维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)04-0552-04

靶向 COX-2 基因的 RNA 干扰治疗裸鼠胃癌的实验研究

谯 敏[1],向廷秀[1],赵 蕾[2],王丕龙[1]

(1.重庆医科大学附属第一医院消化内科;2.重庆医科大学附属第二医院肝胆外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:利用 RNA 干扰技术在裸鼠体内抑制 COX-2 基因表达,探讨 RNA 干扰对胃癌治疗的特异性和相关机制。方法:设计靶向 COX-2 基因的 siRNA,构建重组表达质粒 pTZU6+1-siRNA-COX-2 并导入裸鼠皮下移植瘤,在体外诱导 RNA 干扰,采用 RT-PCR 法、免疫组化法同时检测处理组和对照组 COX-2 基因表达,Western blotting 检测了与细胞增殖相关信号分子 p53、PCNA 及 Ki67 蛋白表达。结果:pTZU6+1-siRNA-COX-2 导入裸鼠皮下移植瘤后 14 天,肿瘤体积明显变小。COX-2 的 mRNA 表达由 98.36%下调到 43.44%,COX-2 蛋白表达由 86.24%下调至 47.59%。PCNA 及 Ki67 蛋白表达均明显下调。对照组各指标均无明显变化。结论:siRNA 明显抑制了 COX-2 表达,并抑制肿瘤生长,这可能与上调 p53 蛋白和下调 PCNA 及 Ki67 蛋白表达有关。

【关键词】RNA 干扰;胃癌;COX-2;PCNA;Ki67

【中国图书分类法分类号】R737.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-01-04

Experimental research on RNA interference targeting COX-2 in treatment of gastric carcinoma of nude mice

Qiao Min, et al.

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

【Abstract】*Objective*: To investigate the specificity and inhibitory mechanism of RNA interference technology for gastric carcinoma gene therapy by inhibiting COX-2 in nude mice. *Methods*: Small interference RNAs targeting COX-2 gene were designed. pTZU6+1-siRNA-COX-2 vector was constructed and transfected into hypodermical gastric tumor in nude mice to induce RNAi. The changes of COX-2 gene expression were detected with RT-PCR and immunochemistry, and the expression of PCNA and Ki67 were tested by Western blot. *Results*: The expression of COX-2 was remarkably inhibited by RNAi in vivo. Tumor size decreased significantly after pTZU6+1-siRNA-COX-2 vector was injected to tumor; the mRNA level of COX-2 decreased from 98.36% to 43.44%, and its protein expression also reduced from 86.24% to 47.59%. PCNA and Ki67 proteins were down-regulated. In contrast, there were almost no changes in control group. *Conclusion*: RNAi inhibits the COX-2 gene expression and tumor growth with good specificity, which may be the result of up-regulating of p53 protein and down-regulating PCNA and Ki67 proteins.

【Key words】RNA interference;Gastric;Carcinoma;COX-2;PCNA;Ki67

环氧化酶 (cyclooxygenase,COX) 有两种同工酶,COX-1 和 COX-2。COX-1 是一种在正常组织中持续表达的结构酶,是正常细胞的组成蛋白。COX-2 是一种诱导型酶,静息状态下不表达,在正常组织中水平很低,难以检测到。当细胞接受到相应的刺激后才开始迅速合成,表达水平升高。COX-2 基因可被多种刺激因素上调,这些因素存在于细胞内外,包括各种生长因子和细胞因子、内毒素、致癌剂和癌基因产物等。近年来研究表明,COX-2 在胃癌组织中呈高表达状态,与胃癌的发生、发展和转移都密切相关[1-3]。本研究依据 RNA 干扰(RNA interference,RNAi)原理,使用以质粒为载体,哺乳动物体内转录合成 siRNA 的技术[4,5],设计、构建,并筛选靶向 COX-2 基因的小干扰 RNA(small interfering RNA,siRNA),导入裸鼠皮下移植瘤,研究 siRNA 特异诱导 COX-2 基因转录后沉默,其对肿瘤生长的影响以及相关信号分子 PCNA 和 Ki67 的改变。

作者介绍:谯 敏(1977-),女,住院医师,博士,
主要研究方向:胃癌的防治。

1 材料与方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 材料

质粒 pTZU6+1 由重庆医科大学感染性疾病分子生物学重点实验室黄爱龙教授惠赠。限制性内切酶 XbaI, SalI, *Hind*III 和 EcoRI 购自 TakaRa 公司，质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、DNA 连接试剂盒、总 RNA 提取试剂、RT-PCR 试剂盒、转染试剂 lipofectamine 2000 等分别购自 TakaRa、Promega、Omiga 和 Invitrogen 公司等。COX-2，p53，PCNA 和 Ki67 单克隆抗体，购自 Santa Cruz 公司。COX-2 引物和内参 GAPDH 引物以及 siRNA 转录模板由北京三博远志生物工程技术有限服务公司和大连宝生物公司合成。

1.2 细胞培养

胃癌细胞株 BGC-823 由重庆医科大学病理生理教研室提供。在含 10%小牛血清的 RPMI-1640 培养液中，37℃ 5% CO_2 培养箱中培养。

1.3 siRNA 结构的设计和合成

根据 siRNA 设计原则[5]和 COX-2 编码序列，设计 19 个碱基的 DNA 片段（AY462100 nucleotides 157~175），中间为 4 个与目的基因无同源性的插入序列(TTCG)，末端终止子为 TTTTT，并利用 BLAST 进行查询，确定其为干扰 COX-2 基因的特异性序列。设计合成一对 COX-2 编码序列的反向重复序列及其对应的点突变的反向重复序列。合成的 DNA 两端设计有 XhoI 或 XbaI 酶切位点，便于与 pTZU6 + 1 载体连接。siRNA 的转录模板序列如下：正义：5/-AACTGCTCAACACCG-GAAT-3/，反义：5/-ATTC CGGTGTTGAGCAGTT-3/；正义：5/-AACTGCTCTACACCGGAAT-3/，反义：5/-ATTCCGGTGTA GAGCAGTT -3/。

1.4 重组载体 siRNA 的构建

内切酶 Sal I 和 Xba I 酶切转录载体 pTZU6+1，凝胶电泳检查证实载体酶切完全。将其与纯化的双链 DNA 片段在 T4DNA 连接酶作用下，4℃连接过夜，转化大肠肝菌 JM109，Amp 抗性筛选，平板培养。阳性克隆提取 DNA，用 Sal I、EcoR I 和 *Hind* III 分别酶切，并用相同的酶酶切载体 pTZU6+1 作为对照，琼脂糖凝胶电泳鉴定。将筛选的阳性重组质粒经测序确定，以证实目的目的 DNA 片段已插入 pTZU6+1 载体，构建的重组质粒命名为 pTZU6+1-siRNA -COX-2，对应目的片段及相应的点突变序列构建的重组质粒分别简称为 pC-siRNA 和 pC′ -SiRNA 质粒。

1.5 裸鼠皮下移植瘤模型

将正常培养的 BGC-823 细胞用胰酶消化、离心、去上清，沉淀用 RPMI-1640 培养液重悬，调整浓度为 1×10^7 个/ml，分别取 0.5ml BGC-823 细胞接种于 BALB/c 裸鼠腹股沟皮下。按公式 $V=1/2\ a \times b^2$ (V 代表瘤体积，a 为长径，b 为短径)，待瘤体积生长到 50~70 mm^3 时将裸鼠随机分成 3 组，每组 4 只。按 Invitrogen 公司的 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书操作，分组转染 pC-siRNA、pC′ -SiRNA 和空载体 pTZU6+1 于瘤体，50μg/（次/只），隔天 1 次，共 7 次。14 天后断颈处死裸鼠，分离出瘤组织。

1.6 RT- PCR 检测 COX-2 mRNA 水平表达的变化

Trizol 试剂提取提取肿瘤组织总 RNA，然后按 Qiagen 公司的 RT-PCR 一步法试剂盒使用说明书操作。反应条件为 50℃ 30min，94℃ 5min，94℃ 55s，54℃ 55s，72℃ 55s，35 cycles。以 GAPDH 作为内参。COX-2 引物序列为，正义：5′ -GT-CAAAACCGAGGT GTATGT-3′，反义：5′ -AAGTTGGTG-GACTGTCAATC-3′；扩增产物长度为 270bp。GAPDH 引物序列为，正义：5′ -GGAAGGTGAAGGTCGGAGT-3′，反义：5′ -GACCACCTGGTGCTCAGTGT-3′；扩增产物长度为 450bp。扩增产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳 30 min，EB 染色，用 BIO-RAD 图象分析仪上观察并扫描制片，记录结果。

1.7 免疫组织化学检测 COX-2 蛋白的表达变化

分离得到的肿瘤组织包埋，固定，石蜡切片，脱蜡，然后按照 COX-2 抗体说明书（SABC 法）进行操作。DAB 显色，二甲苯透明，封片并照相。采用软件 Image Proc Plus3.0 (IPP3.0) 进行分析。

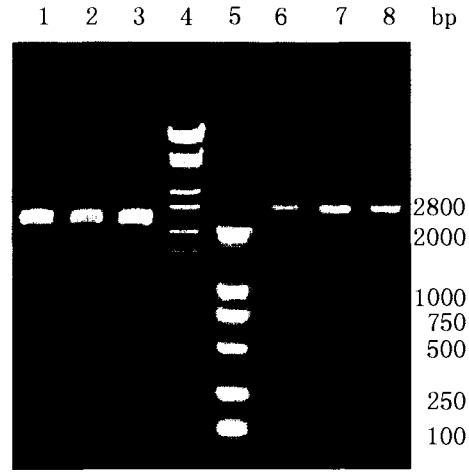
1.8 Western blot 检测 p53、PCNA 和 Ki67 蛋白的表达变化

将肿瘤组织碾磨、超声破碎、蛋白上样缓冲液处理、煮沸、混匀、-20℃保存备用。配制 10%SDS-PAGE 分离胶和 5% SDS-PAGE 浓缩胶。取保存的样品，上样 10μl，90V 恒压电泳约 60min，120V 恒压电泳约 2h。电泳完毕后取出凝胶，4℃、25V 恒压电转过夜。次晨取出 NC 膜，加 1:500 稀释的 p53，PCNA 和 Ki67 一抗溶液，4℃过夜。次日 PBS 洗 3 次后加 1:1000 稀释的辣根过氧化物酶标记的相应的二抗溶液，37℃，轻轻振荡 2h 后弃反应液 PBS 洗 3 次。用 DAB 染色试剂盒染色，数码相机照相。

1.9 统计学处理

实验结果采用 SAS8.0 统计进行统计学分析。

2 结 果



1:pTZU6+1;2:pC-siRNA;3:pC′ -siRNA;4: λ DNA/EcoT14 Marker;
5:DL2000 Marker;6: pTZU6+1/*Hind*Ⅲ+EcoR Ⅰ;
7: pC-siRNA/*Hind*Ⅲ+EcoR Ⅰ;8: pC′ -siRNA/*Hind*Ⅲ+EcoR Ⅰ。

图 1 重组质粒 pTZU6+1-siRNA-COX-2 的酶切鉴定

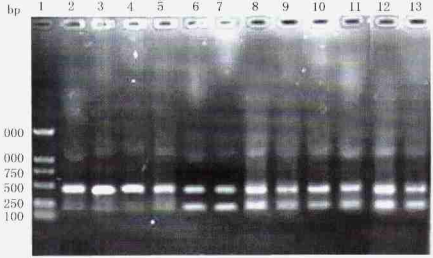
维普资讯 http://www.cqvip.com

2.1 重组质粒载体的构建与鉴定

pC-siRNA 和 pC′-siRNA 质粒经 *Hind*III 和 EcoRI 双酶切，同时做 pTZU6+1 空载体双酶切对照。琼脂糖电泳，pTZU6+1 空载经双酶切后呈两条带，分别为 2.8kb 的载体片段和 350bp 左右的小片段；而重组质粒经双酶切后则为 2.8kb 的载体片段和 400bp 左右的条带两条目的条带(图 1)。测序结果也证明重组质粒的构建成功，插入 DNA 序列均正确。

2.2 RT-PCR 检测 COX-2mRNA 表达

半定量 RT-PCR 检测结果以琼脂糖电泳条带的亮度来判断 COX-2 的 mRNA 表达高低。实验结果(图 2)显示，阴性组和经点突变 pC′-siRNA 质粒处理组 COX-2mRNA 表达无明显变化；pC-siRNA质粒处理组 COX-2 的 mRNA 表达明显下调。



1: DL2000 Marker;2,3,4,5:pC-siRNA 处理组;
6,7,8,9: pC′-siRNA 处理组;10,11,12,13:pTZU6+1 处理组。

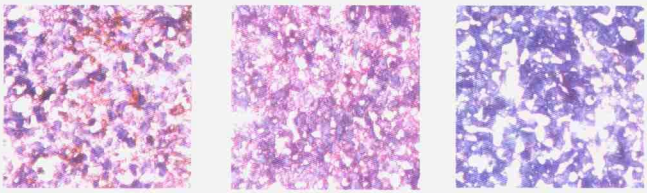
图 2 裸鼠皮下移植瘤中 COX-2 的 mRNA 水平

2.3 免疫组织化学检测 COX-2 蛋白表达

在 pTZU6+1 和 pC′-siRNA 处理组，肿瘤细胞胞浆染成黄褐色，复染后细胞核染成兰色，说明肿瘤细胞中 COX-2 蛋白表达强阳性。而 pC-siRNA 处理组的肿瘤细胞，胞浆着色很浅，细胞核复染成兰色，说明 RNA 干扰显著抑制肿瘤细胞中 COX-2 表达(图 3)。

2.4 Western blot 检测 p53、PCNA 和 Ki67 蛋白的表达

以 β-actin 蛋白特异反应的亮度带作为标准，可以发现，转染 pC-siRNA 质粒后的胃癌组织中，PCNA 和 Ki67 反应条带明显减弱，即这两种蛋白明显被抑制。在阴性组和 pC′-siRNA 转染后的胃癌

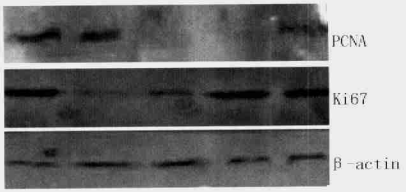


1:pTZU6+1 处理组；2:pC′-siRNA 处理组；3:pC-siRNA 处理组。

图 3 免疫组织化学检测裸鼠皮下移植瘤中 COX-2 蛋白的表达

维普资讯 http://www.cqvip.com

组织中,这两种蛋白表达均无明显变化(图 4)。



1:pTZU6+1 处理组;2,5:pC′-siRNA 处理组;
3,4:pC-siRNA 处理组。

图 4 Western blotting 检测胃癌组织中 p53,PCNA 和 Ki67 蛋白的表达

3 讨 论

在我国,胃癌是一种发病率高,恶性程度高,预后不良的恶性肿瘤。长期以来,临床手术切除及辅助性放疗、化疗技术的应用并没有带来满意的生存率。COX-2 属诱导型酶,在正常组织及细胞中基本无表达,当细胞受到各种刺激因素作用时,COX-2 表达迅速上调。近年来的研究发现,COX-2 不仅是启动炎症反应的关键酶,还可以通过促进肿瘤细胞增殖,抑制凋亡,促进肿瘤新生血管形成等,从而参与肿瘤的发生发展。大量研究表明,在胃癌的发生发展过中,COX-2 呈高表达状态,与肿瘤的发生、发展及预后密切相关[4]。

RNAi 是 Andrew 和 Craig 等[7] 在 1998 年研究 Caenorhabditis elegans 基因组计划时,发现并命名的新技术。Elbashir 等[8]在《自然》上发表文章证实在哺乳动物细胞中可以应用 RNAi 技术,揭开了 RNAi 应用于哺乳细胞研究的新篇章。目前,研究者已经利用 RNAi 对外源 GFP、内源 laminA/C、cdk-2 和 dnmt-1 基因等进行了干预[9,10],成功地下调了相关基因的表达。本课题是通过哺乳动物细胞内构建重组质粒,将 siRNA 导入胃癌 BGC-823 细胞裸鼠皮下移植瘤内,进而观察 COX-2 表达变化及相应的信号分子改变。

在靶基因 COX-2 的 siRNA 转录模板选择、设计时,根据 siRNA 的设计原则[5],选择了 COX-2cDNA 序列中的 1 个区域,设计并合成了 1 个不同的 siRNA 片段,长度为 19bp。同时,根据文献[6]设计了针对这个 siRNA 片段中某一碱基的点突变序列,并与其相应的未突变 siRNA 片段同时进行实验。RNAi 具有高度的特异性,siRNA 转录模板中碱基发生改变时,其诱导的 RNAi 基本无效。未处理组和经单一碱基突变的 pC′-SiRNA 质粒处理组中 COX-2 基因表达几无变化;pC′-SiRNA 质粒处理组中胃癌细胞增殖受抑,COX-2 的 mRNA 和蛋白表达下调,结果说明 siRNA 诱导同源 mRNA 降解的作用是特异的[11]。

PCNA[12]是一种出现在增殖状态细胞核内的酸性蛋白质,在细胞周期不同阶段的表达有所不同。在 G0 期的极早期不表达,在 G1 期表达开始逐渐增加,S 期达高峰,在 G2 期和 M 期表达明显减少。因此,PCNA 表达阳性说明该细胞处于增殖旺盛状态。Ki67[13,14]核抗原是细胞增殖相关核蛋白,其表达水平可反映肿瘤细胞增殖活性。野生型 p53[15]是目前发现的与肿瘤关系最密切的一种抑癌基因。本研究发现,靶向 COX2 基因的特异性 siRNA 能够显著抑制胃癌细胞中 COX2 蛋白表达,这种作用可能与其下调 PCNA 和 Ki67 蛋白,而上调 p53 蛋白的表达密切相关。

综上所述,本研究用 pTZU6+1 质粒为载体,成功构建了重组表达质粒 pTZU6+1-siRNA-COX-2,并导入胃癌细胞株 BGC-823 裸鼠皮下移植瘤,发现能明显抑制 COX-2 表达,并抑制肿瘤细胞生长,同时探讨了相关信号转导分子的变化,研究了 COX-2 的可能作用机理,为肿瘤的基因沉默治疗提供了新的思路。

参 考 文 献

[1] Saukkonen K, Nieminen O, Rees BV, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in dysplasia of the stomach and in intestinal-type gastric adenocarcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2001;7(7):1923-1931.

[2] Xue YW, Zhang QF, Zhu ZB, et al. Expression of cyclooxygenase-2 and clinicopathologic features in human gastric adenocarcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2003;9(2):250-253.

[3] Okano H, Shinohara H, Miyamoto A, et al. Concomitant overexpression cyclooxygenase-2 in HER-Positive on smad-reduced human gastric carcinoma is associated with a poor patient outcome[J]. Clin Cancer Res, 2004;10(20):6938-6945.

[4] Sui G, Soohoo C, Affar el B, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002;99(8):5515-5520.

[5] Tuschl T. Expanding small RNA interference[J]. Nature Biotechnology, 2002;20(5):446-448.

(下转第 565 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

Bcl-XL属抗凋亡基因，该基因激活、蛋白表达可抑制细胞凋亡，延长细胞生存。Redaelli 等[9] 利用 Western Blot 评价热休克诱导 HO-1 和 CoPP 处理的肝脏组织中的抗凋亡蛋白 Bcl-XL，结果发现 CoPP 处理组的 Bcl-XL 与空白对照组无差异，热休克组 Bcl-XL 表达明显增高，而 HO-1 的阻止剂 SnPP 能降低这种增高。Brouad 等认为 HO-1 影响抗凋亡蛋白产生的机制可能通过 HO-1 的代谢产物 CO 或 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号传导途径。Liao 等[10]报道用激活 STAT-3 的 CT-1 处理在体外培养的细胞可提高 I/R 损伤后细胞的存活率并减少凋亡发生率。Ikezoe 等[11]发现用 HIV-1 蛋白酶抑制剂可通过降低 STAT-3 细胞外信号调节激酶 1/2 的活性来抑制人骨髓瘤细胞的生长并诱导凋亡的发生。Nagel-Wolfrum 等[12]用一段特殊的短肽链与 STAT-3 二聚区结合以阻止 DNA 的连接活性并抑制 STA-3 在肿瘤细胞中的作用，结果发现肿瘤细胞生长受抑制，Bcl-XL 表达降低，并诱导了凋亡的发生。

总之，本实验结果为通过抑制或降低 HO-1 在乳腺肿瘤中的表达及活性以治疗乳腺癌提供了一个新的思路。

参 考 文 献

[1] Motterlini R, Foresti R, Intaglietta M, et al. No-mediated activaton of heme oxygenase; endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothlium[J]. American Journal of Physiology, 1996; 270: H107-114.

[2] 中国抗癌协会.新编常见恶性肿瘤诊治规范，乳腺癌分册[M]. 第1版，北京：北京医科大学协和医科大学联合出版社，1999.27-35.

[3] Liming yang, Shuo Quan, Nader G, et al. Retrovirus-mediated HO gene transfer into endothelial cells protects against oxidant-induced injury [J]. Am J physiol, 1999;277:L127-133.

[4] Yanagawa T, Omura K, Harada H, et al. Heme oxygenase-1 expression predicts cervical lymph node metastasis of tongue squamous cell carcinomas[J]. Oral Oncol, 2004;40(1):21-27.

[5] Caballero F, Meiss R, G imenez A, et al. Immunohistochemical analysis of heme oxygenase-1 in preneoplastic and neoplastic lesions during chemical hepatocarcinogenesis[J]. Int J Exp Pathol,2004;85(4):213-222.

[6] Fang J, Sawa T, Akaike T, et al. In vivo antitumor activity of pegylated zinc protoporphyrin: targeted inhibition of heme oxygenase in solid tumor[J]. Cancer Res, 2003; 63(13):3567-3574.

[7] Fang J, Sawa T, Akaike T, et al. Enhancement of chemotherapeutic response of tumor cells by a heme oxygenase inhibitor, pegylated zinc protoporphyrin[J]. Int J Cancer,2004;109(1):1-8.

[8] Zhang XC, Peiying S, Jiang DH, et al. Small interfering RNA targeting heme oxygenase-1 enhances ischemia-reperfusion-induced lung apoptosis [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004;297 (11): 10677-10684.

[9] Redaelli CA, Tian YH, Schaffner T.Extended preservation of rat liver graft by induction of heme oxygenase-1[J]. Hepatology, 2002; 35(5): 1082-1092.

[10] Liao Z, Brar BK, Cai Q, et al. Cardiotrophin-1(CT-1) can protect the adult heart from injury when added both prior to ischaemia and at reperfusion[J]. Cardiovasc Res, 2002; 53:902-910.

[11] Ikezoe T, Saito T, Bandohashi K, et al. HIV-1 protease inhibitor induces growth arrest and apoptosis of human multiple myeloma cells via inactivation of signal transducer and activator of transcription 3 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 [J]. Mol Cancer Ther, 2004; 3(4): 473-479.

[12] Nagel-Wolfrum K, Buerger C, Wittig I, et al. The interaction of specific peptide aptamers with the DNA binding domain and the dimerization domain of the transcription factor Stat3 inhibits transactivation and induces apoptosis in tumor cells[J]. Mol Cancer Res, 2004; 2(3):170-182.

（上接第 555 页）

[6] Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis in human gastric cancer [J].Clin Cancer Res,2000;6(1):135-138.

[7] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference hy double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans[J].Nature, 1998;391(6669):806-811.

[8] Zamore PD, Tuschi H, Sharp PA, et al. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21-23 nucleotide intervals[J]. Cell, 2000;101(1): 25-33.

[9] Agami R. RNAi and related mechanisms and their potential use for therapy[J]. Curr Opin Chem Biol, 2002; 6(6):829-834.

[10] Phipps KM, Martinez A, Lu J,et al. Small interfering RNA molecules as potential anti-human rhinovirus agents: in vitro potency, specificity, and mechanism[J]. Antiviral Res,2004;61(1):49-55.

[11] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs [J]. Genes Dev, 2001;15 (2): 188-200.

[12] Michael K,Sasaki E,Halter F,et al.HGF triggers activation of the COX-2 gene in rat gastric epithelial cells: action mediated through the ERK2 signaling pathway[J].Faseb,1999;13(15): 2184-2189.

[13] Wa J, Mao Y, He L, et al.A new cell proliferating marker,cytosomic thymidine kinase as compared to proliferating cell nuclear antigen in patients with colorectal carcinoma [J].Anticancer Res,2000;20 (6C): 4815-4820.

[14] Sikuma K, Fujimori T, Hirabayashi K, et al. Cyclooxygenase(COX)-2 immunoreactivity and relationship to p53 and ki-67 expression in colorectal cancer[J].J Gastroenterol,2000;35(6):488-490.

[15] Takagi S,Kumagai S,Kinouchi Y,et al.High ki-67 labeling index in human colorectal cancer with microsatellite instability [J].Anticancer Res, 2002;22(6A):3241-3244.