

· 论 著 ·

siRNA 抑制人乳腺癌 KLK6 基因表达的实验研究

季丙元, 关 晶

(济宁医学院生物科学系生物学教研室, 山东日照 276826)

摘要:目的 探讨 siRNA 沉默 KLK6 基因表达对乳腺癌细胞生长的抑制作用及其机制, 为乳腺癌的基因诊断和治疗提供理论依据。方法 针对 KLK6 mRNA 序列设计合成 siRNA, 构建 2 个重组质粒 PGCsilencer™ H1/GFP/Neo/KLK6 和 PGCsilencer™ H1/GFP/Neo/Non; 将重组质粒导入乳腺癌 MCF-7 细胞株, G418 筛选获得稳定转染的细胞株; 实验分为脂质体对照、阴性质粒转染对照及 KLK6 siRNA 重组质粒转染组, 实时荧光定量 PCR 法检测 KLK6 mRNA 的表达的变化, 用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法测量细胞生长情况。结果 测序证实表达载体构建成功, 在稳定转染重组质粒 PGCsilencer™ H1/GFP/Neo/KLK6 的乳腺癌 MCF-7 细胞株中, KLK6 mRNA 抑制率 (76%) 明显高于阴性质粒对照组 (2.7%), MCF-7 细胞增殖活性显著低于阴性对照组和脂质体对照组。结论 重组质粒 PGCsilencer™ H1/GFP/Neo/KLK6 可抑制乳腺癌细胞中 KLK6 基因的表达, 并抑制乳腺癌细胞的生长。

关键词: RNA, 小分子干扰; 乳腺肿瘤; kallikrein 6

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.14.011

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)14-1379-03

Research of silencing kallikrein 6 gene with siRNA in human breast cancer

Ji Bingyuan, Guang Jing

(Department of Biological Science, Jining Medical University, Rizhao, Shandong 276826, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of silencing KLK6 gene with siRNA on the growth of breast cancer cells and its mechanism, and to provide evidence in diagnosis and treatment for breast cancer. **Methods** Specific siRNA for KLK6 mRNA was designed and synthesized. Two recombinant plasmids PGCsilencer™ H1/GFP/Neo/KLK6 and PGCsilencer™ H1/GFP/Neo/Non were constructed. The two plasmids were transfected into MCF-7 cells and the positive cell clones were obtained by G418 selection. The breast cancer cell line MCF-7 were divided into three groups: liposome-treated control group, negative plasmid-transfected control group and KLK6-siRNA transfected group. The expression of KLK6 was determined by real time quantitative PCR, and the proliferation was also observed by MTT assay. **Results** The recombinant plasmid was successfully constructed. The results of real time quantitative PCR indicated that the inhibitory rates of mRNA in PGCsilencer™ H1/GFP/Neo/KLK6 transfected group (76%) was higher than that in negative plasmid transfected control group (2.7%). The MTT assay results showed that the cell proliferation in KLK6-siRNA transfected group was lower than that in negative plasmid transfected control group and liposome-treated control group ($P < 0.01$). **Conclusion** The recombinant plasmid PGCsilencer™ H1/GFP/Neo/KLK6 can suppress the expression of KLK6 in breast cancer cells and proliferation of MCF-7 cells.

Key words: RNA, small interfering; breast neoplasms; kallikrein 6

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, Kallikreins 是一类激素依赖型肿瘤相关多基因家族, Kallikrein 6 (KLK6) 是其 15 个成员之一。据报道 KLK6 与乳腺癌的发生密切相关, 癌组织中 KLK6 的表达可能在早期乳腺癌的侵袭和转移中扮演着重要的角色^[1]。本实验应用 RNAi 技术特异性沉默乳腺癌细胞株 MCF-7 中 KLK6 基因的表达, 探讨 KLK6 基因的靶向抑制对乳腺癌细胞增殖的影响, 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 带有 U6 启动子及 GTP 的质粒 PGCsilencer™ H1/GFP/Neo/KLK6 和 PGCsilencer™ H1/GFP/Neo/Non 购自上海吉凯公司; MCF-7 细胞株由本实验室保存, RPMI 1640 和小牛血清为 Gibco 产品; SYBR Green 为美国 Amresco 产品, TRIzol 试剂和 Lipofectamine™ 2000 均为 Invitrogen 公司产品; mRNA Selective PCR Ver 1.1 和 Ex Taq™ kit 购自 TaKaRa 公司。

1.2 方 法

1.2.1 靶向 KLK6 的 siRNA 表达载体的构建 登陆 GenBank (Accession number of KLK6 mRNA: D78203) 获得 KLK6

mRNA 序列, 依据 siRNA 作用靶向序列的设计原则, 设计 3 条特异的 siRNA 和 1 条阴性对照 siRNA, 由上海吉凯公司用化学合成, 筛选出 1 条干扰效果最好的 siRNA, 构建成表达载体 PGCsilencer™ H1/GFP/Neo/KLK6, 该表达载体在脊椎动物细胞内表达针对 KLK6 的 shRNA。同时构建阴性对照表达载体 PGCsilencer™ H1/GFP/Neo/Non。

1.2.2 细胞培养 人乳腺癌细胞株 MCF-7 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 在 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养, 每 2~3 天进行传代。

1.2.3 稳定转染细胞株的筛选 质粒 PGCsilencer™ H1/GFP/Neo/KLK6 和 PGCsilencer™ H1/GFP/Neo/Non 分别转染 MCF-7 细胞株, 具体操作步骤按照 Lipofectamine 2000 的说明进行, 同时设未转染细胞对照, 转染 2 d 后弃去原培养液, 加入含 300 μg/mL G418 的 RPMI 1640 完全培养液 (含 10% 小牛血清), 每 2 天换液 1 次, 在标准环境下培养 2 周后转染组绝大多数细胞死亡, 未转染组细胞全部死亡, 挑 G418 抗性的细胞克隆在含 150 μg/mL G418 的培养基中扩大培养。

1.2.4 KLK6 mRNA 表达的检测 实验分 3 组: 脂质体对照

组,转染 PGCsilencer™ H1/GFP/Neo/Non 载体组(阴性对照组),转染 PGCsilencer™ H1/GFP/Neo/KLK6 载体组(RNA 干扰组)。传代培养 48 h 后收集各组细胞,按 TRIzol 试剂盒提供的方法提取细胞总 RNA。取 2 μg 总 RNA,反转录成 cDNA。利用软件 Primer Premier 5.0 设计特异性引物及 KLK6 探针,并使上下游引物跨越 2 个内含子,以避免基因组 DNA 的污染。内对照 GAPDH 引物见参考文献[2],由大连 TaKaRa 公司合成。KLK6:上游引物 5'-TTC CTG CCA GGG TGA TTC T-3',下游引物 5'-CAC TTG GCC TGA ATG GTT TT-3',扩增片段长 162 bp;GAPDH:上游引物 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3',下游引物 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3',扩增片段长度 220 bp。

实时荧光定量 PCR 检测各组细胞 KLK6 mRNA 表达水平,反应条件为:95 °C 5 min 变性,95 °C 10 s,56 °C 10 s,72 °C 30 s,84 °C 0 s,40 个循环,84 °C 单次检测荧光,增益为 60。扩增完毕后,进行溶解曲线分析,94 °C 1 min,61 °C 1 min,72 °C 1 min,然后以 0.1 °C/s 的速度升温到 92 °C,连续监测荧光。对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析特异性。采用样点拟合法分析结果,得到标本中 KLK6 和 GAPDH 的 Ct 值。为避免 RNA 提取和反转录造成的误差,以 GAPDH 作内对照,每份标本同时检测 GAPDH 和 KLK6,每批标本重复检测 2 次。用检测到的 Ct 和以 GAPDH mRNA 的量为内参照,计算 KLK6 mRNA 的相对量,计算公式为 $2^{Ct(GAPDH)-Ct(KLK6)}$ 。

1.2.5 MTT 法检测细胞增殖水平 用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液配成单个细胞悬液,以每孔 1 000 个细胞接种于 96 孔培养板中,37 °C、5%CO₂ 条件下培养,2 d 后每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL)20 μL,37 °C,继续孵育 4 h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO),振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪上 570 nm 波长检测各孔吸收值,记录结果。连续检测 6 d,绘制细胞生长曲线。

2 结果

2.1 靶向 KLK6 的 siRNA 表达载体的构建与鉴定 重组质粒 PGCsilencer™ H1/GFP/Neo/KLK6 经测序证实克隆的 RNAi 打靶序列 100% 正确,该载体可同时表达 GFP,表明该质粒构建成功。

2.2 稳定转染细胞株的筛选 含重组质粒 PGCsilencer™ H1/GFP/Neo/KLK6 的 MCF-7 细胞株在 300 μg/mL G418 的 RPMI 1640 完全培养液中持续筛选 2 周后,细胞爬片,荧光显微镜观察,结果显示经过抗性筛选,已获得稳定转染的细胞株,见图 1。

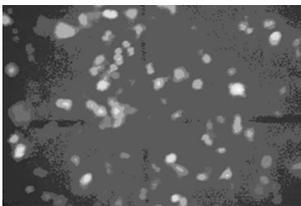


图 1 荧光显微镜下观察稳定转染质粒 PGCsilencer™ H1/GFP/Neo/KLK6 的 MCF-7 细胞

2.3 KLK6 mRNA 表达水平的检测

2.3.1 电泳鉴定结果 扩增后 DNA 电泳图中没有杂带出现,并且相对分子质量大小与实际大小一致(KLK6:162 bp),这表明没有出现非特异性扩增,见图 2。

2.3.2 溶解曲线分析 溶解曲线分析显示:KLK6 和 GAPDH 扩增产物特异,没有出现引物二聚体等非特异性扩增,见图 3。

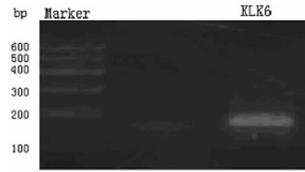


图 2 RT-PCR 扩增后 KLK6 电泳图

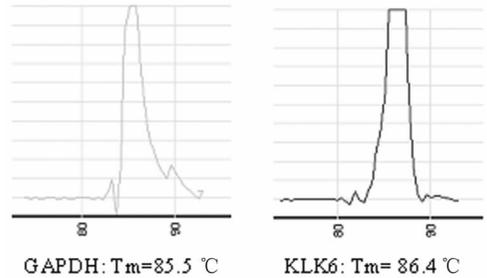


图 3 PCR 扩增后 GAPDH 和 KLK6 溶解曲线分析

2.3.3 KLK6 mRNA 相对定量 MCF-7 细胞转染 siRNA 后 KLK6 mRNA 表达受到了明显的抑制,与脂质体对照组比较,mRNA 抑制率达到了 76%。阴性对照质粒组转染 MCF-7 细胞后,mRNA 的表达与脂质体对照组比较几乎无差异,见表 1。

表 1 稳定转染后各组细胞 KLK6 mRNA 的相对抑制率(%)

组别	KLK6	GAPDH	$\Delta Ct(GAPDH/K6)$	$\Delta\Delta Ct$	$1-2^{\Delta\Delta Ct}$
脂质体对照组	26.83	22.15	-4.48	-	-
阴性对照组	26.82	22.30	-4.52	-0.04	2.70
RNA 干扰载体组	28.87	22.44	-6.43	-1.95	76.0

2.4 四甲基偶氮唑盐(MTT)法观察细胞增殖活力 阴性对照组和脂质体对照组 MCF-7 细胞的增殖活性明显高于 RNA 干扰组($P < 0.01$),阴性对照组与脂质体对照组 MCF-7 细胞的增殖活性差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果表明,RNA 干扰组细胞生长出现了明显的抑制,见图 4。

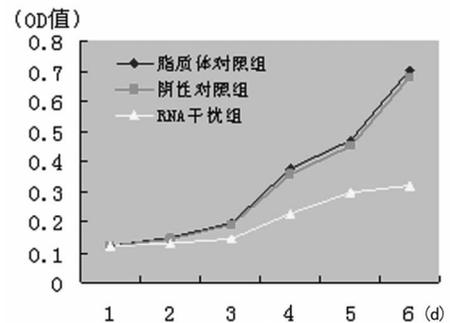


图 4 阴性对照组、脂质体对照组和 RNA 干扰组 MCF-7 细胞生长曲线

3 讨论

Werle^[3]于 1934 年首次提出 Kallikrein 一词,Kallikrein 最早是从胰腺(希腊语,Kallikreas)中分离出来的。研究发现,Kallikreins 编码的丝氨酸蛋白酶家族(hKs)可能参与了多种激素依赖性肿瘤的发生,并预测其可作为某些肿瘤的血清学标志物^[4]。目前 hK3(前列腺特异性抗原 PSA)已被美国食品和药

物管理局(FDA)批准作为前列腺疾病的生物学标志物,hK2 也被作为前列腺疾病的辅助标志物^[5]。不仅如此,最近的研究提示该家族某些成员还可能参与了非激素依赖肿瘤的发生^[6-9]。KLK 基因家族成员已成为肿瘤基因诊断和治疗的新的靶点和热点。

KLK6 是 Kallikreins 基因家族成员之一,编码丝氨酸蛋白酶 hK6。KLK6 基因长约 162 bp,该基因在卵巢、子宫、睾丸等激素依赖性器官的肿瘤中异常表达,与预后相关,联合检测患者血清 hK6 和 CA125 的水平将明显提高卵巢癌诊断的特异性和敏感性^[10-11]。除此之外,KLK6 还参与阿尔茨海默病和血管性痴呆等中枢神经系统疾病的发生发展^[12]。乳腺癌组织中 KLK6 的表达可能在早期乳腺癌的侵袭和转移中扮演着重要的角色^[1,13]。Pampalaris 等^[14]报道,KLK6 在肿瘤进展中扮演了一种保护角色,这种保护作用很可能是通过抑制上皮到间充质细胞转变介导的。

RNA 干扰技术是研究基因功能和治疗中的一种全新的研究手段,其具有高度特异性、高效性等特点。目前应用于体外干扰的技术主要有反义核酸、质粒表达载体和 siRNA。应用较为广泛的是 siRNA 和体内合成的质粒表达载体。质粒表达载体可以长期表达 siRNA,表现出长期沉默效应,适合于进行体内、外的研究。汪欣等^[15]将重组质粒 p Genesil-shRNA-survivin 导入人腺样囊性癌 ACC-M 细胞株,成功抑制了 survivin 基因的表达,以研究其对腺样囊性癌细胞增殖的影响。

本实验应用 RNAi 技术,体外合成并构建 KLK6-siRNA 表达载体及阴性载体,脂质体转染法导入 MCF-7 细胞中,经 G418 筛选,获得了具有 G418 抗性的稳定转染的细胞株,将其体外扩增培养后,通过实时荧光定量 PCR 法检测 mRNA 表达水平。实时荧光定量 PCR 技术在检测基因水平时具有定量准确、检测范围宽、敏感性好、精确度高等优点,相对于其他的基因定量或半定量的方法而言,大大简化了实验过程,减少了实验操作带来的误差。熔解曲线和电泳分析结果显示扩增产物中没有出现引物二聚体等非特异性产物,确保了实验数据的准确性。本文扩增结果证实,稳定转染细胞株的成功建立,PGC-silencer™ H1/GFP/Neo/KLK6 表达载体有效沉默了细胞中 KLK6 基因的表达。

进一步通过 MTT 法测定肿瘤细胞增殖活性,并建立其增殖曲线,结果显示转染 PGCsilencer™ H1/GFP/Neo/KLK6 表达载体的 MCF-7 细胞株增殖活性明显低于脂质体对照组和阴性载体对照组,这表明下调乳腺癌细胞株 MCF-7 中 KLK6 基因的表达能够降低细胞的增殖能力,抑制肿瘤的生长。由此推测,KLK6 基因可能在乳腺癌细胞的增殖过程中起到一个促进作用,很可能是一种促肿瘤生长因子,有望成为乳腺癌的基因诊断和治疗的新靶点。

参考文献:

- [1] Wang SM, Mao J, Li B, et al. Expression of KLK6 protein and mRNA in primary breast cancer and its clinical significance[J]. Cell Mol Immunol, 2008, 24(11): 1087-1089.
- [2] 蔡刚,李闻捷,沈茜. 实时逆转录聚合酶链反应绝对定量实验优化的研究[J]. 上海医学检验杂志, 2003, 18: 343-346.
- [3] Werle E. Zur Kenntnis des haushalts des Kallikreins[J]. Biochem Z, 1934, 269: 415-434.
- [4] Obiezu CV, Diamandis P. Human tissue kallikrein gene family: applications in cancer[J]. Cancer Letters, 2005, 224: 1-24.
- [5] Steuber T, Vickers AJ, Serio AM, et al. Comparison of free and total forms of serum human kallikrein 2 and prostate-specific antigen for prediction of locally advanced and recurrent prostate cancer[J]. Clin Chem, 2007, 53(2): 233-240.
- [6] Planque C, De Monte M, Guyetant S, et al. KLK5 and KLK7, two members of the human tissue kallikrein family, are differentially expressed in lung cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 329(4): 1260-1266.
- [7] Ishida-Yamamoto A, Deraison C, Bonnart C, et al. LEKTI is localized in lamellar granules, separated from KLK5 and KLK7, and is secreted in the extracellular spaces of the superficial stratum granulosum[J]. J Invest Dermatol, 2005, 124(2): 360-366.
- [8] Sher YP, Chou CC, Chou RH, et al. Human kallikrein 8 protease confers a favorable clinical outcome in non-small cell lung cancer by suppressing tumor cell invasiveness[J]. Cancer Res, 2006, 66(24): 11763-11770.
- [9] Strojnik T, Kavalar R, Zajc I, et al. Prognostic impact of CD68 and kallikrein 6 in human glioma[J]. Anticancer Res, 2009, 29(8): 3269-3279.
- [10] Qu S, Long J, Cai Q, et al. Genetic polymorphisms of metastasis suppressor gene NME1 and breast cancer survival[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(15): 4787-4793.
- [11] Crabb SJ, Cheang MC, Leung S, et al. Basal breast cancer-molecular subtype predicts for lower incidence of axillary lymph node metastases in primary breast cancer[J]. Clin Breast Cancer, 2008, 8(3): 249-256.
- [12] Ashby EL, Kehoe PG, Love S. Kallikrein-related peptidase 6 in Alzheimer's disease and vascular dementia[J]. Brain Res, 2010, 1363: 1-10.
- [13] Wang SM, Mao J, Li B, et al. Expression of KLK6 protein and mRNA in primary breast cancer and its clinical significance[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2008, 24(11): 1087-1089.
- [14] Pampalakis G, Prosnikli E, Agalioi T, et al. A tumor-protective role for human kallikrein-related peptidase 6 in breast cancer mediated by inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Cancer Res, 2009, 69(9): 3779-3787.
- [15] 汪欣,杨军,许波,等. siRNA 干扰 survivin 表达对腺样囊性癌细胞株 ACC-M 的抑制作用[J]. 重庆医学, 2009, 37(10): 2601-2601.