

siRNA 对乳腺癌细胞 Cyclin E 表达和生长抑制作用

蒋磊 陈日曙¹ 李继承*

(浙江大学细胞生物学研究所, 杭州 310031; ¹乐清市第二人民医院, 乐清 325608)

摘要 研究 siRNA 对乳腺癌 MCF-7 细胞株 cyclin E 表达的抑制及对细胞生长的影响。化学合成针对 cyclin E 基因的小干扰 RNA (siRNA), 转染 MCF-7 细胞株; 分别应用荧光定量 PCR 和免疫印迹测定 cyclin E mRNA 和蛋白质的表达, CCK-8 测定细胞的增殖活性, 流式细胞仪检测细胞周期, 软琼脂培养检测细胞克隆形成能力。10、50、100 nmol/L siRNA-cyclin E 分别使 MCF-7 细胞 cyclin E 基因表达降低了 24.7%、62.5% 和 71.0%, 蛋白质表达降低了 40.8%、66.5% 和 71.3%。转染 siRNA-cyclin E 后, G₁ 期细胞增多, S 期减少, 增殖受到抑制, 软琼脂克隆形成率降低。结果提示, 在 MCF-7 细胞株中, 导入针对 cyclin E 的 siRNA, 可有效抑制 cyclin E 的表达, 进而使细胞增殖减缓, 逆转其恶性表型。

关键词 cyclin E; siRNA; RNA 干扰; 乳腺癌

Cyclin 是一种与细胞周期相关的核蛋白, 在细胞的增殖分化及肿瘤发生中起重要作用。Cyclin 对细胞周期的调控主要表现在 G₁ 和 M 期。其中早 G₁/S 限制点起关键作用的是 cyclin D 和 cyclin E, 对于细胞进入增殖周期起着重要的促进作用。Cyclin E 高表达可以缩短 G₁ 期, 引起中心体过增殖, 扰乱有丝分裂, 形成不稳定的染色体, 从而诱发肿瘤^[1]。已有研究提示, cyclin E 在白血病、乳腺癌、结肠癌、淋巴瘤等多种肿瘤中过表达^[2], 因此, cyclin E 有望成为肿瘤基因治疗的新靶点。RNA 干扰(RNA interfering, RNAi)是最近发展起来的一种抑制特定基因表达的新方法, 它是通过双链 RNA 的介导特异性地降解相应序列的 mRNA, 阻断相应基因表达的转录后水平的基因沉默机制^[3]。在哺乳动物细胞介导 RNAi 效应的主要是小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 分子, 其大小约 21~23 bp。本研究化学合成了以 cyclin E 基因为靶标的 siRNA, 将其转染到人乳腺癌细胞系 MCF-7 中, 抑制 cyclin E 的表达, 并对 cyclin E 表达受抑制后产生的一些效应进行了观察分析, 对探讨 cyclin E 在乳腺癌肿瘤中的发生机制有重要意义, 可望为乳腺癌的诊断和治疗提供标记物和治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌 MCF-7 细胞株由浙江大学医学院病理学教研室惠赠, 细胞培养基 DMEM、胰蛋白酶、Trizol 和脂质体转染试剂 Oligofectamine 均为 Invitrogen 公司产品, RT-PCR 相关试剂为 Promega 公司产品, 胎牛血清为杭州四季青生物材料有限公司产品, 兔抗人 cyclin D1 多克隆抗体、HRP 标记的羊抗兔 IgG 为 Santa Cruz 公司产品、Supersignal West Pico Trial Kit 为 Pierce 公司产品, CCK-8 (cell counting kit-8) 为 Dojindo 公司产品, 碘化丙啶 (propidine iodide, PI) 为北京鼎国公司产品。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 化学合成 siRNA-cyclin E 针对 cyclin E 基因 (GenBank 登录号: NM_057182) 靶序列为: 5'-AAGATTTCTTTGACCGGTATA-3', 有义链序列: 5'-GAUUUCUUUGACCGGUAdTdT-3', 反义链序列: 5'-UAUACCGGUCAAAGAAAUCdTdT-3'; 对照 siRNA 有义链序列: 5'-UACAGACCCUC-GAUCGGUdTdT-3', 反义链序列: 5'-ACCGAUC-GAGGGGUCUGUAdTdT-3', 与任何编码序列无同源性。由杭州新瑞佳公司化学合成。

收稿日期: 2005-08-12 接受日期: 2005-11-18

浙江省卫生厅科研基金(No.2005B148)和教育厅资助项目

* 通讯作者。Tel: 0571-87217451, E-mail: lijichen@zju.edu.cn

1.2.2 细胞培养及 siRNA 转染 MCF-7 细胞培养体系为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 37 °C、5%CO₂ 培养。转染 24 h 前, 传代至 6 孔培养板, 每孔 2.5×10⁵ 个细胞。实验分空白组、对照组和 siRNA 实验组。空白组不经任何处理, 对照组转染对照 siRNA 50 nmol/L, 实验组转染 siRNA-cyclin E, 除剂量实验中浓度为 10、50、100 nmol/L 外, 其余均为 50 nmol/L。用 Oligofectamine 脂质体转染试剂进行转染, 于 37 °C、5%CO₂ 转染 4 h 后, 每组加入完全培养基, 继续培养 48 h, 收获细胞。

1.2.3 实时定量 PCR 检测 cyclin E 基因表达 用 Trizol 提取各组转染后细胞总 RNA, 40 μl 逆转录反应体系, 500 ng Oligo (dT), 400 U M-Mlv。PCR 反应以管家基因 β 肌动蛋白为内参照, cyclin E 上游引物为 5'-CAGGGTATCAGTGGTGCAC-3', 下游引物为 5'-TCTTTGCTCGGGCTTTGTCC-3', 扩增产物为 180 bp; β 肌动蛋白上游引物为 5'-CCTGTA-CGCCAACACAGTGC-3', 下游引物为 5'-ATACTCC-TGCTTGCTGATCC-3', 扩增产物为 171 bp。各样品的目的基因和管家基因分别进行 SYBR Green 荧光 / Realtime PCR 反应。未经 siRNA 处理的空白组信号为 100%, 其他处理组信号值相对于空白组的百分率进行作图。

1.2.4 Western 印迹检测 cyclin E 表达 收集 siRNA 处理的细胞, 加细胞裂解液 (1% NP40, 0.5% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 1 mmol/L PMSF, 100 μmol/L 亮抑蛋白酶肽, 1 mmol/L Na₃VO₄) 裂解, 10 000 g 离心 10 min 离心收集上清液, Bradford 法测蛋白质含量。取 25 μg 蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳, 转 PVDF 膜 (Bio-Rad 半干转膜仪, 24 V、24 min), 兔抗人 cyclin E (1:1 000), 二抗 (1:7 000), Supersignal West Pico Trial Kit 显色。同时检测 β 肌动蛋白表达, 作为内参照。

1.2.5 CCK-8 测定细胞增殖活性 转染 24 h 前, 传代至 96 孔培养板, 每孔 5×10³ 个细胞。实验分空白组、对照组 (50 nmol/L)、RNA 实验组 (浓度分别为 10、50、100 nmol/L), 每组设 6 个复孔; 在转染 4 h 后, 加入完全培养基, 培养 24 h、48 h、72 h、96 h 后, 每孔加入 10 μl CCK-8 溶液, 37 °C 培养箱中继续温育 2 h。在酶联免疫检测仪 (Bio-Tek, ELx800) 上, 以 450 nm 测定各孔吸光度, 记录结果。以时间、吸光度绘制细胞增殖曲线, 并计算 siRNA 转染后 48 h 时对细胞的抑制率:

细胞抑制率 = (1 - 实验组吸光值 / 空白组吸光值) × 100%。

1.2.6 细胞周期分析 收获转染后继续培养 48 h 各组细胞, 用 4 °C 预冷的 70% 乙醇固定 1 h, 用 PBS 洗 3 次, 细胞重悬于 50 μg/ml PI 染液 (含 20 μg/ml RNase A) 中, 室温避光温育 1 h, 流式细胞仪 (Becton Dickinson 公司) 分析。

1.2.7 软琼脂克隆培养 转染 siRNA 后, 收集继续培养 48 h MCF-7 细胞, 每孔 1000 个细胞与含 0.3% 琼脂完全培养基混合, 接种于预先铺制 0.5% 琼脂完全培养基的 6 孔培养板。每个实验组设 3 个复孔, 37 °C、5%CO₂ 温育 14 天后, 倒置显微镜观察, 并计数细胞克隆数, 计算各组细胞克隆数相对于空白组克隆数的百分率。该实验重复 3 次。

2 结果

2.1 siRNA 对 cyclin E 基因表达的抑制

MCF-7 细胞株转染 10、50、100 nmol/L siRNA-cyclin E 后, 继续培养 48 h, 用荧光定量 PCR 测定对 cyclin E 基因表达的影响。结果发现, 10、50、100 nmol/L siRNA-cyclin E 分别使 MCF-7 细胞 cyclin E 基因表达降低了 24.7%、62.5% 和 71.0%; 对照 siRNA 组的 cyclin E 基因表达与空白组无明显差异 (图 1)。

2.2 siRNA 转染后 cyclin E 表达的变化

应用 Western 印迹测定 cyclin E 表达, 发现 10、50、100 nmol/L siRNA-cyclin E 转染后, cyclin E 表达分别降低了 40.8%、66.5%、71.3% (图 2)。

2.3 siRNA 转染后对 MCF-7 细胞增殖活性的影响

经 siRNA 转染后, CCK-8 检测 96 孔板细胞在

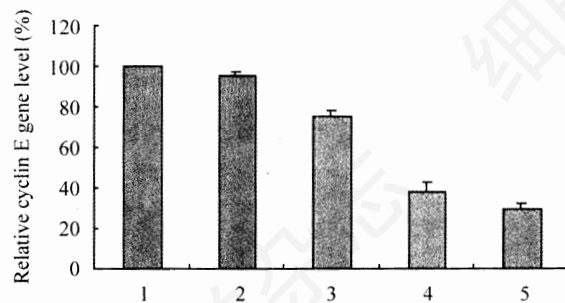


Fig.1 The influence of siRNA-cyclin E on cyclin E gene expression

1: blank; 2: control siRNA; 3: 10 nmol/L siRNA-cyclin E; 4: 50 nmol/L siRNA-cyclin E; 5: 100 nmol/L siRNA-cyclin E.

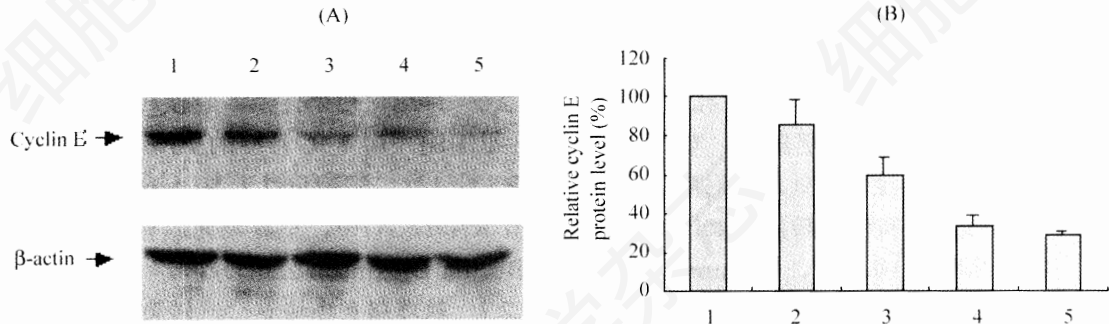


Fig.2 Western blot analysis of cyclin E protein expression

(A) Western blot analysis; (B) Quantification of Western blots normalized to the level of β -actin. 1: blank; 2: control siRNA; 3: 10 nmol/L siRNA-cyclin E; 4: 50 nmol/L siRNA-cyclin E; 5: 100 nmol/L siRNA-cyclin E.

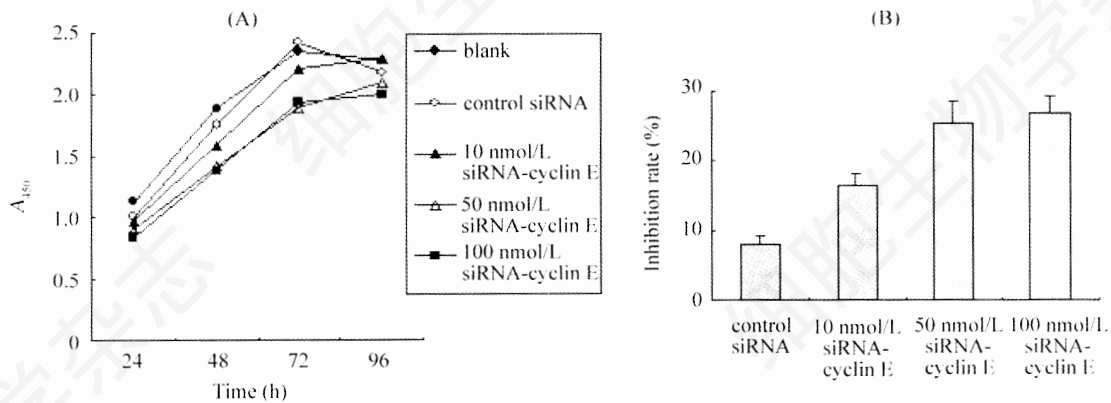


Fig.3 The influence of siRNA-cyclin E on MCF-7 cells proliferation

(A) The curve of MCF-7 cells growth; (B) Proliferation inhibition of siRNA-cyclin E on MCF-7 cells at 48 h.

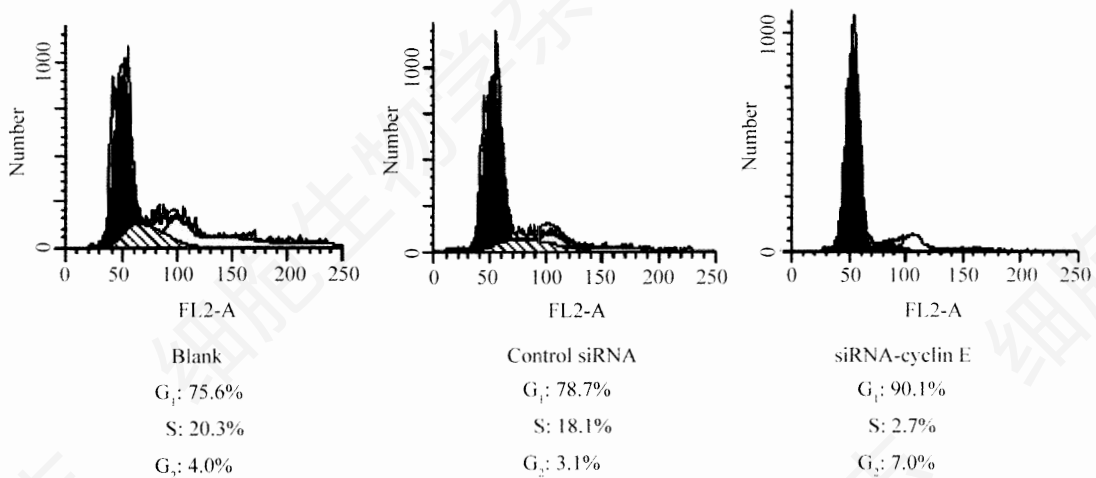


Fig.4 The influence of siRNA-cyclin E on MCF-7 cells cycle

不同时间的吸光值, 根据存活细胞数量与吸光值呈正比的原理, 绘制细胞增殖曲线, 按公式计算得知 48 h 时, 对照组对细胞抑制率为 8.0%, 而 10、50、100 nmol/L siRNA-cyclin E 对细胞抑制率分别为 16.3%、25.2% 和 26.8% (图 3)。上述结果表明, siRNA-cyclin

E 对 MCF-7 细胞增殖能力有明显抑制作用。

2.4 siRNA-cyclin E 对 MCF-7 细胞周期的影响

为进一步研究 siRNA-cyclin E 对 MCF-7 细胞周期的影响, 本研究采用流式细胞术检测了空白组、对照组及转染 50 nmol/L siRNA-cyclin E 实验组, 发

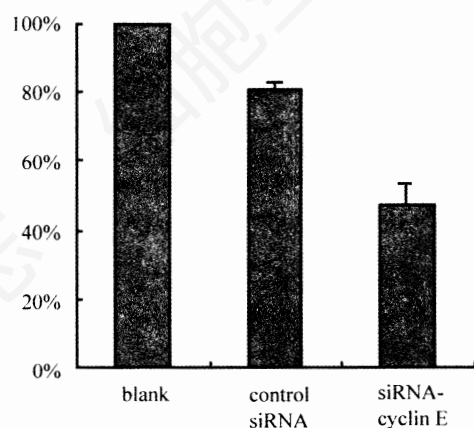


Fig.5 The influence of siRNA-cyclin E on MCF-7 cells colony formation

现空白组 G_1 期细胞占 75.6%, S 期占 20.3%; 与之相比, siRNA-cyclin E 处理组细胞中处于 G_1 期的细胞明显增多, 为 90.1%, S 期比例减少到 2.7%; 而对照 siRNA 处理的细胞周期分布无明显改变(图 4)。该结果提示 cyclin E 的抑制能使 MCF-7 细胞阻滞于 G_1 期。

2.5 siRNA-cyclin E 对 MCF-7 细胞软琼脂克隆形成影响

乳腺癌细胞中 cyclin E 受抑制后, 细胞软琼脂成集落能力明显下降, 克隆数相对于空白组的百分率从对照组细胞 80.6% 下降到 47.3% ($P < 0.05$) (图 5)。

3 讨论

细胞周期的调节是一个有序的网络控制, 网络中的某个环节失调会导致肿瘤的发生, 应用基因治疗的方法, 调控肿瘤细胞的异常细胞周期可以改变或逆转细胞恶性表型。Cyclin E 是细胞周期中重要的调节因子, 大量研究表明它在肿瘤的发生中起重要作用, 也能为许多常见的肿瘤提供预后信息^[4]。Cyclin E 过表达将缩短 G_1 期进程, 导致细胞增殖失控, 促进细胞恶性转化和肿瘤发展, cyclin E 和 ras 共转染成纤维细胞能使细胞发生转化^[5]。乳腺癌中 cyclin E 的增加不仅与肿瘤组织分级和临床分期有关, 而且与不良预后和较高死亡率有关^[6]。Cyclin E 过表达的转基因鼠中雌鼠乳腺癌的发生率为 10%, 表明 cyclin E 在乳腺癌发生中起重要作用^[7]。在乳腺癌细胞和肿瘤组织中, 还存在过度表达的 cyclin E 低分子量变异体, 后者由钙依赖性蛋白酶或胰凝乳蛋白酶裂解 cyclin E 而成, 具有更高活性^[8]。

同时 cyclin E 高表达也是肿瘤耐药的机制之一^[9]。鉴于 cyclin E 在肿瘤细胞周期中的重要调控作用, 所以, cyclin E 有望成为未来癌症治疗的靶蛋白及判断肿瘤预后的标志物。

RNAi 在基因组功能分析领域已经成为强有力的工具, 并且随着在哺乳动物细胞内的进一步应用, 人们已经开始关注 RNAi 作为一种基因治疗手段的潜力。本实验主要以 cyclin E 为靶标, 化学合成特异性 siRNA, 抑制乳腺癌 MCF-7 细胞株 cyclin E 的表达, 研究 cyclin E 在乳腺癌细胞增殖中的作用, 也为利用 RNAi 技术进行基因治疗提供实验基础。本文结果表明, siRNA-cyclin E 能有效降低乳腺癌 MCF-7 细胞株中 cyclin E mRNA 和蛋白质的表达, 仅 50 nmol/L siRNA 就足以产生显著的干涉效应。此外, 转染 siRNA-cyclin E 后, 细胞增殖受到明显抑制; 乳腺癌 MCF-7 细胞周期的分布发生改变, G_1 期细胞增多, 从空白组的 75.6% 上升到 90.1%; 相反, S 期细胞减少; 同时, 软琼脂克隆形成能力显著下降。虽然在实验中, 转染对照 siRNA 的 MCF-7 细胞其生长也受到一定的影响, 但与实验组相比, 其变化都非常微小, 我们推测这可能是由于脂质体转染试剂的微弱毒性所引起的。已有研究报道^[10,11], 在乳腺癌细胞株中, 通过导入反义 cyclin E 重组质粒, 可以抑制细胞生长, 抑制率为 17.5%, 并使细胞阻滞于 G_1 期, 细胞形成集落能力下降。但 RNAi 技术较其他单克隆抗体和反义核苷酸方法, 具有更高的效率性和特异性^[12]。我们利用 siRNA 使 cyclin E 表达最高降低了 71.3%, 对细胞生长的抑制率为 26.8%, 较反义核苷酸技术取得了更高的抑制率。Strube 等^[13]用抗 cyclin E 单链 Fv 抗体在体外也成功抑制了乳腺癌细胞的生长, 不过由于 cyclin E 存在多种异构体和 cyclin E 低分子量变异体, 使得利用单克隆抗体技术进行治疗变得困难。Li^[14]等在肝癌细胞系中, 也成功利用 siRNA 使 cyclin E 表达降低了 90.0%, 从而抑制细胞增殖和克隆形成能力, 促进细胞凋亡, 并抑制肝癌细胞在裸鼠中的致瘤能力。本文结果表明, 利用 siRNA 技术可以有效抑制乳腺癌 MCF-7 细胞 cyclin E 的表达, 使肿瘤细胞阻滞于 G_1 期, 抑制肿瘤细胞增殖, 并使肿瘤细胞软琼脂克隆形成能力下降。本文为利用 siRNA 技术进行基因治疗研究提供了一定的实验基础, 同时, cyclin E 的表达与 MCF-7 细胞增殖能力密切相关, 抑制 cyclin E 的表达可以限制 MCF-7 细胞的增

殖能力, 提示 cyclin E 在乳腺癌的发生发展过程中可能具有重要作用。

参考文献 (References)

- [1] Spruck CH *et al. Nature*, 1999, **401**: 297
- [2] Schraml P *et al. J Pathol*, 2003, **200**: 375
- [3] Yu JY *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 6047
- [4] Hwang HC *et al. Oncogene*, 2005, **24**: 2776
- [5] Haas K *et al. Oncogene*, 1997, **15**: 2615
- [6] Kim HK *et al. Eur J Surg Oncol*, 2001, **27**: 464
- [7] Bortner DM *et al. Mol Cell Biol*, 1997, **17**: 453
- [8] Akli S *et al. Cancer Biol Ther*, 2003, **2**: S38
- [9] Sgambato A *et al. Br J Cancer*, 2003, **88**: 1956
- [10] 桑建利等. *中国生物化学与分子生物学报*, 2001, **17**: 165
- [11] 黄 玫等. *中华病理学杂志*, 2000, **29**: 192
- [12] Miyagishi M *et al. Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2003, **13**: 1
- [13] Strube RW *et al. J Immunol Methods*, 2002, **263**: 149
- [14] Li K *et al. Cancer Res*, 2003, **63**: 3593

Inhibition of Cyclin E Expression and Cell Proliferation by Small Interfering RNA in Breast Cancer MCF-7 Cell Line

Lei Jiang, Ri-Shu Chen¹, Ji-Cheng Li*

(*Institute of Cell Biology, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China; ¹The Second People's Hospital of Yueqing, Yueqing 325608, China*)

Abstract To study the inhibition of cyclin E expression by small interfering RNA (siRNA), and alters cell proliferation in breast cancer MCF-7 cell line. The siRNA targeting cyclin E was chemically synthesized and transfected into MCF-7 cells by Oligofectamine, the expression of cyclin E was analyzed by quantitative PCR and Western blot, cell growth inhibition was measure with CCK-8 assay, cell cycle of the transfected cells was examined by flow cytometry, and cell colony forming ability was measured by soft-agar colony formation assay. After MCF-7 cells were transfected with 10, 50, 100 nmol/L siRNA, the expression of cyclin E mRNA was respectively suppressed with inhibition rate of 24.7%, 62.5% and 71.0%, the corresponding decrease of cyclin E protein expression was confirmed; cells in G₁ phase increased after transfecting with siRNA-cyclin E, but cells in S phase decreased; lacking cyclin E expression exhibited significantly inhibited cell proliferation and showed less colony forming ability in the breast cancer cell line MCF-7 Cells. These results indicate that siRNA-cyclin E was a useful tool for silencing cyclin E and inhibiting cell proliferation in breast cancer cell line.

Key words cyclin E; siRNA; RNAi; breast cancer

Received: August 12, 2005 Accepted: November 18, 2005

This work was supported by the Scientific Research Foundation of Zhejiang Province Health Department (No.2005B148) and Education Department

*Corresponding author. Tel: 86-571-87217451, E-mail: lijichen@zju.edu.cn