

Bcl-2 基因特异性小干扰 RNA 增强食管癌细胞辐射敏感性的实验研究

刘军叶 郭鹤 郭国祯

【摘要】 目的 探讨 Bcl-2 基因特异性的小干扰 RNA (siRNA) 对食管癌细胞的辐射增敏作用。方法 构建表达 Bcl-2 基因特异性 siRNA 的真核表达载体, 并借助脂质体将其转入食管癌细胞 EC109。Western blot 检测 Bcl-2 蛋白在食管癌细胞的表达, 流式细胞仪检测食管癌细胞的凋亡, 克隆形成实验和裸鼠移植瘤生长抑制实验检测 Bcl-2 基因特异性 siRNA 真核表达载体联合 X 射线照射对食管癌的生长抑制作用。结果 Bcl-2 基因特异性 siRNA 真核表达载体可抑制 Bcl-2 蛋白在 EC109 细胞中的表达, 诱导 EC109 细胞凋亡, 增强 X 射线照射对 EC109 细胞克隆形成的抑制能力, 增强 X 射线照射对 EC109 裸鼠移植瘤生长的抑制作用。结论 Bcl-2 基因特异性 siRNA 真核表达载体可显著增强食管癌细胞对 X 射线照射的敏感性, 具有良好的临床应用前景。

【关键词】 食管肿瘤; 基因, Bcl-2; 辐射耐受性; RNA 干涉

【中图分类号】 Q506 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2006)02-0110-03

Small interfering RNA specific to Bcl-2 enhances radiosensitivity of oesophageal cancer cells

LIU Jun-ye, GUO Yao, GUO Guo-zhen

(Department of Radiation Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

【Abstract】 Objective To explore the effects of small interfering RNA (siRNA) specific to Bcl-2 gene on radiosensitivity of oesophageal cancer cells. **Methods** The eukaryotic expression vector of Bcl-2 gene siRNA was constructed and introduced into oesophageal cancer cells EC109 by lipofectamine. Bcl-2 protein expression in EC109 cells was detected by Western blot. Flow cytometry was employed to evaluate apoptosis of EC109. Clone forming assay and nude mice xenograft assay were used to determine the inhibitory effects of X radiation combined with Bcl-2 gene specific siRNA. **Results** Western blot analysis demonstrated that eukaryotic expression vector of Bcl-2 gene siRNA successfully suppressed Bcl-2 protein expression in EC109 cells. Bcl-2 gene siRNA could induce apoptosis of EC109 cells, enhance the inhibitory effects of X radiation on clone forming ability of EC109 cells and xenograft growth in nude mice. **Conclusion** The eukaryotic expression vector of Bcl-2 gene siRNA could enhance the radiosensitivity of oesophageal cancer cells and can be used as a powerful adjunct to conventional radiotherapy.

【Key words】 Esophageal neoplasma; Gene, Bcl-2; Radiosensitivity; RNA interference

放疗是治疗食管癌的主要方法之一, 包括体外照射和食管内放射性支架置入等均已成功用于食管癌患者。临床发现, 单纯放疗疗效较差。近年来, 一些放疗新技术逐渐应用于临床, 也有学者尝试联合使用辐射增敏剂或小剂量化疗药物, 使食管癌局部控制率有了一定的提高。但是, 国内食管癌患者 5 年生存率仅为 8%~16%。本研究拟利用 RNA 干涉 (RNA interference, RNAi) 技术降低 Bcl-2 蛋白在食管

癌细胞的表达, 并观察 Bcl-2 基因小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 对食管癌细胞的辐射增敏作用, 为探索新的食管癌治疗方法提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞系与主要试剂

人食管癌细胞系 EC109 为我室保存, 在含 10% 小牛血清的 RPMI1640x 细胞培养液中常规培养或传代。转染试剂 Lipofectamine 2000 为 Invitrogen 公司产品, Bcl-2 蛋白单克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品, β -actin 单克隆抗体购于 Sigma 公司,

作者单位: 710032 西安, 第四军医大学军事预防医学系放射医学教研室

通讯作者: 郭国祯 (E-mail: guozheng@hotmail.com)

辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购于武汉博士德公司。siRNA 真核表达载体 pSilencer 3.1-H1 为 Ambion 公司产品。其他分子生物学及免疫学试剂均为 Amersham Biosciences 或 Sigma 公司产品。

1.2 动物与照射

17~20g 的 5 周龄雄性 BALB/c 裸鼠购于我校动物中心。X 射线照射仪购自日本岛津公司。放射治疗时,小鼠置于特制的有机玻璃盒中固定体位,并用铅室屏蔽受照射肿瘤以外的躯体。

1.3 载体构建

用限制性内切酶 BamH I 和 Hind III 线性化 pSilencer 3.1-H1 质粒载体。针对 Bcl-2 的特异性 siRNA 由两条寡核苷酸退火形成^[1],正向寡核苷酸的序列为 5'-GATCCCCGGAGGCTGGGATGCCTTTTTCAAGAGAAAAGGCATCCCAGCCTCCGTTTTTTTGAAA-3',反向寡核苷酸的序列为 5'-AGCTTTTCCAAAAA-CGGAGGCTGGGATGCCTTTCTCTTGAAAAGGCATCCCAGCCTCCGGG-3'。寡核苷酸的合成委托上海生工生物技术公司进行。两条寡核苷酸退火形成具有黏端的双链后直接与线性化的 pSilencer 3.1-H1 进行连接,生成重组质粒 pSilencer 3.1-bcl-2,并经 DNA 测序证实。

1.4 细胞转染

借助脂质体 Lipofectamine 2000 将 pSilencer 3.1-bcl-2 或 pSilencer 3.1-H1 转入食管癌细胞 EC109。收获对数生长中期的 EC109 细胞,并按 5×10^5 细胞/孔接种入 6 孔板中。继续培养 24h 后,按照 Lipofectamine 2000 说明书进行细胞转染。转染 48 或 72h 后,收获细胞进行 X 射线照射或 Western blot 检测。

1.5 Western blot

参照文献 2 进行。收获转染 72h 后的食管癌 EC109 细胞,制备细胞总蛋白并进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。用电转移的方法将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上,以 Bcl-2 蛋白单克隆抗体为一抗、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 为二抗检测 Bcl-2 蛋白的表达。Western blot 信号用增强化学发光试剂盒进行检测,以 β -actin 为内参照。

1.6 细胞凋亡检测

参照文献 3。细胞转染 72h 后,每孔加入 5 μ l 磷脂结合蛋白 V-异硫氰酸荧光素并继续培养 10min。用含 1.5 mmol/L CaCl₂ 的培养液洗涤细胞 2 次,收获细胞并重新悬于 490 μ l Tris-HCl 缓冲液中。

加入 5 μ l 碘化丙啶并在 4 $^{\circ}$ C 孵育 10min。用流式细胞仪检测样品并计算凋亡指数。

1.7 克隆形成实验

细胞转染 48h 后,收获细胞并按照 300~500 细胞/孔重新接种于 96 孔板中,并继续培养 24h。对细胞进行 X 射线照射,剂量为 2 Gy。照射后的细胞继续按照常规培养 10~14d,吸弃培养液,以吉姆萨染液染色后显微镜下计数细胞克隆数,并计算每孔的克隆形成率。

1.8 裸鼠移植瘤实验

用裸鼠移植瘤模型实验检测 Bcl-2 基因特异性 siRNA 对食管癌细胞的辐射增敏作用。收获对数生长中期的 EC109 细胞并按照常规方法接种于裸鼠皮下,制备成裸鼠移植瘤模型。接种 3d 后,将动物分为 8 组(每组 8 只),第 1 组为 Bcl-2 基因特异性 siRNA 联合放射治疗组,通过尾静脉注射 pSilencer 3.1-bcl-2 与脂质体的混合物 0.4ml (DNA 终质量浓度为 2 mg/ml),连续 7d,每日联合放射治疗 1 次(2 Gy);第 2 组为对照质粒联合放射治疗组,通过尾静脉注射 pSilencer 3.1-H1 与脂质体的混合物 0.4ml (DNA 终质量浓度为 2 mg/ml),连续 7d,每日联合放射治疗 1 次(2 Gy);第 3 组为 Bcl-2 特异性 siRNA 治疗组,通过尾静脉注射 pSilencer 3.1-bcl-2 与脂质体的混合物 0.4 ml (DNA 终质量浓度为 2 mg/ml),连续 7d;第 4 组为对照质粒治疗组,通过尾静脉注射 pSilencer 3.1-H1 与脂质体的混合物 0.4ml (DNA 终质量浓度为 2 mg/ml),连续 7d;第 5 组为放射治疗组,每日放射治疗 1 次(2 Gy),连续 7d;第 6 组为脂质体对照组,通过尾静脉注射 0.4ml 脂质体,连续 7d;第 7 组为生理盐水对照组,通过尾静脉注射 0.4 ml 生理盐水,连续 7d;第 8 组为未治疗对照组,动物不接受任何治疗作为对照。治疗结束后 3d,处死小鼠,剥离肿瘤并称重,并计算各组肿瘤抑制率=(第 8 组瘤重-实验组瘤重)/第 8 组瘤重。

1.9 统计学处理

实验数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 统计软件包进行统计学处理,结果以 $P < 0.05$ 判断为有意义。

2 结果

2.1 siRNA 降低 Bcl-2 蛋白在 EC109 细胞的表达

Western blot 检测 siRNA 对 Bcl-2 蛋白在 EC109 细胞的表达的结果见图 1。结果显示, Bcl-2 蛋白在 EC109 细胞中呈阳性表达; 将能够表达 Bcl-2 基因特异性 siRNA 的真核表达载体 pSilencer3.1-bcl-2 转入 EC109 细胞后, Bcl-2 蛋白的表达水平明显降低。

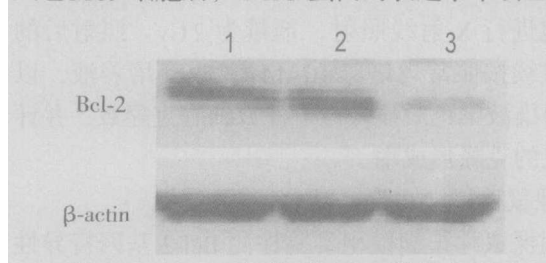


图 1 Western blot 检测 Bcl-2 蛋白在 EC109 细胞中的表达(β -actin 为内参照)

图中, 1 为 EC109 细胞; 2 为转染 pSilencer 3.1-H1 的 EC109 细胞; 3 为转染 pSilencer 3.1-bcl-2 的 EC109 细胞

2.2 Bcl-2 基因特异性 siRNA 诱导 EC109 细胞凋亡

流式细胞仪检测 Bcl-2 基因特异性 siRNA 诱导 EC109 细胞凋亡的结果见图 2。结果显示, 在正常培养条件下, EC109 细胞凋亡指数为 0.05; 转染空载体 pSilencer 3.1-H1 对 EC109 的凋亡无明显影响; 转染 pSilencer 3.1-bcl-2 后, EC109 细胞的凋亡指数显著升高至 0.246($t = 6.334, P < 0.01$)。

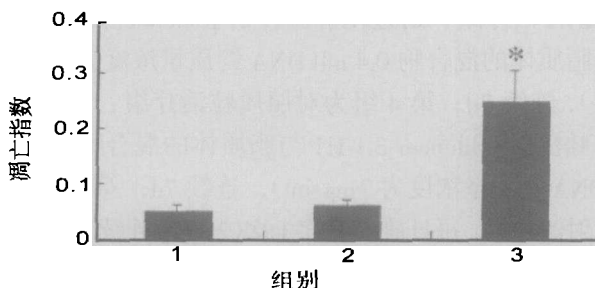


图 2 Bcl-2 基因特异性 siRNA 对 EC109 细胞凋亡指数的影响

图中, 1 为 EC109 细胞组; 2 为转染 pSilencer 3.1-H1 的 EC109 细胞组; 3 为转染 pSilencer 3.1-bcl-2 的 EC109 细胞组。*: 与 EC109 细胞组相比, $P < 0.01$

2.3 Bcl-2 基因特异性 siRNA 联合 X 射线照射降低 EC109 细胞的克隆形成能力

体外克隆形成实验结果见图 3。结果显示, X 射线照射可在一定程度上降低 EC109 细胞的克隆形成率($t = 2.859, P < 0.05$); 转染空载体 pSilencer 3.1-H1 对 X 射线照射效果无明显影响; 将 pSilencer 3.1-bcl-2 转染 EC109 后, X 射线照射对转染细胞克隆形成率的抑制程度显著升高, 与空载体转染组相比差异显著($t = 3.817, P < 0.01$)。

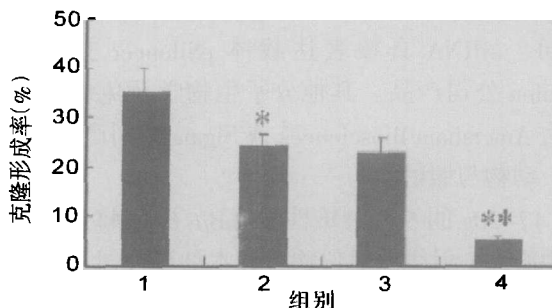


图 3 Bcl-2 基因特异性 siRNA 联合 X 射线照射对 EC109 细胞克隆形成能力的影响

图中, 1 为 EC109 细胞组; 2 为 EC109 细胞+X 射线照射组; 3 为 EC109 细胞+pSilencer 3.1-H1+X 射线照射组; 4 为 EC109 细胞+pSilencer 3.1-bcl-2+X 射线照射组。*: 与第 1 组相比, $P < 0.05$; **: 与第 2 组和第 3 组相比, $P < 0.01$

2.4 Bcl-2 基因特异性 siRNA 增强 X 射线照射对 EC109 裸鼠移植瘤的生长抑制能力

裸鼠移植瘤实验结果见图 4。结果显示, 生理盐水、脂质体和空载体 pSilencer 3.1-H1 对 EC109 细胞的移植瘤生长无明显影响; X 射线照射可抑制移植瘤的生长, Bcl-2 基因特异性 siRNA 的真核表达载体 pSilencer 3.1-bcl-2 也可明显抑制移植瘤的生长($t = 3.974, P < 0.01$)。X 射线照射联合 pSilencer 3.1-H1 注射与单纯应用照射相比, 肿瘤的抑制率无显著差异($t = 1.396, P > 0.05$)。当 X 射线照射联合 pSilencer 3.1-bcl-2 注射时, 肿瘤的抑制率显著升高, 与单纯 X 射线照射组和单纯 pSilencer 3.1-bcl-2 治疗组相比, 差异均为显著($t = 5.258, P < 0.01$)。由此提示, Bcl-2 基因特异性 siRNA 本身可抑制食管癌细胞裸鼠移植瘤的生长, 当与 X 射线照射联合应用时, 可显著增强 X 射线照射的治疗效果。

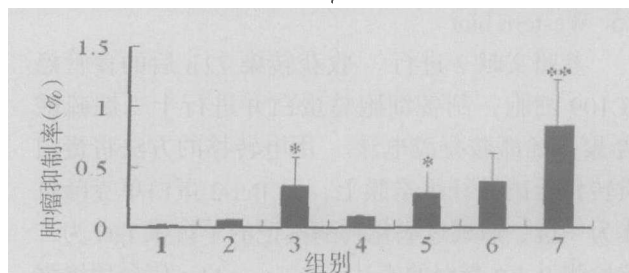


图 4 Bcl-2 基因特异性 siRNA 与 X 射线照射对 EC109 裸鼠移植瘤的抑制率

图中, 1 为生理盐水对照组; 2 为脂质体对照组; 3 为 X 射线照射组; 4 为 pSilencer 3.1-H1 对照组; 5 为 pSilencer 3.1-bcl-2 治疗组; 6 为 pSilencer 3.1-H1+X 射线照射组; 7 为 pSilencer 3.1-bcl-2+X 射线照射组。*: 与第 1 组、第 2 组和第 4 组相比, $P < 0.01$; **: 与第 3 组、第 5 组和第 6 组相比, $P < 0.01$

3 讨论

RNAi 是一种由双链 RNA 介导引起的特异性基因沉默现象, 引发 RNAi 的双链 RNA 被成为 siRNA。在细胞内, siRNA 通过碱基互补作用识别并结合相应的靶 mRNA 链, 引导核酸酶对该 mRNA 链的切割、消化, 最终导致靶基因转录后沉默^[4]。新近的研究表明, 将体外人工合成的 siRNA 导入细胞后, 也可特异性抑制相应基因的表达。由此, RNAi 作为一种干扰或封闭基因表达的工具而被广泛应用于实验研究中^[5]。研究人员已经成功地利用 RNAi 技术降低了多种分子在肿瘤细胞中的表达, 包括癌基因产物、膜受体、凋亡相关分子、DNA 修复相关分子以及某些信号转导分子等, 实验采用的肿瘤模型包括有宫颈癌、肺癌、肝癌、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、胆囊癌、黑色素瘤、胃癌等^[6]。在本研究中, 我们采用 RNAi 技术成功地降低了 Bcl-2 蛋白在食管癌细胞 EC109 中的表达, 再次证实了 RNAi 的有效性。

Bcl-2 蛋白是一个重要的抗凋亡分子, 它通过稳定线粒体膜而防止细胞色素 C 的释放, 也可抑制多种半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶分子的活化, 最终阻止凋亡的发生。研究表明, 包括食管癌的许多肿瘤高表达 Bcl-2 蛋白^[7,8], 而且 Bcl-2 蛋白与肿瘤细胞对化疗和放疗的抵抗性有关^[9], 是一个良好的抗肿瘤分子靶标。利用针对 Bcl-2 基因的特异性反义寡核苷酸可诱导肿瘤细胞凋亡, 并增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 但临床试验显示, Bcl-2 基因特异性反义寡核苷酸用于非霍奇金淋巴瘤治疗时效果有限。进一步研究表明, 仅一半患者体内用反义寡核苷酸降低了 Bcl-2 蛋白在肿瘤组织的表达, 这可能与寡核苷酸抑制效率低、稳定性差有关^[10]。我们采用真核表达载体介导 Bcl-2 基因特异性 siRNA 的表达, 成功地降低了 Bcl-2 蛋白在 EC109 细胞的表达, 并诱导了 EC109 细胞的凋亡。裸鼠移植瘤实验也表明, 单纯用表达 Bcl-2 基因特异性 siRNA 的真核表达载体, 可显著抑制 EC109 移植瘤的生长。我们认为, 真核表达载体由于分子质量大, 其稳定性明显优于寡核苷酸; 同时, 由于利用了 RNAi 技术, siRNA 真核表达载体也具有抑制靶基因的高效性。

本研究的体外实验显示, EC109 细胞转染表

达 Bcl-2 基因特异性 siRNA 的真核表达载体后, 对 X 射线照射的敏感性显著升高, 克隆形成能力明显下降。体内实验显示, siRNA 真核表达载体本身具有抑制 EC109 裸鼠移植瘤生长的作用。当 Bcl-2 基因特异性 siRNA 真核表达载体与 X 射线照射联合应用时, 移植瘤的生长抑制程度显著高于二者分别单用, 并明显高于二者分别单用时的效果总和。我们认为, Bcl-2 蛋白在 EC109 细胞的表达降低后, 细胞对凋亡信号的阈值明显降低; 当给予 X 射线照射这个凋亡诱导信号时, 细胞的死亡率可显著升高; 由于降低 Bcl-2 蛋白表达已经增加了细胞的凋亡, 因此, 联合应用 Bcl-2 基因特异性 siRNA 和 X 射线照射取得了最大程度的肿瘤抑制率。

综上所述, 本研究成功利用 RNAi 技术降低了 Bcl-2 蛋白在食管癌细胞 EC109 中的表达, 并由此显著增强了食管癌细胞对 X 射线照射的敏感性, 为 Bcl-2 基因特异性 siRNA 应用于食管癌治疗提供了一定的理论依据, 也为食管癌辐射增敏剂的开发提供了新思路。

参 考 文 献

- 1 Fu GF, Lin XH, Han QW, et al. RNA interference remarkably suppresses bcl-2 gene expression in cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4(8): 822-829.
- 2 Shi Y, Zhai H, Wang X, et al. Ribosomal proteins S13 and L23 promote multidrug resistance in gastric cancer cells by suppressing drug-induced apoptosis. *Exp Cell Res*, 2004, 296(2): 337-346.
- 3 Sun L, Shi Y, Guo C, et al. Regulation of multidrug resistance by MGR1-antigen in gastric cancer cells. *Tumour Biol*, 2005, 27(1): 27-35.
- 4 Bi F, Liu N, Fan D. Small interfering RNA: a new tool for gene therapy. *Curr Gene Ther*, 2003, 3(5): 411-417.
- 5 Leung RK, Whittaker PA. RNA interference: From gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol Ther*, 2005, 107(2): 222-239.
- 6 Shi Y, Liu Z, Zhang D, et al. RNA interference: A new therapeutic strategy of cancer. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4(8): 830-831.
- 7 Kirkin V, Joos S, Zornig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1644(2-3): 229-249.
- 8 McCabe ML, Dlamini Z. The molecular mechanisms of oesophageal cancer. *Int Immunopharmacol*, 2005, 5(7-8): 1113-1130.
- 9 O'Neill J, Manion M, Schwartz P, et al. Promises and challenges of targeting Bcl-2 anti-apoptotic proteins for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1705(1): 43-51.
- 10 Waters JS, Webb A, Cunningham D, et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of bcl-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, 2000, 18(9): 1812-1823.

(收稿日期: 2006-01-11)