

胃癌相关基因GCRG213正反向转染和RNA干扰对裸鼠胃癌种植瘤的影响

徐世平, 吴本俨, 王孟薇, 高利利, 伍银桥, 王卫华, 尤纬缔

徐世平, 吴本俨, 王孟薇, 高利利, 伍银桥, 王卫华, 尤纬缔,
中国人民解放军总医院南楼消化科 北京市 100853
国家自然科学基金资助项目, No.30370635
通讯作者: 吴本俨, 100853, 北京市海淀区复兴路28号, 中国人民解放军总医院南楼消化科. benyanwu@vip.sina.com
电话: 010-66939443
收稿日期: 2007-04-04 接受日期: 2007-04-21

Effect of sense or anti-sense GCRG213 fragment and GCRG213 RNA interference on transplanted gastric carcinoma *in vivo*

Shi-Ping Xu, Ben-Yan Wu, Meng-Wei Wang, Li-Li Gao,
Yin-Qiao Wu, Wei-Hua Wang, Wei-Di You

Shi-Ping Xu, Ben-Yan Wu, Meng-Wei Wang, Li-Li Gao,
Yin-Qiao Wu, Wei-Hua Wang, Wei-Di You, Department
of Gastroenterology, South Building, General Hospital of
Chinese PLA, Beijing 100853, China
Supported by National Natural Science Foundation of
China, No. 30370635
Correspondence to: Dr. Ben-Yan Wu, Department of Gas-
troenterology, South Building, General Hospital of Chinese
PLA, 28 Fuxing Road, Haidian District, Beijing 100853,
China. benyanwu@vip.sina.com
Received: 2007-04-04 Accepted: 2007-04-21

Abstract

AIM: To investigate the influence of sense or anti-sense GCRG213 fragment and GCRG213 RNA interference (RNAi) on transplanted gastric cancer *in vivo*.

METHODS: Gastric carcinoma cell line MKN45 at logarithmic growth phase was subcutaneously inoculated in 20 athymic mice. After tumor formation, the adeno-associated virus (AAV) containing sense or anti-sense GCRG213 fragment and GCRG213 RNA interference fragment was injected into tubercles. Meanwhile, empty and normal saline control groups were designed. All the mice were killed 2 weeks after injection. Tumors were weighted and the expression of GCRG213 mRNA was detected by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction.

RESULTS: Three weeks after inoculation of MKN45 cells, small tumor tubercles came into formation. The weights of tumor tissues were 5.12 ± 1.02 , 1.22 ± 0.46 , 0.81 ± 0.37 , 3.13 ± 0.69 and 3.45 ± 0.87 g in sense, anti-sense, RNAi, empty and normal saline group, and the mRNA expression of GCRG213 were 0.406 ± 0.013 , 0.211 ± 0.021 , 0.087 ± 0.015 , 0.312 ± 0.050 and 0.283 ± 0.061 in the above groups, respectively.

CONCLUSION: Target genes including sense or anti-sense GCRG213 and RNAi fragment can be effectively expressed *in vivo* through AAV vector. Increased or decreased GCRG213 expression can promote or inhibit growth of gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer related gene GCRG213; Adeno-associated virus; Small interfering RNA; Gene transfection; Transplanted gastric cancer

Xu SP, Wu BY, Wang MW, Gao LL, Wu YQ, Wang WH, You WD. Effect of sense or anti-sense GCRG213 fragment and GCRG213 RNA interference on transplanted gastric carcinoma *in vivo*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(14):1639-1642

摘要

目的: 观察胃癌相关基因GCRG213体内正、反向转染和RNA干扰对裸鼠胃癌种植瘤的影响。

方法: 将对数生长期的胃癌细胞株MKN45接种到裸鼠皮下, 成瘤后用制备好的分别含GCRG213正、反义克隆和RNAi片段的腺相关病毒分别在肿瘤局部注射, 以空病毒和生理盐水对照, 继续喂养2 wk后处死, 取肿瘤测量重量, 并用半定量RT-PCR检测肿瘤组织GCRG213 mRNA表达水平。

结果: 裸鼠接种MKN45细胞3 wk左右皮下形成肿瘤结节。肿瘤组织重量在正向转染组为 5.12 ± 1.02 g、反向组 1.22 ± 0.46 g、RNAi组 0.81 ± 0.37 g、空病毒组 3.13 ± 0.69 g、生理盐水组 3.45 ± 0.87 g; 各组GCRG213 mRNA表达水平依次分别为 0.406 ± 0.013 , $0.211 \pm$

■背景资料

胃癌相关基因GCRG213是我们实验室筛选出的1条在肠型胃癌、癌旁和正常组织间差异表达的新基因, 初步研究表明: 用其正义克隆转染人胃癌细胞系MKN45细胞后, 能增加细胞的生长速度和成瘤性, 用反义克隆转染或RNA干扰后则能抑制细胞的生长速度和成瘤性, 是1种可能的胃癌促进因子。腺相关病毒(AAV)载体是目前唯一没有引起人类宿主任何病理反应的载体, 有望成为人体基因治疗和基因功能研究最理想的载体工具。为了进一步在体研究GCRG213功能, 我们包装了含其正、反义克隆和特异性RNAi片段的3种AAV, 并行裸鼠体内注射, 为以后的研究奠定了基础, 同时也为胃癌基因治疗提供了有益的尝试。

■同行评价

该文选题新颖, 研究方法先进, 数据客观, 结论对于探索胃癌的发病机制具有较高的学术价值, 而且对于胃癌的基因治疗也提供了有益的尝试。

0.021, 0.087 ± 0.015 , 0.312 ± 0.050 , 0.283 ± 0.061 。

结论: 三种腺相关病毒分别有效地介导了GCRG213正、反义克隆和RNAi片段的体内表达, 提高或降低了GCRG213 mRNA的表达水平, 促进或抑制了胃癌种植瘤的生长。

关键词: 胃癌相关基因GCRG213; 腺相关病毒; 小干扰RNA; 基因转染; 胃癌种植瘤

徐世平, 吴本严, 王孟薇, 高利利, 伍银桥, 王卫华, 尤纬绵. 胃癌相关基因GCRG213正反向转染和RNA干扰对裸鼠胃癌种植瘤的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(14):1639-1642
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1639.asp>

0 引言

胃癌的发生发展是多基因变异累积的过程. 本实验室应用荧光标记的DDRT-PCR筛选出1条在肠型胃癌组织、癌旁及正常组织间差异表达的新基因GCRG213^[1]. 初步研究表明, 用其正义克隆转染人胃癌细胞系MKN45细胞后, 能增加细胞的生长速度和成瘤性, 用反义克隆转染或RNA干扰后则能抑制细胞的生长速度和成瘤性^[2-3]. 为了进一步研究GCRG213的体内功能, 我们用包装好的分别含GCRG213正、反义克隆和特异性RNAi片段的三种腺相关病毒行裸鼠体内注射, 观察对胃癌种植瘤生长的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 5周龄雌性裸鼠均购自解放军总医院动物实验中心, 体质量18-20 g. 包含GCRG213正、反向克隆的腺相关病毒rAAV-GCRG213-s, rAAV-GCRG213-a(滴度均为 4×10^{13} v.g./L)和包含GCRG213特异性RNAi片段的腺相关病毒rAAV-U6-shRNA(滴度为 5×10^{15} v.g./L)均有本实验室制备并保存. rAAV-GFP腺相关病毒(滴度为 5×10^{15} v.g./L)由北京本元正阳公司惠赠. MKN45细胞系本实验室保存. RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司。

1.2 方法

1.2.1 建立胃癌种植瘤模型 5周龄雌性裸鼠20只, 随机分成5组, 每组4只, 无菌环境下饲养3 d后准备接种. 取对数生长期MKN45细胞, 2.5 g/L胰酶消化后, $1 \times \text{PBS}$ 洗涤, 制成浓度为 1×10^{10} /L的单细胞悬液, 在每只裸鼠左后肢皮下注射0.2 mL MKN45细胞。

1.2.2 病毒局部注射 将病毒均稀释成滴度为 $2 \times$

10^{14} v.g./L, 待裸鼠皮下有小的瘤结节形成时, 每组裸鼠分别在肿瘤局部注射0.2 mL相应病毒或生理盐水. A组(空白组): 注射0.2 mL生理盐水; B组(空病毒对照组): 注射rAAV-GFP腺相关病毒; C组(正向转染组): 注射rAAV-GCRG213-s腺相关病毒; D组(反向转染组): 注射rAAV-GCRG213-a腺相关病毒; E组(shRNA干扰组): 注射rAAV-U6-shRNA腺相关病毒. 注射后裸鼠继续在无菌环境下饲养2 wk, 观察肿瘤大小变化及裸鼠存活状况。

1.2.3 取肿瘤组织 2 wk后将裸鼠引颈处死, 剥离种植瘤块, 滤纸吸干后测量肿瘤大小并称重, 部分组织液氮保存, 拟行RT-PCR检测GCRG213 mRNA表达水平的变化。

1.2.4 组织总RNA提取及鉴定 称取50-100 mg组织, 加入1 mL TRIzol试剂, 组织体积不超过TRIzol试剂体积的10%. 匀浆后室温孵育5 min, 加0.2 mL氯仿, 剧烈震荡15 s, 室温孵育2-3 min. 4°C 12 000 g离心15 min. 移出上清, 加0.5 mL异丙醇, 室温孵育10 min. 4°C 12 000 g离心10 min. 移去上清, 用冷的750 mL/L乙醇洗一次. 4°C 7500 g离心5 min, 回收RNA沉淀, 溶解于100 μL DEPC水中使用, 或置于乙醇中 -70°C 保存备用. 取5 μL RNA样品, 以10 g/L琼脂糖凝胶电泳分析, 紫外灯下观察rRNA, 28S, 18S, 5S的带型和强度. 总RNA用双蒸水1:40稀释后测其 $A_{260/280}$ 比值以及有无残留蛋白。

1.2.5 半定量RT-PCR检测GCRG213 mRNA表达 取RNA 5 μg 进行逆转录反应, 然后各自取cDNA 1 μL 用于PCR反应. GCRG213基因引物序列如下: P1: 5'-AACTGCAGATGCAACAAGAA-3', P2: 5'-CGGGATCCAAGTTTTGAGTGAG-3'. 以 $\beta 2$ -microglobulin为内参照, 引物序列如下: P1 5'-GCTATCCAGCGTACTCCAAAGA-3', 5'-AGAGCTACCTGTGGAGCAACCT-3'. 引物由上海博亚生物工程公司合成, 反应条件: 94°C 2 min. 94°C 30 s, 51°C 30 s, 72°C 30 s, 32个循环. 72°C 延伸7 min. 取5 μL 扩增产物, 以10 g/L琼脂糖凝胶电泳分析. 产物电泳后经凝胶分析软件(Bandscan)分析其灰度值, 结果以产物与内参照的比值表示。

2 结果

2.1 胃癌种植瘤模型及肿瘤生长状况 裸鼠皮下接种MKN45细胞后, 3 wk左右皮下形成肉眼可见的肿瘤结节, 局部注射病毒后, 裸鼠生长良好,

未出现1例死亡.继续喂养2 wk后处死裸鼠,剥离瘤块,滤纸吸干后称重. A, B, C, D, E五组肿瘤重量分别为(mean \pm SD, g) 3.45 ± 0.87 , 3.13 ± 0.69 , 5.12 ± 1.02 , 1.22 ± 0.46 , 0.81 ± 0.37 , 同A组和B比较, C组的裸鼠肿瘤生长更快($P<0.05$), 而D组和E组的裸鼠肿瘤生长较慢($P<0.05$).

2.2 肿瘤组织总RNA的提取 肿瘤组织提取的总RNA(图1), 分光光度计测量 $A_{260/280} = 1.7-1.85$, 电泳清晰显示28S, 18S和5S条带.

2.3 RT-PCR结果 A, B, C, D, E五组肿瘤组织中GCRG213 mRNA表达水平(与内参照比值)分别为 0.283 ± 0.061 , 0.312 ± 0.050 , 0.406 ± 0.013 , 0.211 ± 0.021 , 0.087 ± 0.015 , 同A组和B组比较C组的裸鼠GCRG213 mRNA表达水平相对较高, 而D组和E组的裸鼠肿瘤GCRG213 mRNA表达水平相对较低, 结果说明注射病毒后正、反向克隆得到了有效表达, shRNA片段也有效抑制了目的基因的表达(图2).

3 讨论

胃癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一, 我国是胃癌发病率较高的地区, 尽管目前我国胃癌的发病率有下降趋势, 但其发病率和死亡率仍位居前列^[4-5]. 探索疾病发生的相关机制, 寻找更为有效的治疗手段仍是我们努力的方向.

GCRG213是我们实验室发现的1条胃癌相关新基因, 既往的研究表明^[2-3]GCRG213可能是一种新发现的恶性肿瘤形成促进因子. 由于既往的实验主要是体外实验, 为了进一步研究GCRG213在体内表达水平的变化对肿瘤的影响, 我们选用腺相关病毒载体进行了GCRG213正、反义克隆和特异性RNAi片段的包装, 结果表明, 用病毒进行裸鼠种植瘤局部注射后, 成功实现了基因的局部表达, 同注射了空病毒组比较, 正向表达组促进了肿瘤的发展, GCRG213 mRNA表达水平升高; 反向表达组和RNAi组减缓了肿瘤的发展速度, GCRG213 mRNA表达水平降低. 结果再次证实了GCRG213是一个促癌因子, 当然本实验裸鼠数量有限, 对实验的进一步扩大将有助于对结果的更深入观察, GCRG213的促癌机制和对体内其他相关基因的影响也有待进一步研究. 本实验也为胃癌的基因治疗提供了有益的尝试. 随着生物技术的发展, AAV载体成为目前载体工具研究的热点. 在用于人类基因治疗常用病毒载体中, AAV载体是目前唯一没有引起人类宿主任何病理反应的

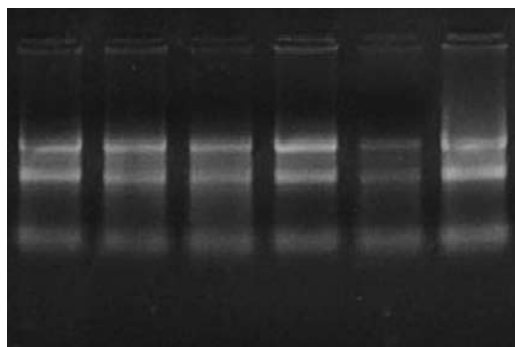


图1 裸鼠肿瘤组织提取总RNA电泳图.

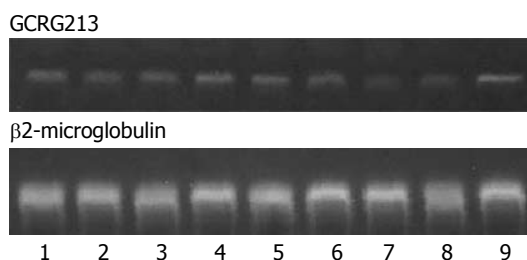


图2 裸鼠肿瘤组织GCRG213 mRNA表达水平. 1-2: D组; 3-4: B组; 5-6: A组; 7-8: E组; 9: C组.

载体^[6]. 作为体内实验一种理想的基因治疗的病毒载体, AAV具有使用安全、不致病、可以定点整合到第19号染色体上、可以感染分裂和非分裂细胞、宿主范围广、携带的外源基因可长期稳定表达等优点^[7-9]. rAAV携带的外源基因除了以整合的形式长期表达以外, 还可以染色体外附加体的形式短暂表达. 这取决于转导的细胞类型、细胞的代谢和增殖状态以及所采用的转导条件. rAAV向体内靶组织注射后, 逐渐由单链的载体基因组转变成高分子量的双链串联体, 伴随着外源基因的表达逐渐增强, 在数周内表达达到稳定状态. 外源基因的长期表达既可以来自整合于染色体的串联体, 也可以来自附加体形式的串联体, 这两种情况同时存在. 在小鼠肝脏中, rAAV的单链基因组在5 wk内逐渐消失, 代之以双链、高分子量串联体的逐渐增加. 这种串联体在约5%的细胞中是整合形式的, 其余则是以附加体形式存在的^[8]. 因此, AAV有望成为人体基因治疗和基因功能研究最理想的载体工具. 本实验显示裸鼠局部注射病毒数达到 $10^{10}-10^{11}$ v.g., 未出现任何不良反应, 生长状况良好, 反应了腺相关病毒良好的安全性, 同时用该病毒成功实现了基因的体内表达, 对肿瘤的生长产生了抑制或促进作用, 也说明用病毒进行体内目的基因的正、反向表达和RNA干扰都

是可行的. Mahendra *et al*^[10]已经用rAAV介导的sFlt21抑制肿瘤血管的生成, Veldwijk *et al*^[11]也在肉瘤细胞系中用rAAV2介导自杀基因来进行基因治疗的研究, 都显示了rAAV应用于临床的广阔前景.

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是由与靶序列同源的双链RNA所诱导的特异性的转录后基因沉默现象, 它具有高效性、特异性的特点, 已成为基因治疗和基因功能研究领域新的热点. 典型的转染外源合成的siRNA在转染7 d以后或者10次细胞分裂后会从mRNA抑制中恢复^[12]. 然而用shRNA载体转染的细胞将经历长期稳定的mRNA抑制作用. 从而提供了比转染化学合成的siRNA更经济有效的方法. 如果能用病毒包装含目的基因特异性的shRNA进行体内感染并有效表达, 无疑是基因治疗的一种理想的方法. 由于RNAi的高效表达需要有特异性的U6启动子^[13-14], 我们构建的包含U6启动子和特异性RNAi片段的rAAV-U6-shRNA腺相关病毒体内注射后成功实现了RNAi片段的有效表达, 也将为更多的基因干预和基因的功能研究提供有效的载体工具.

4 参考文献

- 1 Wang GS, Wang MW, Wu BY, Liu XB, You WD, Yang XY. A gene encoding an apurinic/aprimidinic endonuclease-like protein is up-regulated in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1196-1201
- 2 高利利, 吴本俨, 王孟薇, 黄海力, 伍银桥, 尤纬缔, 王卫华. 胃癌相关基因GCRG213正反义真核表达载体的构建及鉴定. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1453-1457
- 3 高利利, 吴本俨, 王孟薇, 王珊, 黄海力, 伍银桥, 尤纬缔, 王卫华. 胃癌相关基因GCRG213真核表达载体的构建及其对胃癌细胞生长特性的影响. *解放军医学杂志* 2006; 31: 881-884
- 4 赵金扣, 刘爱民, 武鸣, 圣龙贵, 陈娟, 顾小平, 王建军, 覃玉, 陆健. 江苏省大丰市1999-2004年主要恶性肿瘤发病死亡分析. *中国肿瘤* 2005; 14: 577-579
- 5 张薇, 项永兵, 刘振伟, 方茹蓉, 阮志贤, 孙璐, 高立峰, 金凡, 高玉堂. 1973-1999年上海市区老年人恶性肿瘤发病趋势分析. *中华老年医学杂志* 2005; 24: 701-704
- 6 Flotte TR. Gene therapy progress and prospects: recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Ther* 2004; 11: 805-810
- 7 Rabinowitz JE, Samulski RJ. Building a better vector: the manipulation of AAV virions. *Virology* 2000; 278: 301-308
- 8 Xu R, Sun X, Tse LY, Li H, Chan PC, Xu S, Xiao W, Kung HF, Krissansen GW, Fan ST. Long-term expression of angiostatin suppresses metastatic liver cancer in mice. *Hepatology* 2003; 37: 1451-1460
- 9 Wang H, Shayakhmetov DM, Leege T, Harkey M, Li Q, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G, Lieber A. A capsid-modified helper-dependent adenovirus vector containing the beta-globin locus control region displays a nonrandom integration pattern and allows stable, erythroid-specific gene expression. *J Virol* 2005; 79: 10999-11013
- 10 Mahendra G, Kumar S, Isayeva T, Mahasreshti PJ, Curiel DT, Stockardt CR, Grizzle WE, Alapati V, Singh R, Siegal GP, Meleth S, Ponnazhagan S. Antiangiogenic cancer gene therapy by adeno-associated virus 2-mediated stable expression of the soluble FMS-like tyrosine kinase-1 receptor. *Cancer Gene Ther* 2005; 12: 26-34
- 11 Veldwijk MR, Berlinghoff S, Laufs S, Hengge UR, Zeller WJ, Wenz F, Fruehauf S. Suicide gene therapy of sarcoma cell lines using recombinant adeno-associated virus 2 vectors. *Cancer Gene Ther* 2004; 11: 577-584
- 12 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-498
- 13 Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; 296: 550-553
- 14 Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 6047-6052

电编 何基才 编辑 王晓瑜