

Bcl-2 短发夹状 RNA 对 BEL-7402、Caco2 细胞的生长抑制作用

何冬梅,张 洹,刘革修

(暨南大学医学院血液病研究所,广州 510632)

[摘要] **目的:**研究 Bcl-2 短发夹状 RNA(short hairpin RNA,shRNA)序列的表达载体对肝癌细胞系 BEL-7402 和结肠癌细胞系 Caco2 生长的抑制作用。**方法:**将 Bcl-2 shRNA 序列克隆到携带绿色荧光蛋白基因的质粒 Pgenesil-1 载体,采用脂质体介导的转染方法将构建的 Bcl-2shRNA 表达质粒转入 BEL-7402、Caco2 细胞,同时设立阴性 shRNA 组、空载体组、脂质体组、空白组作为对照。通过倒置荧光显微镜和流式细胞仪观察细胞的转染效率,Western 印迹法检测 Bcl-2 蛋白表达水平,MTT 法测定细胞增殖情况。**结果:**Bcl-2 shRNA 转染组、阴性 shRNA 组、空载体组的转染效率无显著差异。转染 Bcl-2 shRNA 后 BEL-7402、Caco2 细胞 Bcl-2 蛋白表达水平与转染阴性 shRNA、空载体组、脂质体组和空白组相比均显著降低($P<0.05$),且 Bcl-2 shRNA 抑制 Caco2 细胞 Bcl-2 蛋白表达比 BEL-7402 细胞更为明显($P<0.05$)。MTT 测定显示转染 Bcl-2 shRNA 载体入 BEL-7402、Caco2 细胞在 72、96 h 细胞生长明显受到抑制,分别与转染阴性 shRNA、空载体组、脂质体组和空白组比较,差异有显著性($P<0.05$)。**结论:**Bcl-2 shRNA 可特异性地抑制 BEL-7402、Caco2 细胞生长。

[关键词] Bcl-2;shRNA;RNAi;BEL-7402 细胞;Caco2 细胞

[中图分类号] R 735 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)09-0995-03

Inhibitory effect of Bcl-2 short hairpin RNA on growth of BEL-7402 and Caco2 cells

HE Dong-mei, ZHANG Huan, LIU Ge-xiu (Institute of Hematology, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effects of Bcl-2 shRNA on the growth of liver carcinoma cell line BEL-7402 and colorectal carcinoma cell line Caco2. **Methods:** Bcl-2 shRNA was cloned into Pgenesil-1 plasmid labeled with fluorescent protein and the product was transfected into BEL-7402 and Caco2 cells with Lipofectamine 2000. The study also included shRNA as negative control, Pgenesil-1, Lipofectamine and blank control groups. Transfected cells were visualized by inverted fluorescent microscope and then assayed by flow cytometry. The expression levels of Bcl-2 protein were assayed by Western-blot and cell proliferation was measured by MTT method. **Results:** There was no difference in transfection rate among cells in Bcl-2 shRNA, shRNA and Pgenesil-1 vector groups. Western-blot assay showed that the expression levels of Bcl-2 protein in BEL-7402 and Caco2 cells were significantly decreased in Bcl-2 shRNA group compared with those in other 4 groups ($P<0.05$). Furthermore, Bcl-2 shRNA had a stronger inhibitory effect on Caco2 cells than on BEL-7402 cells ($P<0.05$). MTT assay showed that Bcl-2 shRNA significantly inhibited the growth of BEL-7402 and Caco2 cells (at 72 and 96 h after treatment, respectively) compared with the other 4 groups ($P<0.05$). **Conclusion:** Bcl-2 shRNA can specifically inhibit the growth of BEL-7402 and Caco2 cells.

[KEY WORDS] Bcl-2; shRNA; RNAi; BEL-7402 cells; Caco2 cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(9): 995-997]

RNAi 是双链小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 引起特异性靶 mRNA 裂解的过程。研究发现, 21~23 nt 的短片段双链 RNA 分子在人类细胞能够以同源互补序列的 mRNA 为靶目标降解特定的 mRNA, 长度为 20 nt siRNA 足以诱导特异性基因沉默而不引发干扰素反应^[1~3]。在细胞内表达短发夹状 RNA (short hairpin RNA, shRNA), 是产生 RNAi 的一种良好方式, 它与化学合成的双链 RNA 作用一致^[4~6]。Bcl-2 基因不仅与恶性肿瘤的发生密切相关, 而且也能抑制细胞凋亡而致肿瘤耐药。本实验室对 Bcl-2 反义药物已研究多年^[7~9], 并利用体外转录合成 siRNA 的方法已经筛

选出了有效的针对 Bcl-2 mRNA 的 RNAi 作用靶点并构建了 Bcl-2 shRNA 序列的表达载体^[10,11]。本研究进一步观察 Bcl-2 shRNA 对高表达 Bcl-2 的肝癌细胞系 BEL-7402 和结肠癌细胞系 Caco2 生长的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 克隆到携带绿色荧光蛋白基因的 Bcl-2 shRNA 序列表达质粒为本室构建^[10,11], 保存于 -20℃ 冰箱中备用。Bcl-2 shRNA 对应的 RNAi

[作者简介] 何冬梅, 博士, 副研究员。

作用靶点的寡核苷酸序列为 5'-AAG TAC ATC CAT TAT AAG CTG-3'。Bcl-2 鼠单克隆抗体、羊抗鼠 IgG 二抗购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 细胞转染 BEL-7402、Caco2 细胞由本院生化教研室惠赠。采用含 10% 新生牛血清(60℃ 灭活 30 min)、100 U/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI 1640 培养基,在 37℃、体积分数 5% CO₂、饱和湿度条件下培养,实验选用对数生长期细胞。采用脂质体介导的方法将 0.1 μmol/L Bcl-2 shRNA 分别转入 BEL-7402、Caco2 细胞,同时设立转染阴性 shRNA 入细胞、转染空载体、直接往培养的细胞中加入脂质体、不加处理的细胞作为对照,具体操作按 LIPOFECTAMINE2000 试剂盒(Invitrogen)的说明进行。转染后 24、48 h 用倒置荧光显微镜观察细胞内绿色荧光蛋白的表达并用流式细胞仪检测转染效率。

1.3 Western 印迹分析 离心分别收集转染后 48 h 的各组细胞,加裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.02% 叠氮钠, 100 μg/ml PMSF, 1 μg/ml Aprotinin, 1% NP-40),冰上反应 30 min, 4℃、13 000 r/min 离心 30 min,取上清即为细胞的总蛋白。用 BCA 法进行总蛋白定量,从各组样品中分别取 40 μg 的总蛋白上样,用 8% SDS-PAGE, 4℃、20 mA 电泳,当指示剂溴酚蓝电泳到分离胶时调节电流为 30 mA 继续电泳 3 h。随后立即于 4℃、200 mA 条件下通过湿转法将蛋白从 SDS-PAGE 胶上转移到硝酸纤维素膜上,转膜过夜。硝酸纤维素膜用 10% 脱脂牛奶常温下封闭 1 h,硝酸纤维素膜与 Bcl-2 鼠单克隆抗体(1:500)孵育 4 h,再与 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗(1:1 000)孵育 1 h。按 Pierce 公司的 ECL 试剂盒进行荧光显色反应,暗室中曝光,显影,定影。应用英国剑桥仪器公司 Quantimet 970 图像分析仪对结果进行图像分析,以 Bcl-2 与 β-actin 的比值表示 Bcl-2 蛋白相对表达量。实验重复 3 次取平均值。

1.4 细胞增殖测定(MTT) 每组设 6 个平行孔,在 96 孔培养板中每孔种 1×10⁴ 细胞(200 μl),加入的 shRNA 终浓度均为 0.1 μmol/L,空载体组加入相同浓度的质粒,脂质体组加入与转染组相同量的脂质体。转染按试剂盒说明进行。分别于培养 48、72、96 h 加入 MTT 100 μg,继续培养 4 h,弃去上清,每孔加入 200 μl DMSO,用酶标仪检测在波长 570 nm 处光密度(D)值,按以下公式计算抑制率:存活率(%)=实验孔 D 值/对照孔 D 值×100%。

1.5 统计学处理 所有结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用

SPSS 11.0 统计软件处理数据,采用单因素方差分析(ANOVA),分析各组间差异的显著性。

2 结果

2.1 Bcl-2 shRNA 在 BEL-7402、Caco2 细胞中的表达及转染效率 转染 24 h 和 48 h 后在倒置荧光显微镜下观察 BEL-7402、Caco2 细胞,可见 Bcl-2 shRNA 和阴性 shRNA、空载体组均有较多细胞表达绿色荧光,脂质体组和空白组细胞未见绿色荧光。流式细胞仪检测发现,转染 BEL-7402 细胞 24 h, Bcl-2 shRNA 和阴性 shRNA、空载体组绿色荧光蛋白阳性细胞百分率分别为 39.52%、41.82% 和 43.61%;转染 Caco2 细胞 24 h, Bcl-2 shRNA 和对照 shRNA、空载体组绿色荧光蛋白阳性细胞百分率分别为 38.18%、39.26% 和 40.53%,均无统计学差异。

2.2 Bcl-2 shRNA 对 BEL-7402、Caco2 细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响 Bcl-2 shRNA 分别作用于 BEL-7402、Caco2 细胞 48 h 后的 Western 印迹分析见图 1。Bcl-2 蛋白相对表达量分别为 0.76±0.32、0.55±0.23;未处理 BEL-7402、Caco2 细胞 Bcl-2 表达量为 1.09±0.38、1.13±0.29。单因素方差分析显示, Bcl-2 shRNA 分别作用于 BEL-7402、Caco2 细胞 Bcl-2 蛋白相对表达量分别与未处理 BEL-7402、Caco2 细胞组相比有显著性差异(P<0.05),且 Bcl-2 shRNA 抑制 Caco2 细胞 Bcl-2 蛋白表达比 BEL-7402 细胞更为明显(P<0.05)。

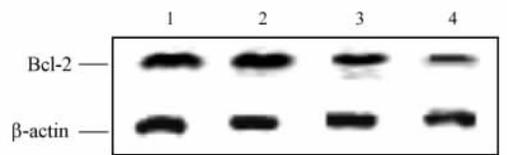


图 1 Bcl-2 shRNA 对 BEL-7402、Caco2 细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响(Western 印迹)

Fig 1 Effect of Bcl-2 shRNA on Bcl-2 protein levels in BEL-7402 cells and Caco2 cells by Western blot

1,2: Untreated BEL-7402, Caco2 cells; 3,4: BEL-7402, Caco2 cells transfected with Bcl-2 shRNA for 48 h

2.3 转染 Bcl-2 shRNA 对 BEL-7402、Caco2 细胞生长的影响 本实验中空白组细胞的存活率均为 100% 左右, Bcl-2 shRNA 作用于 BEL-7402、Caco2 细胞 72、96 h, 细胞的存活率明显降低, 分别与阴性对照 shRNA 组、空载体组、脂质体组和空白组相比, 有显著性差异(P<0.01)。阴性对照组 shRNA 与空载体组、脂质体组、空白组间无差异。

表 1 转染 shRNA 后不同时间 BEL-7402、Caco2 细胞生长的存活率

Tab 1 Survival rate of BEL-7402 and Caco2 cells after transfection of Bcl-2 shRNA vector at different time points

(n = 6, $\bar{x} \pm s$)

Group	BEL-7402 Cells			Caco2 Cells		
	48 h	72 h	96 h	48 h	72 h	96 h
Bcl-2 shRNA	89.12±3.21	79.11±4.18*	60.45±3.61*	88.06±3.31	72.15±3.52*	54.42±4.03*
Negative shRNA	98.53±2.96	97.95±3.82	98.57±4.21	96.95±2.87	97.58±3.28	98.64±4.11
Vector	98.01±3.13	98.55±5.02	99.65±3.27	98.72±3.29	97.91±4.62	99.38±3.19
Lipofectamine	99.43±4.07	98.55±5.13	97.68±3.18	99.53±3.47	98.68±5.01	97.28±3.27
Control	100.9 ±3.51	99.76±3.09	98.59±2.69	100.8 ±3.67	99.38±3.00	98.46±2.63

* P<0.05 vs control

3 讨论

肿瘤细胞中 Bcl-2 蛋白高表达能抑制细胞凋亡,而且 Bcl-2 蛋白表达高的肿瘤细胞对损伤及化疗药物等刺激敏感性降低,这使得 Bcl-2 基因成为 RNAi 治疗中很有吸引力的靶标。RNAi 技术是一项强有力的基因阻断技术,siRNA 能以同源互补序列的 mRNA 为靶标显著降低靶蛋白水平。

本研究利用带有绿色荧光蛋白基因的质粒作为 siRNA 的表达载体,一方面可以通过绿色荧光蛋白的表达观察 siRNA 的转染效率;另一方面,利用质粒特有的抗性标记在目的细胞内持续表达 siRNA,方便研究。本研究应用 BEL-7402、Caco2 细胞是消化道肿瘤细胞,均表达 Bcl-2 蛋白。通过脂质体将含 Bcl-2 shRNA 和无功能阴性 shRNA 的表达载体导入 BEL-7402、Caco2 细胞后,在倒置荧光显微镜下及流式细胞仪检测的转染组间绿色荧光蛋白阳性细胞百分率均无明显差异,这表明细胞已成功导入 shRNA 表达载体且各组的转染效率是一致的。

本研究将 Bcl-2 shRNA 分别导入 BEL-7402、Caco2 细胞后,发现目的基因 Bcl-2 蛋白表达下调,Bcl-2 蛋白相对表达量与未处理 BEL-7402、Caco2 细胞组相比有显著性差异,且 Bcl-2 shRNA 降低 Caco2 细胞 Bcl-2 蛋白比 BEL-7402 细胞更为明显。将 Bcl-2 shRNA 分别导入 BEL-7402、Caco2 细胞后,细胞的增殖明显受到抑制,而且 BEL-7402 细胞增殖受抑比 Caco2 细胞更为明显。表明 Bcl-2 shRNA 导入 BEL-7402、Caco2 细胞后引起了细胞生长特异性的抑制,这条 shRNA 与本实验室先前采用体外转录方法合成的一系列 siRNA 中相同靶序列 siRNA 的 RNAi 作用相近^[10]。我们的研究与 Holle 和 Yano 等^[12,13]的报道一致,他们发现针对 Bcl-2 基因的 siRNA 可明显抑制 Bcl-2 蛋白的表达,抑制癌细胞的生长。总之,我们的结果显示,利用 shRNA 表达载体靶向 Bcl-2 的生物学效果将对恶性肿瘤的

基于 RNAi 的治疗提供良好的前景。

[参考文献]

- [1] Hammond SM, Bernstein E, Beach D, et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells[J]. *Nature*, 2000, 404:293-296.
- [2] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. *Nature*, 2001, 411:494-498.
- [3] Nykanen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway[J]. *Cell*, 2001, 107:309-321.
- [4] Li K, Lin SY, Brunicardi FC, et al. Use of RNA interference to target cyclin E-overexpressing hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2003, 63:3593-3597.
- [5] Ptasznik A, Nakata Y, Kalota A, et al. Short interfering RNA (siRNA) targeting the Lyn kinase induces apoptosis in primary, and drug-resistant, BCR-ABL1(+) leukemia cells[J]. *Nat Med*, 2004, 10:1187-1189.
- [6] Zhu L, Somlo G, Zhou B. Fibroblast growth factor receptor 3 inhibition by short hairpin RNAs leads to apoptosis in multiple myeloma[J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4:787-798.
- [7] 雷小勇,张 涪,何冬梅. Bcl-2 反义核酸增强阿糖胞苷诱导原代白血病细胞凋亡的研究[J]. *癌症*, 2002, 21:1301-1304.
- [8] 何冬梅,张 涪. 脂质体转染 bcl-2 反义寡核苷酸诱导 Raji 细胞凋亡的研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2004, 31:664-666.
- [9] 何冬梅,张 涪. bcl-2 反义寡核苷酸增强 NCI-H460 细胞对紫杉特尔和放射线敏感性的研究[J]. *第二军医大学学报*, 2005, 25:476-479.
- [10] 胡海燕,张 涪. siRNA 对肺癌细胞株 bcl-2 基因表达的抑制[J]. *第二军医大学学报*, 2005, 25:483-486.
- [11] 何冬梅,张 涪,刘革修,等. Bcl-2 shRNA 表达载体的构建及其对 HL-60 细胞生长的抑制作用[J]. *中国现代医学杂志*, 2005, 15:3736-3742.
- [12] Holle L, Hicks L, Song W, et al. Bcl-2 targeting siRNA expressed by a T7 vector system inhibits human tumor cell growth *in vitro*[J]. *Int J Oncol*, 2004, 24: 615-621.
- [13] Yano J, Hirabayashi K, Nakagawa S, et al. Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10:7721-7726.

[收稿日期] 2006-02-15

[修回日期] 2006-07-25

[本文编辑] 孙 岩