维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)05－0567－05

RNAi 沉默 c－erbB－2、c－raf－1 表达对人舌鳞癌 Tca8113 细胞的干预作用

季　平，李庆妹，张福军，李少林

(重庆医科大学临床学院颌面外科，重庆　400016)

【摘　要】目的：探讨应用 RNA 干扰技术沉默 c－erbB－2、c－raf－1 基因表达，研究其对人舌鳞癌 Tca8113 细胞增殖的抑制作用及其分子机制。方法：实验分成 3 组：空白对照组、正常对照组、c－erbB－2、c－raf－1dsRNA 联合干扰组。脂质体转染后不同时间分别进行 MTT 试验、电镜检测、RT－PCR，以观察不同条件处理后各组细胞的增殖、凋亡、细胞周期、mRNA 及蛋白质表达有无差别。结果：c－erbB－2、c－raf－1dsRNA 联合干扰组，转染 72h 的 OD 值为 0.073($P<0.005$)，增殖抑制率达到了 94.5%，凋亡率为 76.5%($P<0.01$)，明显地下调 c－erbB－2 与 c－raf－1 基因 mRNA 及其蛋白质的表达水平。结论：在舌癌 Tca8113 细胞株增殖的抑制作用研究中，c－erbB－2、c－raf－1dsRNA 联合干扰具有显著沉默 c－erbB－2、c－raf－1 基因表达。

【关键词】舌鳞癌；RNA 干扰；转录后沉默(PTGS)；联合转染

【中国图书分类法分类号】Q786；R739.86　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2004－03－02

RNA interference c－erbB－2 and c－raf－1 genes expression combined transfection in the Tca8113 cell lines

JI Ping, et al

(*Department of Maxillofacial Surgery, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the proliferating inhibition and the mechanisms of dsRNA interference c－erbB－2 and c－raf－1 genes expression combined transfection in the human tongue carcinoma Tca8113 cell lines. *Methods*: There were 3 groups in our study, control group, normal control group and RNAi experimental group. At different time after liposome－mediated transfection, the cell proliferation, apoptosis, mRNA level, protein expressing level and cell cycle were observed by MTT, RT－PCR and electronic microscope. *Results*: According to the results of RNAi experimental group, the OD－value were 0.073($P<0.005$) transfected after 72h; the inhibitory rate of proliferation were 94.5%; the apoptosis rate were 76.5% ($P<0.01$) and the level of mRNA and protein were decreased statistically in both c－erbB－2 and c－raf－1. *Conclusion*: These results suggest that c－erbB－2 and c－raf－1 dsRNA effects of silencing c－erbB－2 and c－raf－1 genes expression combined transfection of tongue carcinoma.

【Key words】Tongue carcinoma; RNA interfering; Post transcriptional gene silencing(PTGS); Combined transfection

肿瘤的发生是一个多步骤、多因素参与的复杂的生物学过程，涉及到多个癌基因(oncogene)的激活和抑癌基因(suppressor gene)的失活以及其他肿瘤相关基因(tumor related gene)的激活与表达。目前采用微阵列(Microarray)分析方法、反义寡核苷酸技术(ASODN)、基因敲除技术等同时抑制与肿瘤发病、发展有关的几个关键癌基因研究肿瘤形成机制和探讨抗肿瘤治疗的新方法并取得一定成果。RNA 干扰(RNAi RNA interference)技术是近几年迅速发展起来的一项全新、高效基因研究技术，自 2001 年来 Science 连续 3 年授予有关 RNA 研究的“三甲”。应用该技术进行基因结构与功能、表达与调控、蛋白质的结构及其在细胞周期(Cell cycle)与细胞程序化死亡(PCD)的调节研究已成热点。c－erbB－2 是 EGFR 家族中最重要成员之一，erb B－2 原癌基因的激活与一系列恶性肿瘤的发生、发展之间有着极为密切的关系。人肿瘤细胞中 erbB－2 基

作者介绍：季　平(1962－　)，男，博士生，主要研究方向：肿瘤。

基金项目：国家自然科学基金资助项目(编号：30070230)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

因放大与过表达，导致 erbB－2 蛋白表达水平的显著升高，由 erbB－2 蛋白介导的信号转导加强，从而导致细胞的生长、死亡以及分化，最终导致正常细胞的恶性转化以及恶性肿瘤的形成。c－raf－1 基因在 EGFR 介导的信号系统中担负着关键作用，c－erbB－2 和 c－raf－1 基因同是 EGFR 介导的信号转导系统的关键基因之一[1]。NaglerRM，KernerH 等，研究发现舌鳞癌细胞中（SCC）c－erbB－2 表达为 41%[2]，目前研究针对 EGFR 介导的信号转导系统的不同靶点，采用 RNAi 技术阻抑其功能的表达，达到切断信号转导通路，治疗肿瘤的目的，这些研究成果奠定了基因联合干预的理论基础。

本课题采用 RNAi 沉默 c－erbB－2、c－raf－1 基因表达方法，通过一系列实验，在细胞分子水平观察其对人舌鳞癌（SCC）Tca8113 细胞株增殖的抑制作用，为以后进行动物体内研究以及舌鳞癌的多基因联合干预治疗从基础研究向临床应用过渡提供可靠的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 舌鳞癌 Tca8113 细胞株，购自上海午立生物公司。

1.1.2 阳离子脂质体（Lipofectin），购自美国 Sigma 公司。

1.1.3 寡核苷酸，上海生物工程有限公司合成并经全硫代磷酸化修饰。

c－erbB－2 SODN 序列为 5'－GGTTCACACGTGGCC－3'

c－erbB－2 ASODN 序列为 5'－CCAAGTGTGCACCGG－3'

c－raf－1 SOND 序列为 5'－AATGCATGTCACAGGCGGGA－3'

c－raf－1 ASOND 序列为 5'－TCCCGCCTGTGACATGCATT－3'

1.1.4 c－erb B－2 dsRNA 合成（siLentGene™ U6 盒 RNA 干扰系统，按照 siLentGene™ U6 盒 RNA 干扰系统技术手册）。

1.1.5 c－raf－1 dsRNA 合成（siLentGene™ U6 盒 RNA 干扰系统，按照 siLentGene™U6 盒 RNA 干扰系统技术手册）。

1.1.6 其他 RPMI－1640 培养基；新生小牛血清；PBS 粉剂；胰蛋白酶 Hyclone 公司产品；Access RT－PCR System，美国 Promega 公司产品。

1.2 实验仪器

YJ－1450 型超净工作台、ELX800 微孔板读数仪、CO_2 孵箱、倒置显微镜、电子显微镜、台式离心机、酶联免疫检测仪、低温冰箱（－80℃）PCR 扩增仪（480 型）。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

舌鳞癌 Tca8113 细胞株传代培养。

1.3.2 实验分组 共设立 3 组：

Ⅰ组 空白对照组，仅予以转染液处

Ⅱ组 正常对照组，阳离子脂质体 lipofectin＋转染液

Ⅲ组 RNAi 联合干扰组，c－raf－1 dsRNA＋c－rebB－2 dsRNA＋lipofectin＋转染液

1.3.3 脂质体（Lipofectin）转染

1.3.3.1 将处于对数生长期的细胞用 0.25% 胰酶消化后，用 RPMI－1640 培养液终止，离心 5min，弃上清液，再用 PBS 液重悬细胞，再离心 5min。利用 ELX800 微孔板读数仪调整细胞浓度后，接种到新的培养瓶。

1.3.3.2 37℃、5%CO_2 条件下，在含 10% 小牛血清的 RPMI－1640 培养液中培养 18%～60% 的融合率。

1.3.3.3 阳离子脂质体液与 dsRNA 液的准备，均用转染液配制。脂质体液配制好后，室温静置 30～45min 备用。

1.3.3.4 混合阳离子脂质体液与 dsRNA 液，使脂质体充分包裹 dsRNA 室温静置 10～15min 备用。

1.3.3.5 放入 CO_2 孵箱中传染 20h。

1.3.3.6 按照各种实验要求，加其它试剂，进行各种检查。

1.3.4 MTT 实验

1.3.4.1 试验原理：MTT 试验是一种检测细胞存活和生长的方法，MTT 是一种能接受氢原子的染料。活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的 MTT 还原为难溶性的蓝紫色结晶物（Formazan）并沉积在细胞中，而死细胞无此功能。

1.3.4.2 实验步骤：接种细胞：取对数生长期的细胞用 0.25% 胰酶消化后，制成单细胞悬液，调整细胞浓度为 10^5/ml，取 96 孔板 9 个，每个时间点 3 板，3 个观察时间点，每孔接种 100μl，即每孔细胞数为 10^4，做好分组标志：37℃、5%CO_2 条件下，培养 20h；用转染液配制脂质体液与 dsRNA 液；转染：脂质体液与 dsRNA 液各 10μl 混合，使脂质体充分包裹 dsRNA；放入 CO_2 孵箱中转染 20h；酶联免疫检测仪 570nm 波长比色。

1.3.5 电子显微镜检查

1.3.5.1 试验目的

利用电子显微镜观察药物作用后，细胞超微结构的变化、形态学改变、细胞凋亡现象等。

1.3.5.2 试验方法：接种细胞 37℃、5%CO_2 条件下，培养 20h；脂质体充分包裹 dsRNA，放入 CO_2 孵箱中转染 20h；送标本到电镜室检查。

1.3.6 RT－PCR Procedure、琼脂糖凝胶电泳

电泳条件：0.5×TBE 电解质液，1% 琼脂糖，电压 100～120V，电流 12～15mA，样品数量：阳性对照 c－erbB－2、c－raf－1dsRNA 产物各取 5μl，电泳完毕，计算机采集图象。结

维普资讯 http://www.cqvip.com

果进行计算机图象分析，测定各条带的灰度值(峰强度，Peak intensity)，将各组所得图象灰度值数据的均数作为校正参数，各灰度值与组内均数的比值即为数据结果(本文称 RT－PCR 量)。各组的 RT－PCR 量与对照组的比值，称为该基因的表达率。

1.4 统计分析

用 SPSS 10.0 for windows 统计软件处理。

2 结 果

2.1 MTT 试验

转染后 24h、48h、72h，MTT 检测结果见表 1、图 1。

表 1 不同转染时间的 OD 值比较

分组	24h OD 值	48h OD 值	72h OD 值
Ⅰ	0.772±0.068	1.321±0.205	1.519±0.257
Ⅱ	0.689±0.059	1.187±0.105	1.334±0.195
Ⅲ	0.315±0.034	0.116±0.024	0.073±0.011

转染 24、48、72h Ⅲ组与Ⅱ组比较

24 h 比值 $P<0.05$　48 h 比值 $P<0.01$　72 h 比值 $P<0.01$

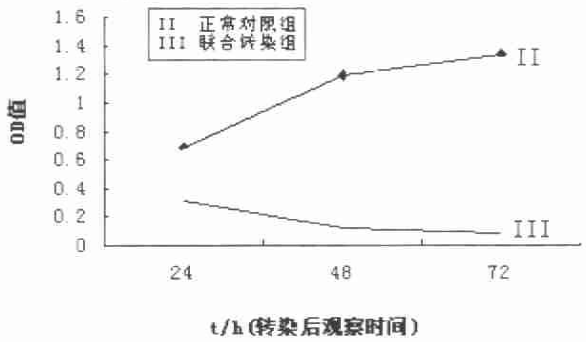


图 1 转染时间－OD 值依赖曲线

从图 1 可以看出，随着时间的延长，c－raf－1 dsRNA、c－erbB－2 dsRNA 联合干扰治疗组的 OD 值进行性降低，降低幅度在转染 48h 小时时最大，至 72h 时曲线明显较前变缓。正常对照组变化区别不大。

2.2 电子显微镜检查结果

结果显示，对照组细胞核大，核仁明显，有较多的核分裂相，胞浆内细胞器丰富、结构完整。联合干扰组出现以下改变：胞浆内脂滴较多，出现髓样结构，线粒体肿胀崩解，溶酶体大量出现；细胞核内染色质边集、可见脂滴、空泡化改变；细胞核的固缩变形，凋亡小体和各期凋亡细胞清晰典型。参见图 2、3。

2.3 RT－PCR 电泳结果

RT－PCR 结果进行计算机图象分析，测定各条带的灰度值，将各组所得图象灰度值数据的均数作为校正参数，各灰度值与组内均数的比值即为数据结果(本文称 RT－PCR 量)，各组的 RT－PCR 量与对照组的比值，称为该基因的表达率。RT－PCR 结果见表 2、3 和图 4、5。

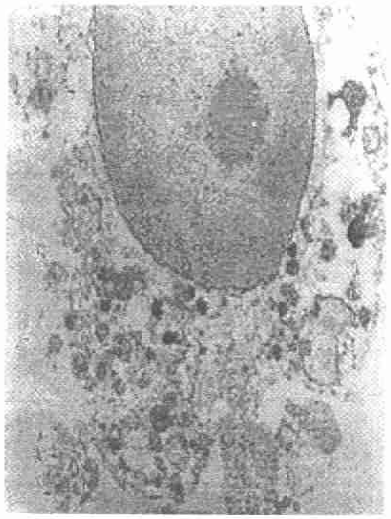


图 2 EM×10000 倍；dsRNA 转染后出现细胞结构破坏(线粒体肿胀，细胞崩解)

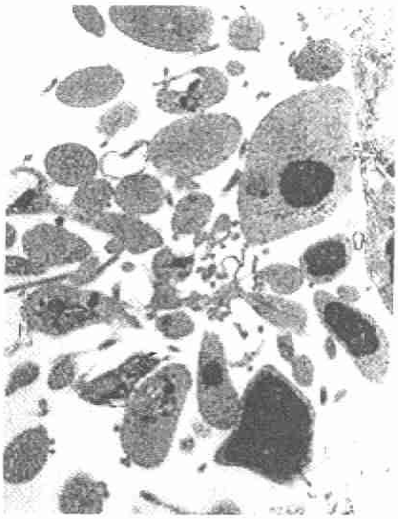


图 3 EM×10000 倍；dsRNA 转染后出现的凋亡小体

表 2 c－erbB－2 RT－PCR 结果

分组	峰强度值	RT－PCR 量	c－erbB－2 表达率(%)
Ⅰ	164.578	1.359	100
Ⅱ	153.058	1.264	93
Ⅲ	46.082	0.381	28

Ⅲ组与Ⅱ组比较 $P<0.05$

表 3 c－raf－1 RT－PCR 结果

分组	峰强度值	RT－PCR 量	c－raf－1 表达率(%)
Ⅰ	147.169	1.294	100
Ⅱ	132.452	1.165	90
Ⅲ	69.169	0.685	53

Ⅲ组与Ⅱ组比较 $P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

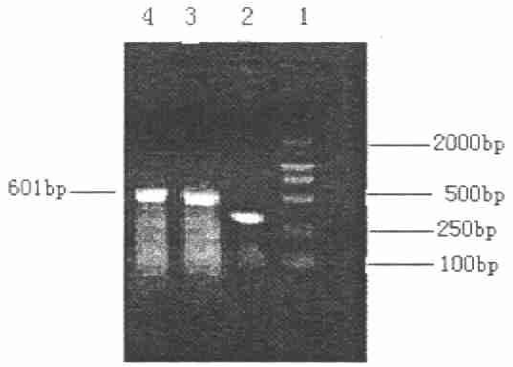


图 4 c-erbB-2 RT-PCR 电泳结果

1:marker 2:positive control 3:normal control group 4:c-erbB-2 dsRNA group

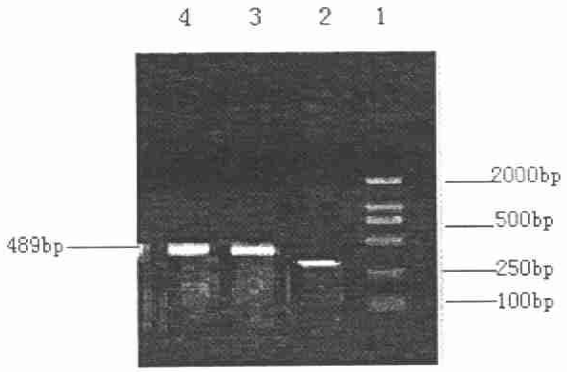


图 5 c-raf-1 RT-PCR 电泳结果

1:marker 2:positive control 3:normal control group 4:c-raf-1 dsRNA group

3 讨 论

3.1 RNAi 的作用机制

RNA 干扰作用(RNAi)是一些具有序列特异性的小双链 RNA(siRNA small interference RNA)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(RNAi)。首先外源性或细胞内源性的 dsRNA(double-stranded RNA)与胞内的 RNA 核酸酶(如 Dicer)的 dsRNA 相结合,之后 dsRNA 被 RNA 核酸酶切割成 21~23nt 的 siRNA(small interferenceRNA,小干扰 RNA),此 siRNA 含有 3'突出端,被输送到 RISC(RNA-induced silencing complex,RNA 诱导的封闭复合物),siRNA 作为引导序列引导 RISC 与同源性的 mRNA 结合,解旋酶催化 mRNA 与 siRNA 的正义 RNA 链相互交换,反义 RNA 链与同源 mRNA 结合后,核酸酶在 mRNA 与反义 RNA 所形成的双链区的 5'起始端下游 7~10 个核苷酸处(也就是双链区的靠近中间位置)切断 mRNA,降解的 mRNA 被释放后,siRNA 双链重新形成,可以继续降解同源的 mRNA[2~5],从而使目的基因沉默,产生 RNAi 现象。这是存在于生物体内一个较保守的生化机制。从目前的研究来看,序列的选择原则尚不清楚,研究表明外显子序列的 dsRNA 通常能够产生基因抑制效应而只针对内含子序列的 dsRNA 不能产生这种作用,但是实际操作中选择往往是试探性的,而且选择不同的序列 RNAi 效应差别非常大,抑制效率可以从 0 到 90% 以上[6,7]。在未能产生目的基因抑制的个别例子中,生物学家未能在序列特征上发现有价值的信息,分析原因可能因为二级结构或 RNA 结合蛋白的影响,也不能排除有更深在的机理尚未清楚。

3.2 c-erbB-2、c-raf-1 dsRNA 联合转染对细胞增殖的抑制作用

本实验采用 MTT 法来观察 c-erbB-2 与 c-raf-1dsRNA 联合转染对人舌鳞癌 Tca8113 细胞株细胞增殖的抑制作用。转染后 24h:各组 OD 值即有明显的不同,联合干扰组对细胞增殖的抑制效果明显高于正常对照组,达 54.3%。转染后 48h:各组 OD 值差别更加明显,联合干扰组抑制率高达 90.2%。转染后 72h:联合干扰组增殖抑制率达 94.5%。以上实验结果表明 c-erbB-2 与 c-raf-1dsRNA 联合转染对人舌鳞癌 Tca8113 细胞株细胞增殖的抑制作用明显,其机制可能是:针对 c-erbB-2 的 dsRNA 转染人舌鳞癌 Tca8113 细胞株细胞后降解与 c-erbB-2 同源的 mRNA,c-erbB-2 的激活、放大、c-erbB-2 蛋白的过表达导致肿瘤细胞增殖的作用受到抑制;c-raf-1 与 bcl-2 的相互作用发生免疫共沉淀(co-precipitasion)抑制细胞程序化死亡,同时参与细胞周期、细胞分化、细胞恶性转化过程的调节,而与 c-raf-1 具有同源性的 dsRNA 转染后降解 c-raf-1mRNA 抑制 c-faf-1 对肿瘤细胞的作用[10]。

3.3 c-erbB-2、c-raf-1 dsRNA 联合转染对细胞形态学影响

电子显微镜检查结果显示,对照组细胞核大,核仁明显,有较多的核分裂相,胞浆内细胞器丰富、结构完整。联合干扰组出现以下改变:胞浆内脂滴较多,出现髓样结构,线粒体肿胀崩解;细胞核内染色质边集、可见脂滴、空泡化改变;细胞核的固缩变形,凋亡小体和各期凋亡细胞清晰典型。c-erbB-2

维普资讯 http://www.cqvip.com

与 c－raf－1dsRNA 联合转染对细胞形态学影响研究结果提示，c－erbB－2 与 c－raf－1 dsRNA 联合转染导致的细胞凋亡，可能是其治疗肿瘤的重要机制之一。分子生物学研究发现参与凋亡调控的基因主要分为两类，一类是诱导凋亡的基因：wtp53、c－myc、ICE 家族（interleukin－1－converting enzyme）、P21 蛋白、P16、Fas/Apo－1、E1A 等；另一类是凋亡抑制基因：bcl－2 家族、mtp53、H－ras、E1B 等。RNAi 引起的细胞凋亡可增加肿瘤对化疗药物的敏感性[8]。

3.4 c－erbB－2、c－faf－1 dsRNA 联合转染对 c－erbB－2 与 c－raf－1 表达的影响

本研究资料中，c－erbB－2 的 RT－PCR 结果通过图象分析系统软件分析，与正常对照组相比，联合干预组 c－erbB－2 的表达水平下降了大约 72%。Nagler RM，Kerner H，等研究表明肿瘤的发生、发展与 Bcl－2，c－erbB－2 and p53 有密切的关系[8]。c－raf－1 的 RT－PCR 结果显示，与正常对照组相比，联合干预组 c－raf－1 的表达水平下降了大约 53%，是因为在 EGFR 介导的信号转导系统中 c－erbB－2 是 c－raf－1 的上游基因，c－erbB－2 可加强 c－raf－1 基因的信号传递，肿瘤组织中 EGFR 过表达时 c－faf－1 基因的表达作用也更强[8～10]。

4 结 论

在舌鳞癌的基因干预中，RNAi 是一种有效的基因干预手段，具有抑制细胞增殖、促进细胞凋亡、下调或沉默基因表达的作用。

参 考 文 献

[1] Kennerdell JR，Carthew RW. Use of dsRNA－mediatod genehc interference to demonstrate that frizzled and frizzled－2act in the wingless pathway[J]. Cell，1998；95(7)：1017－1026.

[2] Nagler RM，Kemer H，Laufer D，et al. Squamous cell carcinoma of the tongue：the prevalence and prognostic roles of p53，Bcl－2，c－erbB－2 and apoptotic rate as related to clinical and pathological characteristics in a retrospective study[J]. Cancer，2002；186(2)：137－150.

[3] Tuschel T，Zamore PD，Lehmann R，et al. Targeted mRNA degradation by double－strannded RNA in vitro[J]. Genes Der，1999；13(24)：3191－3197.

[4] Elbashir SM，Lendeckel W，Tuschel T. RNA interference is mediated by 21－22－nucleotide RNAs[J]. CJene Der，2001；15(2)：188－200.

[5] Lipanli C，Wei Q，Paterson BM. RNAi as random degradation PCR：siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate，new siRNA[J]. Cell，2001；107(3)：297－307.

[6] Jens Harborth，Sayda M. Elbashir，Kim Bechert，et al. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs[J]. Cell Sci，2001；114：4557－4565.

[7] SM Elbashir，J Harborth，W Lendeckel，et al. Dupluxes of 21－nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. Nature，2001；411(6836)：494－498.

[8] Nagler RM，Kerner H，Ben－Eliezer S，et al. Prognostic role of apoptotic，Bcl－2，c－erbB－2 and p53 tumor markers in salivary gland malignancies[J]. Oncology，2003；64(4)：389－398.

[9] Stevenson JP，Kang－Shen Yao，Gallagher M，et al. Phase I clinical pharmacokinehc and pharmacodynamic trial of the c－raf－1 antisense ologonucleotide[J]. clm Oncol，1999；17(7)：2227－2236.

[10] 成 军. 肿瘤相关基因[M]. 北京：北京医科大学出版社，2000；29：96.