

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.09.010

# 靶向 EGFR 基因的 shRNA 抑制胰腺癌 PANC-1 细胞增殖的研究

林远洪<sup>1</sup>, 雷小林<sup>1</sup>, 吴永忠<sup>2</sup>, 高泽莉<sup>1</sup>**Inhibition Effect of Pancreatic Cancer PANC-1 Cells by shRNA Targeting on EGFR**LIN Yuan-hong<sup>1</sup>, LEI Xiao-lin<sup>1</sup>, WU Yong-zhong<sup>2</sup>, GAO Ze-li<sup>1</sup>

1. Department of Tumor, The Affiliated Hospital of Panzhihua University, Panzhihua 617000, China; 2. Chongqing Tumor Institute

**Abstract: Objective** To explore the effect of EGFR gene on proliferation pancreatic cancer PANC-1 cells. **Methods** EGFR gene sequence-specific shRNA expression vector was constructed and then transfected into pancreatic cancer PANC-1 cells with lipofectamine. The EGFR mRNA and protein expression was detected by RT-PCR and Western blot. The cell cycle distribution and apoptosis were detected by cell flow cytometry. The proliferation of cells was detected by clone formation assay. **Results** Sequence-specific shRNA targeting on EGFR gene can obviously repress the mRNA and protein expression of EGFR gene, and EGFR mRNA and protein inhibition rates was 72.1% and 67.6%, respectively. The cell cycle in G<sub>1</sub> phase and S phase decreased ( $P < 0.05$ ). The apoptosis of cells was increased ( $P < 0.05$ ) and the colony-formation of cells was reduced ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Sequence-specific shRNA targeting on EGFR gene can effectively inhibit proliferation and promote the apoptosis of pancreatic cancer cells.

**Key words:** RNA interference; EGFR; Pancreatic cancer

**摘要:目的** 探讨 EGFR 基因对胰腺癌 PANC-1 细胞的增殖抑制作用。**方法** 构建针对 EGFR 序列特异性 shRNA 的表达载体,用脂质体转染胰腺癌 PANC-1 细胞。采用 RT-PCR、Western blot 检测 EGFR mRNA 和蛋白的表达;流式细胞仪检测细胞周期及凋亡;克隆形成实验检测细胞增殖。**结果** 靶向 EGFR 的序列特异性 shRNA 明显抑制 EGFR mRNA 和蛋白的表达,EGFR mRNA 和蛋白的抑制率分别为 72.1% 和 67.6%;G<sub>1</sub> 期细胞增多、S 期细胞减少 ( $P < 0.05$ );细胞凋亡增加 ( $P < 0.05$ );克隆形成减少 ( $P < 0.05$ )。**结论** 靶向 EGFR 的序列特异性 shRNA 能明显抑制胰腺癌细胞增殖、促进凋亡。

**关键词:** RNAi; 表皮生长因子受体; 胰腺癌**中图分类号:** R735.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)09-1012-04

## 0 引言

近年来,胰腺癌的发病率在世界范围呈上升趋势,胰腺癌由于起病隐匿,早期症状不典型,确诊多属中晚期,已失去根治性手术机会,5 年生存率不到 5%,是预后最差的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是相对分子量为 170 kD 的跨膜糖蛋白,具有酪氨酸激酶活性,在包括胰腺癌在内的多种恶性肿瘤中呈高表达。研究表明,EGFR 表达阳性的肿瘤细胞恶性程度更高、分化程度更差,侵袭性及转移力更强,对放

化疗抗拒,易复发,预后差<sup>[2]</sup>。本研究旨在通过 RNAi 技术抑制 EGFR 基因的表达,期望抑制胰腺癌细胞增殖,为胰腺癌的基因治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

胰腺癌 PANC-1 细胞株购自中科院上海细胞生物研究所;限制性内切酶 *Sal* I、*Bam*H I、*Hind*III、DNA 连接酶购自大连宝生公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;去内毒素质粒提取试剂购自 OMEGA 公司;脂质体 lipofectamine 2000 购自 Invitrogene 公司;鼠抗 EGFR 单克隆抗体购自 Santa 公司;蛋白提取试剂盒购自赛百盛公司;SDS-PAGE 凝胶购自博士德公司;总 RNA 提取试剂购自华舜公司;RT-PCR 试剂盒购自宝生公司;上、下游引物

收稿日期:2010-08-23;修回日期:2011-04-13

作者单位:1. 617000 四川攀枝花,攀枝花学院附属医院肿瘤科;2. 重庆市肿瘤研究所

作者简介:林远洪(1979-),男,硕士,主治医师,主要从事肿瘤基因治疗工作

由上海生物工程有限公司合成; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 靶向 EGFR 基因的 shRNA 表达载体的构建及鉴定

根据 shRNA 的设计原则及质粒载体 pGenesil-1 的多克隆位点特点,选择 EGFR 家族同源性基因片段(TGGGGTCGTCAAAGACGTT)为模板,采用 Ambion 公司在线工具设计 shRNA 的结构为: BamH I + Sense + Loop + Antisense + 终止信号 + Sal I + Hind III, 以此序列为基础,中间加入 CUAUGGACA 茎环序列将其分隔为反向重复序列,在插入的目的基因片段里,设计了 Sal I 的酶切位点,插入在质粒载体 pGenesil-1 的 Hind III 和 BamH I 之间,若插入正确,就能被 Sal I 酶切出一条约 400 bp 的 DNA 小带。靶向 EGFR 基因的序列特异性 shRNA 质粒载体(pGenesil-E): 正义链: 5'-UGGGGUCGUCAAAGACGUU'-3; 反义链: 5'-ACCCAGCAGUUUCUGCAA'-3; 此外,经基因库比对无明显同源性后,与 EGFR 基因序列无关的非特异性 shRNA 质粒载体(pGenesil-N),正义链序列: 5'-GCAGGUGCGGAAUAUCUGU'-3', 反义链序列: 5'-CGUCCACGCCUUAUAGACA'-3', 送武汉晶赛生物工程公司合成。将合成好的序列退火形成双链,再与线性化 pGenesil-1 质粒表达载体连接,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,在含 Kana 的 LB 平板筛选出阳性克隆,提取质粒行酶切鉴定,将鉴定正确的质粒送公司测序。

1.2.2 细胞培养及转染 胰腺癌 PANC-1 细胞株采用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,置 37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$  细胞培养箱常规培养,细胞长满时,以 0.25% 胰酶消化传代。按 Lipofectamine 2000 说明书进行转染,实验分为 3 组:阳性组:转染特异性质粒(pGenesil-E),阴性组:转染非特异性质粒(pGenesil-N),对照组:予脂质体及转染液。

1.2.3 RT-PCR 检测 EGFR mRNA 的表达 转染后收集 3 组细胞,提取总 RNA,取定量好的 RNA 5  $\mu$ l,合成 cDNA,再通过 PCR 扩增,EGFR 引物序列:P1(上游)5'-AGGAGTGC GTGGAGGAAT-3', P2(下游)5'-CTGCCGTCGCTTGATGAG-3',扩增产物为 425 bp,同时选取 GAPDH 作为内参照,GADPH 引物序列:P1(上游):5'-AGGTCCACCACTGACACGTT'-3、P2(下游):5'-GCCTCAAGATCATCAGCAAT'-3,扩增产物大小约 310 bp。(PCR 反应参数:94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环,1.5% TAE 琼脂糖凝胶电泳检测)。目的条带采用凝胶成像分析系统分析,测定各

条带的灰度值,以 EGFR 与 GAPDH 条带灰度值的比值作为 EGFR mRNA 的相对表达水平。EGFR mRNA 表达的抑制率 = (1-实验组 EGFR mRNA 相对表达水平/对照组 EGFR mRNA 相对表达水平)  $\times$  100%。

1.2.4 Western blot 检测 EGFR 蛋白的表达 转染后收集 3 组细胞,提取蛋白;取经处理的蛋白样品各 15  $\mu$ l 进行电泳;电转至 PVDF 膜;取下该膜进行杂交,以  $\beta$ -actin 作为内参照;化学发光试剂检测;放射自显影。检测用 Labworks<sup>TM</sup> 扫描分析软件系统检测出 EGFR 和  $\beta$ -actin 的积分吸光度值,以 EGFR 与  $\beta$ -actin 吸光度值的比值作为 EGFR 蛋白的相对表达水平。EGFR 蛋白表达的抑制率 = (1-实验组 EGFR 蛋白相对表达水平/对照组 EGFR 蛋白相对表达水平)  $\times$  100%。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 取对数生长期的各组细胞制成单细胞悬液,以每孔  $5 \times 10^4$  个细胞接种于 24 孔培养板,常规培养,细胞转染 48 h 后常规消化,1 000  $\times$  g 离心 5 min,PBS 洗 3 次,收集细胞,按 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作,置流式细胞仪检测每组样本的凋亡率。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞周期 取对数生长期的各组细胞制成单细胞悬液,以每孔  $5 \times 10^4$  个细胞接种于 24 孔培养板,常规培养,细胞转染 48 h 后常规消化,1 000  $\times$  g 离心 5 min,PBS 洗 3 次,用预冷的 70% 的乙醇固定液,离心收集细胞,加入碘化丙啶 1 ml 后 4 $^{\circ}$ C 避光培养 30 min,行流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.7 克隆形成实验检测克隆形成率 将转染后的细胞置 37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$  细胞培养箱常规培养,连续 12 天,终止培养后常规以 PBS 缓冲液洗涤细胞,甲醛固定,采用姬姆萨(Giemsa)染液染色后,在显微镜下计数细胞数 > 50 个的细胞克隆,计算克隆形成率(克隆形成率 = 克隆数/接种细胞数  $\times$  100%)。

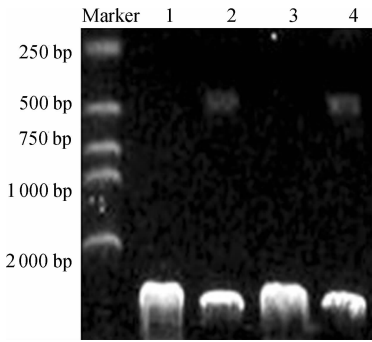
## 1.3 统计学方法

采用 SPSS11.0 统计软件处理,数据结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,计量资料用方差分析及  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒载体的鉴定结果

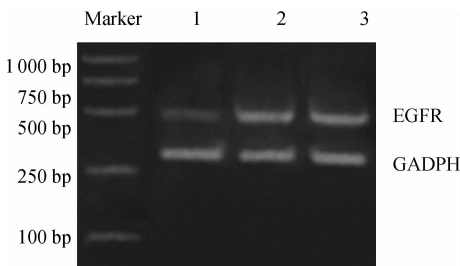
重组质粒载体经 Sal I 酶切的 pGensil-E、pGensil-N 在 400 bp 处见小片段,未酶切的质粒载体在 400 bp 处无小片段,酶切结果表明重组质粒载体构建成功。重组质粒载体经测序结果显示与 DNA 片段序列完全一致,进一步证明重组质粒载体构建成功,见图 1。



1: pGensil-E; 2: pGensil-E Sal I ; 3: pGensil-N;  
4: pGensil-N Sal I

图 1 质粒载体酶切电泳图

Figure 1 The electropherogram of plasmid digested



1: positive group; 2: negative group; 3: control group

图 2 EGFR mRNA 的 RT-PCR 凝胶电泳图

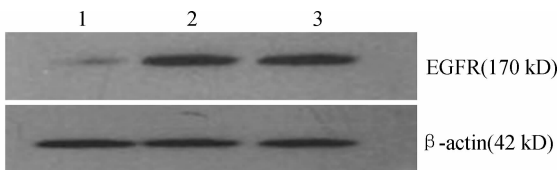
Figure 2 The RT-PCR electropherogram of EGFR mRNA

## 2.2 RT-PCR 检测结果

EGFR mRNA 的表达结果: 阳性组中 EGFR mRNA 条带(425 bp)的亮度明显弱于阴性组及对照组, 而 3 组中 GAPDH mRNA 条带(310 bp)的亮度相似; 阳性组与阴性组、对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 阴性组与对照组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 阳性组 EGFR mRNA 表达的抑制率为 72.1%, 见图 2。

## 2.3 Western blot 检测结果

EGFR 的蛋白表达结果: 阳性组中 EGFR 蛋白(170 kD)表达的强度明显弱于阴性组及对照组, 而 3 组中内参  $\beta$ -actin(42 kD)的强度相似; 阳性组与阴性组、对照组差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 阴性组与对照组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 阳性组 EGFR 蛋白表达的抑制率为 67.6%, 见图 3。



1: positive group; 2: negative group; 3: control group

图 3 EGFR 蛋白的 Western blot 示意图

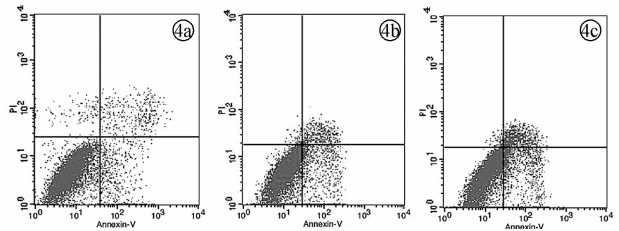
Figure 3 The Western blot diagram of EGFR protein

## 2.4 细胞周期与凋亡率

流式细胞仪检测结果, 阳性组中  $G_0/G_1$  期细胞比例增多, 而 S 期细胞减少, 且凋亡率明显增加; 阳性组与阴性组、对照组差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 阴性组与对照组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 表明转染后阳性组细胞大部分阻滞在  $G_1$  期、凋亡增加、增殖受抑制, 见图 4、表 1。

## 2.5 克隆形成率

克隆形成结果: 阳性组克隆形成率为  $(1.32 \pm 0.24)$ , 阴性组克隆形成率为  $(2.73 \pm 0.56)$ , 对照组克隆形成率为  $(2.54 \pm 0.44)$ ; 阳性组与阴性组、对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 阴性组与对照组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 表明转染后阳性组细胞增殖明显受抑制, 见图 5。



4a: positive group; 4b: negative group; 4c: control group

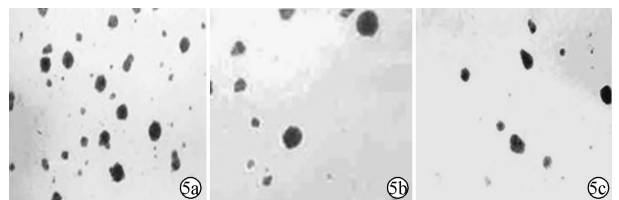
图 4 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡率

Figure 4 Cell cycle and apoptosis detected by flow cytometry

表 1 转染 EGFR 后对 PANC-1 细胞周期的影响

Table 1 The effect of cell cycle after transfected with EGFR

Groups	Cell cycle			Apoptosis rate
	$G_0/G_1$	S	$G_2/M$	
Positive	$68.4 \pm 6.7$	$20.8 \pm 2.4$	$9.3 \pm 1.3$	$28.7 \pm 4.2$
Negative	$46.3 \pm 4.8$	$34.4 \pm 4.5$	$15.2 \pm 2.6$	$10.4 \pm 1.8$
Control	$41.7 \pm 2.9$	$37.5 \pm 3.8$	$18.4 \pm 3.5$	$13.6 \pm 2.9$



5a: positive group; 5b: negative group; 5c: control group

图 5 转染 EGFR 后细胞克隆形成率( $\times 100$ )

Figure 5 The clone formation assay after transfected with EGFR ( $\times 100$ )

## 3 讨论

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是 1998 年由 Fire 首次发现并命名的转录后水平的基因沉默现象, 也成为分子生物学研究中最活跃的热点之一。RNA 干扰是指由双链 RNA 介导的、特定酶

参与的特异性基因沉默现象,它在转录水平、转录后水平和翻译水平上阻断基因的表达,它通过具有序列特异性的双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)或短发夹状 RNA(short hairpin RNA, shRNA)与靶基因 mRNA 结合而导致目的基因表达下调<sup>[3-4]</sup>。相对于传统的基因治疗, RNAi 具有高特异性、高效性、高稳定性、可扩散性、可遗传性等特点,在肿瘤基因研究和基因治疗中显示出强大的效果,可用于筛选抗肿瘤药物,还可以提高肿瘤细胞对放化疗的敏感度,极大促进了 RNA 干扰技术的应用<sup>[5-6]</sup>, RNAi 现象的发现为肿瘤的基因治疗提供了一种新的思路,通过 RNAi 技术抑制癌基因的表达,有可能成为肿瘤基因治疗的新策略,具有较好的应用前景<sup>[7]</sup>。

胰腺癌是常见的消化道恶性肿瘤之一,也是死亡率最高的恶性肿瘤之一,胰腺癌的诊治仍是医学界的一大难题<sup>[8]</sup>。肿瘤分子生物学的研究进展为从分子水平认识肿瘤提供了理论依据,也为肿瘤基因治疗带来新前景。研究表明胰腺癌中 EGFR 呈高表达,而正常胰腺导管上皮和腺泡仅轻度表达<sup>[9]</sup>, EGFR 的高表达和激活与肿瘤的恶性程度、分化程度、浸润程度、肿瘤耐药性、放化疗敏感度及预后等密切相关,可作为诊断及预后判断的指标<sup>[10]</sup>。由于 EGFR 家族在细胞增殖、存活和分化中的重要作用,是目前研究最多的信号转导途径之一,成为公认的肿瘤基因治疗重要靶位,研究 EGFR 及针对 EGFR 的靶向药物,成为近年来抗肿瘤治疗的热点之一<sup>[11]</sup>。

本研究根据 EGFR 基因在胰腺癌中呈高表达,构建了靶向 EGFR 基因的 shRNA 质粒载体,通过酶切及测序证实质粒载体构建成功;并将质粒载体成功转染胰腺癌 PANC-1 细胞,通过 RT-PCR、Western blot 检测到序列特异性的 shRNA 质粒载体明显抑制 EGFR 基因在转录和翻译水平的表达, EGFR 基因的 mRNA 和蛋白均显著降低;细胞周期检测显示: G<sub>1</sub> 期细胞增多、S 期细胞减少、细胞增殖受阻,细胞凋亡检测显示细胞凋亡增加,克隆形成实

验显示细胞增殖受抑制,表明细胞增殖受抑制与序列特异性的 shRNA 质粒载体抑制 EGFR 基因的表达有关。

总之,本研究表明应用 RNAi 技术抑制 EGFR 基因的高表达能抑制胰腺癌细胞增殖,初步显示了 RNAi 技术在胰腺癌基因治疗中的潜在作用。尽管该技术的作用机制还不十分清楚,但随着对 RNAi 技术的深入研究,相信 RNAi 技术将会成为肿瘤治疗中的一个重要组成部分。

#### 参考文献:

- [1] Hsu JT, Chen HM, Wu RC, et al. Clinicopathologic features and outcomes following surgery for pancreatic adenocarcinoma[J]. *World J Surg Oncol*, 2008, 6: 95.
- [2] Bianco R, Gelardi T, Damiano V, et al. Rational bases for the development of EGFR inhibitors for cancer treatment[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(7-8): 1416-1431.
- [3] Mao CP, Hung CF, Wu TC. Immunotherapeutic strategies employing RNA interference technology for the control of cancers[J]. *J Biomed Sci*, 2007, 14(1): 15-29.
- [4] 黄坊, 赵颖海. RNAi 技术在鼻咽癌研究中的应用进展[J]. *肿瘤防治研究*, 2009, 36(1): 73-75.
- [5] Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, 59(2-3): 75-86.
- [6] Ashihara E, Kawata E, Maekawa T. Future prospect of RNA interference for cancer therapies[J]. *Curr Drug Targets*, 2010, 11(3): 345-360.
- [7] Dykxhoorn DM, Chowdhury D, Lieberman J. RNA interference and cancer: endogenous pathways and therapeutic approaches[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2008, 615: 299-329.
- [8] Hidalgo M, Abad A, Aranda E, et al. Consensus on the treatment of pancreatic cancer in Spain[J]. *Clin Transl Oncol*, 2009, 11(5): 290-301.
- [9] Modjtahedi H, Essapen S. Epidermal growth factor receptor inhibitors in cancer treatment: advances, challenges and opportunities[J]. *Anticancer Drugs*, 2009, 20(10): 851-855.
- [10] 杜伟, 王杰军, 何金. 大肠癌中 EGFR、c-erbB-2 及 VEGF 的表达与临床病理特征的关系[J]. *肿瘤防治研究*, 2008, 35(3): 191-193.
- [11] Lurje G, Lenz HJ. EGFR signaling and drug discovery[J]. *Oncology*, 2009, 77(6): 400-410.

[编辑:周永红;校对:杨 卉]