

shRNA靶向干扰COX-2稳定细胞系的建立及鉴定

汪先桃 董晋豫 郭变琴 马婷婷 熊海玉 涂植光*

(重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要 脂质体法将COX-2-shRNA载体转染肝癌细胞株SMMC-7721, G418筛选获得稳定细胞系COX-2-shRNA-SMMC-7721, 通过RT-PCR和Western blot分别检测细胞系中COX-2基因mRNA转录水平和蛋白质表达水平, 通过MTT、流式细胞术和Transwell等观察细胞恶性生物学行为的改变。建立COX-2-shRNA-SMMC-7721(干扰组)、HK-SMMC-7721(阴性对照组)细胞株。干扰组的COX-2基因mRNA的转录水平、蛋白表达水平和细胞增殖能力较阴性对照组和SMMC-7721(空白组)明显下降($P<0.05$), 而阴性对照组与空白组间无明显差异($P>0.05$); 干扰组、阴性对照组和空白组处于G₀/G₁期的细胞分别为(68.85±0.27)%、(53.05±0.35)%和(53.54±0.33)%; 细胞凋亡率分别为(9.60±0.20)%、(1.79±0.23)%和(1.75±0.20)%; 穿膜细胞数分别为(117.60±5.30)、(338.40±11.50)和(347.40±12.80)个。干扰组与阴性对照组和空白组有显著差异($P<0.05$), 而阴性对照组与空白组间无明显差异($P>0.05$)。利用RNA干扰技术成功构建了靶向干扰COX-2的稳定肝癌细胞系COX-2-shRNA-SMMC-7721, 为COX-2分子的作用机制研究提供了细胞模型。

关键词 COX-2; shRNA; 稳定细胞系; 肝癌

Construction and Identification of Cell Lines of COX-2 Inhibited by shRNA

Wang Xiantao, Dong Jinyu, Guo Bianqin, Ma Tingting, Xiong Haiyu, Tu Zhiguang*

(College of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Education Ministry, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The constructed recombinant interference plasmid pshRNA-COX-2 was transfected into SMMC-7721 cells by lipofectamine mediation, then monoclonal cell line was selected by G418 pressure. The expressions of COX-2 mRNA and protein were measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot respectively, and the changes of cell proliferation and apoptosis were assessed by MTT assay and flow cytometry, respectively. The Transwell test was used to detect the invasion ability of cell lines. COX-2-shRNA-SMMC-7721 (interference group), HK-SMMC-7721 group (negative control group) cell lines were established. The levels of interference group's COX-2 mRNA transcription, COX-2 protein expression and cell proliferation significantly decreased. There were significant differences compared with those of the control group and SMMC-7721 (blank group) ($P<0.05$), while those of control group and blank control group were not significantly different ($P>0.05$). Interference group, control group and blank group of cells in G₀/G₁ phase were (68.85±0.27)%, (53.05±0.35)% and (53.54±0.33)%, respectively; the percentage of apoptotic cells were (9.60±0.20)%, (1.79±0.23)% and (1.75±0.20)% separately; transmembrane cell number were (117.60±5.30), (338.40±11.50) and (347.40±12.80) cells, respectively. There were sig-

收稿日期: 2013-01-21 接受日期: 2013-02-26

国家自然科学基金面上项目(批准号: 81172016)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485759, E-mail: tuzhiguang@yahoo.com.cn

Received: January 21, 2013 Accepted: February 26, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81172016)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485759, E-mail: tuzhiguang@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2013-05-23 09:40

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130523.0940.002.html>

nificant differences comparing interference group with control group and blank group ($P < 0.05$), while the control group and blank control group were not significantly different ($P > 0.05$). The cell line COX-2-shRNA-SMMC-7721, in which COX-2 expression was inhibited using RNA interference technology, was successfully established, which could provide the cell model for further study of COX-2 gene function.

Key words COX-2(cyclooxygenase-2); shRNA; stable cell lines; liver cancer

环氧酶(cyclooxygenase, COX)又名前列腺素内过氧化物合成酶,是催化花生四烯酸生成前列腺素类物质过程中的重要限速酶,主要有COX-1和COX-2两种同工异构酶,二者虽结构相似,但因其生物学特异性上的差异,在正常和病理组织中发挥着不同的作用。其中,COX-1被认为是“看家基因”,在大多数正常细胞中都呈稳定的表达,维持正常的生理功能,如调节肾血流量、维持血小板生理功能、保护胃黏膜等;而COX-2被认为是“快速反应基因”,静息时并不表达,仅在细胞受到刺激时迅速合成,参与多种病理生理过程,包括炎症及肿瘤的发生、发展过程。近年来,科研人员对COX-2功能做了大量研究,特别是COX-2与肿瘤的关系。研究表明,多种肿瘤中COX-2呈高表达状态,在肿瘤的发生、发展过程中起到了重要的作用^[1-3]。

RNA干扰技术可特异性阻断靶基因表达,其日益成为基因组功能研究和抗病毒的有力手段,同时也为肿瘤的基因治疗提供了新的策略和途径^[4-5]。本研究拟采用课题组已构建的靶向COX-2重组干扰质粒pshRNA-COX-2,建立SMMC-7721肝癌细胞稳定细胞系,为下一步研究COX-2蛋白的功能提供细胞模型。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株及细胞株

重组干扰质粒pshRNA-COX-2和阴性对照质粒pshRNA-HK由本课题组构建保存,菌株DH5 α 和人肝癌细胞株SMMC-7721由重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室保存。

1.2 主要试剂

Taq酶、T4 DNA连接酶、DNA marker DL2000、逆转录试剂盒均购自日本TaKaRa公司;质粒小抽试剂盒及去内毒素质粒抽提试剂盒购自Omega公司;1640培养基购自美国HyClone公司;胰酶、G418及胎牛血清购自美国GIBCO公司;真核细胞转染试剂LipofectamineTM 2000购自美国Invitrogen公司;Trizol和RT-PCR试剂盒购自大连宝生物工程有限公

司;细胞总蛋白提取试剂购自北京博迈德科技发展有限公司;小鼠抗 β -actin单克隆抗体辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠IgG、HRP标记的羊抗兔IgG及Western blot化学发光试剂购自碧云天生物技术研究;兔抗人COX-2单克隆抗体购自英国Abcam公司;磷酸盐缓冲液(PBS)为本室自配。

1.3 shRNA靶向干扰COX-2细胞单克隆的筛选

每2 cm²细胞培养皿铺5 \times 10⁵细胞,24 h后加入G418,并设置相应的抗生素浓度梯度(100~1 200 μ g/mL)。每隔48 h更换一次新鲜培养基,同时维持G418的浓度,每天观察细胞的存活状况,在加药12 d后确定G418的最佳筛选浓度。重组干扰质粒pshRNA-COX-2和阴性对照质粒pshRNA-HK均用无内毒素大提试剂盒纯化。细胞转染采用LipofectamineTM 2000转染试剂,每10 cm²细胞培养皿转染4 μ g质粒。转染过程中采用无血清和抗生素的DMEM培养基,转染6 h后换成含10%血清和抗生素的完全培养基。48 h后将转染后的所有细胞铺在55 cm²的细胞平皿中,24 h后细胞融合度达到10%即可,然后加入G418进行筛选。持续培养至14 d左右形成细胞克隆。在荧光显微镜下观看,对有荧光的细胞克隆进行标记,在生物安全柜中显微镜下,用枪头挑出标记克隆转移至24孔板中培养,然后扩大培养,留待鉴定。将鉴定阳性的细胞克隆扩大培养,分别命名为COX-2-shRNA-SMMC-7721稳定细胞系和HK-SMMC-7721稳定细胞系。

1.4 RT-PCR和Western blot检测单克隆细胞株中COX-2 mRNA和蛋白表达变化

收集COX-2-shRNA-SMMC-7721和HK-SMMC-7721稳定细胞,以RNAiso plus法提取细胞总RNA,然后进行RT-PCR。COX-2上游引物为:5'-AGT CCC TGA GCA TCT ACG GTT TG-3',下游引物为:5'-CCT ATC AGT ATT AGC CTG CTT GTC T-3';内参 β -actin上游引物为:5'-CCT TCT ACA ATG AGC TGC GT-3',下游引物为:5'-CCT GGA TAG CAA CGT ACA TG-3';引物均由Invitrogen公司合成,进行RT-PCR。反应条件为:

94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共30个循环; 72 °C再延伸 5 min。PCR产物经1%的琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪下观察成像, 用软件Quantity One对电泳区带进行扫描, 计算COX-2-shRNA-SMMC-7721和HK-SMMC-7721稳定细胞中COX-2与内参 β -actin的灰度比值, 再进一步统计分析。

蛋白裂解液法(含苯甲基磺酰氟蛋白酶抑制剂)提取克隆细胞株总蛋白, 二辛可酸法测定蛋白浓度, 加热变性后每孔上样50 μ g, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 电转到聚偏二氟乙烯膜上, 用5%的脱脂奶粉4 °C封闭过夜, 孵育抗人COX-2单克隆抗体(1:1 000稀释)或者鼠抗人 β -actin单克隆抗体(1:1 000稀释), 4 °C孵育12 h后用TBST洗膜3次, 每次10 min, 然后用TBST洗膜10 min, 加入HRP标记羊抗兔IgG(1:1 000稀释)或者HRP标记的羊抗鼠IgG(1:1 000稀释), 室温孵育2 h后同上洗膜, ECL化学发光系统观察目的蛋白条带。用软件Quantity One分析目的条带的灰度值, 再进一步统计分析。

1.5 COX-2-shRNA-SMMC-7721稳定细胞系增殖情况的检测

按3 000/孔的密度将细胞接种于96孔板, 实验分3组: COX-2-shRNA-SMMC-7721稳定细胞系组(干扰组)、HK-SMMC-7721稳定细胞系组(阴性对照组)、SMMC-7721细胞组(空白组), 另外设计只加培养基的空白孔(未接种细胞), 每组设3个复孔。分别在培养1, 2, 3, 4, 5, 6 d后, 弃旧培养液, 加入1%胎牛血清的1640培养基, 再加入MTT溶液20 μ L/孔, 孵育1 h后, 酶标仪上测定590 nm波长处每孔吸光度值, 以吸光度值为纵坐标, 时间为横坐标绘制细胞增殖曲线。

1.6 流式细胞术检测COX-2-shRNA-SMMC-7721稳定细胞系周期的分布和细胞凋亡

分别培养COX-2-shRNA-SMMC-7721组、HK-SMMC-7721组和SMMC-7721组细胞48 h, 然后进行检测。用PBS洗涤3次, 重悬制成单细胞悬液, 调整细胞密度为 2×10^6 /mL, 然后快速加入到4 °C预冷的95%乙醇中固定(乙醇终浓度为70%) 24 h, 即用流式细胞术(flow cytometry, FCM)进行细胞周期检测。以Annexin V-PE/7-AAD流式双染法检测细胞凋亡。实验均重复3次。

1.7 体外侵袭实验(Transwell小室法)

培养COX-2-shRNA-SMMC-7721组、HK-SMMC-7721组和SMMC-7721组细胞, 当其融合至80%时, 用

PBS洗涤细胞, 随后加入无血清的1640培养液并继续培养24 h(每100 mL培养瓶中加入6 mL无血清的1640培养液), 收集上清备用。在Transwell小室滤膜上平铺基质胶(Matrigel) 40 μ L并置于24孔板中, 紫外线下消毒过夜, 用约10 μ L 1640培养液(不含血清)湿润上室。随后在上室中接种400 μ L的各组细胞悬液(含 2×10^5 细胞), 下室中加600 μ L 1640培养液(含10% FBS)。每种细胞设2个复孔。培养36 h后, 取出小室并用棉签小心擦除上层Matrigel与未穿膜的细胞, 用0.1%结晶紫染色。置于200 \times 的光学显微镜下观察并计数滤膜下表面的细胞数, 每组随机计数5个视野, 计算平均穿膜细胞数/视野。

1.8 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm S.D.$ 表示, 采用SSPS 17.0软件进行t检验和卡方检验分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光显微镜观察单克隆细胞株的荧光表达情况

每天观察在相应的抗生素浓度下细胞培养皿细胞的存活状况, 在加药12 d后确定G418的最佳筛选浓度为800 μ g/mL。将重组干扰质粒pshRNA-COX-2和阴性对照质粒pshRNA-HK分别转染SMMC-7721细胞后, 通过G418筛选, 14 d后形成单克隆细胞株, 其荧光图见图1A和1B。再分别将鉴定阳性的两种单克

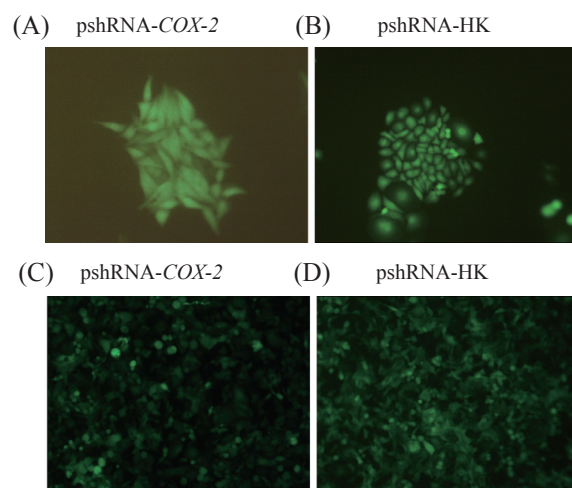


图1 两种单克隆细胞株荧光显微镜观察(A、B, 200 \times)和两种单克隆细胞株扩大培养后的荧光显微镜观察(C、D, 100 \times)

Fig.1 Fluorescent microscope of two monoclonal cell lines(A,B, 200 \times) and fluorescent microscope of stable cell lines after culture expansion(C,D, 100 \times)

隆细胞株扩大培养,其荧光图见图1C和1D。

2.2 COX-2-shRNA-SMMC-7721单克隆细胞株中COX-2基因mRNA的转录水平

PCR扩增产物经过1%的琼脂糖凝胶电泳,可见180 bp的COX-2特异性条带(图2),图中147 bp的条带为内参 β -actin。筛选出的COX-2-shRNA-SMMC-7721细胞克隆株中COX-2基因mRNA的转录水平明显下降,筛选出的COX-2-shRNA-SMMC-7721细胞克隆株(COX-2/ β -actin, 0.31)与HK-SMMC-7721细胞克隆株(COX-2/ β -actin, 0.89)及SMMC-7721细胞株(COX-2/ β -actin, 0.86)比较,COX-2表达差异有统计学意义($P < 0.05$),HK-SMMC-7721细胞克隆株与SMMC-7721细胞株比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 COX-2-shRNA-SMMC-7721单克隆细胞株中COX-2蛋白的表达

Western blot分析显示,筛选出的COX-2-shRNA-SMMC-7721单克隆细胞株(COX-2/ β -actin, 0.19)中的COX-2蛋白表达与HK-SMMC-7721细胞克隆株(COX-2/ β -actin, 0.98)及SMMC-7721细胞株(COX-2/ β -actin, 0.90)比较,COX-2表达差异有统计学意义($P < 0.05$),HK-SMMC-7721细胞克隆株与SMMC-7721细胞株比较,差异无统计学意义($P > 0.05$,图3)。

2.4 MTT法检测细胞的增殖情况

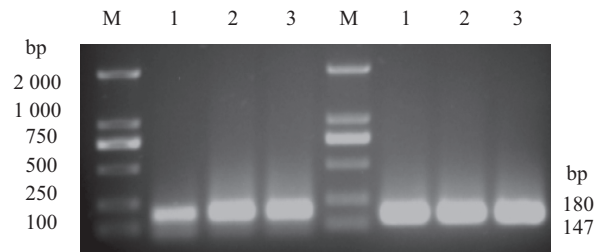
MTT结果如图4所示,COX-2-shRNA-SMMC-7721组与HK-SMMC-7721组和SMMC-7721组相比,COX-2-shRNA-SMMC-7721稳定细胞系组(干扰组)细胞增殖能力明显减弱($P < 0.05$),而HK-SMMC-7721稳定细胞系(阴性对照组)和SMMC-7721细胞(空白组)相比,差异则无统计学意义($P > 0.05$)。

2.5 细胞周期和细胞凋亡变化

FCM法检测结果提示,COX-2-shRNA-SMMC-7721组处于G₀/G₁期的细胞为(68.85±0.27)%,凋亡率为(9.60±0.20)%。HK-SMMC-7721组处于G₀/G₁期的细胞为(53.05±0.35)%,凋亡率为(1.79±0.23)%,SMMC-7721组细胞处于G₀/G₁期的细胞为(53.54±0.33)%,凋亡率为(1.75±0.20)%,差异有显著的统计学意义($P < 0.05$),提示COX-2-shRNA-SMMC-7721稳定细胞系从G₁期进入S期的细胞数减少,并且凋亡率增加(图5和图6)。

2.6 Transwell 法检测细胞的侵袭力

侵袭实验结果表明,COX-2-shRNA-SMMC-7721

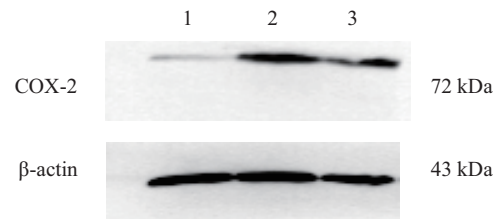


M: DL2000 marker; 1: COX-2-shRNA-SMMC-7721; 2: HK-SMMC-7721; 3: SMMC-7721. 左: COX-2; 右: β -actin。

M: DL2000 marker; 1: COX-2-shRNA-SMMC-7721; 2: HK-SMMC-7721; 3: SMMC-7721. Left: COX-2; Right: β -actin.

图2 单克隆细胞株PCR鉴定COX-2的表达

Fig.2 Identification of the expression of COX-2 of monoclonal cell line by PCR



1: COX-2-shRNA-SMMC-7721; 2: HK-SMMC-7721; 3: SMMC-7721.

图3 单克隆细胞株Western blot鉴定COX-2的表达

Fig.3 Identification of the expression of COX-2 protein in monoclonal cell line by Western blot

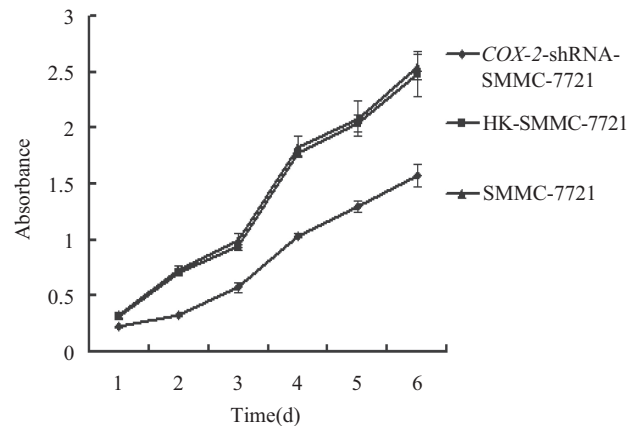
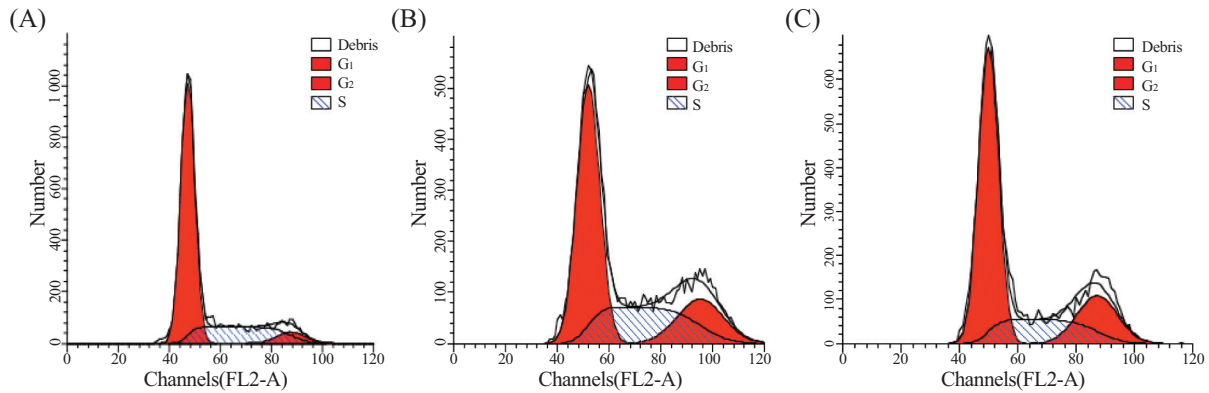


图4 稳定细胞系的增殖情况

Fig.4 The changes of the proliferation of stable cell lines

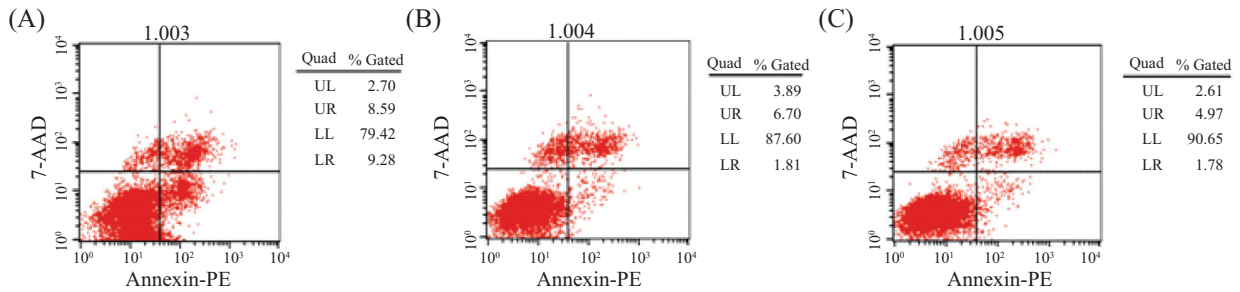
组、HK-SMMC-7721组和SMMC-7721组穿膜细胞数分别为(117.60±5.25)、(338.40±11.50)和(347.40±12.80)个。COX-2-shRNA-SMMC-7721组细胞侵袭基质胶的能力较HK-SMMC-7721组和SMMC-7721细胞组显著明显下降($P < 0.05$),而HK-SMMC-7721稳定细胞系组和SMMC-7721细胞组间无明显差异($P > 0.05$,图7)。



A: COX-2-shRNA-SMMC-7721; B: HK-SMMC-7721; C: SMMC-7721.

图5 稳定细胞系周期的变化

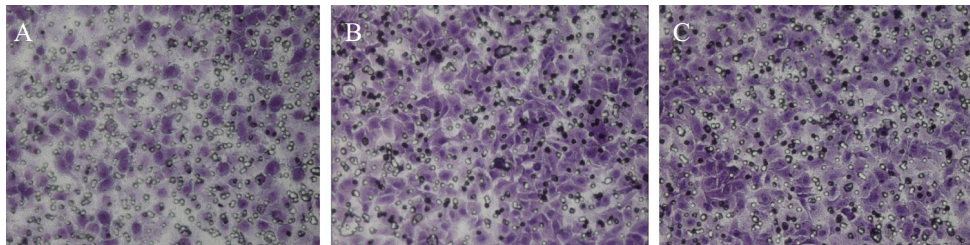
Fig.5 The changes of the cell cycle of stable cell lines



A: COX-2-shRNA-SMMC-7721; B: HK-SMMC-7721; C: SMMC-7721.

图6 稳定细胞系凋亡的变化

Fig.6 The change of the apoptosis of stable cell lines



A: COX-2-shRNA-SMMC-7721; B: HK-SMMC-7721; C: SMMC-7721.

图7 稳定细胞系侵袭力的变化(200×)

Fig.7 The invasive ability changes of stable cell lines(200×)

3 讨论

肝癌在我国发病率高但预后很差。因其易早期转移,难以手术根除,而化疗的疗效有限且毒副作用明显,生存期却无明显延长^[6-7]。深入探讨肝癌发病的分子机制从而寻求新的治疗方法是提高肝癌疗效的关键。近年研究表明,肝细胞癌的发生、发展和侵袭转移与COX-2的异常表达密切相关,COX-2在肝癌中的表达增强对肝癌细胞的增殖、凋亡、转移以及复发都有重要的生物学作用^[8-9]。

COX-2在肝癌发生、发展和侵袭转移中的作用为肝细胞癌的防治提供了重要的基因靶点,应用COX-2抑制剂预防和治疗肿瘤已显示出良好的临床价值。现有的研究所应用的COX-2选择性抑制剂尚存在特异性和抑制效率等方面的不足,且存在副作用。选择性COX-2抑制剂效率低,呈剂量依赖性,高浓度时可诱导肿瘤细胞凋亡和细胞周期阻滞蛋白表达,抑制肿瘤细胞生长和转移。但是,其特异性不强,长期使用选择性COX-2抑制剂容易引起高血压、肾

脏损害等副作用^[10-11]。RNA干扰(RNA interference, RNAi)是基因转录后的一种抑制方式,当细胞中导入与内源性mRNA编码区同源的双链小干扰RNA时,可与靶基因mRNA结合并降解之,实现靶基因转录后表达沉默(gene silencing)^[12]。通过RNAi技术可抑制肿瘤相关基因的表达,为相关基因功能研究及肿瘤基因治疗开辟了新途径。

本研究利用已构建的靶向COX-2重组干扰质粒pshRNA-COX-2,以脂质体法将该重组干扰质粒转染肝癌细胞株SMC-7721,通过G418筛选获得COX-2-shRNA-SMC-7721单克隆细胞株。对该细胞系中COX-2基因mRNA转录水平和蛋白质表达水平的检测,表明COX-2基因被显著抑制。通过MTT、流式细胞术、Transwell实验等观察该细胞系恶性生物学行为的改变,发现此稳定细胞系的增殖能力下降、凋亡率增加,并且侵袭能力显著下降。以上结果分别从基因表达和肿瘤细胞生物学功能方面表明,成功建立了靶向干扰COX-2的稳定肝癌细胞系COX-2-shRNA-SMC-7721,从而为进一步深入研究COX-2作为肝癌基因治疗作用的靶点以及其作用机制奠定了基础。

参考文献 (References)

- 1 Yoon BN, Chon KM, Hong SL, Lee JH, Kim JY, Cho KS, *et al.* Inflammation and apoptosis in malignant transformation of sinonasal inverted papilloma: the role of the bridge molecules, cyclooxygenase-2, and nuclear factor κ B. *Am J Laryngol* 2013; 34(1): 22-30.
- 2 Hu J, Chen C, Su Y, DU J, Qian X, Jin Y. Vascular endothelial growth factor promotes the expression of cyclooxygenase 2 and matrix metalloproteinases in Lewis lung carcinoma cells. *Exp Ther Med* 2012; 4(6): 1045-50.
- 3 Sproviero D, Julien S, Burford B, Taylor-Papadimitriou J, Burchell JM. Cyclooxygenase-2 enzyme induces the expression of the α -2,3-Sialyltransferase-3 (ST3Gal-I) in breast cancer. *J Biol Chem* 2012; 287(53): 44490-7.
- 4 Jagani H, Rao JV, Palanimuthu VR, Hariharapura RC, Gang S. A nanoformulation of siRNA and its role in cancer therapy: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *Cell Mol Biol Lett* 2013; 18(1): 120-36.
- 5 Charames GS, Bapat B. Cyclooxygenase-2 knockdown by RNA interference in colon cancer. *Int J Oncol* 2006; 28(2): 543-9.
- 6 Bosch FX, Ribes J, Borrás J. Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis* 1999; 19(3): 271-85.
- 7 Thomas MB, Zhu AX. Hepatocellular carcinoma: the need for progress. *J Clin Oncol* 2005; 23(13): 2892-9.
- 8 Cerveilo M, Foderaa D, Florena AM, Soresi M, Tripodo C, D'Alessandro N, *et al.* Correlation between expression of cyclooxygenase-2 and the presence of inflammatory cells in human primary hepatocellular carcinoma: Possible role in tumor promotion and angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2005; 11(30): 4638-43.
- 9 李波, 刘勇, 苏松, 张孟瑜, 袁庆, 陈川, 等. 环氧合酶-2与P-糖蛋白在人肝癌细胞中的表达及其意义. *中华肝脏病杂志* (Li Bo, Liu Yong, Su Song, Zhang Mengyu, Yuan Qing, Chen Chuan, *et al.* Expressions and significance of COX-2 and P-gp in human hepatocellular carcinoma tissues. *Chinese Journal of Hepatology*) 2011; 19(10): 755-8.
- 10 Niederberger E, Manderscheic C, Grosch S, Schmidt H, Ehnert C, Geisslinger G. Effects of the selective COX-2 inhibitors celecoxib and rofecoxib on human vascular cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 68(2): 341-50.
- 11 Aalbers J. Benefit versus risk in the use of non-selective NSAIDs and selective COX-2 inhibitors. *Cardiovasc J Afr* 2012; 23(6): 356.
- 12 Schütze N. siRNA technology. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 213(2): 115-9.