基础研究 文章编号:0253-3626(2010)05-0670-04

RNA 干扰 EGFR 基因对卵巢癌细胞放疗敏感性影响的实验研究

罗 茜[1],吴永忠[2],林远洪[1],郭启帅[1],黄 环[3]

(1. 重庆医科大学附属第一医院肿瘤科,重庆 400016;2. 重庆医科大学临床学院,重庆市肿瘤研究所,重庆 400030;3. 第三军医大学大坪医院肿瘤科,重庆 400042)

【摘 要】目的:构建针对表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor,EGFR)基因的小干扰 RNA(Small interference RNA,siRNA)质粒,转染人卵巢癌 SKOV3 细胞株后,检测 RNA 干扰(RNA interference,RNAi)对 EGFR 基因表达及评估细胞对放疗敏感性的影响。方法:体外构建 EGFR 小发卡状 RNA(Short hairpin RNA,shRNA)的表达质粒,脂质体法转染入 SKOV3 细胞及 G418 筛选阳性克隆。实验随机分为阳性 RNA 干扰组(A 组)、阴性 RNA 干扰组(B 组)、空白对照组(C 组)。采用 RT-PCR、Western Blot 技术检测 EGFR mRNA 及其蛋白质的表达情况。分别给予不同放射剂量(0、2、4、6、8 Gy)照射,MTT 法绘制细胞存活曲线。结果:靶向 EGFR 的序列特异性 shRNA 可明显抑制 EGFR 基因的表达,EGFR mRNA 和蛋白的抑制率分别为 77.5% 和 76.1%;序列特异性 shRNA-EGFR 可明显提高 SKOV3 细胞对放疗的敏感性,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论:体外研究表明 RNAi 沉默 EGFR 基因可以提高卵巢癌 SKOV3 细胞对放疗的敏感性。

【关键词】EGFR 基因;RNA 干扰;卵巢癌;放疗敏感性

【中国图书分类法分类号】R737.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-02-25

Experimental studies on effects of EGFR gene suppression by RNA interference on enhancing radiosensitivity of ovarian cancer cells

LUO Qian, et al

(*Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct a expression vector of EGFR specific siRNA and transfect it into human ovarian cancer cell line SKOV3, then to evaluate the effect of RNA interference (RNAi) on the target gene expression and radiosensitivity of the cell line. *Methods*: EGFR sh- RNA was synthesized in vitro and transfected into SKOV3 cells with lipofectamine technique and then the positive clones were selected by G418. The positive RNA interference cell line, negative RNA interference cell line and the normal control cell line were included in the study. RT-PCR and Western Blot technique were performed to detect the inhibitory effect of RNAi on EGFR mRNA level and protein level, respectively. Three kinds of cell lines were exposed to different doses of radiation. Cell survival curve was drawn by means of MTT method. *Results*: The expression of EGFR gene was surpressed obviously in the specific sequence shRNA group, and EGFR mRNA and protein surpression rates were 77.5% and 76.1%, respectively; Sequence-specific shRNA-EGFR can significantly enhance the radiosensitivity of ovarian cancer cells, and significant statistical differences existed among the three groups ($P<0.01$). *Conclusion*: The experiments in vitro confirmed that EGFR gene silenced by RNAi can significantly enhance the radiosensitivity of ovarian cancer SKOV3 cells.

【Key words】EGFR gene; RNA interference; Ovarian cancer; Radiosensitivity

卵巢癌是是妇科常见的三大恶性肿瘤之一。卵巢癌的病理类型繁多,其中上皮性卵巢癌是最常见的类型。表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor,EGFR)高表达于包括卵巢癌在内的多种上皮源性癌组织[1],研究证实 EGFR 的高表达与肿瘤恶性程度、转移、放化疗敏感度下降密切相关,许多阻滞和下调 EGFR 的方法被用来抑制肿瘤增殖以改善预后,因此 EGFR 已成为公认的肿瘤基因治疗的重要靶点[2]。肿瘤放射抗拒是目前困扰放射肿瘤学界的世界性难题,基因放射治疗增敏可成为 21 世纪放射肿瘤学最重要的研究

作者介绍:罗 茜(1979-),女,硕士,
研究方向:肿瘤基因放疗增敏。

通讯作者:吴永忠,男,教授,E-mail:cqmdwyz@yahoo.com.cn。

方向之一。本研究应用 RNA 干扰技术,构建针对 EGFR 基因序列特异性 dsRNA 表达质粒,探讨 EGFR 基因与卵巢癌放疗敏感性的关系,为卵巢癌的基因放疗提供一定的理论依据。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和质粒 卵巢癌 SKOV3 细胞株购自中科院上海细胞生物研究所。EGFR 家族同源性基因的重组真核表达质粒 pGensil-1-E 及阴性对照非特异质粒 pGensil-1-C 已由本实验室构建。

1.1.2 主要试剂 去内毒素质粒提取试剂购自 OMEGA 公司;上、下游引物由上海生物工程有限公司合成;脂质体 lipofectamine2000 购自 Invitrogene 公司; 蛋白提取试剂盒购自赛百盛公司;鼠抗 EGFR 单克隆抗体购自 SantaCruz 公司;RT-PCR 试剂盒购自宝生物公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自 Sigma 公司;总 RNA 提取试剂盒购自华舜公司;SDS-PAGE 凝胶购自博士德公司。

1.2 方法

1.2.1 靶向 EGFR 基因 shRNA 表达载体的构建 根据 siRNA 的设计原则及质粒载体 pGenesil 的多克隆位点特点,选择 SKOV3 细胞 EGFR 家族同源性基片段 (TGGG GTCGT-CAAAGACGTT)为模板,设计靶向 EGFR 基因序列特异性 shRNA 的质粒载体 (pGenesil-E)(正义链:5'-UGGGGUCGUCAAAGACGUU-3';反义链:5'-ACCCCAGCAGUUUCUGCAA-3'),以此序列为基础,中间加入 CUAUGGACA 茎环序列将其分隔为反向重复序列,两端加上 BamHI 和 Hind Ⅲ酶切位点。与 EGFR 基因序列无关的非特异性 shRNA 的质粒载体(pGenesil-N)(正义链序列:5'-GCAGGUGCGGAAUAUCUGU-3',反义链序列:5'-CGUCCACGCCUUAUAGACA-3')送武汉晶赛生物工程公司合成。

1.2.2 细胞转染与筛选 将含 10%胎牛血清 RPMI-1640 培养基的卵巢癌 SKOV3 细胞株,置于细胞培养箱(条件:37℃,5%CO_2)中常规培养,待细胞长满时,以 0.25%胰酶消化后传代。按 Lipofectamine2000 说明书进行转染。实验分为 3 组,阳性 RNA 干扰组(A 组):转染特异性质粒;阴性 RNA 干扰组(B 组):转染非特异性质粒;空白对照组(C 组):未转染质粒。转染后的细胞加入 G418 液筛选出阳性克隆,再进行培养扩增。

1.2.3 RT-PCR 检测 EGFR mRNA 的表达 收集 3 组细胞,分别提取总 RNA,取定量好的 RNA 各 5 μl,先合成 cDNA,再通过 PCR 进行扩增,扩增产物大小约 425 bp,以 GAPDH 作为内参照,其扩增产物大小约 310 bp。应用凝胶成像分析系统分析目的条带,测定各条带的灰度值,将 EGFR 与 GAPDH 条带灰度值的比值作为扩增后 EGFRmRNA 的相对表达水平。EGFRmRNA 的表达抑制率 =(1- 实验组EGFRmRNA 相对表达水平/空白对照组 EGFRmRNA 相对表达水平)×100%

1.2.4 Western Blot 检测 EGFR 蛋白的表达 收集 3 组细胞,分别提取蛋白;取经处理的蛋白样品各 15 μl 进行电泳;电转至 PVDF 膜;取下 PVDF 膜进行杂交,以 β-actin 作为内参照;化学发光试剂检测:放射自显影,漂洗后定影。检测用 LabworksTM 扫描分析软件系统检测出 EGFR 和 β-actin 的积分光密度值,以 EGFR 与 β-actin 光密度值的比值作为 EGFR 蛋白的相对表达水平。EGFR 蛋白表达的抑制率 =(1-实验组 EGFR 蛋白相对表达水平/空白对照组 EGFR 蛋白相对表达水平)×100%

1.2.5 MTT 检测放疗敏感性 取 A、B、C 3 组细胞,采用不同的剂量(0、2、4、6、8 Gy)照射后,立即用 PBS 清洗 2 遍,经 0.25%胰酶消化,制成单细胞悬液,计数后以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔细胞培养板,每组重复 5 孔。置 37℃、5% CO_2 细胞培养箱中继续培养 4 d 后,每孔加入四甲基偶氮唑蓝 20 μl,孵育 4 h,弃去培养液,每孔加入 150 μl 二甲基亚砜,置水平振荡器振荡 10 min 充分溶解。选择 490 nm 波长,测定吸光值,根据吸光值推测出上述处理后的 5 组活细胞的数目。并计算每组细胞的存活分数(SF),SF=实验组平均吸光值/对照组平均吸光值×100%。

1.3 统计学分析

测量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS13.0 统计软件,行单因素多水平的完全随机设计的方差分析(F 检验)和多重比较的 LSD-t 检验,$P\leq0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 重组质粒载体的构建及测序结果

已构建的靶向 EGFR 基因的序列特异性质粒载体 pGenesil-E(见图 1)。

2.2 细胞转染与筛选

转染成功的 SKOV3 细胞,分别经不同浓度的 G418 培养液(200 μg/ml、400 μg/ml)递增筛选,10 d 后未成功转染的细胞全部死亡,持续筛选 3 周后形成的阳性克隆,经扩增后培养备用,最终筛选浓度维持为 300 μg/ml。卵巢癌 SKOV3 细胞成功转染质粒 pGenesil 24 h 后在倒置荧光显微镜下所见如图所示(见图 2)

2.3 RT-PCR 检测结果

用 RT-PCR 法检测 mRNA 的表达结果如图 3 所示:3 组 EGFRmRNA 条带均在 425 bp 处表达,其中阳性干扰组 EGFRmRNA 条带的亮度明显低于阴性对照组及空白对照组,但阴性对照组与空白对照组条带亮度极其相似;3 组中 GADPHmRNA 条带均在 310 bp 处表达,且亮度相似;应用统计软件分析结果(见表 1):阳性 RNA 干扰组与阴性 RNA 干扰组及空白对照组之间的 EGFRmRNA 相对表达水平差异有统计学意义($P<0.05$),阴性 RNA 干扰组与空白对照组之间

差异无统计学意义（$P>0.05$）。

2.4 Western Blot 检测结果

用 Western Blot 检测蛋白表达的结果如图 4 所示：3 组 EGFR 蛋白均在 170 kD 处表达，其中阳性 RNA 干扰组中的强度明显弱于阴性 RNA 干扰组及空白对照组；3 组内参 β-actin 均在 42 kD 处表达，且 3 组亮度相似。应用统计软件分析检测结果（见表 2）：阳性 RNA 干扰组与阴性 RNA 干扰组、空白对照组之间的 EGFR 蛋白相对表达水平差异有统计学意义（$P<0.05$），阴性 RNA 干扰组与空白对照组之间差异无统计学意义（$P>0.05$）。

2.5 MTT 检测结果

应用 MTT 法检测 3 组细胞存活的结果（见表 3），随照射剂量的升高细胞存活率逐渐下降，其中阳性 RNA 干扰组下降趋势最显著。阳性 RNA 干扰组与阴性 RNA 干扰组及空白对照组之间不同照射剂量时在统计学上均有显著性差异（$P<0.05$），多重比较的 LSD-t 检验显示阴性 RNA 干扰组与空白对照组之间差异无统计学意义（$P>0.05$）。每组 SKOV3 细胞受不同剂量照射后存活分数所形成的细胞剂量效应曲线如图 5 所示。

表 1 3 组细胞 EGFR mRNA 的表达结果（$\bar{x}\pm s$）

分组	EGFR mRNA 的相对表达水平	抑制率(%)
阳性 RNA 干扰组(A 组)	0.290 ± 0.034	77.50
阴性 RNA 干扰组(B 组)	1.236 ± 0.065	0.00
空白对照组 (C 组)	1.287 ± 0.082	0.00

表 2 3 组细胞 EGFR 的蛋白表达结果（$\bar{x}\pm s$）

分组	EGFR 蛋白的相对表达水平	抑制率%
阳性 RNA 干扰组(A 组)	0.196 ± 0.038	76.10
阴性 RNA 干扰组(B 组)	0.783 ± 0.022	0.00
空白对照组 (C 组)	0.821 ± 0.042	0.00

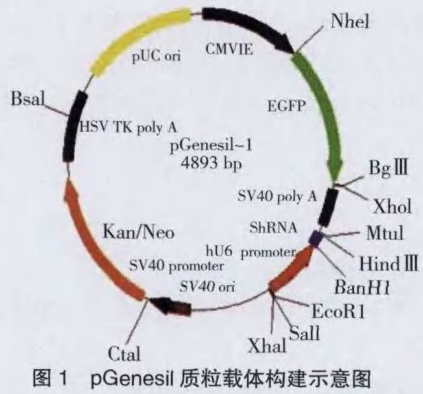
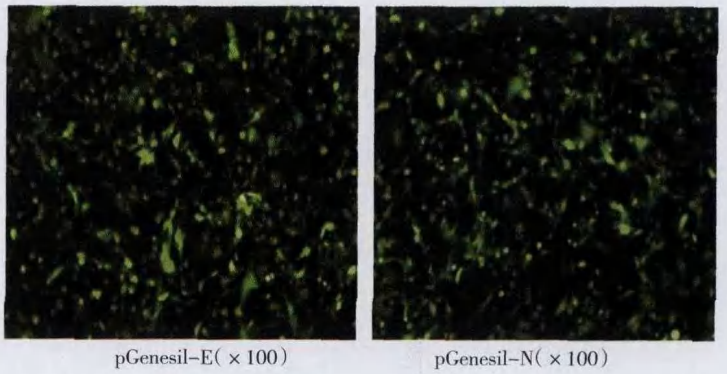


图 1 pGenesil 质粒载体构建示意图



pGenesil-E（×100） pGenesil-N（×100）

图 2 转染特异性质粒（pGensil-E）和非特异性质粒（pGenesil-N）24 h 后卵巢癌 SKOV3 细胞倒置荧光显微镜示意图）



1、4. 阳性干扰组；2、5. 空白对照组；3、6. 阴性对照组；1、2、3. 检测 EGFR mRNA 表达；4、5、6. 检测 GAPDH mRNA 表达

图 3 EGFR mRNA RT-PCR 琼脂糖凝胶电泳

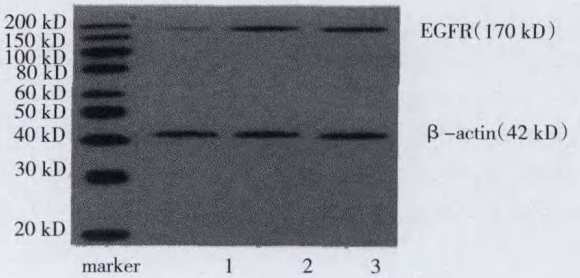


图 4 EGFR 蛋白的 Western Blot 示意图

表 3 不同放射剂量时细胞的存活率（%，$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

照射剂量(Gy)	A 组	B 组	C 组	F 值	P 值
2	85.00 ± 1.30	89.92 ± 0.35	90.28 ± 0.29	69.76	<0.05
4	68.44 ± 0.83	81.82 ± 0.31	82.06 ± 0.30	1252.01	<0.05
6	40.70 ± 0.32	74.18 ± 0.34	74.62 ± 0.48	12790.94	<0.05
8	18.72 ± 0.53	50.26 ± 0.44	50.86 ± 0.42	7885.35	<0.05

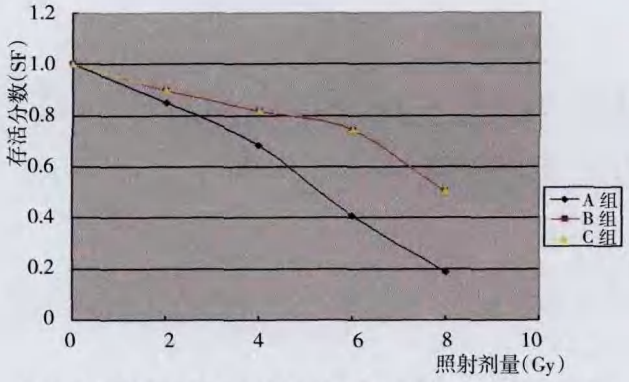


图 5 pEGFR-shRNA 对 SKOV3 细胞照射剂量敏感性的影响

3 讨 论

EGFR 是表皮生长因子受体家族成员之一，在很多实体瘤组织中过表达。近年来随着分子生物学的发展，有研究表明 70%以上的卵巢癌组织中有 EGFR 高水平表达[3,4]，EGFR 高表达或活性增强与肿瘤增殖、侵袭、转移、抗凋亡及放化疗敏感度下降等许多特性有关，因此研究 EGFR 及针对 EGFR 的治疗，成为近年来抗肿瘤治疗的主要热点。

RNAi 是近年发展起来的沉默基因的新技术，是目前分子生物学研究领域的热点之一。它是指由双链 RNA 引发的转录后基因沉默机制，它通过具有序列特异性的双链 RNA (Double-stranded RNA，dsRNA)或 shRNA 与靶基因 mRNA 结合而导致目的基因表达下调[5,6]。新近研究发现，RNAi 技术在应用过程中，siRNA 可通过与目的基因具有同源性的其他 mRNA 结合，或者与细胞的蛋白结合，产生非特异作用，即脱靶效应(Off-target)导致基因沉默特异性降低[6]。RNAi 具有高稳定性，高效性，高特异性，可遗传性，可扩散性等特点，目前 RNA 干扰在癌基因组功能研究和肿瘤基因治疗中已显示出强大的效果。

卵巢癌是妇科常见的三大恶性肿瘤之一，近年发病率有不断上升趋势，卵巢癌发病隐匿，确诊时多为中晚期，故是造成女性生殖道癌瘤中死亡原因最高的肿瘤。治疗上仍以综合治疗为主，但目前尚无一套成熟的、行之有效的综合治疗方案。放射治疗是通过电离辐射直接和间接的作用导致 DNA 碱基损伤、单链和(或)双链断裂以及 DNA 链交联，从而导致细胞死亡或突变。所有的生物细胞都存在 DNA 损伤修复系统，这是细胞维持自身基因组稳定最重要的防御及保护机制，而对于肿瘤细胞，DNA 损伤与修复则是其抵抗放疗，或导致其对放疗不敏感的重要机制之一。卵巢癌细胞对射线抗拒，属于对放疗不敏感的肿瘤。除肿瘤自身对射线的敏感性具有异质性外，在放射线杀伤肿瘤细胞的同时，不可避免地会引起正常组织的损伤[7]，也是影响放疗效果的重要因素。基因治疗能在增强放射治疗效应的同时减少放疗的不良反应，基因治疗与放疗相结合(基因放疗)是肿瘤治疗学领域一种非常重要的发展趋势[8]。

本研究根据 EGFR 基因在卵巢癌中呈高表达，将 RNA 干扰技术与目前国际上有关辐射信号转导途径的研究结合起来，采用 RNA 干扰技术阻断导致辐射抗拒性的信号转导途径上的 EGFR 关键基因家族，以观察其对肿瘤放射敏感性的影响，探讨其在卵巢癌放疗敏感性中的作用。本实验根据 siRNA 的设计原则，选择 EGFR 基因家族中高度同源的基因序列，构建序列特异性 shRNA-EGFR 的质粒载体，将质粒载体转染卵巢癌 SKOV3 细胞，通过 G418 筛选得到稳定转染的细胞株。通过 RT-PCR、Western Blot 检测到序列特异性 shRNA-EGFR 明显抑制 EGFR 基因的表达，采用 MTT 法检测到转染序列特异性 dsRNA-EGFR 的卵巢癌细胞对放射治疗的敏感性较对照组明显增高，从分子生物学水平证实了 EGFR 基因沉默能够提高卵巢癌细胞的放疗敏感性，初步显示了 RNA 干扰技术在卵巢癌基因增敏放疗中的潜在作用，而且为肿瘤治疗提供了新策略，为完善 RNA 干扰技术放疗增敏的临床前研究并为该技术的应用由基础到临床提供理论基础。

参 考 文 献

[1] Herbst R S.Review of epidermal growth factor receptor biology[J].Int J Radiat Oncol Biol Phys,2004,59(s 2):21-26.

[2] Yarden Y.The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities[J].Eur J Cancer, 2001,37(s 4):s3-s8.

[3] Nielsen J S, Jakobsen E, Hølund B,et al. Prognostic significance of p53, Her-2, and EGFR over expression in borderline and epithelial ovarian cancer[J].Int J Gynecol Cancer,2004,14(6):1086-1096.

[4] Alper O,Bergmann-Leitner E S,Bennett T A,et al.Epidermal growth factor receptor signaling and the invasive phenotype of ovarian carcinoma cells[J]. J Natl Cancer Inst,2001,93(18):1375-1384.

[5] Kim V N.Small RNAs:classification,biogenesis,and function[J].Mol Cells,2005,19(1):1-15.

[6] Tomari Y,Zamore P D.Perspective:machines for RNAi[J].Genes Dev, 2005,19(5):517-529.

[7] McBride W H,Chiang C S,Olson J L,et al.A sense of danger from radiation[J].Radiat Res,2004,162(1):1-19.

[8] Collis S J,DeWeese T L.Enhanced radiation response through directed molecular targeting approaches[J].Cancer Metastasis Rev,2004,23 (3-4):277-292.

(责任编辑：冉明会)