论著

文章编号:1000-5404(2011)06-0578-04

shRNA/hTERT 表达载体靶向逆转乳腺癌的耐药性

黄金向,王继见 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院普外科)

【摘要】 **目的** 克隆人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase,hTERT)启动子,探讨对乳腺癌细胞的特异性,构建 shRNA/hTERT 表达载体,探讨在动物实验中耐药性的变化。**方法** 构建重组质粒(pGenesil-CMV-shRNA、pGenesil-hTERT-shRNA),用 MCF-7/ADR 乳腺癌细胞接种于50只裸鼠前肢腋下,并将45只接种成功的动物模型按随机数字表法分为3组:对照组、重组质粒 pGenesil-CMV-shRNA 组、重组质粒 pGenesil- hTERT-shRNA 组,应用 RT-PCR 技术检测裸鼠组织的乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein,BCRP)基因的 mRNA 及 Western blot 检测裸鼠组织 BCRP 基因的蛋白表达、测量裸鼠瘤体体积的变化。**结果** 成功构建人乳腺癌裸鼠模型;动物实验 RT-PCR 及 Western blot 检测结果显示:pGenesil-CMV-shRNA、pGenesil-hTERT-shRNA 组 BCRP 的 mRNA 和蛋白的表达均受抑制,与对照组比较,其差异均有统计学意义($P<0.05$);裸鼠瘤体体积明显缩小,与对照组比较,其差异均有统计学意义($P<0.05$);重组质粒 pGenesil-hTERT-shRNA 组抑瘤率为68.5%。**结论** shRNA/hTERT 表达载体成功靶向沉默 BCRP 基因,动物实验证实对阿霉素的敏感性明显增加。

【关键词】 重组质粒;启动子 hTERT;shRNA;MCF-7/ADR;端粒酶阳性细胞;裸鼠模型
【中图法分类号】 R394-33;R73-361;R737.9 【文献标志码】 A

Targeting reversal of breast cancer drug resistance by BCRP shRNA expression vector with hTERT promoter in nude mice

Huang Jinxiang, Wang Jijian (Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

【**Abstract**】 **Objective** To clone human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter and investigate its specificity to breast cancer cells, and to construct breast cancer resistance protein (BCRP) shRNA expression vector with hTERT promoter, pGenesil-hTERT-shRNA, and observe its influence on doxorubicin resistance of breast cancer cells in experimental animals. **Methods** Recombinant plasmids pGenesil-CMV-shRNA and pGenesil-hTERT-shRNA were constructed. Fifty nude mice were inoculated with human breast cancer cell line MCF-7/ADR. Forty-five tumor-carrying mice were evenly and randomly divided into a control group, a pGenesil-CMV-shRNA group and a pGenesil-hTERT-shRNA group according to random number tables. Western blotting and RT-PCR were applied to detect BCRP and its mRNA expression in mouse tissues. The tumor volume changes of the tumor-carrying mice were measured. **Results** The mouse model of human breast cancer was constructed. Western blotting and RT-PCR results showed that, in the pGenesil-CMV-shRNA and pGenesil-hTERT-shRNA groups, the expression levels of BCRP and its mRNA as well as the tumor volumes were significantly reduced as compared with those of the control group ($P<0.05$). The tumor inhibition rate of pGenesil-hTERT-shRNA groups was 68.5%, which were significantly higher than that of the control group ($P<0.05$). **Conclusion** BCRP shRNA expression vector with hTERT promoter can specifically silence BCRP gene and increase breast cancer cell susceptibility to doxorubicin.

【**Key words**】 hTERT promoter; breast cancer; drug resistance reversal; telomerase-positive cells; shRNA; BCRP

Supported by the Project of Chongqing Municipal Education Commission (KJ080305). Corresponding author: Wang Jijian, E-mail: wangjj1963@163.com

【基金项目】 重庆市教委资助项目(KJ080305)
【通信作者】 王继见,E-mail:wangjj1963@163.com

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一，发病率逐年增高。我国乳腺癌发病率近年来呈逐年上升的趋势，而化疗在乳腺癌治疗中是最重要的治疗之一，但内在型或获得性的多重耐药（multidrug resistance，MDR）常导致化疗失败。药物转运蛋白中ABCG2（ATP binding cassette G2）膜转运蛋白的过度表达与肿瘤MDR关系密切。一种新的乳腺癌耐药蛋白（breast cancer resistance protein，BCRP），属于ABC超家族的一种[1]。利用特异性的基因启动子人端粒酶逆转录酶（human telomerase reverse transcriptase，hTERT）启动子可以使目的基因在特定的组织、细胞或器官中表达，实现对肿瘤靶向性治疗的目的[2]。近年研究发现，端粒酶在80%～90%的肿瘤细胞中呈高表达，而在大部分正常的体细胞中不表达，而且具有治疗基因高效表达的优点[3-4]。因此我们设想能否在基因水平靶向沉默BCRP，逆转肿瘤细胞的耐药性，以提高化疗疗效。本研究采用RT-PCR及Western blot方法，分别检测BCRP mRNA和蛋白的表达，旨在为乳腺癌耐药性奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与实验动物

1.1.1 材料及试剂 MCF-7/ADR均购自中国科学院上海细胞所，PCR反应试剂盒购自Tiangen公司，*Taq* DNA聚合酶、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒，DNA纯化试剂盒购自TaKaRa公司，RNA提取试剂盒购自TaKaRa公司，Lipofectamine™ 2000购自Invitrogen公司，BCRP一抗购自武汉博士德生物科技有限公司，Western及IP细胞裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、BeyoECL Plus（超敏ECL化学发光试剂盒）均购自碧云天公司，倒置荧光显微镜CFM-500购自上海长方光学仪器有限公司。

1.1.2 实验动物 6周龄BALB/c裸雌性小鼠50只，体质量18～22 g，购自中科院动物研究所，在无特定病原体条件的层流架内饲养，室内恒温、恒湿，定期消毒，在无菌操作下定期更换笼具、垫料、饮用水和饲料。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建 shRNA表达载体选用pGenesil-1，含有绿色荧光蛋白（EGFP）。BCRP基因序列引自GenBank，采用Ambion公司的siRNA在线设计工具siRNA Target Finder，选出1条21 nt的序列5′-AAGAGTGGCTTTCTACCTTGT-3′，此序列由本实验室前期设计完成并验证其有效性[5]；全基因合成hTERT启动子（共260 bp），与GenBank中的hTERT调控区序列相对照。构建重组质粒pGenesil-巨细胞病毒（CMV）-shRNA，重组质粒pGenesil-hTERT-shRNA均由武汉晶赛生物工程公司构建、合成，质粒含量及测序由该公司测定。

1.2.2 细胞的培养及传代 MCF-7/ADR细胞在37 ℃，50 ml/L CO_2条件下，用RPMI1640加入10%小牛血清培养液及双抗（100 U/ml青霉素和100 U/ml链霉素）中常规培养，隔天传代1次，处于对数生长期以备实验所用。

1.2.3 人乳腺癌裸鼠模型的建立 MCF-7/ADR细胞系用10%的PBS、RPMI1640培养基在37 ℃，5%的CO_2孵育箱进行培养，待细胞生长至对数生长期时，用0.25%的胰酶消化并收集细胞。用磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤后重悬，调整细胞浓度为2.5×10^{11}/L，每只裸鼠于前肢腋部皮下注射重悬液0.2 ml（5×10^6个细胞），共50只，观察裸鼠生长情况，2周后有45只裸鼠前肢腋下长出体积约50 mm^3的结节，模型成功建立。

1.2.4 注射质粒及药敏实验 将45只裸鼠按随机数字表法分为3组（对照组、重组质粒pGenesil-CMV-shRNA组、重组质粒pGenesil-hTERT-shRNA组），每组15只，分别将空质粒（对照）pGenesil-CMV、重组质粒pGenesil-CMV-shRNA、重组质粒pGenesil-shRNA-hTERT（质粒各30 μg，1 μg/μl）各加入PBS稀释至100 μl，将脂质体75 μl用PBS液稀释至100 μl，静置5 min后将脂质体分别加入3种液体中混匀，常温下静置15 min后分别注射3组裸鼠，采取包块内放射状注射，同时给予经尾静脉缓慢注射阿霉素130 μg/只（50～60 mg/m^2），观察肿瘤体积及化疗的反应，1周1次，共注射4次。注射完后1周，在无菌下取下肿瘤标本，行病理切片和冻存于－80 ℃冰箱备用。

1.2.5 RT-PCR检测BCRP mRNA的表达 提取对照组、重组质粒pGenesil-CMV-shRNA组、重组质粒pGenesil-hTERT-shRNA组RNA，组织采取研磨法提取RNA，内参为NADPH，其上游引物为5′-ACTGTGCCCATCTACGAGG-3′，下游引物为5′-GAAAGGGTGTAACGCAACTA-3′，扩增片段为678 bp；BCRP上游引物为5′-ATGAAACCTGGTCTCAACGC-3′，下游引物为5′-TGGAGTCTGCCACTTTATCC-3′，扩增片段为319 bp，按照RT-PCR说明书检测RNA的表达。逆转录阶段条件：42 ℃ 60 min；70 ℃ 5 min；扩增阶段条件：94 ℃ 4 min，94 ℃ 30 s，57 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，将扩增过程进行30个循环，72 ℃ 4 min，4 ℃ 2 h。

1.2.6 Western blot检测BCRP蛋白的表达 取出组织，在装有液氮的研钵内将组织研磨为细小微粒，加入细胞裂解液，按说明书提取蛋白及检测蛋白的浓度，按照碧云天提供的说明书的步骤进行Western blot检测，在蛋白凝胶成像仪上显影。

1.2.7 阿霉素化疗前和化疗后裸鼠肿瘤体积对比 测量pGenesil-CMV-shRNA组、重组质粒pGenesil-hTERT-shRNA组、对照组裸鼠乳腺癌肿瘤体积（V）并计算抑瘤率。V（mm^3）＝$ab^2/2$（a：长径，b：短径），抑瘤率＝（对照组肿瘤质量－实验组肿瘤质量）/对照组肿瘤质量×100%。

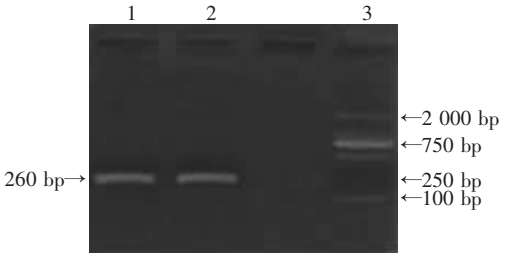
1.3 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 17.0统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 特异性启动子hTERT及重组质粒pGenesil-hTERT-shRNA的构建

PCR扩增结果表明：出现特异性条带约为260 bp，与预期片段一致；成功将hTERT启动子克隆于载体pGenesil上，构建重组质粒pGenesil-hTERT-shRNA经酶切后结果证实重组质粒构建成功（图1）。

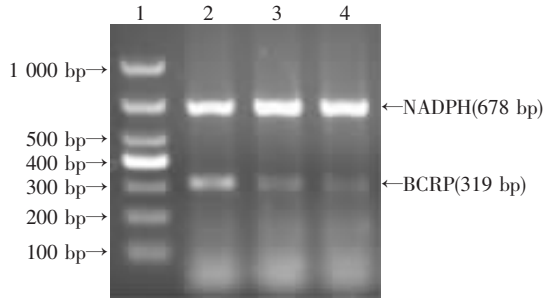


1:克隆1;2:克隆2;3:标准

图1 hTERT启动子的PCR扩增及其鉴定结果

2.2 半定量RT-PCR检测BCRP mRNA的表达

BandScan软件分析各扩增条带产物的BCRP/NAPDH比值,结果显示:对照组(0.255±0.043)、重组质粒pGenesil-CMV-shRNA组(0.025±0.002)、重组质粒pGenesil-hTERT-shRNA组(0.021±0.001)。2个干预组扩增条带(319 bp)的亮度无明显差异,但明显弱于对照组($P<0.05$)。见图2。

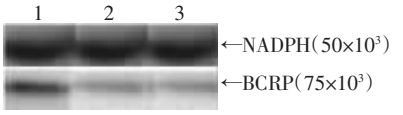


1:标准 2:对照组 3:重组质粒pGenesil-CMV-shRNA组;4:重组质粒pGenesil-hTERT-shRNA组

图2 半定量RT-PCR检测BCRP mRNA的表达

2.3 Western blot检测BCRP蛋白在裸鼠乳腺癌组织中的表达

用BandScan软件分析各扩增条带产物的BCRP/β-actin比值,结果显示,对照组(0.289±0.001)、重组质粒pGenesil-CMV-shRNA组(0.023±0.001)、重组质粒pGenesil-hTERT-shRNA组(0.025±0.002)。重组质粒pGenesil-CMV-shRNA组、重组质粒pGenesil-hTERT-shRNA干预条带(75×10^3)的亮度无明显差异,但均明显弱于对照组($P<0.05$)。见图3。



1:对照组 2:重组质粒pGenesil-CMV-shRNA组;3:重组质粒pGenesil-hTERT-shRNA组

图3 Western blot检测BCRP蛋白在裸鼠乳腺癌组织中的表达

2.4 人乳腺癌裸鼠模型成功后HE染色结果

高倍镜下见癌细胞核多且大,且浓染,核仁明显,分化较差,异型性大,核分裂相多见,表明模型构建成功。见图4。

2.5 阿霉素化疗前和化疗后裸鼠肿瘤体积对比

裸鼠种瘤成功后,对照组肿瘤逐渐增大,体质量逐渐减轻;干预组肿瘤生长明显减慢,体质量增加;化疗后重组质粒pGenesil-CMV-shRNA组、重组质粒pGenesil-hTERT-shRNA组与对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。重组质粒pGenesil-CMV-shRNA组、重组质粒pGenesil-hTERT-shRNA组抑瘤率分别为68.4%、68.5%,与对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),注射重组质粒pGenesil-CMV-shRNA的裸鼠出现了不同程度的恶心、呕吐等症状,其他组未见不良反应。见表1。

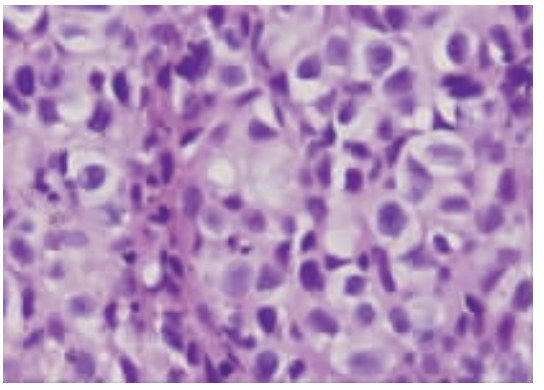


图4 人乳腺癌裸鼠模型构建后病理学观察 (HE ×400)

表1 化疗前后裸鼠肿瘤体积比较(mm^3,$\bar{x}\pm s$)

组别	化疗前	化疗后
对照组	255±3	2 252±8
重组质粒pGenesil-CMV-shRNA组	257±4	686±5[a]
重组质粒pGenesil-hTERT-shRNA组	258±9	683±4[a]

a:$P<0.05$,与对照组化疗后比较

3 讨论

靶向基因治疗是指使目的基因能靶向导入特定的组织细胞或在其中靶向表达,最大限度杀伤肿瘤细胞,而不损伤正常细胞。用反义核酸技术可以特异地抑制某些基因的表达,但靶向性低。现已有不少启动子得到证实并用于调控治疗基因的表达,如靶向结直肠癌中的CEA启动子[6]、靶向乳腺癌中的MUC1启动子[7]和靶向黑色素瘤的酪氨酸激酶启动子[8]等。虽然这些启动子能严格限制治疗基因在特异组织或细胞类型中的表达,但它们只能针对一种组织来源肿瘤,不能广泛用于多种来源肿瘤的治疗。其他一些启动子如CMV、RSV-LTR、SV40早期启动子则介导的基因表达量低,这些原因都阻碍了它们用于肿瘤基因治疗。端粒酶已成为公认的肿瘤治疗靶点[9-10]。hTERT是人端粒酶复合物的核心成分之一,为端粒酶的限速酶,对端粒酶的调控起决定作用。

当前shRNA基因治疗在基因治疗中成为全世界的研究热点[11],然而shRNA使正常细胞和不正常细胞内的靶基因同时被敲出或抑制,造成shRNA干扰的不确定性,这是shRNA研究停滞不前的瓶颈。

目前对于肿瘤基因治疗大多采用CMV启动子,开

发的临床试验产品虽然有一定的疗效,但毒副作用大。应用肿瘤特异启动子,可减少毒副作用。但肿瘤特异启动子的活性极低,一般仅为 CMV 启动子活性的 1%,因而其效果不满意,其临床应用价值非常有限。理想的肿瘤特异性启动子应该在肿瘤细胞中高表达,而在正常细胞中不表达或几乎不表达。hTERT 启动子在多种肿瘤细胞中都具有明显的转录活性,而在大部分正常成人组织中无活性,是肿瘤的基因治疗中很有前途的启动子。研究表明,hTERT 启动子经修饰后可作用于乳腺癌、成骨肉瘤、膀胱癌等恶性肿瘤[12]。

shRNA/hTERT 表达载体转染不同的细胞后,在不同时间用倒置荧光显微镜检测,只在端粒酶阳性细胞可见很强的荧光,而阴性细胞均不能见到荧光,因此,hTERT 启动子可能成为肿瘤基因治疗的靶向治疗,这是前期实验在分子生物学水平上证实的[13]。

在动物实验中,我们应用 shRNA 技术干预 BCRP mRNA,通过干预前后对比,其差异有统计学意义($P<0.05$),干预组间(重组质粒 pGenesil-CMV-shRNA、重组质粒 pGenesil-hTERT-shRNA 组)无统计学差异($P>0.05$),说明其目的基因达到很好的干预效果。我们应用 Western blot 技术干预 BCRP 蛋白的表达,通过干预前后对比,差异有统计学意义($P<0.05$),干预组间(重组质粒 pGenesil-CMV-shRNA、重组质粒 pGenesil-hTERT-shRNA 组)差异无统计学意义($P>0.05$)。同样的实验方法应用在细胞水平上,得出同样的结论[13-14]:其干预的目的基因达到很好的干预的效果,且带有 hTERT 启动子较带有 CMV 启动子的干预效果无统计学差异($P>0.05$)。因此在动物实验及细胞实验均证实 hTERT 启动子功能与 CMV 启动子一样强大[15]。

将耐药的人乳腺癌裸鼠干预后进行化疗,重组质粒 pGenesil-CMV-shRNA 组、重组质粒 pGenesil-hTERT-shRNA 组瘤体体积与对照组比较其差异有统计学意义($P<0.05$)。所以我们从分子生物学水平[13]及动物实验均证实 shRNA/hTERT 表达载体成功靶向逆转乳腺癌的耐药性。

由 hTERT 启动子调控的特异性基因治疗载体能增加基因治疗的安全性和有效性,是一种非常有前景的基因治疗方法。但体内某些细胞如造血干细胞、皮肤干细胞、小肠隐窝干细胞、胚胎细胞等非靶向细胞也表达端粒酶活性,hTERT 启动子介导的治疗基因也势必对这些细胞也产生一定的毒副作用。因此,寻找具有肿瘤特异性和组织特异性的表达载体正成为研究的热点。

参考文献:

[1] Lou Z, Wei J, Riethman H, *et al*. Telomere length regulates ISG15 expression in human cells[J]. Aging (Albany NY), 2009, 1(7): 608-621.

[2] Alukmets R, Schriml L M, Hutchinson A, *et al*. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance[J]. Cancer Res, 1998, 58(23): 5337-5339.

[3] Wu H, Hait W N, Yang J M. Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells[J]. Cancer Res, 2003, 63(7): 1515-1519.

[4] Irving J, Wang Z, Powell S, *et al*. Conditionally replicative adenovirus driven by the human telomerase promoter provides broad-spectrum antitumor activity without liver toxicity[J]. Cancer Gene Ther, 2004, 11(3): 174-185.

[5] 杨成, 印国兵, 龚骊, 等. RNAi 抑制乳腺癌 MCF-7/ADR 细胞乳腺癌耐药蛋白基因研究[J]. 免疫学杂志, 2008, 24(3): 304-307.

[6] Sagawa T, Takahashi M, Sato T, *et al*. Prolonged survival of mice with multiple liver metastases of human colon cancer by intravenous administration of replicable E1B-55K-deleted adenovirus with E1A expressed by CEA promoter[J]. Mol Ther, 2004, 10(6): 1043-1050.

[7] Chen RF, Li Z H, Pan Q H, *et al*. *In vivo* radioiodide imaging and treatment of pancreatic cancer xenografts after MUC1 promoter-driven expression of the human sodium-iodide symporter[J]. Pancreatology, 2007, 7(5/6): 505-513.

[8] Schwabe M, Lubbert M. Epigenetic lesions in malignant melanoma [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2007, 8(6): 382-387.

[9] Helder M N, Wisman G B, van-der-Zee G J. Telomerase and telomeres: from basic biology to cancer treatment [J]. Cancer Invest, 2002, 20(1): 82-101.

[10] 张巧, 钱丽丽, 刘红梅, 等. pcDNA3.1-hTERT 真核表达载体的构建及其抗肿瘤效应 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2008, 43(3): 483-486.

[11] 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.

[12] Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K R, *et al*. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. Science, 1994, 266(5193): 2011-2015.

[13] 黄金向, 王继见, 莫琳君. 使用 hTERT 启动子联合 RNAi 靶向逆转乳腺癌的耐药性[J], 重庆医科大学学报, 2010, 10(35): 1482-1484.

[14] Lee S J, Lee S W, Jeong J S, *et al*. *In vivo* reprogramming of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) by trans-splicing ribozyme to target tumor cells[J]. Methods Mol Biol, 2010, 629: 307-321.

[15] 刘晓艳, 方红, 陈鸿超, 等. CMV 启动子调控的 VEGF-shRNA 表达载体的构建及有效干扰序列的筛选[J]. 浙江大学学报: 医学版, 2010, 39(2): 181-186.

(收稿 2010-10-08 修回 2010-12-02)

(编辑 王 红)