

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2006 )03-0181-04

## siRNA 封闭 *BRCA1* 基因对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖和 *Rb* 基因表达的影响

杨 浩, 崔大祥, 李 清, 黄 拓, 高 峰, 贺 蓉, 潘碧峰, 邵 君, 尤晓钢, 刘风涛( 上海交通大学微纳科学和技术研究院, 微纳制造技术国家重点实验室, 薄膜与微纳技术教育部重点实验室, 生物纳米科学与工程研究室, 上海 200030 )

[ 摘 要 ] **目的:** 研究 siRNA 封闭乳腺癌抗原相关基因 1( *BRCA1* )对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖和 *Rb* 基因表达的影响。**方法:** 采用 RNAi 技术对乳腺癌细胞 MCF-7 细胞 *BRCA1* 基因进行特异性抑制, 用阳离子脂质体与化学合成的 Pre-designed anti-*BRCA1* siRNA 构建转染复合体, 反转染 MCF-7 细胞株 48h 后提取总 RNA, 分为未处理( NT)组、阴性对照组、阳性对照组和 *BRCA1* 组, 经反转录荧光实时 PCR 检测 *BRCA1* 和 *Rb* 基因 mRNA 表达情况; 检测细胞增殖抑制率。**结果:** 与阴性对照组相比, siRNA 转染 MCF-7 细胞后实验组 *BRCA1* 基因 mRNA 水平降低了 42.3%; *Rb* 基因表达较之阴性对照组上升了 11.1%; 实验组 MCF-7 细胞增殖抑制率为( 81.9 ± 6.1 )%, 抑制作用明显强于对照组(  $P < 0.05$  )。**结论:** *BRCA1* 基因的封闭明显抑制了 MCF-7 细胞的增殖, *BRCA1* 基因与 *Rb* 基因可能存在有某种相互拮抗的作用。

[ 中图分类号 ] R730 [ 文献标识码 ] A

[ 关键词 ] siRNA; *BRCA1* 基因; 乳腺癌; *Rb* 基因

## Effect of blocking *BRCA1* gene with siRNA on proliferation of MCF-7 cells and expression of *Rb* gene

YANG Hao, CUI Da-xiang, LI Qing, HUANG Tuo, GAO Feng, HE Rong, PAN Bi-feng, SHAO Jun, YOU Xiao-gang, LIU Feng-tao ( Department of Bio-Nano Science and Engineering, Key Lab For Thin Film and Microfabrication of Ministry of Education, National Key Lab of Micro-Nano Fabrication Technology, Institute of Micro-Nano Science and Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China )

[ **Abstract** ] **Objective:** To investigate the effect of blocking *BRCA1* gene expression with siRNA on the proliferation of tumor cell line MCF-7 and *Rb* gene expression. **Methods:** RNAi was employed to specifically knock down *BRCA1* expression. MCF-7 cells were transfected with complexes constructed with lipids and chemically synthesized Pre-designed anti-*BRCA1* siRNAs. The total RNA was isolated and reversely transcribed after 48 h. The expressions of *BRCA1* and *Rb* mRNA were determined by Real-Time PCR. **Results:** Compared with negative control, transfected MCF-7 cells had a 42.3% decrease in expression of *BRCA1* mRNA and an 11.1% increase in *Rb* mRNA expression. The inhibitory rate of MCF-7 cells proliferation was ( 81.6 ± 6.1 )%. **Conclusion:** There may be some antagonistic effect between *BRCA1* gene and *Rb* gene in proliferation of tumor cells, which provides a potential target for anti-tumor gene therapy.

[ **Key words** ] siRNA; *BRCA1* gene; breast carcinoma; *Rb* gene

[ Chin J Cancer Biother, 2006, 13( 3 ): 181-184 ]

乳腺癌抗原相关基因 1( *BRCA1* )是在 1999 年克隆到的、位于染色体 1q42.1-43、全长 93 857 bp、包含 18 个外显子和 17 个内含子的一个基因<sup>[1,2]</sup>。*BRCA1* 基因编码的蛋白由 2 124 个氨基酸组成,具有 10 个糖基化位点,在 N 端的第 740 ~ 750 位氨基酸处有最强的亲水性,提示此区域可能存在有  $\alpha$ -螺旋结构<sup>[2]</sup>。迄今为止,在 GenBank 中有一些同源性基因如 *ARID4B*、*RBBP1L1* 等,但对这些基因的结构和功能还了解不多。*BRCA1* 蛋白与 *Rb* 结合蛋白 1( RBP-1 )具有 37% 的同

源性,但与 *Rb* 结合蛋白 1 定位于不同的染色体位点。因此,我们推测 *BRCA1* 可能是 *Rb* 结合蛋白家族的成员,并与其他 *Rb* 结合蛋白家族成员共有某些生物学

[ 基金项目 ] 国家重点基础研究发展( 973 )项目( 2005CB724300 -G );国家自然科学基金( 39900177, 30471599 )

[ 作者简介 ] 杨浩( 1980- ), 男, 湖北石首人, 硕士生, 研究方向为纳米诊断治疗技术、蛋白质的结构与功能。

[ 通讯作者 ] 崔大祥, Email: dxcui@sjtu.edu.cn

功能。

*Rb* 基因为非常重要的抑癌基因之一,在 14% ~ 40% 的原发性眼部肿瘤中部分或完全缺失,在其他类型肿瘤如骨肉瘤和软组织肉瘤中呈现失活状态<sup>[3-5]</sup>。*Rb* 基因编码一个相对分子质量为 105 000 的蛋白,表达于所有正常组织中,在细胞周期中起着调节细胞循环的作用<sup>[6]</sup>。本研究采用 RNAi 技术对 *BRCA1* 基因进行特异性抑制,在 mRNA 水平上定量检测 *BRCA1* 基因的抑制对肿瘤细胞增殖以及肿瘤细胞内 *Rb* 基因表达水平的影响,为全面阐明 *BRCA1* 基因的功能奠定实验基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞株与试剂

乳腺癌细胞株 MCF-7 购自上海午立生物公司,小牛血清、DMEM 为 Hyclone 公司产品,牛胰岛素为 Sigma 公司产品,OPTI-MEM 减血清培养基、0.25% 胰蛋白酶/EDTA 为 Gibco 公司产品,anti-*BRCA1* Pre-designed siRNA、siRNA 阳性对照 (GADPH)、siRNA 阴性对照、siPORT neoFX 转染试剂购自 Ambion 公司,RNeasy Mini Kit、Omniscript RT Kit 购自 Qiagen 公司,反转录随机引物购自 Toyobo 公司,SYBR Premix Ex Taq 购自 Takara 公司。

### 1.2 siRNA 反转染 MCF-7 细胞

MCF-7 细胞培养于含 10% 胎牛血清、1 nmol/L 丙酮酸钠及 10 μg/ml 牛胰岛素的 DMEM 培养液,5% CO<sub>2</sub>、37℃ 培养箱中培养 48 h 后用 0.25% 胰蛋白酶/EDTA 消化,细胞计数后以培养基稀释为  $1 \times 10^5$ /ml。按照 siPORT neoFX 转染试剂说明书及 Ovcharenko 等<sup>[7]</sup>方法,用 OPTI-MEM 减血清培养基稀释转染试剂和 siRNA 后对 MCF-7 细胞进行反转染,最终 siRNA 转染浓度为 30 nmol/L,在 6 孔板中 MCF-7 细胞接种密度为  $2.3 \times 10^5$ /孔,接种后按照常规培养条件继续培养。

### 1.3 总 RNA 提取、反转录及荧光实时 PCR 检测

1.3.1 荧光实时 PCR 检测 实验共分 4 组:NT 组(未处理)、阳性对照组(anti-GADPH siRNA 处理)、阴性对照组(乱序无关 siRNA 处理)和 *BRCA1* 组(Pre-designed siRNA 处理)。接种 48 h 后的 MCF-7 细胞用 RNeasy Mini Kit 提取总 RNA,RNA 溶于无 RNase 和 DNase 水中,紫外分光光度计测定浓度,根据 Omniscript RT Kit 说明书用随机引物进行反转录。实时 PCR 引物在 Roche ProbeFinder(<http://www.universalprobelibrary.com>)在线引物工具辅助下设计。*BRCA1* 基因引物序列,上游引物:5'-TACCAAATCTCCGCAAGG-3',下游引物:5'-TCATATTTCCAGGTCCGACA-3',其中

下游引物设计为跨越一段长为 2 419 bp 的内含子;*Rb* 基因引物序列,上游引物:5'-ACTCTTCAGCAAATTG-GAAAGG-3',下游引物:5'-CACCAATGCAGAATT-TATTTTCAGT-3',其中上游引物设计为跨越一段长为 2 622bp 的内含子,产物跨越一段长为 1 091 bp 的内含子;GAPDH 内参基因引物序列,上游引物:5'-GAAG-CTGAAGGTCCGAGTC-3',下游引物:5'-GAAGATGCT-GATGGGATTTC-3',该序列引用自 Gutala RV<sup>[8]</sup>。按照 Takara 公司 SYBR Premix Ex Taq 试剂说明书进行荧光实时 PCR,取 2 μl 反转录产物,上、下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μl,SYBR Premix Ex Taq(2 × )10 μl,dH<sub>2</sub>O 补足至 20 μl,在 ABI Prism 7 000 上进行实时 PCR,循环条件为:95℃ 预变性 10 s;95℃ 5 s,60℃ 31 s,两步法扩增 40 个循环,融解曲线分析从 70℃ 至 95℃,同时,荧光实时 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.3.2 荧光实时 PCR 数据分析 荧光实时 PCR 数据采用比较 Ct 法进行分析处理,计算公式如下: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , $\Delta\Delta Ct = (\text{实验组 mRNA Ct} - \text{实验组 GAPDH mRNA Ct}) - (\text{阴性对照组 mRNA Ct} - \text{阴性对照组 GAPDH mRNA Ct})$ ,计算公式所得结果表示实验组目的基因 mRNA 表达量对阴性对照组目的基因 mRNA 表达量的比值<sup>[9-10]</sup>。

### 1.4 细胞增殖测定

MCF-7 细胞分为 3 组:NT 组(未处理)、阴性对照组(乱序无关 siRNA 处理)和 *BRCA1* 组(Pre-designed siRNA 处理),接种于 12 孔板上, $1 \times 10^5$ /孔,反转染及培养条件同 1.2,每组设 3 个复孔,3 d 后用 0.25% 胰蛋白酶/EDTA 消化,细胞计数,观察抑制 *BRCA1* 基因表达后对细胞增殖的影响。

细胞增殖抑制率(%) = (阴性对照组细胞数 - 阳性对照组细胞数) / 阴性对照组细胞数 × 100%。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS 11.0 软件包进行分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,均数的比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 荧光实时 PCR 引物的验证

荧光实时 PCR 产物通过融解曲线分析显示,GAPDH 扩增产物峰在 84.1℃ 处;*BRCA1* 扩增产物峰在 80.9℃ 处;*Rb* 扩增产物峰在 77℃ 左右。3 对引物的扩增产物峰均为单一峰,无模板对照均无扩增产物峰。1% 琼脂糖凝胶电泳结果均为单一扩增条带(图 1)。

### 2.2 siRNA 转染效果

取同等量总 RNA 进行反转录,取同等量 cDNA 对阳性对照组 *GAPDH* 基因 mRNA 进行荧光实时

PCR 检测,结果表明阳性对照组 Ct 值为( 19. 50 ± 0. 14 ),较之 NT 组 Ct 值( 17. 2 ± 0. 09 )上升约为 2. 3 个 Ct; 根据模板浓度每提高 1 倍下降 1 个 Ct 值,可计算出阳性对照组 *GAPDH* 组 *GAPDH* 基因的 mRNA 水平约为 NT 组的 20. 35%,证明阳性对照组 MCF-7 细胞中的 *GAPDH* 基因已被显著抑制(  $P < 0. 05$  ),转染效果较好。

### 2.3 *BRCAA1* 和 *Rb* 基因 mRNA 表达水平

转染 48 h 后分离各组细胞的总 RNA,经紫外分光光度计定量后,均用无 RNase 和 DNase 水稀释至 150 μg/L 浓度,取 2 μl 作为模板反转录,2 μl 反转录产物进行 20 μl 体系的实时 PCR 检测。结果显示,*BRCAA1* 实验组的 *BRCAA1* 基因 mRNA( 777 FI)为阴性对照组( 1 338 FI)的 58%,*Rb* 基因 mRNA( 870 FI)较阴性对照组( 784 FI)升高了 11%(  $P < 0. 05$  )。

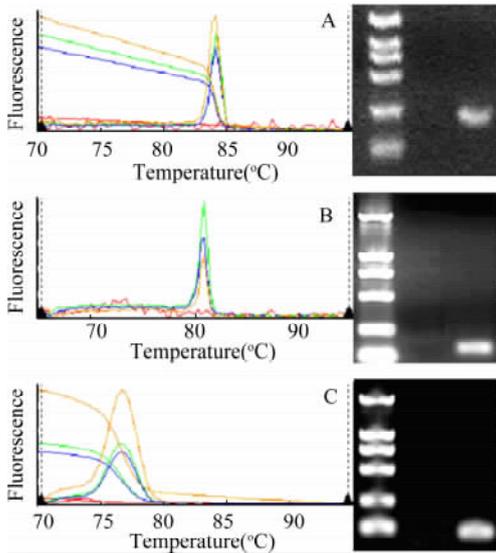


图 1 实时荧光 PCR 产物融解曲线及凝胶电泳分析

Fig 1 Melting curve and gel electrophoresis analysis of real time PCR products

A: *GAPDH*; B: *BRCAA1*; C: *Rb*

### 2.4 抑制 *BRCAA1* 基因对细胞增殖影响

反转染 siRNA 3 d 后,0. 25% 胰酶/EDTA 消化细胞,计数结果表明,采用 siRNA 抑制 *BRCAA1* 基因后对 MCF-7 细胞的抑制率为( 81. 9 ± 6. 1 )%,*BRCAA1* 组与阴性对照组间细胞数量差异有显著意义,  $P < 0. 05$ 。

## 3 讨论

本研究首先对 *BRCAA1* 这一新基因进行了同源性对比,对该基因的功能进行预测,然后采用 RNAi 技术对该基因进行特异性抑制来验证预测。与 RBP-1 相比,在 *BRCAA1* 的氨基酸组成中,推测的 Tudor 结构域

享有 80% 的同源性;ARID 结构域为 83% ( 图 2 );Chromo 结构域则有 75% 同源性。其中,Tudor 结构域为一进化上保守的结构,具有甲基结合特性,但具体功能不明<sup>[11]</sup>;ARID 结构域在一些实验中被证实与介导蛋白-DNA 相互作用相关<sup>[12]</sup>;Chromo 结构域则在异染色质功能的外显性调节和常染色质基因表达中起着主导作用<sup>[13]</sup>。此外,*BRCAA1* 蛋白也缺乏在 RBP-1 中的 Lx-Cx E 结构,此结构与 Rb 蛋白口袋结构结合相关。RBP-1 蛋白中的抑制结构域 R1 和 R2 在 *BRCAA1* 蛋白序列中同源性较低,分别只有 58% 和 44%<sup>[14]</sup>。因此,推测 *BRCAA1* 基因在肿瘤组织中的高表达可能扮演着与 RBP-1 完全不同的角色。

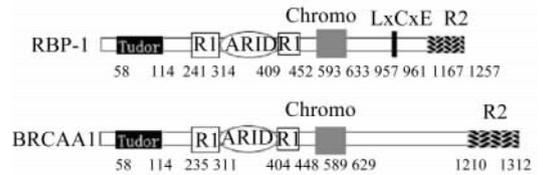


图 2 *BRCAA1* 与 RBP-1 蛋白结构对比

Fig. 2 Comparison of protein structures between *BRCAA1* and RBP-1

由于 *BRCAA1* 基因作为一种乳腺癌相关抗原基因,首先在乳腺癌组织中差异筛选出来。过去的研究中已经证实 *BRCAA1* 基因在患者乳腺癌组织中高表达,其产物具有独特的抗原性<sup>[1-2]</sup>。本实验用 siRNA 特异性地降低了 MCF-7 乳腺癌细胞系中 *BRCAA1* 基因的表达,细胞增殖实验结果初步证实,肿瘤细胞的增殖受到了显著抑制,表明该基因的表达状态与肿瘤细胞的增殖相关联。而且,在对 *Rb* 基因的表达量进行检测发现,随着 *BRCAA1* 基因的抑制,*Rb* 基因的表达呈现出上升趋势。由此,本研究推测,*BRCAA1* 基因与 *Rb* 基因之间存在拮抗关系,*BRCAA1* 基因能够调节 *Rb* 基因的表达水平,*Rb* 基因介导了肿瘤细胞增殖的抑制,进一步的研究证实工作正在进行。

总之,本研究基于以往鉴定的肿瘤抗原,结合同源性对比和 RNAi 基因抑制技术初步验证了我们对 *BRCAA1* 基因推测的生物学功能,即与 *Rb* 基因存在拮抗关系。但是,到目前为止,本研究对 *BRCAA1* 基因在肿瘤细胞增殖中的作用机制尚不清楚,特别是氨基酸序列中几个主要的推定结构域的功能,相关研究较少。因此,进一步的研究将集中在阐明 *BRCAA1* 基因通过何种途径、以何种方式在肿瘤细胞的增殖中起作用,以及确定 *BRCAA1* 蛋白上推定的几个主要结构域的具体生物学功能。

[ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] 崔大祥,高天文,金桂秋,等. BRCAA1 基因克隆、染色体定位与特征性分析[ J ]. 自然杂志, 2004, 25( 6 ): 365-368.

[ 2 ] Cui D, Jin G, Gao T, *et al.* Characterization of BRCAA1 and its novel antigen epitope identification[ J ]. *Cancer Epidemiol, Biomarkers & Prev*, 2004, 13( 7 ):1136-1145.

[ 3 ] Lee WH, Bookstein R, Hong F, *et al.* Human retinoblastoma susceptibility gene: Cloning, identification and sequence[ J ]. *Science*, 1987, 235( 4794 ): 1394-1399 .

[ 4 ] Friend SH, Bernards R, Rogelj S, *et al.* A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma[ J ]. *Nature*, 1986, 323 ( 6089 ): 643-646.

[ 5 ] Fung YK, Murphree AL, T'Ang A, *et al.* Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene[ J ]. *Science*, 1987, 236( 4809 ):1657-1661.

[ 6 ] Strohmeyer T, Reissmann P, Cordon-Cardo C, *et al.* Correlation between retinoblastoma gene expression and differentiation in human testicular tumors[ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88 ( 15 ): 6662-6666.

[ 7 ] Ovcharenko D, Jarvis R, Hunnicke-Smith S, *et al.* High-throughput RNAi screening *in vitro*: From cell lines to primary cells[ J ]. *RNA* 2005, 11( 6 ): 985-993.

[ 8 ] Gutala RV, Reddy PH. The use of real-time PCR analysis in a gene expression study of Alzheimer 's disease post-mortem brains [ J ]. *J Neurosci Methods*. 2004, 132( 1 ):101-107.

[ 9 ] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[ J ]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29( 9 ):2002-2007.

[ 10 ] Peirson SN, Butler JN, Foster RG. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis[ J ]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31( 14 ): e73.

[ 11 ] Cote J, Richard S. Tudor domains bind symmetrical dimethylated arginines[ J ]. *J Biol Chem*, 2005, 280( 31 ):28476-28483.

[ 12 ] Patsialou A, Wilsker D, Moran E. DNA-binding properties of ARID family proteins[ J ]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33( 1 ): 66-80.

[ 13 ] Cavalli G, Paro R. Chromo-domain proteins: linking chromatin structure to epigenetic regulation[ J ]. *Curr Opin Cell Biol*. 1998, 10( 3 ):354-360.

[ 14 ] Binda O, Roy JS, Branton PE. RBP1 family proteins exhibit SU-5698-dependent transcriptional repression and induce cell growth inhibition reminiscent of senescence[ J ]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26( 5 ): 1917-1931.

[ 收稿日期 ] 2006 - 06 - 02

[ 修回日期 ] 2006 - 06 - 12

[ 本文编辑 ] 韩 丹

· 读 者 · 作 者 · 编 者 ·

### 正确使用数的修约规则

在生物医学领域的各种研究中,对实验测定和计算所得的数值往往都要进行修约。过去习惯使用“四舍五入法”进行数的修约,该方法是不正确的,我们应将其废除。根据国家标准《出版物上数字用法的规定》,数的修约应遵照“四舍六入”的法则进行,具体介绍如下:

( 1 )数的修约规则的简明口诀: 4 舍 6 入 5 看后, 5 后有数便进 1, 5 后为 0 看左数,左数奇进偶舍弃。

( 2 )数的修约操作示例见表 1。

表 1 数的修约操作示例

口 诀	示 例	
	已知数	修约数( 设保留 1 位小数 )
4 舍 6 入 5 看后	5. 7418	5. 7
	5. 7618	5. 8
5 后有数便进 1	5. 7518	5. 8
5 后为 0 看左数		
左为奇数要进 1	5. 7500	5. 8
右为偶数全舍弃	5. 6500	5. 6
	5. 0500	5. 0( 0 为偶数 )
无论舍弃多少位	5. 74546	5. 7( 不是由 5. 7455
均须一次修完毕		→5. 746→5. 75→5. 8 )