

## 靶向 DcR3 的 siRNA 抑制人结肠癌 裸鼠皮下移植瘤的实验研究

张胜行, 兰小鹏, 易寻飞

(南京军区福州总医院检验科, 全军检验医学研究所, 福建福州 350025)

[摘要] 目的 以脂质体为载体, 探讨靶向诱骗受体 3(decoy receptor 3, DcR3) 的 siRNA 对人结肠癌 SW 480 细胞裸鼠皮下移植瘤生长的抑制作用。方法 裸鼠背部皮下种植结肠癌 SW 480 细胞, 建立结肠癌 SW 480 细胞裸鼠皮下移植瘤模型。针对靶标 DcR3 基因, 利用 Dharmacon 公司软件设计并合成 siRNA 序列, 通过瘤体局部多点注射脂质体与 DcR3 siRNA 混合物, 将 DcR3 siRNA 转染到裸鼠背部皮下移植瘤内。同时设立阴性对照组和空白对照组。观察肿瘤治疗前后体积变化, 评价 DcR3 siRNA 对肿瘤的抑制作用; 比较肿瘤治疗前后的细胞形态学改变; 免疫组织化学及 RT-PCR 检测 DcR3 基因表达; 原位细胞凋亡检测肿瘤的凋亡情况。结果 治疗组肿瘤体积明显小于对照组, 肿瘤组织内坏死面积增大, 细胞凋亡率显著增高, DcR3 蛋白表达水平降低。治疗过程中裸鼠生长良好, 无明显毒性反应。结论 脂质体介导的 DcR3 siRNA 对裸鼠皮下结肠癌 SW 480 细胞移植瘤有明显抑制、杀伤作用, 细胞凋亡是 DcR3 siRNA 所致肿瘤细胞死亡的重要形式。

[关键词] 结肠癌; 基因治疗; SW 480 细胞; DcR3; siRNA; 裸鼠

中图分类号: R 730.231 文献标识码: A 文章编号: 1672-271X(2009)01-0001-05

Colon cancer subcutaneously inoculated in nude mice inhibited by siRNA to DcR3

ZHANG Sheng-hang, LAN Xiao-peng, Yi Xun-Fei (People's Liberation Army Center of Laboratory Medicine, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, Fujian, China)

[Abstract] Objective To investigate the effect of DcR3-siRNA mediated by liposome vector in inhibiting the growth of human cultured cancer cell SW 480 subcutaneously inoculated in nude mice. Methods A thymic mice were subcutaneously transplanted with human colon carcinoma SW 480 cells to establish a transplanted tumor model. To directly aim at target gene—DcR3, siRNA was synthesized by Dharmacon company and transfected into tumors subcutaneously transplanted in athymic mice. The negative and blank controls were established as well. The inhibitive effect of DcR3 siRNA to tumor was estimated. The changes on morphology and tumor volume were compared before and after therapy. The genetic expression of DcR3 was detected by immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction. The tumor apoptosis was detected by TUNEL method. Results DcR3-siRNA can inhibit the growth of human colon cancer cell SW 480. The expression of DcR3 mRNA in human cultured cancer cell SW 480 was decreased significantly in the gene transfected group compared to that of control group. Conclusion DcR3 siRNA mediated by liposome distinctly inhibits the growth or kills SW 480 cells subcutaneously transplanted in athymic mice.

[Key words] Colorectal carcinoma; Gene therapy; SW 480 cell; DcR3; siRNA; Nude mice

结肠癌是常见的恶性肿瘤之一, 近年来发病率呈明显上升趋势<sup>[1]</sup>。虽然近年来传统的治疗方式如手术、放疗、化疗等有了很大的改进, 但手术对结肠

功能的破坏以及放、化疗的严重副作用仍使以上治疗方式受到极大限制。诱骗受体 3(decoy receptor 3, DcR3) 作为一种新的肿瘤抑制基因越来越引起人们

基金项目: 福建省科技厅国际合作重点项目(2004I012)

作者简介: 张胜行(1976-), 男, 河北衡水人, 硕士研究生, 主管技师, 从事医学检验专业。

的研究兴趣,其在肿瘤发生、发展和治疗方面的作用正不断被发现,在T细胞和DC细胞的功能调节、免疫黏附、肿瘤血管生成及转移等方面发挥重要的作用<sup>[1-2]</sup>。易浔飞等<sup>[3]</sup>在体外实验中发现,DcR3基因的表达能抑制结肠癌SW 480细胞的增殖,使该细胞生长停滞,并诱导细胞凋亡。

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是近年来基因治疗与研究领域的热点,其原理是将外源性的双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)分子通过一定的方法转入细胞内,形成酶切复合体,并与其互补的目的mRNA结合,使之降解,从而无法合成相应的蛋白质,在mRNA水平特异地下调该基因的表达,这就是所谓的序列特异性的转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)。本实验利用RNA干扰技术抑制结肠癌SW 480细胞裸鼠皮下移植瘤中DcR3的表达,试图为结肠癌靶向基因治疗提供可能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 BALB/C裸鼠48只,由上海西普尔-必凯实验动物公司提供。鼠龄4~6周,体重18~20g,雌雄共用,在无特殊病原(SPF, specific-Pathogen free)条件下饲养。

1.1.2 主要试剂 DcR3-siRNA,上海吉玛公司合成;脂质体DOTAP,购于福州迈新公司;结肠癌细胞株SW 480,购自南京凯基生物公司;Purified anti-human DcR3抗体,美国Biolegend公司;鼠抗人 $\beta$ -actin多克隆抗体(作为内参照),福州迈新公司;Superscript III逆转录酶试剂盒,Invitrogen公司。

### 1.2 方法

1.2.1 结肠癌SW 480细胞皮下移植模型的制备 以10% FCS RPMI 1640培养液培养结肠癌SW 480细胞,反复传代扩增对数生长期细胞,至需要量( $2 \times 10^6$ 只鼠),计数,以无血清培养液调整细胞浓度为 $1 \times 10^7$  ml,每只小鼠注射200  $\mu$ l,即 $2 \times 10^6$ 个细胞只。

随机选取10只裸鼠,接种前3天起每只腹腔注射环磷酰胺100 mg/kg(10 mg/ml环磷酰胺生理盐水(NS),200  $\mu$ l),连续2 d<sup>[4]</sup>。接种时,裸鼠右侧背部以75%酒精消毒后,暴露皮肤作为肿瘤细胞接种点。75%酒精消毒暴露皮肤,眼科镊提起皮肤,应用200  $\mu$ l微量注射器,确保进针至皮下。

另选裸鼠30只,接种前处理同前。待初代移植

肿瘤长至直径1~2 cm时,脱颈处死裸鼠,取移植肿瘤在75%酒精中浸泡2~3 min后,将瘤体移入培养皿中,清除外周血块及结缔组织,剪成小块之后用匀浆器稍微磨碎,以1:20与完全培养基混合,单层纱布过滤,滤过的液体与等量的Matrigel(10 mg/ml)混合,皮下注射0.2 ml于裸鼠背部皮下<sup>[5]</sup>。Matrigel胶低温为液体状,高温则为胶状,可弥补具有流动性的细胞悬液在裸鼠皮下不易成型或成型的形状不规则这一缺陷,为肿瘤细胞的生长营造良好的环境,操作时,需将Matrigel置于冰上。以皮下结节直径>0.5 cm为成瘤标准。

1.2.2 实验动物分组 取第二代种植成瘤后的裸鼠24只,称重后根据体重随机分成3组:治疗组、阴性对照组与空载体组,每组8只,均对肿瘤局部多点给药。治疗情况如下:

治疗组(A):脂质体DOTAP 300  $\mu$ g+ DcR3-siRNA 100  $\mu$ g+ NS 100  $\mu$ l

阴性对照组(B):脂质体DOTAP 300  $\mu$ g+ 对照-siRNA 100  $\mu$ g+ NS 100  $\mu$ l

空白对照组(C):脂质体DOTAP 300  $\mu$ g+ NS 100  $\mu$ l

三组均每天给予治疗1次,连续治疗5天。治疗结束后第1天起,用游标卡尺隔日测量肿瘤大小1次,按下面公式:

$$\text{肿瘤体积}(\text{mm}^3) = \frac{1}{2} \times \text{肿瘤长径}(\text{mm}) \times \text{肿瘤短径}(\text{mm})^2$$

1.2.3 肿瘤模型一般情况观察 治疗期间每天观察裸鼠接种点有无破溃红肿及种植瘤的生长情况,观察裸鼠体重变化。于治疗结束21 d后断颈处死裸鼠,取出肿瘤,称重后部分瘤组织于-70℃保存,部分肿瘤组织用福尔马林固定,连续4  $\mu$ m切片。以下面公式计算肿瘤生长抑制率:

$$\text{抑制率} = [1 - (\text{治疗组瘤重量} / \text{对照组瘤重量}) \times 100\%]$$

### 1.2.4 荧光实时定量检测肿瘤组织中DcR3表达

PCR检测活体动物模型肿瘤组织中DcR3-mRNA的含量检索NCBI数据库查到人类DcR3基因mRNA全长序列,登录号为GI4106877,上游引物:5'-CTT CTT CGC GCA CGC TG-3',下游引物:5'-ATC ACG CCG GCA CCA G-3'。以Primer Express 5.0软件设计引物。引物GC比例为30%~80%;避免连续出现相同的核苷酸,特别避免连续出现4个或以上G,  $T_m$ 值介于58~60,3'-端的5个核

苷酸中不能存在超过两个以上的G或C。看家基因选用GA PDH 基因。引物设计好后通过BLAST 分析(www. ncbi. nlm. nih. gov BLAST) 避免扩增的序列存在非特异性, 设计好的引物交上海吉玛公司合成。反应体系在 ABI Prism 7900 Sequence Detector 进行, 采集待测基因及内参照GA PDH 扩增各循环荧光信号, 以SDS2. 1 软件(Applied Biosystem s) 进行荧光收集和资料分析。

1. 2. 5 免疫组织化学检测(SP 法) 将肿瘤组织切片置于枸橼酸 枸橼酸钠抗原修复液中, 在720W 微波炉中预热至95℃以上, 再间断加热30 min, 每加热10 min 间歇2 min; 进行组织抗原修复。依次滴加正常羊血清及DcR3 单克隆抗体, 4℃冰箱中过夜, PBS 洗涤后按免疫组化 SP 法完成, DAB 显色, Mayer 苏木精复染。阴性对照: 用PBS 液代替DcR3 单克隆抗体抗作为每次染色的阴性对照; 阳性对照: 用公司提供阳性切片作为对照。DcR3 为一种分泌蛋白, 主要表达于细胞浆内, 蛋白染色信号呈现淡黄色、棕色或褐色。

1. 2. 6 透射电镜观察 三组裸鼠处死后立即切除肿瘤, 切取大小为1 mm<sup>3</sup> 的标本, 经3% 戊二醛4 固定2 h, 磷酸盐缓冲液洗涤2 次, 1% 锇酸后固定2 h, 丙酮梯度脱水, 环氧树脂包埋, 超薄切片, 醋酸铀-枸橼酸铅染色, 日立H 600 型透射电镜下观察。

1. 3 统计学处理 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 用SPSS11. 0 统计软件对相关数据进行t 检验分析,  $P < 0. 05$  有统计学意义。

## 2 结 果

### 2. 1 结肠癌SW 480 细胞裸鼠皮下移植模型情况

2. 1. 1 裸鼠生长情况 第一批选取的10 只裸鼠, 皮下注射肿瘤细胞4 周后, 有6 只裸鼠成瘤, 6 周左右, 肿瘤长至约0. 8 cm 大小, 接种点无红肿破溃。取其肿瘤组织块种植于第二批30 只裸鼠背部皮下, 有28 只裸鼠成瘤, 第6 周形成1. 8~ 2. 0 cm 大小肿块, 成瘤率93. 3%。

2. 1. 2 DcR3-siRNA 对裸鼠结肠癌皮下种植瘤生长的影响 经过瘤体内多点注射治疗, 各组裸鼠均存活。处死后取肿瘤称重量空白对照组、阴性对照组、DcR3-siRNA 治疗组的平均瘤重见表1。可见经DcR3-siRNA 治疗的裸鼠肿瘤重量明显小于空白对照组( $P < 0. 01$ ), 而阴性对照组无明显效果。DcR3-siRNA 治疗组抑瘤率为57. 66%, 显著高于阴性对照组。

表1 各组大肠癌裸鼠皮下移植瘤生长的变化

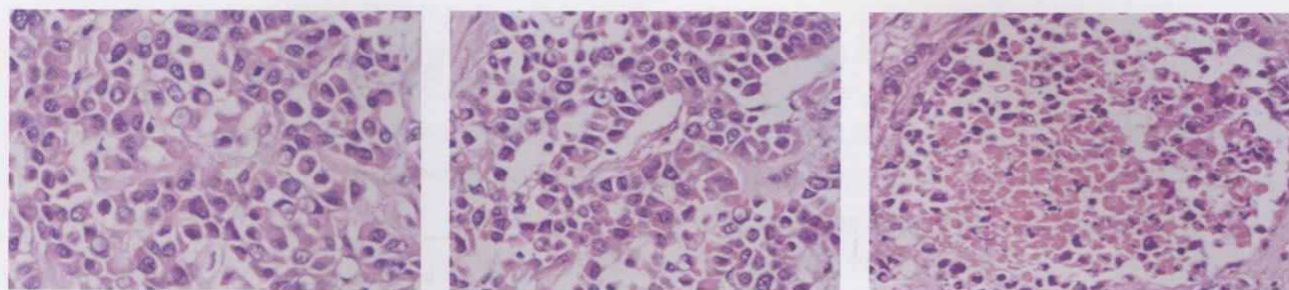
组别	裸鼠数量 (只)	瘤重量 ( $\bar{x} \pm s$ , g)	平均抑瘤率 (%)
治 疗 组	8	0. 58 $\pm$ 0. 14	57. 66
阴性对照组	8	1. 28 $\pm$ 0. 17	6. 67
空白对照组	8	1. 37 $\pm$ 0. 15	

2. 2 荧光实时定量检测移植瘤组织内DcR3 mRNA 的表达 把肿瘤组织样本提取RNA 后同时进行荧光实时定量PCR, 各组裸鼠肿瘤组织的DcR3 mRNA 含量差别有统计学意义, 治疗组肿瘤组织吸光度值(0. 12  $\pm$  0. 02) 明显低于阴性对照组(0. 28  $\pm$  0. 08) 和空白对照组吸光度值(0. 27  $\pm$  0. 05) ( $P < 0. 05$ ), 而阴性对照组和空白对照组相对光密度值无差异( $P > 0. 05$ )。

2. 3 光学显微镜观察 阴性对照组与空白对照组肿瘤病理切片可见肿瘤细胞排列紧密, 瘤细胞生长活跃, 大小相对一致, 核深染, 染色质粗, 核浆比例大, 部分区域可见腺腔形成, 肿瘤细胞分泌黏液, 并侵犯周边结缔组织, 无大范围细胞损伤现象。治疗组肿瘤细胞排列疏松, 肿瘤细胞片状或大块状坏死, 核碎片明显可见, 细胞结构破坏严重, 坏死区炎症细胞浸润, 坏死的肿瘤细胞形成无固定结构的粉染物。部分肿胀的细胞其细胞核消失, 形成空泡状结构(图1)。

2. 4 免疫组织化学检测 治疗组细胞浆内着色颗粒明显少于对照组, 免疫组化染色后见对照组DcR3 蛋白主要位于结肠癌细胞浆, 表达较强, 呈棕黄色颗粒, 癌周组织无表达。而治疗组则可见DcR3 蛋白表达明显降低, 数量减少, 颜色变淡, 表明DcR3-siRNA 抑制了DcR3 蛋白的表达。将胞浆内棕黄色颗粒超过肿瘤细胞浆体积的1/4 者计为阳性细胞, 统计500 个细胞中阳性细胞数, 计算阳性细胞百分比。治疗组阳性细胞率(10. 73  $\pm$  3. 32)%, 阴性对照组为(51. 90  $\pm$  4. 90)%, 空白对照组为(65. 06  $\pm$  4. 57)%, 治疗组与阴性对照组和空白对照组相比有显著差异( $P < 0. 01$ ), 而阴性对照组与空白对照组相比无明显差异( $P > 0. 05$ ) (图2)。

2. 5 透射电镜观察 透射电镜下观察, 治疗组肿瘤细胞明显凋亡, 结构严重破坏, 细胞器数目明显减少, 细胞器完整性差, 胞浆内仍可见分泌小泡, 核膜断裂, 有凋亡小体形成。而阴性对照组和空白对照组肿瘤细胞虽不规则, 但核浆比例大, 核染色质较深, 细胞器数量较多, 线粒体丰富, 胞浆内可见大小不等的分泌小泡, 核膜完整(图3)。

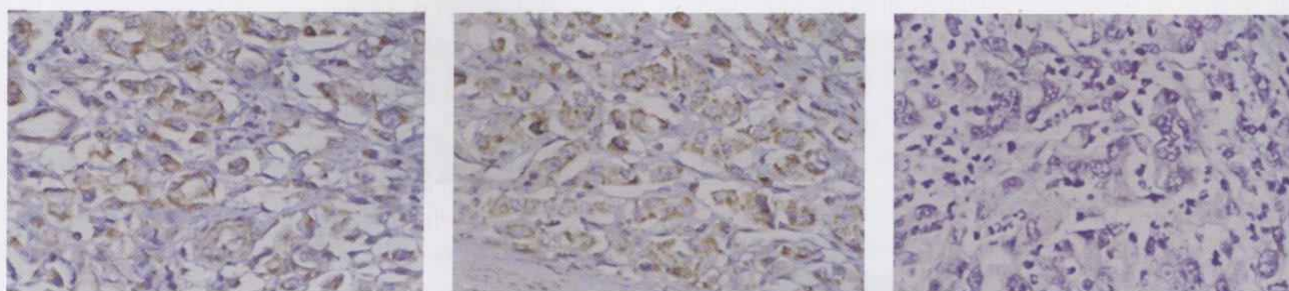


空白对照组

阴性对照组

治疗组

图 1 各组肿瘤光镜下观察 (HE×100)



空白对照组

阴性对照组

治疗组

图 2 各组肿瘤免疫组化情况 (HE×400)



空白对照组

阴性对照组

治疗组

图 3 各组肿瘤透射电镜观察 (透射电镜×10 000)

### 3 讨 论

结肠癌作为人类常见的恶性肿瘤之一,在世界范围内属于四大最常见恶性肿瘤。临床研究表明,DcR3 在结肠癌<sup>[6-7]</sup>等多数肿瘤存在高表达。肿瘤的发生与癌基因的突变、扩增、过度表达或抑癌基因的突变、失活有关,传统的肿瘤基因治疗技术,通过对单个癌基因的阻断往往不能完全抑制或逆转肿瘤细胞的增殖,因此很难达到预期的治疗效果。

近年来的研究发现,干扰性小 RNA (small interfering RNA, sRNA) 是 RNA 干扰赖以发生的重要的中间效应分子。RNA 干扰主要通过双链

RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 被核酸酶切成 21~25 nt 的干扰性小 RNA (small interfering RNA 或 short interfering RNA s, sRNA), 由干扰性小 RNA (small interfering RNA 或 short interfering RNA s, sRNA) 介导识别并靶向切割同源性靶 mRNA 分子而产生效应。RNA i 技术不仅可同时抑制多个不同的基因,其抑制效果互不干扰,而且还可根据基因家族中多个基因具有一段同源性很高的保守序列这一特性,针对该保守序列设计相应的 dsRNA 片段,可通过体外人工化学法合成 dsRNA, 亦可通过构建在体内表达 sRNA 的质粒而实现 RNA i 作用<sup>[8]</sup>。RNA i 可使突变基因稳定静默,而不

影响正常基因的表达,且具有简易性、特异性及高效性的特点,在肿瘤的研究及治疗上有着无可比拟的优势。RNAi技术的发展将为人类研究基因功能、抗病毒和治疗恶性肿瘤提供一种新的方法。

本实验采用的DOTAP是一种多价阳离子脂质体,表面带四个正电荷,可以与带负电荷的DNA、RNA等阴离子物质自发而迅速地形成复合体,介导基因的转移。脂质体介导的基因转移具有方法简单、可携带较大的核酸分子、能转染多种细胞、与细胞分裂状态无关、低毒、无免疫原性、安全性高等特点。其性质比较稳定,能保护被包裹的核酸分子免受降解。Chae等<sup>[9]</sup>将siRNA和脂质体按照适合比例混合稀释后,注入肿瘤的不同部位,稳定地抑制了目的基因的表达。直接导入的方法简单,容易操作,在容易转染的细胞中更具有优势。有学者在腹腔肿瘤模型中反复注射DNA-脂质体复合物,治疗后取得与逆转录病毒介导同样的效果<sup>[10]</sup>。

基于以上理论,利用RNA干扰技术,以DcR3为靶点,关闭肿瘤细胞中的DcR3基因的表达,就有可能高效抑制结肠癌肿瘤细胞的增殖。

本课题组于2005年成功以脂质体为载体将DcR3 siRNA导入结肠癌SW 480细胞中,在体外细胞实验中证实了DcR3 siRNA对DcR3表达的干扰作用<sup>[3]</sup>。本实验进一步利用将DcR3 siRNA应用于活体结肠癌SW 480细胞动物模型,观察其在活体中对肿瘤组织中DcR3的干扰作用。实验中采用荧光实时定量PCR方法检测活体动物模型肿瘤组织中DcR3 mRNA的含量,该方法较RT-PCR法更为可靠和客观。本试验结果显示治疗组肿瘤组织DcR3 mRNA明显低于阴性对照组和空白对照组DcR3 mRNA值( $P < 0.05$ ),而阴性对照组和空白对照组相对DcR3 mRNA值无差异( $P > 0.05$ )。这说明DcR3 siRNA应用于活体治疗能够降解肿瘤组织中DcR3 mRNA的含量,从而可以抑制肿瘤DcR3的表达。通过该实验我们发现DcR3 siRNA对结肠癌

动物模型体内肿瘤具有显著的抑制作用,提示DcR3 siRNA可作为治疗基因用于结肠癌及其他肿瘤的治疗,为肿瘤的治疗提供一个新的治疗途径。

## 参考文献

- [1] Yang CR, Hsieh SL, Ho FM, et al. Decoy receptor 3 increases monocyte adhesion to endothelial cells via NF-Kappa B-dependent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1, VCAM-1 and E-selectin expression [J]. *J Immunol*, 2005, 174 (3): 1647-1656.
- [2] Chang YC, Chan YH, Janckson DG, et al. The glycosaminoglycan binding domain of decoy receptor is essential for induction of monocyte adhesion [J]. *J Immunol*, 2006, 176 (1): 173-180.
- [3] 易浔飞, 兰小鹏. siRNA介导人结肠癌细胞DcR3基因的表达抑制研究[J]. *医学研究生学报*, 2006, 19 (9): 833-837.
- [4] 司徒镇强, 吴军正. *细胞培养* [M]. 世界图书出版社, 1996: 68-73.
- [5] Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, et al. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate [J]. *Embo J*, 2001, 20 (6): 6877-6888.
- [6] Bai C, Connolly B, Metzker ML, et al. Overexpression of M68 DcR3 in human gastrointestinal tract tumors independent of gene amplification and its location in a four-gene cluster [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 169 (97): 1230-1235.
- [7] Takahama Y, Yamada Y, Emoto K, et al. The prognostic significance of overexpression of the decoy receptor for Fas ligand (DcR3) in patients with gastric carcinomas [J]. *Gastric Cancer*, 2002, 5 (1): 61-68.
- [8] Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, et al. RNAi: double stranded RNA directs the ATP dependent cleavage of mRNA at 21-23 nucleotide intervals [J]. *Cell*, 2000, 101 (27): 25-33.
- [9] Chae SS, Paik JH, Furneaux H, et al. Requirement for sphingosine 1-phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114 (8): 1082-1089.
- [10] Gore ME, Collins MK. Gene therapy for cancer [J]. *Eur J Cancer*, 1994, 8 (5): 1076-1084.

(收稿日期: 2008-10-19)

(本文编辑: 潘雪飞 英文编辑: 王建东)