基础研究 文章编号:0253-3626(2009)03-0265-04

RNAi 沉默 EGFR 基因在卵巢癌裸鼠移植瘤的成瘤抑制作用

林远洪[1],吴永忠[1,2],黄 环[1],郭启帅[1],罗 茜[1]
(1.重庆医科大学附属第一医院肿瘤科,重庆 400016;2.重庆市肿瘤研究所,重庆 400030)

【摘 要】目的:探讨应用 RNA 干扰技术沉默 EGFR 基因对卵巢癌 SKOV3 细胞成瘤力的抑制作用。方法:构建针对 EGFR 序列特异性 dsRNA 的表达载体,用脂质体转染 SKOV3 细胞及 G418 筛选阳性克隆。建立裸鼠移植瘤模型,分为阳性干扰组、阴性对照组、空白对照组。监测瘤体积,测量瘤质量,采用 RT-PCR、Western Blot、免疫组化检测移植瘤 EGFR 基因的表达。结果:阳性干扰组成瘤力明显降低,EGFR mRNA 和蛋白的抑制率分别为 78.8% 和 76.4%。结论:动物实验证实 RNAi 沉默 EGFR 基因可明显抑制卵巢癌的成瘤力。

【关键词】EGFR 基因;RNA 干扰;卵巢癌
【中国图书分类法分类号】R737.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-23

Inhibition effect of silencing EGFR gene by RNAi on tumorigenesis of xenograft tumor of ovarian cancer

LIN Yuan-hong, et al
(*Department of Tumor, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the inhibition effect of silencing EGFR gene by RNAi on tumorigenesis of ovarian cancer SKOV3 cells. *Methods*: The EGFR gene sequence- specific dsRNA expression vector was constructed, lipofectamine transfer SKOV3 cells and G418 were used for the selection of positive clones. Xenograft tumor models were established.The model mice were divided into positive interference group, negative control group, blank control group. The tumor volume was monitored; the tumor quality was measured; the expression of EGFR gene in the xenograft tumor was detected by RT-PCR, Western Blot and immunohistochemical. *Results*: The tumorigenesis of the positive interference group decreased significantly, EGFR mRNA and protein inhibition rates were 78.8% and 76.4%, respectively. *Conclusion*: The animal experiment was confirmed that Silencing of EGFR gene by RNAi can obviously inhibit the tumorigenesis of ovarian cancer.

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

表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor,EGFR)是相对分子量为 170 kD 的跨膜糖蛋白,具有酪氨酸激酶活性,在包括卵巢癌在内的多种上皮源性肿瘤中呈高表达,研究表明 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 目前成为公认的肿瘤基因治疗的重要靶点。RNAi 技术是近年发展起来的沉默基因的新技术,通过 dsRNA 特异性地降解具有同源序列的 mRNA, 阻断相应基因的表达,从而抑制蛋白表达。RNA 干扰技术能特异、高效、快速地抑制靶基因的表达,已广泛应用于基因治疗的研究。本研究根据 EGFR 基因在卵巢癌高表达,利用 RNAi 技术,观察其对卵巢癌 SKOV3 细胞在裸鼠体内的成瘤力的影响,探讨其生物学特性的改变,为卵巢癌基因治疗提供一定的动物实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

卵巢癌 SKOV3 细胞株购自中科院上海细胞生物研究所。BALB/C 雌性裸鼠购自北京维通利华公司。脂质体 lipofectamine2000 购自 Invitrogene 公司;去内毒素质粒提取试剂购自 OMEGA 公司;鼠抗 EGFR 单克隆抗体购自 Santa cruz

作者介绍:林远洪(1979-),男,硕士,
研究方向:基因增敏放疗。
通讯作者:吴永忠,男,教授,E-mail:cqmdwyz@yahoo.com.cn。
基金项目:重庆市自然科学基金资助课题(2005-BB-5314)。

公司；蛋白提取试剂盒购自赛百盛公司；免疫组化试剂盒及SDS-PAGE 凝胶、预染蛋白 Maker 购自博士德公司；总 RNA 提取试剂购自华舜公司；RT-PCR 试剂盒购自宝生公司。

1.2 方法

1.2.1 靶向 EGFR 基因 dsRNA 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 EGFR 家族同源性基因片段（TGGGGTCGTCAAAGACGTT）为模板，设计靶向 EGFR 基因序列特异性 dsRNA 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 *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ酶切位点，此外，与 EGFR 基因序列无关的非特异性 dsRNA 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 细胞培养及转染、筛选 卵巢癌 SKOV3 细胞株采用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基，置 37℃，5% CO_2 细胞培养箱常规培养，细胞长满时，以 0.25% 胰酶消化传代。按 Lipofectamine2000 说明书进行转染。实验分为 3 组：阳性干扰组：转染特异性质粒 pGenesil-E，阴性对照组：转染非特异性质粒 pGenesil-N，空白对照组：未转染质粒 pGenesil。转染后的细胞加入 100 mg/mlG418 筛选出阳性克隆，细胞分别命名为：pGenesil-E/SKOV3、pGenesil-N/SKOV3，再进行扩增培养。

1.2.3 建立卵巢癌移植瘤模型 采用常规培养细胞种植法，取对数生长期的 pGenesil-E/SKOV3、pGenesil-N/SKOV3、SKOV3 细胞，分别制成 2×10^7 个 /ml 的细胞悬液，取 0.3 ml 接种于每只 BALB/C 裸鼠右肩胛皮下，每组 5 只，观察肿瘤生长情况，测量肿瘤体积，肿瘤近似体积（V）=∏/6（abc），单位 mm^3，a、b、c 分别为肿瘤结节的长度、宽度和高度。两个月后处死小鼠，取出瘤块，称其质量，计算抑瘤率，抑瘤率%=（空白对照组瘤质量 - 实验组瘤质量）/ 空白对照组瘤质量 × 100%。

1.2.4 RT-PCR 检测 EGFR mRNA 的表达 分别取 3 组瘤组织各 40 mg，提取总 RNA，取定量好的 RNA 5 μl，合成 cDNA，再通过 PCR 扩增，EGFR 引物序列：P1（上游）5'-AGGAGTGCGTGGAGGAAT-3'、P2（下游）5'-CTGCCGTCGCTTGATGAG-3'，扩增产物为 425 bp，同时选取 GAPDH 作为内参照，GADPH 引物序列：P1（上游）5'-AGGTCCACCACTGACACGTT-3'、P2（下游）5'-GCCTCAAGATCATCAGCAAT-3' 扩增产物大小约 310 bp。（PCR 反应参数：94℃30sec，60℃ 30 sec，72℃ 1 min，30 个循环，1.5% TAE 琼脂糖凝胶电泳检测）。目的条带采用凝胶成像分析系统分析，测定各条带的灰度值，以 EGFR 与 GAPDH 条带灰度值的比值作为 EGFR mRNA 的相对表达水平。EGFR mRNA 表达抑制率%=（1- 实验组 EGFR mRNA 相对表达水平 /空白对照组 EGFR mRNA 相对表达水平）× 100%。

1.2.5 Western Blot 检测 EGFR 蛋白的表达 分别取 3 组瘤组织各 20 mg，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。检测用 Labworks™ 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%。

1.2.6 免疫组化检测 EGFR 蛋白的表达 标本用 10% 甲醛固定，常规石蜡包埋，切片，步骤按试剂盒说明进行，DAB 染色剂显色，阳性产物为棕黄色或棕褐色，背景为蓝色。采用 Olympus 公司图像采集系统及北航医学图像分析管理系统进行半定量析，EGFR 蛋白表达的抑制率%=（1- 实验组平均光密度值 /空白对照组平均光密度值）× 100%。

1.3 统计学分析

采用 SPSS11.0 统计分析软件处理，数据结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，计量资料用方差分析。

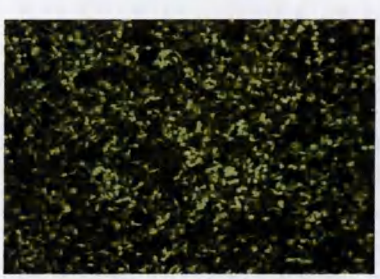
2 结 果

2.1 细胞转染与筛选

瞬时转染成功的 SKOV3 细胞，24 h 后开始在倒置荧光显微镜下观察、摄像（图 1），分别经 G418 200 μg/ml、400 μg/ml 浓度的培养液递增筛选，10 d 后未转染细胞全部死亡，维持筛选 3 周后形成阳性克隆，扩增培养备用，最终筛选维持浓度 300 μg/ml。



A. 质粒 pGensil-E（× 100）



B. 质粒 pGensil-N（× 100）

图 1 卵巢癌 SKOV3 细胞转染质粒 pGensil 24 h 后所见

2.2 肿瘤生长情况

3 组细胞接种后 1 周左右成瘤，分别于 20 d、30 d、40 d、50 d、60 d 测量瘤体积（表 1），统计软件分析结果：阳性干扰组与阴性对照组、空白对照组差异有统计学意义（$P<0.01$），阴性对照组与空白对照组差异无统计学意义（$P>0.05$）。

2.3 抑瘤率

接种 60 d 后处死裸鼠，3 组在裸鼠体内的瘤质量及抑瘤率（表 2），统计软件分析结果：阳性干扰组与阴性对照组、空白对照组差异有统计学意义（$P<0.01$），阴性对照组与空白对照组差异无统计学意义（$P>0.05$）。

2.4 RT-PCR 检测结果

EGFR mRNA 的表达结果（图 2）。阳性干扰组中 EGFR mRNA 条带（425 bp）的亮度明显低于阴性对照组及空白对照组，而 3 组中 GADPH mRNA 条带（310 bp）的亮度相似；统计软件分析结果（表 3）：阳性干扰组与阴性对照组、空白对照组差异有统计学意义（$P<0.01$），阴性对照组与空白对照组差异无统计学意义（$P>0.05$）。

2.5 Western Blot 检测结果

EGFR 的蛋白表达结果（图 3）。阳性干扰组中 EGFR 蛋白（170 KD）表达的强度明显弱于阴性对照组及空白对照组，而内参 β-actin（42 kD）在 3 组中的强度相似，统计软件分析结果（表 4）：阳性干扰组与阴性对照组、空白对照组差异有统计学意义（$P<0.01$），阴性对照组与空白对照组差异无统计学意义（$P>0.05$）。

2.6 免疫组化检测结果

免疫组化结果（图 4）。阴性对照组与空白对照组中胞膜及胞浆内见大量棕黄色颗粒，阳性干扰组中胞膜及胞浆内见少量棕黄色颗粒，统计软件分析结果（表 5）：阳性干扰组与阴性对照组、空白对照组差异有统计学意义（$P<0.01$），阴性对照组与空白对照组差异无统计学意义（$P>0.05$）。

表 1 3 组瘤细胞不同生长时间的瘤体积（mm^3）

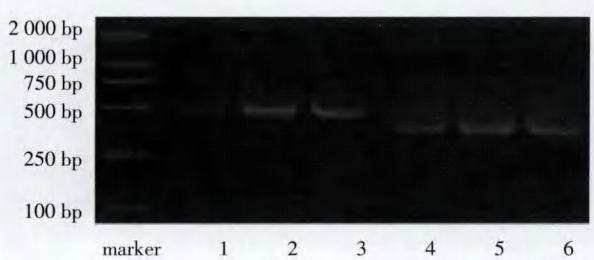
分组	20 d	30 d	40 d	50 d	60 d
阳性干扰组	33.0 ± 5.8	142.4 ± 8.8	288.8 ± 18.2	416.0 ± 27.7	531.2 ± 42.7
阴性对照组	80.4 ± 10.3	265.0 ± 15.5	510.4 ± 53.2	680.2 ± 52.7	846.6 ± 64.6
空白对照组	95.6 ± 11.9	280.8 ± 18.4	531.4 ± 60.6	691.6 ± 44.0	884.8 ± 60.2

表 2 荷瘤 60 d 后 3 组瘤组织的瘤重（g）

分组	裸鼠皮下瘤重	抑瘤率%
阳性干扰组	0.64 ± 0.09	40.7
阴性对照组	1.03 ± 0.11	4.8
空白对照组	1.08 ± 0.16	–

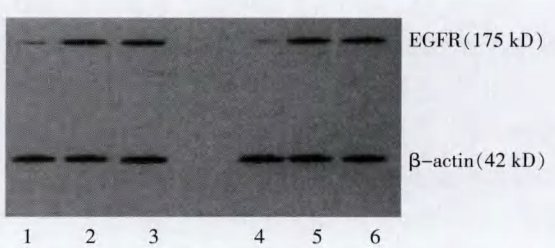
表 3 3 组瘤组织 EGFR mRNA 的表达结果

分组	EGFR mRNA 的相对表达水平	抑制率%
阳性干扰组	0.272 ± 0.043	78.8
阴性对照组	1.210 ± 0.098	5.5
空白对照组	1.281 ± 0.118	–



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 2 EGFR mRNA 的 RT-PCR 琼脂糖凝胶电泳



1、4. 阳性干扰组；2、5. 阴性对照组；3、6. 空白对照组

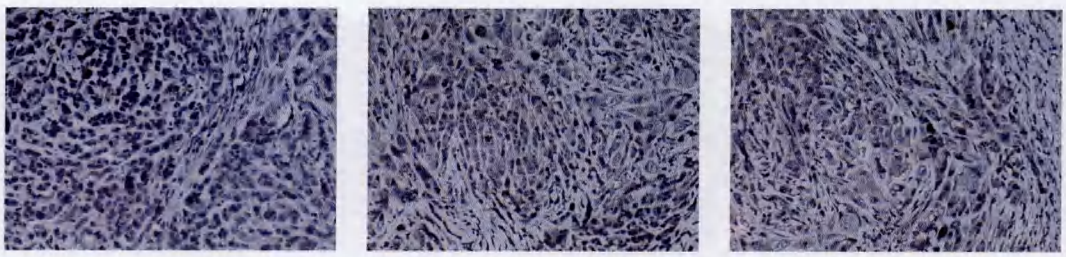
图 3 EGFR 蛋白的 Western Blot 示意图

表 4 3 组瘤组织 EGFR 的蛋白表达结果

分组	EGFR 蛋白的相对表达水平	抑制率%
阳性干扰组	0.194 ± 0.034	76.4
阴性对照组	0.805 ± 0.042	2.2
空白对照组	0.823 ± 0.067	–

表 5 3 组瘤组织的免疫组化的检测结果

分组	平均光密度值	抑制率%
阳性干扰组	0.104 ± 0.014	69.7
阴性对照组	0.323 ± 0.026	5.8
空白对照组	0.343 ± 0.03	–



A. 阳性干扰组　　B. 阴性对照组　　c. 空白对照组

图 4　免疫组化示意图(×400)

3　讨　论

RNA 干扰是近年发展起来的沉默基因的新技术,也成为分子生物学研究中最为活跃的热点之一。RNA 的相关研究被美国《科学》杂志评为 2002 年的十大科技之首[1]。RNA 干扰(RNA interference,RNAi)是一些具有序列特异性的小分子干扰 RNA(Small interfering RNA,siRNA)以高效特异地阻断体内特定基因表达,促使 mRNA 降解,诱使细胞表现出特定基因缺失的表型,称为 RNA 干扰[2]。与传统的基因治疗方式相比,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 干扰在功能基因组学、肿瘤基因治疗、抑制病毒复制、药物靶筛选和细胞信号传导通路分析等方面显示出广泛的应用前景。

表皮生长因子受体是原癌基因 C-erbB-1 的表达产物,是一种跨膜糖蛋白,分子量为 170 kD,具有酪氨酸激酶活性,能被生长因子或转化生长因子激活,并通过 Ras/MAPK、PI3K/AKT 等通路将信号从细胞外传递到细胞内,调节细胞的生长分化,调控细胞周期,促进损伤修复。近年来随着分子生物学的发展,有学者研究表明,表皮生长因子受体存在于所有正常上皮和部分间叶来源的细胞,在 70%以上的卵巢癌组织中有 EGFR 高水平表达[3,4],与肿瘤增生、转移、放化疗敏感性下降关系密切,是极具发展的前途的治疗靶位[5]。

本实验采用基因功能研究中最直接,最有效的 RNA 干扰技术,选择表皮生长因子受体为研究对象,探索其对卵巢癌 SKOV3 细胞成瘤力的抑制作用。本实验构建了针对 EGFR 序列特异性 dsRNA 的表达载体,将质粒载体转染入卵巢癌 SKOV3 细胞并筛选出阳性克隆,获得了稳定转染的细胞株,通过建立卵巢癌移植瘤模型,观察到序列特异性的 dsRNA-EGFR 能明显抑制卵巢癌 SKOV3 细胞成瘤能力;通过 RT-PCR、Western Blot、免疫组化检测到 EGFR 基因的 mRNA 和蛋白的表达明显抑制,证实序列特异性的 dsRNA-EGFR 能显著抑制 EGFR 基因的表达,从而抑制 EGFR 蛋白合成,使 EGFR 介导的细胞信号转导通路被阻断,影响了卵巢癌 SKOV3 细胞的生长,从而进一步证实了卵巢癌 SKOV3 细胞生长缓慢与 EGFR 基因沉默相关。

本研究发现应用 RNAi 技术可明显下调 EGFR 基因的表达,抑制了肿瘤生长,初步显示了 RNAi 技术在卵巢癌基因治疗中的潜在作用,为以 EGFR 为靶点的卵巢癌治疗提供了实验依据。目前,肿瘤治疗提倡综合治疗,临床上如采取联合化放疗,可能会进一步提高疗效。

参　考　文　献

[1] Couzin J. Breakthrough of the year: small RNAs make big splash[J]. Science, 2002, 298(5602): 2296-2297.

[2] Zamore P D, Tuschl T, Sharp P A, et al. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals [J]. Cel, 2000, 101(1): 25-33.

[3] Nielsen J S, Jakobsen E. Prognostic significance of p53, Her-2, and EGFR overexpression in borderline and epithelial ovarian cancer[J]. 1nt J Gynecol Cancer, 2004, 14(6): 1086.

[4] Alper, 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.

[5] Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer-signa1ling mechanisms and therapeutic opportunities[J]. Eur J Cancer, 2001, 37(4): 3-8.

[6] 杨华安, 苟　欣, 吴　跃, 等. RNA 干扰技术阻断 EJ 细胞中 survivin 基因的表达 [J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(1): 33-36.

[7] Hirsch F R, Witta S. Epidermal growth factor receptor signaling and the invasive phenotype of ovarian carcinoma cells[J]. Curt Opin Oncol, 2005, 17(2): 118-122.

[8] Maihle N J, Baron A T, Barrette B A, et al. EGF/ErbB receptor family in ovarian cancer [J]. Cancer Treat Res, 2002, 107: 247-258.

(责任编辑: 冉明会)