

慢病毒介导的 Clusterin 基因沉默抑制肾癌 786-O 细胞增殖并促进细胞凋亡

石 华^{1,2}, 邓军洪², 郑少斌^{1*}, 王 铸³, 曹开源³, 周 亮², 万 华²

(1.南方医科大学南方医院泌尿外科,广东广州 510515;2.广州医学院附属广州市第一人民医院泌尿外科,广东广州 510180;3.中山大学临床检验标准化研究中心//中山医学院微生物学教研室,广东广州 510080)

摘要:【目的】应用慢病毒介导的 RNA 干扰技术,检测 clusterin(CLU)基因沉默在人肾癌 786-O 细胞的干扰效果及其对人肾癌 786-O 细胞增殖、迁移和凋亡的影响。【方法】构建靶向 CLU 基因的慢病毒干扰载体,利用包装细胞 293T 获得重组慢病毒,感染人肾癌 786-O 细胞株。实验分 5 组:CLU-RNAi-LV1(KD1)、CLU-RNAi-LV2(KD2)、CLU-RNAi-LV3(KD3)为加入靶向 CLU 基因的慢病毒感染的肾癌细胞组,未处理的慢病毒感染的肾癌细胞组(NC 组),肾癌 786-O 细胞为空白对照组(CON 组)。应用 Real time-PCR 及 Western blot 检测不同组别干扰前后 CLU mRNA 及蛋白表达的变化。用细胞划痕实验、MST-1、流式细胞仪等方法检测 CLU 沉默后肾癌 786-O 细胞在增殖、迁移、凋亡等生物学行为的改变。【结果】成功构建 CLU shRNA 慢病毒载体 clu-RNAi-LV 并获得相应慢病毒。Real time-PCR 显示不同感染复数 CLU-RNAi-LV 处理的 KD1、KD2、KD3 组 CLU mRNA 表达水平与对照组相比分别下调 69.4%~96.5%和 0。Western blot 结果显示 KD1、KD2、KD3 组 CLU 蛋白表达水平与 CON 组相比分别下降 35.24%、46.26%和 58.91%,KD3 能显著抑制 786-O 细胞中 CLU 基因的表达。划痕实验显示 24 h 时 KD3(si-CLU)组细胞迁移相对距离(408.43 ± 25.92)小于 NC 组(101.35 ± 6.05)和 CON 组(68.13 ± 6.64, $P < 0.05$)。WST-1 法检测转染后 72 h KD3(si-CLU)组细胞生长速度较 NC 组及 CON 组明显下降($P < 0.05$),各组间差异($P < 0.05$),均有统计学意义。流式细胞仪检测 KD3 (si-CLU)组与 NC 组、CON 组细胞凋亡率分别为(6.23 ± 2.51)%、(1.05 ± 0.30)%和(1.17 ± 0.29)%,KD3(si-CLU)组与 NC 组、CON 组相比凋亡率增加($P < 0.05$),差异有统计学意义。肾癌 786-O 细胞的增殖、迁移受到抑制,而凋亡率增加。【结论】筛选出能稳定干扰 CLU 基因表达的 siRNA 序列和肾癌 786-O 细胞株。CLU 慢病毒干扰载体可有效沉默肾癌 786-O 细胞的内源性 CLU 基因,抑制肾癌 786-O 细胞的增殖、迁移并促进细胞凋亡。

关键词: RNA 干扰;慢病毒;clusterin;肾细胞癌;786-O

中图分类号:R737.11 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2012)05-0603-07

Lentivirus-mediated Clusterin Silence Inhibits Proliferation and Promotes Apoptosis in Human Renal Cell Cancer Line 786-O In Vitro

SHI Hua^{1,2}, DENG Jun-hong², ZHENG Shao-bin^{1*}, WANG Zhu³, CAO Kai-yuan³, ZHOU Liang², WAN Hua²

(1.Department of Urology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2.Department of Urology, The First People's Hospital Affiliated to Guangzhou Medical University, Guangzhou 510180, China; 3.Research Center for Clinical Laboratory Standard//Department of Medical Microbiology, Zhongshan Medical School of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To testify the silence efficiency of a lentivirus-mediated vector for RNA interference (RNAi) targeting clusterin (CLU) and the influence of proliferation and apoptosis in human renal cancer cell line 786-O. 【Methods】Lentiviral vectors for different short hairpin RNAs targeting the coding region of human CLU mRNA (CLU-RNAi-LV) were constructed. The recombinant lentiviral vectors were harvested from 293T cells and were used to transfect human renal cancer cell lines 786-O. There were five groups: CLU-RNAi-LV1 (KD1), CLU-RNAi-LV2 (KD2), and CLU-RNAi-LV3 (KD3) were renal cancer cells with lentiviral

收稿日期:2012-02-22

基金项目:广东省科技计划项目(2009B030801053);广州市科技计划项目(2009Z1-E381-02)

作者简介:石华,在读博士,副主任医师,研究方向:泌尿系肿瘤与泌尿男科疾病微创手术治疗,E-mail:shihua2868@sina.com; * 通信作者:郑少斌,教授,博士生导师,研究方向:泌尿生殖系肿瘤的诊断和治疗与尿动力学,E-mail:ucocyba@21cn.com

infection targeting CLU gene, NC were renal cancer cells with negative lentiviral infection, and CON were renal cancer cells 786-O as blank control group. Expression of CLU mRNA and protein in the cells were detected by real time-PCR and Western blot, respectively. After that, MST-1, wound healing assay, flow cytometry were applied to examine the effect of CLU silence on the proliferation and apoptosis in 786-O cells.【Results】 The lentiviral vectors CLU-RNAi-LV were constructed and confirmed by DNA sequencing. CLU-RNAi-LV resulted in obviously reduced expression of CLU mRNA and protein in the human renal cancer cell line 786-O compared with the control vector. Real time-PCR showed that the CLU mRNA expression levels in KD1, KD2 and KD3 group after CLU-RNAi-LV infection by different MOI were down-regulated by 69.4%, 58.7% ~ 96.5% and 0 respectively compared with NC group. Western blot showed that the CLU protein expression levels in KD1, KD2 and KD3 group decreased by 35.24%, 46.26%, and 58.91%, respectively compared to CON group, and the expression of CLU gene in 786-O cells was significantly inhibited in KD3 group. The wound healing assay showed the cell migration distance in KD3 (si-CLU) group (408.43 ± 25.92) was less than NC (101.35 ± 6.05) and CON group (68.13 ± 6.64), with statistically significant differences among groups ($P < 0.05$). WST-1 assay showed cell growth rate at 72h after transfection was significantly decreased in KD3 (si-CLU) group compared to NC and CON group ($P < 0.05$) with statistically significant differences among groups ($P < 0.05$). FCM showed the apoptosis rate in KD3 (si-CLU), NC and CON group was $(6.23 \pm 2.51)\%$, $(1.05 \pm 0.30)\%$, and $(1.17 \pm 0.29)\%$, respectively. The apoptosis rate in KD3 (si-CLU) group was increased compared to NC and CON group, with statistically significant differences among groups ($P < 0.05$). The proliferation and migration of 786-O cell line were suppressed and apoptosis of 786-O cell line was promoted.【Conclusion】 siRNA sequences and renal cancer cell line 786-O cell with stable interference of CLU gene expression were filtered out. Lentivirus-mediated CLU RNAi can specifically inhibit endogenous CLU expression in human renal carcinoma cell line 786-O. CLU-RNAi-LV can also effectively inhibit proliferation and promote apoptosis in human renal carcinoma cell line 786-O.

Key words: RNA interference; lentivirus; clusterin; human renal cell carcinoma; 786-O

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(5):603-609]

肾癌是泌尿外科最常见的恶性肿瘤之一,针对肾癌基因靶点的药物治疗已开始临床应用^[1]。研究表明 Clusterin(CLU)基因通过抗凋亡作用在泌尿系肿瘤的发生、发展中起重要作用^[2]。慢病毒介导的转染具有高效稳定和持续表达的优点^[3],其介导的 RNA interference(RNAi)已在子宫颈癌^[4]、乳腺癌^[5]、卵巢癌^[6]等人类肿瘤细胞株体外抑制实验中获得了成功。本实验拟观察慢病毒介导 CLU 基因干扰 (CLU-RNAi-LV) 对人肾癌 786-O 细胞增殖、迁移和凋亡的影响,为后续的动物实验及体内研究提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与分组

采用肾癌 786-O 细胞株 (中国科学院上海细胞库),用含 10 mL/L 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,在 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 恒温培养箱进行培养。肾上皮 293T 细胞和大肠杆菌菌株 DH5 α (上海吉凯基因化学有限公司)。CLU-RNAi-LV 慢病毒载体(上海吉凯基因化学有限公司)。实验分 5 组,CLU-RNAi-LV1 (KD1 组)、CLU-RNAi-LV2(KD2

组)、CLU-RNAi-LV3(KD3 组,si-CLU 组)为加入前期实验制备的靶向 CLU 基因的慢病毒感染的肾癌细胞组。未处理的病毒感染的肾癌细胞为阴性对照组(negative control 组,NC 组),肾癌 786-O 细胞为空白对照组 (blank control 组,CON 组)。CLU 引物(上海生工)。鼠抗 CLU 抗体,羊抗鼠二抗 (AB cam)。ECL Kit 化学发光试剂盒 (GE healthcare)。WST-1 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒以及细胞凋亡与坏死检测试剂盒 (碧云天公司)。

1.2 RNA 干扰慢病毒载体制备及转染 786-O 细胞

慢病毒载体质粒 pGCSIL-GFP、pHelper1.0、pHelper2.0 均购自上海吉凯基因化学有限公司。设计 CLU siRNA 片段:CCAGAGCTGCCCCCTTCTAC 及阴性对照片段:TTCTCCGAACGTGTCACGT。构建并合成 shRNA 干扰片段:第 1 条:5'-CAGGGAAGTAAGTACGTCAATCTCGAGATTGACGTACTTACTTCCCTGTTTTT-3',第 2 条 5'-GCTA AAGTCCTACCAGTGGAACTCGAGTTCCACTGGTGGACTTTAGCTTTT T-3',第 3 条 5'-AGGGAA GTAAGTACGTCAATACTCGAGTATTGACCTACTTA

CTTCCCTTTTTT-3'。把合成的引物形成双链。将 shRNA 和 pGCSIL-GFP 进行酶切连接,制备和鉴定克隆后,以 Qiagen 公司的质粒抽提试剂盒分别提取 3 种质粒 DNA,用 293T 细胞进行病毒包装。48 h 后收获并浓缩慢病毒,测定慢病毒滴度。取 1 μL polybrene 和 20 μL 浓缩病毒液感染对数生长期的 786-O 细胞株。

1.3 786-O 细胞慢病毒感染效率的测定

786-O 细胞铺板,每个孔加 4×10^4 个细胞,24 h 后取滴度为 4.0×10^8 TU/mL 的 KD1、KD2、KD3 病毒原液 20 μL 。每一病毒原液转染 3 个孔,分别加入 0.1、1、10 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 体积分数 5% CO_2 培养箱中培养。72 h 后于倒置相差/荧光显微镜下观察并拍照,确定慢病毒感染效率,即转染复数 (multiplicity of infection, MOI) 值。

1.4 Real time-PCR 检测靶向 CLU 慢病毒载体 RNAi 系统敲减效能

收集不同 MOI 病毒感染后的 786-O 细胞,TRIzol 法提取总 RNA 后采用 PCR kit 检测 CLU 基因的表达。CLU 上游引物为 5'-TCCGCGCATTCTTTGGGC G-3',下游引物 5'-GCA CTGGGAGGCGCCGTATT-3'。以 β -actin 为内对照,上游引物 5'-CGGAGTC AACGG ATTTGCTCGTAT-3',下游引物 5'-CCCTGCACAT GCCGAGCCGT-3'。 $\Delta\Delta\text{Ct}$ =转染细胞 [Ct(target gene)-Ct(β -actin)]-对照细胞 [Ct(target gene)-Ct(β -actin)]。沉默效率=($1-2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) $\times 100\%$ 。

1.5 Western blot 检测靶向 CLU 慢病毒载体 RNAi 系统敲减效能

收集感染后的 786-O 细胞,制备蛋白样品。分光光度计测定蛋白浓度。上样量 30 μg ,经 50 g/L 的 SDS-PAGE 浓缩胶和 100 g/L SDS-PAGE 分离胶,分别予 70 V 恒压电泳 30 min,60 V 恒压电泳 2 h,再与 100 V 恒压 90 min 电转移至硝酸纤维素膜上,之后用 50 g/L 脱脂奶粉封闭 2 h。加入鼠抗人 CLU 蛋白单克隆抗体(1:100)孵育过夜,洗膜后加羊抗鼠二抗 IgG (1:5 000) 抗体室温摇动 1 h。ECL 发光法显影定影,胶片扫描,用凝胶图象处理系统分析目标带的分子质量和净光密度值。

1.6 细胞划痕实验

取对数生长期的 786-O 细胞和病毒感染后的 786-O 细胞,以 5×10^5 个细胞/孔接种于 6 孔板中,培养至细胞长至 90% 融合度时出,用 20 μL 枪

头在细胞表面划痕。用 PBS 洗 3 次,去除漂浮的细胞,加入无血清 RPMI 1640 培养液。继续培养,分别在 6、12、24 h 时显微镜下拍照。用 Image 软件测量细胞迁移距离。

1.7 WST-1 法检测 786-O 细胞生长水平

感染病毒 3 d 后,取对数生长期的细胞,将慢病毒感染组、空载体病毒感染组及未感染组细胞重悬配制为 3×10^4 个/mL 单细胞悬液,按每孔 100 μL 接种于 6 孔板中,每孔加 10 μL 的 WST-1 溶液混匀,培养 2 h 后在分光光度计下以波长 450 nm 测定各孔光吸收值 D ,计算细胞生长抑制率=($1-D_{\text{实验}}/D_{\text{对照}}$) $\times 100\%$ 。

1.8 流式细胞仪检测细胞凋亡情况

感染病毒 3 d 后,实验组和对照组分别制备成 1×10^6 mL⁻¹ 的单细胞悬液各取 1 mL 细胞悬液于 1.5 mL 离心管中,300 $\times g$ 离心 5 min,弃上清。细胞沉淀用 1 mL 细胞染色缓冲液重悬。每管细胞加入 5 μL Hoechst 染色液和 5 μL PI 染色液。混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。用流式细胞仪上机分析,检测红色荧光和蓝色荧光。

1.9 统计学分析

使用 SPSS 13.0 统计软件进行统计处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。定量资料进行 one-way ANOVA 单因素方差分析及双因素方差分析,样本间两两比较应用 LSD 方法。所有检验结果以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肾癌 786-O 细胞慢病毒感染效率测定

慢病毒感染 786-O 细胞 72 h 后在倒置/荧光显微镜下观察到目的细胞绿色荧光。荧光显微镜下随机选取视野计算出 786-O 细胞的慢病毒感染效率,并对同一视野细胞进行明视野和荧光视野拍照(图 1)。图中可见,MOI = 1 时,病毒转染率不足 5%;MOI = 100,转染率达 95% 以上,但细胞形态改变明显,细胞趋圆,轮廓模糊,死亡较多;MOI = 10 时,转染效率达 90% 以上,且细胞毒副作用小,密度改变不明显。

2.2 Real time-PCR 检测靶向 CLU 慢病毒载体 RNAi 对肾癌 786-O 细胞的沉默效能

从 4 组细胞中分别提取总 RNA,Real time-PCR 扩增 CLU mRNA,以 β -actin 为内参照。Real

time-PCR 扩增产物电泳结果显示目的基因 (图 2 “↑”所示), CLU 和内参照 β -actin 扩增条带, 与预期设计的扩增片段大小相符。转染后第 3 天, 从 Real-time PCR 结果可以看出 (表 1): 以内参基因 β -actin 为内对照, 在 mRNA 丰度基本相同的情况下, 与内对照相比, KD1、KD2、KD3 对 CLU mRNA 表达水平下调, 其表达量 3 组与对照组相比平均下调至 6.4%, 其中 KD3 下调至 3.5%, 对 CLU 基因沉默效率最高。KD1、KD2、KD3 在不同 MOI 下沉默效率分别为 91.6%、83.1%、88.4%、90.4%、69.4%、58.7%、93.6%、96.5% 和 0。结合蛋白表达情况以 KD3 1:10 的稀释度作后续试验。

2.3 Western Blot 检测靶向 CLU 慢病毒载体对肾癌细胞株 786-O 细胞的沉默效能

慢病毒 RNAi 载体转染 786-O 细胞 72 h 后, KD1、KD2、KD3 组 CLU 蛋白表达条带比 CON 组条带有不同程度减弱, KD3 条带最弱, 对蛋白表达的干扰效果更好, 如图 3A 所示。蛋白表达产物利用凝胶光密度分析软件测定条带灰度值, 结果如图 4B 所示。CLU 干扰慢病毒感染肾癌 786-O 细胞后内源性 CLU 基因的蛋白表达水平明显下调, KD1、KD2、KD3 组 CLU 基因的蛋白表达丰度与 CON 组相比下降 35.24%、46.26%、58.91%, KD3 能显著抑制 786-O 细胞中 CLU 基因的表达。结果表明慢病毒载体能够明显抑制 786-O 细胞中 CLU 蛋白的表达, 与荧光定量 PCR 结果一致。

2.4 靶向 CLU 慢病毒载体抑制肾癌 786-O 细胞划痕实验

细胞划痕 24 h 后 NC 组细胞和 CON 组细胞划痕已经基本被迁移过来的细胞所覆盖, 而 CLU 慢病毒感染后的 786-O 细胞的划痕仍明显 (图 4)。测量各组 0、6、12、24 h 时点迁移相对距离 (表 2)。干扰后 24 h KD3 组 (si-CLU) 细胞迁移距离远小于 NC 组细胞和 CON 组。方差分析显示实验组与对照组间差别有统计学意义 ($P < 0.001$), 而 NC 组和 CON 组间差异无统计学意义 ($P = 0.172 > 0.05$)。实验组与对照组的差别随时间的变化而变化, 存在交互效应 ($P < 0.001$)。

2.5 WST-1 法检测 CLU 基因沉默后 786-O 细胞增殖能力

感染病毒 72 h 后, 用 WST-1 法检测 CLU 基因沉默后的 786-O 细胞生长速度的改变。干扰组 KD3 (si-CLU) 平均吸光度值 0.3413 ± 0.0345 , 而

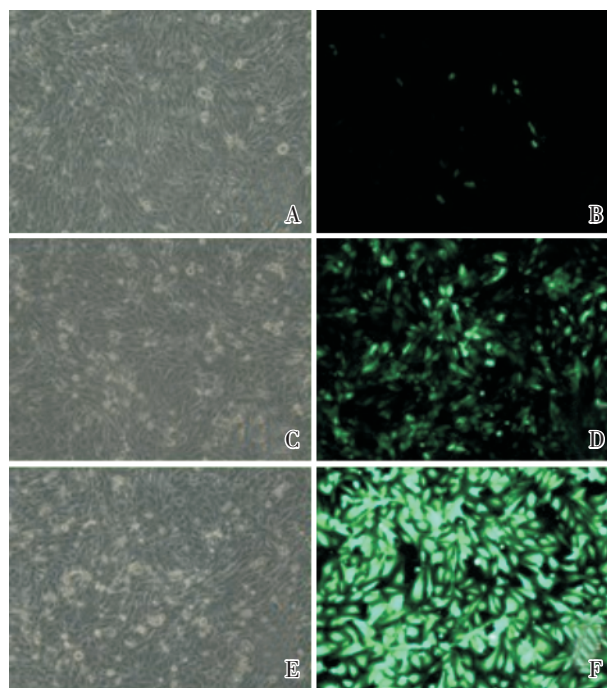


图 1 不同 MOI 慢病毒肾癌 786-O 细胞转染效率荧光镜检图

Fig.1 Transfection efficiency of lentivirus in 786-O cells test under fluoroscope

A: The lentivirus vector transfects 786-O cells when MOI = 1 test under; B: transfection efficiency of lentivirus in 786-O cells when MOI = 1 test under fluoroscope; C: The lentivirus vector transfects 786-O cells when MOI = 10; D: transfection efficiency of lentivirus in 786-O cells when MOI = 10 test under fluoroscope; E: The lentivirus vector transfects 786-O cells when MOI = 100; F: transfection efficiency of lentivirus in 786-O cells when MOI = 100 test under fluoroscope; $\times 100$

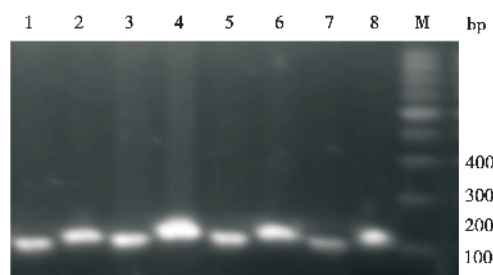


图 2 Real-time PCR 结果凝胶电泳

Fig.2 Electrophoresis expansion plans of real-time PCR

1. CLU-RNAi-LV1 Actin; 2. CLU-RNAi-LV1 clusterin; 3. 786-O cells Actin; 4. 786-O cells Clusterin; 5. CLU-RNAi-LV2 Actin; 6. CLU-RNAi-LV2 Clusterin; 7. CLU-RNAi-LV3 Actin; 8. CLU-RNAi-LV3 Clusterin.

NC 组为 0.4175 ± 0.0554 , CON 组为 0.4145 ± 0.0231 ($\bar{x} \pm s, n=6$)。si-CLU 组生长速度较 NC 组及

表 1 Real-time PCR 检测不同干扰序列不同 MOI 对 786-O 细胞的 CLU mRNA 表达水平的影响

Table 1 MOI effects and specific sequence effects of CLU-RNAi-LV induces CLU gene expression in 786-O cells by real time-PCR

	1#-1clu	1#-10clu	1#-100clu	2#-1clu	2#-10clu	2#-100clu	3#-1clu	3#-10clu	3#-100clu
Treatment group	28.05	25.82	26.66	27.03	27.40	32.25	28.77	27.04	26.07
β -actin	12.61	12.91	12.00	11.78	15.35	19.42	11.95	11.86	15.00
Δ CT	15.44	12.91	14.66	15.25	12.05	12.83	16.82	15.18	11.07
$\Delta\Delta$ CT	3.58	2.57	3.11	3.39	1.71	1.28	3.96	4.84	-0.43
Folds	11.95	5.93	8.63	10.48	3.27	2.42	15.56	28.64	0

Clu: clusterin

表 2 RNA 干扰后不同时间各组细胞的迁移相对距离

Table 2 Results of cell locomotion detected with wound healing assay

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

Group	0 h	6 h	12 h	24 h
Blank control	763.35 \pm 28.21	319.65 \pm 41.12	181.30 \pm 17.35	68.13 \pm 6.64
Negative control	744.98 \pm 48.42	344.93 \pm 35.17	220.23 \pm 20.19	101.35 \pm 6.05
Si-CLU group	791.68 \pm 38.57	513.65 \pm 36.45	448.90 \pm 28.70	408.43 \pm 25.92

CON组 786-O 细胞明显下降,增殖能力显著降低(P 值分别为 0.005 与 0.006,均 < 0.05),差异有统计学意义。而 NC 组与 CON 组之间差异无统计学意义($P = 0.898 > 0.05$)。转染后 72 h si-CLU 组的生长抑制率为 17.66%(图 5)。

2.6 流式细胞仪检测 CLU 基因沉默后 786-O 细胞凋亡改变

转染 3 d 后,采用 Hoechst 33342 和碘化丙啶双染后进行荧光显微镜检测及流式细胞仪检测。荧光显微镜观察绿色荧光为 GFP 蛋白,红色荧光为 PI 染色的坏死细胞,蓝色荧光为 Hoechst 染色的细胞核,如图 6 所示。流式细胞仪检测各组细胞凋亡率,KD3(si-CLU)组为(6.23 \pm 2.51)%,NC 组为(1.05 \pm 0.30)%,CON 组为(1.17 \pm 0.29)%,如图 7 所示。5 次重复样本方差分析,si-CLU 组与 NC 组、CON 组相比(P 均 < 0.01),差异有统计学意义,而 NC 组与 CON 组比较差异无统计学意义($P = 0.890 > 0.05$)。

3 讨论

基因治疗是极有潜力的肿瘤治疗方法。研究表明 CLU 基因表达异常与人类多种肿瘤的发生、发展密切相关。RNAi 技术可以在不影响正常基因功能的前提下抑制 CLU 基因的过度,则可能促进细胞凋亡,抑制细胞的迁移和新生血管的形成,从而实现基因治疗。CLU(聚集素)是一种广泛存在

的异源二聚体硫酸化糖蛋白。1983 年首次由睾丸分离^[7],CLU 蛋白在生理条件下参与脂质转运、组织重建、胚胎发育、辅助生殖、细胞与基质间相互作用及细胞凋亡等生物学过程。研究发现肾癌中 CLU 过度表达且肿瘤细胞中 CLU 的表达水平与其侵袭性相关。Sakai 等^[8]分析 153 例肾癌标本提示 CLU 的表达可作为肾癌根治术后的分子预后指标。本课题组研究亦提示 CLU 过表达与肿瘤进展有关^[9]。

Li 等^[6]研究卵巢癌细胞株 CLU 基因 RNA 干扰后上调了细胞的化疗耐受性及抗凋亡效果。Miyake 等^[10]应用反义寡核苷酸阻断前列腺癌细胞 CLU 基因表达,抑制了其抗凋亡作用。Gleave 等^[11]研究发现反义寡核苷酸抑制 CLU 表达水平不但能增加前列腺癌对紫杉醇化疗的敏感性,而且还增加了其对去势疗法以及放疗的敏感性。Miyake 等^[12]应用互补 DNA 法将 CLU 基因导入肾癌 ACHN 细胞并注入鼠体内观察到可以增强肿瘤细胞的转移能力。提示可以运用 RNAi 技术针对 CLU 基因进行干扰观察其对肾癌细胞的影响,为肾癌的进展和转移治疗提供实验依据。

慢病毒载体以慢病毒基因组为基础,去除复制所需的基因,以治疗性基因和选择性标记物构建而成。慢病毒载体具有许多优点:慢病毒载体能高效地将基因转染到几乎所有哺乳动物细胞中,包括不分裂细胞^[13]。慢病毒载体介导 RNAi 可使目的基因在细胞中长期稳定表达,持续数周甚至

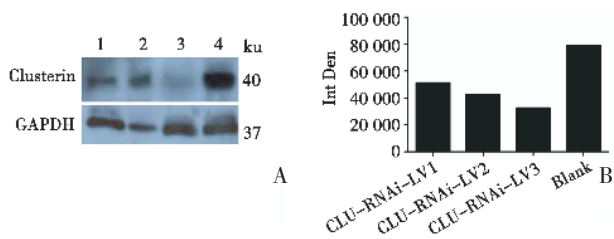


图 3 CLU-RNAi-LV 对 786-O 细胞 CLU 蛋白表达水平的影响

Fig.3 Effect of CLU-RNAi-LV on CLU protein expression on 786-O cells

1: CLU-RNAi-LV1; 2: CLU-RNAi-LV2; 3: CLU-RNAi-LV3; 4: 786-O cells. A: Western blot results; B: diagram results

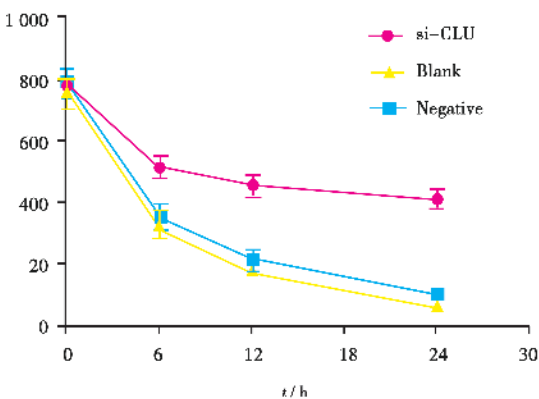
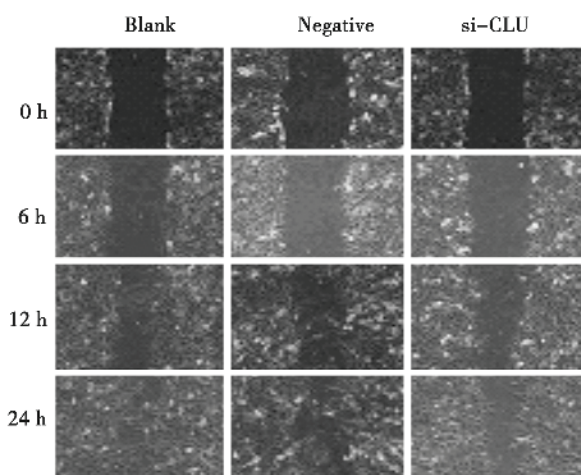


图 4 划痕试验检测肾癌 786-O 细胞迁移能力

Fig.4 Cell locomotion detected with wound healing assay

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

数月。慢病毒表达载体不携带病毒外壳基因, 转染后的细胞不能产生病毒颗粒, 安全性高。此外, 它还具有转移基因片段容量大、无毒性、不易诱发宿主免疫反应等优点^[14]。近年来, 慢病毒载体介导的 RNAi 技术已大量应用于肿瘤研究。

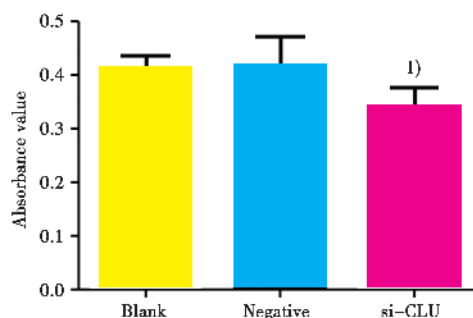


图 5 RNA 干扰 72 h 后对各组细胞的增殖抑制作用

Fig.5 The proliferation inhibition of 786-O cells after 72-hour treatment with CLU-RNAi-LV by WST-1 assay

$\bar{x} \pm s, n=6$; 1) si-CLU vs Negative, $P < 0.05$

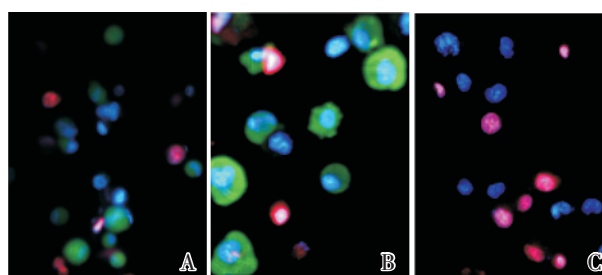


图 6 细胞凋亡与坏死检测

Fig.6 Apoptosis cells and necrosis cells test under fluoroscope

A: si-CLU group; B: negative group; C: blank control; $\times 400$

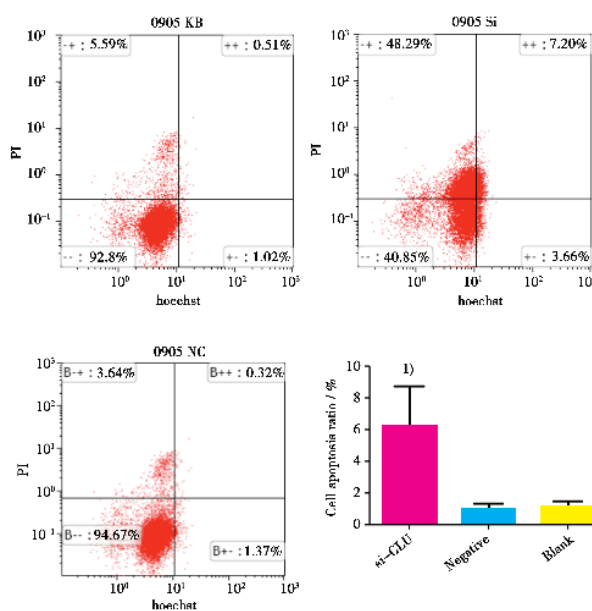


图 7 流式细胞仪对细胞凋亡与坏死检测

Fig.7 Apoptosis rates change in 786-O cells by flow cytometry analysis

$n = 5$; 1) si-CLU vs Negative, $P < 0.05$

Deharvengt^[15]用慢病毒介导的 RNAi 沉默 cyclin D1 基因抑制了血管内皮生长因子的表达,从而抑制了胰腺癌细胞的增殖及血管生成。Duan 等^[16]应用慢病毒介导 RNA 干扰显著降低人舌癌细胞株 β -catenin 蛋白的表达,抑制肿瘤细胞的生长与增殖。

本实验用慢病毒载体干扰肾癌 786-O 细胞中的 CLU 基因,结果发现在 mRNA 水平和蛋白质水平均有明显的抑制。KD1、KD3、KD3 在不同 MOI 下沉默效率均超过 50%。RNA 干扰后 786-O 细胞 CLU 基因的蛋白表达丰度较未干扰 786-O 细胞下降 35%~58%,表现出很高的干扰效率。由 Real time-PCR 与 Western Blot 检测结果筛选出 MOI 为 10 时 KD3(si-CLU)组对 CLU 基因沉默效率最高。二者结果的一致性反映了慢病毒介导的 RNA 干扰的高效性及稳定性。由划痕试验可见 24 h 后空白处理组细胞和阴性对照组细胞的划痕已经基本被迁移过来的细胞所覆盖,而 CLU 慢病毒感染后的 786-O 细胞的划痕仍明显。WST-1 法检测转染 72 h 后吸光度值反映细胞增殖能力显著下降,实验组生长受到抑制。流式细胞仪检测 KD3 (si-CLU)组细胞凋亡率增加。由此可见,CLU 慢病毒干扰载体感染后的肾癌 786-O 细胞,其增殖、迁移和侵袭能力均明显下降,凋亡增加,表明 CLU 慢病毒干扰载体可有效地抑制肾癌 786-O 细胞的增殖、侵袭和转移,促进肿瘤细胞凋亡。

本研究通过慢病毒介导的特异性 RNA 干扰高效抑制肾癌细胞 CLU 基因的表达,显著降低肾癌细胞增殖、迁移和侵袭能力,促进肿瘤凋亡,提示 CLU 基因在肾癌发生发展和侵袭转移中起着重要的作用,为进一步探究 CLU 基因与肿瘤浸润转移的分子机制提供依据,是肿瘤治疗的极有潜力的靶点,有望成为治疗肾癌的一种新途径。

参考文献:

- [1] Rathmell WK, Godley PA. Recent updates in renal cell carcinoma[J]. *Curr Opin Oncol*, 2010, 22(3):250-256.
- [2] Hazzaa SM, Elashry OM, Afifi IK. Clusterin as a diagnostic and prognostic marker for transitional cell carcinoma of the bladder[J]. *Pathol Oncol Res*, 2010, 16(1): 101-109.
- [3] Aris K, Michae T, Oliver G, et al. Discovery and analysis of the first endogenous lentivirus [J]. *PNAS*, 2007, 104(15): 6261-6265.
- [4] Gu W, Putral L, Mc Millan N. siRNA and shRNA as anticancer agents in a cervical cancer model [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 442(II):159-172.
- [5] Dougherty CJ, Ichim TE, Liu L, et al. Selective apoptosis of breast cancer cells by siRNA targeting of BORIS[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 370(1): 109-112.
- [6] Wei L, Xue T, Wang J, et al. Roles of clusterin in progression, chemoresistance and metastasis of human ovarian cancer[J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(4):791-806.
- [7] Blaschuk O, Burdzy K, Fritz IB. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid[J]. *J Biol Chem*, 1983, 258(12): 7714-7720.
- [8] Sakai I, Miyake H, Takenaka A, et al. Expression of potential molecular markers in renal cell carcinoma: impact on clinicopathological outcomes in patients undergoing radical nephrectomy [J]. *BJU Int*, 2009, 104(7): 942-946.
- [9] 陈炜, 石华, 谢丹, 等. Clusterin 蛋白在肾癌组织中的表达及临床意义[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2006, 27(2): 87-89.
- [10] Miyake H, Hara I, Gleave M. Antisense oligodeoxynucleotide therapy targeting clusterin gene for prostate cancer: Vancouver experience from discovery to clinic[J]. *Intern J Urol*, 2005, 12(9): 785-794.
- [11] Gleave M, Miyake H. Use of antisense oligonucleotides targeting the cytoprotective gene, clusterin, to enhance androgen and chemo-sensitivity in prostate cancer [J]. *World J Urol*, 2005, 23(1): 38-46.
- [12] Miyake H, Gleave M, Arakawa S, et al. Introducing the clusterin gene into human renal cell carcinoma cells enhances their metastatic potential [J]. *J Urol*, 2002, 167(5): 2203-2208.
- [13] Nishitsuji H, Ikeda T, Miyoshi H, et al. Expression of small hairpin RNA by lentivirus-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells [J]. *Microbes Infect*, 2004, 6(1): 76-85.
- [14] Cocknell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors[J]. *Mol Biotechnol*, 2007, 36(3): 184-204.
- [15] Deharvengt SJ, Gunn JR, Pickett SB, et al. Intratumoral delivery of shRNA targeting cyclin D1 attenuates pancreatic cancer growth [J]. *Cancer Gene Ther*, 2010, 17(5): 325-333.
- [16] Duan Y, Fan M. Lentivirus-mediated gene silencing of beta-catenin inhibits growth of human tongue cancer cells[J]. *Oral Pathol Med*, 2011, 40(8): 643-650.