文章编号:1000-5404(2010)20-2177-04

论著

瘤内注射慢病毒载体介导的Bmi1-shRNA对A549皮下移植瘤的抑制作用

周 菁,徐 瑜,张明慧,胡义德 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军肿瘤诊治研究所)

【摘要】 **目的** 探讨瘤内注射慢病毒介导的原癌基因Bmi1的特异性短发夹RNA(Bmi1-shRNA)对人非小细胞肺癌免疫缺陷鼠皮下种植瘤生长的抑制作用。**方法** 建立NOD/SCID(非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷)小鼠人肺癌A549荷瘤模型,共27只,分为3组。其中治疗组移植瘤内注射含有Bmi1-shRNA的慢病毒载体,阴性对照组注射含有NC-shRNA的慢病毒载体,空白对照注射同剂量PBS。通过激光共聚焦观察移植瘤内绿色荧光蛋白(GFP)表达,RT-PCR、Western blot检测Bmi1 mRNA、蛋白水平的表达,观察RNA干扰效果,测量肿瘤体积,计算肿瘤抑制率。**结果** 将A549细胞移植到NOD/SCID鼠背部皮下,成瘤率为100%。激光共聚焦观察治疗组及阴性对照组皮下移植肿瘤组织中有GFP表达,而空白对照组未见GFP表达。治疗组NOD/SCID小鼠的肿瘤体积较阴性对照组和空白对照组显著缩小($P<0.05$),肿瘤抑制率分别为52.9%和57.9%。Bmi1-shRNA治疗组中的Bmi1蛋白明显降低,相对空白对照组和阴性对照组,蛋白表达抑制率分别为51.1%、50.3%,差异有显著性($P<0.05$)。**结论** 利用慢病毒载体成功将Bmi1-shRNA导入移植瘤细胞内,检测到Bmi1蛋白表达的下调,且Bmi1的下调能显著抑制A549小鼠移植瘤的生长。

【关键词】 非小细胞肺癌;肿瘤生长抑制;慢病毒载体;Bmi1
【中图法分类号】 R73-362;R734.2;R373 【文献标志码】 A

Intratumoral injection of recombinant lentivirus-mediated Bmi1-shRNA inhibits growth of A549 xenografts in mice

Zhou Jing, Xu Yu, Zhang Minghui, Hu Yide (Cancer Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the inhibitory effect of lentivirus-mediated Bmi1-shRNA on transplanted human non-small cell lung cancer (NSCLC) by intratumoral injection. **Methods** Recombinant lentivirus containing Bmi1-shRNA was constructed. A model of subcutaneous implanted tumor was generated through injecting human lung cancer cell A549 (10^7) into the NOD/SCID mice. The 27 established mice with a mass at a diameter of 4 to 5 mm were divided into 3 groups randomly and equally. Recombinant lentivirus containing Bmi1-shRNA (5×10^8 TU/ml, 0.1 ml), lentivirus containing NC-shRNA (5×10^8 TU/ml, 0.1 ml, as negative controls) and PBS (0.1 ml, as blank control) was given the mice of the 3 groups respectively, once per 3 d, for 4 weeks. The size of the tumor mass were measured every 3 d. The mice were sacrificed in the end of 4 weeks' treatment. The expression of GFP in the xenografts was detected through laser scanning confocal microscope. RT-PCR and Western blot analysis were used to test the mRNA and protein expressions of Bmi1 in the xenografts. **Results** GFP was expressed in the tumor mass of the recombinant lentivirus groups, but not in the blank control. The average tumor volume in Bmi1-shRNA lentivirus group was significantly lower than that in the negative control and blank control groups ($P<0.05$) with an inhibitory rate of 52.9 % and 57.9% respectively. RT-PCR and Western blotting showed that the mRNA and protein expression of Bmi1 was decreased in the Bmi1-shRNA lentivirus group ($P<0.05$). **Conclusion** Intratumoral injection of recombinant Bmi1-shRNA Lentivirus inhibits the growth and proliferation of A549 xenografts in the NOD/SCID mice, suggesting that Bmi1 might represent a therapeutic target in the genotherapies of non-small cell lung cancer.

【**Key words**】 non-small cell lung cancer; tumor growth-inhibition; Bmi1

Supported by the National Nature Science Foundation of China (30772144). Corresponding author: Hu Yide, Tel: 86-23-68774484, E-mail: huyide_mit@yahoo.com.cn

【基金项目】 国家自然科学基金(30772144)
【通信作者】 胡义德,电话:(023)68774484,E-mail:huyide_mit@yahoo.com.cn

Bmi1 属于 Polycomb 家族的原癌基因成员，具有协同癌基因引起细胞恶性转化、抑制肿瘤抑癌基因进而减少细胞凋亡，引起细胞的永生化以及维持肿瘤干细胞自我更新等功能[1]。在胶质瘤、白血病及某些实体瘤的研究中均发现有 Bmi1 的过度表达[2,3]。Bmi1 在非小细胞肺癌中也存在过表达，且在肺癌的发生发展、侵袭转移中扮演着重要角色，Bmi1 高表达提示预后不良[4]。以 Bmi1 为靶点的基因治疗有望成为非小细胞肺癌靶向治疗的一个新方向。但有关 Bmi1 对 A549 细胞增殖、凋亡等的作用机制研究少见报道。本实验对免疫缺陷 NOD/SCID 小鼠 A549 移植瘤模型瘤内注射慢病毒载体介导的 Bmi1-shRNA，通过体内研究，观察 Bmi1-shRNA 对荷人肺癌鼠移植瘤侵袭生长的治疗效果，以期为非小细胞肺癌的治疗探索提供一条新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞株及实验动物：人肺腺癌细胞株 A549 由本室保存。常规培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640（HyClone）培养基中，添加 100 U/ml 的青霉素-链霉素（Sigma 公司）。置于 5% 的 CO_2、37 ℃饱和湿度的孵箱中培养。4～6 周龄 NOD/SCID 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司，按 SPF 级标准饲养。人 Bmi1-shRNA 慢病毒表达载体构建：人 Bmi1-shRNA 及阴性对照 NC-shRNA（碱基序列随机排列，与人类基因的外显子无同源性）慢病毒表达载体由上海吉凯基因化学技术公司设计合成并鉴定。慢病毒载体系统由 pGC-LV 载体、pHelper 1.0 载体和 pHelper 2.0 载体三质粒组成，携带绿色荧光蛋白（GFP），滴度为 10^9 TU/ ml。主要试剂及仪器：兔抗人 Bmi1（1∶200 Santa Cruz），anti-GAPDH 抗体（Santa Cruz Biotechnology），二抗鼠抗兔 IgG（1∶2 000 Santa Cruz）。BCA 蛋白浓度测定试剂盒（Promega），ECL 发光液（Beyotime），激光共聚焦显微镜：Leica LAS/AF/LITE，德国，由新桥医院中心实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 A549 移植瘤动物模型建立及分组 取对数生长期的人肺腺癌细胞株 A549，胰酶消化后，PBS 液清洗 2 次，制成 A549 单细胞悬液，调整细胞数至 2×10^8/ml，每只裸鼠皮下接种 0.2 ml 单细胞悬液（含细胞 10^7 个）于左侧腋下。每天观察 NOD/SCID 小鼠健康状况并触诊肿瘤形成情况。9 d 后在接种区皮下开始出现结节，成瘤率为 100%（27/27）。待肿块长至直径 4～5 mm 时进行治疗实验。将 27 只荷瘤裸鼠分为 3 组，每组 9 只，进行瘤体内给药，给药方法采用瘤内多点注射，1 次/3 d，共注射 2 次。①治疗组：注射 Bmi1-shRNA 慢病毒 0.1 ml/（只·次）（滴度 5×10^8 TU /ml）；②阴性对照组：注射 NC-shRNA 慢病毒 0.1 ml/（只·次）（滴度 5×10^8 TU/ml）；③空白对照组：注射 PBS 0.1 ml/（只·次）。

1.2.2 肿瘤体积与抑瘤率分析 每 3 天用游标卡尺测量小鼠皮下肿瘤最长径 a、最短径 b，体积计算公式 $V=a^2\times b\times 0.4$，绘制瘤体增长曲线。4 周后拉颈处死 NOD/SCID 小鼠，剥离皮下肿瘤，测量肿瘤体积并计算抑瘤率，抑瘤率 =（对照组瘤体积 - 实验组瘤体积）/对照组瘤体积 ×100%。取出的瘤块快速冰冻切片在激光共聚焦下观察 GFP 表达情况。

1.2.3 半定量 RT-PCR 检测瘤体内 Bmi1 mRNA 的表达 Trizol 法分别提取 3 组肿瘤组织总 RNA，电泳鉴定其完整性。cDNA 第 1 链合成试剂盒逆转录总 RNA，PCR 扩增 Bmi1 基因。上游引物 5′- GACCACTACTGAATATAAGG-3′，下游引物 5′-CATTTGTCAGTCCATCTCTC-3′，扩增片段长度 546 bp。内参 GAPDH 上游引物 5′-CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-3′，下游引物 5′-CGTCCTTCCACGATACCAAAGT-3′，扩增片段长度 113 bp。PCR 反应步骤为：94 ℃ 5 min，94 ℃ 30 s，51 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，共 32 个循环，72 ℃ 5 min。15 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析结果，Bio-Rad 凝胶成像系统采集图片，结果用计算机凝胶图像分析系统分析。比较上述 3 组 Bmi1 基因与其 GAPDH PCR 产物的灰度比值。上述实验至少重复 3 次。

1.2.4 Western blot 检测瘤体内 Bmi1 蛋白表达 用 RIPA 裂解液制备移植瘤组织蛋白，蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度，上样于 12% SDS-PAGE 电泳，电转染到硝酸纤维膜。室温下用含 5% 脱脂奶粉的 1×PBS 封膜 2 h。更换检测蛋白抗体室温下孵育 2 h。检测蛋白抗体为兔抗人 Bmi1。辣根过氧化物酶标记的鼠抗兔 IgG 抗体室温孵育 2 h。ECL 光化学法显色。内参照 α-tublin 蛋白测定：除一抗为抗 α-tublin 抗体外，余步骤同前。凝胶成像分析系统分析扫描结果，结果采用 Quantity One 软件进行光密度值分析，以目的条带与内参条带的比值代表目的蛋白的表达水平。

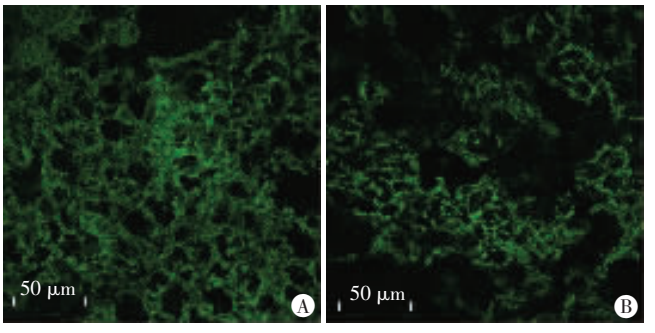
1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件进行独立样本 t 检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 激光共聚焦观察瘤体内 GFP 表达

Bmi1-shRNA 治疗组及 NC-shRNA 阴性对照组瘤体取出后快速冰冻切片，激光共聚焦下可见皮下移植肿瘤组织中有 GFP 表达（图 1），而 PBS 空白对照组未见 GFP 表达。说明慢病毒载体介导的 Bmi1-shRNA、NC-shRNA 在移植瘤细胞内获得稳定表达。

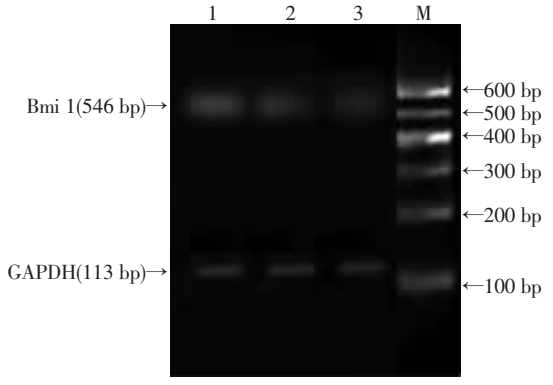


A：Bmi1-shRNA 治疗组；B：NC-shRNA 阴性对照组

图 1 激光共聚焦显微镜观察慢病毒载体介导的 shRNA 成功转染后在瘤体细胞内获得的 GFP 表达

2.2 Bmi1 基因 mRNA 表达变化

RT-PCR 结果表明，与阴性对照组及空白对照组相比较，治疗组 Bmi1 的表达量明显减少，抑制率分别为为 61.4% 和 58.3%（图 2）。

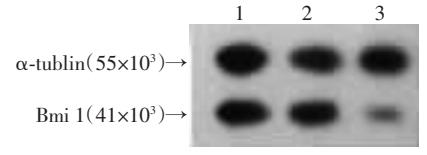


M：标准 1：阴性对照组 2：空白对照组 3：治疗组

图 2　RT-PCR 法检测小鼠移植瘤瘤体内 Bmi1 mRNA 的表达

2.3 Western blot 检测瘤体内 Bmi1 蛋白表达

与阴性对照组和空白对照组比较，Bmi1-shRNA 治疗组中的 Bmi1 蛋白明显降低，蛋白表达抑制率分别为 51.1%、50.3%，有统计学差异（$P<0.05$）。阴性对照组和空白对照组则无统计学差异（$P>0.05$）（图 3）。

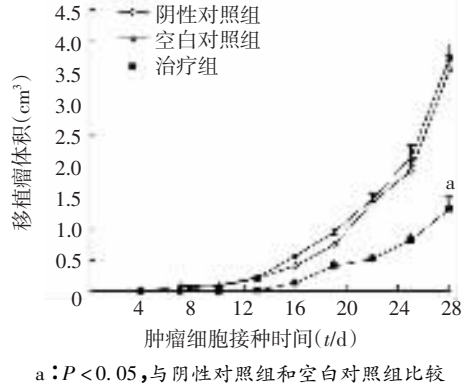


1：阴性对照组；2：空白对照组；3：治疗组

图 3　Western blot 检测小鼠移植瘤瘤体内 Bmi1 蛋白的表达

2.4 Bmi1-shRNA 抑制 NOD/SCID 小鼠 A549 皮下移植瘤生长

治疗过程中，各组 NOD/SCID 小鼠瘤体均呈进行性增大，但 Bmi1-shRNA 治疗组的瘤体生长速度明显减慢（图 4）。4 周后取出完整肿块，计算肿瘤体积。Bmi1-shRNA 治疗组瘤体体积较阴性对照组和空白对照组也明显缩小，抑瘤率分别达到 52.9% 和 57.9%，有统计学差异（$P<0.05$），而阴性对照组和空白对照组则无统计学差异（$P>0.05$）。



a：$P<0.05$，与阴性对照组和空白对照组比较

图 4　A549 NOD/SCID 小鼠皮下移植瘤体积生长速度比较

3　讨论

Bmi1 基因的适量表达是维持生物个体正常生长发育所必需的，但 Bmi1 基因的过度表达则参与了肿瘤的形成。近年来研究证实多种肿瘤，包括肺癌、直肠癌、乳腺癌、鼻咽癌及白血病等肿瘤中均有 Bmi1 高表达，提示其在肿瘤中发挥作用[5-7]。Vonlanthen 等[8]用免疫组织化学染色检测了 48 例非小细胞肺癌中的 Bmi1、$p16^{INK4a}$、$p14^{ARF}$ 的表达，Bmi1 基因有 20 例表达为阴/弱阳性，22 例中阳性，6 例强阳性（中高水平表达占 58%），并且在中阳性及强阳性的 Bmi1 基因的染色体标本中 $p16^{INK4a}$ 和 $p14^{ARF}$ 均明显下调。提示 Bmi1 在非小细胞肺癌的发生、发展中存在重要作用。小分子干扰 RNA（siRNA）是 RNAi 的效应分子，然而 siRNA 在活体内稳定性较差，容易被核酸酶降解。因此如何使 siRNA 有效地穿过细胞膜而进入细胞质中的 RNAi 通路，是将 siRNA 分子开发为治疗疾病的药物分子的主要障碍之一。siRNA 表达载体的出现促进 RNAi 从体外到体内、从实验室到临床应用的转化。近来出现的慢病毒 siRNA 表达载体，具有较低的免疫原性和细胞毒性，生物体内稳定性比较好，适用于体内 RNAi 的研究，包括稳定表达细胞株成瘤实验、瘤内注射、局部注射等，是抑制特定基因表达的理想工具[9,10]。本研究利用以 Bmi1 为靶向的慢病毒 siRNA 表达载体，以人肺腺癌 A549 荷瘤鼠模型来评估 Bmi1 作为肿瘤治疗靶点的效果，通过移植瘤内多点注射慢病毒介导的 Bmi1-shRNA，成功地下调了瘤体细胞内 Bmi1 蛋白的表达水平，减慢肿瘤生长速度。提示 Bmi1-shRNA 慢病毒表达载体能显著抑制人肺腺癌 A549 的 NOD/SCID 小鼠移植瘤的生长。

Jacobs 等[11]研究发现，INK4a/ARF 是 Bmi1 基因调节细胞增殖和老化的靶点，在 Bmi1 缺陷的小鼠成纤维细胞（MEF）和淋巴细胞中，抑癌基因 p16INK4a 和 p19ARF 表达水平明显升高，相反，Bmi1 过度表达的 MEF 细胞中 p16INK4a 和 p19ARF 蛋白下调，细胞可发生永生化。提示 INK4a/ARF 途径可能是 Bmi1 在 A549 细胞中发挥作用，调节细胞增殖、分化、凋亡以及迁移等的途径之一。另有研究发现在某些肿瘤中，Bmi1 基因可诱导下游基因端粒酶逆转录酶（hTERT）基因的表达，维持端粒长度[12]。在人正常组织细胞中，hTERT 的表达出生后即被抑制，端粒酶活性呈阴性。Bmi1 基因可诱导下游基因 hTERT 基因的表达，从而激活端粒酶，补偿细胞分裂时的端粒缩短，维持端粒长度，使细胞获得无限增殖能力，阻止细胞衰老，导致永生化，在细胞的恶性转化中起重要作用[12]。Silva

等[13]研究发现在原发性乳腺癌组织中 Bmi1 基因和 c-myc 基因的表达有相关性，但在肺癌中有关这方面的文献报道少，有待进一步研究。

综上所述，为进一步验证 Bmi1 在体内的作用，我们成功构建了人肺腺癌 A549 荷瘤鼠模型，利用 Bmi1-shRNA 慢病毒表达载体，采用瘤内多点注射方法转染入移植瘤内，发现，Bmi1-shRNA 治疗组肿瘤的生长明显受到抑制，通过体内实验证实了利用 RNAi 技术下调小鼠移植瘤内 Bmi1 的表达，能够一定程度地逆转 A549 细胞的恶性生物学行为，表明了利用 RNAi 在非小细胞肺癌基因治疗中的潜在作用，但我们对 Bmi1 在非小细胞肺癌可能存在的作用机制尚不完全清楚，将进行深入研究。

参考文献：

[1] Vonlanthen S, Heighway J, Tschan M P, *et al*. Expression of p16INK4a/p16alpha and p19ARF/p16beta is frequently altered in non-small cell lung cancer and correlates with p53 overexpression [J]. Oncogene, 1998, 17(21): 2779 - 2785.

[2] Bruggeman S W, Hulsman D, Tanger E, *et al*. Bmi1 controls tumor development in an Ink4a/Arf-independent manner in a mouse model for glioma [J]. Cancer Cell, 2007, 12(4): 328 - 341.

[3] Park I K, Qian D, Kiel M, *et al*. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells [J]. Nature, 2003, 423(6937): 302 - 305.

[4] Becker M, Korn C, Sienerth A R, *et al*. Polycomb group protein Bmi1 is required for growth of RAF driven non-small-cell lung cancer [J]. PLoS One, 2009, 4(1): e4230.

[5] Sangiorgi E, Capecchi M R. Bmi1 is expressed *in vivo* in intestinal stem cells [J]. Nat Genet, 2008, 40(7): 915 - 920.

[6] 朱勇，胡义德，胡中华. Bmi-1 siRNA 对人白血病 K562 细胞增殖的影响及其机制 [J]. 第三军医大学学报，2008，30(9)：791 - 794.

[7] Vrzalikova K, Skarda J, Ehrmann J, *et al*. Prognostic value of Bmi-1 oncoprotein expression in NSCLC patients: a tissue microarray study [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2008, 134(9): 1037 - 1042.

[8] Vonlanthen S, Heighway J, Altermatt H J, *et al*. The bmi-1 oncoprotein is differentially expressed in non-small cell lung cancer and correlates with INK4A-ARF locus expression [J]. Br J Cancer, 2001, 84(10): 1372 - 1376.

[9] Natt F. siRNAs in drug discovery: target validation and beyond [J]. Curr Opin Mol Ther, 2007, 9(3): 242 - 247.

[10] Cockrell A S, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors [J]. Mol Biotechnol, 2007, 36(3): 184 - 204.

[11] Jacobs J J, Kieboom K, Marino S, *et al*. The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus [J]. Nature, 1999, 397(6715): 164 - 168.

[12] Haga K, Ohno S, Yugawa T, *et al*. Efficient immortalization of primary human cells by p16INK4A-specific short hairpin RNA or Bmi-1, combined with introduction of hTERT [J]. Cancer Sci, 2007, 98(2): 147 - 154.

[13] Silva J, Garcia J M, Pena C, *et al*. Implication of polycomb members Bmi-1, Mel-18, and Hpc-2 in the regulation of p16INK4a, p14ARF, h-TERT, and c-Myc expression in primary breast carcinomas [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(23): 6929 - 6936.

（收稿：2010-06-05 修回：2010-07-12）

（编辑 龙 亮）

关于部分作者将稿件委托论文代理商有关问题的声明

最近，陆续有作者向我们核实、投诉一些论文代理商在向他们征集稿件时声称与我刊合作，开通所谓的“绿色通道”、“快速通道”或在代理商处设立了采编部等等，甚至有作者被骗取了相当数额的款项。我刊在 2010 年 5 月 12 日即发表声明，表示没有委托代理商征集稿件，并明确告知我刊审稿费费用。在此，我刊对有关问题说明并声明如下。

1. 我刊没有委托代理商征集稿件，没有外设任何采编部，没有开通任何“绿色通道”、“快速通道”，每篇稿件必须投进稿件处理系统，严格按稿件处理程序处理。我刊对所有来稿在收到审稿费后，即及时启动稿件处理程序。稿件处理程序为：初审和查重、外审、修改、复审、终审，再查重等。

2. 我刊的网站和远程稿件处理系统都是开放的，接受任何一位作者的自由来稿。编辑部全体同志本着尊重作者研究成果的态度，对所有稿件一视同仁，认真对待。正因为该系统的开放性，一些论文代理商四处征集稿件收取费用后，有的代投进系统了事，有的甚至连代投都不做就没有了音信。请作者一定提高警惕，以免上当受骗。

3. 建议作者在投稿之前，最好先到图书馆借阅相关期刊，了解该期刊发表文章的要求、最近对哪些问题比较感兴趣、刊登的文章质量如何等，再决定将稿件投向哪种期刊。从纸质期刊上获知期刊的投稿地址是非常安全、明智的做法。

4. 对于在搜索引擎中搜索期刊网址的作者，我们善意地提醒：从百度搜索到的网址中，我刊网址并未排在第 1 位，排在搜索结果最前面的是那些交钱给百度做推广链接的论文代理商。熟悉互联网的作者都知道，百度搜索结果排名是商业化的，不熟悉的作者可能就会点开排在最前面的链接，直接进入了代理商的投稿系统。因此，我们建议作者直接进入我刊网站（http://aammt.tmmu.com.cn）投稿，没有必要经过任何代理商代理自己的稿件。

5. 我刊对每篇稿件的处理时限为 3 个月（以收到审稿费开始计算，稿件审稿费为 50 元/篇），即 3 个月内必须给作者答复稿件是否能录用。2010 年，我刊刊稿平均时间不超过 180 天。欢迎广大作者直接登陆我刊网站投稿。

本刊编辑部