文章编号:1000-5404(2010)13-1379-04

论著

GW112基因siRNA对人胃癌SGC-7901细胞体外增殖的影响

黄 轶[1,2], 杨梅华[3], 杨华安[4], 蒋 雪[2], 曾昭淳[2] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院临床分子医学中心[1];400016 重庆,重庆医科大学基础学院生物化学与分子生物学教研室[2];400037 重庆,第三军医大学新桥医院神经外科,全军癫痫病诊治中心[3];401120 重庆,重庆市渝北区人民医院泌尿外科[4])

[摘要] **目的** 构建靶向GW112 siRNA逆转录病毒载体并筛选特异高效的RNAi靶点,研究GW112基因沉默后对胃癌SGC-7901细胞体外增殖的影响。**方法** 应用逆转录病毒载体psilencer 5.1-H1 Retro构建针对GW112基因3个不同靶点的RNAi干扰载体-pSiRNA-GW112(pSi405-GW112, pSi1066-GW112, pSi1480-GW112),将脂质体法转染PT67细胞包装的病毒感染SGC-7901细胞,嘌呤霉素筛选稳定克隆,RT-PCR鉴定病毒整合,Real-time PCR筛选高效抑制靶点,CCK-8法检测对细胞体外增殖的影响。Western blot检测增殖细胞核抗原(PCNA)的表达。**结果** 测序结果证实各干扰靶点的重组逆转录病毒载体pSiRNA-GW112构建正确。RT-PCR结果显示除亲本细胞外,经各靶点病毒上清感染的细胞均能扩增出510 bp的Puro抗性基因片段。Real-Time PCR分析表明与SGC-7901亲本细胞组相比,7901-Si405,7901-Si1066及7901-Si1480组GW112的转录水平分别只有SGC-7901组的(15.50±0.01)%,(32.40±0.01)% 与(57.00±0.02)%。而7901-Sc组GW112表达基本无变化。Si405, Si1066与Si1480靶点的抑制率分别为84.5%,67.6%及43.0%。沉默GW112后导致SGC-7901细胞体外增殖能力显著抑制($P<0.05$),并伴随PCNA蛋白表达下调。**结论** 构建的重组逆转录病毒载体pSiRNA-GW112能显著抑制SGC-7901细胞的体外增殖能力,且这种增殖抑制与下调的PCNA表达有关。

[关键词] GW112基因;RNA干扰;逆转录病毒, 胃癌
[中图法分类号] R735.2; R394.3; R730.23 **[文献标志码]** A

Inhibitory effect of silencing GW112 siRNA gene on proliferation of human gastric SGC-7901 cell line

Huang Yi[1,2], Yang Meihua[3], Yang Hua'an[4], Jiang Xue[2], Zeng Zhaochun[2] ([1]Center for Clinic Molecular Medicine, College of Basic Medical Sciences, Children's Hospital, [2] Department of Biochemistry and Molecular Biology, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [3] Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [4]Department of Urinary Surgery, Yubei People's Hospital, Chongqing, 401120, China)

[Abstract] **Objective** To construct the small interfering RNA (siRNA) retrovirus vector targeting GW112 with a high specificity and to study the effect of silencing GW112 gene on the proliferation of gastric SGC-7901 cells. **Methods** Three recombinant RNAi interference vectors were constructed according to different GW112 targeting points (pSi405-GW112, pSi1066-GW112, pSi1480-GW112) using a retrovirus expression vector, psilencer 5.1-H1 Retro. SGC-7901 cells were infected with a packaged PT67 cells transfected with liposome. Stable clones were selected using puromycin. Integration of virus was identified by RT-PCR and highly inhibited targets were detected RT-PCR. The effect of GW112 on proliferation of gastric SGC-7901 cells was detected with CCK-8 kit. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was assayed by Western blotting. **Results** Sequence analysis showed recombinant retrovirus vector psiRNA-GW112 was successfully constructed. RT-PCR showed that except for parental cells, other SGC-7901 cells infected with virus supernatant could amplify anti-puromycin GW112 gene into a 510 bp fragment. The inhibitory efficacy was 84.5%, 67.6%, and 43.0%, respectively, for Si405, Si1066 and Si1480 respectively. Both the proliferation of gastric SGC-7901 cells and the expression of PCNA in SGC-7901 cells were significantly inhibited after GW112 was silenced. **Conclusion** The recombinant retrovirus vector, pSiRNA-GW112, can significantly inhibit the proliferation and expression of PCNA in SGC-7901 cells, indicating that GW112 plays an important role in proliferation of SGC-7901cells.

[Key words] GW112 gene; RNA interference; gastric cancer

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30701004). Corresponding author:Zeng Zhaochun,Tel: 86-23-68485398,E-mail: zengzc88@yahoo.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(30701004)
[通信作者] 曾昭淳, 电话:(023)68485398,E-mail:zengzc88@yahoo.com.cn

胃癌,一种常见的消化道恶性肿瘤,目前其治疗尤其是进展期治疗发展仍然缓慢。随着研究进展更多的与胃癌高表达分子被发现,为胃癌基因治疗提供了的新的候选靶点。GW112 又名 OLFM4, hGC-1,是一种新近发现在胃癌组织中高特异表达[1-3],且与嗅觉介导素相关的分泌性糖蛋白分子。研究显示 GW112 与肿瘤细胞的凋亡调控、细胞黏附及增殖等方面密切相关[4-6]。因其与正常胃黏膜组织以及癌旁组织相比,GW112 在胃癌组织表达具有高特异表达的特点以及具有分泌性表达的特性,有研究将 GW112 作为胃癌早期诊断、预后判断的一种血清学检测指标[7]。

尽管目前研究已经表明 GW112 过表达可促进鼠前列癌细胞体外快速增殖,加速裸鼠移植瘤生长。但上述部分功能的诠释并不是以胃癌细胞为研究对象获得的。迄今为止,GW112 高表达在胃癌发生、发展过程中的作用仍不清楚。本研究以胃癌细胞为研究对象,特异性的抑制 GW112 的表达研究其表达下调对胃癌细胞增殖的影响,为选择新的胃癌基因治疗性候选靶点提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

逆转录病毒 PT67 包装细胞,NIH3T3 细胞,人胃癌细胞株 SGC-7901,菌株 DH5α 为本室保存;逆转录病毒空载体 psilencer 5.1-H1 Retro 以及常用阴性对照 psilencer 5.1-H1-Scramble (pSc)载体为西南医院尹昌林博士惠赠。Tripure 及化学发光试剂盒为 Roche 公司产品,限制性内切酶 *Bam*HⅠ、*Hind*Ⅲ,DNA 聚合酶、RT-PCR 反转录 *Kit*、DNA Marker DL2000 购自大连 TaKaRa 公司,T_4 DNA 连接酶购自美国 NEB 公司,去内毒素超纯质粒提取 Kit 购自 Omega 公司。脂质体 Lipofection 2000 购自 Invitrogen 公司,嘌呤霉素(Puromycin)为 Amersco 产品;细胞增殖检测试剂 Cell Counting Kit-8(CCK-8)为日本同仁化学公司产品;蛋白抽提试剂 RIPA 购自上海申能博彩公司,细胞培养用 DMEM,胎牛血清为 TBD 公司产品,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 靶向 GW112 基因 siRNA 序列的设计与合成 根据 Ambion 公司提供的 shRNA 设计原则,应用该公司网上在线设计工具 www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html,选取针对 GW112(GenBank:NM006418.3)编码框内的 3 个阳性靶位,并经 Blast 分析排除与其他基因的同源性,茎环结构的设计所设计茎环结构序列长度为 59 bp 的反向重复序列,两端带有 *Bam*HⅠ、*Hind*Ⅲ酶切位点,中间被 5 bp 茎环结构分割。并以 6 个 T 作为 RNA 聚合酶的转录终止子,形成 *Bam*HⅠ + Sense + Loop + Antisense + 终止信号 + *Hind*Ⅲ的结构,送上海英骏公司合成。序列如下(正义链):Si405, 5′-GATCCACCTAACTGTCCGAATTGACCACCTCAATTCGGACAGTTAGGTTTTTTTGGAAA-3′; Si1066, 5′-GATCCGCACGATTGCTGTGACTCAACCACCTTGAGTCACAGCAATCGTGTTTTTGGAAA-3′; Si1480, 5′-GATCCGCGATGGTTACCTTCTGAATCCACCATTCAGAAGGTAACCATCGTTTTTGGAAA-3′。

1.2.2 重组逆转录病毒质粒的构建与鉴定 将合成的单链正义和反义 siRNA 转录模板退火形成 5′端和 3′端分别为 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ黏性末端的双链 DNA,与 psilencer 5.1-H1 Retro 质粒按 3∶1摩尔比混合后以 T_4 DNA 连接酶连接,得到阳性重组质粒 pSiRNA-GW112,转化感受态大肠杆菌 DH5α,氨苄青霉素筛选出阳性克隆,扩增后送上海英骏测序验证,测序正确的克隆分别命名为 pSi405-GW112、pSi1066- GW112 和 pSi1480-GW112。

1.2.3 逆转录病毒稳定产毒细胞筛选及病毒滴度的测定 参照文献[8]所述方法,将 pSiRNA-GW112 转染 PT67 细胞进行逆转录病毒稳定产毒细胞筛选及病毒滴度的测定。

1.2.4 逆转录病毒感染胃癌 SGC-7901 细胞及稳定克隆筛选 SGC-7901 细胞的感染步骤参照文献[8]进行。感染后细胞用含 1.0 μg/ml puromycin 的培养液筛选直至克隆形成,有限稀释法分离克隆。Tripure 法抽提各克隆总 RNA,RT-PCR 分析 Puro 基因表达。引物序列如下:上游 5′-CGAGGCAGCGCGGCTATCGT-3′,下游 5′-ACGTGCTCGCTCGATGCGAT-3′,扩增片段长 240 bp。反应条件为:94 ℃预变性 5 min,接由 94 ℃变性 1 min、52 ℃退火 50 s、72 ℃延伸 1 min 组成的 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。*puromycin* 基因扩增阳性的靶细胞克隆分别命名为 7901-Si405,7901-Si1066,7901-Si1480 以及 7901-Sc。

1.2.5 Real-time PCR 筛选高效干扰靶位 将 *puromycin* 基因 PCR 扩增阳性的各靶点 SGC-7901 细胞单克隆,按 5×10^5/孔接种于 6 孔板持续培养 24 h,Tripure 法提取上述克隆细胞总 RNA,以 β-actin 基因作为内参,每份标本均行 3 复孔在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪进行 GW112 mRNA 的表达分析。反应条件为 94 ℃ 30 s, 65 ℃ 30 s, 72 ℃ 45 s 收集荧光信号,共 45 循环,64 ℃行解链曲线分析扩增特异性。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法[9]比较 GW112 基因的表达差异:ΔCt 值 = 目的基因 Ct 值 − 内参基因 Ct 值;ΔΔCt 值 = 目的基因 ΔCt 值 − 内参基因 ΔCt 值[$\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的基因} - Ct_{\beta\text{-actin}})_{实验组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{\beta\text{-actin}})_{对照组}$]。

1.2.6 CCK-8 法检测细胞体外增殖速率 实验分为 7901-Si405 组、7901-Sc 组、SGC-7901 亲本细胞组($n=3$)。将细胞 3.0×10^4/ml 密度接种 96 孔细胞培养板,每组细胞设 3 个平行复孔,接种 24 h 后,参照 CCK-8 试剂使用说明,以无细胞的培养基为空白对照,分别测定细胞生长 1 ~ 6 d 时 450 nm 波长处的吸光密度值[$D(450)$],以时间为 X 轴,$D(450)$为 Y 轴,绘制细胞生长曲线。

1.2.7 Western blot 分析 参照 1.2.6 细胞分组,在 6 孔板内培养稳定转染后的细胞至 80% 汇合度,RIPA 法抽提细胞总蛋白。取 25 μg 蛋白行 PAGE 分离后,电转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭,加入 1∶700 稀释的鼠抗人 PCNA 抗体(Santa Cruz,sC-53407),以 1∶800 稀释的鼠抗人 β-actin (Santa Cruz, sC-47778)抗体为内对照,洗膜后 ECL 法显色。

1.3 统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组数据比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 pSiRNA-GW112 重组逆转录病毒质粒的鉴定

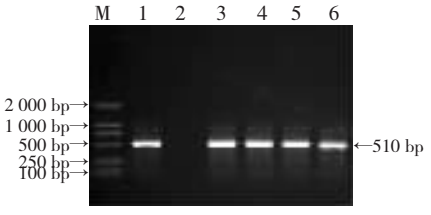
将合成的单链正义和反义 siRNA 转录模板退火后分别克隆入逆转录病毒载体 pSilencer 5.1-H1 Retro 的 *Bam*HⅠ与 *Hind*Ⅲ位点间，测序结果表明各靶点序列与设计序列完全一致且插入位点正确。

2.2 逆转录病毒稳定产毒细胞筛选及病毒滴度测定

各 RNAi 干扰靶点 PT67 产毒细胞分别随机挑选 1 个克隆，扩大培养收集病毒上清，经 NIH3T3 细胞进行病毒测定的滴度分别为 2.2×10^4 pfu/ml（PT67-Si405）、3.2×10^4 pfu/ml（PT67-Si1066）、5.0×10^4 pfu/ml（PT67-Si1480）、4.7×10^4 pfu/ml（PT67-Sc）。

2.3 病毒 DNA 在 SGC-7901 细胞中的整合鉴定

Tripure 法提取各稳定细胞克隆的总 RNA，RT-PCR 扩增嘌呤霉素抗性基因 *puromycin* 的表达。扩增结果如图 1 所示，除亲本细胞 SGC-7901 外，其余各靶点感染后筛选的稳定克隆株 7901-Si405，7901-Si1066，7901-Si1480 以及 7901-Sc 中，均能扩增出 510 bp 的 *puromycin* 基因片段，表明 siRNA 表达框成功整合入细胞的基因组 DNA 中。



M：DNA 标准（DL2000）；1：阳性对照；2：SGC-7901；3：7901-Si405；4：7901-Si1066；5：7901-Si1480；6：7901-Sc

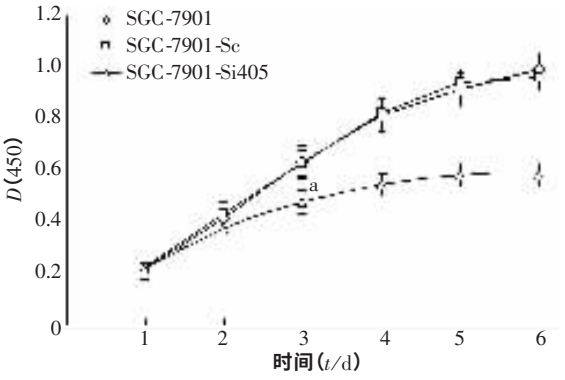
图 1 稳定表达各 RNAi 靶点细胞克隆中嘌呤霉素抗性基因的 RT-PCR 分析

2.4 GW112 各干扰靶点抑制效率的确定及高效靶点的筛选

应用 Real-time PCR 检测干扰靶点细胞中 GW112 的表达，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析比较 GW112 的相对表达丰度。结果表明，与亲本对照组相比，7901-Sc 阴性对照组 GW112 mRNA 水平基本无变化，7901-Si405，7901-Si1066，7901-Si1480 组 GW112 的转录水平分别只有 SGC-7901 组的（15.50±0.01）%，（32.40±0.01）%，（57.00±0.02）%，抑制率分别 84.5%，67.6% 及 43.0%。解链曲线分析表明 GW112 与 β-actin 为单一扩增峰，表明基因扩增的特异性。

2.5 GW112 基因沉默对胃癌 SGC-7901 细胞体外增殖的抑制作用

采用细胞计数试剂 CCK-8 试剂盒分别在 1～6 d，绘制 7901-Si405 组、7901-Sc 组、SGC-7901 细胞生长曲线。如图 2 所示，与 7901-Sc 对照组相比，3 组细胞在传代后第 1、2 天生长速率无显著变化，从第 3 天开始增殖细胞数显著减少（$P<0.05$），而 7901-Sc 与 SGC-7901 亲本细胞组细胞数无显著差异（$P>0.05$）。这表明 GW112 基因沉默能抑制胃癌 SGC-7901 细胞体外增殖。

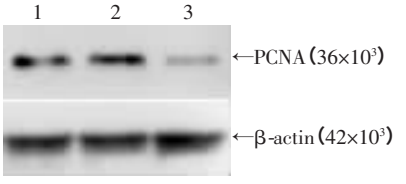


a：$P<0.05$，与 SGC-7901-Sc 组比较

图 2 RNAi 抑制 GW112 表达对 SGC-7901 细胞体外增殖的影响

2.6 GW112 基因沉默对 PCNA 蛋白表达的影响

经 Western blot 分析，SGC-7901 亲本细胞、7901-Sc 及 7901-Si405 3 组细胞 PCNA 蛋白表达如图 3。结果显示：PCNA 蛋白在 SGC-7901 细胞与 7901-Sc 组中表达基本一致，但在 7901-Si405 组中表达下调。这表明 GW112 基因沉默导致的 SGC-7901 细胞增殖抑制与 PCNA 的表达下调有关。



1：SGC-7901；2：7901-Sc；3：7901-Si405

图 3 RNAi 抑制 GW112 表达对 PCNA 蛋白表达的影响

3 讨论

随着一些胃癌高特异表达分子的逐步鉴定，针对这些分子进行功能研究从而寻找新的治疗性靶点已成为新的研究热点。近来研究发现，与癌旁组织及正常胃黏膜组织只有极低的表达丰度相比，GW112 在胃癌组织中表达的高度特异性并具有分泌性表达的特点已逐渐引起研究者的重视[1-6]。进一步研究发现，GW112 过表达可促肿瘤细胞生长[5]，与细胞外黏附分子 Lectins、Cadherin 相互作用有助于细胞黏附[6]；另 GW112 可与细胞死亡调控基因 GRIM-19 具有蛋白间的相互作用，减弱 GRIM-19 的凋亡促进效应，使其具有的“抗凋亡分子”的称谓[5]。上述研究表明 GW112 很可能作为一种促胃癌恶性发展的“癌基因”。

小干扰 RNA（small interfering RNA，siRNA），是近年来发现一类可以高效、特异地阻断体内同源基因表达小 RNA 分子，它可促使同源 mRNA 降解引起基因转录后沉默，被应用到多种肿瘤治疗性的实验研究[8-11]。以 GW112 为靶点，利用 RNAi 技术沉默其表

达观察对胃癌细胞恶性生物学行为如增殖效应的作用,可为证实 GW112 是否作为胃癌基因治疗性靶点提供实验依据。但在实际操作中 RNA 干扰作为一种科学研究或生物治疗手段,它的治疗效果直接受到 siRNA 在体内的稳定性、转导的组织特异性以及 siRNA 在肿瘤细胞中的转导效率的影响。除了增加 siRNA 的稳定性和转导的组织特异性以外,提高 SiRNA 的转导效率也非常关键[12]。由于逆转录病毒能够将外源基因有效整合入宿主细胞基因组中,持续、稳定而高效地表达目的基因的优势[13-15],

因此研究根据 RNAi 靶点设计原则,利用 H1 启动子驱动的逆转录病毒表达载体 pSilencer 5.1-H1 Retro 构建表达靶向 GW112 的 siRNA 逆转录病毒载体 pSiRNA-GW112 作为运送载体,利用其包装产生的逆转录病毒以增加其对肿瘤细胞的转导效率并延长其在体内的表达时间并从中筛选出高效的 RNAi 抑制靶点,达到持久、稳定地研究 RNAi 抑制 GW112 表达效果。由于目前还未出现针对 GW112 蛋白的商业化抗体,无法从蛋白水平验证其干扰效果;由此选择具有高特异性、高灵敏性,准确度高的实时定量 PCR 成为鉴定各干扰靶点的抑制效率则本研究的首选技术,这同时也是目前国外同行研究者研究 GW112 表达常用方法。由于 SYBR 和双链 DNA 的结合是非特异性的,在 PCR 反应过程中可能产生非特异产物、引物二聚体等均会形成类似的扩增曲线。为了使试验结果可信,减少系统误差,反应时同时进行了多复孔测试以及扩增产物的解链曲线分析。

在评估细胞体外增殖效应影响的过程中,我们选择了基于 WST-8 法的 CCK-8 试剂,因其具有快速、高灵敏度、低细胞毒性的优点,目前已用于替代普通的 MTT 法。我们的研究显示抑制 GW112 的表达对 SGC-7901 细胞体外增殖具有明显的抑制效应,从而初步提示 GW112 过表达在胃癌的快速增殖具有重要的作用。增殖细胞核抗原 PCNA 与细胞 DNA 合成关系密切,在细胞增殖的启动上起重要作用,是反映细胞增殖状态的良好指标,其合成水平反映了细胞增殖率及 DNA 合成率,与多种细胞周期调节因子密切相关,通过 Western blot 研究发现 GW112 基因沉默的 SGC-7901 细胞组 PCNA 的表达下调。这些结果提示 GW112 基因沉默抑制胃癌 SGC-7901 细胞体外增殖可能与 PCNA 的表达下调相关,但涉及何种信号转导机制需进一步深入。由于 GW112 在细胞黏附、凋亡调控也具有重要作用,在今后的研究中我们将进一步分析 GW112 的表达抑制对胃癌侵袭、凋亡的影响,以明确 GW112 在胃癌发生、发展中的作用。

参考文献:

[1] Yasui W, Oue N, Aung P P, *et al*. Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review[J]. Gastric Cancer, 2005, 8(2): 86-94.

[2] Aung P P, Oue N, Mitani Y, *et al*. Systematic search for gastric cancer-specific genes based on SAGE data: melanoma inhibitory activity and matrix metalloproteinase-10 are novel prognostic factors in patients with gastric cancer[J]. Oncogene, 2006, 25(17): 2546-2557.

[3] Oue N, Aung P P, Mitani Y, *et al*. Genes involved in invasion and metastasis of gastric cancer identified by array-based hybridization and serial analysis of gene expression [J]. Oncology, 2005, 69(Suppl 1): 17-22.

[4] Zhang J, Liu W L, Tang D C, *et al*. Identification and characterization of a novel member of olfactomedin-related protein family, hGC-1, expressed during myeloid lineage development[J]. Gene, 2002, 283(1/2): 83-93.

[5] Zhang X, Huang Q, Yang Z, *et al*. GW112, a novel antiapoptotic protein that promotes tumor growth [J]. Cancer Res, 2004, 64(7): 2474-2481.

[6] Liu W, Chen L, Zhu J, *et al*. The glycoprotein hGC-1 binds to cadherin and lectins [J]. Exp Cell Res, 2006, 312(10): 1785-1797.

[7] Oue N, Sentani K, Noguchi T, *et al*. Serum olfactomedin 4 (GW112, hGC-1) in combination with Reg IV is a highly sensitive biomarker for gastric cancer patients [J]. Int J Cancer, 2009, 125(10): 2383-2392.

[8] 尹昌林,吕胜青,黄轶, 等. pSiRNA-Notch1 逆转录病毒载体的构建及对恶性脑胶质瘤细胞的作用[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(12): 1211-1214.

[9] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method [J]. Methods, 2001,25(4): 402-408.

[10] 熊震,汤旭东, 房殿春, 等. 人肝素酶 RNAi 序列的筛选及鉴定[J].第三军医大学学报,2007,29(20): 1929-1932.

[11] 李戈,王明. 应用 RNAi 技术沉默 survivin 基因对肾癌 786-O 细胞的影响[J]. 第三军医大学学报,2009,31(24): 2444-2447.

[12] Taulli R, Accomero P, Follenzi A, *et al*. RNAi technology and lentiviral delivery as a powerful tool to suppress Tpr-Met-mediated tumorigenesis[J]. Cancer Gene Ther, 2005, 12(5): 456-463.

[13] 闫国和, 杨余亮, 侯爱莲, 等. PDGF-A 基因逆转录病毒载体的构建及其在猪骨髓间充质干细胞中表达的研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(21): 2024-2028.

[14] Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference [J]. Cancer Cell, 2002, 2(3): 243-247.

[15] 葛成国,靳风烁,李黔生,等. 过表达 Bcl-2 肾小管上皮细胞株的建立及 Bcl-2 逆转录病毒对抗肾小管-上皮细胞凋亡的研究[J]. 第三军医大学学报,2008,30(14): 1360-1363

(**收稿**:2010-01-12;**修回**:2010-02-25)

(编辑 王 红)