

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.28.005

RNAi 沉默 ERCC1 基因对肺腺癌细胞顺铂敏感性的影响*

王巍炜, 巫正伟, 王德光, 张 勇[△]

(昆明医科大学第三附属医院胸外科 650118)

[摘要] **目的** 目的用包含切除修复交叉互补(ERCC1)基因特异 RNA 序列的慢病毒,将其转染入宣威肺腺癌细胞 XWCL05 中,沉默 ERCC1 基因表达,初步探讨其基因沉默效果及对顺铂敏感性的影响,为顺铂耐药逆转提供思路和依据。**方法** 经 293T 细胞包装后构建 ERCC1 基因 RNAi 的慢病毒载体及阴性对照,分别使用 XWCL05 空白组(空白对照)、XWCL05-neg 组(转染空载体)、XWCL05-RNAi 组(转染 ERCC1-RNAi 慢病毒)。Western blot 法检测转染前后 XWCL05 细胞中 ERCC1 蛋白的表达。12.5 μg/mL 顺铂作用 48 h 后,用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测顺铂对各组 XWCL05 细胞增殖抑制率的影响;流式细胞术检测各组中 XWCL05 细胞的凋亡率。**结果** (1)Western blot 结果显示,XWCL05-RNAi 组中 ERCC1 蛋白表达水平显著低于 XWCL05-neg 组($P<0.05$),而 XWCL05-neg 和 XWCL05 空白组差异无统计学意义($P>0.05$)。(2)MTT 法检测显示相同浓度顺铂作用下,XWCL05-RNAi 组的增殖抑制率显著高于 XWCL05-neg 组和 XWCL05 空白组($P<0.05$),而 XWCL05-neg 组。(3)流式细胞术检测结果显示,XWCL05-RNAi 组凋亡率显著高于 XWCL05-neg 组和 XWCL05 空白组($P<0.05$)。而顺铂作用后,各组凋亡率较前均显著升高($P<0.05$),且 XWCL05-RNAi 组凋亡率显著高于其余两组。**结论** ERCC1 基因 RNAi 的慢病毒能够有效地沉默宣威肺腺癌细胞 XWCL05 中 ERCC1 基因的表达,并增强 XWCL05 对顺铂的敏感性。

[关键词] 遗传载体;RNA 干扰;ERCC1;肺腺癌细胞**[中图分类号]** R453.9**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)28-3904-03

The effect of RNAi silencing ERCC1 gene on the cisplatin sensitivity of lung adenocarcinoma cell line*

Wang Weiwei, Wu Zhengwei, Wang Deguang, Zhang Yong[△]

(Department of Thoracic Surgery, the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming, Yunnan 650118, China)

[Abstract] **Objective** RNAi targeted ERCC1 were used to transfected Xuanwei lung adenocarcinoma cell line XWCL05 by lentivirus in order to further investigate ERCC1 gene silencing effect on the cisplatin sensitivity of XWCL05. We wish this could be reference for cisplatin-resistance reversion. **Methods** Lentivirus contained ERCC1 targeted RNAi were cultured in 293T cell line and XWCL05 wild type(control), XWCL05-neg(blank vector) and XWCL05-RNAi(ERCC1-RNAi) were cultured for further analysis. Western blot was applied to test ERCC1 expression in XWCL05 before and after transfection. After co-cultured with cisplatin(concentration 12.5 μg/mL) for 48 hours, MTT was used to test cell proliferation and flow cytometry(FCM) was used to test cell necrosis. **Results** (1) Western blot showed ERCC1 expression was significantly lower in XWCL05-RNAi($P<0.05$) and its expression between XWCL05 wild type and XWCL05-neg showed no significantly difference($P>0.05$). (2) In MTT test, there was significant proliferation inhibiting effect in XWCL05-RNAi group compared with XWCL05-neg group. (3) In FCM, the necrosis rate of XWCL05-RNAi was significantly higher($P<0.05$) than that of other two groups and there was also no significant difference between XWCL05 wild type and XWCL05-neg. However after treated with cisplatin, the necrosis rate of these 3 groups increased significantly when compared with their counterpart before the treatment of cisplatin($P<0.05$) and necrosis rate of XWCL05-RNAi decreased the most. **Conclusion** ERCC1 RNAi lentivirus can effectively silence ERCC1 gene expression in XWCL05 and enhance XWCL05 sensitivity to cisplatin.

[Key words] genetic vector; RNA interference; ERCC1; lung adenocarcinoma cell

以铂类联合第 3 代化学治疗药物是肺癌的标准化学治疗方案,但无论是初治还是复发的肺癌患者,均可能存在对铂类药物尤其是顺铂不同程度的耐药,严重影响肺癌化学治疗效果^[1-4]。因此,如何避免或逆转患者对顺铂耐药是当前的研究热点。DNA 损伤修复能力增强是导致实体肿瘤对顺铂耐药的主要原因。研究表明,DNA 修复存在 5 种途径:核苷酸切除修

复(NER)、同源重组修复(HRR)、非同源末端连接(NHEJ)、碱基切除修复(BER)和错配修复(MMR)。DNA 损伤主要通过 NER 途径修复,而切除修复交叉互补(ERCC1)基因在 NER 中起关键作用。因此,反向抑制 ERCC1 蛋白表达,可能会减弱 DNA 修复功能,增加肺癌细胞对顺铂的敏感性,促进细胞凋亡。宣威地区是云南省乃至全国肺癌高发区之一,流行病学研

* 基金项目:云南省科技厅-昆明医科大学 2013 年联合基金资助项目(2013FB164);昆明医科大学第三附属医院博士基金资助项目(BS55201510)。 作者简介:王巍炜(1979-),副教授,博士,主要从事肺癌的多学科综合治疗研究。 △ 通讯作者, Tel:13708761555; E-mail:zhongyonghh@126.com

究显示其高发人群主要为农民,组织学分型以腺癌为主,女性患者比例高于男性。前期研究也发现宣威肺腺癌患者中 ERCC1 基因高表达^[5]。慢病毒载体介导的 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是研究基因功能和细胞信号转导的重要方法,可持续有效地抑制靶基因的表达。本研究通过构建 ERCC1 基因慢病毒干扰载体,将其转入宣威地区肺腺癌患者的癌细胞 XWCL05 中,探讨其对 ERCC1 蛋白表达的作用和对顺铂敏感性的影响,以期肺癌患者顺铂耐药逆转提供参考。

1 材料与与方法

1.1 材料 宣威肺腺癌细胞株 XWCL-05,由昆明医科大学第一附属医院建株,昆明医科大学第三附属医院肿瘤研究所提供。工具细胞 293T 由昆明医科大学第三附属医院肿瘤研究所提供。RPMI-1640 培养液、胰蛋白酶、胎牛血清、Lipofectamine 2000 试剂盒均购自 XXLIFE 公司。BCA 蛋白质定量试剂盒、细胞及组织总蛋白抽提试剂盒、Western blot 试剂盒、HRP 兔二抗等购自碧云天有限公司。其他试剂均为进口和国产分析纯。

1.2 慢病毒包装 利用公用网站按照 RNA 序列设计原则,设计多个 RNA 靶点序列,根据设计软件进行评估测定,选择最佳的动力学参数靶点进入后续实验流程。由上海吉凯基因公司合成含干扰序列的双链 DNA oligo,其两端含酶切位点粘端,直接连入酶切后的 RNA 干扰载体上。将连接好的产物转入制备好的细菌感受态细胞,对长出的克隆进行 PCR 鉴定,测序比对正确的克隆即为构建成功的目的质粒。将编码慢病毒颗粒的重组病毒颗粒及其两种辅助包装载体质粒分别进行高纯度无内毒素抽提,按 Lipofectamine 2000 试剂盒使用说明进行共转染 293T 细胞,转染后按说明书进行培养,之后收集、浓缩富含慢病毒颗粒的细胞上清液,在 293T 细胞中测定并标定病毒滴度。制作完成慢病毒包装产生的病毒液(ERCC1-RNAi-LV、ERCC1-negative-LV)由上海吉凯基因技术公司帮助合成包装。

1.3 慢病毒转染 将置于 -80°C 冰箱中保存的细胞株取出,培养、传代,取处于对数生长期的细胞进行实验。细胞分为 XWCL05 空白组(空白对照)、XWCL05-neg 组(转染空载体)、XWCL05-RNAi 组(转染 ERCC1-RNAi 慢病毒)。感染前 1 d,将 XWCL05 细胞接种于 6 孔板中,每孔接种细胞 1×10^5 ,于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱培养。24 h 后,开始病毒感染,加入 RPMI-1640 培养液每瓶 5 mL,再加入稀释病毒液 $100 \mu\text{L}$ (MOI 值相当于 10),培养 6 h 后换液,继续培养 72 h 后进行后续实验。

1.4 Western blot 检测 ERCC1 蛋白表达 病毒感染 3 d 后,分别取感染后的各组细胞,提取总蛋白并测定蛋白质浓度,BCA 试剂盒定量, $5 \times$ 十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液及蛋白裂解液将样品浓度定为 $3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。取 $20 \mu\text{g}$ 改为 $24 \mu\text{g}$ 或 $8 \mu\text{L}$ 蛋白质,与 $2 \times$ SDS 上样缓冲液 1:1 混合, 100°C 变性 10 min。置冰上 2 min,进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)胶电泳。电泳完毕后,切胶、转膜。聚偏氟乙烯(PVDF)膜用 20 mL 封闭液(含 5%脱脂奶粉的 PBST)室温孵育 1 h,弃封闭液,分别加入 ERCC1 多克隆抗体(1:1 000), 4°C 孵育过夜后洗膜,加入 HRP 标记的二抗(1:4 000)孵育后洗膜。加入 ECL 化学发光显色试剂,反应 5 min,X 线片曝光后显影、定影。以 β -actin 为内参。

1.5 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞增殖抑制率 分别

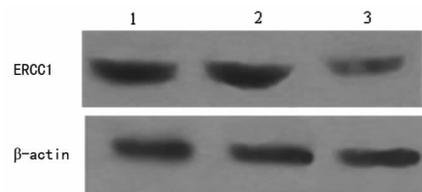
取对数生长期的 XWCL05 空白组、XWCL05-neg 组、XWCL05-RNAi 组细胞,其中,XWCL05 组为空白对照组。均以 $6 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于 96 孔板培养 24 h 至细胞单层铺满孔底,加入不同浓度梯度的顺铂。本研究设置 5 个浓度梯度:3、12.5、6.250、12.500、25.000、50.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每组均设 5 个复孔。 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 继续培养 48 h,每孔加入 $20 \mu\text{L}$ MTT 溶液,继续培养 4 h 后终止,除去孔内培养液。每孔加入 $150 \mu\text{L}$ 二甲基亚砜,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。用酶联免疫检测仪测量 490 nm 波长处吸光度(OD)值;重复 3 次,肿瘤细胞抑制率=(1-实验 OD 值/对照组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.6 流式细胞检测细胞凋亡情况 顺铂作用 48 h 后,将各组细胞用胰酶处理后悬浮,每组取至少 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 细胞,以 1 000 r/min 速度离心 5 min,弃培养液。PBS 洗 1 遍,加入 70%冷乙醇固定, 4°C 过夜。加入 PI 染色液 1 mL,置于 4°C 冰箱中避光染色,0.5 h 后用流式细胞仪检测,用相关软件分析数据,计算凋亡细胞所占的百分比。检测前先以人淋巴细胞作为标准品,调校仪器 CV 值在 3.0% 内。实验重复 3 次。

1.7 统计学处理 采用 SPSS15.0 软件处理数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行方差齐性检验,比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染前后 ERCC1 蛋白表达情况 XWCL05 组、XWCL05-neg 组、XWCL05-RNAi 组细胞中 ERCC1 蛋白的相对表达量分别为 0.57 ± 0.02 、 0.54 ± 0.03 、 0.11 ± 0.02 。XWCL05-RNAi 组细胞中 ERCC1 蛋白的相对表达量显著低于其余两组($P=0.00$),而 XWCL-05 空白组、XWCL05-neg 组差异无统计学意义($P=0.81$),见图 1。



1: XWCL05 空白组; 2: XWCL05-neg 组; 3: XWCL05-RNAi 组。

图 1 RNAi 转染对 ERCC1 蛋白表达的影响

2.2 RNAi 转染对顺铂药物敏感性的影响 MTT 法测定顺铂细胞毒作用分析显示,XWCL05-neg 组细胞对顺铂的 IC_{50} 为 $(14.21 \pm 3.72) \mu\text{g}/\text{mL}$,而 XWCL05-RNAi 组细胞对顺铂的 IC_{50} 为 $(5.93 \pm 2.76) \mu\text{g}/\text{mL}$;在一定范围内,相同浓度顺铂作用下 XWCL05-RNAi 组的增殖抑制率显著高于 XWCL05-neg 组,见图 2。

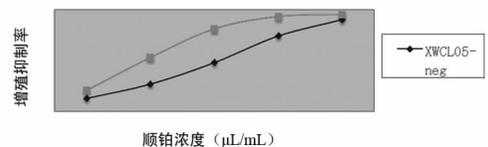


图 2 RNAi 转染对 DDP 药物敏感性的影响

2.3 RNAi 转染对细胞凋亡率的影响 流式细胞术检测 XWCL05 空白组、XWCL05-neg 组和 XWCL05-RNAi 组的细胞凋亡率分别为 $(1.81 \pm 0.31)\%$ 、 $(1.73 \pm 0.42)\%$ 和 $(16.04 \pm 3.62)\%$,XWCL05-RNAi 组凋亡率高于其余两组,差异有统计

学意义($P < 0.05$), XWCL05-neg 组和 XWCL05 空白组凋亡率差异无统计学意义($P > 0.05$)。而当用 $12.5 \mu\text{g/mL}$ 顺铂作用 48 h 后, XWCL05 空白组、XWCL05-neg 组和 XWCL05-RNAi 组的细胞凋亡率分别为 $(47.00 \pm 3.61)\%$ 、 $(51.00 \pm 3.43)\%$ 和 $(81.2 \pm 4.33)\%$, 可见顺铂作用后, 各组凋亡率均显著升高($P < 0.05$), XWCL05-RNAi 组凋亡率高于其余两组, 差异有统计学意义($P = 0.00$)。

3 讨论

铂类联合第 3 代化学治疗药物一直是肺癌化学治疗的标准方案, 有着极其广泛的应用^[6]。如何提高铂类药物敏感性, 减少耐药已经成为临床研究的热点。铂类药物的细胞毒作用主要是形成铂-DNA 加合物, 抑制 DNA 复制及转录, 导致 DNA 断裂和错误编码从而引起细胞死亡, 因此当 DNA 损伤修复能力增强时, 机体即会对顺铂产生耐药性^[7]。前期研究表明 ERCC1 的表达产物与 ERCC4(XPF) 形成杂合二聚体 ER-CC1-XPF, 该二聚体是一个特异性的连结 5' 端的核酸内切酶, 具有损伤识别和切除 5' 端的双重作用, 在 NER 中起到限速或调节的重要作用。ERCC1 高表达的情况下, 肿瘤细胞修复顺铂造成的损伤的功能可能增强。多项临床研究中也发现, 在 ERCC1 高表达的肺癌患者中采用铂类方案进行化学治疗, 其近期疗效和远期效果都欠佳^[8-10]。同时, 近期研究发现, ER-CC1 基因异构体^[11]的存在及人群中 ERCC1 基因的多态性^[12], 使得 ERCC1 导致的铂类耐药更加复杂。RNAi 技术是利用双链 RNA 高效、特异地降解细胞内同源信使 RNA (messenger RNA, mRNA), 从而阻断特定基因表达, 使细胞出现靶基因缺失的表型。采用 RNAi 技术可减少肿瘤耐药性, 增加肿瘤对放、化疗药物的敏感性, 这在其他肿瘤细胞的相关实验研究中也得到了证实^[13-15]。

本研究采用 ERCC1 表达较高的宣威肺腺癌细胞株 XWCL05, 构建 ERCC1 干扰基因, 通过慢病毒载体将其转入 XWCL05, 结果显示 XWCL05-RNAi 组细胞中 ERCC1 蛋白的相对表达量明显低于 XWCL05 组和 XWCL05-neg 组, 说明通过 RNAi 干扰 XWCL05 中 ERCC1 基因的表达, 在细胞层面上是切实可行的。在本研究中, 笔者发现, ERCC1 表达被干扰后, 宣威肺腺癌细胞株 XWCL05 的 IC_{50} 浓度明显降低, 说明通过抑制 ERCC1 表达能够明显提高 XWCL05 对顺铂药物的敏感性。流式细胞检测显示, 通过单用 XWCL05-RNAi 病毒或顺铂给药都能促进宣威肺腺癌细胞株 XWCL05 凋亡, 且在 XWCL05-RNAi 病毒联合顺铂的组别中, 其凋亡更为明显, 提示在细胞层面, 通过有效的 RNAi 转染能够提高宣威肺腺癌细胞 XWCL05 对顺铂的敏感性。

综上所述, 采用 RNAi 干扰技术能够有效地沉默肺癌细胞系中 ERCC1 的表达, 提高肺腺癌细胞对顺铂的敏感性。这一发现为肺癌治疗提供了新思路, 也为肺腺癌铂类耐药机制的认识提供了新的视角。

参考文献

[1] McHugh PJ, Spanswick VJ, Hartley JA. Repair of DNA

interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance[J]. *Lancet Oncol*, 2001, 2(8): 483-490.

- [2] 单利, 韩志刚, 刘莉, 等. 晚期非小细胞肺癌 ERCC1 和 BRCA1 的表达及与顺铂耐药性的临床研究[J]. *肿瘤*, 2009(6): 571-574.
- [3] 苏彤, 赵立军, 常文军, 等. ERCC1、XPD 和 BRCA1 基因多态与晚期非小细胞肺癌患者铂类药物化疗效果的相关性[J]. *第二军医大学学报*, 2010, 31(2): 117-122.
- [4] 周彩存, 徐妍, 苏春霞, 等. ERCC1 在非小细胞肺癌中表达及其临床意义[J]. *中国癌症杂志*, 2006, 16(8): 622-625.
- [5] 李高峰, 邓首军, 王巍伟, 等. 老年性非小细胞肺癌 ER-CC1 表达与新辅助化疗疗效的关系[J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(9): 2131-2133.
- [6] Otvos R, Szulkin A, Hillerdal CO, et al. Drug sensitivity profiling and molecular characteristics of cells from pleural effusions of patients with lung adenocarcinoma[J]. *Genes Cancer*, 2015, 6(3/4): 119-128.
- [7] 姚草原, 江涛, 韩晓黎, 等. 靶向 survivin 的 RNAi 联合顺铂抑制肺腺癌 A549 细胞增殖的实验研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2009, 34(2): 178-181.
- [8] Shiraiishi K, Kohno T, Tanai C, et al. Association of DNA repair gene polymorphisms with response to platinum-based doublet chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(33): 4945-4952.
- [9] Soria JC. ERCC1-tailored chemotherapy in lung cancer: the first prospective randomized trial[J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(19): 2648-2649.
- [10] Tan DS, Ng QS, Tan IB, et al. Truth about ERCC1 in lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(10): 162-164.
- [11] Friboulet L, Olaussen KA, Pignon JP, et al. ERCC1 isoform expression and DNA repair in non-small-cell lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(12): 1101-1110.
- [12] Lee MS, Liu CY, Su L, et al. Polymorphisms in ERCC1 and ERCC2/XPD genes and carcinogen DNA adducts in human lung[J]. *Lung Cancer*, 2015, 89(1): 8-12.
- [13] Foged C. siRNA delivery with lipid-based systems: promises and pitfalls[J]. *Curr Top Med Chem*, 2012, 12(2): 97-107.
- [14] Wang W, Li GF, Hong ZP, et al. The effect of Survivin antioligonucleotide on the apoptosis of Xuanwei lung adenocarcinoma cell[J]. *Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, 2011, 10(5): 252-255.
- [15] 邵军, 余文静, 肖斌, 等. RN Ai 基因沉默对消化系统肿瘤化疗敏感性的影响[J]. *重庆医学*, 2014, 43(12): 1471-1473.

(收稿日期: 2016-06-18 修回日期: 2016-07-06)