

# 环氧合酶-2 特异性 siRNA 真核表达质粒对 HT-29 细胞生长的影响

王 磊<sup>1</sup>, 陈卫昌<sup>1</sup>, 杨吉成<sup>2</sup>

Effect of Eukaryotic Expression Plasmid for Cyclooxygenase-2 Specific siRNA on Growth of HT-29 Cells in vitro

WANG Lei<sup>1</sup>, CHEN Wei-chang<sup>1</sup>, YANG Ji-cheng<sup>2</sup>

1. Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Soochow 215006, China; 2. Department of Cellular and Molecular Biology, Soochow University

Corresponding Author: CHEN Wei-chang, E-mail: weichangchen@126.com

**Abstract :Objective** To investigate the effect of the eukaryotic expression plasmid of specific small interfering RNA (siRNA) against COX-2 gene on the COX-2 expression and growth of human colon cancer HT-29 cells. **Methods** The COX-2 siRNA template DNA sequence for short hairpin RNA (shRNA) was designed and synthesized. The recombinant plasmid (pshCOX-2) was transfected into HT-29 cells. The effect of the recombinant plasmid on the COX-2 expression of human colon cancer HT-29 cells was detected by RT-PCR and Western blot. Changes of the cell growth activity in response to transfected plasmid were evaluated by MTT assay and FCM. The methods of RIA and ELISA were respectively used to estimate the content of PGE<sub>2</sub> and VEGF in supernatant. **Results** It was confirmed by restrictive enzyme digestion and sequence analysis that the recombinant plasmid was cloned and the aim sequence was obtained. The COX-2 expression of HT-29 cells was inhibited at mRNA and protein levels 72 hours after transfected with the recombinant pshCOX-2. The growth of HT-29 cells was inhibited and the apoptotic ratio was significantly highly in COX-2 siRNA transfected group than those in control groups ( $P < 0.05$ ). The content of PGE<sub>2</sub> and VEGF in supernatant decreased significantly by transfecting pshCOX-2. **Conclusion** COX-2 siRNA expression plasmid pshCOX-2 successfully constructed can inhibit the expression of COX-2 gene, proliferation and synthesis of PGE<sub>2</sub> and VEGF of HT-29 cells.

**Key words** :Cyclooxygenase-2; siRNA; RNA interference; Eukaryotic expression plasmid; Colon cancer

**摘 要**:目的 探讨环氧合酶-2(COX-2)特异性小干扰 RNA(siRNA)真核表达质粒对人结肠癌 HT-29 细胞 COX-2 表达和生长的影响。方法 设计短发夹结构的 COX-2 siRNA 对应模版 DNA 序列,构建重组质粒 pshCOX-2。将重组质粒转染人结肠癌 HT-29 细胞,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、Western 印迹分别从 mRNA 和蛋白水平检测 COX-2 表达。用四氮唑盐(MTT)法和流式细胞仪观察 COX-2 表达被抑制后细胞的生长情况,放射免疫法(RIA)和 ELISA 法分别检测培养上清中 PGE<sub>2</sub> 和 VEGF 的含量变化。结果 酶切及测序证实质粒 pshCOX-2 构建成功。转染重组质粒 72 h 后可以显著抑制 HT-29 细胞 COX-2 mRNA 和蛋白表达( $P < 0.05$ ),细胞生长受抑,凋亡细胞数显著增加( $P < 0.05$ ),细胞 PGE<sub>2</sub> 和 VEGF 的产生受抑制( $P < 0.05$ )。结论 成功构建的 COX-2 siRNA 真核表达质粒 pshCOX-2 通过抑制人结肠癌 HT-29 细胞 COX-2 基因表达,从而抑制细胞生长、PGE<sub>2</sub> 合成和 VEGF 的产生。

**关键词**:环氧合酶-2; siRNA; RNA 干扰; 真核表达质粒; 结肠癌

中图分类号:R735.350.5 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2008)10-0705-06

## 0 引言

RNA 干扰(RNA interference RNAi)是近年迅速发展起来的一项新的基因功能研究手段,它是利用与靶基因同源的小片段双链 RNA(dsRNA),即小干扰 RNA(siRNA),转染靶细胞,促进靶基因 mRNA 降解,从而特异性诱导转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)<sup>[1]</sup>。但化学

收稿日期:2007-08-07;修回日期:2008-06-03

基金项目:江苏省 135 重点医学人才基金资助项目(RC2007076)

作者单位:1. 215006 江苏苏州大学附属第一医院消化科;2. 苏州大学医学院细胞与分子生物学教研室

通信作者:陈卫昌, E-mail: weichangchen@126.com

作者简介:王磊(1973-),男,博士,主治医师,主要从事消化系统肿瘤的研究

合成 siRNA 成本太大且作用时间短暂,一般仅为数个细胞周期,不能完全满足长期实验研究的要求。2002 年 Brummelkamp 等<sup>[2]</sup>首次报道,将 siRNA 所对应的模板 DNA 双链序列克隆入质粒转染细胞, DNA 模板在细胞内转录成小片段发夹状 RNA (shRNA),这种 shRNA 与化学合成的 siRNA 具有相同的基因封闭作用,但作用时间可以长达 2 个月。因此我们构建针对结肠癌中高表达基因 COX-2 的 siRNA 表达质粒,将其转染入结肠癌 HT-29 细胞,观察其对 HT-29 细胞 COX-2 表达和生长的影响,为探讨结肠癌中 COX-2 基因的功能提供新的手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

总 RNA 提取试剂和 RT-PCR 试剂盒购于 Fermentas 公司;转染试剂 lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 购自 Invitrogen 公司;COX-2 多克隆抗体购于 Cayman Chemical 公司;COX-2 引物及内参  $\beta$ -actin 引物由上海生工程公司合成,COX-2 siRNA 转录模版及质粒 pGPH1-GFP-Neo 由上海吉玛公司提供。人 VEGF ELISA 试剂盒购于上海精美公司,PGE<sub>2</sub> 测定试剂盒由苏州大学血液病研究所提供。

### 1.2 COX-2 siRNA 序列的设计

按照 siRNA 设计原则<sup>[3-4]</sup>,利用 Ambion 公司提供的“siRNA Target Finder and Design Tools”,根据 NCBI 数据库中 COX-2 基因(Gene Bank 编号 NM000963)cDNA,设计了针对 COX-2cDNA 1 689 ~ 1 707 位置碱基序列的 19nt 的 DNA 片段,经 Blast Search 检索确认与 COX-2 以外的人类已知基因序列无同源性。序列如下:sense 5'-GGA CTT ATG GGT AAT GTT A-3',anti-sense 5'-TAA CAT TAC CCA TAA GTC C-3'。

### 1.3 COX-2 siRNA 表达质粒的构建和鉴定

1.3.1 shRNA 转录模版 DNA 的设计 根据前面设计的 siRNA 序列,设计总长度为 58nt 的模版 DNA 链 2 条,由上海吉凯公司合成。其顺序为 Bbs

酶切位点、19 nt 正义序列、9 nt loop 接头序列、19 nt 反义序列、RNA 聚合酶 中止子(6 个 T)、BamH 酶切位点。其序列为:正义:5'-CAC CGG ACT TAT GGG TAA TGT TAT TCA AGA GAT AAC ATT ACC CAT AAG TCC TTT TTT G-3',反义:3'-CCT GAA TAC CCA TTA CAA TAA GTT CTC TAT TGT AAT GGG TAT TCA GGA AAA AAC CTA G-5'。

1.3.2 质粒 pshCOX-2 的构建 pGPH1-GFP-Neo 质粒,其 RNA 聚合酶 启动子为人 H1 启动子,抗

性标记为卡那霉素和新霉素。先将两条模版单链退火处理。对于 pGPH1-GFP-Neo 质粒进行 Bbs 和 BamH 双酶切后电泳,胶回收线性化质粒,利用 T4 DNA 连接酶把退火的 shRNA 模版 DNA 定向克隆至 pGPH1-GFP-Neo 质粒 H1 启动子之后,构建成重组体质粒。将重组体转化大肠杆菌 DH5<sup>+</sup>,筛选卡那霉素抗性克隆,大量扩增摇菌后,抽提质粒纯化,命名为 pshCOX-2。

1.3.3 重组子的鉴定 利用限制性内切酶 Bbs 和 BamH 将质粒 pshCOX-2 双酶切成两条片段,电泳观察插入子及载体片段的分子量。重组质粒序列测定由上海英骏生物技术有限公司完成。

### 1.4 细胞培养及转染

人结肠癌细胞株 HT-29 购自于中国科学院上海细胞生物研究所,细胞接种于含有 10% 灭活胎牛血清、1% 谷胺酰胺和 1  $\times$  抗生素混和液的 McCoy's 5A (购于 Gibco 公司)培养液中,置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养。在 6 孔板上加入 4  $\times$  10<sup>5</sup> 个/孔 HT-29 细胞,在无抗生素含血清培养液中孵育过夜,质粒以每孔 5  $\mu$ g 与 250  $\mu$ l 无血清培养液配制成混和液,以及 12.5  $\mu$ l Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 与 250  $\mu$ l 无血清培养液配制成混和液,两种混合液分别于室温下孵育 5 min 后混和,再于室温孵育 20 min 后加入无血清和抗生素细胞培养液中,6 h 后更换为全培养液,48 h 后于荧光显微镜下观察转染情况。阴性 siRNA 质粒为阴性对照组,PBS 液代替质粒为空白组。

### 1.5 RT-PCR 测定 COX-2 mRNA

转染 24、48、72 h 和 1 周后分别收集 6 孔板中各组细胞,RT-PCR 法扩增各组细胞中 COX-2 mRNA,COX-2 上游引物 5'-TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA ATT GCT-3',下游引物为 5'-AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT-3'。反应条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 2 min,95  $^{\circ}$ C 变性 30 s,60

退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 32 循环,产物最后 72  $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。使用  $\beta$ -actin 作为内参,上游引物为 5'-GAAACTACCTTCAACTCCATC-3',下游引物为 5'-CGA GGCCA GGA TGGAGCCGCC-3'。扩增的 COX-2 产物长度为 305 bp, $\beta$ -actin 长度为 219 bp。取扩增产物 10  $\mu$ l,加溴酚蓝 1  $\mu$ l,在含溴乙锭的 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳分离后,凝胶扫描仪进行电泳条带强度分析,使用 BioCaptMW 软件测出 COX-2/ $\beta$ -actin 的值作为表达水平的参数。

### 1.6 Western blot 检测 COX-2 蛋白表达

收集各组的 HT-29 细胞 1  $\times$  10<sup>7</sup>,提取总蛋白,上样经 10% SDS-PAGE 分离胶和 5% 的 SDS-

PAGE 浓缩胶,分别与 90 V 恒压电泳约 2 h,60 V 恒压电泳约 90 min,再与 110 V 恒压 1.5 h 电转移至硝酸纤维素膜上,随后封闭过夜。用兔抗人 COX-2 蛋白多克隆抗体(1 1 000)加在中室温下杂交 2 h,洗膜后加入羊抗兔二抗 IgG(1 2 000)抗体,室温下摇动 1 h。ECL 显色,暗室曝光 X 线片,胶片进行拍照,记录结果。

1.7 MTT 法检测转染重组质粒对 HT-29 细胞生长的影响

对数生长期的 HT-29 细胞以  $1 \times 10^4$ /孔接种于 96 孔板中常规培养 24 h 后,加上转染因素,每组设 3 个复孔,并设空白对照组,阴性对照组,继续培养 1~7 d,每孔分别加入 5 g/L 的 MTT 10  $\mu$ l,37  $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后,每孔均加入 10 %SDS-Cl 100  $\mu$ l,轻微振荡使紫蓝色沉淀溶解,用酶标仪测定 A570 nm。

1.8 流式细胞仪检测重组质粒对 HT-29 细胞凋亡的影响

对数生长期的 HT-29 细胞以  $4 \times 10^5$ /孔接种于 6 孔板中常规培养 24 h 后,加上转染因素,设空白对照组,阴性对照组。72 h 后收取细胞,PBS 洗涤 2~3 次,70 %酒精固定后,流式细胞仪检测细胞凋亡的变化。

1.9 RIA 法测定细胞上清中 PGE<sub>2</sub> 含量

对数生长期的 HT-29 细胞以  $4 \times 10^5$ /孔接种于 6 孔板中常规培养 24 h 后,加上转染因素,设空白对照组,阴性对照组。分别于 24、48 和 72 h 后收取细胞培养液上清,放免法测定 PGE<sub>2</sub> 含量(以 pg/ml 表示)。

1.10 ELISA 法测定细胞上清中 VEGF 含量

对数生长期的 HT-29 细胞以  $4 \times 10^5$ /孔接种于 6 孔板中常规培养 24 h 后,加上转染因素,设空白对照组,阴性对照组。分别于 24、48 和 72 h 后收取细胞培养液上清,ELISA 法测定 VEGF 含量(以 pg/ml 表示)。

1.11 统计学方法

所有数据采用 SAS 8.0 统计软件包进行统计学分析,数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 COX-2 siRNA 真核表达质粒的鉴定

pshCOX-2 经过酶切后电泳,可观察到在 5 000 bp 和 100 bp 左右各有一条带,符合 pGPH1-GFP-Neo 质粒(5 075 bp)及插入的 shRNA 片段(58 bp)的特征,见图 1。测序证实与设计的短发夹结构的 COX-2 siRNA 对应模版 DNA 序列相同,表明重组质粒中已经含有可以转录 siRNA 模版 DNA 片段。

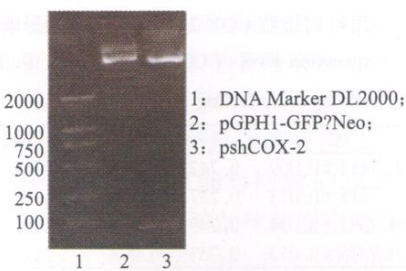
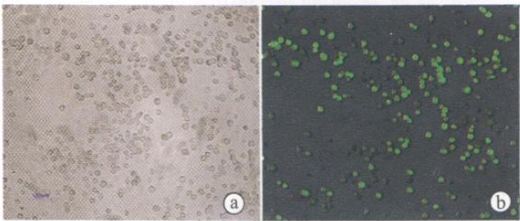


图 1 重组质粒的限制性酶切产物电泳结果

Fig 1 The electrophoresis results of the recombinant plasmid by the restrictive enzyme digestion

2.2 重组质粒转染细胞观察

质粒中含有编码 GFP 的基因,故转染细胞在荧光显微镜下可激发出绿色荧光,见图 2,转染效率可以达到 80 %以上,证实重组质粒在 HT-29 细胞内已经有表达。



a: light microscopic results (Magnification  $\times 100$ ); b: fluorescence microscopic results in the same visual field (Magnification  $\times 100$ )

图 2 人结肠癌 HT-29 的转染情况

Fig 2 The microscopic results of HT-29 cells by transfecting the pshCOX-2

2.3 转染重组质粒对 COX-2 mRNA 表达的影响

空白对照组和阴性质粒转染组在转染后 24、48、72 h 和 1 周时细胞 COX-2 mRNA 表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),转染重组质粒的 HT-29 细胞与空白对照组相比在转染 24 和 48 h 后 COX-2 mRNA 表达未受明显影响,而 72 h 和 1 周时 HT-29 细胞的 COX-2 mRNA 表达水平显著低于空白对照及阴性对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1、图 3。结果表明转染重组真核表达质粒可以显著抑制 HT-29 细胞 COX-2 mRNA 表达。

2.4 转染重组质粒对细胞 COX-2 蛋白表达的影响

转染重组质粒 72 h 后,提取各组 HT-29 细胞蛋白运用 Western blot 检测 COX-2 蛋白表达,见图 4,结果发现重组质粒转染组细胞的 COX-2 蛋白表达显著低于空白对照和阴性对照组,结果与 RT-PCR 一致。

2.5 MTT 法检测重组质粒对 HT-29 细胞生长的影响

表 1 重组质粒对细胞 COX-2 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Expression level of COX-2 mRNA in the HT-29 cells by transfecting pshCOX-2 ( $\bar{x} \pm s$ )			
Times	C	NC	T
24 h	0.7452 $\pm$ 0.009	0.7421 $\pm$ 0.015	0.7268 $\pm$ 0.012
48 h	0.7318 $\pm$ 0.013	0.7377 $\pm$ 0.005	0.6992 $\pm$ 0.019
72 h	0.7382 $\pm$ 0.034	0.7401 $\pm$ 0.013	0.2639 $\pm$ 0.025 *
1 W	0.7375 $\pm$ 0.013	0.7393 $\pm$ 0.005	0.2639 $\pm$ 0.060 *

C:Control;NC:Negative control;T:pshCOX-2;There were significant differences in the expression of COX-2 mRNA between group C and T, \*  $P < 0.05$

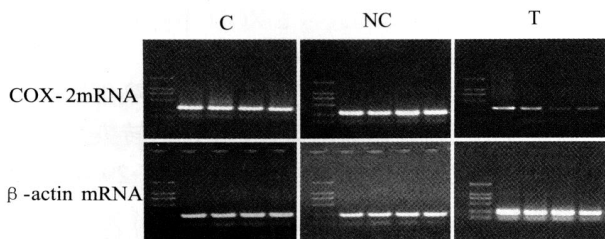


图 3 转染重组质粒对细胞 COX-2 mRNA 表达影响的电泳图

Fig 3 The electrophoresis results of COX-2 mRNA in the HT-29 cells by transfecting pshCOX-2

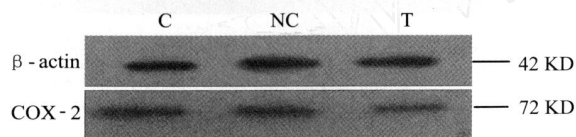


图 4 转染重组质粒对 COX-2 蛋白表达的影响

Fig 4 The western blot results of COX-2 protein in the HT-29 cells by transfecting pshCOX-2

MTT 法检测各组细胞的 A 值,见表 2,图 5,转染重组质粒后与空白和阴性对照相比,在 24 h 时细胞生长未受到明显影响 ( $F = 0.14, P = 0.8721$ ),在转染 48 h 后细胞生长开始受到抑制 ( $F = 17.68, P = 0.0031$ ),72 h 后抑制作用比较明显 ( $F = 43.14, P = 0.0003$ ),抑制作用可以持续至 1 周 ( $F = 344.59, P = 0.0001$ )。

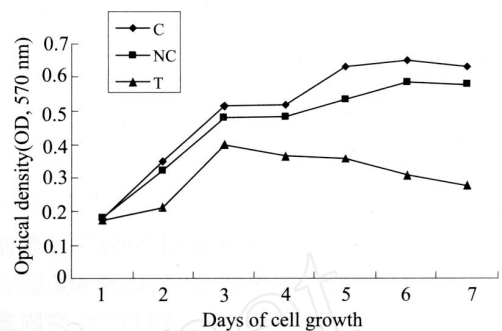


图 5 MTT 法检测不同细胞的生长曲线

Fig 5 The growth curves of cells in different groups by MTT

2.6 转染重组质粒后对 HT-29 细胞凋亡的影响

HT-29 细胞转染重组质粒 72 h 后,用流式细胞仪检测细胞凋亡的变化,见图 6。空白对照组和阴性对照组的细胞周期大部分处于 G<sub>1</sub> 期,细胞生长分裂正常,而转染重组质粒的 HT-29 细胞有明显的凋亡峰(Sub-G<sub>1</sub> 峰),三组的凋亡率分别为 (0.3000  $\pm$ 0.2000 %), (0.2667  $\pm$ 0.2082 %) 和 (7.0667  $\pm$ 2.3459 %),重组质粒组明显高于各对照组 ( $F = 24.71, P = 0.0013$ ),说明转染 COX-2 siRNA 重组质粒可直接诱导 HT-29 细胞的凋亡。

表 2 MTT 法检测转染后各组细胞的 A 值 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 2 The MTT results in the different cell groups ( $\bar{x} \pm s$ )							
Groups	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
C	0.18 $\pm$ 0.04	0.35 $\pm$ 0.0436	0.5133 $\pm$ 0.0058	0.5167 $\pm$ 0.0058	0.63 $\pm$ 0.0781	0.65 $\pm$ 0.0361	0.6333 $\pm$ 0.0153
NC	0.1833 $\pm$ 0.0058	0.3233 $\pm$ 0.0231	0.4783 $\pm$ 0.0257	0.4833 $\pm$ 0.0351	0.5333 $\pm$ 0.0231	0.5867 $\pm$ 0.0076	0.58 $\pm$ 0.0231
T	0.1733 $\pm$ 0.0058	0.2117 $\pm$ 0.0176 *	0.3983 $\pm$ 0.0058 *	0.3667 $\pm$ 0.0301 *	0.3567 $\pm$ 0.0104 *	0.3083 $\pm$ 0.0104 *	0.2767 $\pm$ 0.0252 *

C:Control;NC:Negative control;T:pshCOX-2;There were significant differences in the MTT results between group C and T; \*  $P < 0.05$

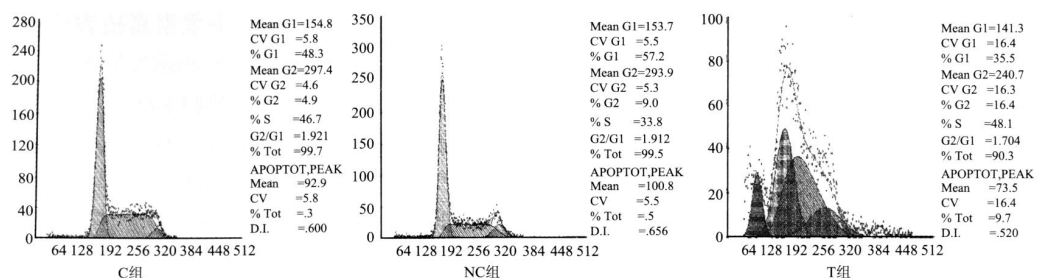


图 6 流式细胞术检测不同细胞的凋亡百分率

Fig 6 The apoptosis percentage in different cell groups through FACS

2.7 RIA 法检测转染后培养液上清中 PGE<sub>2</sub>变化

测得转染后 24、48 和 72 h 各组细胞培养上清中 PGE<sub>2</sub>的含量,见表 3,结果发现重组质粒组与对照组比较,转染 24 h 后 PGE<sub>2</sub>没有明显变化( $F = 0.29, P = 0.7552$ ),而从 48 h 开始含量下降( $F = 11.71, P = 0.0085$ ),72 h 下降明显( $F = 82.23, P = 0.0001$ ),差异有统计学意义。

表 3 各组细胞不同时间上清中 PGE<sub>2</sub>(pg/ml)的比较( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 3 The level of PGE<sub>2</sub> in the different cell groups(pg/ml) ( $\bar{x} \pm s$ )

Groups	24 h	48 h	72 h
C	233.4707 ±18.6126	269.9970 ±19.6192	322.6032 ±33.2803
NC	225.1546 ±14.2087	245.7350 ±24.8801	315.9302 ±23.2020
T	225.2666 ±12.1274	197.1136 ±7.4172 *	102.4503 ±8.3846 *

C: Control; NC: Negative control; T: pshCOX-2; The level of PGE<sub>2</sub> was significantly different between group C and T (\*:  $P < 0.05$ )

2.8 ELISA 法测定细胞培养液上清中 VEGF 变化

测得转染后 24、48 和 72 h 各组细胞培养上清中 VEGF 的浓度,见表 4,结果发现在重组质粒组 24 h 上清中 VEGF 含量与对照组比较没有明显变化( $F = 1.9828, P = 0.2182$ ),而从 48 h 开始含量下降,差异无统计学意义( $F = 4.89, P = 0.0549$ ),72 h 下降明显,差异有统计学意义( $F = 136.31, P = 0.0001$ )。

表 4 各组不同时间上清中 VEGF(pg/ml)的比较( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 4 The level of VEGF in the different cell groups(pg/ml) ( $\bar{x} \pm s$ )

Groups	24 h	48 h	72 h
C	84.3920 ±4.8648	106.8833 ±6.2932	140.0208 ±8.9801
NC	81.1348 ±1.8692	103.6137 ±1.3511	137.0079 ±6.0278
T	86.2985 ±3.0216	90.0192 ±10.2797	63.3333 ±2.7519 *

C: Control; NC: Negative control; T: pshCOX-2; The level of VEGF was significantly different between group C and T (\*:  $P < 0.05$ )

3 讨论

环氧合酶(cyclooxygenase COX)是花生四烯酸代谢中环氧合酶途径的限速酶,1991 年被证实确实存在两种同工酶<sup>[5]</sup>:结构性 COX-1 和诱导性 COX-2。前者在人体多种组织和细胞中均有表达,主要调节生理前列腺素的合成,后者在正常组织中水平很低,其表达受细胞内外许多刺激因素的影响,在病理生理反应过程中,诱导产生<sup>[6]</sup>。近年来许多研究表

明,COX-2 在结直肠癌中高表达<sup>[7]</sup>。COX-2 可能通过促进血管生成,加速肿瘤细胞增殖,抑制细胞凋亡,在肿瘤的发生发展过程中起了重要的作用<sup>[8-9]</sup>。有报道表明使用非甾体类解热镇痛药(NSAIDs)可以抑制结肠癌生长,这可能与抑制 COX-2 有关,但是由于存在非 COX-2 依赖的抗肿瘤作用机制,因此 NSAIDs 确切抗肿瘤的机制尚未完全搞清<sup>[10-12]</sup>。为了进一步研究 COX-2 基因与结肠癌的关系,以前的一些研究多采用基因敲除、反义寡核苷酸及其他 COX-2 抑制剂等方法,由于均有一定的缺陷,结果不很满意,故在本研究中我们采用了一种新的研究基因功能的技术,即 RNAi 技术<sup>[13]</sup>。

RNAi 技术是 Fire 和 Mello 等<sup>[1,14]</sup>在 1998 年研究秀丽隐杆线虫发现并且命名的,其比单独运用反义 RNA 诱导基因沉默的效率 10 倍<sup>[15]</sup>,2001 年 Elbashir 等<sup>[16]</sup>的研究证实在哺乳动物细胞中也可以应用 RNAi 技术,揭开了 RNAi 应用于哺乳细胞研究的新篇章,《Science》杂志将 RNAi 称为“2002 年的重大突破”<sup>[13]</sup>。在哺乳动物细胞内,由于长 dsRNA 可引起非特异性的基因表达抑制,所以只有 19-23nt 的 siRNA 能诱导 RNAi,siRNA 可以高效、特异地阻断哺乳动物细胞内同源基因表达<sup>[17]</sup>,故 RNAi 技术非常适合用于研究和阻滞肿瘤细胞中异常基因或蛋白的表达,可能起到抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡的作用<sup>[18-19]</sup>。siRNA 可通过化学合成、质粒或病毒载体的转录产生<sup>[20]</sup>,相比之下,质粒载体转录产生 siRNA 的方式更便宜,更安全,操作更简便,比较适合于长期研究肿瘤癌基因的功能,尤其是带有抗生素标记的载体可以在哺乳动物细胞中持续抑制靶基因的表达,作用可持续数星期甚至数月<sup>[2,21]</sup>。

本研究依据 RNA 干扰原理,按照 siRNA 的设计原则<sup>[3-4]</sup>,采用将含有真核细胞内转录启动子 H1,并能分别在原核和真核细胞水平进行阳性克隆抗性筛选的真核表达载体 pGPHI-GFP-Neo 与针对 COX-2 基因设计的 siRNA 相连接,构建重组子。在靶序列的选择时应用 BLAST 排除了与现有基因文库中所有其他人类基因同源的可能,所以具有高度的特异性。在成功地构建了重组转录载体 pGPHI-GFP-Neo-COX-2 后,通过脂质体转染导入人结肠癌 HT-29 细胞中,荧光显微镜结果显示质粒成功导入 HT-29 细胞内并获得成功表达,随后运用 RT-PCT 和 Western blot 分别从转录水平和蛋白水平研究,发现转染重组质粒后 24 和 48 h 时 HT-29 细胞 COX-2 表达未有明显下调,转染 72h 后 COX-2 表达才明显受抑,抑制作用可以持续到转染后 1 周。

同时发现在 COX-2 基因被沉默 72h 后 HT-29 细胞生长明显受抑制,流式细胞仪分析也证实重组转染组 HT-29 细胞凋亡率明显增加,这进一步证明 COX-2 表达在促进结肠癌细胞生长和抗凋亡中发挥着重要作用,通过抑制 COX-2 表达可以抑制结肠癌细胞的生长,但 COX-2 基因抗凋亡作用可能涉及很多途径,尚待进一步研究<sup>[12]</sup>。

本研究还发现,通过阻断 HT-29 细胞 COX-2 基因表达,可减少细胞合成 PGE<sub>2</sub>,现已证实 PGE<sub>2</sub> 在肿瘤的生长、增殖以及增加侵袭性中发挥重要作用<sup>[22]</sup>,抑制 PGE<sub>2</sub> 的产生,可以影响结肠癌细胞生长,同时 PGE<sub>2</sub> 合成的减少,也阻断了 PGE<sub>2</sub> 对 COX-2 表达的正反馈作用<sup>[23]</sup>。另外, PGE<sub>2</sub> 还可以通过 EP 受体/CAMP 信号途径,促进肿瘤细胞产生 VEGF 等促肿瘤血管因子<sup>[24]</sup>,本研究中发现重组质粒转染组细胞 VEGF 的产生明显减少,可能与 PGE<sub>2</sub> 合成减少,继而阻断了这个信号途径有关,为解释 NSAIDs 的抗肿瘤血管作用提供了理论依据。

本研究构建的靶向性 COX-2 siRNA 真核表达载体能够显著的抑制人结肠癌 HT-29 细胞 COX-2 表达,作用持续、特异而且完全,结肠癌细胞 COX-2 基因沉默后可以抑制细胞生长、促进肿瘤细胞凋亡,抑制 PGE<sub>2</sub> 的合成和减少 VEGF 的产生,这将有助于抑制肿瘤血管的形成,为进一步研究 COX-2 与结肠癌的关系,阐明 NSAIDs 抗肿瘤作用,提供了新的策略和途径,可以预见靶向性的肿瘤基因沉默的 siRNA 表达载体技术,将有望成为肿瘤基因治疗的有力工具<sup>[25-26]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.
- [2] Brummelkamp TR, Bernards R. New tools for functional mammalian cancer genetics[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(10): 781-789.
- [3] Levenkova N, Gu Q, Rux JJ. Gene specific siRNA selector [J]. *Bioinformatics*, 2004, 20(3): 430-432.
- [4] Reynolds A, Leake D, Boese Q, et al. Rational siRNA design for RNA interference[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(3): 326-330.
- [5] Appleby SB, Ristimäki A, Neilson K, et al. Structure of the human cyclooxygenase-2 gene[J]. *Biochem J*, 1994, 302(Pt3): 723-727.
- [6] Marnett LJ, DuBois RN. COX-2: A Target for Cancer Prevention[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2002, 42(1): 55-80.
- [7] Gwyn K, Sinicrope FA. Chemoprevention of colorectal cancer [J]. *Am J Gastroenterol*, 2002, 97(1): 13-21.
- [8] Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(5): 1306-1311.
- [9] Folkman J. Angiogenesis and apoptosis[J]. *Cancer Biology*, 2003, 13(2): 159-167.
- [10] Tuynman JB, Peppelenbosch MP, Richel DJ. COX-2 inhibition as tool to treat and prevent colorectal cancer[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2004, 52(2): 81-101.
- [11] Husain SS, Imre L Szabo, Tarmawski AS, et al. NSAIDs inhibition of GI cancer growth: clinical implications and molecular mechanisms of action[J]. *Am J Gastroenterol*, 2002, 97(3): 542-553.
- [12] Hawk ET, Levin B. Colorectal Cancer Prevention[J]. *J Clin Oncology*, 2005, 23(2): 379-391.
- [13] Couzin J. Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash[J]. *Science*, 2002, 298(5602): 2296-2297.
- [14] Arenz C, Schepers U. RNA interference: An ancient mechanism or a state of the art therapeutic application[J]. *Naturwissenschaften*, 2003, 90(8): 345-359.
- [15] Aoki Y, Cioca DP, Oidaira H, et al. RNA interference may be more potent than antisense RNA in human cancer cell lines [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2003, 30(1-2): 96-102.
- [16] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. *Nature*, 2001, 411(6836): 494-498.
- [17] Rozema DB, Lewis DL. siRNA delivery technologies for mammalian systems[J]. *Targets*, 2003, 2(6): 253-260.
- [18] Ryther RC, Flynt AS, Phillips JA 3rd, et al. siRNA therapeutics: big potential from small RNAs[J]. *Gene Ther*, 2005, 12(1): 5-11.
- [19] Izquierdo M. Short interfering RNAs as a tool for cancer gene therapy[J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12(3): 217-227.
- [20] Amarzguioui M, Rossi JJ, Kim D. Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(26): 5974-5881.
- [21] Malik I, Garrido M, Bahr M, et al. Comparison of test systems for RNA interference[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341(1): 245-253.
- [22] Sheng H, Shao J, Washington MK, et al. Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells[J]. *Biol Chem*, 2001, 276(21): 18075-18081.
- [23] Tjandrawata RR, Dahlya R, Hughes Fulford. Induction of cyclooxygenase-2 mRNA by prostaglandin E2 in human prostatic carcinoma cells[J]. *British Journal of Cancer*, 1997, 75(6): 1111-1118.
- [24] Bisacchi D, PHD, R Benelli, et al. Anti-angiogenesis and angioprevention: mechanisms, problems and perspectives[J]. *Cancer Detect Prev*, 2003, 27(3): 229-238.
- [25] Stevenson M. Therapeutic Potential of RNA Interference[J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(17): 1772-1777.
- [26] Jones SW, Souza PM, Lindsay MA. siRNA for gene silencing: a route to drug target discovery[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2004, (5): 522-527.

[编辑:安 凤;校对:贺 文]