文章编号:1000-5404(2011)23-2459-04

论著

靶向于雄激素受体的siRNA筛选及效能评价

张 森[1],郭燕丽[1],王洛夫[2],李 彦[3],李 锐[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院:超声科[1],中心实验室[3];400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科[2])

[摘要] **目的** 设计并合成新的靶向于雄激素受体(AR)的siRNA序列,转染前列腺癌细胞筛选最佳干扰序列。**方法** 设计并合成靶向于雄激素受体的siRNA,以不同浓度转染雄激素非依赖性前列腺癌细胞C4-2,确定最佳转染浓度。以最佳转染浓度转染细胞,分为siRNAⅠ组、siRNAⅡ组、siRNAⅢ组、阴性对照组、空白对照组和无关对照组。RT-PCR检测AR mRNA表达水平,Western blot检测AR蛋白表达水平。CCK-8分析绘制细胞生长曲线,观察C4-2细胞生长活性并筛选出抑制效果最佳的siRNA靶序列。**结果** 以不同浓度的AR siRNA转染C4-2细胞后,细胞生长活性降低($P<0.05$),并筛选出100 nmol/L的最佳转染浓度;RT-PCR和Western blot结果显示转染后AR的mRNA和蛋白表达水平显著下降($P<0.05$);CCK-8法检测结果显示各组细胞增殖活性显著降低,其中siRNAⅠ的抑制效果最为明显($P<0.05$)。**结论** 新设计合成的AR siRNA能通过沉默AR表达高效抑制C4-2细胞的增殖。

[关键词] RNA干扰;雄激素受体;雄激素非依赖性前列腺癌
[中图法分类号] R394-33; R394.3; R937.25 [文献标志码] A

Screening and evaluation of a newly designed siRNA targeting androgen receptor

Zhang Miao[1], Guo Yanli[1], Wang Luofu[2], Li Yan[3], Li Rui[1] ([1]Department of Ultrasonography, [3]Laboratory Center of Medical Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Urology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] Objective To design and synthesize siRNA sequences targeting androgen receptor (AR), and to screen effective sequences by transfecting C4-2 cells. Methods Three pairs of siRNA sequences targeting AR were designed and synthesized according to the cDNA of AR, and were transfected into androgen-independent prostate carcinoma C4-2 cells to determine an optimal concentration. Experimental groups comprised of siRNA Ⅰ, siRNA Ⅱ, and siRNA Ⅲ, negative control, blank control and unrelated control. RT-PCR and Western blotting were applied to detect mRNA and protein expression of AR, respectively. Cell growth activity and the most effective siRNA sequence were evaluated based on cell growth curves by CCK-8 analysis. Results Cell growth activities of C4-2 cells transfected with different concentrations of AR siRNA (20 nmol/L, 50 nmol/L, 100 nmol/L and 200 nmol/L, respectively) were suppressed, and 100 nmol/L was the optimum concentration of AR siRNA ($P<0.05$). Compared with those of the control groups, mRNA and protein levels of AR decreased significantly, and C4-2 cell growth activity was suppressed significantly in the groups of C4-2 cells transfected with AR siRNA ($P<0.05$). The inhibitory effect of AR siRNA Ⅰ was the most significant than that of the others. Conclusion The newly designed AR siRNA can inhibit C4-2 cell proliferation by silencing AR expression.

[**Key words**] RNA interference; androgen receptor; androgen-independent prostate carcinoma

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30970830). Corresponding author: Guo Yanli, Tel: 86-23-68765439, E-mail: guoyanli71@yahoo.com.cn

前列腺癌为常见的恶性肿瘤之一,具有雄激素依赖性,经抗激素治疗后绝大多数会发展成雄激素非依赖性前列腺癌(androgen-independent prostate carcinoma,AIPC),缺乏有效的治疗方法[1]。有研究表明,AIPC多表达雄激素受体(androgen receptor, AR),具有AR依赖性,抑制AR的表达,可对细胞生长产生抑制作用[2]。本研究尝试以AR基因作为靶点,利用RNA干扰(RNA interference,RNAi)技术,设计并合成

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30970830)
[通信作者] 郭燕丽,电话:(023)68765439,E-mail: guoyanli71@yahoo.com.cn

新的靶向于AR基因的siRNA序列并转染雄激素非依赖性前列腺癌C4-2细胞,筛选高效沉默AR基因的AR siRNA序列,评价其对C4-2细胞的生长抑制效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人类前列腺癌细胞株C4-2为西安交通大学第一附属医院泌尿外科研究所赠与,该细胞具有雄激素非依赖性,表达AR。

1.1.2 主要试剂 RPMI1640培养基和胎牛血清购自美国HyClone公司,Silencer siRNA Construction Kit购自Ambion公司,Oligofectamine Reagent(主要成分为脂质体)购自Invitrogen公司,RNAiso Plus和RNA PCR Kit(AMV) Ver.3.0购自TaKaRa公司,Cell Counting Kit-8购自碧云天公司,鼠抗人AR单克隆抗体购自Santa Cruz公司,siRNA寡核苷酸模板序列及PCR引物由上海生工公司合成。

1.2 方法

1.2.1 siRNA的设计 根据GenBank提供的AR基因的cDNA序列(序列号:M23263, N18624),利用Ambion公司网站上的在线设计软件设计并参阅文献[3]报道,设计3条siRNA靶序列AR siRNAⅠ、AR siRNAⅡ、AR siRNAⅢ及1条无效序列siRNA-NC作为阴性对照。经Blast软件进行同源性比对分析确定靶序列特异性,无效序列在人类基因组中无相同序列。序列见表1。

表1 设计的AR siRNA序列

基因		序列(5′→3′)
AR siRNAⅠ	正义链	AAACAGGTACTTCTGTTTCCC
	反义链	AAGGGAAACAGAAGTACCTGT
AR siRNAⅡ	正义链	AAGGCTCTTTTGAAGAAGACC
	反义链	AAGGTCTTCTTCAAAAGAGCC
AR siRNAⅢ	正义链	AAGTCCATACAACTGGCCTTC
	反义链	AAGAAGGCCAGTTGTATGGAC
AR siRNA-NC	正义链	AAGTGCGATCTAACTGACCTA
	反义链	AATAGGTCAGTTAGATCGCAC

1.2.2 siRNA的合成 采用Ambion公司的Silencer siRNA Construction Kit合成上述AR siRNA,按试剂说明书操作如下。将正(反)义寡核苷酸模板与T7启动子引物混合,经加热退火后结合。然后加入Klenow DNA聚合酶,形成双链DNA转录模板。利用T7 RNA聚合酶进行体外转录后,将正义和反义转录产物混合形成双链形式的siRNA(dsRNA)。最后用DNA酶及专一核糖核酸酶消化5′的引导序列,并进行2次离心过滤纯化,得到的产物即是所需的21 bp的双链siRNA,19对碱基互补,3′端各有2个UU碱基突出。用2%琼脂糖凝胶电泳检测产物,在紫外光度分光仪测其浓度,并调整浓度至20 μmol/L,-20 ℃保存备用。产物按靶序列分别命名为AR siRNAⅠ、AR siRNAⅡ、AR siRNAⅢ和siRNA-NC。

1.2.3 细胞培养 C4-2细胞于含有10%胎牛血清RPMI1640培养液,在37 ℃,5% CO_2的孵育箱中培养,常规用0.25%胰酶消化传代,实验所用细胞均处于对数生长期。

1.2.4 siRNA最佳转染浓度的筛选 将C4-2细胞以8×10^3/孔浓度接种于96孔板,待培养密度30%~50%汇合时进行siRNA转染。采用Oligofectamine Reagent转染试剂,选用AR siRNAⅠ进行转染,按试剂说明书操作。按siRNA终浓度分为6个组:20、50、100、200 nmol/L浓度组,阴性对照组和空白对照组。分别于转染后12、24、36、48、60、72 h后做CCK-8分析,按试剂说明书操作,每组设10个复孔,另设2个复孔只加1640培养液和CCK-8液做空白对照。在Bio-Rad 550型酶标仪上测定波长450 nm处光密度值[D(450)]。根据CCK-8结果进行统计学分析,筛选出对细胞生长抑制程度最高的转染浓度。

1.2.5 半定量RT-PCR检测AR mRNA表达水平 将C4-2细胞按上述最佳转染浓度进行转染。实验按转染液不同分为6个组:A组:AR siRNAⅠ+脂质体;B组:AR siRNAⅡ+脂质体;C组:AR siRNAⅢ+脂质体;D组(阴性对照组):siRNA NC+脂质体;E组(空白对照组):只加脂质体,无siRNA;F组(无关对照组):无转染试剂。转染48 h后,提取细胞总RNA,按RNA PCR Kit(AMV) Ver.3.0说明书操作进行RT-PCR反应。AR及GAPDH引物序列(5′→3′):AR上游AAGCCATTGAGCCAGGTGTAGTG;AR下游AACCAGATGAGGGGCGAAGTAGA,扩增片段长度为275 bp。GAPDH上游ACCCATCACCATCTTCCAGGAG,GAPDH下游GAAGGGGCGGAGATGATGAC,扩增片段长度为159 bp。反转录条件:50 ℃ 30 min→99 ℃ 5 min→5 ℃ 5 min。PCR反应条件:94 ℃ 2 min→(94 ℃ 30 s→57 ℃ 30 s→72 ℃ 1 min)×32→72 ℃ 10 min。PCR产物行1%琼脂糖凝胶电泳,在Bio-Rad GelDoc 2000凝胶成像系统观察并照相,然后应用图像分析软件对条带进行灰度值计算,以AR与GAPDH灰度比值来反映AR mRNA的相对定量。

1.2.6 Western blot检测AR蛋白表达水平 实验分组同1.2.5,转染48 h后,用细胞裂解液提取各组细胞上清总蛋白,Bradford法测浓度。取50 μg蛋白行12%的SDS-PAGE凝胶电泳转PVDF膜,用含5%脱脂奶粉封闭液室温封闭4 h,加1∶400稀释的一抗37 ℃孵育4 h,TBST漂洗后加1∶2 000稀释的二抗37 ℃孵育2 h后,加ECL显色试剂于暗室中曝光和显影。通过Quantity one 4.52图像分析软件进行图像分析。

1.2.7 CCK-8法检测细胞生长抑制率 实验分组同1.2.5,分别于转染后1、2、3、4、5 d做CCK-8分析,按试剂说明书操作,每组设10个复孔,另设2个复孔做空白对照,在酶标仪上测定波长450 nm处光密度值[D(450)]。以时间为X轴,D(450)为Y轴绘制细胞生长曲线,计算细胞生长抑制率(IR)。IR=[1-siRNA转染组D(450)/阴性对照组D(450)]×100%。

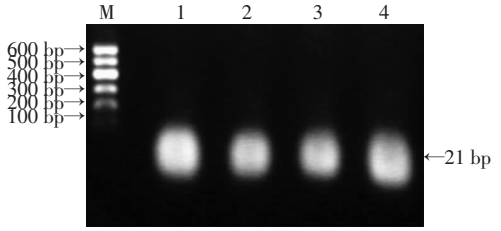
1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0软件进行统计学分析,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,多组数据比较采用单因素方差分析,2组数据均值比较采用两独立样本t检验。

2 结果

2.1 siRNA的合成

采用Silencer siRNA Construction Kit合成的4组AR siRNA为双链siRNA,产物经2%琼脂糖凝胶电泳可见大小为21 bp的明亮条带,见图1。

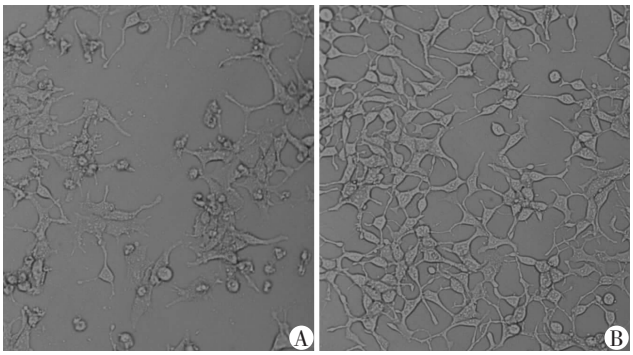


M:标准;1:AR siRNA Ⅰ;2:AR siRNA Ⅱ;3:AR siRNA Ⅲ;4:siRNA-NC

图 1　合成的 AR siRNA 2%琼脂糖凝胶电泳结果

2.2　siRNA 转染效果及最佳转染浓度的筛选

转染 36 h 后,镜下观察转染组均开始出现细胞形态变化,表现为细胞轮廓模糊,形态萎缩,颗粒状漂浮物增多,生长缓慢(图 2)。



A:转染组;B:阴性对照组

图 2　AR siRNA 转染 C4-2 后细胞形态观察　(×200)

CCK-8 结果见表 2,各转染组和阴性对照组相比,48、72 h 的 $D(450)$ 值差异具有统计学意义($P<0.05$),表明不同转染浓度的 AR siRNA 对细胞生长均有一定的抑制作用。其中 100、200 nmol/L 组与 20、50 nmol/L 组相比,细胞生长差异具有统计学意义($P<0.05$),100 nmol/L 组和 200 nmol/L 组之间差异无统计学意义($P>0.05$),从节省用量考虑,优选 100 nmol/L 转染浓度。

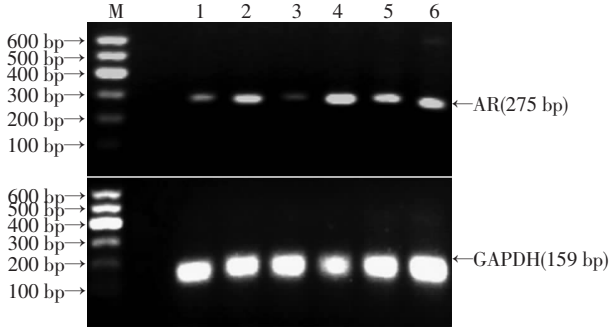
表 2　AR siRNA Ⅰ不同转染浓度转染不同时间对细胞生长的影响[$D(450)$, $n=10$, $\bar{x}\pm s$]

组别	24 h	48 h	72 h
20 nmol/L 浓度组	0.534±0.032	0.743±0.040[a]	0.873±0.031[a]
50 nmol/L 浓度组	0.533±0.037	0.646±0.058[a]	0.686±0.040[a]
100 nmol/L 浓度组	0.512±0.033	0.595±0.047[ab]	0.572±0.073[ab]
200 nmol/L 浓度组	0.531±0.027	0.592±0.042[ab]	0.574±0.047[ab]
阴性对照组	0.533±0.035	0.780±0.045	1.015±0.073
空白对照组	0.521±0.033	0.807±0.055	1.021±0.091

a:$P<0.05$,与阴性对照组比较;b:$P<0.05$,与 20 nmol/L 和 50 nmol/L 浓度组比较

2.3　半定量 RT-PCR 检测 AR mRNA 表达水平

电泳结果见图 3,各组均可见大小分别为 275 bp 和 159 bp 的明亮条带。通过图像分析软件计算各组 AR/GAPDH 灰度值比值,结果表明,siRNAI、siRNA Ⅱ和 siRNA Ⅲ 3 组灰度比值分别为 0.27±0.03、0.46±0.05 和 0.16±0.04,与阴性对照组(0.71±0.02)差异有统计学意义($P<0.05$)。siRNA Ⅲ、siRNA Ⅰ和 siRNA Ⅱ相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。说明 AR siRNA 转染 C4-2 细胞后显著抑制了 AR mRNA 的表达,siRNA Ⅲ和 siRNA Ⅰ抑制作用较强。

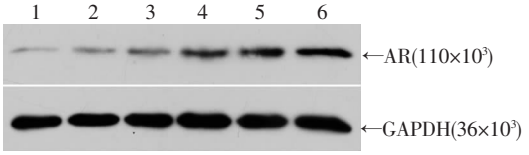


M:标准;1:AR siRNA Ⅰ;2:AR siRNA Ⅱ;3:AR siRNA Ⅲ;4:阴性对照;5:空白对照;6:无关对照

图 3　RT-PCR 检测 siRNA 转染后 AR mRNA 表达

2.4　Western blot 检测 AR 蛋白表达水平

Western blot 实验结果见图 4,siRNA Ⅰ、siRNA Ⅱ、siRNA Ⅲ组和阴性对照组灰度值分别为 0.23±0.04、0.58±0.09、0.74±0.05 和 1.17±0.11,统计学分析结果表明,转染组蛋白表达水平与阴性对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。siRNA Ⅰ与 siRNA Ⅱ、siRNA Ⅲ组相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。表明 AR siRNA 转染 C4-2 细胞后 AR 蛋白表达明显减弱,且 siRNA Ⅰ抑制蛋白作用较强。



1:AR siRNA Ⅰ;2:AR siRNA Ⅱ;3:AR siRNA Ⅲ;4:阴性对照;5:空白对照;6:无关对照

图 4　Western blot 检测 siRNA 转染后 AR 蛋白表达

2.5　CCK-8 法检测细胞生长抑制率

CCK-8 结果表明,3 组 siRNA 转染 C4-2 细胞 48 h 后均可以达到较明显的生长抑制效果,细胞生长曲线见图 5。抑制率结果见表 3,其中 AR siRNA Ⅰ在转染 5 d 后 IR 为(65.71±2.01)%,抑制效果最为明显($P<0.05$)。

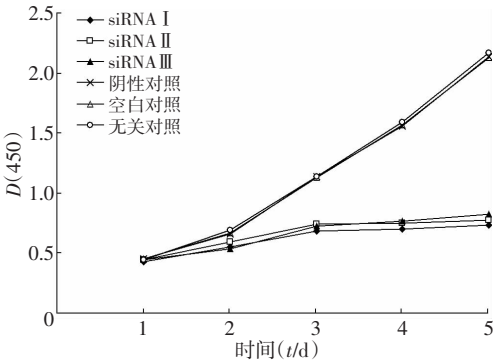


图 5　不同 AR siRNA 靶序列对 C4-2 细胞生长曲线

表 3　AR siRNA 转染 C4-2 后不同时段对细胞生长的抑制率[$n=10$, $(\bar{x}\pm s)\%$]

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
siRNA Ⅰ组	5.09±0.15	16.30±0.87	39.80±1.34	55.02±1.91	65.71±2.01
siRNA Ⅱ组	1.55±0.07	10.30±0.43	34.62±1.53	51.69±1.85	63.67±1.92[a]
siRNA Ⅲ组	1.54±0.09	18.76±0.92	36.29±1.42	51.05±1.73	61.60±1.78[a]

a:$P<0.05$,与 siRNA Ⅰ组比较

3 讨论

前列腺癌是高发的恶性肿瘤,发病率在美国位居男性恶性肿瘤之首,在国内也有上升趋势。虽然早期前列腺癌通过抗激素治疗多能达到良好的效果,但绝大多数会演变成雄激素非依赖性前列腺癌(AIPC)[4]。对于AIPC,现在仍无较理想的临床治疗方法。

基因治疗为前列腺癌的治疗开辟新的思路,治疗靶基因的选择尤为关键。survivin基因、Smad4基因均可成为前列腺癌治疗的靶点,并在体外实验取得良好的效果[5-6]。曾锐等[7]研究表明,AR在前列腺癌组织表达较正常前列腺和前列腺增生组织中表达均增高。AR不仅在雄激素依赖性前列腺癌中起到关键作用,在AIPC中也起到重要作用,主要有以下几种机制:①内分泌治疗可能会使前列腺癌AR基因表达增高,AR大量扩增,使其在体内低激素环境下,维持AR信号通路活化,促进癌细胞增长[8]。②前列腺癌的AR基因突变后,AR识别配体特异性降低,能够与其他甾体激素如孕激素、雌二醇、羟基氟他胺结合而被活化[9]。③其他信号分子通路的激活。在低激素环境下,成纤维细胞生长因子,表皮生长因子等过表达,活化AR信号通路,促进AIPC的形成[10]。④相继发现有许多AR共调节因子的参与实现AR表达增强[11]。因此AIPC细胞高度依赖AR,阻断AR的表达可起到治疗作用,AR可能成为AIPC的有效治疗靶点。C4-2细胞是LNCap的细胞系亚型,是一种AIPC细胞,高表达AR,被认为是前列腺癌由雄激素依赖性发展到APIC阶段的典型代表,常作为表达AR的雄激素非依赖性前列腺癌的体外模型[12]。RNAi是指通过引入与内源靶基因具有相同序列的双链RNA(dsRNA),诱导内源靶基因的mRNA降解,从而特异性的使靶基因转录后出现沉默的现象,经过近十年的发展,RNAi技术已较为成熟[13]。目前利用RNAi阻断AR表达,进而评价对C4-2细胞的作用效果的报道很少,siRNA的最有效作用靶点及其效能评价,需要进一步研究。

本研究结合上述研究进展,针对AR基因的cDNA序列,重新设计并合成出3组AR siRNA转染C4-2细胞。转染后细胞形态出现凋亡改变,生长活性显著降低。半定量RT-PCR及Western blot实验结果表明,AR siRNA转染细胞后,AR基因在mRNA及蛋白水平的表达均得到有效的抑制,进一步证实了是由于siRNA阻断AR基因表达致使细胞生长活性降低。并且通过定量分析显示,AR基因的表达程度与细胞生长活性呈线性关系,以此筛选出生长抑制效果最好的AR siRNA靶序列。

尽管AR siRNA抑制C4-2生长效果较为显著,但抑制率还需要进一步的提高。增加基因转染率是提高抑制率的一种途径。近年来超声微泡造影剂介导的基因治疗逐渐成为研究热点,超声辐照下微泡破坏不但可以显著提高基因的转染效率,而且基因还可以随超声微泡在靶组织中定向释放,提高治疗的组织特异性,有可能成为一种高效、安全的基因靶向转染手段[14]。若能将超声微泡造影剂与RNA干扰技术结合起来,势必会使两者优势得到最大的体现,是一种前景开阔的基因治疗方法。本研究所筛选出的抑制AIPC细胞生长效果最好的AR siRNA靶序列为下一步超声微泡介导的AIPC基因治疗提供了研究基础。

综上所述,本研究通过RNA干扰技术沉默AR基因表达,观察了AIPC细胞生长活性并筛选出抑制效果最佳的siRNA靶序列,为攻克AIPC这一前列腺癌治疗领域的难题提供实验研究基础。

参考文献:

[1] McPhaul M J. Mechanisms of prostate cancer progression to androgen independence[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2008, 22(2): 373-388.

[2] Eder I E, Haag P, Bartsch G, *et al*. Targeting the androgen receptor in hormone-refractory prostate cancer—new concepts[J]. Future Oncol, 2005, 1(1): 93-101.

[3] 王洛夫, 张尧, 兰卫华, 等. RNA干扰沉默雄激素受体基因对前列腺癌细胞生长的抑制作用研究[J]. 重庆医学, 2010, 39(1): 28-30.

[4] Kantoff P. Recent progress in management of advanced prostate cancer[J]. Oncology (Williston-Park), 2005, 19(5): 631-636.

[5] 吴开杰, 张栋, 曾津, 等. RNAi沉默Smad4基因表达对人前列腺癌细胞增殖的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(13): 1250-1253.

[6] Fan Y J, Huang N S, Xia L. Genistein synergizes with RNA interference inhibiting survivin for inducing DU-145 of prostate cancer cells to apoptosis[J]. Cancer Lett, 2009, 284(2): 189-197.

[7] 曾锐, 刘智勇, 孙颖浩, 等. 不同前列腺组织中雄激素受体的表达研究[J]. 中华男科学杂志, 2010, 16(11): 967-972.

[8] Javidan J, Deitch A D, Shi X B, *et al*. The androgen receptor and mechanisms for androgen independence in prostate cancer[J]. Cancer Invest, 2005, 23(6): 520-528.

[9] Han G, Buchanan G, Ittmann M, *et al*. Mutation of the androgen receptor causes oncogenic transformation of the prostate[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(4): 1151-1156.

[10] Hsieh A C, Small E J, Ryan C J. Androgen-response elements in hormone-refractory prostate cancer: implications for treatment development[J]. Lancet Oncol, 2007, 8(10): 933-939.

[11] Brooke G N, Parker M G, Bevan C L. Mechanisms of androgen receptor activation in advanced prostate cancer: differential co-activator recruitment and gene expression[J]. Oncogene, 2008, 27(21): 2941-2950.

[12] van-Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, *et al*. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines[J]. Prostate, 2003, 57(3): 205-225.

[13] Aagaard L, Rossi J J. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2007, 59(2/3): 75-86.

[14] Wang J F, Wu C J, Zhang C M, *et al*. Ultrasound-mediated microbubble destruction facilitates gene transfection in rat C6 glioma cells[J]. Mol Biol Rep, 2009, 36(6): 1263-1267.

(**收稿**:2011-07-19;**修回**:2011-09-30)

(编辑 汪勤俭)