

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.03.004

· 基础研究 ·

四环素调控 livin RNA 干扰系统对肺癌移植瘤生长的影响

李鸿茹^{1,2}, 涂洵威¹, 翁丽红¹, 陈榆生^{1,2} (1. 福建医科大学省立临床医学院 福建省立医院 呼吸与危重症医学科, 福建 福州 350001; 2. 福建省呼吸四病研究室, 福建 福州 350001)

[摘要] **目的:** 探讨四环素调控(Tet-on)livin RNA 干扰系统对肺癌移植瘤生长的影响, 以期寻找更优的肺癌干预调控系统。**方法:** 构建 Tet-on livin shRNA 慢病毒载体, 在裸鼠右上肢背部皮下注射肺腺癌 A549 株细胞建立肺癌裸鼠皮下移植瘤模型, 以 Tet-on livin shRNA 慢病毒载体注射瘤体干预 livin 表达, 并以四环素腹腔注射诱导处理, 了解 Tet-on 调控 livin RNA 干扰效果并观察其抑制肺癌细胞增殖情况。**结果:** 经四环素诱导, Tet-on livin RNA 组移植瘤组织中 livin 蛋白表达明显低于 CTL 组及 Tet-on-NC 组, 且 Tet-on-livin RNA 组瘤体质量明显低于 CTL 组及 Tet-on-NC 组[(5.31±0.86) vs (8.22±0.63)、(7.17±0.54) g, $P<0.05$]; 提示该调控系统可显著下调 livin 的表达, 并抑制肺癌皮下移植瘤的生长, 且该调控系统毒副作用小, 未发现裸鼠死亡。**结论:** Tet-on livin RNA 干扰系统在四环素诱导下可抑制肺癌生长, 具有靶向性、可调控的特点, 为以 livin 蛋白为靶点的肺癌靶向治疗研究提供重要的研究工具。

[关键词] livin 基因; 四环素调控; RNA 干扰; 肺癌; A549 细胞; 动物模型

[中图分类号] R734.2; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)03-0236-04

Suppressive effect of Tet-on mediated livin RNA interference on growth of lung carcinoma xenograft in a rat model

LI Hongru^{1,2}, TU Xunwei¹, WENG Lihong¹, CHEN Yusheng^{1,2} (1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Fujian Provincial Hospital, Provincial Clinical Medical College, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian, China; 2. Research Institute of Four Respiratory Diseases of Fujian Province, Fuzhou 350001, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of tetracycline- (Tet-on) mediated livin RNA interference on growth of lung carcinoma xenografts, and find a better regulatory way to interfere the development on lung cancer. **Methods:** livin shRNA lentiviral vectors were constructed; and the lung cancer A549 cells were subcutaneously injected into right upper back of nude mice to establish xenograft model. The livin shRNA lentiviral vectors were injected into xenografts to interfere the expression of livin, then tetracycline was injected intraperitoneally for the induction. The suppressive effect of Tet-on mediated livin RNA interference efficiency was investigated and lung cancer xenograft development was observed. **Results:** After the induction with Tet-on, livin gene expression was significantly inhibited by livin shRNA compared with the control group and Tet-on-NC group; the xenograft volume in Tet-on- livin shRNA group was significantly smaller than that in control group and Tet-on-NC group [(5.31±0.86)g vs [8.22±0.63]g and [7.17±0.54] g, $P<0.05$). Moreover, little body toxicity was observed and no nude mice died in this study. **Conclusion:** The Tet-on mediated livin shRNA could suppress the growth of lung cancer development with good targeting and controllable characteristics, which might provide a potent tool for treating lung cancer with livin protein as target.

[Key words] livin gene; Tet-on mediated regulation; livin RNA interfere; lung carcinoma; A549 cell line; animal model

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(3): 236-239. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.03.004]

肺癌发病率及病死率均位居各种恶性肿瘤之首^[1], 晚期肺癌治疗的疗效不理想, 目前靶向治疗发展迅速, 越来越多的靶点被发现并深入研究。研究^[2-4]已证实凋亡抑制蛋白 livin 在多种肿瘤(包括肺癌)中表达, 并可能促进肿瘤发生、发展, 有望成为肺癌治疗的新靶点。本课题组前期研究^[5-7]表明, 干扰 livin mRNA 表达的肺腺癌 SPC-A1 细胞凋亡增多、肺癌移植瘤减少, 局部注射 livin shRNA 慢病毒可在局

[基金项目] 福建省自然科学基金资助项目(No. 2015J01376); 福建省立医院优秀青年医师项目(No. 2014YNQN03)。Project supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2015J01376), and the Foundation of Fujian Provincial Hospital for Excellent Young Physicians (No. 2014YNQN03)

[作者简介] 李鸿茹(1980-), 女, 博士, 主治医师, 主要从事肺癌靶向治疗的研究, E-mail: muzi131122@163.com

[通信作者] 陈榆生(CHEN Yusheng, corresponding author), 主任医师、教授, 博士生导师, 主要从事肺癌靶向治疗与肺部感染的研究, E-mail: cysktz@163.com

部抑制肺癌生长。但既往采用的慢病毒载体缺乏可控性、靶向性,且全身副作用较大,四环素(tetracycline, Tet)调控慢病毒载体可通过外源四环素给予的方法来人为调控目的基因表达的元件,可更加严密、安全、高效能抑制肺癌生长,并具有副作用小的优点,故本课题拟在前期研究^[5]基础上,利用四环素调控(Tet-on) livin RNA 干扰系统,探讨其抑制肺癌生长的效果。

1 材料与方法

1.1 动物与细胞

BALB/c SCID 裸鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,共 60 只,体质量(14±2) g/只,4~6 周龄,均为雌性。以数字随机表法将裸鼠随机分为 3 组:实验组(Tet-on-KD 组)、阴性载体对照组(Tet-on-NC 组)和空白对照组(CTL 组),饲养于福建医科大学动物实验中心 SPF 级动物室[SYXK(闽)2012-0001]。所用的饲料、水、垫料都经过严格灭菌处理,并按动物实验的 3R 原则给予人道的关怀。人肺腺癌 A549 株细胞购自中科院细胞库。

1.2 主要试剂与设备

Tet-on 慢病毒载体、EGFP、脂质体转染试剂 Lipofectamin-2000TM和 293T 细胞均由上海吉凯基因公司提供,四环素衍生物多西环素(doxycycline, DOX)购自美国 Sigma 公司,RPMI1640 培养基购自美国 HyClone 公司,胎牛血清(FBS)购自杭州四季青公司,0.25% 胰酶细胞消化液(Trypsin-EDTA)和青霉素-链霉素双抗(Pen-strep)购自美国 Gibco 公司。倒置显微镜为日本奥林巴斯公司产品、生物安全柜和 CO₂培养箱为日本三洋公司产品。

1.3 细胞培养

A549 细胞用含 10% FBS、1% Pen-Strep 和 1% 葡萄糖(Glu)的 RPMI 1640 培养基在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。镜下观察细胞生长良好时,取对数生长期的细胞,经 0.25% 胰酶消化,以无血清培养基制备单细胞悬液,调整细胞密度至 5×10⁷/0.1 ml,用于建立裸鼠皮下移植瘤动物模型。

1.4 构建 Tet-on 慢病毒载体

根据 EcoR I、Hind III 双酶切位点将 livin shRNA 和增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)加入质粒载体,并经 Amp 抗性培养基挑选单菌落。用脂质体转染试剂 LipofectaminTM 2000 将含目的基因的重组质粒与包装质粒共转染 293T 细胞。收集细胞培养液上清液于 -80 °C 中保存备用。最终得到含目的基因 livin shRNA 和阴性对照 shRNA 的 2 种重组慢病毒质粒

(图 1)pLV-tet-on-U6-livin-shRNA-CMV-EGFP(Tet-on-livin-shRNA)和 pLV-tet-on-U6-NC-shRNA-CMV-EGFP(Tet-on-NC-shRNA)。

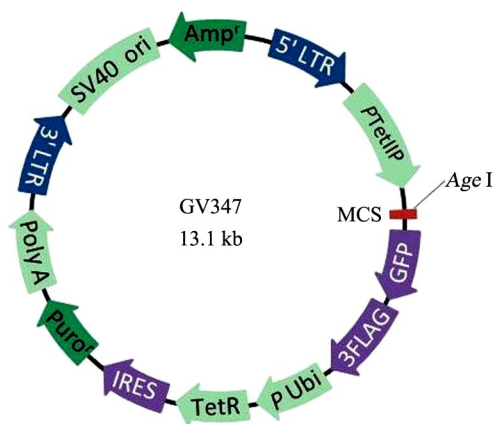


图 1 pLV-Tet-on-U6-shRNA-EGFP 载体图谱

Fig. 1 Vector atlas of pLV-Tet-on-U6-shRNA-EGFP

1.5 建立人肺腺癌裸鼠皮下移植瘤模型及分组实验

BALB/c 裸鼠经麻醉固定后,在其左上肢上方背部皮下注射接种人肺腺癌 A549 细胞悬液 0.1 ml,待移植瘤长至 1 000 mm³ 左右时,对瘤体按下列实验分组进行干预处理:①Tet-on-KD 组:瘤体内注射 Tet-on-livinshRNA 慢病毒载体质粒;②Tet-on-NC 组:瘤体内注射 Tet-on-NC-shRNA 慢病毒载体质粒;③CTL 组:瘤内注射 0.9% NS。注射方式为瘤体 4 周+中央 5 点注射,注射总量为 0.1 ml,瘤体内注射慢病毒载体质粒 5×10⁹ TU。注射后 3 d 开始进行 Tet 诱导,腹腔注射 Tet(1 mg/kg),每周 2 次。注射后 2 d 开始记录裸鼠一般情况、瘤体大小、瘤体质量等数据。

1.6 观察裸鼠状态及移植瘤大小与标本留取

裸鼠皮下移植瘤建模后每周称重记录裸鼠质量,观察裸鼠的活动状态和一般情况;慢病毒载体质粒注射后第 6 周处死裸鼠并留取皮下瘤结,称瘤体质量,同时取肺、肝、脑及肾等组织,肉眼观察成瘤情况(部分用于蛋白检测,方法见下文),同时切片 H-E 染色病理检查。

1.7 Western blotting 法检测移植瘤组织中 livin 蛋白的表达

常规方法提取总蛋白;用 BCA 蛋白法测定各样品浓度,使各孔蛋白上样量一致;12% SDS-PAGE 2 h,电泳完毕后经湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜,5% 伊利脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入兔抗鼠一抗(livin 1:100, GAPDH 1:4 000)4 °C 冰箱孵育过夜,加山羊抗兔二抗(1:2 000)室温孵育 1 h,加入 ECL A、B 液后在 Bio-Rad 凝胶成像系统曝光、图像分析。

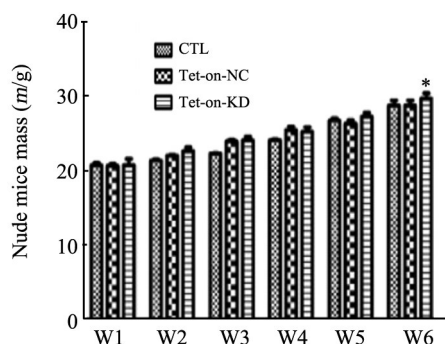
1.8 统计学处理

采用SPSS 22.0软件进行统计学分析, 计量数据 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)及*t*检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建裸鼠皮下移植瘤模型

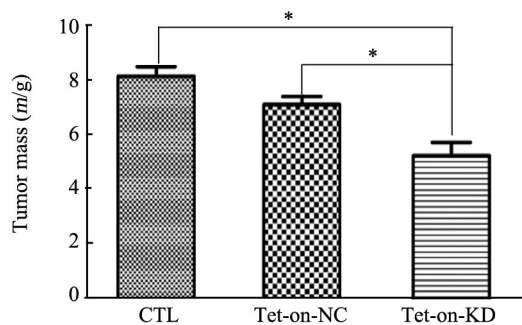
裸鼠在接种A549细胞1周后背部出现瘤结。各组裸鼠处死时一般情况良好, 未见恶病质征象。所有裸鼠均在皮下成瘤, 动态检测3组裸鼠质量无显著差异, 在观察及干预期间无裸鼠死亡。CTL组、Tet-on-NC组和Tet-on-KD组瘤体质量分别为(8.22±0.63)、(7.17±0.54)和(5.31±0.86)g; Tet-on-KD组瘤体质量明显低于CTL组及Tet-on-NC组(均 $P < 0.05$, 图2、3)。各组裸鼠肺、脑、肾等器官肉眼均未见转移灶, 病理H-E染色也证实无转移灶形成。



* $P > 0.05$ vs Tet-on-NC or CTL group

图2 荷瘤裸鼠质量(第1~6周)

Fig.2 Body mass of the nude mice with xenograft (at 1st -6th week)



* $P < 0.05$ vs Tet-on-NC or CTL group

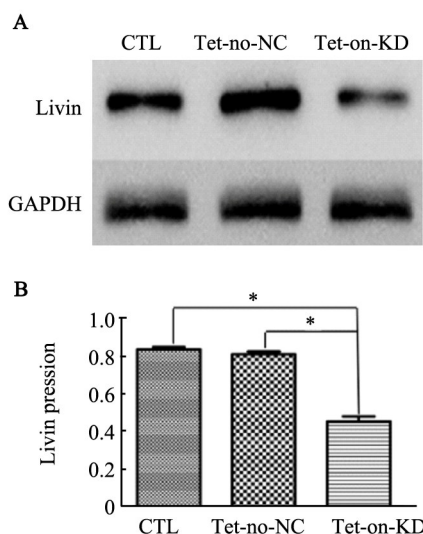
图3 三组皮下移植瘤体质量比较

Fig. 3 Comparison of tumor mass among the three groups

2.2 移植瘤组织中 livin 蛋白低表达

Western blotting 检测结果(图4)显示, 四环素诱

导后, Tet-on-KD组移植瘤组织中 livin 蛋白表达明显低于CTL组及Tet-on-NC组(均 $P < 0.05$)。



* $P < 0.05$ vs Tet-on-NC or CTL group

A: Immunoblotting image; B: Comparison of livin protein expression in the various groups

图4 各组四环素诱导后移植瘤组织中 livin 蛋白表达比较
Fig. 4 Comparison of livin protein expressions in the various groups after induction with tetracycline

3 讨论

肺癌是目前发病率和病死率最高的恶性肿瘤之一, 尽管近年来晚期肺癌在多学科综合治疗的情况下生存率有所提高, 但总体预后仍不理想^[8]。凋亡抑制蛋白 livin 参与细胞凋亡的调控, 在多种肿瘤发生发展中起重要作用。本课题组前期研究^[5]表明, 干预 livin 表达可使肺癌细胞凋亡增多, 增殖减少, 可有效抑制肺癌裸鼠移植瘤生长, 提示 livin 可能成为肺癌治疗的靶点。但前期实验采用的慢病毒载体存在风险, 难以调控, 且达不到目标控制肿瘤, 可引起全身副作用, 故使用何种方法干预 livin 表达才更有效, 既达到靶向抑制肺癌生长, 且减少对全身副作用等值得深入探讨。

近年来 Tet 载体系统的出现, 为解决上述问题提供新的方法。Tet 载体系统, 是一种通过外源 Tet 诱导人为调控目的基因表达元件实现的, 该系统四环素诱导的 RNA 载体系统具备较好的调控性能, 可较高水平诱导目的基因 shRNA 表达得到高效率的敲减, 经诱导后最高诱导倍数可达 1×10^4 倍^[9]。另外, 诱导剂 Tet 为常见的抗生素, 毒性低, 能准确、特异、高效调控目的基因表达, 可根据需要进行且不受宿主基因影响, 故更准确、更接近生理条件^[10]。目前的诱导

剂有 Tet 及其衍生物 DOX, DOX 较 Tet 而言,完全激活或抑制目的基因表达所需要的量更少(0.01~1 mg/L DOX 相当于 1~2 mg/L Tet);并且半衰期更长(DOX 24 h vs Tet 12 h)^[11]。Tet 载体系统主要包括两部分:Tet 反应元件,即细菌四环素操纵子(Tet operator, TetO);融合的转录活化因子,该转录活化因子能被 Tet 及其衍生物诱导并激活,主要由细菌的 Tet 阻遏物(Tet resistance operon, TetR)和人类单纯疱疹病毒的 VP16 转录激活蛋白融合而成。根据其作用不同分为 tTA 和 rtTA (reverse Tet-controlled transcriptional activator), tTA 为 Tet-off 系统成分,即经诱导终止目的基因转录;rtTA 为 Tet-on 系统成分,即经诱导可启动目的基因转录^[12-14]。

本实验成功构建了 Tet-on *livin* shRNA 慢病毒载体,该载体调控性好、背景低,且安全性好。本实验共有 60 只裸鼠,实验过程中未见裸鼠非正常死亡,也未发现裸鼠存在食欲减退等异常反应。本实验则在此基础上研究该系统对在体水平 *livin* 表达及抗肺癌增殖的作用,采用既往腹腔注射 Tet 方法进行诱导,该法的特点为操作方便,剂量较为准确,吸收快,但具体剂量需要摸索。本研究腹腔内注射 1 mg/kg,每周 2 次,结果表明 Tet 可在体内诱导 *livin* shRNA 表达,进而抑制 *livin* 表达,从而起到抗肺癌增殖作用。以往有学者利用 Tet 腹腔注射作为诱导起效后改为饮水喂食(2 mg/ml Dox+5% sucrose)使 Tet 持续得到诱导表达,发现停用 Tet 1 周后相关表达即丧失^[15],故该系统可有效地按人为目的进行调控目的基因的表达,但最佳的用药方式及剂量尚待进一步深入探讨。

综上所述,本课题组成功利用 Tet-on *livin* shRNA 慢病毒载体显著降低肺腺癌皮下移植瘤裸鼠模型凋亡抑制蛋白 *livin* 的表达,抑制肺腺癌移植瘤生长,该系统的建立为今后以 *livin* 蛋白为靶点的肺癌靶向治疗研究提供重要的研究工具。

[参考文献]

- [1] SUNDAR R, SOONG R, CHO B C, et al. Immunotherapy in the treatment of non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2014, 85 (2): 101-109. DOI:10.1016/j.lungcan.2014.05.005.
- [2] NEDELCOU T, KUBISTA B, KOLLER A, et al. *Livin* and Bcl-2 expression in high-grade osteosarcoma. [J]. J Cancer Res, 2008, 134 (2): 237-244. DOI: 10.1007/s00432-007-0276-2.
- [3] XI R C, BIAO W S, GANG Z Z. Significant elevation of survivin and *livin* expression in human colorectal cancer: inverse correlation between expression and overall survival[J]. Onkologie, 2011, 34(8-9):428-432. DOI: 10.1159/000331132.
- [4] CHENG T, ZHANG J G, CHENG Y H, et al. Relationship between PTEN and *livin* expression and malignancy of renal cell carcinomas [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(6): 2681-2685.
- [5] 陈愉生,李鸿茹,林明,等.慢病毒介导 sh RNA 特异性沉默 *livin* 基因促进 SPC-A1 细胞凋亡[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2009,16 (5): 469-473. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2009.05.009
- [6] CHEN Y S, LI H R, MIAO Y, et al. Local injection of lentivirus-delivered *livin* shRNA suppresses lung adenocarcinoma growth by inducing a G0/G1 phase cell cycle arrest[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2012, 5(8): 796-805.
- [7] LIN X, LI H R, LIN X F, et al. Silencing of *livin* inhibits tumorigenesis and metastasis via VEGF and MMPs pathway in lung cancer [J]. Int J Oncol, 2015, 47(2): 657-667. DOI:10.3892/ijo.2015.3058.
- [8] GULDBRANDT L M, FENGER-GRON M, RASMUSSEN T R, et al. The role of general practice in routes to diagnosis of lung cancer in denmark: a population-based study of general practice involvement, diagnostic activity and diagnostic intervals[J]. BMC Health Serv Res, 2015, 15(1): 21. DOI:10.1186/s12913-014-0656-4.
- [9] 陈皓,夏海滨.四环素诱导调控表达系统的研究与应用[J].生命的化学,2011,31(2): 285-290.
- [10] 胡伟,李玉霞,凌焱,等.新型低基础表达 Tet-on 基因表达系统的构建与鉴定[J].军事医学科学院院刊,2008,32:309-327. DOI:10.3969/j.issn.1674-9960.2008.04.003.
- [11] BERMAN B, PEREZ O A, ZELL D, et al. Update on rosacea and anti-inflammatory-dose doxycycline[J]. Drugs Today (Barc), 2007, 43(1): 27-34. DOI:10.1358/dot.2007.43.1.1025697.
- [12] SZULC J, WIZNEROWICZ M, SAUVAIN M O. A versatile tool for conditional gene expression and knockdown[J]. Nat Methods, 2006, 3(2): 109-116. DOI:10.1038/nmeth846.
- [13] 陈迁,胡维新. Tet 基因调控系统研究进展[J].临床与病理杂志,2003,23(5): 456-458. DOI: 10.3969/j.issn.1673-2588.2003.05.006.
- [14] 官秀群,马敏敏,徐格林.四环素基因调控系统的研究进展[J].基础医学与临床,2012,32(2): 233-236.
- [15] VANRELL L, DI SCALA M, BLANCO L, et al. Development of a liver-specific Tet-on inducible system for AAV vectors and its application in the treatment of liver cancer[J]. Mol Ther, 2011, 19(7): 1245-1253. DOI: 10.1038/mt.2011.37.

[收稿日期] 2017-11-28

[修回日期] 2018-01-19

[本文编辑] 韩丹