

慢病毒介导 RNAi 抑制胃癌细胞 *CDH17* 基因的表达对化疗药物敏感性的影响

奚海林^{1,2}, 陶凯雄¹, 牛建华², 袁明², 帅晓明¹, 李睿², 常伟龙¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院, 湖北 武汉 430022;

2. 石河子大学医学院第一附属医院, 新疆 石河子 832008)

摘要: [目的] 探讨慢病毒介导的 RNA 干扰 (RNAi) 沉默肝肠—钙黏连蛋白 (*CDH17*) 基因的胃癌细胞 SGC-7901 对化疗药物敏感性的影响。[方法] 将制备好的 siRNA-*CDH17* 慢病毒表达载体稳定转染 SGC-7901 细胞 72h 后, 采用实时定量 PCR 法检测转染后 SGC-7901 细胞中 *CDH17* 基因的表达水平; Western blot 检测 *CDH17* 蛋白的表达水平; 利用流式细胞仪检测细胞周期, MTT 法和平板克隆形成实验检测 *CDH17* 基因沉默后胃癌细胞 SGC-7901 对氟尿嘧啶 (5-FU) 的敏感性。[结果] Real-time PCR 及 Western blot 检测结果表明 *CDH17* mRNA 及蛋白在 SGC-7901 细胞中表达下调; 实验组 SGC-7901 细胞周期明显阻滞在 G₀/G₁ 期, S 期相对减少; 5-FU 处理 SGC-7901 细胞 48h 后, MTT 法和平板克隆形成实验显示实验组增殖抑制显著高于另两组, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。 *CDH17* 基因沉默的 SGC-7901 细胞对 5-FU 的敏感性显著增强。[结论] 以 *CDH17* 基因为靶标的 RNA 干扰能下调 SGC-7901 细胞中 *CDH17* 的表达, 从而增强其对 5-FU 的化疗敏感性。

关键词: 胃肿瘤; *CDH17*; 细胞增殖; RNA 干扰; 氟尿嘧啶

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X (2013) 05-0321-06

Lentivirus-mediated RNA Interference Suppresses *CDH17* Expression and Enhances Chemosensitivity in Gastric Cancer Cells

XI Hai-lin^{1,2}, TAO Kai-xiong², NIU Jian-hua², et al.

(1. Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China; 2. The First Affiliated Hospital, Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832008, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effects of lentivirus-mediated RNA interference (RNAi) targeting *CDH17* (liver-intestine cadherin) on the chemosensitivity to 5-FU of gastric cancer cell line SGC-7901. [Methods] SGC-7901 cells were steady transfected with lentiviruses delivering small interfering RNA (siRNA) against *CDH17* gene. The expression levels of *CDH17* mRNA and protein were detected by real-time PCR and Western blot, respectively. Flow cytometry was used to detect the cell cycle. Sensitivity to 5-FU after transfection were examined by MTT and colony formation assay. [Results] In SGC-7901 cells, the expression levels of *CDH17* mRNA and protein decreased significantly after transfection. The cell number in G₀/G₁ phase increased while that in S phase decreased in experimental group cells. Forty-eight hours after treatment with 5-FU, the growth inhibition rate in experimental group was significantly higher than that in the other two groups ($P < 0.001$). The sensitivity of SGC-7901 cells to 5-FU increased significantly after transfection. [Conclusion] Lentivirus-mediated RNAi targeting *CDH17* can effectively suppress the expression of *CDH17* in SGC-7901 cells and enhance the chemosensitivity of the cells to 5-FU.

Subject words: Stomach neoplasms; *CDH17* gene; cell proliferation; RNA interference; 5-FU

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 2003~2007 年我国胃癌发病率为 33.14/10 万, 居恶性肿瘤第 2 位, 严重威胁广大人民的健康^[1]。本文通过合成

通讯作者: 陶凯雄, 主任医师, 博士生导师, 博士; 华中科技大学同济医学院附属协和医院胃肠外科, 湖北省武汉市解放大道 1277 号 (430022); E-mail: Tao_kaixiong@163.com。

收稿日期: 2013-01-04; **修回日期:** 2013-02-07

LV-*CDH17*-RNAi 慢病毒表达载体转染胃癌细胞株 SGC-7901, 分析 RNAi 对 *CDH17* 基因沉默的效率, 进而检测 SGC-7901 细胞周期及其对 5-FU 的化疗敏感性, 为下一步进行 RNA 干扰 *CDH17* 基因治疗胃癌或作为增敏药物研究提供实验依据^[2]。

1 材料与方法

1.1 主要材料

胃癌细胞株 SGC-7901 为华中科技大学同济医学院附属协和医院动物中心实验室保存;胎牛血清和 RPMI 1640 培养液购自美国 Gibco 公司;实时荧光定量 PCR 检测试剂盒为大连 TaKaRa 公司产品;兔抗人 CDH17 单克隆抗体为美国 Abcam 公司产品;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 IgG 购自北京中杉金桥公司;ECL 化学发光试剂盒购自美国 Thermo 公司。

1.2 CDH17 基因 siRNAi 序列的设计和合成

针对 CDH17 靶基因序列 (GenBank Accession No. NM_004063), 利用公用网站按照 RNAi 序列设计原则, 并参照相关文献^[3], 确定靶向 CDH17 基因的 siRNA 序列为 5'-AAGTGAAGGACATCAACGA-CACTCGAGTGTCTTGATGTCTTCACTT-3', 由上海吉凯基因化学有限公司合成同时合成互补链, 退火形成双链 DNA(dsRNA)。经 Hpa I 和 Xho I 双酶切后与 Pfu-gw-006 载体相连, 转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞, 挑选阳性克隆行 PCR 鉴定, 测序正确后行慢病毒包装、收获、浓缩和滴度测定。

1.3 细胞的培养和转染

胃癌细胞株 SGC-7901 细胞培养于含 10%胎牛血清 RPMI 1640 培养液中, 置于饱和湿度、5%CO₂、37℃的恒温培养箱中培养。实验共分 3 组, 分别是①空白对照组: 细胞不予任何处理;②阴性对照组: 转染不含目的基因的空病毒载体对照;③实验组: 转染含目的基因 CDH17 的慢病毒载体。取对数生长期的 SGC-7901 细胞, 病毒感染前一天按每孔 1×10⁵ 个细胞接种于 24 孔板中培养, 感染当天按实验设计的组别加入慢病毒颗粒(MOI=20)进行目的细胞的转染实验。转染后 24h 换正常培养液, 3d 后荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白(GFP)的表达情况。待细胞长满培养板后收集细胞检测相应指标。

1.4 Real-time PCR 检测

收集细胞, 离心除去上清液, 加入 1ml TRIzol, 提取总 RNA, 用 cDNA 合成试剂盒反转录合成 cDNA。以此 cDNA 为模板分别扩增 CDH17 和内参 GAPDH。CDH17 引物序列: 正义 5'-GCCAATC-CTCCTGCTGTG-3', 反义 5'-GCAACCTGGAGATTGTG-

AGT-3'; 内参照 GAPDH 正义 5'-TGACTTCAACAG-CGACACCCA-3', 反义 5'-CACCCTGTTGCTGTAGC-CAAA-3'。设定程序为两步法 Real-time PCR: 预变性 95℃, 15s; 之后每一步变性 95℃, 5s; 退火延伸 60℃, 30s; 共进行 45 个循环。以 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 表示 CDH17 基因 mRNA 相对表达水平。实验共重复 3 次。

1.5 Western blot 检测

细胞弃培养液后 PBS 冲洗 3 次, 每孔加入预冷的 RIPA 细胞裂解液, 操作在冰上进行, 用 BCA 法测定蛋白浓度, 煮沸处理 10min。取 50 μ g 蛋白行 10%SDS-PAGE 电泳, 采用湿转法将分离后的蛋白转移至 PVDF 膜上, 5%脱脂奶粉室温振荡封闭 1h, 加入 1:800 稀释的 CDH17 一抗 4℃ 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 每次 10min, 漂洗后, 加入 1:4 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗, 37℃孵育 2h, TBST 洗膜 3 次, 每次 5min。采用 ECL 试剂盒进行显色发光, 暗室行 X 光片的曝光、显影、定影。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期

收集各实验组处于对数生长期细胞, 胰酶消化后制成单细胞悬液, 使细胞密度为 1×10⁶ 个/ml, 加入到预冷的 75%冰乙醇中, -20℃固定过夜, 次日弃乙醇, PBS 洗涤细胞, RNA 酶消化后加入碘化丙啶(PI)进行细胞的 DNA 染色, 避光孵育后通过流式细胞仪分析细胞的 DNA 含量分布, 计算出各个细胞所占百分率。实验共重复 3 次。

1.7 MTT 法检测干扰 CDH17 后 SGC-7901 细胞对 5-FU 的敏感性

收集各实验组处于对数生长期细胞, 接种于 96 孔板, 每个样本设 3 个复孔, 细胞贴壁后, 加入不同浓度的 5-FU (0、25、50、100、200 μ g/ml) 培养 48h, 每孔加入 20 μ l 的 MTT (浓度为 5mg/ml), 置于恒温箱 4h 后, 吸去上清液, 每孔加入 200 μ l DMSO 终止反应; 振荡 10min, 用全自动酶标仪 490nm 检测吸光度值(A 值)。抑制率(%)=(1-A_{实验组}/A_{对照组})×100%。

1.8 平板克隆检测干扰 CDH17 后 SGC-7901 细胞对 5-FU 的敏感性

取生长良好的 3 组实验细胞, 制备获得单细胞悬液后进行细胞计数, 调整细胞密度为 400~1 000 个/ml, 细胞接种于 6 孔板, 每个样本作 3 个复孔。细胞贴壁后, 加入不同浓度的 5-FU (0、25、50、100、

200 μ g/ml),置于饱和湿度、5%CO₂、37℃的恒温培养箱中,培养至肉眼可见的克隆时,终止培养。用PBS浸洗2次,加入4%的多聚甲醛溶液室温下固定15min,弃去固定液,用PBS浸洗2次,加入结晶紫染色液染色20min。洗去染液,空气中干燥后拍照计数。克隆形成抑制率(%)=(1-实验组克隆数/对照组克隆数)×100%。

1.9 统计学处理

以SPSS12.0软件进行统计学分析。计量资料数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示;多组间连续变量比较用方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 CDH17 在 SGC-7901 细胞中的表达

将构建成功的LV-CDH17-RNAi慢病毒表达载体感染SGC-7901细胞后,荧光显微镜下可见明显绿色荧光蛋白表达(Figure 1)。Real-time PCR和Western blot检测结果显示,实验组CDH17基因和CDH17蛋白的表达水平与空白对照组和阴性对照组相比明显下降,差异具有统计学意义($P<0.05$);空白对照组和阴性对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)(Figure 2)。

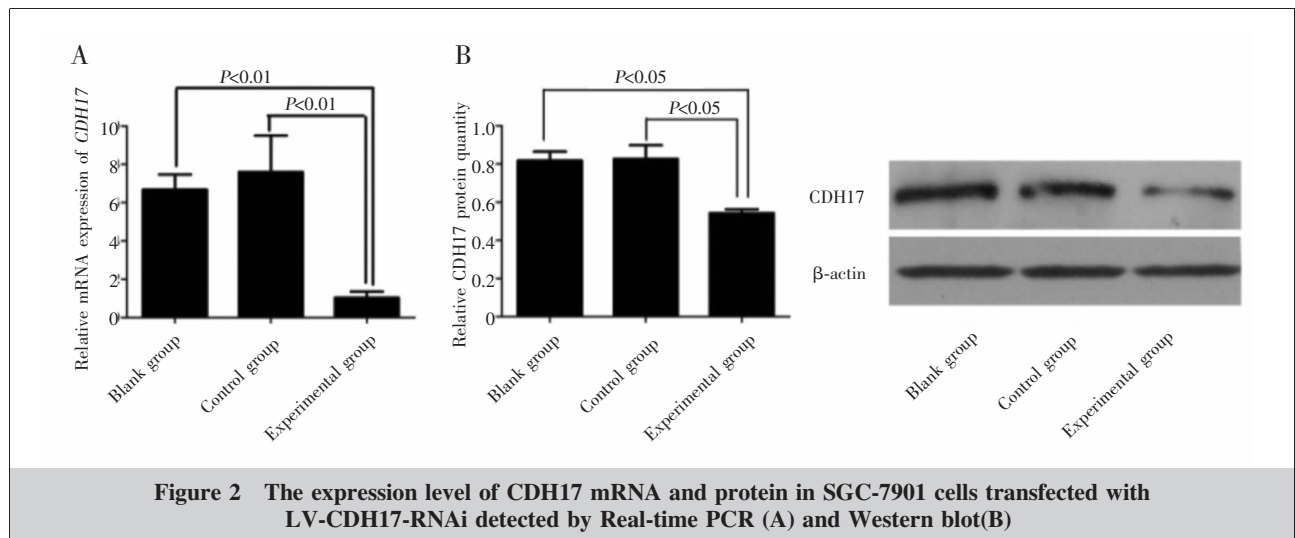
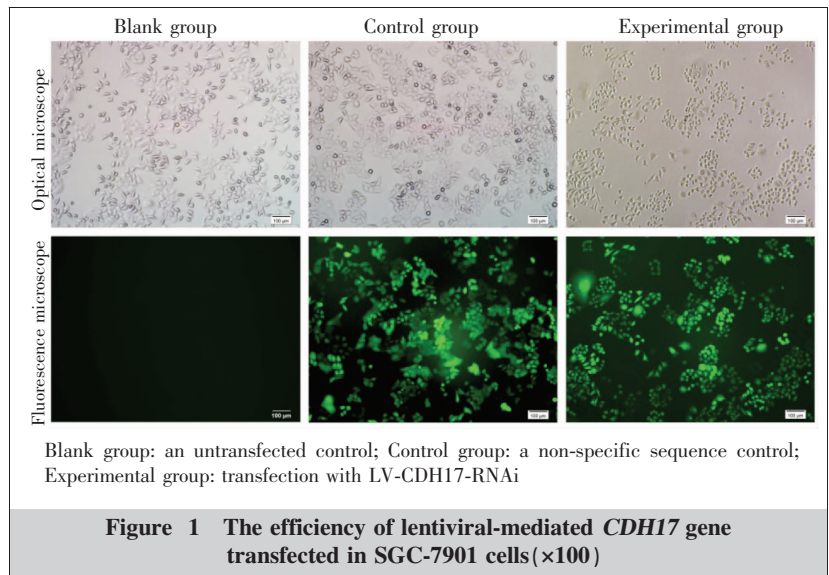
2.2 流式细胞仪检测细胞周期

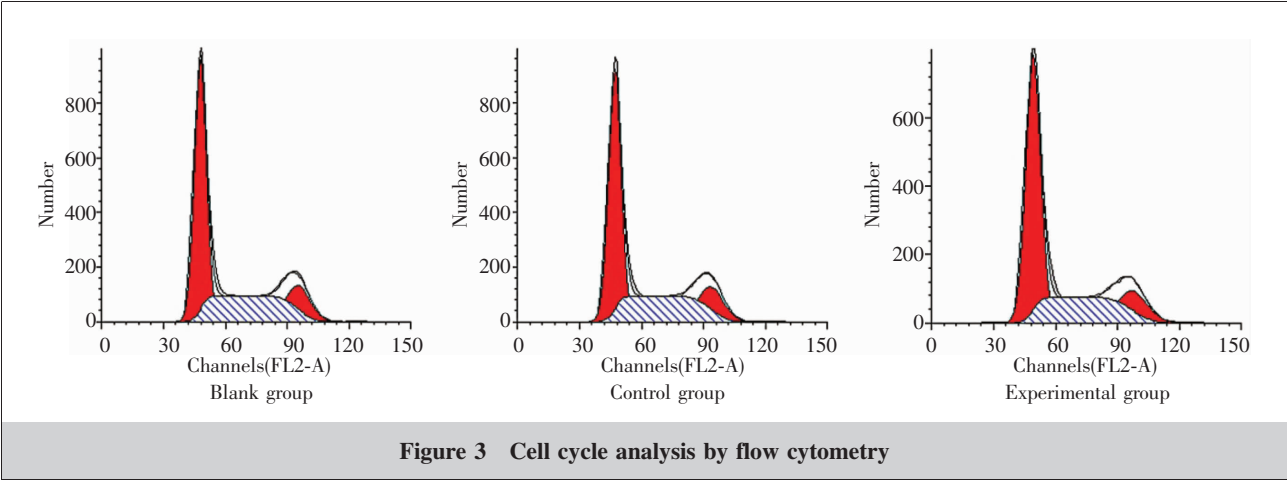
对细胞周期影响的检测结果显示,实验组SGC-7901细胞与空白对照组和阴性对照组细胞相比,S期细胞百分比相对减少,G₀/G₁期百分比相对增加,差异有统计学意义($P<0.05$);G₂/M期百分比变化不大,差异无统计学意义($P>0.05$);空白对照组和阴性对照组两组细胞比较,各期细胞百分比变化不大,差异无统计学意义($P>0.05$)(Table 1, Figure 3)。

Table 1 Effects of CDH17 gene silencing inhibited to the cell cycle of SGC-7901 cells ($\bar{x}\pm s$, n=3)

Groups	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Blank group	52.76 $\pm$ 1.06	32.69 $\pm$ 1.08	14.55 $\pm$ 0.12
Control group	53.40 $\pm$ 0.60	32.47 $\pm$ 0.87	14.12 $\pm$ 0.36
Experimental group	58.22 $\pm$ 0.48*	27.97 $\pm$ 0.98*	13.81 $\pm$ 0.51

*:Compared with blank group and control group, $P<0.05$.





2.3 RNAi 干扰 CDH17 基因表达后 SGC-7901 细胞对 5-FU 的敏感性

MTT 法检测结果经随机区组资料的方差分析显示,未经药物干预的三组细胞,实验组细胞的增殖能力明显减弱,空白对照组和阴性对照组细胞的增殖能力未见明显差别,差异有统计学意义 ($F=50.385, P<0.001$); 经不同浓度的 5-FU 干预后,3 组细胞对不同浓度的 5-FU 敏感性均有所提高,并且随药物浓度的增加 5-FU 对细胞的抑制率也增加,呈现出剂量依赖性。实验组细胞对不同浓度的 5-FU 敏感性显著高出空白对照组和阴性对照组细胞 ($F=533.448, P<0.001$) (Figure 4)。

2.4 对 SGC-7901 细胞克隆形成的影响

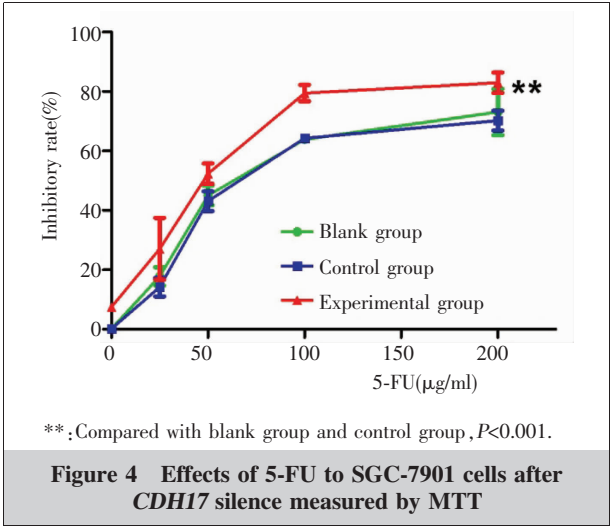
平板克隆形成实验检测结果经随机区组资料的方差分析显示,未经药物干预的 3 组细胞,实验组细胞的集落生成数明显下降,实验组与空白对照组和

阴性对照组相比较,差异有统计学意义 ($F=23.342, P<0.001$); 经不同浓度的 5-FU 干预后,3 组细胞在不同浓度的 5-FU 作用下,克隆形成的抑制率也不断提高,呈现出剂量依赖性。当 5-FU 药物的浓度由 $100\mu\text{g/ml}$ 增长至 $200\mu\text{g/ml}$ 时,克隆形成的抑制率虽有所增加,但结果无统计学差异 ($P=0.097$)。实验组与空白对照组和阴性对照组比较,差异有统计学意义 ($F=122.806, P<0.001$) (Table 2, Figure 5)。

Table 2 Growth inhibition of SGC-7901 cells after CDH17 silence ($\bar{x}\pm s, n=3$)

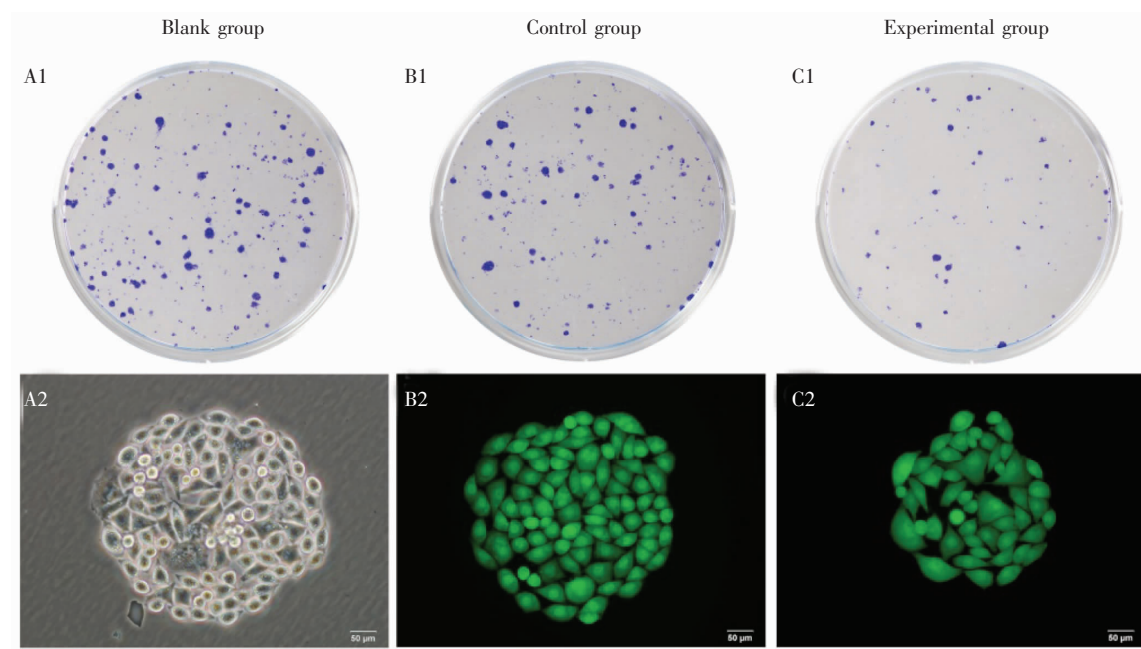
5-FU ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibitory rate (%)		
	Blank group	Control group	Experimental group
0	0.42 ± 0.29	0.51 ± 0.34	$12.88\pm 4.50^{**}$
25	20.30 ± 5.48	15.02 ± 4.17	$33.95\pm 3.09^{**}$
50	30.03 ± 5.57	31.24 ± 3.43	$44.43\pm 5.59^{**}$
100	42.80 ± 4.87	49.30 ± 2.16	$54.50\pm 3.47^{**}$
200	49.34 ± 4.42	54.84 ± 4.48	$59.77\pm 2.21^{**}$

** : Compared with blank group and control group, $P<0.01$.



3 讨论

我国早期胃癌的检出率较低,多数为进展期胃癌患者,虽然胃癌的综合治疗手段有所提高,但术后仍有较高的复发转移率。肿瘤的发生发展是多种因素共同作用的结果,探索肿瘤的分子靶向治疗有望成为一种新的治疗手段。CDH17 基因位于染色体的 8q22.1,在结构和功能上不同于其他如 E-cadherin、N-cadherin 等经典钙黏蛋白,它不依赖于细胞骨架的相互作用,而是具有 Ca^{2+} 依赖性嗜同种细胞间的粘附功能,是对经典的钙黏蛋白和桥粒钙黏蛋白功能的补充,属于钙黏连蛋白超家族中的特殊一员^[4]。



A1,B1,C1: crystal violet staining;A2:under the optical microscope;B2,C2:under the fluourescence microscope (×200)

Figure 5 Colony formation of SGC-7901 cells after *CDH17* silence observed by microscope

CDH17 参与肝脏和胃肠道的发育过程,受同源异型框转录因子(*CDX-2*)的调控^[5,6],成年后表达下降或消失^[7]。*CDH17* 也是早期筛选胃肠道腺癌的肿瘤标志物^[8,9]。本课题前期研究表明 *CDH17* 基因过表达可增强胃癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力,并促进胃癌的发生及发展^[10];*CDH17* 与胃肠道肿瘤的 TNM 分期、淋巴结的远处转移密切相关,是作为胃肠道肿瘤预后的独立影响因素。

化疗是恶性肿瘤重要的综合治疗措施之一,化疗药物的作用主要是通过损伤 DNA、诱导细胞凋亡和抑制细胞增殖,从而发挥抗肿瘤作用。然而肿瘤细胞对化疗药物的耐药是影响胃癌患者化疗效果的重要原因,研究肿瘤的耐药机制对提高化疗药物的敏感性具有重要意义。5-FU 是最常用的抗肿瘤药物,也是胃癌化疗的首选药物。5-FU 为不典型的细胞周期特异性药物,通过抑制胸腺嘧啶核苷酸合成酶,阻断脱氧嘧啶核苷酸转换成胸腺嘧啶核苷酸,干扰 DNA 合成。主要抑制 S 期细胞,阻滞 G₁ 期细胞向 S 期转化进程^[11]。由于 5-FU 对 RNA 的合成也有一定的抑制作用,对其他各期细胞也有效。RNAi 技术

是通过在细胞中导入与内源性 mRNA 编码区同源的双链 RNA,该 mRNA 与特定的核蛋白形成 RNA 诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC),与目的 mRNA 互补结合后,阻断蛋白质的翻译过程,导致转录后基因表达沉默,从而抑制该基因的功能。

本实验选用 5-FU 对 *CDH17* 基因沉默后的胃癌细胞株 SGC-7901 进行药物敏感性实验后发现 *CDH17* 基因沉默能明显提高胃癌细胞株 SGC-7901 对 5-FU 的敏感性,增加了药物的抑制率。结合细胞周期检测结果发现实验组 SGC-7901 细胞周期明显阻滞在 G₀/G₁ 期,S 期相对减少,抑制了肿瘤细胞的增殖。细胞增殖是通过细胞周期来实现的,肿瘤细胞的增殖异常是肿瘤发生的重要环节,阻滞细胞周期即能起到阻止肿瘤细胞增殖的目的。相关实验证实 *CDH17* 基因干扰后可引发调控细胞周期相关蛋白表达的变化,具体是 *CDH17* 蛋白表达下调可降低 CyclinD1 蛋白的表达,并使 Rb 蛋白表达增高,从而使 G₀/G₁ 期细胞百分比明显增多,S 期细胞百分比减少^[12]。凋亡受阻可以增加细胞的突变概率,进而诱发

肿瘤的发生^[13]。诱导凋亡能使有缺陷细胞及老化细胞发生自体吞噬。有研究证实, *CDH17* 基因干扰后下调 *CDH17* 蛋白的表达水平能明显激活 *GSK3 β* 蛋白的活性, 提高 *caspase-3* 剪切大亚基蛋白的表达, 诱发凋亡的发生^[12]。5-FU 诱导肿瘤细胞凋亡主要是通过激活 *caspase-6* 实现的^[14]。以上研究可以得出 *CDH17* 基因沉默和 5-FU 具有协同效应, 因此提高了肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。

综上所述, 本研究初步证实胃癌细胞中, *CDH17* 和 5-FU 共同作用可抑制肿瘤细胞的增殖能力并增强 5-FU 的敏感性, 为胃癌的联合治疗提供了一定的理论基础。然而肿瘤的增殖和凋亡过程是由多种相关因子通过复杂的网络化调节而形成的, 应综合分析其他多种因素在这一过程中所起的作用。

参考文献:

- [1] Zou XN, Sun XB, Chen WQ, et al. Analysis of incidence and mortality of stomach cancer in China from 2003 to 2007[J]. *Tumor*, 2012, 32(2):109-114. [邹小农, 孙喜斌, 陈万青, 等. 2003-2007 年中国胃癌发病与死亡情况分析[J]. *肿瘤*, 2012, 32(2):109-114.]
- [2] Liu QS, Zhang J, Liu M, et al. Lentiviral-mediated miRNA against liver-intestine cadherin suppresses tumor growth and invasiveness of human gastric cancer[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(8):1807-1812.
- [3] Yu QF, Dong WG, Ren JL. Knockdown of Li-cadherin increases metastatic behaviors of LoVo cells[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(11): 1641-1649.
- [4] Horsfield J, Ramachandran A, Reuter K, et al. Cadherin-17 is required to maintain pronephric duct integrity during zebrafish development[J]. *Mech Dev*, 2002, 115 (1-2):15-26.
- [5] Barros R, da Costa LT, Pinto-de-Sousa J, et al. CDX2 autoregulation in human intestinal metaplasia of the stomach: impact on the stability of the phenotype[J]. *Gut*, 2011, 60 (3):290-298.
- [6] Weimann A, Zimmermann M, Gross M, et al. CDX2 and LI-cadherin expression in esophageal mucosa: use of both markers can facilitate the histologic diagnosis of Barrett's esophagus and carcinoma[J]. *Int J Surg Pathol*, 2010, 18 (5): 330-337.
- [7] Angres B, Kim L, Jung R, et al. LI-cadherin gene expression during mouse intestinal development[J]. *Dev Dyn*, 2001, 221(2):182-193.
- [8] Su MC, Yuan RH, Lin CY, et al. Cadherin-17 is a useful diagnostic marker for adenocarcinomas of the digestive system[J]. *Mod Pathol*, 2008, 21(11):1379-1386.
- [9] Ge J, Chen Z, Wu S, et al. A clinicopathological study on the expression of cadherin-17 and caudal-related homeobox transcription factor (CDX2) in human gastric carcinoma[J]. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2008, 20 (4):275-283.
- [10] Xi HL, Li R, Niu JH, et al. Effect of over-expression of liver-intestine cadherin on the proliferation, invasion and migration of human gastric carcinoma BGC-823 cells[J]. *Tumor*, 2012, 32(11):880-885. [奚海林, 李睿, 牛建华, 等. 肝肠—钙黏连蛋白过表达对胃癌细胞 BGC-823 增殖、侵袭及迁移能力的影响[J]. *肿瘤*, 2012, 32(11):880-885.]
- [11] Bartek J, Lukas J. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13(6):738-747.
- [12] Liu LX, Lee NP, Chan VW, et al. Targeting cadherin-17 inactivates Wnt signaling and inhibits tumor growth in liver carcinoma[J]. *Hepatology*, 2009, 50(5):1453-1463.
- [13] Chen L, Liang GP, Wang ZH, et al. Silencing ALK1 expression inhibits cell growth in human gastric cancer cell line SGC-7901[J]. *China Oncology*, 2011, 21(3):182-186. [陈陵, 梁光萍, 王宗华, 等. RNAi 抑制 ALK1 对人胃腺癌 SGC-7901 细胞增殖的影响[J]. *中国癌症杂志*, 2011, 21 (3):182-186.]
- [14] Chan JY, Phoo MS, Clement MV, et al. Resveratrol displays converse dose-related effects on 5-fluorouracil-evoked colon cancer cell apoptosis: the roles of caspase-6 and p53[J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(8):1305-1312.