

慢病毒介导的shRNA对MFC细胞生长抑素的沉默 及对细胞增殖的影响

马强¹, 于浩¹, 曹婧华¹, 王楠³, 刘松财¹, 张永亮^{1,2}, 郝林琳¹
(¹吉林大学农学部, 长春 130062; ²华南农业大学动物科学学院, 广州 510642;
³中国兽医药品监察所, 北京 100081)

摘要: SS能够抑制肿瘤细胞的增殖, 其与肿瘤的关系已成为研究热点。将包装获得的靶向生长抑素的lv-shRNA病毒液感染MFC细胞, 同时, 以pcDNA3.1-SS(pSS)转染细胞组作为SS过表达细胞对照, 通过荧光显微镜观察到了绿色荧光蛋白(GFP)的高效表达, RIA检测发现49.55% ($P < 0.05$)的SS受到了抑制。MTT法绘制细胞的生长曲线可知, pSS转染细胞的生长明显受到抑制, 而LV-shRNA组细胞的生长密度比对照组细胞提高了19.27% ($P < 0.05$), 表明SS对肿瘤细胞的增殖具有抑制作用。文章为SS及其类似物在肿瘤方面的治疗提供了理论依据。

关键词: 生长抑素; MFC细胞; 细胞增殖

中图分类号: Q291, Q522

文献标志码: B

论文编号: 2010-3457

Effects of Lentiviral-directed shRNA on Somatostatin Silencing and the Cell Proliferation of MFC Cells

Ma Qiang¹, Yu Hao¹, Cao Jinghua¹, Wang Nan³, Liu Songcai¹, Zhang Yongliang^{1,2}, Hao Linlin¹
(¹Agricultural Division of Jilin University, Jilin University, Changchun 130062;
²College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642;
³China Institute of Veterinary Drugs Control, Beijing 100081)

Abstract: Somatostatin inhibits the growth of tumor cells, and the correlation between somatostatin and the tumor is becoming a hot topic. MFC cells were infected with the lv-shRNA viral stocks targeting somatostatin with pcDNA3.1-SS transfected cells as the positive controls. The the fluorescence observation showed that high infection efficiency was gained. SS protein level in LV-shRNA infected cells were reduced 49.55% ($P < 0.05$) detected with RIA. Cell growth curve measured using the MTT assay showed that high levels of SS inhibit the cell growth ability significantly. Reversely, lowering SS stimulates the cell growth ability (19.27%, $P < 0.05$), which identified that SS inhibits the growth of MFC cells. This research lays theoretical basis for the SS or its analogue on the oncotherapy.

Key words: somatostatin; MFC cell; cell proliferation

0 引言

生长抑素(Somatostatin, SS)是一种广泛存在的神经肽^[1-2], 不仅正常组织可分泌SS, 有些肿瘤组织也生

成SS, SS在胃癌组织中的表达已得到证实, 分化程度好的胃癌SS表达阳性率为75%, 分化差的胃癌SS表达阳性率为19.2%^[3]。Ferone等^[4]发现肺癌细胞也能表

基金项目: 国家自然科学基金“抗体封闭猪垂体SSTR2和5方法的建立及其对猪生长的影响”(30771572)。

第一作者简介: 马强, 男, 生于1986年, 黑龙江省哈尔滨市人, 本科生, 研究方向: 动物生化。通信地址: 130062 吉林省长春市西安大路5333号吉林大学畜牧兽医学院, Tel: 0431-87836176, E-mail: irisqiang8691@163.com。

通讯作者: 郝林琳, 女, 1979年出生, 吉林省敦化市人, 讲师, 博士, 研究方向: 动物生长表达调控。通信地址: 130062 吉林省长春市西安大路5333号吉林大学畜牧兽医学院, Tel: 0431-87836120, E-mail: hll7976@163.com。

收稿日期: 2010-11-30, **修回日期:** 2010-12-17。

达 SS。SS 能够直接或间接地抑制肿瘤细胞的增殖,其与肿瘤的关系是近年来肿瘤学的研究热点,但 SS 抑制肿瘤细胞生长的调控机制方面的研究尚处于起步阶段,对其能否进入临床应用仍缺乏相关数据支持。2003 年,Stewart 等^[5]首次报道:在分裂相和非分裂相细胞中,慢病毒介导的 shRNA 均能特异性抑制外源的 GFP 的表达。因此,以慢病毒介导 SS 的 shRNA 作为基因阻断技术,包装获得假病毒颗粒感染胃癌细胞 MFC,研究其抑制肿瘤细胞内源性 SS 基因表达的效应,进而观察细胞生长的变化,即利用基因沉默技术来研究 SS 对肿瘤细胞生长的作用,可以为研究 SS 对肿瘤细胞的作用机制奠定基础。

1 材料

1.1 质粒和细胞

质粒 pcDNA3.1(+)-SS 由吉林大学分子生物学实验室构建并保存;慢病毒 LV-sh0 (sh0 为无干扰的 shRNA 序列),LV-shRNA (在前期试验中筛选出的靶向 SS 433-451 的有效 shRNA 序列)及 LV-GFP 假病毒液(不含 shRNA 的慢病毒)(6×10^7 ifu/mL)由吉林大学分子生物学实验室包装并保存。MFC 细胞株(小鼠前胃癌细胞),吉林大学基础医学院药理学教研室赠送;小鼠 SS 放免试剂盒,购自第二军医大学神经生物学教研室,测定在长春市吉林大学第三临床医院核医学实验室进行。MTT Cell Proliferation/Cytotoxicity Assay Kit,华特生生物技术有限公司。

1.2 细胞分组

MFC 细胞悬浮培养于含 10% FBS, 100 U/mL 青、链霉素的 1640 培养基中,在 37℃ 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。MFC 细胞以 1×10^8 /孔接种于六孔板内,培养 24 h 后,换以新鲜培养液,根据分组分别加入

100 μL 假病毒液(6×10^7 ifu/mL),轻轻混匀,培养 24 h 后,换以新鲜培养液。继续培养 72 h,待检。

细胞分组如下:(1)正常对照组:正常 MFC 细胞;(2)阳性对照组:pcDNA3.1-SS 转染 MFC 细胞;(3)LV-sh2 组:10 μL LV-sh2 假病毒液感染 MFC 细胞;(4)LV-sh0 组:10 μL LV-sh0 假病毒液感染 MFC 细胞;(5)LV-GFP 组:10 μL LV-GFP 假病毒液感染 MFC 细胞。(3)~(5)组 MFC 细胞用含有 7 μg/mL 嘌呤毒素的 1640 培养基培养和筛选,(2)组 MFC 细胞用含有 7 μg/mL G418(0.2~0.5 mg/mL)的培养基培养和筛选。

1.3 MFC 细胞的荧光观察

转染后 96 h,荧光显微镜观察,细胞计数估测转染效率。

1.4 RIA 检测转染 MFC 细胞内 SS 的蛋白质表达丰度

上述五个组别的 MFC 细胞转染后 96 h,裂解细胞,采用考马斯亮蓝 G-250 法测定裂解液中总蛋白的浓度^[6],经 SN-695 γ counter RIA 检测转染细胞裂解液中 SS 的浓度。

1.5 MTT 细胞增殖/细胞毒性检测

将上述 5 组细胞病毒感染后 96 h 传代培养于 5 块 96 孔培养板内,培养 0、1、2、3、4、5 天后,分别取出 1 块 96 孔板,进行 MTT 检测。

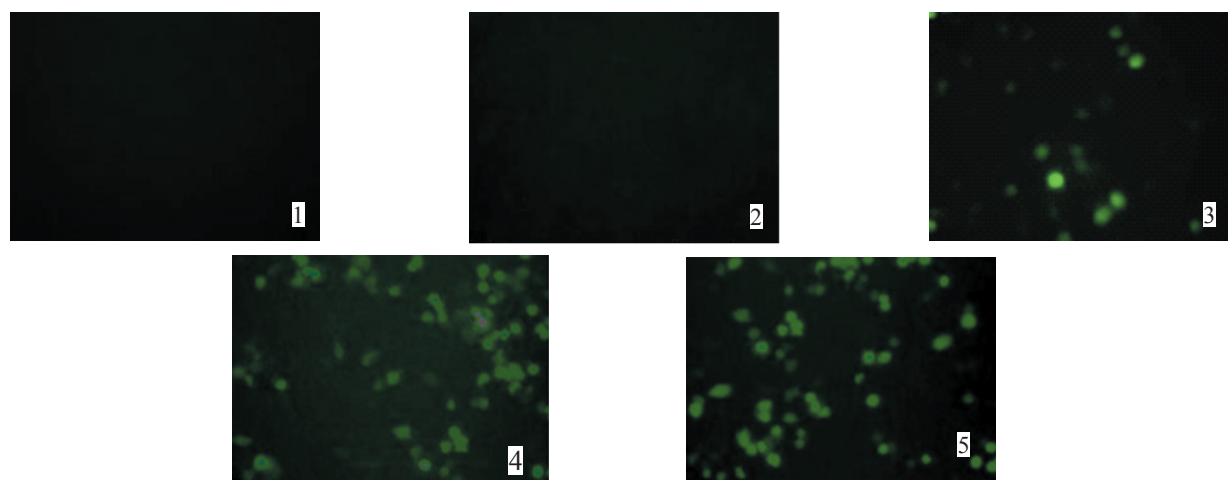
1.6 数据分析

各组数据均表示为 mean±SE,采用 SPSS12.0 软件对数据做平均值和单向方差分析,方差齐性检验并 LSD 多重比较,显著性水准为 0.05。

2 结果与分析

2.1 LV-shRNA 感染 MFC 细胞的荧光观察

由图 1 可知,感染后 96 h, LV-GFP、LV-sh0、LV-shRNA 感染组细胞均观察到了绿色荧光,说明慢



1: 未转染 MFC 细胞; 2: pcDNA3.1-SS 转染细胞; 3: LV-GFP 感染细胞; 4: LV-sh0 感染细胞; 5: LV-shRNA 感染细胞

图 1 病毒感染 96 h MFC 细胞的荧光观察

病毒可以有效的感染悬浮细胞MFC。正常对照组未见荧光。

2.2 RIA 检测各组细胞SS蛋白水平表达变化

病毒感染MFC细胞96 h,收集细胞计数,每组细胞数量均在 10^8 数量级。裂解细胞,考马斯亮蓝G-250

法测得细胞裂解液总蛋白浓度,RIA检测细胞裂解液中SS的浓度(表1)。结果显示,各组细胞总蛋白浓度水平基本一致($P>0.05$)。转染pSS组SS浓度较对照组有所升高,是对照的(1.17 ± 0.16)倍,但差异不显著($P>0.05$);感染LV-shRNA组SS浓度较对照组显著降

表1 转染MFC细胞裂解液中SS的浓度

样品	MFC	MFC/pSS	MFC/LV-shRNA	MFC/LV-sh0	MFC/LV-GFP
细胞裂解液总蛋白浓度($\mu\text{g/mL}$)	420.34 \pm 18.96	425.12 \pm 50.01	454.22 \pm 34.72	408.22 \pm 10.98	412.66 \pm 20.00
SS浓度(pg/mL)	306.62 \pm 100.23	358.38 \pm 48.36	154.69 \pm 50.74*	322.10 \pm 23.86	348.58 \pm 34.56

低,降低了49.55%($P<0.05$)。LV-sh0和LV-GFP组MFC细胞裂解液中SS浓度与对照组水平一致($P>0.05$)。

2.3 SS对MFC细胞生长的影响

将以上5组转染细胞传代培养,以570 nm的吸光度值对培养时间(d)作图即得MFC细胞生长曲线(图2)。由生长曲线可知,0~5天各时间点,对照组MFC细胞与LV-sh0组细胞以及LV-GFP组细胞 $A_{570\text{nm}}$ 差异均不显著($P>0.05$),表明慢病毒感染MFC细胞以及siRNA在细胞内的表达没有引起细胞生长的变化。选择细胞处于对数生长期的同一时间点(4天),进行各组间细胞生长抑制率的比较,pSS转染细胞的生长明显受到抑制,抑制效率为8.14%,与对照组MFC细胞差异显著($P<0.05$);而LV-shRNA组细胞的生长密度显著高于对照组,是对照组细胞的119.27%($P<0.05$)。5天时,LV-shRNA组细胞的 $A_{570\text{nm}}$ 与对照组细胞差异不显著($P>0.05$),这是由于细胞达到饱和密度后,细胞因营养的枯竭和代谢物的影响,发生密度抑制,导致细胞分裂停止。但此时的LV-sh2组细胞密度仍然高于对照组,而pSS组细胞密度低于对照组,说明细胞生长的最终密度与SS对细胞的抑制作用有关。

3 讨论

慢病毒载体区别一般的逆转录病毒载体,它对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力,目前被广泛应用于RNAi的研究中^[7]。由于有些细胞脂质体转染效率低,转移到细胞内的siRNA半衰期短,对基因表达的抑制作用通常是短暂的,因而使其应用受到较大的限制。慢病毒载体能够产生表达shRNA的高滴度的假病毒,在周期性和非周期性细胞、干细胞、受精卵以及分化的后代细胞中表达shRNA,实现在多种类型的细胞中特异而稳定的基因表达的功能性沉默,为在人和动物的原代细胞中快速而高效的研究基因功能提供了有力工具^[8]。实验通过荧光显微镜观察,慢病毒对于悬浮细胞MFC可以获得较高的感染效率。通过LV-shRNA假病毒感染MFC细胞,49.55%的SS基因表达得到了抑制($P<0.05$),但pSS质粒转染组MFC细胞的SS蛋白质表达水平并未得到显著的升高,推测是由于质粒对悬浮细胞的转染效率过低造成的。

SS的细胞效应主要表现在对细胞分泌和细胞分化的抑制以及诱导细胞凋亡^[9-13]。SS对许多细胞分泌有很强的抑制能力。一方面可能通过肿瘤细胞SSTRs介导实现^[14],另一方面则是所谓的旁分泌效应。这些

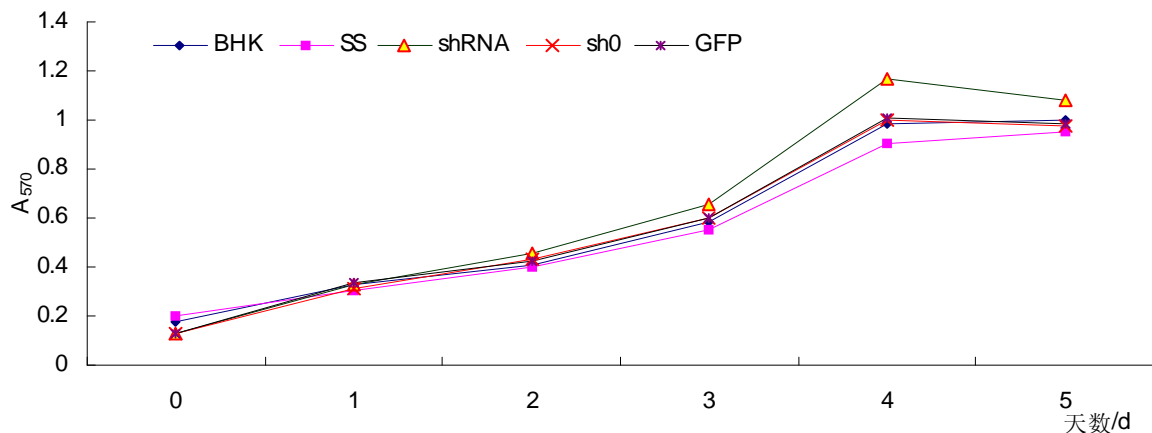


图3 生长抑制剂对MFC细胞生长的影响

效应可能是通过细胞内 G 蛋白依赖性抑制作用来调节,或通过 SSSTR 依赖性的蛋白磷酸化酶的激活来实现。此外,SS 还能抑制持续分泌的蛋白如生长因子和细胞因子的释放^[15]。该研究采用 MTT 比色分析法研究发现,通过 LV-shRNA 假病毒液感染 MFC 细胞,绘制各组细胞生长曲线可知,pSS 转染细胞的生长明显受到抑制,抑制效率为 8.14%($P<0.05$),而 LV-shRNA 组细胞的生长密度显著高于对照组,是对照组细胞的 119.27%($P<0.05$)。该研究首次从 SS 过表达和低表达两方面证明了 SS 对肿瘤细胞 MFC 的生长增殖具有抑制作用。

参考文献

- [1] Krantic S. Peptides as regulators of the immune system: emphasis on somatostatin[J]. *Peptides*,2000,21(12):1941-1964.
- [2] Brazeau P, Vale W, Burgus R, et al. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone [J].*Science*,1973,179(68):77-79.
- [3] 林岩,李光伟,肖锋刚.胃泌素、生长抑素的表达与胃癌生物学行为相关性研究[J]. *齐齐哈尔医学院学报*,2004,25(2):129-131.
- [4] Ferone D, Arvigo M, Semino C, et al. Somatostatin and dopamine receptor expression in lung carcinoma cells and effects of chimeric somatostatin-dopamine molecules on cell proliferation[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*,2005,289: 1044-1050.
- [5] Stewart S A, Dykxhoorn D M, Palliser D, et al. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells[J]. *RNA*,2003,9: 493-501.
- [6] F.奥斯伯,R.布伦特,R.E.金斯顿,等.精编分子生物学实验指南[M].北京:中国科学出版社,1998:123-162.
- [7] Naldini L, Blomer U, Gage F H, et al. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector[J]. *PNAS*,1996,93: 11382-11388.
- [8] Nagy P, Arndt D J, Jovin T M. Small interfering RNAs suppress the expression of endogenous and GFP-fused epidermal growth factor receptor (erbB1) and induce apoptosis in erbB1-overexpressing cells [J]. *Exp Cell Res*,2003,285(1):39-49.
- [9] Marily T, Zhang J, Laupheirner S, et al. Octreotide, a somatostatin analogue, mediates its antiproliferative action in pituitary tumor cells by altering phosphatidylinositol 8-kinase signaling and inducing Zac 1 expression[J]. *Cancer Res*,2006,66:1576-1582.
- [10] Wilson S H, Davis M I, Caballero S, et al. Modulation of renal endothelial cell behavior by insulin-like growth factor I and somatostatin analogues:implications for diabetic retinopathy[J]. *Growth Horm IGF Res*,2001,11(suppl.A):53-59.
- [11] Pagliacci M C, Tognellini R, Grignani F, et al. Inhibition of human breast cancer cell (MCF-7) growth "in vitro" by the somatostatin analogue SMS 201-995: effects on cell cycle parameters and apoptotic cell death[J].*Endocrinology*,1991,129:2555-2562.
- [12] Liu D, Martino G, Thangaraju M, et al. Caspase-8-mediated intracellular acidification precedes mitochondrial dysfunction in somatostatin-induced apoptosis[J].*J Biol Chem*,2000,275(13): 9244-9250.
- [13] Sharma K, Srikant C B. Induction of wild-type p53, bax, and acidic endonuclease during somatostatin-signaled apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells[J].*Cancer*,1998,76(2):259-266.
- [14] 胡江元.生长抑素受体的研究进展[J].*国外医学*,1996,16(1):16-18.
- [15] Ferjoux G, Bousquent C, Cordeller P, et al. Signal transduction of somatostatin receptors negatively controlling cell proliferation[J]. *J Phyol Paris*,2000,94:205-210.