

c-myc RNA 干扰增强肺腺癌细胞对吉西他滨的敏感性

刘黎明, 张永, 胡俊峰

[摘要] 目的:探讨 *c-myc* RNA 干扰后肺腺癌细胞 A549 对吉西他滨敏感性的改变。方法:构建 *c-myc* 特异 RNA 小干扰 (siRNA) 的表达载体,转染 A549 细胞,G418 筛选出稳定表达 *c-myc* 特异 siRNA 的细胞株,荧光实时定量 RT-PCR 和免疫印迹检测 *c-myc* 基因表达水平。吉西他滨作用于干扰有效 A549 细胞,分为 GE + siRNA 组、GE 组、siRNA 组和空白对照组。每组 12 例,四甲基偶氮唑蓝法检测吸光度,流式细胞仪测凋亡率。结果:成功构建 *c-myc*-siRNA 表达载体。*c-myc* 基因 mRNA 和蛋白表达下降 71.9% 和 85.6%。吉西他滨作用于 *c-myc*-siRNA 细胞其吸光度在各时间点较单用吉西他滨组、单用 *c-myc*-siRNA 组以及对照组均下降 ($P < 0.01$),凋亡率增加 ($P < 0.01$)。结论:*c-myc* RNA 干扰后 A549 细胞的增殖减慢,对吉西他滨的敏感性增加。

[关键词] 肺肿瘤;吉西他滨;核糖核酸干扰;细胞株

[中国图书资料分类法分类号] R 734.2 **[文献标识码]** A

c-myc RNA interference sensitizes lung adenocarcinoma cells to gemcitabine

LIU Li-ming, ZHANG Yong, HU Jun-feng

(Department of Respiratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the sensitivity of lung adenocarcinoma cells to gemcitabine (GE) after *c-myc* RNA interference. **Methods:** The *c-myc*-siRNA expression vector was constructed and confirmed by sequencing, and its expression vector was transfected into A549 cells. G418 (geneticin) was used for selecting the cell line which expressed *c-myc*-siRNA stably. The level of *c-myc* was tested by FQ RT-PCR and western blot. The transfected cells were treated with gemcitabine, which were then divide into GE + siRNA group, GE group, siRNA group and control group, with 12 cases in each. The cell proliferation and apoptosis were assayed by tetrazolium bromide colorimetry and flow cyclometry, respectively. **Results:** *c-myc*-siRNA expression vector was constructed and transfected into A549 cells successfully. The *c-myc* mRNA and protein expression was effectively reduced (71.9% and 85.6% respectively). The cells treated with *c-myc*-siRNA and gemcitabine had a lower absorbance value at each time point than that of simple gemcitabine group, simple *c-myc*-siRNA group or control group ($P < 0.01$), and the apoptosis rate was also decreased ($P < 0.01$). **Conclusions:** The *c-myc* RNA interference can enhance the sensitivity of lung adenocarcinoma A549 cells to gemcitabine.

[Key words] lung neoplasms; gemcitabine; RNA interference; cell line

RNA 干扰技术 (RNA interference, RNAi) 是近年来发展起来的一个新的基因阻断技术,该技术已在肿瘤病因研究及基因治疗领域中显示出良好的前景^[1]。*c-myc* 是一个与多种肿瘤发生、发展有关的重要原癌基因,其表达异常对促进细胞分裂和增殖有重要作用^[2]。本实验利用 RNAi,用含有真核细胞启动子的质粒 P silencerTM4.1-CMV neo 构建在细胞内可以稳定表达的 *c-myc*-siRNA 载体,转染 A549 细胞后,检测其对吉西他滨敏感性的变化,为吉西他滨应用于肺癌治疗探索新的方法,也为 RNA 干扰用于肺癌的基因治疗提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 人肺腺癌细胞系 A549 购自上海细胞

生物学研究所,质粒 P silencerTM4.1-CMV neo 购自 Ambion 公司,感受态大肠埃希菌 DH5 α 购自 Takara 公司。质粒 DNA 提取纯化试剂盒购自上海生物工程技术服务有限公司,T4DNA 连接酶购自 Takara 公司,Trizol 和真核转染试剂 lipofectamineTM2000 购自 Invitrogen 公司,cDNA 第一链合成试剂盒购自 MBI 公司,G418 购自美国 Alexis 公司,Western blot 用抗 *c-myc* 和 GAPDH 一抗购自北京中杉金桥公司,四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 和吉西他滨购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 *c-myc* 特异的 siRNA 转录模板的设计和制备 从 Genbank 上查阅 *c-myc* 基因的全长序列,应用 Ambion 公司网址所提供“siRNA target finder and design tools”设计 *c-myc* 特异的转录模板,长 55 bp。为确保干扰有效,共设计 3 对,经后续的 Western blot 和荧光实时定量 RT-PCR 检测挑选出一条有效的片段,序列正义链:5'-GAT CCC TTC TAC CAG CAG CAG CAG TTC AAG AGA CTG CTG CTG CTG

[收稿日期] 2009-01-06

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 呼吸病科,安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 刘黎明(1967-),男,博士,副主任医师。

GTA GAA GTT A-3', 反义链: 5'-AGC TTA ACT TCT ACC AGC AGC AGC AGT CTC TTG AAC TGC TGC TGC TGG TAG AAG G-3'。稀释至 1 g/L, 各取 2 μ l, 与退火缓冲液混匀后 90 $^{\circ}$ C 3 min, 再降到 37 $^{\circ}$ C 1 h 形成双链。

1.2.2 表达载体的构建及测序 退火后的双链模板与质粒连接按说明书操作。将重组质粒和试剂盒提供的阴性对照(人类基因组无同源序列 siRNA 质粒)、阳性对照(GAPDH-siRNA 质粒)转染至 DH5 α , 分别接种于 0.1 g/L 氨苄西林平板上, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 次日挑取单个阳性菌落摇菌扩增。菌液送测序, 测序引物 5'-AGG CGA TTA AGT TGG GTA-3' 和 5'-CGG TAG GCG TGT ACG GTG-3'。

1.2.3 转染 按 lipofectamineTM 2000 说明书进行。约 6~8 μ g 的 *c-myc*-siRNA, 阴性和阳性对照质粒分别用 15 μ l lipofectamineTM 2000 转染 A549 细胞, 另设仅用 lipofectamineTM 2000 的空白对照。G418(0.6 g/L) 筛选 3 周可以获得阳性单克隆, 挑取单克隆用含 G418(0.3 g/L) 培养液扩大培养, 约 12 周可获得稳定表达的 A549 细胞。

1.2.4 荧光实时定量反转录聚合酶链反应 (1) cDNA 合成: 收集约 10⁶ 个各组细胞, 提取总 RNA, 取 2 μ g RNA, 用随机引物反转合成第一链 cDNA。(2) 定量阳性模板的克隆: 以空白对照 cDNA 2 μ l 为模板常规 PCR 扩增, 引物: *c-myc* 上游 5'-TCA AGA GGC CAC AGC AAA C-3', 下游 5'-AAA AGC TAC GCT TCA GCT CG-3'; 内参照 GAPDH(274 bp) 上游: 5'-GGG AAG GTG AAG GTC GGA GTC -3', 下游 5'-AGC AGA GGG GGC AGA GAT GAT-3', 产物 375 bp。试剂盒纯化, 回收产物, 与 T 载体连接, 转化大肠埃希菌, 测序。纯化重组质粒计算分子拷贝数, 按 10¹⁰/ μ l 拷贝储存。(3) 标准曲线的建立: 将已知阳性模板从 10⁸~10² 梯度稀释进行荧光实时定量 PCR 扩增, 电脑绘出标准曲线。(4) 荧光实时定量 PCR 反应: 使用的引物如前述, 按 SYBR Premix

Ex-Taq(perfect real time) 要求, 反应体系 20 μ l, 条件: *c-myc*: 95 $^{\circ}$ C 3 min 预变性, 93 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 40 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 80 $^{\circ}$ C 时采集荧光信号; GAPDH 反应条件同 *c-myc*。溶解曲线分析有助于区分特异性和非特异性扩增。目的基因表达水平 = (目的基因拷贝数/GAPDH 拷贝数) \times 10²。复管检测取平均值。

1.2.5 免疫印迹 按 Western blot 操作常规电泳, 转膜。一抗、二抗孵育, 封闭, 洗膜。化学发光试剂盒显色。一抗和二抗工作浓度分别为 1:300 和 1:2000。

1.2.6 MTT 法检测细胞增殖 选择干扰有效 A549 细胞, 分为以下 4 组: GE + siRNA 组、GE 组、siRNA 组和空白对照组。GE(使用浓度 0.050 mol/L 溶于 DMEM 中) 作用细胞 24 h 后, 以 2 \times 10⁴/ μ l 分别接种于 96 孔板, 每孔 100 μ l, 细胞贴壁后更换无血清 DMEM 培养液, 5% CO₂ 培养 6 h, 使细胞同步化后再次换回含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液 100 μ l, 培养 4 h, 弃培养液, 加入二甲亚砜(DMSO) 100 μ l 振荡摇匀, 使结晶完全溶解, 490 nm 波长酶标仪测各孔吸光度(A)值。重复 3 次。同一时间点连续检测 5 天。

1.2.7 流式细胞仪检测细胞凋亡率 洗涤、调整细胞浓度约为 10⁸/L, Annexin-V-FITC 和碘化丙啶(PI) 双染 15 min 测定凋亡率。

1.3 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验及 *t* 检验。

2 结果

2.1 *c-myc* 特异性 siRNA 表达载体构建 未转染质粒的细菌在含氨苄西林的平板上不能生长, 而转染了 *c-myc*-siRNA, 阴性对照及阳性对照质粒的细菌均长出较多的菌落, 每板随机挑取 5 个菌落摇菌扩增测序, 证明序列完全正确。阳性重组质粒命名为 *c-myc*-siRNA。测序结果见图 1。

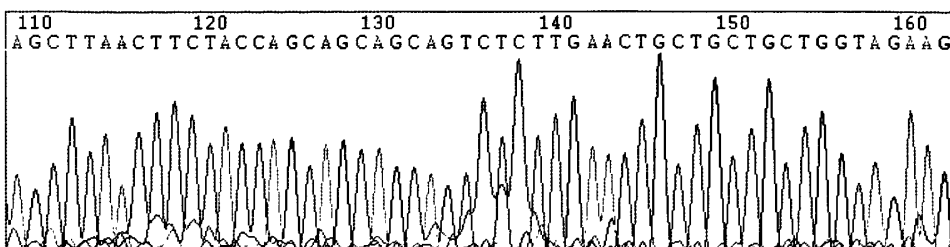


图 1 连接在质粒中的 *c-myc* 特异小干扰 RNA 的 55 bp 转录模板的测序结果

2.2 荧光实时定量 RT-PCR 检测 *c-myc*-siRNA 抑制 *c-myc* mRNA 的表达 (1) 标准曲线: 根据质粒标

准品 Ct 值和模板含量在计算机上绘制出标准曲线, *c-myc* 和 GAPDH 基因标准曲线相关系数为 0.995

和 0.993,符合要求。(2) *c-myc*-siRNA 组表达水平 (1.72 ± 0.052) 较空白对照 (6.11 ± 0.078) 和阴性对照 (6.07 ± 0.084) 明显降低 ($n_i = 12, F = 14\ 464.60, P < 0.01, MS_{组内} = 0.005$)。较空白对照

下降 71.9%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。试剂盒提供阳性对照 GAPDH 基因表达水平 (17.1 ± 2.29), 较阴性对照 (97.6 ± 6.85) 下降 82.5%, 差异有统计学意义 ($t = 38.61, P < 0.01$) (见图 2)。

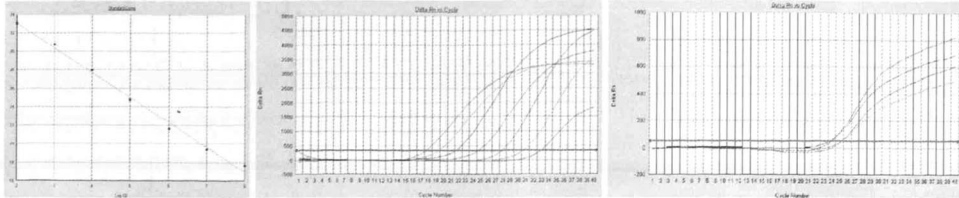
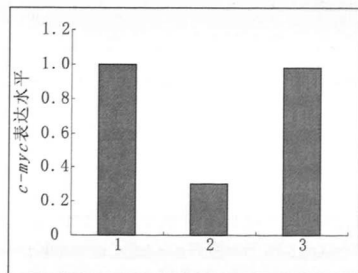


图 2 *c-myc* 标准曲线和各组细胞的荧光实时定量 PCR 反应曲线

2.3 Western blot 检测 *c-myc*-siRNA 抑制蛋白的表达 凝胶成像系统灰度扫描各组 *c-myc* 和 GAPDH 杂交条带亮度的比值。*c-myc*-siRNA 质粒转染的 A549 细胞和空白对照细胞相比, 蛋白表达下降 85.6% (见图 3)。



1: 阴性对照; 2: *c-myc*-SiRNA; 3: 对照

图 3 Western blot 检测 *myc* -siRNA 抑制 *myc* 蛋白的表达

2.4 MTT 法检测细胞吸光度值(A)的结果 GE + siRNA 组 A 值在各时间点与 GE 组、*c-myc*-siRNA 组及对照组比较均明显下降 ($P < 0.01$), 而 siRNA 组、GE 组与对照组比较也均下降 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$) (见表 1)。

2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡结果 GE + siRNA 组凋亡率 (6.67 ± 0.36)% 高于 siRNA 组的 (2.65 ± 0.26)%、GE 组的 (4.50 ± 0.42)% 及对照组的 (2.10 ± 0.15)% ($n_i = 12, F = 517.42, P < 0.01, MS_{组内} = 0.098$)。GE 组较对照组增加 ($P < 0.01$)。siRNA 组较对照组亦有所增加 ($P < 0.01$) (见图 4)。

3 讨论

RNA 干扰技术是一种新的阻抑基因表达的方法, 它是一种序列特异的转录后基因沉默机制, 通过人工导入一段与目的基因同源的双链 RNA 序列使其 mRNA 降解, 表达缺失, 实现基因沉默^[3]。RNA 干扰具有高度的特异性以及很高的效率, 和以往采用的反义技术相比, 抑制基因表达的功能要强大得多。目前实验室进行 RNA 干扰常用的 siRNA 来源主要有两种, 即细胞外合成和细胞内合成, 包括以质粒为载体的细胞内合成和以病毒为载体的细胞内合

表 1 *c-myc* RNA 干扰和 GE 作用后各组细胞吸光度(A)的变化 ($n_i = 12; \bar{x} \pm s$)

分组	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
对照组	1.023 ± 0.049	1.102 ± 0.062	1.044 ± 0.074	1.016 ± 0.051	1.033 ± 0.056
siRNA	$0.872 \pm 0.065^{**}$	$0.976 \pm 0.033^{**}$	$0.867 \pm 0.063^{**}$	$0.976 \pm 0.028^*$	$0.955 \pm 0.055^{**}$
GE	$0.653 \pm 0.029^{\Delta\Delta}$	$0.778 \pm 0.059^{\Delta\Delta}$	$0.811 \pm 0.077^{\Delta*}$	$0.765 \pm 0.054^{**\Delta\Delta}$	$0.731 \pm 0.052^{\Delta\Delta}$
GE + siRNA	$0.518 \pm 0.041^{**\Delta\Delta}$	$0.554 \pm 0.057^{**\Delta\Delta}$	$0.567 \pm 0.053^{**\Delta\Delta}$	$0.546 \pm 0.049^{**\Delta\Delta}$	$0.524 \pm 0.052^{**\Delta\Delta}$
F	265.08	236.17	102.47	258.74	219.61
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MS _{组内}	0.002	0.003	0.005	0.002	0.003

q 检验: 与对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 siRNA 比较 $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 GE 组比较 $\#\# P < 0.01$

成。经改造的质粒和病毒为载体的小片段干扰

RNA 可长时间在真核细胞内表达, 为肿瘤的基因治

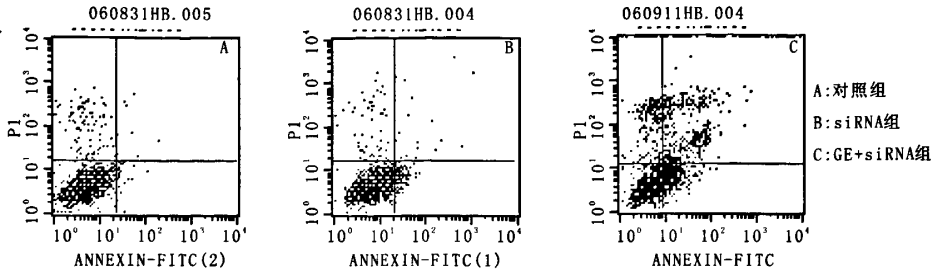


图4 流式细胞仪检测各组细胞凋亡结果

疗开辟了新的途径^[1,2,4,5]。

吉西他滨是一种新型的脱氧胞苷类似物。它在细胞内经过核苷激酶的作用转化成具有活性的代谢产物双氟二磷酸脱氧胞苷和双氟三磷酸脱氧胞苷,插入DNA,导致DNA合成中断^[6]。吉西他滨属于作用于S期的细胞周期特异性药物,作用于DNA合成期和晚G₁期,并可阻止细胞由G₁期进入S期。由于其良好的膜穿透性,与脱氧胞苷激活酶更强的亲和力以及细胞内更长的滞留时间,所以显示较好的抗癌活性。像其它化疗药物一样,肿瘤细胞易对吉西他滨产生耐药。所以众多学者^[7,8]研究提高肿瘤细胞吉西他滨的敏感性,降低耐药性的方法。

c-myc 基因是重要的原癌基因,过度表达可以激活其他癌基因,抑制细胞凋亡。针对*c-myc*的基因治疗备受关注。已有文献报道针对*c-myc*的RNA干扰成功地抑制了乳腺癌和直肠癌细胞的增殖,提高了凋亡率^[9-11]。本实验构建了针对*c-myc*的表达小干扰RNA片段的重组质粒,转染胰腺癌细胞后*c-myc*基因表达明显降低,这表明针对*c-myc*小干扰RNA成功抑制*c-myc*基因表达。用吉西他滨作用于这一细胞株后,细胞的吸光度(A)值在各时间点低于单用吉西他滨组,单纯*c-myc*-siRNA组及对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。凋亡率增加($P < 0.01$),证明吉西他滨和针对*c-myc*的RNA干扰合用明显优于单一用*c-myc*干扰或吉西他滨,为吉西他滨用于肿瘤的治疗提供了一个新的思路。但到目前为止,RNA干扰技术用于肿瘤的临床治疗还有很多技术问题有待解决,主要是如何设计在体内能够安全、稳定、有效表达的载体,这是未来RNA干扰技术研究的方向。*c-myc*基因和吉西他滨抗肿瘤机制以及肿瘤细胞吉西他滨耐药之间的关系尚未见报道,具体机制有待阐明。

[参 考 文 献]

- [1] Luo B, Heard AD, Lodish HF, *et al.* Small interfering RNA production by enzymatic engineering of DNA (SPEED) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(15): 5494-5499.
- [2] Uchida H, Tanaka T, Sasaki K, *et al.* Adenovirus-mediated transfer of siRNA against survivin induced apoptosis and attenuated tumor cell growth in vitro and in vivo [J]. *Mol Ther*, 2004, 10(1): 162-171.
- [3] Couzin J. Breakthrough of the year: small RNAs make big splash [J]. *Science*, 2002, 298(5602): 2296-2297.
- [4] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R, *et al.* A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cell [J]. *Science*, 2002, 296(5567): 550-553.
- [5] Hannon GJ, Conklin DS. RNA interference by short hairpin RNAs expressed in vertebrate cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 257(3): 255-266.
- [6] 夏晓阳, 叶爱和陈爱明, 等. 吉西他滨联合顺铂治疗晚期非小细胞肺癌 42 例观察 [J]. 蚌埠医学院学报, 2007, 32(5): 551-553.
- [7] Kunnumakkara AB, Guha S, Krishnan S, *et al.* Curcumin potentiates antitumor activity of gemcitabine in an orthotopic model of pancreatic cancer through suppression of proliferation, angiogenesis, and inhibition of nuclear factor-kappaB-regulated gene products [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(8): 3853-3861.
- [8] Mei K, Wang L, Tian L, *et al.* Antitumor efficacy of combination of interferon-gamma-inducible protein 10 gene with gemcitabine, a study in murine model [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2008, 27(1): 63-66.
- [9] Christensen LA, Finch RA, Booker AJ, *et al.* Targeting oncogenes to improve breast cancer chemotherapy [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(8): 4089-4094.
- [10] Wang YH, Liu S, Zhang G, *et al.* Knockdown of C-myc expression by RNAi inhibits MCF-7 breast tumor cell growth in vitro and in vivo [J]. *Breast Cancer Res*, 2005, 7(2): 220-228.
- [11] Hao H, Nancai Y, Lei F, *et al.* siRNA directed against C-myc inhibits proliferation and downregulates human telomerase reverse transcriptase in human colon cancer Colo 320 cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2008, 27(1): 27-34.