基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.10.005

CXCR4-siRNA重组腺病毒载体沉默人卵巢癌细胞株CXCR4基因表达的研究

刘 瑜,袁 瑞

(重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究 CXCR4-siRNA 重组腺病毒载体对人卵巢癌细胞株 SKOV3 的 CXCR4 基因表达的影响。方法:*Pac* Ⅰ酶切 CXCR4-siRNA 重组腺病毒载体使其线性化,应用 HEK293 细胞大量包装扩增病毒,收集病毒液,转染人卵巢癌细胞株 SKOV3。细胞分为 3 组:siRNA 组,转染空病毒载体的阴性对照组,细胞不做任何处理的空白对照组。通过 PCR、Western blot、免疫组化检测 CXCR4 基因沉默效果。结果:包装扩增后病毒滴度为 6×10^8 PFU/ml,荧光显微镜下可观察到 SKOV3 细胞中绿色荧光蛋白的大量表达,重组腺病毒能够有效抑制 SKOV3 细胞中 CXCR4 的表达。结论:CXCR4-siRNA 重组腺病毒载体可高效转染靶细胞和沉默 CXCR4 基因的表达,为 RNA 干扰技术应用于卵巢癌的临床基因治疗奠定基础。

【关键词】CXCR4;RNA 干扰;重组腺病毒载体;卵巢癌

【中国图书分类法分类号】R737.31 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-08-09

Study on the expression of CXCR4 gene silenced by CXCR4-siRNA recombinant adenoviral vector in human ovarian cancer cells

LIU Yu, YUAN Rui

(*Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effect of the CXCR4-siRNA recombinant adenoviral vector on the expression of CXCR4 gene in SKOV3 cells. *Methods*: Recombinant adenoviral vector was linearized with *Pac* Ⅰ. Then it was repeatedly packaged and amplified in HEK293 cells and transfected into SKOV3 cells. The SKOV3 cells were divided into three groups: siRNA group with adenovirus carrying RNA interference, negative group with vacant adenovirus vector, and control group without any infection. The expression level of CXCR4 gene in SKOV3 cells was measured by RT-PCR, Western blot and immunocytochemistry analysis. *Results*: The viral titers were 6×10^8 PFU/ml. The green fluorescent protein expressed highly in SKOV3 cells under fluorescent microscope. The CXCR4 gene was greatly inhibited after infection with CXCR4-siRNA recombinant adenoviral vector. *Conclusion*: The CXCR4-siRNA recombinant adenoviral vector can efficiently transfect targeted cells and silence the expression of CXCR4 gene, which would lay a foundation for the further study on clinical gene therapy of RNAi technology in ovarian cancer.

【Key words】CXCR4; RNA interference; recombinant adenoviral vector; ovarian cancer

卵巢癌是严重威胁妇女生命的肿瘤,死亡率居妇科恶性肿瘤之首。在卵巢癌的治疗中,肿瘤的浸润、转移、复发是患者 5 年生存率难以提高的重要原因之一。研究表明趋化因子受体 CXCR4 在卵巢癌[1]、前列腺癌[2]、甲状腺癌[3]、乳腺癌[4]等多种恶性肿瘤组织中均有高度表达,其与 CXC 类趋化因子 CXCL12,即基质细胞衍生因子(Stromal cell-derived factor 1, SDF-1)构成的生物学轴与肿瘤的播散和器官的特异性转移密切相关。因而干扰癌细胞中趋化因子受体 CXCR4 的表达,有助于防治肿瘤的侵袭转移。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一门新兴的基因阻断技术,由双链 RNA(dsRNA)引发的特异性降解相应序列 mRNA,导致靶基因的沉默,属于转录后水平的基因沉默机制[5]。本研究应用 RNA 干扰技术,以腺病毒为工具制备的CXCR4-siRNA 重组腺病毒载体转染人卵巢癌细胞株 SKOV3, 观察其对人卵巢癌细胞内源性 CXCR4 基因的干扰效应,以期为 RNA 干扰基因治疗的临床应用奠定基础。

作者介绍:刘 瑜(1985-),女,硕士,
研究方向:妇科内窥镜技术和妇科肿瘤。

通信作者:袁 瑞,女,教授,Email:yrui96@126.com。

基金项目:重庆市自然科学基金计划资助项目(编号:CSTC,2008BB5239)。

1 材料和方法

1.1 材料

CXCR4-siRNA 重组腺病毒载体由本实验组成员构建完成；人卵巢癌细胞株 SKOV3 细胞、HEK293 细胞、*Pac* Ⅰ酶由本实验室保存；RPMI1640 购自 GIBCO 公司；无支原体新生牛血清购自杭州四季青生物材料工程研究所；PCR 试剂盒购自大连宝生物公司；Trizol 试剂盒、脂质体 Lipofectamine2000 购于 Invitrogen 公司；兔抗人 CXCR4 抗体购于 Santa Cruz 公司；辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体购于 Sigma 公司；免疫组化染色试剂盒购于中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 CXCR4-siRNA 重组腺病毒扩增及滴度测定 将 HEK293 细胞接种于 6 孔板中，每孔 1×10^6 个细胞，待细胞的融合度约为 60%~70%，*Pac* Ⅰ酶切 1 μg 的 CXCR4-siRNA 重组腺病毒载体，用 Lipofectamine2000 脂质体 2 μl 共转染 HEK293 细胞，24 h 后倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达。转染 9~14 d 后约 70%细胞病变脱落，收集细胞并重悬于 1 ml PBS，-80℃/37℃反复冻融 3 次，离心取上清，病毒上清重复感染 HEK293，扩增病毒。HEK293 细胞接种于 96 孔板，病毒原液按 10^{-4}~10^{-13} 做梯度稀释后，每个稀释度500 μl/孔接种，37℃、5% CO_2 细胞培养箱里培养 18 h 后荧光显微镜下进行荧光计数，病毒滴度(PFU/ml)=GFP 阳性细胞数×病毒上清稀释倍数/稀释的体积。

1.2.2 人卵巢癌细胞株 SKOV3 的转染 人卵巢癌细胞株 SKOV3 培养于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中，在 37℃、5% CO_2 孵箱中培养。转染前 1 d SKOV3 细胞以 5×10^6 个/ml 接种于 6 孔板，细胞融合达 60%~80%时用 0.1 ml 病毒液感染。同时以转染空病毒载体为阴性对照组，未做任何处理的 SKOV3 细胞为空白对照组。

1.2.3 RT-PCR 反应 转染 48 h 后用 Trizol 提取 siRNA 组、阴性对照组和空白对照组的细胞总 RNA。取 1 μg 总 RNA 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR，CXCR4 的上游引物：5'-TGCCCTCCTGCTGACTATTCC-3'，下游引物：5'-GCGCTTCTGGTGGCCCTT-3'，扩增片段大小约为 249 bp；GAPDH 的上游引物：5'-AGGTCGGAGTCAACGGATTTG-3'，下游引物：5'-GTGATGGCATGGACTGTGGT-3'，扩增片段大小为 532 bp。扩增条件：94℃ 5 min 预变性；94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 30 s，循环 32 次；72℃ 10 min。反应产物在琼脂糖凝胶电泳 1 h 后成像分析。

1.2.4 Western blot 检测 转染 72 h 后收获 siRNA 组、阴性对照组和空白对照组细胞，加入含 PMSF 的裂解液提取总蛋白，用 BCA 法检测蛋白质浓度。取相同总量蛋白变性上样，10%SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜。脱脂奶粉封闭 2 h 后加一抗：兔抗人 CXCR4(1:500)和抗 β-actin(1:500)，4℃孵育过夜。次日 TBST 洗膜，加辣根过氧化物酶标记二抗(1:1 000)，室温孵育 1 h，TBST 洗膜 3 次，加入化学发光底物，于暗室中曝光、显影、定影。凝胶成像仪摄像后用 Quantity One 软件分析各条带灰度值。

1.2.5 免疫组化检测 将 SKOV3 于 6 孔板进行细胞爬片，次日细胞约融合 40%~50%时加入重组病毒液约 0.1 ml，同时设立阴性对照组和空白对照组，48 h 后去除培养基每张切片用 PBS 冲洗 3 次，每次 3 min。加 4%多聚甲醛室温孵育10 min，PBS 冲洗 3 次，滴加 3% H_2O_2 去离子水室温孵育 10~15 min，消除内源性过氧化物酶活性，PBS 冲洗，用正常山羊血清封闭 1 h，甩干多余液体，滴加稀释的一抗 40 μl，4℃过夜。次日于 37℃孵箱复温 45 min，生物素化二抗(山羊抗兔 IgG)室温孵育 20 min，PBS 冲洗后滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液孵育 15 min，DAB 显色 2~10 min，自来水冲洗，苏木素复染 2~3 min 后再次自来水冲洗，梯度酒精脱水，甘油封片，镜检，使用 Image-Pro Plus6.0 软件测量各组细胞中 CXCR4 蛋白的平均光密度值。

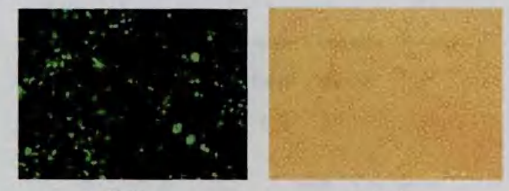
1.3 统计学分析

采用 SPSS17.0 进行统计学处理，数据以均数±标准差表示，组间比较采用单因素方差分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 重组腺病毒的包装及滴度测定

重组腺病毒载体经 *Pac* Ⅰ酶切线性化后，转染至 HEK293 细胞中进行包装，约 1~3 d 后在倒置荧光显微镜下可观察到绿色荧光蛋白的表达，见图 1。细胞培养 9~14 d 后约70%的细胞病变变圆脱落，收集病毒，通过反复感染新的HEK293 细胞进行病毒的扩增，最终病毒滴度约为 6×10^8 PFU/ml。

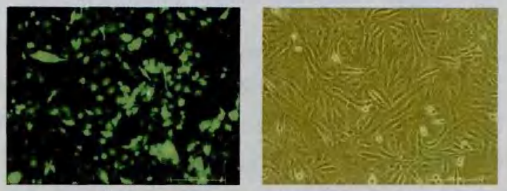


A. 荧光　　B. 白光

图 1 重组腺病毒载体感染 HEK293 细胞 2 d(标尺 =200 μm)

2.2 重组腺病毒感染 SKOV3 细胞

分别用阴性对照组腺病毒液和干扰组腺病毒液以 MOI=50 感染 SKOV3 细胞，培养 48 h 后在倒置荧光显微镜下观察到 80%以上的细胞表达绿色荧光蛋白，见图 2。

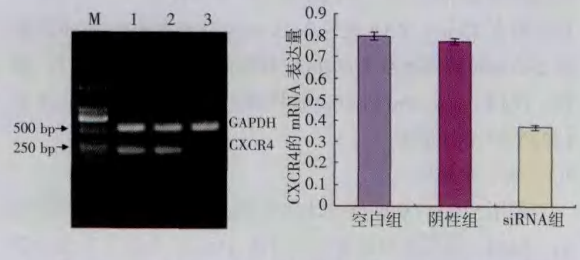


A. 荧光　　B. 白光

图 2 重组腺病毒载体感染 SKOV3 细胞 2 d(标尺 =200 μm)

2.3　RT-PCR 检测 CXCR4 的 mRNA 表达

琼脂糖凝胶电泳结果显示各组可见灰度一致的 532 bp 的 GAPDH 内参条带，并且均有 249 bp 的 CXCR4 条带表达，但 siRNA 组目的基因的条带灰度比阴性对照组和空白对照组明显减弱，阴性对照组与空白对照组比较无明显差别。CXCR4 与 GAPDH 的 mRNA 灰度值之比反映目的基因 mRNA 表达量：siRNA 组为 0.370 ± 0.011，阴性对照组为 0.772 ± 0.015，空白对照组为 0.795 ± 0.018，siRNA 组与阴性对照组和空白对照组比较差异有统计学意义（$P<0.05$），阴性对照组与空白对照组比较差异无统计学意义（$P>0.05$），见图 3。

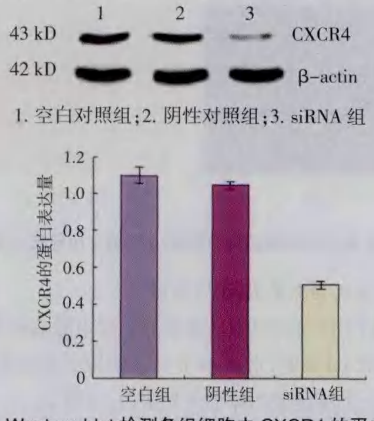


M. DNA Maker DL 2000；1. 空白对照组；2. 阴性对照组；3. siRNA 组

图 3　RT-PCR 检测各组细胞中 CXCR4 的 mRNA 表达

2.4　Western blot 检测 CXCR4 蛋白水平的表达

siRNA 组 CXCR4 蛋白表达明显受抑制，而阴性对照组与空白对照组则无明显变化，各组内参 β-actin 蛋白表达不受影响。siRNA 组、阴性对照组、空白对照组 CXCR4 与内参 β-actin 灰度值之比为目的基因蛋白表达量，分别为：0.508 ± 0.022、1.047 ± 0.023、1.100 ± 0.043，siRNA 组与空白对照组、阴性对照组比较差异有统计学意义（$P<0.05$），阴性对照组与空白对照组比较差异无统计学意义（$P>0.05$），如图 4 所示。



1. 空白对照组；2. 阴性对照组；3. siRNA 组

图 4　Western blot 检测各组细胞中 CXCR4 的蛋白表达

2.5　免疫组化检测 CXCR4 蛋白表达的变化

空白对照组和阴性对照组细胞浆、细胞膜布满棕黄色颗粒，提示细胞内 CXCR4 大量表达，siRNA 组细胞内则棕黄色颗粒少，提示 CXCR4 蛋白表达受抑制。各组细胞中 CXCR4 蛋白表达的平均光密度值分别为：siRNA 组 0.157 ± 0.018、阴性对照组 0.202 ± 0.020、空白对照组 0.212 ± 0.025，siRNA 组与空白组、阴性组比较有统计学意义（$P<0.05$），阴性组与空白组比较无统计学意义（$P>0.05$），见图 5。

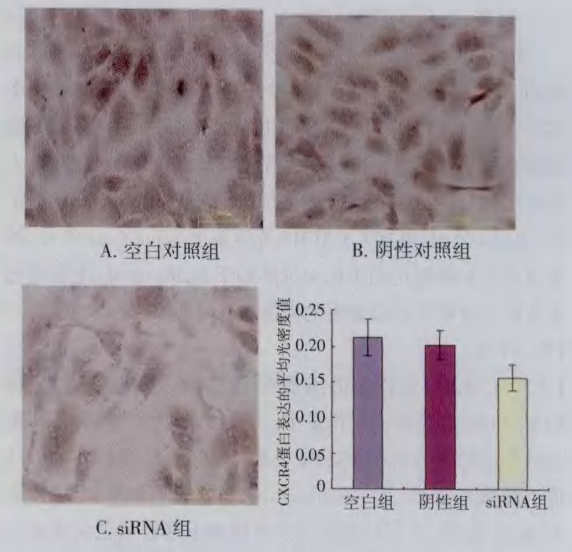


图 5　免疫组化检测各组细胞中 CXCR4 蛋白表达（标尺 =200 μm）

3　讨　论

SDF-1 是一类对多种细胞具有趋化作用的小分子量的细胞因子，属于 CXC 类趋化因子的家族成员，系统命名为 CXCL12，趋化因子受体 CXCR4 为含有 7 个跨膜区的高度保守的 G 蛋白偶联受体。不少研究表明 CXCL12 与其特异性受体 CXCR4 有高度亲和力，CXCL12/CXCR4 生物学轴不仅介导免疫及炎症反应调控、造血干细胞迁移及归巢、HIV 感染、胚胎发育，还与恶性肿瘤的浸润和转移密切相关[6]。该生物学轴在恶性肿瘤中的重要作用，已经引起了越来越多的广泛关注。在卵巢癌细胞系和卵巢癌手术切除标本中均发现 CXCR4 的高表达，同时上皮性卵巢癌腹水和腹膜后淋巴组织中均有 SDF-1 的高表达[7]。Bertolini 等[8]研究表明，用 CXCR4 单克隆抗体中和非霍奇金淋巴瘤细胞 CXCR4，可促进瘤细胞凋亡，减弱瘤细胞的增殖，同时还抑制瘤细胞经内皮和基质的迁移，认为中和CXCR4 可作为非霍奇金淋巴瘤临床治疗的一个重要途径。Walter 等[9]发现在乳腺癌细胞中 CXCR4 表达异常增高，应用 CXCR4 抑制剂（合成 14 肽 TN140）可明显下调乳腺癌细胞中 CXCR4 表达，从而抑制动物模型中乳腺癌转移发生。这些研究表明 CXCR4 在肿瘤的发生发展中起着重要的作用，通过拮抗 CXCL12 与 CXCR4 构成的生物学轴来阻断肿瘤增殖分化转移成为肿瘤治疗的有效途径。

卵巢癌是女性生殖系统三大恶性肿瘤之一，至今缺乏有效的早期诊断，且易转移复发，常规手术和放化疗总体疗效不理想，患者的 5 年存活率仍较低，因此寻找卵巢癌治疗的新方法成为当前严峻的挑战。RNAi 作为新兴的基因沉默技术，其高度特异性、高效性、稳定性、可遗传性等特点为基因的功能研究和肿瘤的靶基因治疗提供了新的方法。Landen 等[10]

在卵巢癌的小鼠模型中，分别用无沉默作用的 siRNA 和靶向癌蛋白 EphA2 的脂质体 DOPC 包裹的 siRNA 处理小鼠 3 周，发现用靶向 EphA2 的 siRNA-DOPC 处理过的小鼠，比用无沉默作用的 siRNA 处理的小鼠肿瘤生长缓慢。研究结果显示 RNA 干扰技术为卵巢癌的临床治疗带来新的希望。介导基因转移的载体可分为非病毒载体和病毒载体两大类。非病毒性载体包括酵母人工染色体、阳离子脂质体包裹 DNA、质粒 DNA 等方法，研究表明在应用质粒 siRNA 载体抑制目的基因表达的实验中，质粒 siRNA 的转染效率不稳定，转染细胞种类有限，应用于动物体内实验时不易作用于靶细胞等，因此限制了质粒 siRNA 载体的应用[11]，脂质体、磷酸钙、电转移等非病毒载体方法转染外源基因效率都很低（1%）[12,13]。总之，它们染效率低且基因表达时间短，尤其在动物体内实验时干扰效应不理想[14]。目前腺病毒载体是最有应用前景的病毒载体之一，具有以下优点：宿主范围广，可感染分裂细胞与非分裂细胞，能容纳较大的外源基因，不整合到宿主细胞基因组中，有较好的安全性和低的致病性，容易包装扩增高滴度的病毒颗粒，比质粒介导的 RNA 干扰有更高的转染率。

在前期实验中我们已经筛选出有效的干扰序列[15]，将该干扰序列构建于腺病毒载体，制备 CXCR4-siRNA 重组腺病毒载体。本研究中将制备的重组腺病毒载体转染 HEK293 细胞进行包装扩增，获得较高滴度的病毒颗粒，使 RNAi 的制备成本明显降低，然后再将其转染人卵巢癌细胞株 SKOV3，检测到绿色荧光蛋白的高表达提示重组腺病毒的高效转染，克服了以质粒作为 siRNA 载体转染效率低、表达时间短的缺点，应用 RT-PCR、Western blot、免疫组化检测人卵巢癌细胞株 SKOV3 中 CXCR4 表达，结果显示 CXCR4-siRNA 重组腺病毒使 CXCR4 的表达明显降低，对靶基因沉默的高效性证实重组腺病毒载体的成功构建，为进一步观察其在体内复杂环境中对卵巢癌的影响打下坚实基础，为研究 CXCR4 在卵巢癌中的生物学行为提供新的手段和肿瘤临床基因治疗提供新的途径，也为 RNA 干扰药物在肿瘤、基因疾病等的研发奠定基础。

参 考 文 献

[1] Balkwill F.Cancer and the chemokine network[J].Nat Rev Cancer, 2004,4(7):540-550.

[2] Sun Y X,Wang J,Shelburne C E,et al.Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1)in human prostate cancers (PCa) in vivo[J].J Cell Biochem,2003,89(3):462-473.

[3] Castellone M D,Guarino V,De Falco V,et al.Functional expression of the CXCR4 chemokine receptor is induced by RET/PTC oncogenes and is a common event in human papillary thyroid carcinomas[J]. Oncogene,2004,23(35):5958-5967.

[4] Schmid B C,Rudas M,Rezniczek G A,et al.CXCR4 is expressed in ductal carcinoma in situ of the breast and in atypical ductal hyperplasia[J].Breast Cancer Res Treat,2003,84(3):247-250.

[5] Hannon G J.RNA interference[J].Nature,2002,418(6894):244-251.

[6] Kryczek I,Wei S,Keller E,et al.Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis[J].Am J Physiol Cell Physiol, 2007,292(3):C987-995.

[7] 李 芳，朱怀仕，韩志强，等.趋化因子受体及配体在卵巢癌细胞迁移中的作用[J].癌症，2005,24(1):23-27.

[8] Bertolini F,Dell'Agnola C,Mancuso P,et al.CXCR4 neutralization,a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma[J]. Cancer Res,2002,62(11):3106-3112.

[9] Engers R,Mueller M,Walter A,et al.Prognostic relevance of Tiam1 protein expression in prostate carcinomas[J].Br J Cancer,2006,95(8): 1081-1086.

[10] Landen C N J,Chavez-Reyes A,Bucana C,et al.Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery[J].Caner Res,2005,65(15):6910-6918.

[11] McNeish I A,Bell S J,Lemoine N R.Gene therapy progress and prospects:cancer gene therapy using tumour suppressor genes[J].Gene Ther,2004,11(6):497-503.

[12] Arthur J F,Butterfield L H,Roth M D,et al.A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells[J].Cancer Gene Ther,1997,4 (1):17-25.

[13] Van Tendeloo V F,Snoech H W,Lardon F,et al.Nonviral transfection of distinct types of human dentritic cells:highefficiency gene transfer by electroporation into hematopoietic progenitorbut not moncyte-derived dendritic cells[J].Gene Ther,1998,5(5):700-707.

[14] Ghosh S S,Gopinath P,Ramesh A.Adenoviral vectors:a promising tool for gene theraphy[J].Appl Biochem Biotechnol,2006,133(1):9-29.

[15] 汤 容，于国新，袁 瑞.shRNA 抑制人卵巢癌 SW626 细胞 CXCR4 基因的研究[J].生物技术通报，2010,4:165-168.

（责任编辑：关蕴良）

更 正

2011年9月《重庆医科大学学报》第9期1057页，重庆医科大学中医药学院针灸教研室曾志华同志撰写的《壳聚糖聚乳酸膜的兔结肠瘘一期修复实验研究》一文，应在作者名中添加黄学宽作者与其相应单位：重庆医科大学中医药学院中医基础教研室。

重庆医科大学学报编辑部

2011 年 10 月