论著

文章编号:1000-5404(2011)13-1370-04

沉默EC9706细胞NS基因对裸鼠移植瘤组织中EGF、EGFR基因表达的影响

张功员[1],关文池[2],李晟磊[3],张 巧[1],吴卫东[1] (450001 郑州,郑州大学:公共卫生学院流行病学教研室[1],基础医学院病理学教研室[3];361005 福建 厦门,厦门大学医学院临床医学系[2])

【摘要】 **目的** 建立裸鼠食管癌移植瘤模型,探讨由RNAi诱导的EC9706细胞核干细胞因子(nucleostemin,NS)基因沉默对裸鼠移植瘤组织中EGF、EGFR基因表达的影响。**方法** 裸鼠15只,采用STATA 8.0编制随机化分组程序,均分为3组,分别皮下注入pRNAT-U6.1-siNS2转染的EC9706细胞(siRNA干预组),pRNAT-U6.1-siC转染的EC9706细胞(无关siRNA对照组)以及正常EC9706细胞(空白对照组),接种5周,观察移植瘤生长情况,应用免疫组织化学方法和原位杂交技术检测裸鼠移植瘤组织中NS、EGF、EGFR基因蛋白和mRNA的表达。**结果** 无关siRNA对照组及空白对照组第4天于接种部位出现肉眼可见的肿块,siRNA干预组于第6天在相应部位发现肉眼可见肿块,第5周各组裸鼠成瘤率均为100%。siRNA干预组、无关siRNA对照组及空白对照组裸鼠移植瘤组织中NS、EGF、EGFR蛋白和mRNA的阳性表达率比较差异显著($P<0.05$)。相对于无关siRNA对照组和空白对照组,siRNA干预组裸鼠肿瘤组织中NS蛋白及mRNA的阳性表达率均降低。**结论** EC9706细胞沉默NS基因可降低裸鼠体内EGF、EGFR基因的表达。

【关键词】 食管鳞状细胞癌;EC9706细胞;RNA干扰;裸鼠;核干细胞因子
【中图法分类号】 R394.3;R730.23;R735.1 【文献标志码】 A

Silencing nucleostemin in EC9706 cells inhibits tumor growth and expression of EGF and EGFR in xenograft tumor in nude mice

Zhang Gongyuan[1], Guan Wenchi[2], Li Shenglei[3], Zhang Qiao[1], Wu Weidong[1] ([1]Department of Epidemiology, Public Health College, [2]Department of Pathology, Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450001; [3]Department of Clinical Medicine, Medical College of Xiamen University, Xiamen, Fujian Province, 361005, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effect of silencing nucleostemin (NS) in EC9706 cells induced by RNAi on the expression of epidermal growth factor (EGF) and its receptor (EGFR). **Methods** Fifteen nude mice were divided into three groups, each group contains five mice. Three different kinds of cells, EC9706 cells transfected by pRNAT-U6-1-siNS2, or by pRNAT-U6.1-siC and normal EC9706 cells were injected into the hypodermis tissues of corresponding mice respectively. Five weeks later after the injection, the sizes of xenograft tumors in these mice were measured, and the protein and mRNA expression of NS, EGF and EGFR in the xenograft tumor were detected by immunohistochemistry and RT-PCR. **Results** Visible tumors were observed in the injected position after 4 d in transfected pRNAT-U6.1-siC and normal EC9706 cells groups, and after 6 d in transfected pRNAT-U6-1-siNS2 EC9706 cells group. In 5th week, the tumorigenesis were 100%. The protein and mRNA levels of NS, EGF and EGFR were lower in transfected pRNAT-U6-1-siNS2 EC9706 cells group than in the other two groups ($P<0.05$). **Conclusion** Silencing NS of EC9706 cells inhibits the growth of exnograft tumor in nude mice and decreases the expression of EGF gene and EGFR gene. Silencing NS gene may be a new strategy for the treatment of esophagus caicinoma.

【**Key words**】 esophageal squamous cell carcinoma; EC9706 cells; RNA interference; nude mice; nucleostemin

Supported by the Key Tackling Funds for Sci & Tech Research of Henan Province (72102310104), the Natural Science Foundation of Department of Education of Henan Province (2007310017) and the Tackling Foundation for Sci & Tech Research of Zhengzhou City (064SGDS33218-28). Corresponding author: Zhang Gongyuan, E-mail: zgy@zzu.edu.cn

【基金项目】 河南省重点科技攻关基金(72102310104);河南省教育厅自然科学研究基金(2007310017);郑州市科技攻关基金(064SGDS33218-28)
【通信作者】 张功员,E-mail:zgy@zzu.edu.cn

在食管鳞状细胞癌的发生、发展及侵袭、转移过程中，核干细胞因子（nucleostemin，NS）发挥一定的作用[1-3]。本课题组已成功构建了1组针对NS基因的siRNA表达载体，并筛选出最强的干扰表达载体pRNAT-U6.1-siNS2，转染EC9706细胞后能抑制NS的表达[4]。EGF和EGFR是近年来发现的在细胞增殖和分化中起重要作用的因子，可促进正常细胞的恶性转化及刺激肿瘤细胞的增殖[5]。EGF和EGFR基因已成为近年来研究肿瘤发生、发展与细胞信号传导的新热点。研究表明食管癌组织中有EGF和EGFR的过表达[4,6]。为进一步了解沉默NS基因对裸鼠移植瘤组织中EGF、EGFR基因表达的影响，采用干扰表达载体pRNAT-U6.1-siNS2，转染EC9706细胞[4]，植入裸鼠皮下，观察其对移植瘤组织中EGF、EGFR基因表达的影响，为NS基因应用于食管肿瘤的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 食管癌细胞株EC9706，中国医学科学院肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室赠。

1.1.2 裸鼠 BALB/c裸小鼠15只，雄性，4周龄，体质量16~18 g，购自中科院上海斯莱克实验动物中心。饲养在恒湿（相对湿度40%~60%）、恒温（26~28 ℃）的半屏障系统中，在河南省肿瘤病理重点实验室裸鼠培养室饲养。饮水及饲料均经灭菌处理，由郑州大学实验动物中心提供。全部实验饲养过程达到SPF级。

1.1.3 EC9706细胞的培养与转染 siRNA干预组为转染pRNAT-U6.1-siNS2的EC9706细胞，无关siRNA对照组为转染pRNAT-U6.1-siC的EC9706细胞，空白对照组为未转染的EC9706细胞[4]。

1.2 实验方法

1.2.1 分组方法 采用STATA 8.0编制随机化分组程序，将15只裸鼠随机分为3组，每组5只，用剪耳缘法标记，分为siRNA干预组、无关siRNA对照组和空白对照组。分笼饲养。

1.2.2 裸鼠异种肿瘤接种实验 大量扩增并收获处于对数生长期的siRNA干预组、无关siRNA对照组、空白对照组的EC9706细胞，用不含Ca^{2+}、Mg^{2+}的PBS液（0.01 mol/L，pH=8.0）洗涤2次并制备成细胞悬液。每只裸小鼠背部肩胛旁区作为注射点，分别皮下注射各组细胞2.0×10^6。

1.2.3 移植瘤大小观测 肉眼观察接种处新生物的生长情况。裸鼠在接种5周后，颈椎脱臼处死，冰上操作，迅速剪开皮肤，完整剥离肿块。肿瘤组织用40 g/L多聚甲醛固定，石蜡包埋，4 μm连续切片，拟行免疫组织化学法和原位杂交技术检测肿瘤组织中蛋白和mRNA的表达。

1.2.4 裸鼠肿瘤组织中NS、EGF、EGFR基因蛋白和mRNA检测 免疫组织化学法检测裸鼠肿瘤组织中NS、EGF、EGFR蛋白的表达[2,6]，原位杂交法检测裸鼠肿瘤组织NS、EGF、EGFR mRNA的表达，NS、EGF和EGFR原位杂交5端生物素标记、全硫代修饰探针由北京奥科生物技术有限责任公司合成。NS探针序列为：5′-CAGCAAAGCCAAGAAGCACCTGGAG-3′；EGF探针序列为：5′-GAGGTCTTGCCCACACACAGTGCTGC-3′；EGFR探针序列为：5′-CGATCCCCAGGGCCACCACCAGCAGC-3′。

1.3 统计学处理

应用SPSS 12.0统计软件处理数据。各组裸鼠移植瘤组织中NS、EGF、EGFR蛋白及其mRNA阳性表达率差异性比较采用行×列表的精确概率法。

2 结果

2.1 EC9706细胞株异种移植瘤动物模型的建立

无关siRNA对照组、空白对照组裸鼠，经过4 d的成瘤潜伏期后，在其接种部位形成肉眼可见的肿块，而siRNA干预组裸鼠出瘤的时间较前2组延长2 d。5周3组裸鼠皮下均形成瘤体，3组裸鼠成瘤率均为100%。

2.2 裸鼠肿瘤组织中蛋白的表达

2.2.1 NS蛋白的表达 免疫组织化学检测结果显示，空白对照组、无关siRNA对照组可见到NS蛋白阳性染色，呈棕黄色颗粒，阳性信号定位于细胞核，而siRNA干预组裸鼠肿瘤组织未见到NS蛋白阳性染色（图1）。空白对照组、无关siRNA对照组和siRNA干预组NS蛋白表达阳性率分别为100%（5/5）、60.0%（3/5）和0（0/5），3组间差异显著（$P=0.009$）。

2.2.2 EGF蛋白的表达 免疫组织化学结果显示，空白对照组及无关siRNA对照组裸鼠肿瘤组织均可见到EGF蛋白阳性染色，呈棕黄色颗粒，阳性信号定位于细胞质，而siRNA干预组未见到EGF蛋白阳性染色（图1）。空白对照组、无关siRNA对照组和siRNA干预组间EGF蛋白阳性表达率分别为100%（5/5）、80%（4/5）和0（0/5），3组间差异显著（$P=0.006$）。

2.2.3 EGFR蛋白的表达 免疫组织化学结果显示，空白对照组及无关siRNA对照组裸鼠肿瘤组织均可见到EGFR蛋白阳性染色，呈棕黄色颗粒，阳性信号定位于细胞质，而siRNA干预组未见到EGFR蛋白阳性染色（图1）。空白对照组、无关siRNA对照组和siRNA干预组间EGF蛋白阳性表达率分别为100%（5/5）、80%（4/5）和0（0/5），3组间EGF蛋白表达差异显著（$P=0.006$）。

2.3 裸鼠肿瘤组织中mRNA的表达

2.3.1 NS mRNA的表达 原位杂交结果显示，阳性信号呈紫蓝色颗粒，定位于细胞质（图2）。空白对照组、无关siRNA对照组和siRNA干预组间NS mRNA表达阳性率分别为100%（5/5）、100%（5/5）和20%（1/5），3组间差异显著（$P=0.011$）。

2.3.2 EGF mRNA的表达 原位杂交结果显示，空白对照组及无关siRNA对照组裸鼠肿瘤组织均可见到EGF mRNA阳性表达，呈紫蓝色颗粒，阳性信号定位于细胞质，而siRNA干预组EGF mRNA阳性表达率降低（图2）。空白对照组、无关siRNA对照组和siRNA干预组间EGF mRNA阳性表达率分别为100%（5/5）、100%（5/5）和20%（1/5），3组间差异显著（$P=0.011$）。

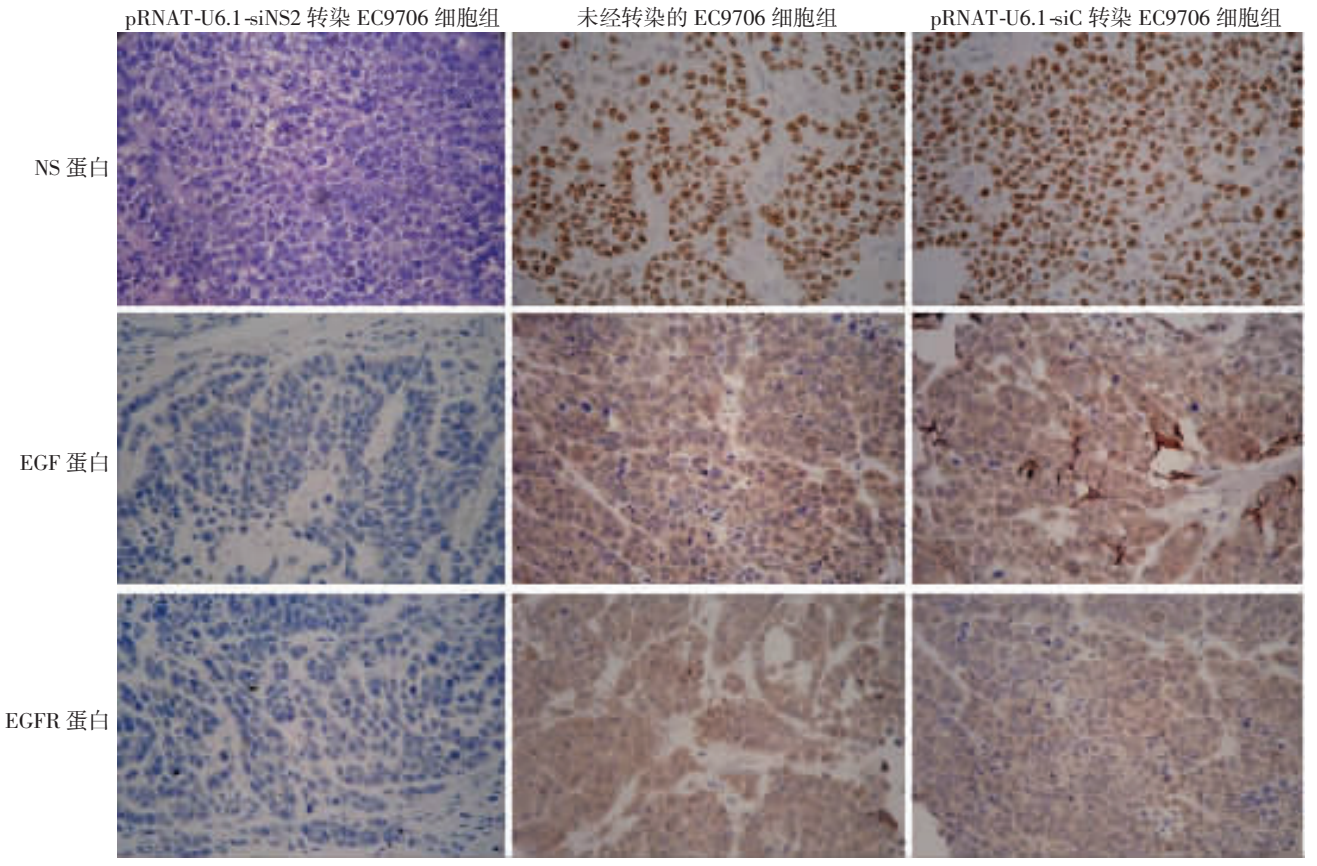


图1 免疫组化染色检测裸鼠皮下移植瘤组织中蛋白的表达 （SABC ×200）

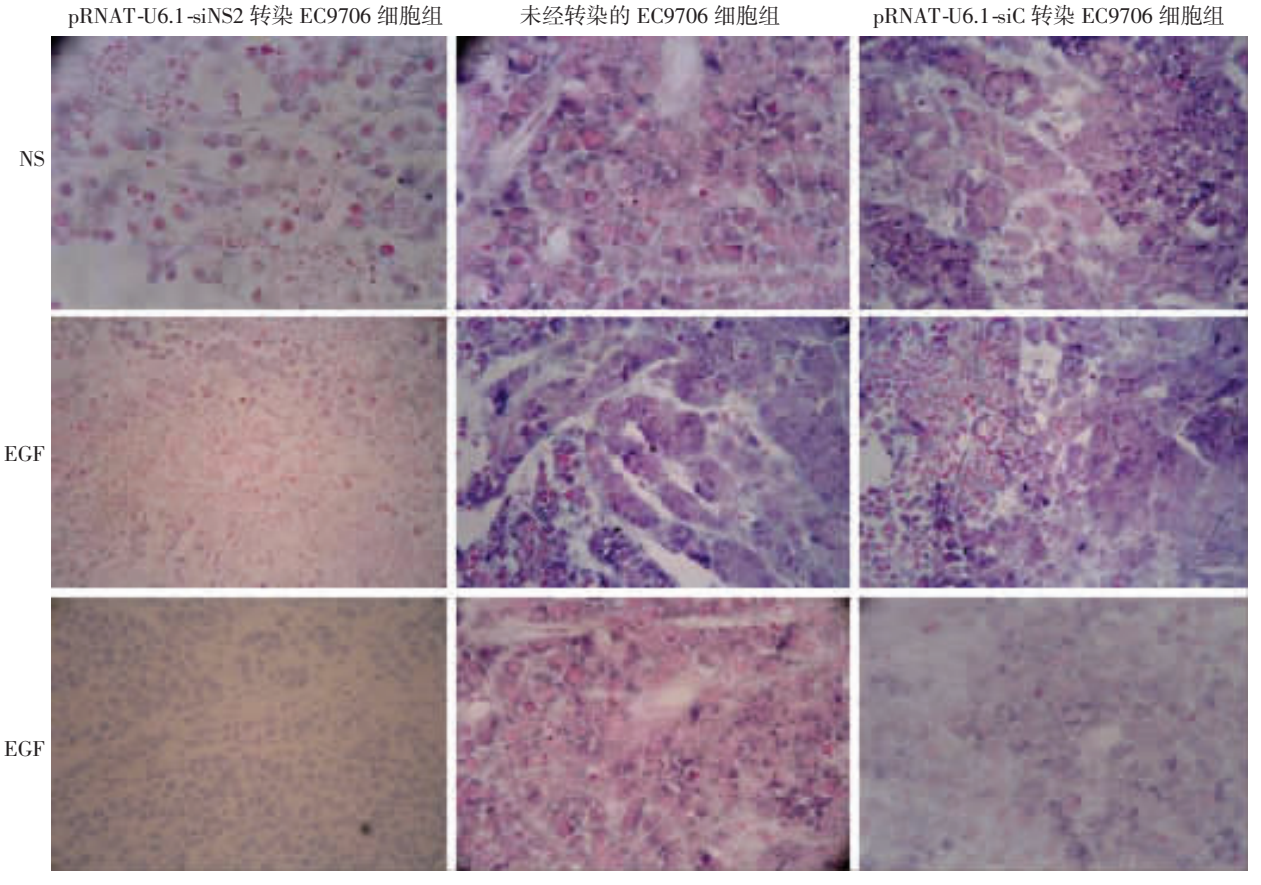


图2 原位杂交法检测裸鼠移植瘤组织中 mRNA 的表达 （LM ×400）

2.3.3 EGFR mRNA的表达 原位杂交结果显示,空白对照组及无关siRNA对照组裸鼠肿瘤组织均可见到EGFR mRNA阳性表达,呈紫蓝色颗粒,阳性信号定位于细胞质,而siRNA干预组未见到EGFR mRNA阳性表达(图2)。空白对照组、无关siRNA对照组和siRNA干预组间EGFR蛋白阳性表达率分别为100%(5/5)、80%(4/5)和0(0/5),3组间阳性表达率差异显著($P=0.006$)。

3 讨论

NS是2002年新发现的一个与细胞增殖相关的蛋白质,NS蛋白可能是维持干细胞和癌细胞增殖所必需的蛋白质并使细胞保持在不分化状态[7-9]。其异常表达可能与多种实体肿瘤的增殖、分化密切相关[10-12]。国内有研究表明,沉默NS基因的表达可对HL-60白血病细胞有抑制增殖和促分化作用,改变了细胞的生物学性质,使细胞恶性程度有所减弱,并有可能诱发凋亡,在白血病的基因中具有潜在的临床价值[13]。本实验前期的研究结果显示:食管鳞状细胞癌组织中存在NS高表达,并且在食管鳞状细胞癌的发生、发展及浸润、转移过程中起着非常重要的作用[1-3]。为进一步了解沉默NS基因对EC9706细胞移植瘤生长的影响,将siRNA干预、空白对照及无关siRNA对照3组肿瘤细胞培养后分别种植于裸鼠皮下,结果发现,无关siRNA对照组、空白对照组均于接种后4 d出现肉眼可见的瘤体,而siRNA干预组裸鼠出瘤的时间较前2组延长2 d。接种后5周,3组裸鼠皮下均形成了瘤体,人食管癌EC9706细胞株异种移植成功率达到100%。结果提示皮下注射成瘤的方式建立人食管癌EC9706细胞株异种移植瘤动物模型是成功的。

采用免疫组织化学方法及原位杂交技术检测了不同组移植瘤组织中的NS、EGF和EGFR蛋白和mRNA的表达,结果显示siRNA干预组、无关siRNA对照组及空白对照组裸鼠移植瘤组织中NS、EGF、EGFR蛋白和mRNA的阳性表达率差异均有统计学意义($P<0.05$)。相对于无关siRNA对照组和空白对照组,siRNA干预组裸鼠肿瘤组织中NS蛋白及mRNA的阳性表达率均降低,这就提示pRNAT-U6.1-siNS2能从蛋白及mRNA水平特异性调节NS的表达,使NS基因沉默。NS基因沉默之后,EGF、EGFR蛋白及mRNA的表达阳性率同样也存在显著下降的趋势,这就提示NS基因沉默降低了移植瘤组织中EGF及EGFR基因的表达。

综上所述,成功建立了裸鼠食管癌移植瘤模型,该裸鼠移植瘤模型可作为临床研究人食管鳞状细胞癌与NS关系的动物模型。沉默NS基因可明显下调裸鼠移植瘤组织中NS、EGF、EGFR蛋白和mRNA的表达。

参考文献:

[1] 张功员,陈萍萍,李晟磊,等. 食管鳞状细胞癌组织中核干细胞因子基因mRNA的表达[J]. 中华医学杂志,2008,88(9):602-605.

[2] 张功员,尹磊,李晟磊,等. 食管鳞状细胞癌组织中核干细胞因子蛋白和mRNA的半定量表达[J]. 中华肿瘤杂志,2008,30(2):125-128.

[3] 张功员,尹磊,李晟磊,等. 食管鳞状细胞癌组织中核干细胞因子、表皮生长因子和表皮生长因子受体mRNA的表达[J]. 解剖学报,2008,39(6):862-866.

[4] 张功员,赵国强,尹磊,等. 核干细胞因子基因siRNA表达载体的构建及鉴定[J]. 南方医科大学学报,2008,28(3):392-395,398.

[5] Yamada A, Saito N, Kameoka S, *et al*. Clinical significance of epidermal growth factor (EGF) expression in gastric cancer[J]. Hepatogastroenterology, 2007, 54(76):1049-1052.

[6] 尹磊,张功员,刘键,等. 食管鳞状细胞癌组织中EGF蛋白和mRNA的表达[J]. 郑州大学学报:医学版,2007,42(6):1099-1101.

[7] Lo D, Lu H. Nucleostemin: Another nucleolar "Twister" of the p53-MDM2 loop[J]. Cell Cycle, 2010, 9(16):3227-3232.

[8] Tamase A, Muraguchi T, Naka K, *et al*. Identification of tumor-initiating cells in a highly aggressive brain tumor using promoter activity of nucleostemin[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(40):17163-17168.

[9] Tsai R Y. Nucleolar modulation of TRF1: a dynamic way to regulate telomere and cell cycle by nucleostemin and GNL3L[J]. Cell Cycle, 2009, 8(18):2912-2916.

[10] Rosby R, Cui Z, Rogers E, *et al*. Knockdown of the Drosophila GTPase nucleostemin 1 impairs large ribosomal subunit biogenesis, cell growth, and midgut precursor cell maintenance[J]. Mol Biol Cell, 2009, 20(20):4424-4434.

[11] Huang M, Itahana K, Zhang Y, *et al*. Depletion of guanine nucleotides leads to the Mdm2-dependent proteasomal degradation of nucleostemin[J]. Cancer Res, 2009, 69(7):3004-3012.

[12] Ohmura M, Naka K, Hoshii T, *et al*. Identification of stem cells during prepubertal spermatogenesis via monitoring of nucleostemin promoter activity[J]. Stem Cells, 2008, 26(12):3237-3246.

[13] 岳保红,朱晓燕,张功员,等. 核干细胞因子特异性短发夹状RNA对HL-60细胞分化抗原和生物学性质的影响[J]. 第三军医大学学报,2006,28(11):1191-1194.

(收稿:2011-02-13 修回:2011-04-13)

(编辑 张 维)