论著

文章编号:1000-5404(2012)01-0020-04

RNA干扰HER2/neu对膀胱癌BIU-87细胞增殖和凋亡的影响

李永生[1],赵 诚[1],刘锦裕[2],胡 钊[1],黄玉清[1] (350001 福州,福建医科大学附属协和医院泌尿外科[1];351100 福建 莆田,莆田学院附属医院泌尿外科[2])

[摘要] **目的** 研究靶向HER2/neu基因的siRNA对膀胱癌BIU-87细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 化学合成的靶向HER2/neu基因siRNA在脂质体的介导下转染BIU-87细胞,实验分为HER2/neu siRNA组、空脂质体组、阴性siRNA序列组,以未转染BIU-87细胞为空白对照组。利用CCK-8法评价HER2/neu基因siRNA对BIU-87细胞体外生长的抑制作用,流式细胞术检测细胞凋亡情况,通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和Western blot法检测转染前后细胞中HER2/neu mRNA和蛋白表达水平的变化。**结果** 转染HER2/neu siRNA后BIU-87细胞的存活率显著下降,从(82.37±0.90)%降低到(56.76±1.70)%,差异有统计学意义($P<0.05$);同时能诱导细胞凋亡,HER2/neu siRNA组凋亡率达(45.60±0.70)%,与空白对照组、空脂质体组、阴性siRNA序列组比较差异有统计学意义($P<0.05$);靶向HER2/neu基因siRNA能显著降低BIU-87细胞中HER2/neu mRNA和蛋白的表达($P<0.05$)。**结论** 化学合成的靶向HER2/neu基因siRNA能有效抑制HER2/neu基因在BIU-87细胞中的表达,进而能有效抑制BIU-87细胞的增殖和诱导凋亡的作用。

[关键词] 膀胱癌;RNA干扰;HER2/neu;siRNA
[中图法分类号] R394-33; R730.23; R737.14 [文献标志码] A

Effect of RNAi-mediated gene silencing of HER2/neu on proliferation and apoptosis in bladder cancer cell line BIU-87

Li Yongsheng[1], Zhao Cheng[1], Liu Jinyu[2], Hu Zhao[1], Huang Yuqing[1] ([1]Department of Urological Surgery, Union Clinical College of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian Province, 350001; Department of Urological Surgery, Affiliated Hospital of Putian College[3], Putian, Fujian Province, 351100, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the effect of small interfering RNA (siRNA)-mediated gene silencing of HER2/neu on the proliferation and apoptosis in bladder cancer cell line BIU-87. Methods HER2/neu siRNA was chemically synthesized and transfected into BIU-87 cells mediated by liposome. BIU-87 cells with different treatments were divided into an HER2/neu siRNA group, an empty liposome group, a negative siRNA group and a non-transfection group was the control group. Inhibitory effect of HER2/neu siRNA on BIU-87 cell proliferation was assessed by CCK-8 assay. Cell apoptosis was examined by flow cytometry (FCM). mRNA and protein levels of HER2/neu in BIU-87 cells before and after transfection were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting. Results BIU-87 cells transfected with HER2/neu siRNA showed a significant decrease of cell viability from (82.37±0.90)% to (56.76±1.70)% ($P<0.05$) and cell apoptosis with a rate of (45.60±0.70)%, which was significantly different from that of the control group, empty liposome group and negative HER2/neu siRNA group ($P<0.05$). The siRNA targeting HER2/neu gene significantly reduced mRNA and the protein expressions of HER2/neu in BIU-87 cells ($P<0.05$). Conclusion Chemically synthesized siRNA targeting HER2/neu gene, which can effectively inhibit HER2/neu gene expression and subsequently inhibit cell proliferation and induce apoptosis in BIU-87 cells, is a potential target for gene therapy of bladder cancer.

[**Key words**] bladder cancer; RNA interference; HER2/neu; siRNA

Supported by the Youth Talent Project of Science and Technology of Department of Fujian Province (2007F3036). Corresponding author: Li Yongsheng, Tel: 86-591-83357896, E-mail: lysdr163@163.com

[基金项目] 福建省科技厅青年人才项目(2007F3036)
[通信作者] 李永生,电话:(0591)83357896,E-mail:lysdr163@163.com

膀胱癌是泌尿生殖系统中最常见的恶性肿瘤。大多数膀胱癌为移行细胞癌(transitional cell carcinoma, TCC)。HER2/neu 基因又称 CerbB-2,位于 17 号染色体长臂,编码为一种具有酪氨酸蛋白激酶(TPK)活性的物质,其表达产物是一种相对分子质量为 185×10^3 的细胞膜受体[1]。HER2/neu 基因的扩增及(或)蛋白的过度表达通常见于乳腺癌、卵巢、肺、膀胱肿瘤细胞上。HER2/neu 基因的扩增及(或)蛋白的过度表达往往伴随着患者生存期缩短,提前复发,是预后不良的表现。在 TCC 患者中,HER2/neu 表现为基因扩增和(或)蛋白产物过度表达。膀胱癌中 HER2/neu 基因过表达主要发生在晚期和高分级肿瘤,而针对 HER2/neu 等癌基因分子的抗肿瘤药物目前已成为肿瘤治疗的新方向[2]。RNA 干扰(RNA interferenc, RNAi)是指双链 RNA 介导的、序列特异的转录后基因沉默的过程。现如今 RNAi,尤其是引发 RNAi 现象的小片段 RNA 双链分子即小干扰 RNA (siRNA),已经成为生物学基础研究的重要工具。本实验应用 RNAi 研究靶向 HER2/neu 基因的 siRNA 沉默后对 HER2/neu 膀胱癌细胞增殖和凋亡的影响,旨在为膀胱癌的治疗提供新的治疗手段。

1 材料与方法

1.1 材料

膀胱移行细胞癌株 BIU-87,购自武汉细胞典藏中心。RPMI1640 培养基、胎牛血清(FBS)为 Gibco 公司产品,胰酶-EDTA 为 HyClone 公司。兔抗人 HER2/neu 一抗及 S-P 9001 检测试剂盒,购至中杉金桥;Trizol® Reagent, Agarose (Invitrogen 公司);RNA 引物由英韦创津公司合成;逆转录试剂盒、PCR 试剂盒(Fermentas 公司);DNA 标准购自上海生工, silencer siRNA-HER2/neu 由 Biomics 合成,Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 常规培养 BIU-87 细胞[3]。转染前 1 d 将对数生长期的 BIU-87 细胞以 3×10^5/ml 接种于 6 孔板,细胞铺板在 2 ml 含血清、不含抗生素的 RPMI1640 培养基中,于 24 h 内待细胞融合度达到 40% ~60% 时进行转染实验。

1.2.2 siRNA 脂质体复合体合成 取化学合成的 siRNA 稀释于无血清的 RPMI1640 培养基中,充分混匀。同法将 Lipofectamine2000 稀释于 RPMI1640 培养基中,室温孵育 5 min。二者充分混合后于室温下孵育 20 min,形成 siRNA-Lipofectamine2000 复合体。以上培养基用量各为 250 μl,siRNA 用量为 100 pmol,脂质体用量为 5 μl。具体操作参考文献[4]。

1.2.3 实验分组 共设 4 个组:HER2/neu siRNA 组、空脂质体组、阴性 siRNA 序列组、空白对照组(未转染 BIU-87 细胞),同步进行实验。

1.2.4 细胞对 siRNA 的摄取 将带有 FAM 荧光素标记的阴性对照 siRNA 依据转染试剂说明书进行转染细胞,评估细胞摄取 siRNA 情况。转染方法同 1.2.2。然后在荧光显微镜下观察细胞并计算转染率。

1.2.5 CCK-8 法检测沉默 HER2/neu 基因对膀胱癌细胞生长的影响 将处于对数生长期的膀胱癌细胞以胰酶消化制备单细胞悬液,以每孔 1×10^4 细胞接种于 96 孔培养板(每一处理组设 5 个复孔)。置于 37 ℃含 5% CO_2 培养箱中培养 24 h。以未转染为空白对照组,空脂质体组、阴性 siRNA 序列组、HER2/neu siRNA 组为实验组,以只加培养基不加细胞的空白对照孔调零。按上述脂质体转染试剂 Lipofectamine2000 的操作说明进行细胞转染。细胞转染 72 h 之后,每孔加入 15 μl CCK-8 试剂,继续培养 4 h。利用酶标仪测定 450 nm 处光密度值[D(450)]。细胞存活率 = 实验组 D(450)均值/对照组 D(450)均值 ×100%。实验重复 3 次。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞的凋亡 消化收集转染 72 h 后各组 BIU-87 细胞,用 PBS 洗涤细胞 2 次,收集 5×10^5 细胞;加入 500 μl 的 Binding Buffer 悬浮细胞;加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μl 碘化丙啶(propidium iodide, PI)混匀;室温避光反应 10 min;用流式细胞仪检测(Ex = 488 nm; Em = 530 nm)细胞凋亡的情况。

1.2.7 RT-PCR 法 转染 72 h 后收集各组 BIU-87 细胞,按 Trizol 试剂盒操作程序提取总 RNA。总 RNA 浓度和纯度用紫外分光光度计检测,之后按两步法进行 RT-PCR,以 β-actin 的扩增产物作为内参照。目的基因引物引自文献[5]。HER2/neu 基因上游引物序列:5′-GCCTGTGCCCACTATAAGGAC-3′,下游引物序列:5′-GCAGCTTCCGCATCGTGTA-3′,扩增产物长度 316 bp。内参 β-actin 上游:5′-AGCGGGAAATCGTGCGTGAC-3′,下游:5′-ACTCCTGCTTGCTGATCCACATC-3′,扩增产物长度 471 bp。PCR 反应条件:预变性 95 ℃、5 min,变性 94 ℃、45 s,延伸 72 ℃、45 s,最后延伸 7 min,退火温度 HER2/neu 为 52 ℃、内参 β-actin 退火温度为 60 ℃,总共 33 个循环。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶经电泳检测,在紫外线下透视成像拍照,使用视频图像分析系统进行半定量分析。

1.2.8 Western blot 法 收集转染后 72 h BIU-87 细胞,用含 RIPA 的裂解液提取总蛋白,用二喹林甲酸(bicinchoninic acid, BCA)测量总蛋白量,取等量总蛋白用质量分数为 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,用 PVDF 膜进行转膜。接着用 Western 封闭液封闭过夜后,与将兔抗人 HER2/neu 一抗用封闭液稀释 1 000 倍;将封闭后的膜直接放入一抗工作液中,4 ℃反应过夜。然后将羊抗兔 IgG 二抗用 1 × TBST 稀释 3 000 倍,将洗涤后的一抗反应膜放入二抗工作液中(室温、避光缓慢摇动)作用 60 min。ECL 试剂盒显色,拍照,采用美国 UVP 分析仪器,对胶片进行扫描,比较各组灰度变化

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件行,两样本之间用 t 检验,多样本比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 膀胱癌 BIU-87 细胞对 siRNA 的有效摄取

在膀胱癌 BIU-87 细胞转染 FAM-siRNA 后,荧光显微镜下观察显示:FAM-siRNA 在细胞内呈现并分布均匀,转染效率达到 80% 以上(图 1)。

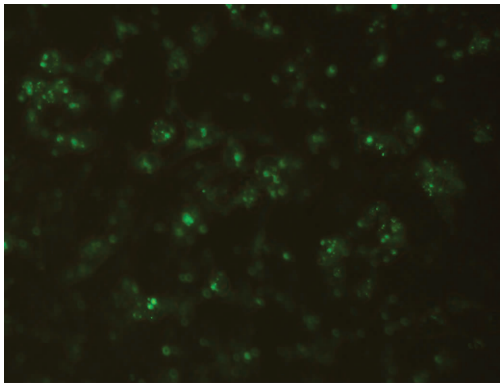
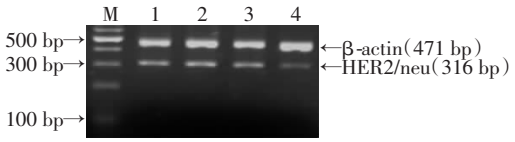


图1 膀胱癌 BIU-87 细胞转染 FAM-siRNA 24 h 后荧光显微镜观察 （×200）

2.2 转染 HER2/neu siRNA 对膀胱癌 BIU-87 细胞 HER2/neu mRNA 表达水平的影响

提取转染 72 h 后的细胞总 RNA，利用 RT-PCR 半定量方法检测各组细胞 HER2/neu 基因转录水平。琼脂糖凝胶电泳结果表明转染 HER2/neu siRNA 72 h 后的 BIU-87 细胞 HER2/neu mRNA 表达水平（0.26 ± 0.02）下调，与空白对照组（0.73 ± 0.03）、空脂质体组（0.71 ± 0.02）、阴性 siRNA 序列组（0.70 ± 0.01）比较差异有统计学意义（$P < 0.05$）。空白对照组、空脂质体组、阴性 siRNA 序列组组间差异无统计学意义（图 2，$P > 0.05$）。

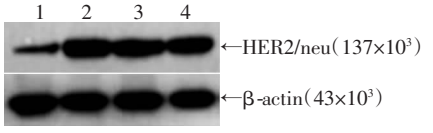


M：标准；1：空白对照组；2：空脂质体组；3：阴性 siRNA 序列组；4：HER2/neu siRNA 组

图2 HER2/neu siRNA 对膀胱癌 BIU-87 细胞 HER2/neu mRNA 水平的影响

2.3 转染 HER2/neu siRNA 对膀胱癌 BIU-87 细胞 HER2/neu 蛋白表达水平的影响

提取转染 72 h 后的细胞总蛋白进行 Western blot 分析，分析结果提示阴性 siRNA 序列组、空脂质体组、空白对照组蛋白相对表达量分别为（73.85 ± 0.01）%、（76.86 ± 0.01）%、（77.41 ± 0.02）%。发现空脂质体组及阴性 siRNA 序列组 HER2/neu 蛋白表达未受明显抑制，与空白对照组比较无显著差异（$P > 0.05$），HER2/neu siRNA 组蛋白相对表达量为（49.76 ± 0.01）%，与其余 3 组比较，HER2/neu 蛋白表达水平明显下调（$P < 0.05$），说明转染 HER2/neu siRNA 后能够有效地抑制转染细胞中 HER2/neu 蛋白的表达（图 3）。



1：HER2/neu siRNA 组；2：阴性 siRNA 序列组；3：空脂质体组；4：空白对照组

图3 HER2/neu siRNA 转染后膀胱癌 BIU-87 细胞 HER2/neu 蛋白的表达

2.4 HER2/neu siRNA 对膀胱癌 BIU-87 细胞生长的影响

CCK-8 法检测发现空脂质体组存活率为（79.59 ± 2.00）%，阴性 siRNA 序列组为（82.37 ± 0.90）%、HER2/neu siRNA 组为（56.76 ± 1.70）%。空脂质体组与阴性 siRNA 序列组之间存活率无显著性差异（$P > 0.05$），HER2/neu siRNA 组分别与空脂质体组、阴性 siRNA 序列组之间存在显著性差异（$P < 0.05$）。

2.5 转染 HER2/neu siRNA 对膀胱癌 BIU-87 细胞凋亡的影响

空白对照组、空脂质体组、阴性 siRNA 序列组细胞凋亡率分别为（3.87 ± 0.30）%、（5.50 ± 0.36）%、（5.33 ± 0.51）%，转染 HER2/neu siRNA 72 h 后，BIU-87 细胞凋亡率为（45.60 ± 0.70）%，与前 3 组比较有显著性差异（$P < 0.01$）。说明转染 HER2/neu siRNA 后能够诱导细胞的凋亡。

3 讨论

HER2/neu 也称为 HER2 或 CerbB-2。HER2/neu 是一种原癌基因，编码 1 型酪氨酸蛋白激酶（TPK）生长因子受体，是表皮生长因子受体家族的重要成员。该家族成员还包括 HER1/erbB1（EGFR），HER3/erbB3，HER4/erbB4[6-7]。HER2/neu 位于 17q21，编码产物为 185×10^3 的跨膜糖蛋白 P185。Ono 等[8]报道中指出 ErbB 受体由胞外的配体结合区、胞内的蛋白酪氨酸激酶区及单链跨膜区组成，而胞内酪氨酸激酶区有较高的同源性和保守性，具有激酶活性，但是只有 ErbB-3 与其他家族成员不同，其激酶活性缺失。HER-2/neu 被认为在肿瘤细胞中过度表达，而在正常组织中表达水平非常低。同时在细胞信号转导中发挥重要作用，是细胞存活、生长、分化的重要调节者。HER2/neu 基因在人膀胱癌、乳腺癌、肺癌等中扩增及过量表达，与肿瘤恶性程度增高、转移能力增强、化疗抵抗密切相关，且与预后不良有关。Latif 等[9]报道 17 号染色体上的基因扩增和 HER2/neu 的过表达同预后差的膀胱移行细胞癌患者相关联。Lae 等[10]研究发现在膀胱癌 HER2 的过度表达是 HER2 基因扩增的结果，和乳腺癌研究相符。对乳腺癌的研究表明，赫赛汀（曲妥珠单抗）对伴有 HER2 基因扩增的乳腺肿瘤有明显的治疗作用。目前有报道用赫赛汀治疗人膀胱肿瘤的病例，具体机制尚不完全明了。Kolla 等[11]指出常用的辅助治疗药物如赫赛汀、紫杉醇和顺铂，在治疗膀胱癌症患者和转移性疾病上有协同作用。

RNAi 是近年快速发展的一种基因沉默技术，具有高度特异性、高稳定性、高效率性和可扩散性的特点，具

有很强的对目的基因的抑制作用。RNAi 主要分为两种：>30 nt 的长双链 RNA 的非特异效应和 21～23 nt 的短双链 RNA 的特异效应。细胞内双链 RNA 在 Dicer 酶的作用下，形成 22 bp 大小的小干扰 RNA，siRNA 可进一步掺入大部分核酸酶并使其激活，从而精确降解与 siRNA 序列互补的 mRNA，完全抑制了该基因在细胞内的翻译和表达。Fuessel 等[12]利用 survivin 的反义 DNA 及 siRNA 分别转染膀胱癌细胞，结果发现均能降低 survivin 表达水平，同时增强了细胞对于化疗药物的敏感性，但 siRNA 的效果优于反义 DNA。以上进一步说明在肿瘤治疗方面，siRNA 比反义 DNA 抑制目的基因的效果更强。杨华安等[4]应用 RNA 干扰(RNAi)阻断膀胱癌 EJ 细胞 survivin 基因的表达，发现 siRNA 能有效抑制 EJ 细胞的 survivin 表达，进而抑制细胞的增殖并诱导细胞凋亡。目前 siRNA 被成功应用在动植物细胞中，而且能够显著降低靶向基因产物的表达，其 90% 是 siRNA 诱导的，并且 RNAi 的作用能够遗传给子代细胞[13]。但是 siRNA 是否可应用于人类疾病的治疗目前还不清楚。如果 RNAi 技术能够应用于人类疾病的治疗，那么首先 RNAi 可通过抑制某种蛋白在体内过度表达。但对于因某个基因产物过度表达或由于体内突变基因表达所引起的疾病，往往缺乏比较有效的手段。本研究主要以原癌基因 HER2/neu 为靶点，利用体外合成的 siRNA，探讨 RNAi 技术对 HER2/neu 阳性的膀胱癌 BIU-87 细胞株中 HER2/neu 的表达及细胞存活率和凋亡的影响，为 RNAi 技术在基因治疗中的进一步应用，提供实验基础。

本研究表明，HER2/neu siRNA 能有效降低膀胱癌 BIU-87 细胞株 HER2/neu mRNA 的表达，并使相应的蛋白表达从空白对照组的(77.41 ± 0.02)% 降低到 HER2/neu siRNA 组的(49.76 ± 0.01)%($P < 0.05$)，而空白对照组、空脂质体组、阴性 siRNA 序列组则对 HER2/neu 蛋白的表达无影响($P > 0.05$)，说明 siRNA 具有较好的特异性。并且 HER2/neu siRNA 转染后，细胞存活率明显下降，出现细胞出现凋亡，凋亡率为(45.60 ± 0.70)%，表明 siRNA 对 HER2/neu 表达阳性的膀胱癌 BIU-87 细胞株生长能产生显著诱导凋亡作用。与文献[14]报道一致。

综上所述，HER2/neu siRNA 可以有效的抑制膀胱癌细胞的增值，并诱导其凋亡，可能与通过下调 HER2/neu mRNA 和蛋白的表达水平有关，为膀胱癌新的治疗方法打下了理论基础。但 siRNA 在体内对 HER2/neu 基因表达和膀胱癌细胞增值及凋亡的影响，以及是否优于 HER2/neu 的靶向治疗药物 Herceptin，有待进一步研究。

参考文献：

[1] Hung M C, Lau Y K. Basic science of HER-2/neu: a review[J]. Semin Oncol, 1999, 26(4 Suppl 12): 51－59.

[2] Folgiero V, Bachelder R E, Bon G, *et al*. The alpha6beta4 integrin can regulate ErbB-3 expression: implications for alpha6beta4 signaling and function[J]. Cancer Res, 2007, 67(4): 1645－1652.

[3] 黄玉清，李永生，刘锦裕. 粉防己碱逆转膀胱癌 BIU-87/ADM 的凋亡抗性及可能机制的研究[J]. 第三军医大学学报，2011，33(5)：506－510.

[4] 杨华安，苟欣，郑传东，等. RNAi 沉默 survivin 基因表达对膀胱癌 EJ 细胞增殖的影响[J]. 第三军医大学学报，2008，30(13)：1260－1263.

[5] Choudhury A, Charo J, Parapuram S K, *et al*. Small interfering RNA (siRNA) inhibits the expression of the Her2/neu gene, upregulates HLA Class I and induces apoptosis of Her2/neu positive tumor cell lines[J]. Int J Cancer, 2004, 108(1): 71－77.

[6] Yarden Y, Sliwkowski M X. Untangling the ErbB signalling network [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2(2): 127－137.

[7] Cho H S, Mason K, Ramyar K X, *et al*. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab[J]. Nature, 2003, 421(6924): 756－760.

[8] Ono M, Kuwano M. Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(24): 7242－7251.

[9] Latif Z, Watters A D, Dunn I, *et al*. HER2/neu gene amplification and protein overexpression in G3 pT2 transitional cell carcinoma of the bladder: a role for anti-HER2 therapy? [J]. Eur J Cancer, 2004, 40(1): 56－63.

[10] Lae M, Couturier J, Oudard S, *et al*. Assessing HER2 gene amplification as a potential target for therapy in invasive urothelial bladder cancer with a standardized methodology: results in 1005 patients[J]. Ann Oncol, 2010, 21(4): 815－819.

[11] Kolla S B, Seth A, Singh M K, *et al*. Prognostic significance of Her2/neu overexpression in patients with muscle invasive urinary bladder cancer treated with radical cystectomy[J]. Int Urol Nephrol, 2008, 40(2): 321－327.

[12] Fuessel S, Herrmann J, Ning S, *et al*. Chemosensitization of bladder cancer cells by survivin-directed antisense oligodeoxynucleotides and siRNA[J]. Cancer Lett, 2006, 232(2): 243－254.

[13] 任淑华，张伟，曲平，等. RNA 干扰 C-erbB-2 对肺腺癌细胞 calu-3 增殖的影响[J]. 癌症，2005，24(10)：1173－1178.

[14] Faltus T, Yuan J, Zimmer B, *et al*. Silencing of the HER2/neu gene by siRNA inhibits proliferation and induces apoptosis in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells[J]. Neoplasia, 2004, 6(6): 786－795.

(**收稿**:2011-09-14;**修回**:2011-10-31)

(编辑　龙　亮)