

[文章编号] 1007-385X(2006)05-0367-04

靶向 siRNA 对人直肠癌 Colo320 细胞的抑制作用

黄浩^{1,2}, 关江锋², 余南才², 刘倩², 易艳东², 马威² (1. 华中科技大学同济医学院基础医学院病原生物学系, 武汉 430030; 2. 武汉市第一医院中心实验室, 武汉 430022)

[摘要] **目的:** 利用小分子干扰 RNA (siRNA) 技术抑制人直肠癌 Colo320 细胞 *c-myc* 基因的表达, 探讨 *c-myc* 基因在人直肠癌 Colo320 细胞中的作用。 **方法:** 设计人直肠癌 Colo320 细胞基因特异性小分子干扰 RNA, 用体外转录方法合成人直肠癌 Colo320 细胞的小分子干扰 RNA 并转染该细胞, 培养 48~96 h 后, 收集细胞 RNA, 应用实时荧光定量 PCR 方法检测转染细胞中 *c-myc* 基因 mRNA 水平变化, Western blotting 检测 *c-myc* 表达的蛋白, 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法和集落形成试验检测细胞增殖活性。 **结果:** 转染 siRNA 后, 与对照组相比, 实验组 pGensil-*c-myc*-1、2、3、4 的 *c-myc* 基因 mRNA 水平明显降低, *c-myc* 的蛋白表达也明显降低。 MTT 法和集落形成试验检测表明, 实验组的细胞增殖速率明显低于对照组。 **结论:** 在人直肠癌 Colo320 细胞中存在 RNA 干扰的机制, 特异性 siRNA 能够有效地抑制 *c-myc* 基因的表达, 从而抑制 Colo320 细胞的增殖。

[关键词] 小分子干扰 RNA; 人直肠癌; *c-myc* 基因

[中图分类号] R37 **[文献标识码]** A

Inhibition of *c-myc* expression in human rectal cancer cell line Colo320 by siRNA technique

HUANG Hao^{1,2}, GUAN Jiang-feng², YU Nan-cai², LIU Qian², YI Yan-dong², MA Wei² (1. Department of Pathogenic Biology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Center of Experimental Medicine, the First Hospital of Wuhan, Wuhan 430030, China)

[Abstract] **Objective:** To inhibit *c-myc* gene expression in human rectal cancer cell line Colo320 by small interfering RNA technique, so as to assess the role of *c-myc* in Colo320 cells. **Methods:** The *c-myc* gene specific siRNA was designed and prepared by *in vitro* transcription. The prepared *c-myc* siRNA was transfected into Colo320 cells. After cultured for 48-96 hours, the cells were harvested. *c-myc* mRNA and protein level was monitored by fluorescence real time reverse transcription-poly merase chain reaction, *c-myc* protein expression was detected by Western blotting, and the cell proliferation activities were assayed by tetrazolium bromide (MTT) colorimetry and clone test. **Results:** Compared with control group, the mRNA of pGensil-*c-myc*-1, 2, 3, and 4 in Colo320 cells was obviously decreased in *c-myc* siRNA transfected cells. *c-myc* protein expression was also decreased obviously. MTT assay and clone test showed that *c-myc* siRNA apparently slowed down the proliferation of Colo320 cells. **Conclusion:** Our results suggest that RNA interference exists in Colo320 cell line; *c-myc* siRNA can specifically inhibit the expression of *c-myc* gene in Colo320 cells, subsequently inhibits the proliferation of Colo320 cells.

[Key words] small interfering RNA; human rectal cancer; *c-myc* gene

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(5): 367-370]

原癌基因 *c-myc* 的蛋白产物是一种 DNA 磷酸化蛋白质, 是调节细胞生长分化的重要转录激活因子。许多研究表明, *c-myc* 基因表达失控在肿瘤发生中起关键作用^[1,2]。已经证实人直肠癌 Colo320 细胞存在 *c-myc* 基因高表达的情况^[3]。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 能特异性抑制基因表达, 是一种转录后基因表达调控机制, 目前已被广泛应用于功能基因组和基因

治疗的研究。本研究采用体外合成的小分子 RNA, 干扰抑制人直肠癌 Colo320 细胞中 *c-myc* 内源性的表达, 探讨 *c-myc* 基因对人直肠癌 Colo320 细胞的调节作用。

[基金项目] 湖北省攻关计划项目 (编号 2006AA301B66-3)

[作者简介] 黄浩 (1972-), 男, 武汉人, 主治医师, 博士, 主要从事病原生物学与肿瘤分子生物学方面研究

[通讯作者] 黄浩, E-mail: whuanghao10@yahoo.com.cn

1 材料与方 法

1.1 材 料

人直肠癌细胞株 Colo320 购置于武汉大学生命科学院, *Bam*H I, *Hind* III 购置凌飞生物有限公司, SYBR Green 荧光染料试剂盒购置晶美生物有限公司, 梭华 - Sofast™/DNA 试剂盒购置武汉大风生物有限公司。

1.2 细胞培养

人直肠癌细胞株 Colo320 培养于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中, 37℃、5% 的 CO₂ 条件下培养, 0.3% 的胰酶消化和传代。

1.3 siRNA 合成和真核表达载体的构建

根据 *c-myc* 基因序列 (GenBank NO. K002467) siRNA 设计规则设计 4 对 siRNA, 设计基因靶点分别于 *c-myc* 基因的第 600、720、1 734、1 762 位点, 靶序列分别为: MYC₁ AACTATGACCTCGACTACGAC; MYC₂ AAGAAATTCGAGCTGCTGCCC; MYC₃ AAGCCCCCAAGG TAGTTATC; MYC₄ AAGCCACAGCATAATCCTGT。另设计一对对照 siRNA, 由武汉市晶赛生物技术有限公司合成。将 siRNA 经 *Bam*H I, *Hind* III 双酶切插入真核表达载体 pGensil-1 构建的质粒分别命名为: pGensil-*c-myc*-1、2、3、4 和 pGensil-*c-myc*-HK (对照质粒)。

1.4 阳离子聚合物 (梭华-Sofast™/DNA 试剂盒) 介导的细胞转染

细胞培养至 40% ~ 60% 汇合, 配制不同浓度的 pGensil-*c-myc*-1、2、3、4 (终质量浓度分别为 1、7.5、10、12.5、15 ng/ml) 梭华-Sofast™/DNA 复合物, 进行转染, 具体操作步骤见试剂盒说明书。

1.5 集落形成实验

取以上各组转染细胞培养 48 h, 悬浮于 40℃ 预热的 10% FCS 的 DMEM 培养液中, 接种于 24 孔培养板, 吸取预热的 1.2% 琼脂 125 μl, 于 24 孔板中混匀。自然凝固后, 置 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 8 ~ 10 d, 取软琼脂层, 置于载玻片上, 镜下观察到细胞数在 50 个以上为一集落, 计算集落形成率。

1.6 MTT 法检测细胞增殖

收集以上各组转染细胞, 用含 10% 小牛血清的培养液配成单个细胞悬液, 调整细胞密度为 1.0 × 10⁵/ml 接种到 96 孔板, 置 37℃、5% CO₂ 培养 4 h, 每孔加 MTT 溶液 (5 mg/ml) 20 μl, 继续孵育 5 d, 终止培养, 弃孔内上清液。每孔加 100 μl DMSO, 振荡 10 min, 使结晶充分溶解, 540 nm 检测各孔光密度值, 连续检测 5 d, 以时间为横坐标, 光密度值为纵坐标绘制生长曲线。

1.7 逆转录反应

5 000 r/min 离心 10 min, 收集各组转染细胞, 预冷

PBS 洗涤 1 次后, 用 Trizol 一步法提取细胞总 RNA, 取 1 μg 细胞总 RNA, 加入 Oligo primer (0.5 μg/μl) 1 μl, 去离子水 12 μl 混匀, 70℃ 5 min。0℃ 冰水浴立刻终止, 5 000 r/min 离心 4 s。加入 5 × reaction buffer 4 μl、Ribonuclease 酶抑制剂 (20 U/μl) 1 μl、dNTPs (10 μmol/2 μl) 混匀, 37℃ 5 min, 再加 Reverse Transcriptase (200 U/μl) 1 μl, 42℃ 60 min, 再 70℃、10 min。0℃ 终止后, cDNA -20℃ 冻存。

1.8 荧光定量检测 *c-myc* mRNA 的表达

采用 SYBR Green 荧光染料法针对 *c-myc* 的 mRNA 进行实时 PCR 检测, 吸取逆转录反应产物 10 μl 引物上下游各 2 μl, 缓冲液 10 μl、ddH₂O 4 μl、ROX 荧光燃料 1 μl, 预变性 95℃ 10 min、94℃ 10 s、56℃ 30 s 延伸 72℃ 30 s、35 次循环, 72℃ 5 min。设置阴性对照和 β-actin 内参照, 引物序列: F 5'-AGCTGCT-TAGACGCTGGATTT-3' R 5'-CGAGGTCAAGTTCCTGTT-GGT-3'

1.9 Western blotting 定量检测 *c-myc* 蛋白

转染细胞如 1.4, 收集转染及正常的细胞, 细胞裂解液裂解, 取 20 μl 裂解样品液, 进行 SDS-PAGE 电泳, 表达产物电转移至硝酸纤维素膜上, 进行 Western blotting 反应, 通过 BandScan 5.0 软件对杂交图像进行分析, 以 β-actin 作为定量 Marker。

2 结 果

2.1 siRNA 对 Colo320 细胞转染效率的影响

阳离子聚合物与 pGensil-*c-myc*-4 共转染, 60 min 时转染效率达峰值, 峰值达 70%, 此后降低不显著, 240 min 时被转染的细胞比率仍维持于 50%。由于空白对照组不含荧光标记的转染物质, 故其转染效率为 0 (图 1)。同时发现 siRNA 的转染效率也随 siRNA 浓度的增加而升高, 增加到 15 ng/ml 时转染效率最高。

2.2 转染 siRNA 对细胞增殖的抑制

2.2.1 MTT 法检测转染细胞的生长曲线 由图 2 可以看出, 转染了 pGensil-*c-myc*-1、2、3、4 和 pGensil-*c-myc*-HK 各组的细胞较对照组细胞增殖缓慢, 第 3 天时抑制的效果最明显, 其中转染 pGensil-*c-myc*-4 的 Colo320 细胞抑制最显著。

2.2.2 集落形成实验观察转染细胞生长情况 通过集落形成试验观察细胞集落形成, 结果显示, 对照组细胞与 *myc*-HK 组细胞形成的集落直径大, 细胞饱满, 细胞间隙小, 细胞生长旺盛。而转染组细胞的细胞集落直径明显小于对照组, 细胞间隙大, 细胞增殖受到抑制, 其中转染 pGensil-*c-myc*-4 组细胞变化尤为明显。实验结果表明转染 siRNA 可以抑制细胞的增殖 (图 3)。

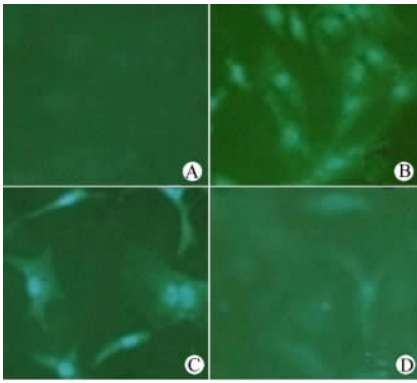


图 1 荧光标记 pGensil-c-myc-4 在 Colo 320 细胞中的时相分布 (× 100)

Fig. 1 Chron-phase distribution of fluorescence labeling pGensil-c-c-myc-4 in Colo320 cells (× 100)

A: Blank control siRNA transfected; B: pGensil-c-myc-4 transfected after 60 min; C: pGensil-c-myc-4 transfected after 120 min; D: pGensil-c-myc-4 transfected after 240 min

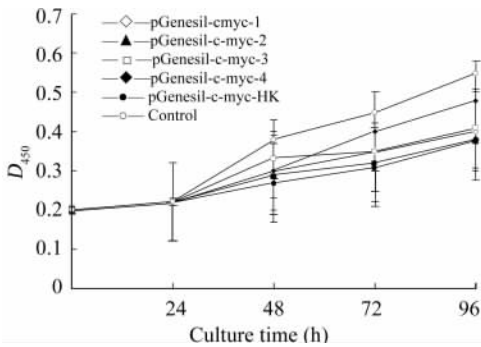


图 2 转染 siRNA 对 Colo320 细胞增殖的影响

Fig. 2 Effects of siRNA transfection on cell Colo320 proliferation

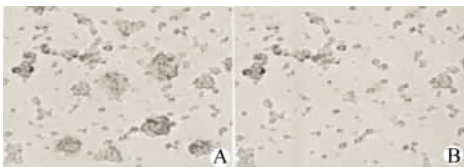


图 3 转染 pGensil-c-myc-4 对 Colo 320 细胞集落形态的影响(× 100)

Fig. 3 Effect of pGensil-c-myc-4 transfection on morphology of Colo 320 cell clone

A: Morphology of Colo 320 cell clone; B: Morphology of Colo 320 cells 24 h after transfected by pGensil-c-myc-4

2.3 实时荧光定量 PCR 检测转染 siRNA 对 Colo320 细胞 *c-myc* mRNA 的影响

Colo320 细胞转染 pGensil-c-myc-1、2、3、4、24 h 后, 收集细胞抽提总 RNA, 应用荧光定量实时 RT-PCR 来

检测转染组与对照组 *c-myc* 的 mRNA 水平变化, 转染 pGensil-c-myc-1、2、3、4 各组平均 CT 值为分别为 28.23、30.12、32.43、34.65, 转染 pGensil-c-myc-HK 和对照细胞平均 CT 值为分别为 25.31、26.35(图 4)。结果表明转染了 pGensil-c-myc-1、2、3、4 各组的 *c-myc* mRNA 表达水平比对照组明显降低, 4 个不同 siRNA 的抑制效果有差别, 转染 pGensil-c-myc-4 抑制效率最高。

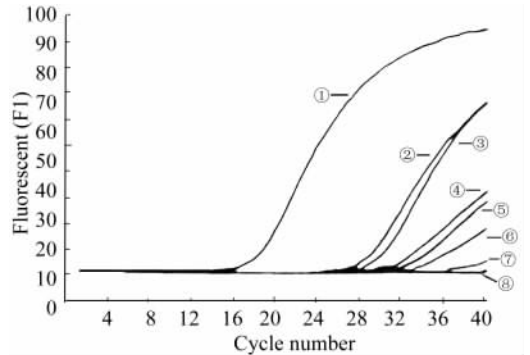


图 4 实时荧光定量 PCR 检测各组转染细胞 *c-myc* mRNA 的表达

Fig. 4 Expression of *c-myc* gene in each group by real time fluorescent PCR

①: β -actin; ②: Control group; ③: pGensil-c-myc-HK group; ④: pGensil-c-myc-1 group; ⑤: pGensil-c-myc-2 group; ⑥: pGensil-c-myc-3 group; ⑦: pGensil-c-myc-4 group; ⑧: Negative group

2.4 Western blotting 检测转染 siRNA 对 Colo320 细胞 *c-myc* 蛋白影响的表达

由图 5 可知, 没有转染的正常 Colo320 细胞和转染了 pGensil-c-myc-HK、pGensil-c-myc-1、2、3、4 质粒(各种质粒分别转染 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 Colo320 细胞均可见 β -actin 略下方清晰杂交带, 将杂交带进行 Band-Scan5.0 软件分析, 以 β -actin 为内参照定量 Marker, 得出结果分别为 11.84、11.32、1.14、4.43、1.14、0.51, 转染了 4 种真核表达质粒的细胞表达的 *c-myc* 蛋白量均显著降低, 其中转染 pGensil-c-myc-4 降低最显著。

3 讨论

有关原癌基因与细胞周期调控的研究是近年来细胞生物学研究的热点之一, 取得了令人瞩目的成果。*c-myc* 是目前研究较多的原癌基因之一, 编码关键性调控蛋白, 在生理状态下不表达或仅限制性低表达, 参与调控正常细胞的增殖和分化; 在受到异常刺激激活后, 其出现高表达, 导致细胞生长、分化凋亡等异常改变, 与许多肿瘤的发生和发展有关^[4-7]。

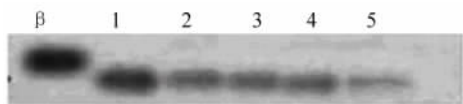


图 5 Western blotting 检测各组转染细胞 c-myc 蛋白的表达

Fig.5 Detection of c-myc protein expression in each group by Western blotting

β:β-actin; 1: Colo320 cell group; 2: pGensil-c-myc-1group; 3: pGensil-c-myc-2 group; 4: pGensil-c-myc-3 group; 5: pGensil-c-myc-4 group

哺乳动物细胞 RNA 干扰机制的发现为基因功能的研究提供了一个新的方法,目前已被广泛用于基因组和基因治疗的研究。本研究以 *c-myc* 为靶基因,根据 Elbashir 等^[8-10]提出的设计原则,设计了 4 条 siRNA 序列,并成功克隆至空载体 pGenesil 中,构建重组体 pGensil-c-myc-1、2、3、4。进而再将 *c-myc* 特异性 siRNA 转染人直肠癌 Colo320 细胞中,利用 MTT 法测定了转染了 pGensil-c-myc-1、2、3、4 各组细胞的生长曲线,结果显示转染 pGensil-c-myc-1、2、3、4 各组细胞的增殖活性明显降低。同时,本实验采用实时荧光定量 PCR 检测了转染 pGensil-c-myc-1、2、3、4 各组的 *c-myc* 表达水平,结果发现 4 个不同的 siRNA 其抑制效果有差别。通过 Western blotting 及 BandScan5.0 软件分析,发现表达 *c-myc* 蛋白量均有显著性差异,转染 pGenesil - *c-myc* 4 组的 *c-myc* 蛋白量降低最为显著,转染各种浓度的质粒的 *c-myc* 蛋白表达量均明显下降,进一步证实了构建的 4 种 siRNA 真核表达载体均具有有效性,其中,pGenesil - *c-myc* 4 的效果最好。

本实验结果表明:本实验成功地构建了 siRNA 重组体 pGensil-c-myc-1、2、3、4,在转染人直肠癌 Colo320 细胞后能显著抑制细胞增殖和 *c-myc* 表达,研究同时也证明在人直肠癌 Colo320 细胞中存在 RNA 干扰的机制,特异性 siRNA 能够有效地抑制 *c-myc* 基因的表达,

这为下一步诱导其对化疗药物的敏感性以及动物体内实验提供了实验基础,为人直肠癌的生物治疗探索了一条新的途径。

[参 考 文 献]

[1] Fire A, Xu S, Montgomery MK, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in caenorhabditis elegans [J]. Nature, 1998, 391(6669): 806-811.
 [2] Mello CC, Conte D Jr. Revealing the world of RNA interference [J]. Nature, 2004, 431(7006): 338-342.
 [3] Jemal A, Tiwari RC, Murray T, *et al.* Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2004, 54(1): 8-29.
 [4] 张宝春, 单易非. *c-myc* 反义寡核苷酸对白血病细胞凋亡的影响[J]. 复旦学报: 医学版, 2001, 28(1): 13-16.
 [5] Sui G, Soohoo C, Affarel B, *et al.* A DNA vector- based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 99(8): 5515-5520.
 [6] Ou XM, Chen K, Shih JC. Monoamine oxidase A and repressor R1 are involved in apoptotic signaling pathway[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(29): 10923-10928.
 [7] Marderosian M, Sharma A, Funk AP, *et al.* Tristetraprolin regulates cyclin D1 and *c-Myc* mRNA stability in response to rapamycin in an Akt-dependent manner via p38 MAPK signaling[J]. Oncogene, 2006, [in press]
 [8] Liu J, Narasimhan P, Lee YS, *et al.* Mild hypoxia promotes survival and proliferation of SOD2-deficient astrocytes via *c-Myc* activation[J]. J Neurosci, 2006, 26(16): 4329-4337.
 [9] Feng Y, Lee N, Fearon ER. TIP49 regulates beta-catenin-mediated neoplastic transformation and T-cell factor target gene induction via effects on chromatin remodeling[J]. Cancer Res, 2003, 63 (24): 8726-8134.
 [10] Alarcon-Vargas D, Ronai Z. *c-Jun*-NH2 kinase (*JNK*) contributes to the regulation of *c-Myc* protein stability[J]. J Biol Chem, 2004, 279(6): 5008-5016.

[收稿日期] 2006 - 06 - 15 [修回日期] 2006 - 09 - 10
 [本文编辑] 郁晓路

· 读 者 · 作 者 · 编 者 ·

文稿中统计学符号规范化书写的要求

本刊严格遵守国家标准 GB 3358 - 93《统计学术语》的有关规定。为此,请作者书写统计学符号时注意以下要求:(1)样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} ,不用大写 X,也不用 Mean 或 M;(2)标准差用英文小写 s ,不用 SD;(3)标准误用英文小写 s_x ,不用 SE;(4) *t* 检验用英文小写 t ;(5) *F* 检验用英文大写 F ;(6)卡方检验用希腊小写 χ^2 ;(7)相关系数用英文小写 r ;(8)自由度用希腊小写 ν ;(9)样本数用英文小写 n ;(10)概率用英文大写 P ;(11)以上符号 \bar{x} 、 s 、 s_x 、 t 、 F 、 χ^2 、 r 、 ν 、 n 、 P 均为斜体。请作者注意遵照执行。

(本刊编辑部)