

siRNA-Med19对人肺癌 A549细胞 Med19转录、表达的影响

李金东 孙梅¹ 高楠² 罗树生 王荣有 金成彦 张兴义
(吉林大学第二医院胸外科,吉林 长春 130041)

摘要 目的 研究 siRNA-Med19对人肺癌 A549细胞 Med19的影响。方法 利用前期已合成的 siRNA-Med19慢病毒载体,感染 A549细胞,并以无病毒感染组作为空白对照组,以慢病毒载体感染组作为阴性对照组。采用荧光图片和白光图片对比方法判断细胞的感染率;RT-PCR法检测细胞 Med19mRNA的转录水平;Western印迹法检测细胞 Med19蛋白表达水平。结果 慢病毒载体对人肺癌 A549细胞的感染率在 80%以上,siRNA-Med19慢病毒感染组 Med19mRNA 转录水平明显降低,敲减效率大于 70%,Med19蛋白表达量也明显降低。结论 siRNA-Med19慢病毒载体可以高效感染人肺癌 A549细胞,siRNA-Med19对 A549细胞 Med19的转录和表达具有明显的抑制和消减作用。

关键词 siRNA;Med19;肺癌;A549细胞

中图分类号 R730.5;R734.2 **文献标识码** A **文章编号** 1005-9202(2009)09-1072-03

肺癌的治疗效果近年仍不理想,总治愈率约 10%。Med19 是 RNA 聚合酶 通用转录装置的重要组成部分,理论上阻断肿瘤细胞中 Med19基因可起到治疗肿瘤的作用。迄今无关于 siRNA 沉默人类肺癌细胞内 Med19基因诱导肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤细胞生长、转移的研究。本文观察 siRNA-Med19慢病毒载体对人肺癌 A549细胞 Med19表达的干扰作用,探讨 Med19基因在肺癌发生发展中的作用,并为 RNAi 分子靶向基因治疗人非小细胞肺癌 (NSCLC)提供新的实验依据。

1 材料与方

1.1 主要试剂及材料 BCA Protein Assay Kit 购自 HyCone-Pierce, ECL-PLUS/Kit 购自 Amersham 公司,抗羊 Med19 购自 Abcam 公司,抗鼠 IgG 购自 Santa Cruz 公司,PCR 用试剂、引物购自上海吉凯基因技术有限公司,胎牛血清、DMEM 培养基购自 GBCO 公司,Trizo 购自 Invitrogen, dNTP、M-MLV 逆转录酶、Rnase 抑制剂购自 Promega 公司,oligo dT 购自上海生工,A549 细胞购自中科院细胞库,pDNA3.1(-)-Med19-siRNA-GFP、pDNA3.1(-)-Med19-NC-GFP 慢病毒载体均来自本实验室,滴度为 4×10^8 TU/ml。

1.2 肿瘤细胞培养及传代 从液氮罐中取出人肺癌 A549 细胞,常规方法复苏,重悬细胞,接种至培养皿中,晃动后置 37℃、5% CO₂ 培养箱培养。次日更换 1 次培养液。将生长 90% 汇合的细胞进行传代,连续传代 20 次后获得相对纯净的肿瘤细胞用于实验。

1.3 慢病毒载体感染人肺癌 A549 细胞 取对数生长期的 A549 细胞,制成细胞悬液,将细胞悬液接种于 6 孔板中的 3 个孔,每孔细胞数约 5×10^4 。空白对照组不加入任何病毒,阴性对照组加入 pDNA3.1(-)-Med19-NC-GFP 慢病毒,siRNA-

Med19 慢病毒感染组加入 pDNA3.1(-)-Med19-siRNA-GFP 慢病毒。感染 3 d 后观察慢病毒报告基因——绿色荧光蛋白 (GFP) 的表达情况,用荧光显微镜观察有荧光细胞的数量来判断感染率。感染率大于 50% 者继续培养,待感染时间达到 5 d 后收集细胞抽提 RNA 进行 RT-PCR 检测。

1.4 RT-PCR 检测 常规法提取总 RNA,紫外分析测定 RNA 浓度,经逆转录获得 cDNA,置于 -80℃ 保存备用。Med19 (222 kb) 和 β -actin (214 bp) 上、下游引物分别为: β -actin 上游 5'-TCGTGCGTGACA TTAAGGAG-3',下游 5'-AAGGTAGTTTCGTGGATGCC-3' 和 Med19 上游 5'-GTAAGTTCCTGCCTGACCTG-3',下游 5'-TGTGCTTGTGCTATCTCTCTC-3'。采用标准曲线分析法 (2^{-Ct} 分析法) 分析每一标本的 Med19mRNA 的表达水平。

1.5 Western 印迹检测 准备靶细胞及 6 孔板中每孔样品排列、细胞慢病毒感染操作同上。从培养箱中取出细胞,弃去培养液,PBS 洗涤 2 次,弃去 PBS,加入适量预冷的 2 mL lysis Buffer,细胞刮刮下细胞,将样品转移入 1.5 ml Eppendorf 管中,冰上裂解细胞 10~15 min,超声破碎仪破碎细胞。4℃,12 000 r/min,离心 15 min。取上清,测蛋白浓度后,每个样品蛋白终浓度均调整为 2 μ g/ μ l,每个样品取相同蛋白量在 10% 聚丙烯酰胺条件下进行 SDS-PAGE。电泳后转移到 NC 膜上,5% 脱脂牛奶 TBST 溶液封闭过夜后洗膜,加入 1:200 稀释的羊抗 Med19, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。用封闭液 1:6 000 稀释抗鼠 IgG,室温下孵育 PVDF 膜 2 h。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,Western 印迹试剂盒显色,X 光显影,取出 X 光片,晾干,分析,以 GAPDH 为内参。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡 用胰蛋白酶将细胞消化并收集在离心管中,以预冷的 0.01 mol/L PBS 冲洗细胞 3 次,每次均需打散细胞。最后用 0.5 ml PBS 重悬细胞,逐滴加入预冷的 75% 酒精中固定。碘化丙啶染色,流式细胞仪检测。

1.7 统计学处理 采用 SAS8.2 统计软件分析,进行 t 检验。

2 结果

2.1 Med19-siRNA-GFP 和 Med19-NC-GFP 慢病毒载体对 A549 细胞的感染 见图 1。空白对照组未见荧光,阴性对照组及敲

1 吉林大学第二医院病理科 2 吉林大学中日联谊医院胸外科
通讯作者:张兴义 (1963-),男,教授,博士生导师,主要从事肿瘤基因治疗和器官移植研究。

第一作者:李金东 (1967-),男,在读博士,副主任医师,主要从事肿瘤基因治疗和器官移植研究。

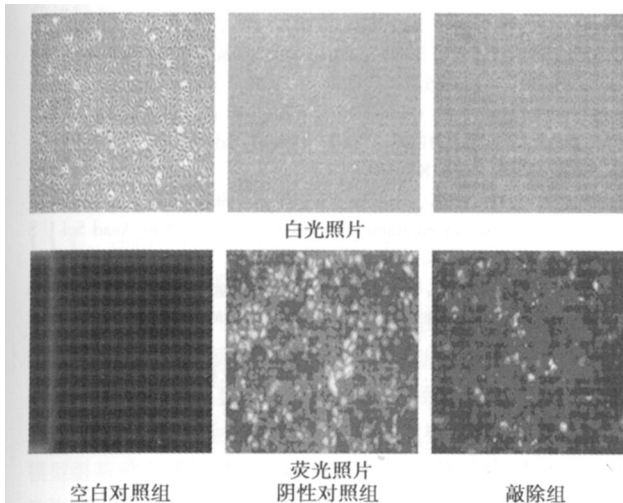


图 1 三组细胞荧光观察结果

除组细胞荧光感染效率大于 80%。

2.2 RT-PCR方法检测 siRNA-Med19对 A549细胞 Med19基因转录的影响 siRNA慢病毒感染组 Med19mRNA 表达水平 (0.178 ± 0.042)较空白对照组 (0.617 ± 0.089)及阴性对照组 (1.002 ± 0.075)明显减少 ($P < 0.05$), 溶解曲线: actin和 Med19的扩增产物溶解曲线,没有出现杂峰,也未出现主峰的异常增宽,表明实验中未出现污染、引物二聚体和非特异性扩增。

2.3 siRNA-Med19对 A549细胞 Med19蛋白表达的影响 siRNA-Med19慢病毒感染组中 Med19蛋白的表达明显减弱,光密度分析与空白对照组及阴性对照组明显减弱,各组内参 GAPDH表达量无显著差异(图 2)。

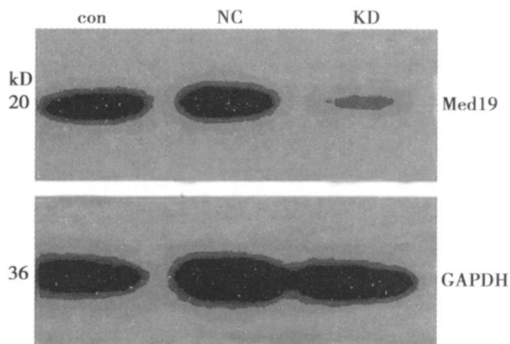


图 2 Western印迹扫描图

2.4 siRNA-Med19对 A549细胞生长周期的影响 流式细胞仪分析结果显示,实验组与其他两对照组相比较,在正常二倍体细胞的 G0-G1期前出现的一个亚二倍峰即为凋亡峰,提示 siRNA-Med19转染人肺癌 A549细胞后,可诱导癌细胞周期停止在 G1期,抑制肺癌细胞的分裂增殖,促进细胞凋亡。

3 讨论

前期工作中,我们设计合成 siRNA-Med19慢病毒载体,可以稳定地表达 siRNA,而且具有高转染效率(转染效率大于

80%),较长时间的持续效应和较为明显的蛋白敲减效果。本次实验将构建的 siRNA-Med19慢病毒载体转入人肺癌 A549细胞,研究其对 Med19基因转录和表达的抑制作用。

外科手术一直以来是肺癌综合治疗的最重要的手段之一。虽然手术技术及方式进步很快,但对提高生存率的作用有限,放化疗效果同样不佳,故人们正在寻求疗效更好,毒性更低的治疗方案以提高患者生活质量。

siRNA介导的 RNAi技术是近年发展起来的一个崭新的研究领域,它的发现为基因功能探索、基因治疗提供了一种全新、高效的研究手段。RNAi技术因其特异性和高效性已成为研究基因功能的重要工具^[1],具有其他基因封闭技术无法比拟的特点和优势^[2]。siRNA又被称为转录后基因沉默^[3],其机制是细胞内的 dsRNA被 Dicer(一种 RNA酶)剪切成双链的 siRNA,与 RNA诱导的基因沉默复合物结合,降解与之互补的靶 mRNA,特异性抑制靶基因表达^[4]。自 Fire等^[4]发现 dsRNA能引起特异性基因沉默以来, RNAi技术因有望成为理想的基因转移载体。有实验报道使用慢病毒载体稳定介导基因沉默达 25 d之久^[5,6]。也有实验采用慢病毒载体成功转染了一些包括原代细胞、终末分化细胞等难以转化的细胞,适合于对目的基因进行较长时间的研究^[7]。

Med的细胞外功能包括促进激活的转录、增强基础转录、增强(CTD)的磷酸化。Med19在酵母菌的曾用名 ROX3(或 SSN7、RMR1等),酵母菌及人类的 Med在结构和功能上惊人地保守^[8]。Med19在人类编码的基因名为肺癌转移相关蛋白(LCMR1)。LCMR1基因直接或间接参与和介导了多种信号途径,在具有高转移能力的人肺癌 95D细胞系中高表达。但真核生物转录调控的情况相对复杂,除了复杂的原核染色质结构外,真核调节蛋白与 RNA聚合酶的相互作用还需要多个亚基组成的蛋白质复合体,即 Med来介导形成全酶才能完成转录^[9]。含有不同激酶组件的 Med复合物可对不同类型的基因起到调节作用^[10]。Med的构象改变会产生一个对 RNA聚合酶

在的 PIC组件进行募集和组装的表面,这是 Med在转录调控中发挥重要作用的重要方面^[11]。

我们构建 siRNA-Med19慢病毒表达载体,利用 RNAi技术沉默肺癌细胞中 Med19基因,可诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞生长,为后续实验及其在肺癌治疗中的应用提供了理论依据。通过 siRNA来介导 RNAi干扰作用,从而抑制肿瘤组织中 Med19基因的表达,对于治疗肺癌可能具有重要意义。慢病毒通过病毒衣壳糖蛋白与细胞膜上的特异受体结合而进入易感靶细胞。病毒 RNA逆转录合成双链线性 DNA而转运至细胞核。线性病毒 DNA永久性整合入染色体 DNA(宿主基因组)中,形成前病毒,在细胞周期中与靶细胞基因一样复制,并稳定表达与传给子代细胞。本研究针对人肺癌 A549细胞 Med19基因构建 siRNA慢病毒为载体,将该载体导入 A549细胞内持续表达,细胞生长速度明显减慢,提示 RNAi抑制 Med19基因表达后可以显著抑制 A549细胞增殖能力。通过 RT-PCR、Western印迹等方法,证实 siRNA-Med19成功地抑制了人肺癌 A549细胞内 Med19 mRNA和蛋白的表达,为后期研究 Med19基因在人 NSCLC中的作用机制和基因治疗打下基础。

4 参考文献

- McManus MT, Haines BB, Dillon CP, *et al.* Small interfering RNA mediated gene silencing in T lymphocytes [J]. *J Immunol*, 2002; 169 (10): 5754-60.
- Hannon GJ. RNA interference [J]. *Nature*, 2002; 418 (6894): 244-51.
- 王春光, 王荣有, 孙梅, 等. 沉默基因表达对肺癌细胞生长影响的实验研究 [J]. *中国老年学杂志*, 2006; 26 (2): 210-3.
- Fire A, Xu S, Montgomer MK, *et al.* Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998; 391 (6669): 806-11.
- Abbas-Terki T, Blanco-Bose W, Deglon N, *et al.* Lentiviral mediated RNA interference [J]. *Hum Gene Ther*, 2002; 13 (18): 2197-201.
- Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, *et al.* Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells [J]. *RNA*, 2003; 9 (4): 493-501.
- Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors [J]. *Mol Biol* technol, 2007; 36 (3): 184-204.
- Conaway RC, Sato S, Tamomori-Sato C, *et al.* The mammalian mediator complex and its role in transcriptional regulation [J]. *Trends Biochem Sci*, 2005; 30 (5): 250-5.
- Baumli S, Hoepfner S, Cramer P. A conserved mediator hinge revealed in the structure of the MED7-MED21 (Med7, Srb7) heterodimer [J]. *J Biol Chem*, 2005; 280 (18): 18171-8.
- Dotson MR, Yuan CX, Roeder RG, *et al.* Structural organization of yeast and mammalian mediator complexes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000; 97 (26): 14307-10.
- Cosma MP, Panizza S, Nasmyth K. Cdk1 triggers association of RNA polymerase to cell cycle promoters only after recruitment of the mediator by SBF [J]. *Mol Cell*, 2001; 7 (6): 1213-20.

[2008-12-10收稿 2008-12-30修回]
(编辑 徐杰 胡国义)

依达拉奉抑制血管性痴呆大鼠脑组织环氧合酶-2与 NF- κ B 的表达

蔡志友 晏勇 张骏¹ 晏宁 王咏龙 吴芳 黄华 张建刚

(重庆医科大学附属第一医院神经内科重庆市神经病学重点实验室, 重庆 400016)

摘要 目的 观察依达拉奉对血管性痴呆 (VD) 大鼠行为学和脑组织环氧合酶-2 (COX-2)、核转录因子- κ B (NF- κ B) 表达的影响, 探讨依达拉奉对 VD 脑保护作用机制。方法 Wistar 大鼠随机分为: 正常组、假手术组、痴呆模型组 (模型组)、依达拉奉治疗组 (治疗组)。水迷宫和穿梭箱实验检测行为学特征; 免疫组织化学法和蛋白质免疫印迹法检测大鼠脑组织 COX-2、NF- κ B 的表达, 用图象分析仪测定光密度 (OD) 值。结果 治疗组大鼠的前后两次跳台实验的检测结果显示差异显著 ($P < 0.01$), 治疗组的行为学症状较模型组明显改善。NF- κ Bp65 和 COX-2 阳性细胞百分率治疗组较正常组、假手术组明显增高 ($P < 0.01$), 较模型组明显降低 ($P < 0.01$), NF- κ Bp65 和 COX-2 OD 值, 治疗组较正常组、假手术组明显降低 ($P < 0.01$), 较模型组明显增高 ($P < 0.01$)。结论 依达拉奉能明显改善 VD 大鼠的行为学症状、降低大鼠脑组织 NF- κ Bp65 和 COX-2 表达, 依达拉奉能够通过抑制大鼠脑组织 NF- κ Bp65 和 COX-2 表达途径发挥其脑保护作用。

关键词 血管性痴呆; 依达拉奉; 环氧合酶-2; 核转录因子- κ B

[中图分类号] R743 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9202(2009)09-1074-04

Downregulation expressions of COX-2, NF- κ B in brain of vascular dementia rats induced by edaravone

CAI Zhiyou, YAN Yong, ZHANG Jun, *et al.*

Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Key Laboratory of Neurology of Chongqing City, Chongqing 400016, China

【Abstract】 Objective To observe the effects of edaravone on praxiology changes and the expressions of cyclooxygenase-2 (COX-2), nuclear factor-kappa B (NF- κ B) in brain of vascular dementia (VD) rats, to study the neuroprotective mechanisms of edaravone. **Methods** Wistar rats were randomly divided into normal, sham, VD model and edaravone treatment groups. Praxiology changes were tested by Morris water maze and shuttle box. The expressions of COX-2, NF- κ B were measured by immunohistochemistry and Western blot. The OD values of COX-2, NF- κ B were measured by imaging analysis. **Results** The praxiology symptoms were improved in edaravone treatment group compared with model group. The percentages of COX-2 positive cells and NF- κ B p65 positive cells in edaravone treatment group were increased than those in normal and sham groups ($P < 0.01$), and decreased than those in model group ($P < 0.01$). The OD values of COX-2 and NF- κ B in edaravone treatment group were decreased than those in normal and sham groups ($P < 0.01$) and increased than those in model group ($P < 0.01$). **Conclusions** Edaravone can improve praxiology symptom and downregulate expressions of COX-2, NF- κ B in VD rats. Edaravone can exert cerebral protection by inhibiting the COX-2 and NF- κ B pathway.

【Key words】 Vascular dementia; Edaravone; Cyclooxygenase-2; Nuclear factor-kappa B

基金项目: 国家民政部 中国老年学学会 (2007-18-3-05); 重庆医科大学博士课题基金 (2006010068)

¹ 遵义医学院附属医院神经内科

通讯作者: 晏勇 (1947-), 男, 博士生导师, 教授, 主任医师, 主要研究痴呆和癫痫。

第一作者: 蔡志友 (1972-), 男, 医学博士, 主要研究阿尔茨海默病。

细胞凋亡是血管性痴呆 (VD) 重要的病理生理机制, 痴呆程度和细胞凋亡有着直接的联系, 同时, 细胞凋亡也参与脑缺血损伤机制过程^[1]。环氧合酶 2 (COX-2) 和核转录因子- κ B (NF- κ B) 通过自由基、氧化应激和神经炎症途径参与 VD 病理生理过程, 加速细胞凋亡进程。依达拉奉是一种新型自由基清除剂, 具有神经保护作用^[2-4]。所以, 本研究采用