

[文章编号] 1000-4718(2008)10-1877-05

RNAi 沉默 PSMA 基因对前列腺癌 LNCaP 细胞生物学行为的影响*

曹开源¹, 张甜¹, 徐霖², 袁广卿³, 田小东¹, 黄小荣³, 丘少鹏^{4Δ}(中山大学¹中山医学院临床检验标准化研究中心,²中山医学院免疫教研室,³中山医学院实验教学中心,⁴附属第一医院泌尿外科,广东 广州 510080)

[摘要] 目的: 构建 LNCaP 细胞 PSMA 基因的 shRNA 真核表达载体, 探讨其对 LNCaP 细胞中 PSMA 基因表达的干扰作用。方法: 针对 PSMA mRNA 序列设计合成 3 对编码 shRNA 的寡核苷酸链, 退火形成双链, 连接入含有 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点的 pSilencer 2.1-U6-neo 真核表达载体, 双酶切及测序鉴定。使用脂质体转染的方法将重组质粒导入 LNCaP 细胞, G418 筛选后 RT-PCR、Western blotting 检测其对 PSMA 基因干扰作用, 并观察对 LNCaP 细胞生物学行为的影响。结果: 经酶切及测序鉴定, 成功构建 shRNA 真核表达载体 p-shRNA1, 2, 3 转染 LNCaP 后, 对细胞 PSMA mRNA 表达抑制率分别为 33.15%、9.26%、41.97%, Western blotting 结果显示对 PSMA 蛋白表达的抑制率分别为 26.26%、6.47%、40.69%。选择抑制效率较高的 p-shRNA3 进行体外生长及侵袭力实验, 发现干扰后对 LNCaP 细胞侵袭力增强, 但是对细胞生长影响不大。结论: 成功构建了人 PSMA 基因的 RNAi 的真核表达载体, 并在 LNCaP 细胞中有效地发挥了对 PSMA 基因表达的干扰作用, 初步发现 PSMA 在前列腺癌的侵袭中起负向调节作用, 为进一步研究 PSMA 的生物学功能, 探索前列腺癌的发病机制奠定一定的实验基础。

[关键词] 前列腺肿瘤; 前列腺癌特异膜抗原; RNA 干扰**[中图分类号]** R737.25**[文献标识码]** A

Silencing of PSMA by RNAi influences biological behavior of prostate cancer cell line LNCaP

CAO Kai-yuan¹, ZHANG Tian¹, XU Lin², YUAN Guang-qing³, TIAN Xiao-dong¹, HUANG Xiao-rong³, QIU Shao-peng⁴

(¹Research Center for Clinical Laboratory Standard, ²Department of Immunology, School of Preclinical Medicine, ³Basic Medical Experimental Teaching Center, Zhongshan Medical College, ⁴Department of Urinary Surgery, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China. E-mail: urology@vip.163.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the blocking effect of shRNA on the expression of PSMA gene in LNCaP cell line by using shRNA eukaryotic expression vector. **METHODS:** Three pairs of DNA templates coding shRNA, synthesized against PSMA and cloned into the vector pSilencer 2.1-U6-neo, which was named pSilencer 2.1-U6-neo-shRNA, were identified by restriction endonuclease digestion analysis and DNA sequencing. LNCaP cells were then transfected with these three pSilencer 2.1-U6-neo-shRNAs and the negative control pSilencer 2.1-U6-neo-NC. After G418 selection, the cells were selected and the interfering effect was detected by RT-PCR and Western blotting. The biological behaviours of the transfected LNCaP cells were also tested. **RESULTS:** Restriction endonuclease digestion analysis and DNA sequencing results all showed that the 3 target segments were cloned into pSilencer 2.1-U6-neo vector respectively. After transfected into LNCaP cells, the inhibitory ratio of PSMA mRNA was 33.15%, 9.26% and 41.97% respectively, and that of PSMA protein was 26.26%, 6.47%, 40.69% respectively. The p-shRNA3 was chosen to test the cell growth and its invasive power *in vitro*. The results showed that after interfering, the invasiveness of LNCaP cells were enhanced. **CONCLUSION:** The vector-based shRNA on PSMA gene effectively knocks down the PSMA gene expression. The successful construction of PSMA shRNA makes it possible for further study of the interaction between PSMA and prostate cancer.

[KEY WORDS] Prostatic neoplasms; Prostate-specific membrane antigen; RNA interference

[收稿日期] 2007-07-12

[修回日期] 2008-01-29

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30772503); 广东省自然科学基金重点资助项目 (No. 021907)

Δ 通讯作者 Tel: 020-87333300; E-mail: urology@vip.163.com

前列腺癌特异膜抗原 (prostate - specific membrane antigen, PSMA) 是一种前列腺上皮细胞膜上的、具有多种生物学活性的蛋白质。因其具有较高的前列腺组织特异性及病变特异性,成为前列腺癌较为特异的生物学标志物及诊断、治疗的潜在靶点,受到广泛的关注^[1,2]。有关 PSMA 的生物学功能及其与前列腺癌发生、发展的相关性是目前前列腺癌研究领域的热点之一。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 因其能高效特异地产生基因沉默效应,是新兴的研究基因功能和进行基因治疗的有效手段,其在前列腺癌中的应用主要集中在信号转导通路^[3]及雄激素受体^[4]等方面,该技术在 PSMA 研究的应用国内外都鲜有报道。本研究应用该技术对前列腺癌 LNCaP 细胞株 PSMA 基因产生特异性沉默,通过观察沉默后细胞生长、侵袭能力等细胞行为学的变化,旨在了解 PSMA 的生物学功能及其在前列腺癌发生发展中的作用,为探索前列腺癌的发病机制提供新的思路。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 细胞株、菌株及质粒 LNCaP 细胞、大肠杆菌

E. coli 为本实验室保存,shRNA 表达载体 pSilencer 2.1 - U6 - neo 购自 Ambion 公司。

1.2 主要试剂 T4 连接酶、*Hind* III、*Eco*R I 限制性核酸内切酶、质粒抽提试剂盒购自 TaKaRa 公司, Lipofectamine2000 试剂盒购自 Invitrogen 公司,纤维黏连蛋白 (fibronectin, Fn) 购自 Sigma, Matrigel 购自 BD, Transwell 侵袭小室购自 Corning, β - actin 鼠抗人单抗购自武汉博士德生物工程有限公司, AP 标记羊抗鼠 IgG II 抗购自北京鼎国生物技术有限责任公司, PSMA 鼠抗人单抗购自 Abcam。

2 方法

2.1 PSMA 基因干扰片段的设计

采用 Ambion 公司的 siRNA Target Finder 在线设计软件进行 siRNA 的设计 (http://www.ambion.com/techlib/mist/siRNA_finder.html), 获得 3 条 shRNA 干扰片段 (表 1), 上游限制位点为 *Bam*H I, 下游限制位点为 *Hind* III, Loop 序列为 TTCAAGAGA。按照 *Bam*H I + Sense + Loop + Anti-sense + 终止信号 + *Hind* III 连接, 将序列送英骏公司合成。

表 1 针对 PSMA 的 shRNA 的核苷酸序列
Tab 1 Nucleotide sequences of the PSMA - targeting shRNA

shRNA duplex	Nucleotide sequences	G+C (%)	Position in PSMA gene coding sequence
shRNA1	5' - GATCCGTTGCCAGATATGGGAAAGTTTCAAGAGAACTTCCCATATCTGGCAATTTTTGGAAA - 3' 5' - AGCTTTTCCAAAAAATGGCAGATATGGGAAAGTTCCTTCAAACTTCCCATATCTGGCAACG - 3'	38.1%	869bp - 889bp
shRNA2	5' - GATCCGAGCGTGGCCTGGCTTATATTCAAGAGATATAAGCCACGCCAGCCTCTTTTTGGAAA - 3' 5' - AGCTTTTCCAAAAAAGAGCGTGGCGTGGCTTATATCTCTTGAATAAGCCACGCCACGCTCG - 3'	52.4%	1589 bp - 1609 bp
shRNA3	5' - GATCCGTTCACTGAGAGACTCCAGTCAAGAGACTGGACTCTCTCACTGAACTTTTGGAAA - 3' 5' - AGCTTTTCCAAAAAAGTTCACTGAGAGACTCCAGTCTCTTGAAGTGGACTCTCACTGAACG - 3'	47.6%	2194 bp - 2214 bp

2.2 pSilencer 2.1 - U6 - neo/shRNA 载体的构建与鉴定 将合成的互补 DNA 寡核苷酸链分别用退火缓冲液充分溶解后,稀释成 1 g/L。并将正义寡核苷酸链和反义寡核苷酸链退火,形成双链 DNA。用 T4 DNA Ligase 将退火产物与线性化 pSilencer 2.1 - U6 - neo 载体连接,转化入感受态细胞中,37 °C 过夜培养,挑取阳性克隆,抽提质粒。用 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切鉴定。酶切鉴定正确的克隆测序,阴性对照 p - NC 由试剂盒提供。

2.3 转染 在 24 孔板内按照 2.0×10^5 cells/well 接种 LNCaP 细胞,第 2 d 转染重组质粒及阴性对照质粒 p - NC,操作步骤按 Lipofectamine2000 说明书进行。转染后 48h 换为含 G418 的选择培养基培养。14 d 后空白对照组细胞全部被杀死,继续培养阳性

转染组及空质粒转染组细胞,获得 4 种质粒转染后的 LNCaP 细胞稳定克隆。

2.4 RT - PCR 检测 PSMA 的表达 提取细胞总 RNA 并逆转录成 cDNA。用测序引物验证载体是否转染成功,正义链 5' - GTTTTCCCAGTCACGAC - 3',反义链 5' - GAGTTAGCTCACTCATTAGGC - 3'。然后以此为模板扩增 PSMA 及内参对照 β - actin。PSMA 引物序列分别是,正义链 5' - TACCACATT - TAGCAGGAACAGAAC - 3',反义链 5' - AACCATCT - GGATAGGACTTCACC - 3',扩增长度为 498bp。 β - actin 引物序列分别是,正义链 5' - GCATGGAGTC - CTGTGGCATCC - 3',反义链 5' - CATTGCGGTG - GACGATGGAC - 3',扩增长度为 318 bp。反应条件: 94 °C 预变性 5 min,94 °C 复性 40 s,55 °C 退火 40 s,

72 ℃延伸 45 s,共 32 个循环,72 ℃延伸 3 min。取 PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

2.5 Western blotting 裂解细胞,提取总蛋白,紫外分光光度法对蛋白进行定量。10% PAGE 电泳,转膜,封闭,以 1:1 000 加入 I 抗、II 抗作用,显影,定影。

2.6 细胞生长曲线 收集对数生长期的稳定转染细胞株,计数。以 1.5×10^4 cells/well 细胞数接种于 24 孔培养板中。37 ℃、5% CO₂ 条件下培养 5 d。每天各随机选择 3 孔细胞计数活细胞数(台盼蓝染色),绘制细胞生长曲线。

2.7 细胞体外侵袭力实验 在 PVPF 膜外面涂 Fibronectin 风干,膜内面涂 Matrigel,每孔加入含 BSA 的无血清培养基,37 ℃、30 min,吸出残余液体。24 孔培养板内加入含 BSA 的胎牛血清 RPMI - 1640 培养基,收集对数生长期的细胞,计数。将细胞悬液加到 Transwell 细胞培养小室中,37 ℃ 5% CO₂ 条件下孵育 4 d。滤膜用甲醇固定后染色。400 倍显微镜下计数。以侵袭细胞的相对数目来表示肿瘤细胞的侵袭能力。侵袭指数(%) = 实验组/对照组 × 100%。

3 统计学处理

利用 SPSS11.5 统计软件包对数据进行分析。采用单因素方差分析。

结 果

1 pSilencer 2.1 - U6 - neo/shRNA 质粒经 EcoR I 和 Hind III 双酶切的酶切鉴定结果

结果显示片段大小约为 396 bp,与我们预期的结果一致,见图 1。

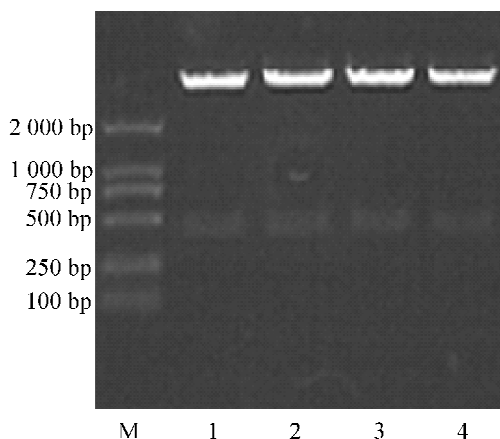


Fig 1 Restriction enzyme assay of recombinant plasmid pSilencer 2.1 - U6 - neo/shRNA digested by EcoR I and Hind III. M: marker; Lane 1: p - shRNA1; Lane 2: p - shRNA2; Lane 3: p - shRNA3; Lane 4: p - NC.

图 1 pSilencer 2.1 - U6 - neo/shRNA 质粒经 EcoR I 和 Hind III 双酶切

2 测序结果

将酶切鉴定正确的克隆送测序,测序结果均与目的序列相同,表明表达 shRNA 的 DNA 模板链已经成功插入载体的正确部位。并将构建的重组载体分别命名为 p - shRNA1、p - shRNA2、p - shRNA3。

3 稳定转染细胞系的鉴定

使用浓度为 700 mg/L 的 G418 进行筛选,约 14 d 后,阴性对照细胞全部被杀死,筛选出具 G418 抗性细胞。扩大培养后,经逆转录得 cDNA,测序引物进行 PCR 反应,扩增出相应的目的条带,约 546bp (图 2),证明该载体已经成功转染入细胞内。将获得的阳性转染细胞用含 400 mg/L G418 培养基继续培养。实验结果证实成功筛选出携带重组 shRNA 表达载体的 LNCaP 细胞。

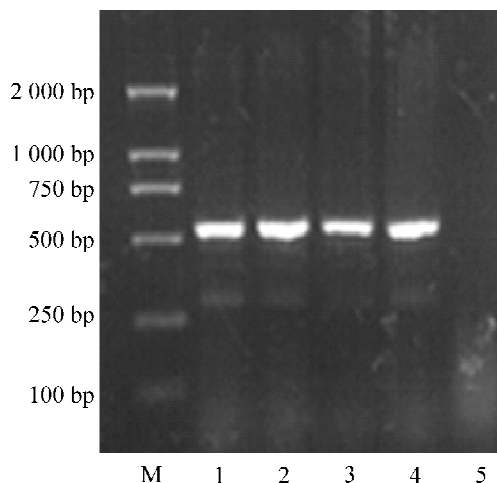


Fig 2 The PCR results using sequencing primer. M: marker; Lane 1: p - shRNA1; Lane 2: p - shRNA2; Lane 3: p - shRNA3; Lane 4: p - NC; Lane 5: LNCaP.

图 2 测序引物扩增产物电泳图

4 shRNA 对 PSMA 抑制作用

将 RT - PCR 及 Western blotting 结果用 Image Pro Plus 软件进行灰度扫描(图 3、4)。以条带灰度与内参 β - actin 条带灰度比值表示 mRNA 的相对表达量,再用 1 - (各组 p - siRNA 与 p - NC 组 mRNA 的相对表达量的比值),即可得到相应的抑制率。蛋白水平的抑制率计算方法与此类似。从实验结果可知,p - shRNA1,2,3 转染 LNCaP 后,对细胞 mRNA 表达的抑制作用不同,其抑制率分别为 33.15%、9.26%、41.97%。Western blotting 结果显示对 PSMA 蛋白表达的抑制率分别为 26.26%、6.47%、40.69%。而阴性对照 p - NC 的抑制作用不明显,mRNA 及蛋白表达的抑制率分别为 10.10%、7.97%。

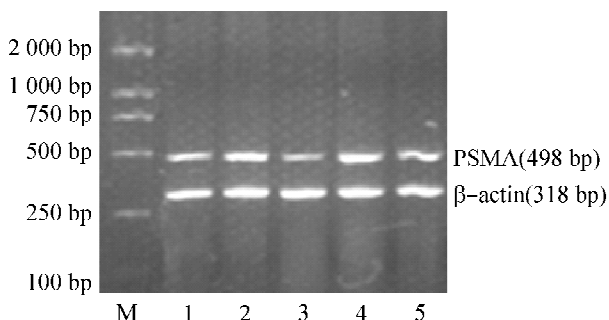


Fig 3 RT-PCR analysis of PSMA mRNA. M; marker; Lane 1; p-shRNA1; Lane 2; p-shRNA2; Lane 3; p-shRNA3; Lane 4; LNCaP; Lane 5; p-NC.

图3 RT-PCR检测PSMA mRNA的表达

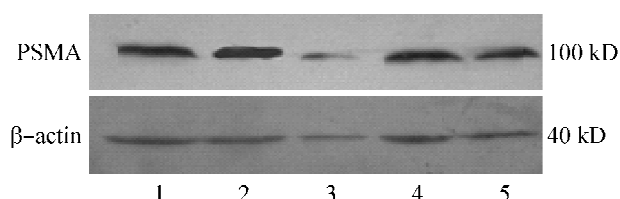


Fig 4 Western blotting analysis of PSMA protein. Lane1; p-shRNA1; Lane2; p-shRNA2; Lane3; p-shRNA3.

图4 Western blotting检测PSMA蛋白表达

5 对细胞生物学行为的影响

我们选择抑制率较高的 p-shRNA3 组细胞进行生物学行为实验。

5.1 细胞生长曲线结果显示,与未转染 LNCaP 细胞相比较, p-NC 组细胞生长变化不明显,差异无显著 ($P > 0.05$),虽然 p-shRNA3 组肿瘤细胞生长有所加快,但是与 p-NC 组间差异也无显著 ($P > 0.05$),见图 5。

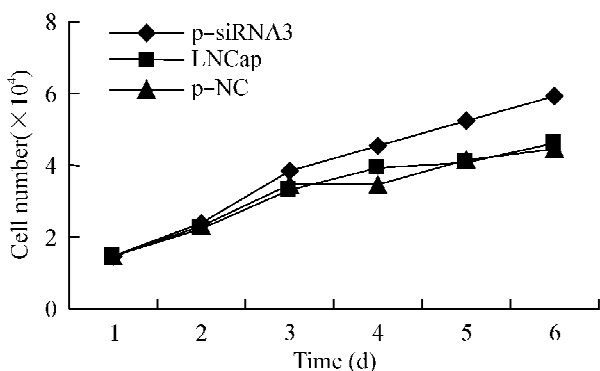


Fig 5 The cell growth curve.

图5 细胞生长曲线

5.2 细胞体外侵袭力实验结果说明,转染 p-shRNA3 的 LNCaP 细胞其穿膜细胞数明显高于阴性对照组 p-NC,差异显著 ($P < 0.01$),而 p-NC 及未转染 LNCaP 细胞组间差异无显著 ($P > 0.05$),见图 6。p-shRNA3 组侵袭指数为 220.3%。

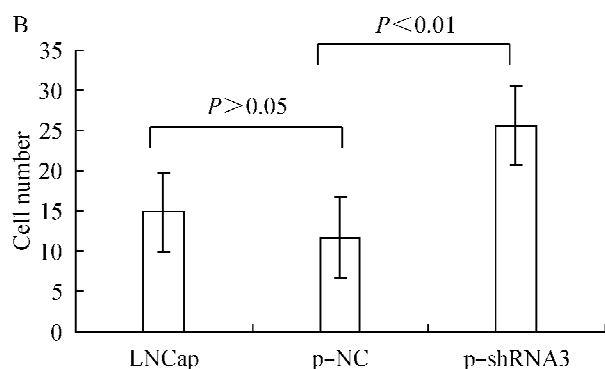
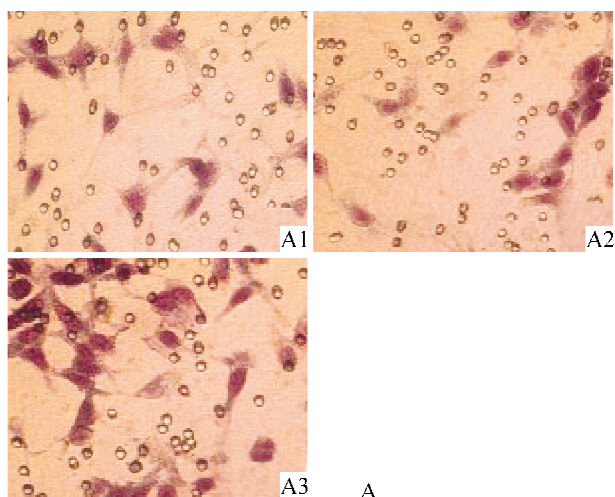


Fig 6 Invasion of LNCaP cells transfected with p-shRNAs *in vitro*. A; The LNCaP cells were stained by Wright-Gimsa (A1; LNCaP; A2; p-NC; A3; p-shRNA3 ($\times 400$)); B; the number of invading cells.

图6 细胞体外侵袭力

讨 论

在 RNAi 中,干扰片段的设计是关系到 RNAi 实验成败的关键环节。PSMA 是一种由 750 个氨基酸组成的 II 型跨膜糖蛋白,包括 3 个结构域:胞内区,跨膜区,胞外区^[5]。其胞外区的氨基酸序列与转铁蛋白受体变体 TfR2 α 高度同源^[6]。PSMA 基因结构与细胞中其它一些基因存在一定的同源性,并且在转录过程中可形成多种剪接变体。为保证设计的干扰片段对目的基因的针对性和干扰作用的有效性,本研究应用计算机软件在详尽的同源性分析的基础上,根据 Elbashir 的 siRNA 设计原则^[7],设计出 3 条 19nt 的 shRNA,其 GC 含量为 38.1%、52.4%、47.6%,分别位于 PSMA cDNA 序列 869 bp、1 589 bp、2 194 bp 处,这些位点为 PSMA 及其剪接变体所特有,且具有较高的特异性。将设计的 3 条 shRNA 片段连接到真核表达载体 pSilencer2.1-U6,测序证实后转染至前列腺癌 LNCaP 细胞株中,经 RT

-PCR 及 Western blotting 鉴定在 mRNA 和蛋白水平均有不同程度的抑制作用。RT-PCR 结果显示, p-shR NA1、2、3 对 PSMA mRNA 表达抑制率分别为 33.15%、9.26%、41.97%, Western blotting 结果显示对 PSMA 蛋白表达的抑制率分别为 26.26%、6.47%、40.69%。仅就干扰效果而言与其它作者类似的研究结果基本一致^[8,9]。具有干扰效果的稳定转染细胞系的建立,为后续功能实验提供了必要的物质基础。

为研究 PSMA 在前列腺癌中的作用及生物学功能,我们以人前列腺癌 LNCaP 细胞株为模型,选取干扰效率较高的 p-shRNA3 组细胞进行体外细胞行为学研究。结果显示,导入干扰载体后,LNCaP 细胞的生长加快,但是与未转染 LNCaP 细胞相比较,p-shRNA3 组的肿瘤细胞生长变化无统计学意义。这说明干扰 PSMA 对 LNCaP 细胞的体外生长影响不大。在侵袭力实验中,转染干扰片段的 LNCaP 细胞侵袭力增强。而且与未转染 LNCaP 细胞相比较,p-NC 组细胞生长及侵袭力变化不明显,差异无显著 ($P > 0.05$),而 p-shRNA3 组的肿瘤细胞生长侵袭力变化明显,差异显著 ($P < 0.05$),侵袭指数为 220.3%。由于阴性对照 p-NC 组与未转染 LNCaP 细胞之间的差异并不明显,这样就可以排除干扰的结果是由于转染入外源性的物质引起的非特异性干扰现象,即细胞侵袭状况的变化是由于转染的特异性干扰片段所引起的。综上所述,PSMA 表达受阻后,LNCaP 细胞侵袭力明显增强,提示 PSMA 可能在前列腺癌的侵袭中起负向调节作用。

目前研究发现 PSMA 与前列腺癌的恶性程度存在一定的相关性,说明研究 PSMA 在前列腺癌的侵袭转移及前列腺癌的发生机制中的作用具有重要意义。本研究的实验结果显示,PSMA 可能具有抑制前列腺癌侵袭的作用,这与目前其它作者的研究结论基本相符。PSMA 具有叶酸水解酶(FOLH1)和谷氨酰胺酶 II(GCPII)两种酶活性^[10],有研究表明异位表达的 PSMA 可抑制前列腺癌细胞株 PC-3 的侵袭力,将进行位点突变而失去羧基酶活性的 PSMA 突变体转染 PC-3,其对细胞侵袭力失去抑制作用^[11],研究结果初步提示 PSMA 可能有抑制前列腺癌细胞侵袭作用,且此作用可能与 PSMA 的羧基酶活性有关。尽管 PSMA 在前列腺癌中的作用及其调

控机制尚有待于进一步阐明,但是本研究结果将为更深入的研究 PSMA 的功能奠定一定的实验基础。

[参 考 文 献]

- [1] 曹开源,戴淑琴,肖娜,等,新型前列腺特异膜抗原剪接变异体的发现及临床意义初步探讨[J]. 中国病理生理杂志,2006,22(11):2185-2188.
- [2] 陈维真,张勇,卢汉平,等.¹⁸⁸Re-7E11c5.3 抑制前列腺癌细胞增殖[J]. 中国病理生理杂志,2007,23(10):2051-2053.
- [3] Liao X, Tang S, Thrasher JB, et al. Small-interfering RNA-induced androgen receptor silencing leads to apoptotic cell death in prostate cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2005,4(4):505-515.
- [4] Gao L, Zhang L, Hu J, et al. Down-regulation of signal transducer and activator of transcription 3 expression using vector-based small interfering RNAs suppresses growth of human prostate tumor *in vivo*[J]. Clin Cancer Res, 2005,9(11):6333-6341.
- [5] Rinker S, Havkin CW. Location and physical mapping of the PSMA gene to human chromosome II[J]. Genomics, 1995,30(1):105-108.
- [6] Chang SS, Reutter VE, Heston WD, et al. Five different prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expressing in tumor associated neovascularity[J]. Cancer Res, 1999,59(13):3192-3198.
- [7] Elbashir SM, Harborth J, Weber K, et al. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs[J]. Methods, 2002,26:199-213.
- [8] Xu DQ, Gao L, Zhang L, et al. Down-regulation of signal transducer and activator of transcription 3 expression using vector-based small interfering RNAs suppresses growth of human prostate tumor *in vivo*[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(17):6333-6341.
- [9] Shen HL, Xu W, Wu ZY, et al. Vector-based RNAi approach to isoform-specific downregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF)165 expression in human leukemia cells[J]. Leuk Res, 2007,31(4):515-521.
- [10] Chang SS, Reutter VE, Heston WD, et al. Five different prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expressing in tumor associated neovascularity[J]. Cancer Res, 1999,59(13):3192-3198.
- [11] Ghosh A, Wang X, Klein E, et al. Novel role of prostate-specific membrane antigen in suppressing prostate cancer invasiveness[J]. Cancer Res, 2005,65(3):727-731.