文章编号:1000-5404(2012)01-0009-04

论著

RNA 干扰 PDK-1 对 5-FU 诱导结肠癌细胞凋亡的促进作用

谢赣丰,梁后杰,童晶涛,何金霞 (400038 重庆,第三军医大学西南医院肿瘤科)

[摘要] **目的** 探讨以丙酮酸脱氢酶激酶-1(pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 1, PDK-1)为靶标的短发夹 RNA(shRNA)与化疗药 5-氟尿嘧啶(5-FU)联合应用对人结肠癌 LS174T 细胞的促凋亡作用。**方法** 针对 PDK-1 序列设计 3 段干扰序列及 1 个阴性对照,分别构建 pGenesil. 1-PDK-1 重组质粒表达载体及 pGenesil. 1-NC 阴性对照载体,利用脂质体分别将质粒转染入 LS174T,并用 G418 对细胞进行药物筛选,并通过 Real-time PCR 和 Western blot 检测有干扰序列的有效性。MTT 实验检测 5-FU 对干扰组和对照组细胞生长、增殖的影响,流式细胞仪检测细胞凋亡率。**结果** Real-time PCR 和 Western blot 证实 3 个干扰组均抑制 PDK-1 表达,其中最大敲减效率超过 70%。MTT 实验结果显示,经 5-FU 同样处理 48 h 后,PDK-1 干扰的 LS174T 细胞生长抑制率较对照组显著增高($P<0.05$);流式细胞仪结果显示,干扰组细胞凋亡率较对照组增高($P<0.05$)。**结论** PDK-1 shRNA 能特异性下调 LS174T 细胞中 PDK-1 的表达,PDK-1 干扰联合 5-FU 可促进结肠癌细胞化疗诱导凋亡。

[关键词] 结肠肿瘤; 丙酮酸脱氢酶激酶-1; 细胞增殖; 化学治疗; 凋亡
[中图法分类号] R394-33; R730.23; R735.35 [文献标志码] A

Promoting effect of RNA-interfered pyruvate dehydrogenase kinase isozyme-1 on 5-fluorouracil-induced apoptosis of colon cancer cells

Xie Ganfeng, Liang Houjie, Tong Jingtao, He Jinxia (Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 1 (PDK-1) on 5-fluorouracil (5-FU)-induced apoptosis of colon cancer cells. **Methods** Three interference sequences (interference group) and a negative control sequence of PDK-1 shRNA (control group) were designed to construct pGenesil-1 recombinant plasmid expression vector and pGenesil. 1 negative control (pGenesil. 1-NC) plasmid vector, respectively. The plasmid was transfected into LS174T cells using liposome and drugs were screened with G418. Effect of RNA interference on 5-FU-induced apoptosis of colon cancer cells was detected by real-time PCR and Western blotting, respectively. Effect of 5-FU on growth and apoptosis of colon cancer cells was detected by MTT assay and flow cytometry, respectively. **Results** Real-time PCR and Western blotting showed that the 3 interference sequences of PDK-1 shRNA inhibited the expression of PDK-1 in LS174T cells, with a maximum inhibitory rate of over 70%. MTT assay demonstrated that the growth inhibiting rate of LS174T cells interfered with PDK-1 was significantly higher in interference group than in control group 48 h after 5-FU was used ($P<0.05$). Flow cytometry displayed that the apoptosis rate of colon cancer cells was significantly higher in interference group than in control group ($P<0.05$). **Conclusion** PDK-1 shRNA can down-regulate the expression of PDK-1 in LS174T cells and PDK-1 interference in combination with 5-FU can promote the apoptosis of colon cancer cells.

[**Key words**] colon neoplasms; pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 1; proliferation; chemotherapy; apoptosis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30873015). Corresponding author: Liang Houjie, Tel: 86-23-68754128, E-mail: lianghoujie@sina.com

结肠癌是世界死因顺位中列第 3 位的肿瘤[1]。尽管结肠癌的治疗手段有很大进展,但多年来晚期结肠癌的 5 年生存率并无多大改观。化疗作为结肠癌的重要治疗手段,却面临越来越频繁的耐药难题,因此,探寻提高结肠癌化疗效果的新策略是目前非常迫切的任务[2]。丙酮酸脱氢酶激酶(pyruvate dehydrogenase kinase, PDK)是细胞糖酵解关键限速酶丙酮酸脱氢酶(PDH)的调节酶[3]。PDK1 蛋白兼有促进能量 ATP 合

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30873015)
[通信作者] 梁后杰,电话:(023) 68754128, E-mail: lianghoujie@sina.com

成和影响凋亡的双重功能,因此推测 PDK1 可能具有影响肿瘤化疗效果的作用[4]。本研究构建了针对 PDK-1 mRNA 的短发夹 RNA(shRNA)干扰载体,转染结肠癌 LS174T 细胞,观察其是否促进 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)诱导的 LS174T 细胞凋亡效应。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞 人结直肠癌 LS174T 细胞株为第三军医大学西南医院肿瘤科液氮冷冻保存。

1.1.2 实验试剂 DMEM 细胞培养液、优级胎牛血清及青/链霉素双抗均购自 Gibco 公司;限制性内切酶 *Bam*HⅠ、*Hind*Ⅲ、Lipofectamine™ 2000 及 Trizol 均购自 Invitrogen 公司;DNA 连接试剂盒和质粒小量抽提试剂盒均购自 Promega 公司;ReverTra Ace 逆转录试剂盒购自 Toyobo 公司;荧光染料 SYBR® Green Ⅰ购自 TaKaRa 公司;兔抗人 PDK1 单克隆抗体购自 Abcam 公司;G418 购自 Sigma 公司;BCA 蛋白定量试剂盒、ECL 化学发光试剂盒购自 Pierce 公司;蛋白预染 Marker、DNA Marker 购自 Fermentas 公司;RIPA 蛋白裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒和 PI 荧光染料均购自江苏碧云天公司;二甲基四氮唑蓝(MTT)购自上海博鑫;注射用 5-FU 购自山东德州德药制药有限公司。其余试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人结肠癌 LS174T 置于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青链霉素的高糖 DMEM 细胞培养液中,于 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度的孵箱中培养 5 代,实验时取对数生长期细胞。

1.2.2 质粒构建 根据 GenBank PDK-1 mRNA 序列(NM_002610)和 shRNA 的设计原则,利用在线设计软件寻找靶序列,并作同源序列搜索排除和其他编码序列或 EST 同源的序列如下。第 1 对:正义链 5′-UGCUUGUGAAAAGACCUCATT-3′,反义链 5′-UGAGGUCUUUUCACAAGCATT-3′;第 2 对:正义链 5′-AAGACCUCAUUUAUGUUUCTT-3′,反义链 5′-GAAACAUAAAUGAGGUCUUTT-3′;第 3 对:正义链 5′-GACCUCAUUUAUGUUUCUGTT-3′,反义链 5′-CAGAAACAUAAAUGAGGUCTT-3′;无关序列:正义链 5′-AGAAAUAAGUCUCCAGAUATT-3′,反义链 5′-UAUCUGGAGACUUAUUUCUTT-3′。武汉晶赛生物工程技术有限公司合成序列。将合成的 3 个目的片段和 1 个无关序列对照片段分别经退火处理,从而得到 4 对 siRNA 序列,pGenesil-1 干扰质粒经 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ双酶切、纯化,然后通过 DNA 连接试剂盒分别与 4 对 siRNA 序列连接,构建干扰质粒,分别命名为 pGenesil-1-PDK-1/1(简称 pv1)、pGenesil-1-PDK-1/2(pv2)、pGenesil-1-PDK-1/3(pv3)和 pGenesil-1-NC(pNC)。提取质粒 DNA,并送上海生工进行序列分析。

1.2.3 细胞转染 采用阳性脂质体 Lipofectamine™ 2000 介导转染。转染前将对数生长期的 LS174T 细胞以每孔 5×10^4/ml 接种于 24 孔板中。在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,于 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养,待细胞融合率达 70% 后,按说明书进行转染,转染 8 h 后更换正常培养液,其后每 2 天换液。细胞转染后 24 h 按 1∶9的比例传代,48 h 后开始用含 500 μg/ml G418 的选择性培养液进行筛选,2~3 周以后克隆形成。以克隆环挑取细胞克隆转移至 6 孔板扩大培养、传代,最后转入 60 ml 培养瓶。

1.2.4 Real-time PCR 根据 PDK1 mRNA 序列由 TaKaRa 公司设计合成 PDK1 基因及内参物 β-actin 基因 PCR 扩增引物,各引物序列如下:β-actin 正义链 5′-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3′,反义链 5′- CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG-3′,产物大小 553 bp;PDK-1 正义链 5′-AAGATGAGTGACCGAGGAGGT-3′,反义链 5′-CCATAACCAAAACCAGCCAGAG-3′,产物大小 131 bp。按 Trizol 试剂盒说明书提取细胞 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 含量和纯度。按照逆转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA。用 SYBR® Green Ⅰ嵌合荧光法进行 PCR 扩增。反应总体积为 20 μl,其中 SYBR® *Premix Ex Taq*™ Ⅱ 10 μl,ROX Reference Dye 0.4 μl,上下游引物各 0.8 μl,去 RNA 酶双蒸水补足至20 μl。反应包括 3 个阶段,第 1 阶段:95 ℃预变性 30 s;第 2 阶段:95 ℃变性 5 s 后 60 ℃退火 30 s,共执行 35 个循环;第 3 阶段:95 ℃变性 15 s 后 60 ℃ 退火 60 s,95 ℃ 15 s。反应结束后,由电脑自动分析并计算 Ct 值。选用 β-actin 作为内参基因,采用 $2^{-\triangle(\triangle Ct)}$ 法分析基因表达差异。$\triangle Ct = Ct_{target} - Ct_{control}$;$\triangle\triangle Ct = \triangle Ct_{target} - \triangle Ct_{untreated}$。

1.2.5 Western blot 检测 RIPA 裂解液裂解细胞提取细胞内蛋白,BCA 法进行蛋白质定量,用 SDS-PAGE 进行电泳分离,转 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加 PDK-1 一抗(1∶400),4 ℃ 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,加辣根过氧化物酶标记二抗(1∶500),室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次,用 ECL 显色并曝光显影。

1.2.6 MTT 法检测细胞活性 向 96 孔板加入浓度为 1×10^4/ml 的各组细胞,每孔 100 μl,并培养 24 h。加入梯度浓度的 5-FU 各 100 μl,继续培养 48 h。于每孔加入 20 μl MTT 液(5 mg/ml),4 h 弃培养基后滴加 150 μl 二甲基亚砜(DMSO)。采用 Model550 酶标仪检测 490 nm 波长下的光密度值[D(490)值],药物的细胞抑制率根据公式计算:抑制率 =[1 − 平均 D(490)值$_{实验孔}$/平均 D(490)值$_{对照孔}$]×100%。实验重复 5 次。并计算其 IC_{50}。

1.2.7 流式细胞术 FITC/PI 双染检测细胞凋亡 将 1×10^6 个细胞接种于 6 孔板中,分别用 10 μmol/L 的 5-FU 处理 24 h。0.25% 胰酶消化收集细胞后,用预冷 PBS 重悬细胞 1 次,洗涤。加 300 μl 1×Buffer 悬浮细胞后,加 5 μl Annexin V-FITC,避光 15 min。加 5 μl PI 标记,上机检测。

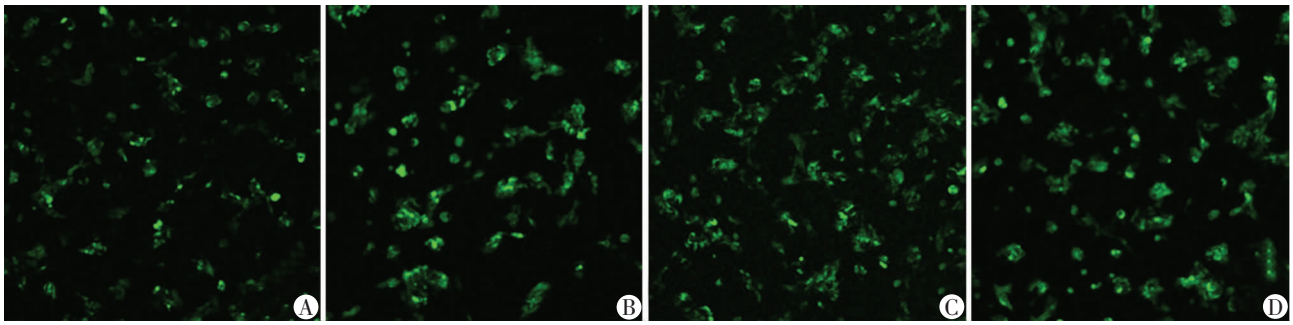
1.3 统计学分析

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

2 结果

2.1 PDK-1 shRNA 干扰质粒构建、细胞转染、稳定筛选及鉴定

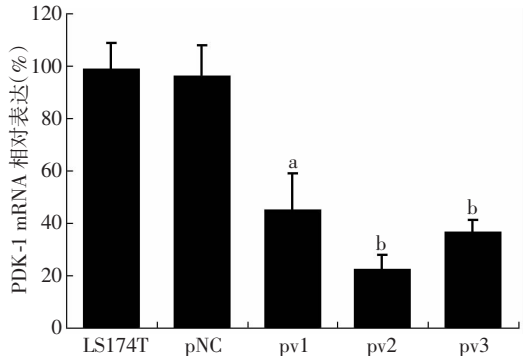
经上海生工测序鉴定,构建的 3 个干扰质粒及对照质粒与预期一致。将这 4 个质粒分别转染 LS174T 细胞,48 h 后荧光显微镜下观察其转染情况。绿色荧光显示,转染效率均达到 80% 以上(图 1)。转染后 72~96 h 收集细胞,定量 PCR 检测 PDK-1 mRNA 表达显示3组干扰质粒均可以下调LS174T细胞



A:pv1;B:pv2;C:pv3;D:pNC

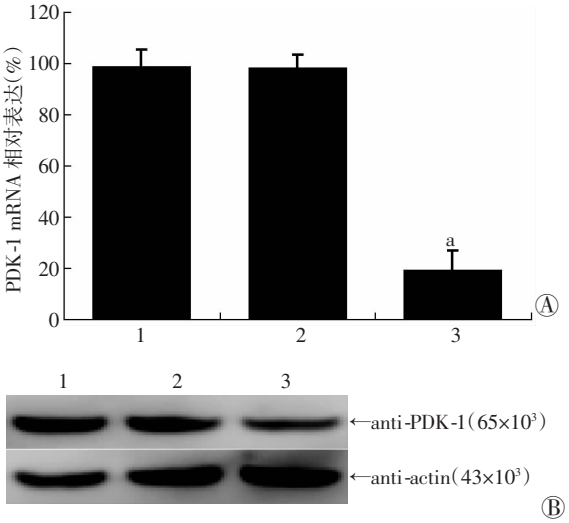
图 1　激光共聚焦显微镜观察各组转染 LS174T 细胞的情况　(×200)

中 PDK-1 mRNA 的表达,干扰质粒 2(pv2)具有最好的敲低效果(图 2),后续试验选取该质粒作为干扰质粒。将获取的有效干扰靶点质粒和对照质粒分别转染 LS174T 细胞,G418 筛选后经定量 PCR 和 Western blot 检测显示 pv2 转染的 LS174T 细胞中 PDK-1 mRNA 及蛋白表达均显著低于正常对照及阴性对照组(pNC)细胞,敲减效率 >70%(图 3)。



1:空质粒转染组;2:无关干扰质粒转染组;3~5:靶向干扰质粒转染 pv1、pv2、pv3 组　a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与 LS174T 和 pNC 组比较

图 2　重组干扰对 LS174T 细胞中 PDK-1 mRNA 的抑制作用



1:正常对照;2:无关序列对照;3:干扰序列

A:Real-time PCR 检测 PDK-1 mRNA 表达　a:$P<0.01$,与正常对照和无关序列对照比较;B:Western blot 检测 PDK-1 蛋白表达

图 3　pv2 稳定转染 LS174T 细胞后检测干扰效率

2.2　MTT 法检测 IC_{50} 值

PDK-1-shRNA LS174T 细胞 5-FU 的 IC_{50} 值为(1.342 ± 0.023)μmol/L,对照组细胞 5-FU 的 IC_{50} 值为(3.561 ± 0.249)μmol/L,两者的差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.3　Annexin V 检测 5-FU 作用后细胞的凋亡

在同样的 10 μmol/L 5-FU 刺激细胞 24 h 后,对照组 LS174T 细胞凋亡率为(34 ± 13)%,而干扰组细胞凋亡率则高达(66 ± 15)%,两者差异有统计学意义($P<0.01$)。

3　讨论

近年来结肠癌在我国的发病率和死亡率逐年升高。在结肠癌的治疗中,外科手术和放疗等局部治疗手段难以控制肿瘤的复发转移。而以 5-FU 为一线药物的化疗,却因为组织选择性和特异性差,对骨髓等高代谢组织造成较大的损伤,给患者带来了严重的并发症[5]。加之肿瘤对化疗药物的耐药现象长期存在,因此临床上常联合使用多种化疗药物。然而严重的并发症使患者的生活质量和生存时间明显降低,因而寻求新的治疗方法迫在眉睫[6]。

细胞增殖与细胞凋亡是细胞生存中两种相互制约的生命活动。细胞增殖与凋亡相互平衡才能维持组织器官正常的生理功能和细胞数的稳定,否则可导致肿瘤发生和发展。细胞分化、增殖和凋亡紊乱,几乎是恶性肿瘤发生机制的全部内容。PDK1 作为糖酵解关键限速酶的激酶,可通过调控能量代谢促进肿瘤细胞的增殖,拮抗凋亡[7]。因此,PDK1 作为抗肿瘤的靶点正受到密切关注[8]。前期试验表明 PDK1 在结肠癌组织和细胞中表达上调,且 PDK1 的表达与结肠癌的分化、分期以及淋巴结转移有关[9],提示 PDK1 在结肠癌的分化、进展和转移中可能有着重要的作用。

既往相关研究也发现抑制 PDK1 的活性可以抑制肿瘤细胞的活性和增殖,目前该研究在肺癌、前列腺癌、乳腺癌等肿瘤细胞中已经得到证实[10-12]。本研究采用干扰质粒敲低结肠癌细胞 LS174T 的 PDK-1 表

达,检测了在不同浓度5-FU作用该组细胞和对照细胞的半数抑制率,实验结果表明,PDK-1干扰的LS174T细胞的IC_{50}数值显著低于对照组细胞。说明抑制PDK-1后结肠癌LS174T对5-FU治疗更敏感,使结肠癌细胞在较低的药物浓度下达到较高的凋亡率。

在哺乳动物体内目前鉴定出PDK 1~4这4种同工酶,其在不同的组织中表达丰度各异。我们既往研究表明PDK特异性抑制剂二氯乙酸盐(DCA)可增强5-FU诱导的结肠癌细胞凋亡[13],但究竟通过对何种同工酶作用尚无定论,本研究结果证实PDK-1抑制对5-FU诱导结肠癌细胞凋亡的促进作用。

总之,本研究表明通过RNA干扰抑制PDK-1表达联合5-FU可促进结肠癌细胞化疗诱导凋亡,为基因治疗和化学药物联合治疗大肠癌提供新的策略。

参考文献:

[1] Jemal A, Siegel R, Xu J, *et al*. Cancer statistics, 2010[J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277-300.

[2] Wolpin B M, Mayer R J. Systemic treatment of colorectal cancer[J]. Gastroenterology, 2008, 134(5): 1296-1310.

[3] Holness M J, Sugden M C. Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation[J]. Biochem Soc Trans, 2003, 31(Pt 6): 1143-1151.

[4] Roche T E, Hiromasa Y. Pyruvate dehydrogenase kinase regulatory mechanisms and inhibition in treating diabetes, heart ischemia, and cancer[J]. Cell Mol Life Sci, 2007, 64(7/8): 830-849.

[5] Rustum Y M. Clinical implications of 5-FU modulation[J]. Oncology (Williston Park), 1999, 13(7 Suppl 3): 22-25.

[6] Catenacci D V, Kozloff M, Kindler H L, *et al*. Personalized colon cancer care in 2010[J]. Semin oncol, 2011, 38(2): 284-308.

[7] Chen Y, Cairns R, Papandreou I, *et al*. Oxygen consumption can regulate the growth of tumors, a new perspective on the Warburg effect [J]. PLoS One, 2009, 4(9): e7033.

[8] Sheng H, Niu B, Sun H. Metabolic targeting of cancers: from molecular mechanisms to therapeutic strategies[J]. Curr Med Chem, 2009, 16(13): 1561-1587.

[9] 童晶涛, 梁后杰, 陈建芳, 等. 丙酮酸脱氢酶激酶-1在人结肠癌中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(3): 257-260.

[10] Michelakis E D, Webster L, Mackey J R. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer[J]. Br J Cancer, 2008, 99(7): 989-994.

[10] Wong J Y, Huggins G S, Debidda M, *et al*. Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells[J]. Gynecol Oncol, 2008, 109(3): 394-402.

[12] Cao W, Yacoub S, Shiverick K T, *et al*. Dichloroacetate (DCA) sensitizes both wild-type and over expressing Bcl-2 prostate cancer cells *in vitro* to radiation[J]. Prostate, 2008, 68(11): 1223-1231.

[13] Tong J, Xie G, He J, *et al*. Synergistic antitumor effect of dichloroacetate in combination with 5-fluorouracil in colorectal cancer[J]. J Biomed Biotechnol, 2011, 2011: e740564.

(**收稿**:2011-08-31;**修回**:2011-11-29)

(编辑 汪勤俭)

(上接4页)

2 讨论

Sturge-Weber综合征主要是由于胚胎早期血管系统发育异常所致,可累及软脑膜及三叉神经分布区域的面部血管。Sturge于1879年最先提出患者癫痫发作可能是脑内有与面部血管瘤相似的血管瘤有关,Weber于1922年首次使用X线检查,发现此病患者的颅内有大片钙化灶,故又称之为Sturge-Weber综合征。

Sturge-Weber综合征的典型临床表现包括:偏侧性葡萄酒色或鲜红色血管痣、癫痫发作、智能减退,少数患者可合并青光眼与眼球突出,还可合并隐睾、脊柱裂等先天畸形[2-4]。CT和磁共振作为确诊该病的重要手段,可以表现为:脑叶萎缩,脑回状皮质钙化,脉络膜丛扩大,病侧颅骨增厚和血管畸形等。CT对钙化较敏感,可以清晰地显示颅内的病理改变,MRI能清楚地显示脑萎缩所引起的颅内解剖结构的细微改变和程度,还可以清楚地显示软脑膜血管瘤及脉络膜丛的扩大,以及深静脉的异常[5]。MRI增强扫描可精确显示软脑膜血管瘤及其伴发的血管异常(表现为特征性的脑回样强化),对定性诊断具有重要作用。本例患儿具有其典型的表现:颜面血管瘤、癫痫发作,同时患儿合并青光眼。脑电图提示左侧脑电波频率较右侧减慢,左侧脑电波的波幅较右侧降低,头颅MRI可见左侧大脑较右侧明显萎缩,增强后有脑回强化的典型表现。目前对该病无特殊的治疗方法,主要是对症处理,关于Sturge-Weber综合征继发青光眼,目前治疗以手术为主,同时予以控制癫痫发作,但患者一般预后差。

参考文献:

[1] 陈祖培, 杨小庆. 临床综合征影像学[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2000: 238.

[2] Thomas-sohl K A, Vaslow D F, Maria B L. Sturge-Weber syndrome: a review [J]. Pediatr Neurol, 2004, 30(5): 303-310.

[3] Ouigg M, Rust R S, Miller J Q. Clinical findings of the phakomatoses: Sturge-Weber syndrome [J]. Neurology, 2006, 66 (4): E17-E18.

[4] Comi A M. Update on Sturge-Weber syndrome: diagnosis, treatment, quantitative measures, and controversies [J]. Lymphat Res Biol, 2007, 5(4): 257-264.

[5] 陈星荣, 沈天真, 段承祥, 等. 全身CT和MRI[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1999: 104.

(**收稿**:2011-08-31;**修回**:2011-09-23)

(编辑 王小寒)