装系统(由本所肖广惠教授惠赠)包括 plVTHM、psPAX2 和 pMD2.G 3 种质粒。*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、T_4 DNA 连接酶、限制性内切酶、DNA marker、质粒小量提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒均购自大连宝生物(TaKaRa)工程有

基金项目:广东省科技计划项目(2007B031515006)
Supported by the Planned Science and Technology Project of Guangdong Province(2007B031515006)
作者简介:陈 丽,女,湖北省随州市人,硕士研究生,主要从事肿瘤转移机制方面的研究。电话:(020)62789443,E-mail: gmyychl@163.com
通信作者:姚开泰,电话:(020)61648225,E-mail:ktyao@fimmu.com
收稿日期:2009-02-12;**修回日期**:2009-03-25

限公司;质粒中量提取试剂盒购自 Qiagen 公司;Boyden 小室购自美国 Chemicon 公司,其他常规试剂均购自北京鼎国生物技术有限公司;大肠杆菌 JM109、病毒包装细胞 293FT 和鼻咽癌细胞株 5-8F 均由本室保存。

1.2 构建表达 shRNA 慢病毒表达载体

根据人类 Snail mRNA 结构(NM_005985),并参照文献[3]已经证实确实有效的干扰序列分别合成针对 Snail mRNA 及阴性对照(不针对任何已知人 mRNA)的寡核苷酸正负链各 1 对,分别在 Snail 正义链 P1、反义链 P2 和阴性对照正义链 P3、反义链 P4 的 5′端引入 *Mlu* Ⅰ和 *Cla* Ⅰ的酶切位点,引物由上海英骏技术有限公司公司合成:Snail P1:5′-CGCGTCGGCCTAACTACAGCGAGCTGTTCAAGAGACAGCTCGCTGTAGTTAGGCTTTTTGGCCAT-3′, P2:5′-CGATGGCCAAAAAGCCTAACTACAGCGAGCTGTCTCTTGAACAGCTCGCTGTAGTTAGGCCGA-3′;阴性对照 P3:5′-CGCGTCGGTATTGCCTAGCATTACGTTTCAAGAGAACGTAATGCTAGGCAATACTTTTTGGCCAT-3′, P4:5′-CGATGGCCAAAAAGTATTGCCTAGCATTACGTTCTCTTGAAACGTAATGCTAGGCAATACCGA-3′;经退火形成双链 DNA,与经 *Mlu* Ⅰ和 *Cla* Ⅰ双酶切后的 pLVTHM 载体连接,转化 JM109 大肠杆菌,挑取重组阳性克隆行 PCR 及测序鉴定(北京六合华大基因科技股份有限公司)。PCR 鉴定阳性克隆的引物:上游引物 5′-GTGTCACTAGGCGGGAACAC-3′;下游引物 5′-TTATTCCCATGCGACGGTATC-3′。

1.3 细胞转染

取对数生长期的 293FT 细胞,以 2×10^6 的细胞数接种于 10 cm 培养皿,于 37 ℃、5% CO_2 培养 24 h,细胞密度达 60% ~ 70% 时加 Opti-MEM-Lipofectamine™ 2000 脂质体复合物和质粒 DNA。转染分为 2 组:阳性组(plVTHM-siSnail)和阴性对照组(plVTHM-control)。48 ~ 72 h 后收集病毒上清液,于 4 ℃ 4 000 × *g* 离心 10 min,再用直径为 0.45 μm 的滤膜过滤后,上清分装,用于病毒滴度测定和细胞转染。

1.4 流式细胞仪分选稳定干扰 Snail 的鼻咽癌细胞株

将含有 Snail 干扰片段的慢病毒(plVTHM-siSnail)和阴性对照慢病毒(plVTHM-control)分别感染 5-8F 细胞,病毒感染的同时加入工作液浓度为 6 μg/μl 的聚凝胺(polybrene)以增加感染效率,次日去除含病毒的培养基,更换为完全培养基,感染 48 h 后荧光显微镜下观察 GFP 的发光情况。由于载体 plVTHM 只带有绿色荧光标记(GFP)而不带抗性标记,因而本研究依据 GFP 标记,采用流式细胞仪(BD FACSAria™,美国 BD 公司)的分选技术(fluorescence activated cell sorter,FASC)获得 GFP^+ 细胞。

1.5 荧光定量 PCR

待细胞长至状态良好,铺满瓶壁后,用冰预冷的 PBS 洗 2 遍,用 TRIzol 试剂常规提取细胞总 RNA。按照 TaKaRa(PrimeScript™RT Reagent Kit)逆转录试剂盒操作程序进行逆转录反应,RNA 的量为 2 μl,引物为 Oligo dT Primer、Random 6 mers,反应条件为:37 ℃ 15 min、85 ℃ 5 s。Snail 上游引物:5′-CACTATGCCGCGCTCTTTC-3′,下游引物:5′-GGTCGTAGGGCTGCTGGAA-3′,扩增片段 175 bp,以 GAPDH 基因为内对照,扩增产物 222 bp,上游引物:5′-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3′,下游引物:5′-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3′。将反应管置于 Stratgene Mx3000P Real Time PCR 反应仪中,反应条件为 95 ℃ 10 s、95 ℃ 5 s、57 ℃ 30 s,45 个循环,荧光信号监测。定量的方法以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$(Ct 代表循环阈值)表示基因的表达量,以 5-8F - PLVTHM-control 细胞为对照细胞,公式如下,实验重复 3 次。

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{Snail} - Ct_{GAPDH})_{5\text{-}8F\text{-}pLVTHM\text{-}siSnail} - (Ct_{Snail} - Ct_{GAPDH})_{5\text{-}8F\ -\ pLVTHM\text{-}control}$$

1.6 MTT 比色实验

以每孔 800 个细胞接种于 96 孔培养板中,每孔体积 200 μl,每组 3 孔,分别培养 1、2、3、4、5、6、7 d。每孔加入 5 mg/ml 的四氮唑蓝盐(MTT)20 μl,37 ℃培养 4 h 后终止培养,小心吸弃孔内培养基,加入二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)150 μl,室温振荡器振荡 10 min,使结晶物充分溶解,酶标仪(Biotek 公司)上 490 nm 测定各孔吸光度值[*D*(490)值],以相对应吸光度比值表示细胞增殖能力大小,各组取 3 孔平均值,绘制增殖曲线。

1.7 Boyden 小室体外侵袭实验

实验前在 Boyden 小室的内室中加 300 μl 无血清培养基,置于培养箱中孵育 1 ~ 2 h。胰酶消化细胞制成单细胞悬液,无血清培养基洗涤 2 次,细胞计数,调整细胞浓度为(0.5 ~ 1.0)$\times10^6$/ml。吸出内室中培养基后,加 300 μl 细胞悬液于内室,然后加 500 μl 完全培养基于下室,37 ℃培养 18 h。取出小室,用棉签轻轻擦掉未穿过膜的细胞,然后将小室浸入 Giemsa 染液中染色 20 min,用蒸馏水轻轻地冲洗数次,空气中风干。显微镜下选取 5 个高倍视野计数穿过基膜的细胞数。

1.8 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 重组质粒的 PCR 鉴定及测序鉴定

重组质粒转化 JM109 大肠杆菌,挑取克隆,行 PCR 鉴定阳性克隆。重组细菌克隆的 PCR 产物 275 bp(插入片段为 65 bp),以经双酶切后没有插入片段的 pLVTHM 空载体 PCR 产物 210 bp 为对照,鉴定结果与预期相符。测序结果表明合成的 Snail shRNA 寡核苷酸链和阴性对照序列插入正确。

2.2 流式细胞仪分选获得 GFP^+ 细胞

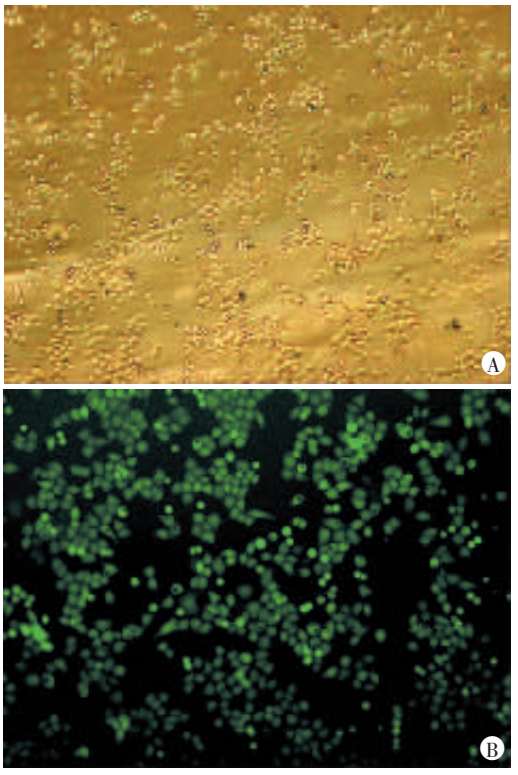
将包装产生的 2 种慢病毒分别感染 5-8F 细胞,72 h 后荧光显微镜下观察到 5-8F-pLVTHM-control 和 5-8F-pLVTHM-siSnail 均发出绿色荧光,继而采用流式细胞仪分选获得 GFP^+ 细胞(图 1)。

2.3 荧光定量 PCR 检测

荧光定量 PCR 的结果显示,干扰前后的细胞熔解曲线分析未见杂峰,说明扩增产物单一特异,没有非特异性扩增(图 2)。通过公式计算发现干扰后的细胞 Snail 基因表达量仅为阴性对照的 11.3%,即干扰效率为 88.7%。

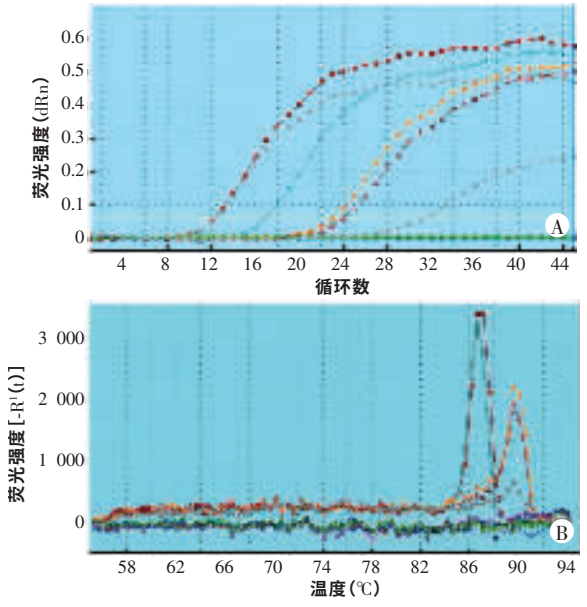
2.4 MTT 法检测细胞体外增殖能力的影响

检测 3 组细胞的体外增殖能力发现,5-8F 和 5-8F-pLVTHM-control 的 *D*(490)值逐渐增大,但其差异无统计学意义($P>0.05$)。而 5-8F-pLVTHM-siSnail 细胞的增殖速度显著慢于上述 2 种细胞,随着时间的延长,这种抑制作用更加显著($P<0.05$)(图 3)。



A：分选后细胞的普通光学显微镜下成像；B：相同视野，荧光显微镜下观察可见大部分的细胞表达绿色荧光蛋白

图 1　流式细胞仪分选后的 5-8F-pLVTHM-siSnail 细胞的光镜与荧光显微镜观察（×40）

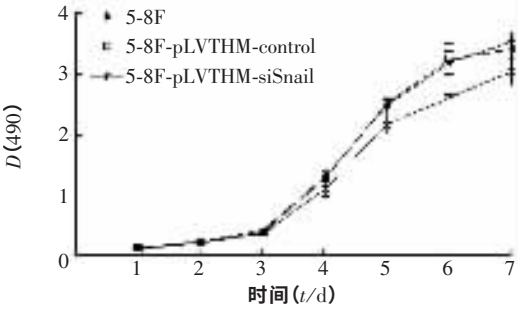


A：5-8F、5-8F-pLVTHM-control 及 5-8F-pLVTHM-siSnail 的扩增曲线；B：3 种细胞的熔解曲线显示 Snail 及 GAPDH 基因呈单峰

图 2　荧光定量 PCR 检测 Snail 基因干扰效率

2.5　Boyden 小室检测体外侵袭能力

Boyden 小室检测结果显示在肿瘤细胞侵袭 18 h 后，3 组细胞均穿透基底膜向下侵袭。5-8F-pLVTHM-siSnail 穿过基底膜的细胞数（54.4 ± 5.0）明显少于 5-8F 的细胞数（82.6 ± 7.4）和 5-8F-pLVTHM-control 的穿膜细胞数（79.4 ± 7.0）（$P < 0.01$），其体外侵袭能力明显降低。



$P < 0.05$，4 d 后 3 种细胞的组间比较

图 3　3 种细胞的体外生长曲线

3　讨论

上皮细胞间质转化（epithelial-mesenchymal transition，EMT）是一种哺乳动物胚胎发育过程中必需的生理现象，越来越多的研究表明它与上皮细胞恶性肿瘤的发生和发展关系密切，受到了高度的关注[4,5]。事实上，Snail 已被证明与上皮性肿瘤进展过程中触发 EMT 有关，是 EMT 发生的关键点。Snail 是存在于果蝇、鼠、人等生物体内的一种碱性螺旋-环-螺旋（basic helix-loop-helix，bHLH）转录因子，属于锌指蛋白家族成员。人 Snail 基因位于染色体 20q13.1-q13.2，编码由 264 个氨基酸组成的，相对分子质量为 29×10^3 的蛋白质[6]。目前已有研究表明，Snail 高表达于许多原发肿瘤，如乳腺癌、胃癌、结肠癌、肝癌、卵巢癌、头颈部鳞状细胞癌等[7]。Snail 的表达与 E-cadherin 的减少或缺失相关，而且充当 E-cadherin 转录的直接抑制子[8]。Zhang 等[9]的研究发现 Snail 诱导 EMT，反义 Snail 阻止 EMT 的发生。在原位异种移植物模型，腺病毒介导的反义 Snail 抑制肿瘤的淋巴结转移，延长宿主的生存期，因此认为抑制 Snail 可作为预防肿瘤转移的一个新的靶点。而 Olmeda 等[10]用 shRNA 沉默 Snail 后导致乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 的间充质表型减少，体外侵袭能力减弱，且体内实验证实肿瘤的发生率及生长速度大大减弱，增强了对化疗药物的敏感性。

鼻咽癌在我国南方及东南亚地区高发，其早期症状不明显，易发生淋巴结转移。鼻咽癌的浸润和转移是否通过诱导 Snail 和 EMT 而发生，是否其上下游还存在更为特异的和鼻咽癌细胞 EMT 及侵袭有关的因子，目前都少见报道，其发生转移的作用机制和信号通路也不是很清楚。这些问题的解决都依赖于 Snail 稳定干扰鼻咽癌细胞株的获得及其干扰后相关功能和细胞因子的检测。

因此，本实验以慢病毒为载体，用鼻咽癌低分化高转移潜能的 5-8F 细胞为研究对象，成功构建了特

异性干扰 Snail 基因的慢病毒表达载体，分选出稳定干扰人鼻咽癌 5-8F 细胞 Snail 基因的细胞亚型。由于载体 plVTHM 只带有绿色荧光标记(GFP)而不带抗性标记，因而病毒感染后稳定细胞株的建立不能采用常规的抗生素筛选单克隆的方法。本研究依据 GFP 标记，采用流式细胞仪的分选技术获得 GFP^+ 细胞，荧光定量 PCR 验证了重组质粒能有效抑制 Snail mRNA。然后观察其增殖及体外侵袭能力的变化。实验结果表明，与 5-8F 和 5-8F-pLVTHM-control 相比，干扰后的细胞增殖速度显著减慢，侵袭能力减弱，进一步证明了 Snail 基因与鼻咽癌的增殖和转移存在密切关系，为后续研究众多细胞因子的改变及相关信号转导通路奠定基础。

参考文献：

[1] Cano A, Perez-Moreno M A, Rodrigo I, *et al*. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression[J]. Nat Cell Biol, 2000, 2(2): 76－83.
[2] 邱际华，刘求真，陈 丽，等. CXCR4/SDF-1 对鼻咽癌细胞增殖与迁移能力的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(7): 598－600
[3] Zhuo W, Wang Y, Zhuo X, *et al*. Knockdown of Snail, a novel zinc finger transcription factor, via RNA interference increases A549 cell sensitivity to cisplatin via JNK/mitochondrial pathway[J]. Lung Cancer, 2008, 62(1): 8－14.
[4] 卞修武. 对肿瘤研究前沿之肿瘤干细胞的几点认识[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(11): 995－997.
[5] Hugo H, Ackland M L, Blick T, *et al*. Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression[J]. J Cell Physiol, 2007, 213(2): 374－383.
[6] Paznekas W A, Okajima K, Schertzer M, *et al*. Genomic organization, expression, and chromosome location of the human SNAIL gene (SNAI1) and a related processed pseudogene (SNAI1P)[J]. Genomics, 1999, 62(1): 42－49.
[7] Becker K F, Rosivatz E, Blechschmidt K, *et al*. Analysis of the E-cadherin repressor Snail in primary human cancers[J]. Cells Tissues Organs, 2007, 185(1－3): 204－212.
[8] Blanco M J, Moreno-Bueno G, Sarrio D, *et al*. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas[J]. Oncogene, 2002, 21(20): 3241－3246.
[9] Zhang A, Chen G, Meng L, *et al*. Antisense-Snail transfer inhibits tumor metastasis by inducing E-cadherin expression[J]. Anticancer Res, 2008, 28(2A): 621－628.
[10] Olmeda D, Montes A, Moreno-Bueno G, *et al*. Snai1 and Snai2 collaborate on tumor growth and metastasis properties of mouse skin carcinoma cell lines[J]. Oncogene, 2008, 27(34): 4690－4701.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2009)12-1154-01

21 例腹腔镜肝切除术的围手术期护理

曹 永,谭 平,郑树国 (第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038)

肝脏由于质地脆而易碎，血供丰富，腔镜下手术显露、止血困难，操作难度大等因素，被认为是腹腔镜外科的最后禁区[1]。我院腹腔镜肝胆胰外科技术中心自 2007 年 3 月 1 日至 6 月 30 日，对病变位于肝脏不同部位的 21 例患者施行了电视腹腔镜下肝切除术[2]，现将围手术期护理体会报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

患者共 21 例，男性 10 例，女性 11 例，中位年龄 49 (25～69) 岁。就诊原因：上腹胀痛不适 8 例，上腹触及包块 5 例，乙肝病史 5 例，查体发现肝脏占位 7 例。术前经 B 超检查初步确定为肝脏占位性病变，CT 进一步明确病变部位、性质以及与血管、胆管关系。术前初步诊断：原发性肝癌 6 例，转移性肝癌 1 例，肝血管瘤 9 例，肝脏良性占位考虑腺瘤或局灶性结节增生 4 例，肝内胆管结石 1 例。肝功能 Child A 级 17 例，B 级 4 例，合并胆囊结石 2 例，慢性阑尾炎 1 例，慢性乙型肝炎、肝炎后肝硬化 5 例。肿瘤直径平均 7.4(1.5～13) cm，肿瘤标志物检测甲胎蛋白(AFP)明显增高 4 例。

1.2 手术方式

21 例中 2 例中转开腹，1 例改为手助式腹腔镜肝切除，其余 18 例在全腹腔镜下完成肝切除术。其中联合胆囊切除 3 例，阑尾切除 1 例，右肝肿瘤射频消融 1 例。

2 结果

手术平均时间 185(50～358) min，平均出血量 320(20～1 300) ml，全组患者无手术死亡，无胆漏、腹腔内出血、感染及肝衰等手术并发症发生，平均住院日 9(5～16) d。术后病理诊断：肝细胞癌 5 例，混合细胞性肝癌 1 例，转移性肝癌 1 例，肝血管瘤 9 例，肝腺瘤 2 例，肝局灶性结节增生 2 例，肝内胆管结石 1 例，合并肝炎后肝硬化者 5 例。

随访 2～6 个月，1 例左肝外叶及Ⅷ段多发性肝细胞癌患者行腔镜下左肝外叶切除及Ⅷ段射频消融术，术后 40 d 出现右肝后叶再发肝细胞癌，再次射频消融治疗。其余恶性肿瘤患者无复发，良性病变无症状再发。

(下转 1157 页)

作者简介：曹 永，女，重庆市人，护师，主要从事护理方面的研究。E-mail: caoyongingd3@sina.com
通信作者：郑树国，电话：(023)68765297，E-mail：Shuguozh@yahoo.com.cn
收稿日期：2008-09-01；修回日期：2009-03-31