

· 论 著 ·

COX-2 特异性的 siRNA 诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡*

譙 敏, 向廷秀, 王丕龙

(重庆医科大学附属第一医院消化内科 400016)

摘要:目的 利用 RNA 干扰(RNAi)技术在体外抑制 COX-2 基因表达,探讨 RNAi 诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的可能途径。方法 设计靶向 COX-2 基因的小干扰 RNA(siRNA),构建重组表达质粒 pTZU6+1-siRNA-COX-2,并导入 SGC-7901 细胞,在体外诱导 RNAi,用 RT-PCR、免疫细胞化学、末端标记细胞凋亡检测法(TUNEL)和 Western Blot 检测 COX-2 基因表达、细胞凋亡和凋亡相关基因的表达。结果 重组质粒 pTZU6+1-siRNA-COX-2 导入 SGC-7901 细胞株后,COX-2 表达明显下调,细胞出现凋亡($P<0.05$),Caspase-9 和 Caspase-3 表达明显上调。结论 RNA 干扰明显抑制了靶基因 COX-2 的表达,并可能通过激活 Caspase 途径诱导 SGC-7901 细胞凋亡。

关键词:RNA 干扰;COX-2;胃癌;细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.20.004

中图分类号:R735.2;R730.23

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)20-2707-03

siRNA targeting COX-2 induces gastric carcinoma cell SGC-7901 apoptosis*

QIAO Min, XIANG Ting-xiu, WANG Pi-long

(Department of Digestive Diseases, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the possible pathway of SGC-7901 cells apoptosis by utilizing RNA interference(RNAi) to inhibit expression of COX-2 in vitro. **Methods** Small interference RNA(siRNA) homologous to COX-2 gene were designed, pTZU6+1-siRNA-COX-2 vector was constructed and transfected into SGC-7901 cells to induce RNAi. The changes of COX-2 gene, cell apoptosis and expression of apoptosis related genes were detected with RT-PCR, immunochimistry, TUNEL and Western blotting. **Results** After transfected with pTZU6+1-siRNA-COX-2, the level of cox-2 gene was down-regulated, SGC-7901 cell apoptosis was obvious($P<0.05$), expressions of Caspase-9 and Caspase-3 were arised. **Conclusion** RNA interference down-regulate COX-2 expression, and induce SGC-7901 cell apoptosis maybe by exciting expression of Caspases.

Key words: RNA interference; COX-2; Gastric Carcinoma; Cell Apoptosis

环氧化酶(cyclooxygenase, COX)是花生四烯酸(arachidonic acid, AA)合成前列腺素(prostaglandins, PGs)的限速酶,包括 COX-1 与 COX-2 两种同工酶。其中 COX-2 是由 Xie 等在 1991 年发现的一种诱导型酶,在正常生理状态下 COX-2 几乎不表达,而在多种恶性肿瘤细胞及组织中呈高表达状态^[1-4]。RNA 干扰(RNA interfering, RNAi)是指双链 RNA 引发细胞浆内同源 mRNA 降解的转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)现象,具有特异、高效、可传递等优点^[5-9]。本实验利用转录载体 pTZU6+1 构建 COX-2 的短发夹状 RNA(small hairpin RNA, siRNA),研究其对胃癌细胞株 SGC-7901 中 COX-2 基因的抑制作用,进一步了解 RNAi 介导的 SGC-7901 细胞凋亡及其可能的作用途径。

1 材料与方 法

1.1 材料 质粒 pTZU6+1 为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 Xba I、Sal I、Hind III 和 EcoR I 购自 TakaRa 公司,质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、连接试剂盒、总 RNA 提取试剂、RT-PCR 试剂盒、转染试剂 lipofectamine 2000 和末端标记细胞凋亡检测法(TUNEL)反应试剂盒等分别购自 TakaRa、Promega、Omega 和 Invitrogen 公司等。COX-2、Caspase-3 和 Caspase-9 的兔抗人多抗均为美国 Santa Cruz 公司产品;HRP 标记的羊抗兔 IgG(二抗)购自北京中山生物技术公司。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 SGC-7901 细胞株由重庆医科大学病理教研室提供。在含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中,37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.3 siRNA 结构的设计和合成 根据 siRNA 设计原则^[10]和 COX-2 编码序列,设计 19 个碱基的 DNA 片段,中间为 8 个与目的基因无同源性的插入序列(GAGTACTG),末端终止子 TTTT,并利用 BLAST 进行查询,确定其为特异性序列,合成的重组质粒命名为 pTZU6+1-siRNA-COX-2。共设计、合成 2 对 COX-2 编码序列的反向重复序列以及 2 对对应的点突变反向重复序列。合成的 DNA 两端设计有 Xho I 或 Xba I 酶切位点,便于与 pTZU6+1 载体连接。siRNA 的转录模板序列的正链分别为:5'-AAC TGC TCA ACA CCG GAA T-3'和 5'-GCC TTC TCT AAC CTC TCC T-3'。对应的点突变序列的正链分别为:5'-AAC TGC TCT ACA CCG GAA T-3'和 5'-GCC TTC TCA AAC CTC TCC T-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,转化大肠杆菌 JM109, Amp 抗性筛选。筛选克隆提取 DNA,用 EcoR I 和 Hind III 分别酶切,并用相同的酶酶切载体

* 基金项目:重庆医科大学校办资助项目(XBYB2007021);重庆市卫生局资助项目(2008-2-121)。

pTZU6+1 作为对照,琼脂糖凝胶电泳鉴定。将筛选的重组质粒测序确定,以证实目的 DNA 片段克隆入 pTZU6+1 载体,将构建的重组质粒命名为 pTZU6+1-siRNA-COX-2,对应目的序列及相应的点突变序列构建的重组质粒分别简称为 pC1-siRNA、pC2-siRNA、pC1'-siRNA 和 pC2'-siRNA。

1.5 质粒转染 按照 Invitrogen 公司 lipofectamine 2000 的说明书进行转染。将正常培养的 SGC-7901 细胞用胰酶消化、离心、弃上清液,沉淀用 RPMI-1640 培养液重悬,调整浓度为 4×10^5 cells/mL,以 2 mL 细胞接种于 6 孔培养板中,置 37 °C 培养。待细胞生长到占培养瓶底约 70%~80%时,换为无抗菌素含血清的 RPMI-1640 培养液,培养过夜。次日,分别用 pC1-siRNA、pC2-siRNA、pC1'-siRNA 和 pC2'-siRNA 转染 SGC-7901 细胞,同时设 pTZU6+1 空载体转染的阴性对照,在无血清、无抗菌药物的培养液中培养 4~6 h 后换新鲜 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液,继续培养 72 h 后检测各指标。

1.6 免疫细胞化学检测 COX-2 蛋白表达的变化 收获细胞,用 95%乙醇固定后,按 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。

1.7 TUNEL 检测细胞凋亡 采用 TUNEL 反应试剂盒。取对数生长期的 SGC-7901 细胞 4×10^5 接种于 6 孔板,含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基培养过夜,分组转染细胞。转染后 72 h,弃上清液,用 95%乙醇固定,3% H_2O_2 封闭,0.1% Triton-100,每孔加 50 μ L 反应混合液,37 °C 孵育 60 min,每孔加 50 mL POD,最后用 DAB 显色。

1.8 Western Blot 检测 Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白表达 配制 10%SDS-PAGE 分离胶和 5%SDS-PAGE 浓缩胶。分别收集阴性对照组和转染 pC1-siRNA、pC2-siRNA、pC1'-siRNA 和 pC2'-siRNA 质粒 72 h 的 SGC-7901 细胞,沉淀用 PBS 洗 2 遍,细菌裂解液处理,上样 10 μ L,90 V 恒压电泳约 60 min,120 V 恒压电泳约 2 h。电泳完毕后取出凝胶,4 °C、25 V 恒压电转过夜。次日晨取出 NC 膜,加 1:500 稀释的 Caspase-9 和 Caspase-3 一抗溶液,4 °C 过夜,加 1:1000 的辣根过氧化物酶标记稀释二抗溶液,37 °C、轻轻振荡 2 h 后弃反应液,用 DAB 染色试剂盒染色,BIO-RAD 图像分析仪上观察并扫描制片,记录结果。采用软件 Image Proc Plus3.0 (IPP3.0) 进行分析。

1.9 统计学方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 χ^2 检验和 *t* 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 重组质粒载体的构建与鉴定 pC1-siRNA、pC2-siRNA、pC1'-siRNA 和 pC2'-siRNA 质粒经 Hind III 和 EcoR I 双酶切,同时做 pTZU6+1 空载体双酶切对照。琼脂糖电泳,pTZU6+1 空载体经双酶切后呈 2 条带,分别为 2.8 kb 的载体片段和 350 bp 左右的小片段;而重组质粒经双酶切后则为 2.8 kb 的载体片段和 400 bp 左右的条带(图 1)。测序结果也证明重组质粒构建成功,插入 DNA 序列均正确。

2.2 免疫细胞化学检测结果 对照组质粒、pC1'-siRNA 和 pC2'-siRNA 质粒处理的 SGC-7901 细胞可见细胞浆黄染,内有较多棕黄色颗粒为阳性。而经 pC1-siRNA 和 pC2-siRNA 处理的胃癌 SGC-7901 细胞,细胞浆的黄色明显减弱、变浅,说明 COX-2 蛋白表达低于对照组(图 2)。

2.3 Western Blot 检测结果 以 β -actin 蛋白条带的强弱作为标准,与对照组比较,pC1-siRNA 和 pC2-siRNA 质粒转染组细胞 Caspase-9 和 Caspase-3 表达明显增强,而 pC1'-siRNA 和

pC2'-siRNA 质粒转染组细胞中 Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白表达与对照组比较,差异无统计学意义(图 3)。

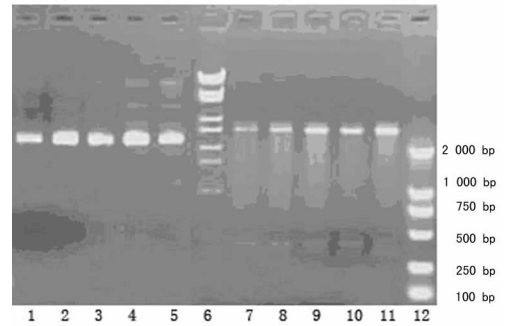


图 1 重组质粒 pTZU6+1-siRNA-COX-2 的酶切鉴定
1: pC1-siRNA 质粒转染组; 2: pC2-siRNA 质粒转染组; 3: pC1'-siRNA 质粒转染组; 4: pC2'-siRNA 质粒转染组; 5: pTZU6+1 质粒转染组; 6: 分子 Marker; 7: Hind III 和 EcoR I 酶切 pC1-siRNA 质粒组; 8: Hind III 和 EcoR I 酶切 pC2-siRNA 质粒组; 9: Hind III 和 EcoR I 酶切 pC1'-siRNA 质粒组; 10: Hind III 和 EcoR I 酶切 pC2'-siRNA 质粒组; 11: Hind III 和 EcoR I 酶切 pTZU6+1 质粒组; 12: 分子 Marker。

图 1 重组质粒 pTZU6+1-siRNA-COX-2 的酶切鉴定

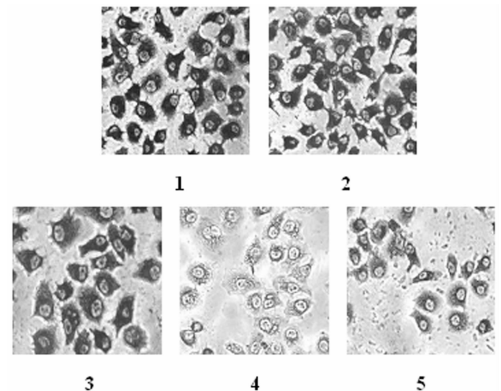


图 2 免疫细胞化学检测 COX-2 蛋白表达
1: pTZU6+1 质粒转染组; 2: pC1'-siRNA 质粒转染组; 3: pC2'-siRNA 质粒转染组; 4: pC1-siRNA 质粒转染组; 5: pC2-siRNA 质粒转染组。

图 2 免疫细胞化学检测 COX-2 蛋白表达

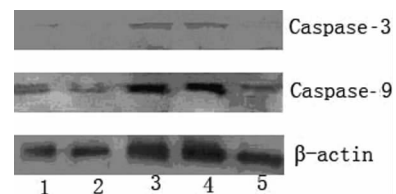
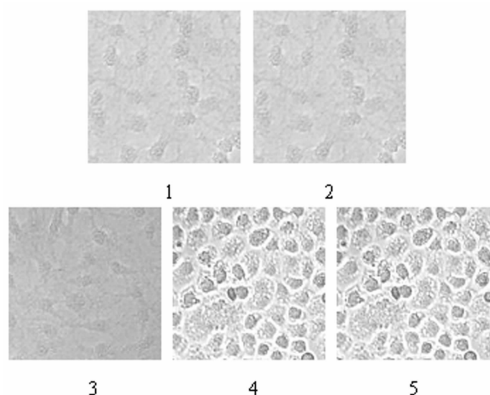


图 3 Western Blot 检测 SGC-7901 细胞中 Caspases 蛋白的表达
1: pC1'-siRNA 质粒转染组; 2: pC2'-siRNA 质粒转染组; 3: pC1-siRNA 质粒转染组; 4: pC2-siRNA 质粒转染组; 5: pTZU6+1 质粒转染组。

图 3 Western Blot 检测 SGC-7901 细胞中 Caspases 蛋白的表达

2.4 TUNEL 检测结果 TUNEL 染色反应后,在倒置显微镜下可见,对照组、转染 pC1'-siRNA 和 pC2'-siRNA 组细胞大部分贴壁良好,形态完整正常,少量胞核内有色现象,胞质着色浅。在转染 pC1-siRNA 和 pC2-siRNA 的 SGC-7901 细胞中出现大量凋亡细胞($P < 0.05$),表现为细胞核中央呈类圆形、均一的棕色,在胞浆中有片状着色,核浓缩,凋亡小体形成(图 4)。



1: pTZU6+1 质粒转染组; 2: pC1'-siRNA 质粒转染组; 3: pC2'-siRNA 质粒转染组; 4: pC1-siRNA 质粒转染组; 5: pC2-siRNA 质粒转染组。

图 4 TUNEL 检测 SGC-7901 细胞凋亡

3 讨论

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机制促进肿瘤的发生、发展。胃癌是常见的消化道恶性肿瘤, 其具有高发率、高恶性度、预后不良的特点, 临床手术切除后常需进行辅助性化疗, 其目的在于抑制肿瘤细胞生长、诱导肿瘤细胞凋亡。研究表明, 在胃癌组织和细胞中, COX-2 常呈高表达状态, 与肿瘤的发生、发展及预后密切相关。RNAi 是一种 PTGS 的基因阻断技术, 近年来被广泛应用于哺乳动物细胞抑制基因表达^[11-12]。本课题通过构建重组质粒, 将 siRNA 导入胃癌 SGC-7901 细胞内诱发 RNAi, 进而观察 COX-2 表达变化、SGC-7901 细胞凋亡及与凋亡相关的信号分子改变。

作者构建了 2 对 COX-2 编码序列的反向重复序列以及 2 对对应的点突变反向重复序列, 即 pC1-siRNA、pC2-siRNA、pC1'-siRNA 和 pC2'-siRNA, 并用其转染胃癌 SGC-7901 细胞株。结果发现 pC1-siRNA 和 pC2-siRNA 均能显著下调 SGC-7901 细胞中 COX-2 表达, 而 pC1'-siRNA 和 pC2'-siRNA 处理的 SGC-7901 中 COX-2 表达无明显改变。说明 RNAi 对同源 mRNA 的作用是很特异的, 即使发生碱基的点突变也可能影响 RNAi 的效力。这与 Phipps 等^[13] 和 Elbashir 等^[14] 的报道相一致。本实验中, 作者还发现转染 pC1-siRNA 和 pC2-siRNA 的 SGC-7901 出现明显的细胞凋亡, 且与对照组相比, Caspase-9 和 Caspase-3 表达明显上调, 说明 COX-2 基因特异性的 siRNA 可能通过激活 Caspases 通路而诱发 SGC-7901 细胞凋亡。

参考文献:

[1] 黄昌杰, 湛永滋, 黄剑锋, 等. CerB-2 基因、COX-2 基因在鼻咽癌中的表达及相关性研究[J]. 广西医学, 2009, 31(3): 305.

[2] Okano H, Shinohara H, Miyamoto A, et al. Concomitant overexpression cyclooxygenase-2 in HER-positive onomad-reduced human gastric carcinoma is associated with a poor patient outcome[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(4): 6938.

[3] Chen XL, Su BS, Sun RQ, et al. Relationship between expression and distribution of cyclooxygenase-2 and bcl-2 in human gastric adenocarcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(8): 1228.

[4] 倪观太, 张正荣. 环氧化酶-2 与卵巢癌关系的研究进展[J]. 安徽医学, 2004, 25(4): 344.

[5] 曾柯, 吴小侯, 杜虎. Survivin 靶向 siRNA 对膀胱癌细胞增殖和凋亡作用的体外研究[J]. 重庆医学, 2007, 36(14): 1360.

[6] Song E, Lee SK, Wang J, et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis[J]. Nat Med, 2003, 9(3): 347.

[7] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference[J]. Cancer Cell, 2002, 2(3): 245.

[8] Olson A, Sheth N, Lee JS, et al. RNAi Codex: a portal/database for short-hairpin RNA (shRNA) gene-silencing constructs[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34: 153.

[9] 钟文昭, 苏健, 陈志红, 等. RNA 干扰技术抑制人肺腺癌 A549 细胞株 EGFR 基因表达[J]. 广东医学, 2008, 29(6): 924.

[10] Sui G, Soohoo C, Affar EB, 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.

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

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

[13] 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.

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

(收稿日期: 2010-02-23 修回日期: 2010-03-05)

(上接第 2706 页)

[14] Liu H, Yin Y, Yao K. Construction of chitosan-gelatin-hyaluronic acid artificial skin in vitro[J]. J Biomater Appl, 2007, 21(4): 413.

[15] 鲁元刚, 伍津津, 张教扬, 等. 体外构建皮肤基底膜的组织学特征[J]. 中华烧伤杂志, 2007, 23(5): 369.

[16] 鲁元刚, 伍津津, 张教扬, 等. 层粘蛋白促进复方壳多糖组织工程皮肤基底膜构建的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(23): 2299.

(收稿日期: 2010-02-07 修回日期: 2010-03-05)