

· 论 著 ·

RNA 干扰沉默雄激素受体基因对前列腺癌细胞生长的抑制作用研究*

王洛夫, 张 尧, 兰卫华, 靳风烁[△], 江 军

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科, 重庆 400042)

摘要:目的 设计、合成针对雄激素受体(AR)基因的具有高干扰效率的 siRNA, 观察其对前列腺癌细胞的生长抑制作用。**方法** 设计、合成多个针对 AR 的 siRNA, 转染前列腺癌细胞 LNCaP, 筛选出对 AR 基因干扰效率最高的 AR siRNA, 用 RT-PCR 检测 AR mRNA 水平, 并计算细胞生长抑制率。**结果** 采用 Silencer[®] siRNA Construction Kit 成功合成了 AR siRNA, 转染 LNCaP 细胞, 筛选出一个对其生长抑制作用最强的 siRNA, 并证实 AR mRNA 水平显著下降, LNCaP 细胞的生长抑制率为 78.2%。**结论** 针对雄激素受体的 siRNA 可沉默雄激素受体基因, 并抑制前列腺癌细胞的生长。

关键词: 前列腺癌; RNA 干扰; 雄激素受体; 基因治疗**中图分类号:** R737.25; R730.54**文献标识码:** A**文章编号:** 1671-8348(2010)01-0028-03

Suppressive effect of androgen receptor siRNA on prostate cancer cell proliferation by RNA interference*

WANG Luo-fu, ZHANG Yao, LAN Wei-hua, et al.

(Department of Urology, Daping Hospital, Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To design and synthesize AR siRNAs and to observe their effect on the proliferation of prostate cancer cells. **Methods** siRNAs were designed and synthesized and transfected LNCaP prostate cancer cells. One of the most effective AR siRNAs was selected by observing the suppressive effect. The AR mRNA level was detected by RT-PCR and the suppressive rate of cell growth was calculated. **Results** AR siRNAs were successfully synthesized by using Silencer[®] siRNA Construction Kit. We confirmed that AR siRNA II was the most effective siRNA. The level of AR mRNA of LNCaP cells was significantly reduced by AR siRNA II. The suppressive rate of AR siRNA II on LNCaP cell growth was 78.2%. **Conclusion** AR siRNA can silence the androgen receptor gene and suppress the proliferation of the prostate cancer cells.

Key words: prostate cancer; gene therapy; RNA interference; androgen receptor

前列腺癌具有雄激素依赖性, 抗雄激素治疗至少对 80% 的晚期前列腺癌有效, 但绝大多数患者会在短期内发展为雄激素非依赖性前列腺癌, 缺乏有效的治疗方法^[1-2]。目前有研究认为, 前列腺癌的雄激素依赖性主要是雄激素受体 (androgen receptor, AR) 依赖性, AR 不但在雄激素依赖性前列腺癌中具有重要作用, 在雄激素非依赖性前列腺癌中也起着关键作用^[3-4], 因此, 可针对 AR 基因进行前列腺癌的基因治疗。RNA 干扰 (RNAi) 具有高效、高度基因特异性的特点, 能沉默所有已知序列的基因, 采用 RNA 干扰技术沉默 AR 基因, 将可能有效地抑制 AR 的表达, 从而抑制前列腺细胞的生长。因此, 本研究拟设计合成针对 AR 基因的小干扰 RNA (siRNA) 并转染前列腺癌细胞, 观测其对 AR 基因的沉默作用及对前列腺癌细胞的生长抑制作用。

1 材料与方

1.1 材料 实验用人前列腺癌细胞株 LNCaP (购自美国 ATCC), 该细胞表达 AR, 具有雄激素依赖性, 同时该细胞对雌激素、孕激素甚至抗雄激素药物敏感, 具有雄激素非依赖性前列腺癌的特性。siRNA 合成试剂盒 Silencer[®] siRNA Construction Kit、siRNA 转染试剂 siPORT[™] Lipid Transfection Agent 购自美国 Ambion 公司, ReverTra Ace- α -逆转录试剂盒购自 TOYOBO 公司。

1.2 AR siRNA 的设计 利用 Ambion 公司提供的 siRNA 设计软件设计针对 AR cDNA (GeneBank 序列号: M23263

N18624) 符合特征的靶序列, 同时设计阴性对照序列 (GC 含量与靶序列相同)。经初步分析选取了 3 个靶序列: 5'- AAT GCA AAG GTT CTC TGC TAG -3' (位于 Exon1), 5'- AAG GTC TTC TTC AAA AGA GCC -3' (位于 Exon2), 5'- AAA GTC AAG CCC ATC TAT TTC -3' (位于 Exon8); 阴性对照序列: 5'- AAG TGC GAT CTA ACT GAC CTA -3'。根据靶序列设计用于合成 siRNA 的寡核苷酸模板, 反义链为靶序列, 正义链为靶序列的互补序列, 3' 加 T7 启动子引物序列 CCT-GTCTC。以上寡核苷酸模板均由上海生工生物工程公司合成。

1.3 AR siRNA 的制备 采用 Ambion 公司的 Silencer[®] siRNA Construction Kit 合成上述 AR siRNA, 按试剂盒操作说明书取等摩尔浓度的正、反义寡核苷酸模板与 T7 启动子混合, 70℃ 加热混合物 5min, 室温下放置 5min, T7 启动子和寡核苷酸模板序列退火结合, 然后用 DNA 聚合酶 Klenow 大片段补齐成为可用于转录的双链 DNA 模板, 分别用 T7 RNA 聚合酶进行体外转录, 再将产物混合后于 37℃ 水浴箱持续孵育过夜, 形成双链 RNA。以 DNA 酶降解模板, 同时用单链专一的核糖核酸酶 (RNase) 消化 5' 的引导序列, 由于 RNase 不能切开 U 碱基, 也不能降解双链 RNA, 所以得到的产物就是所需的 21bp 的双链 siRNA, 有 19 对碱基互补, 3' 端各有 2 个 U 突出。按试剂盒操作说明书进行纯化, 得到的 siRNA 用去核酸酶的水溶解, 紫外分光光度计定量, -20℃ 保存备用。将 3 种靶序

* 基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目 (CSTC, 2006BB5083)。 [△] 通讯作者, 电话: (023) 68757946。

列合成的 AR siRNA 依次命名为 AR siRNA I、AR siRNA II、AR siRNA III。

1.4 AR siRNA 转染前列腺癌细胞 取对数生长期 LNCaP 细胞接种于 6 孔板 (5×10^5 /孔), 培养细胞至密度为 50%~60%。采用 siPORT™ Lipid Transfection Agent 进行 siRNA 转染, 简要步骤如下: 取 4 μ L siPORT™ Lipid Transfection Agent, 加入 OPTI-MEM I reduced serum medium 使终体积为 15 μ L, 充分混匀, 室温孵育 10~30min。用 OPTI-MEM I reduced serum medium 稀释 siRNA 至终体积 185 μ L (终浓度 25nM)。将稀释的 siRNA 加入到稀释的 siPORT™ Lipid Transfection Agent 中, 室温孵育 15~20min。用 OPTI-MEM I reduced serum medium 将细胞洗一遍, 然后加入新鲜的 OPTI-MEM I 至 800 μ L。加入 siPORT™ Lipid Transfection Agent/siRNA 复合物至每孔, 使终体积为 1 000 μ L, 在常规细胞培养条件下孵育 4h, 加 1~2mL 新鲜的常规培养基继续培养。每种 AR siRNA 转染重复 3 次, 观察细胞生长状况, 挑选对 LNCaP 抑制作用最强的一组 AR siRNA 进行下一步实验。

1.4 AR siRNA 对 AR 基因转录的影响 实验分 3 个组, A 组: 以抑制作用最强的 AR siRNA 转染 LNCaP, 称为 AR siRNA 干预组; B 组: 以阴性对照 siRNA 转染 LNCaP, 称为无关对照组 (mock control); C 组: 只加脂质体, 称为空白对照组 (control)。转染 48h 后, 采用 Trizol 试剂 (Invitogen) 提取细胞总 RNA, 用 DNA 酶消化后, 电泳证实提取 RNA 成功, 以随机六聚体引物反转录为 cDNA, 反应条件: 42 $^{\circ}$ C、10min \rightarrow 30 $^{\circ}$ C、20min \rightarrow 99 $^{\circ}$ C、5min \rightarrow 4 $^{\circ}$ C、5min, 然后以 AR 引物 P1、P2 进行 PCR, 以 GAPDH 作为内参照, 引物序列: P1 5'-AAG CCA TTG AGC CAG GTG TAG TG-3', P2 5'-AAC CAG ATC AGG GGC GAA GTA GA-3', GAPDH 引物: 5'-ACC CAT CAC CAT CTT CCA GGA G-3' (上游引物), 5'-GAA GGG GCG GAG ATG ATG AC-3' (下游引物), 反应条件: 94 $^{\circ}$ C、5min \rightarrow (94 $^{\circ}$ C、30s \rightarrow 58 $^{\circ}$ C、30s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C、30s) \times 28 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C、10min, 扩增片段的长度 AR 为 275bp, GAPDH 为 159bp。PCR 产物采用图像扫描仪拍照并进行灰度分析, 以 AR/GAPDH 的比值代表相对含量。

1.6 细胞生长曲线 接种 LNCaP 于 24 孔板, 每孔接种 3×10^4 个细胞, 24h 后按上述分组进行转染, 次日开始每天消化 3 孔记数, 取平均值, 绘制细胞生长曲线, 计算细胞生长抑制百分率, 计算公式: 细胞生长抑制百分率 (%) = $(N_n - N) / (N_n - N_0) \times 100\%$ 。其中 N_0 为始接种细胞数, N 为 AR siRNA 干预组细胞接种 n 天后的细胞数, N_n 为对照组细胞接种 n 天后的细胞数。

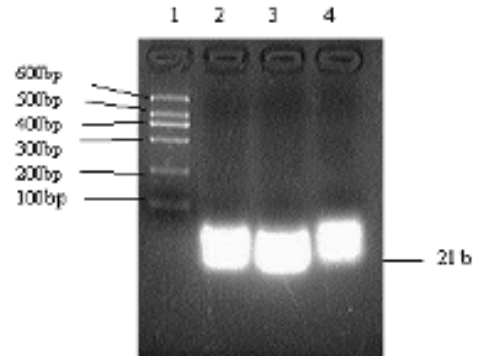
2 结 果

2.1 siRNA 的合成 采用 Ambion 公司的 Silencer® siRNA Construction Kit 合成的 AR siRNA 是双链 RNA, 长度为 21bp, 经凝胶电泳证实成功合成了 AR siRNA (图 1)。

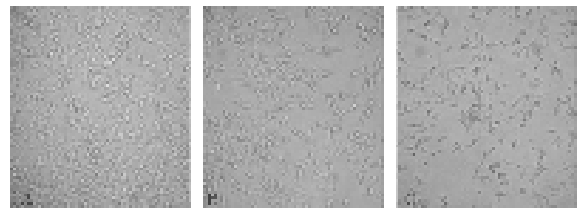
2.2 AR siRNA 转染前列腺癌细胞及其对前列腺癌细胞生长的影响 将合成的 3 种 AR siRNA 转染前列腺癌细胞 LNCaP, 与阴性对照和空白对照相比, 发现 3 种 AR siRNA 对 LNCaP 细胞均有不同程度的抑制作用, 但以 AR siRNA II 对 LNCaP 细胞的生长抑制作用最强, 表现为细胞生长停滞、脱壁, 而对照组细胞生长旺盛, 故选择 AR siRNA II 进行进一步的研究 (图 2)。

2.3 AR siRNA 对 AR 基因转录的影响 为明确 AR siRNA

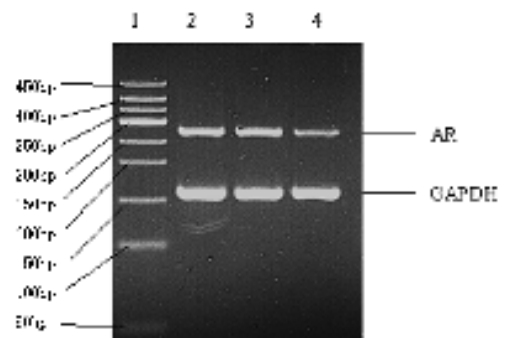
II 转染对靶基因的影响, 本科进行了 RT-PCR。结果表明, AR siRNA II 转染 LNCaP 细胞 48h 后, AR mRNA 水平明显下调, 与空白对照组和无关对照组相比差异有统计学意义 [(0.302 \pm 0.028) vs (0.494 \pm 0.032), $P < 0.01$; (0.302 \pm 0.028) vs (0.534 \pm 0.034), $P < 0.01$], 而无关对照组不引起靶基因 AR mRNA 水平的明显变化 [(0.534 \pm 0.034) vs (0.494 \pm 0.032), $P > 0.05$], 见图 3。



1: 分子量标准; 2: AR siRNA I; 3: AR siRNA II; 4: AR siRNA III。
图 1 合成的 AR siRNA 凝胶电泳 (1% 琼脂糖凝胶) 结果



A: 空白对照组; B: 无关对照组; C: AR siRNA II。
图 2 各组细胞生长情况 (光镜 $\times 100$)



1: 分子量标准; 2: 空白对照组; 3: 无关对照组; 4: AR siRNA II。
图 3 RT-PCR 产物凝胶电泳 (1% 琼脂糖凝胶) 结果

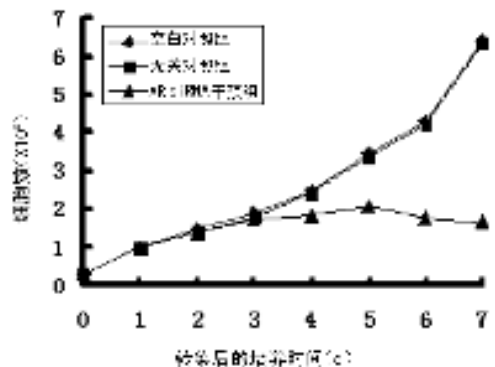


图 4 细胞生长曲线

2.4 细胞生长曲线 按上述分组绘制细胞生长曲线(图 4),可见 AR siRNA 干预组细胞生长明显被抑制,细胞生长抑制率(相对空白对照组)为 78.2%。

3 讨 论

前列腺癌是西方工业国家最常见的恶性肿瘤之一,是美国男性常见的恶性肿瘤,其死亡率仅次于肺癌,居男性癌症死亡的第 2 位;中国前列腺癌的发病率也呈上升趋势。前列腺癌具有雄激素依赖性,抗雄激素治疗至少对 80% 的晚期前列腺癌有效,但绝大多数患者会在短期内发展为雄激素非依赖性前列腺癌,缺乏有效的治疗方法^[1-2]。

目前,研究认为,前列腺癌的雄激素依赖性主要是 AR 依赖性,AR 不单在雄激素依赖性前列腺癌中具有重要作用,在雄激素非依赖性前列腺癌中也起着关键作用^[3-4],表现在:(1) AR 表达增加,几乎所有雄激素非依赖性前列腺癌均表达 AR,且大多数病例高于原发性肿瘤。AR 表达增加的机制之一是 AR 基因扩增,在进行抗雄激素治疗后发生雄激素非依赖性转变的前列腺癌患者,约 30% 有 AR 基因扩增。AR 表达增加使得在低浓度雄激素环境中雄激素-雄激素受体通路仍可被激活。(2) AR 基因突变,突变的 AR 可被雄激素以外的甾体激素激活。(3) 生长因子或细胞因子以配基非依赖的方式激活。(4) 过量表达 AR 共激活因子,如 ARA-70 等,使 AR 的活性大幅度提高。这些细胞尽管对抗雄激素治疗抵抗,但却对 AR 具有高度依赖性,因此,阻断这些细胞的 AR 表达应该可以起到治疗作用。这对攻克雄激素非依赖性前列腺癌这一前列腺癌治疗领域的难题无疑是有益的尝试。Eder 等^[5]采用 AR 反义寡核苷酸阻断 AR 蛋白表达,抑制了前列腺癌细胞 LNCaP 的生长,本科采用逆转录病毒载体介导的 AR 反义 RNA 抑制 AR 表达也取得了类似的结果^[6-7]。因 LNCaP 具有雄激素非依赖性前列腺癌的一些特性,如在无雄激素的环境中,雌激素、孕激素、细胞因子等仍能通过激活 AR 而使 LNCaP 生长。因此,上述研究表明 AR 在雄激素非依赖性前列腺癌的治疗中极具价值。但这些实验中反义核酸对 AR 表达的抑制程度及对前列腺癌细胞的生长抑制程度仍偏低,仍需寻找更有效的方法。

RNA 干扰是一种在细胞内导入与特定基因序列相同的双链 RNA(dsRNA)而特异关闭基因的方法,即用 20 多个核苷酸组成的 siRNA 代替传统反义核酸进行转录后基因沉默,目前该技术已经迅速而广泛地应用到基因功能、基因表达调控机制研究等热门领域,并为基因治疗开辟了新的途径^[8-9]。RNAi 具有高效、高度基因特异性的特点,能沉默所有已知序列的基因,且 RNA 干扰在基因沉默方面比反义 RNA 和反义寡核苷酸更有效。因此,设计合成针对 AR 的特异 dsRNA 并导入到

前列腺癌细胞,使 AR 基因沉默,将可能更有效地抑制 AR 的表达,从而抑制前列腺癌细胞的生长。所以,本研究在既往研究的基础上,选用 RNA 干扰技术沉默雄激素受体基因。

通过设计、合成多个 AR siRNA,转染前列腺癌细胞 LNCaP,本研究筛选出了一个对其生长抑制作用最强的 AR siRNA,RT-PCR 证实前列腺癌细胞的 AR mRNA 水平显著降低,LNCaP 细胞生长被显著抑制,细胞生长抑制率为 78.2%。以上结果表明 AR siRNA 可沉默 AR 基因,并进一步抑制前列腺癌细胞的生长。由于 LNCaP 存在基因突变,雌激素、孕激素甚至抗雄激素药物可刺激其生长,具有雄激素非依赖性前列腺癌的一些特征,故本研究结果提示 AR siRNA 可能对雄激素非依赖性前列腺癌也有生长抑制作用。

参考文献:

- [1] 吴绮思,罗春丽.前列腺干细胞抗原与前列腺癌的研究进展[J].重庆医学,2008,37(13):1424.
- [2] Kasper S,Cookson MS. Mechanisms leading to the development of hormone-resistant prostate cancer [J]. Urol Clin North Am,2006,33(2):201.
- [3] Sharifi N,Farrar WL. Androgen receptor as a therapeutic target for androgen independent prostate cancer[J]. Am J Ther,2006,13(2):166.
- [4] Eder IE,Haag P,Bartsch G,et al. Targeting the androgen receptor in hormone-refractory prostate cancer-new concepts[J]. Future Oncol,2005,1(1):93.
- [5] Eder IE,Hoffmann J,Rogatsch H,et al. Inhibition of LNCaP prostate tumor growth in vivo by an antisense oligonucleotide directed against the human androgen receptor [J]. Cancer Gene Ther,2002,9(2):117.
- [6] 江军,王洛夫,方玉华,等.雄激素受体反义 RNA 对前列腺癌 LNCaP 生长特性的影响[J].第三军医大学学报,2003,25(16):1410.
- [7] 王洛夫,江军,方玉华,等.雄激素受体反义寡核苷酸对前列腺癌细胞生长的抑制作用[J].中华泌尿外科杂志,2003,24(6):383.
- [8] Gaur RK. RNA interference:a potential therapeutic tool for silencing splice isoforms linked to human diseases[J]. Biotechniques,2006,28(1):15.
- [9] 黄环,吴永忠. RNA 干扰技术及其在肿瘤研究中的进展[J].重庆医学,2008,37(2):198.

(收稿日期:2009-07-02)

(上接第 27 页)

antagonists on rapid microglial and astroglial reactions in rat hippocampus following traumatic brain injury [J]. Neurol Res,2008,30(4):420.

- [14] Smith DH,Nonaka M,Miller R,et al. Immediate coma following inertial brain injury dependent on axonal dam-

age in the brainstem[J]. J Neurosurg,2000,93(2):315.

- [15] Admas JH,Graham DI,Jennett B. The neuropathology of the vegetative state after an acute brain insult[J]. Brain,2000,(Pt 7):327.

(收稿日期:2009-05-29 修回日期:2009-07-27)