

反义 p55PIK 慢病毒载体的构建及其对甲状腺癌细胞 FTC236 增殖的影响

李 川, 金 源, 来森艳, 胡俊波*

(华中科技大学同济医学院附属同济医院分子医学中心, 湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的: 观察反义 p55PIK 慢病毒对甲状腺癌细胞 FTC236 的增殖是否有抑制作用。方法: 构建含 p55PIK 反义 RNA 的慢病毒载体并包装成慢病毒, 使之感染 FTC236 细胞, 得到稳定的细胞系后用 Western blot 方法检测 p55PIK 蛋白的表达情况, 用 Real-time PCR 检测 p55PIK 的 mRNA 的表达情况。同时用四甲基偶氮唑盐(MTT)法及 BrdU 掺入法检测各组细胞的增殖情况。结果: 构建的慢病毒感染甲状腺癌细胞 FTC236 的效率约为 95%; Western blot 证明反义 p55PIK 病毒可以使该细胞的 p55PIK 蛋白水平降低, mRNA 水平降为对照组的 $(47 \pm 8)\%$ ($P < 0.01$)。MTT 法检测发现反义 p55PIK 慢病毒感染后的 FTC236 细胞增殖明显受到抑制, 增殖率为未处理组的 $(59 \pm 19)\%$ ($P < 0.05$)。且反义 p55PIK 慢病毒组的平均 BrdU 掺入率比未处理组降低了 10.64% ($P < 0.02$)。结论: 反义 p55PIK 病毒可以通过抑制 p55PIK 蛋白的表达而抑制了 FTC236 细胞的增殖。

[关键词] p55PIK; 慢病毒; 反义 RNA; 增殖抑制

[中图分类号] R736.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)06-790-05

The antisense of p55PIK lentivirus could inhibit the proliferation of thyroid carcinoma FTC236 cells

LI Chuan, JIN Yuan, LAI Sen-yan, HU Jun-bo*

(Center of Molecular Medicine, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Wuhan 430030, China)

[Abstract] **Objective:** To elucidate the role of antisense oligodeoxynucleotide of p55PIK inhibiting the proliferation of thyroid carcinoma cells. **Methods:** The lentivirus package system carrying the antisense RNA of p55PIK was constructed. The FTC236 cell was infected by the virus. Western blot and Realtime PCR were used to confirm the protein content and mRNA level of p55PIK. Then MTT assay and BrdU/PI corporation assay were used to analyze the proliferation of stable cells. **Results:** Two stable cell lines, one expressing p55PIK antisense RNA and the other expressing scramble antisense RNA, were constructed, and the p55PIK antisense RNA could knockdown the target protein's expression ($P < 0.01$). In MTT assay, the absorbance ratio of the cells expressing p55PIK antisense RNA is $(59 \pm 19)\%$ of that in the cells expressing scramble antisense. The BrdU/PI corporation assay showed that the DNA synthesize ratio of cells expressing p55PIK antisense RNA decreased by 11.6% compared with that of cells expressing scramble antisense. **Conclusion:** The p55PIK antisense can inhibit proliferation of the thyroid carcinoma cells by knockdown the p55PIK protein expression.

[Key words] p55PIK; lentivirus; antisense RNA; proliferation inhibition

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(6): 790-794]

[基金项目] 国家 973 计划 (2009CB521802); 国家自然科学基金 (30872472, 30973496, 30800569); 湖北省自然科学基金 (2008CDB174, 2009CDB239); 中央高校基本科研业务费专项资金 (2011JC062, 2011JC063); 华中科技大学自主创新基金 (2010MS027)

*通讯作者, E-mail: jbh@tjh.tjmu.edu.cn

磷酸肌醇-3-激酶(PI3K)是对细胞的生长代谢非常重要的酶, 它接受胞外的信号如生长因子、胰岛素等的刺激后活化, 通过对下游一系列蛋白的磷酸化水平的调控来影响细胞的增殖、生存、糖代谢等。近年来的研究显示, PI3K 与多种肿瘤的发生有关^[1-2]。PI3K 含有调节亚基和催化亚基, p55PIK (又命名为 p55 γ) 是新发现的 1 个 I A 型 PI3K 的调节

亚基,它与其他调节亚基的不同之处在于它的 N 末端有 24 个独特而高度保守的氨基酸(N24)^[3]。研究发现通过腺病毒让细胞过表达外源性的 N24 后发现对甲状腺癌细胞 FTC236 有明显的周期阻滞和生长抑制作用^[4-5]。N24 对细胞的生长抑制作用被认为是通过对 p55PIK 的竞争性抑制而发生的,所以本文主要研究 p55PIK 低表达是否也可抑制细胞增殖。

反义 RNA 是指能和 mRNA 完全互补的寡聚核苷酸(oligodeoxynucleotide)片段。其与 mRNA 结合形成了空间位阻效应,呈一种稳定的双链结构,可以阻止核糖体 RNA 与该 mRNA 结合,从而阻止了编码蛋白的翻译过程,另一方面与 mRNA 结合后可以激活内源性 RNA 酶或 ribozyme,也可降解目标 mRNA。本实验通过将 p55PIK 的反义 RNA 用慢病毒 pCDF 包装系统包装成慢病毒,将其感染甲状腺癌 FTC236 细胞并观察对细胞增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

甲状腺癌 FTC236 细胞为美国 Johns Hopkins 大学夏献民博士馈赠。DMEM 培养基及胎牛血清(Hyclone 公司,美国);转染试剂 lipofectamine2000、OPTI-MEM(Invitrogen 公司,美国);慢病毒载体质粒 pCDF、pFIV、pVSVG(SBI 公司,美国);限制性内切酶及 T4 连接酶(NEB 公司,美国);p55PIK 抗体、GAPDH 抗体和 BrdU 一抗(Santa Cruz 公司,美国);四甲基偶氮唑盐(MTT)试剂盒(武汉启动子公司);HRP 标记的二抗和 ECL 显色液(Thermo 公司,美国);BrdU 化合物(Sigma 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 反义序列质粒的构建

反义 p55PIK 设计的引物为上游 5'-CG-GAATTCATGTACAATACGGTGTGGAGTA-3',下游 5'-TCCCCCGGGTTATCTGCAAAGCGAGGG-3',PCR 产物为 p55PIK 的 mRNA,全长 1 386 bp。设计所选择的酶切位点使 p55PIK 扩增片段的 N 端与质粒 pCDF 的 C 端以 *EcoR* I 相连,末尾 C 端反向与质粒 pCDF 的 N 端以 *Sma* I 相连,这样便使插入到 pCDF 质粒的片段为编码链与互补链互换的 p55PIK 序列。随机对照反义 RNA 为向 pCDF 质粒中插入一段短链 5'-AATTGTGTTAGCCCCCTC-3'。设计好后采用 PCR 法从已有的质粒模板 pCDNA3.1-p55PIK-myc 中扩增出 p55PIK 的全长后,并用 *EcoR* I 和

Sma I 双酶切并回收,用 T4 连接酶将回收的目的片段与同样双酶切后回收的 pCDF 质粒连接过夜得到连接产物。取连接产物 5 μ l 转化 100 μ l 感受态细菌 DH5 α ,37 $^{\circ}$ C 过夜生长,挑出单克隆菌落,扩增后送测序,确定构建质粒序列正确后,将质粒大量提取纯化备用。

1.2.2 慢病毒包装及感染靶细胞

根据 pCDF 包装系统慢病毒包装说明书,将 3 种质粒按比例共转染 293FT 细胞:取 11 μ g 的 pCDF-antisense-p55PIK、4 μ g 的 pFIV 和 7 μ g 的 pVSVG 加入至含 1.5 ml 的 OPTI-MEM 的 Eppendorf 离心管(以下简称 EP 管)中,另取 30 μ l 的 lipofectamine2000 加入含有 1.5 ml 的 OPTI-MEM 的 EP 管中。5 min 后将 2 个 EP 管液体混合成 3 ml 在室温下孵育 20 min 后加入到 10 cm 培养皿中的 293FT 细胞中,4 h 后换液。转染 24-48 h 后在荧光显微镜下观察,待 293FT 细胞呈 95%绿色荧光时,收集上清,0.45 μ m 滤器过滤后得到病毒上清,用 Beckman 低温超速离心机离心,4 $^{\circ}$ C、25 000 r/min 离心 2 h,去上清,PBS 稀释后测病毒滴度。滴度的测定依照文献^[6]的方法。将病毒依照滴度测定的量感染 FTC236 细胞 3 次并定期在荧光显微镜下观察,当细胞均出现绿色荧光后即得到稳定的细胞株可用于下一步实验。

1.2.3 Western blot

收集细胞沉淀,用含有 1 mmol/L PMSF 的 NP-40 裂解液裂解,置于冰上裂解 10 min 后转至低温离心机在 4 $^{\circ}$ C 条件下以 12 000 r/min 离心 10 min,将上清转移至另一干净 EP 管中。每个上清样品取 5 μ l 用 BCA 法测定蛋白浓度。其余上清加入 1/4 体积的 5 \times SDS 上样缓冲液,在沸水中煮 8 min 使蛋白变性。制备 10%的 SDS-PAGE 凝胶,将变性后的蛋白样本点样,以 50 V 的电压电泳 30 min 后换成 100 V 继续电泳 1.5 h。其后使用 PVDF 膜以 350 mA 恒流转膜 1.5 h。将转印好的 PVDF 膜用 5%脱脂奶粉/TBST 封闭 1 h 后,用一抗(p55PIK 和 GAPDH)4 $^{\circ}$ C 封闭过夜,次日将膜取出,用 TBST 洗 3 遍,每次 5 min,用二抗(p55PIK 的二抗为 HRP-兔抗羊,GAPDH 的二抗为 HRP-羊抗鼠)室温孵育 2 h。再用 TBST 洗 3 次,使用 ECL 化学发光法检测目的条带,发光显影使用 Cell Biosciences 公司的 FluorChem-FC2 成像仪得到图像。

1.2.4 Real-time PCR

实时定量所使用 PCR 仪器型号为 ABI7300,设计的 p55PIK 的 Real-time PCR 引物序列为上游 5'-

ATGTACAATACGGTGTGGAGTATG-3', 下游为 5'-GCTGGAGGATCCATTTCAAT-3', 扩增片段长度 107 bp, GAPDH 的 Real-time 引物序列为上游 5'-GAGA-GACCCTCACTGCTG-3', 下游为 5'-GATGGTACAT-GACAAGGTGC-3', 扩增片段长度 135 bp。PCR 设定程序为 50°C 2 min, 95°C 10 min, 40 个循环(95°C 15 s, 60°C 1 min)后, 95°C 15 s, 60°C 15 s, 95°C 15 s, 检测熔解曲线。

1.2.5 MTT 法检测细胞增殖

常规 0.25% 胰酶消化收集细胞, 按每孔 5×10^3 个细胞数接种于 96 孔板, 置于 37°C、5% CO₂ 培养箱培养 72 h 后, 每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml, PBS 溶解)10 μ l 孵育 4 h 后, 弃去培养基上清, 每孔加 DMSO 150 μ l, 置于摇床上振荡, 约 15 min 后结晶完全溶解, 用酶标仪在 490 nm 波长处测吸光度值。两组各设 8 个复孔, 实验重复 3 次。

1.2.6 BrdU 掺入法测定细胞 DNA 合成

取对数期生长期的细胞, 加入 BrdU(终浓度为 30 μ g/L), 继续在 37°C 培养箱培养 30 min 后, 弃去培养基, PBS 洗 1 遍后用 0.25% 胰酶消化成单细胞悬液并离心, 将得到的细胞沉淀再次用 PBS 洗 1 遍后离心, 用 80% 冰乙醇固定置于 -20°C 过夜。次日将细胞取出, 离心弃去乙醇, PBS 洗 1 遍后, 用 2 mol/L 的 HCl 作用 40 min 后离心弃去 HCl。其后加入 0.1 mol/L 硼酸中和 1 min 后离心弃去硼酸并用 PBS-T(含 0.2% Tween-20)洗 2 遍。加入鼠单抗 BrdU 的抗体置于 4°C 约 1 h, 间歇振荡。PBS-T 洗 2 遍后, 用 FITC-羊抗小鼠二抗孵育 30 min 后再次用 PBS-T 洗 2 遍。最后将细胞沉淀用 100 μ l 的 PBS 重悬后, 加入 10 μ l 的 PI (0.5 mg/ml) 及 5 μ l 的 RNA 酶(0.5 mg/ml)室温避光反应 30 min 后流式细胞仪检测。

1.3 统计学方法

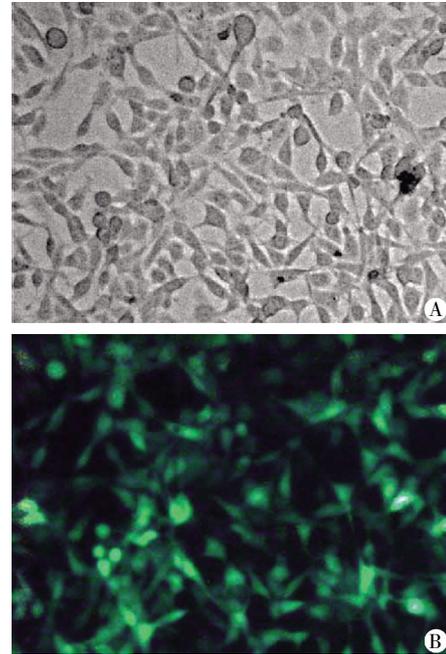
实验结果数值用平均值和标准差表示, 每组实验至少重复 3 次($n \geq 3$), 并采用 SPSS13.0 分析各组数据之间是否有统计学意义。Real-time PCR 结果通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算出组间变化倍数, 结果采用单因素方差分析 Dunnett's C 检验。MTT 和 BrdU 实验检测数据采用单因素方差分析, 进一步的比较则采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 病毒包装及目标靶细胞感染

构建含有 p55PIK 反义序列的质粒载体经测序证明序列正确后, 共转染 293FT 细胞得到含有病毒

的上清液, 测定滴度后感染 FTC236 细胞, 连续感染 3 次后在荧光显微镜下观察感染效率, 约 95% 的细胞带有绿色荧光(图 1)。



A: 同一视野的平光; B: 同一视野的绿色荧光图。

图 1 慢病毒感染效率检测($\times 200$)

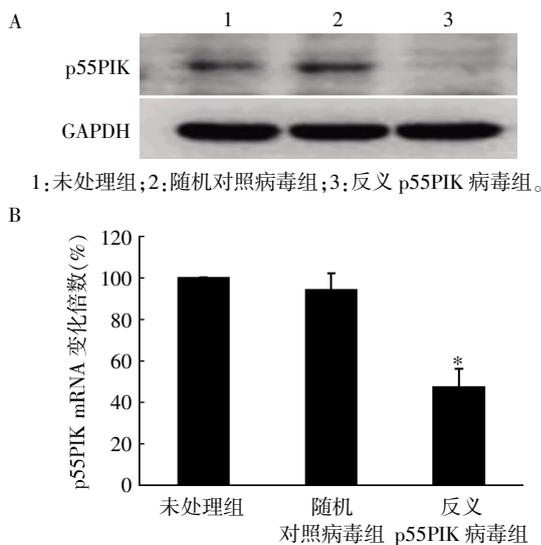
Figure 1 The detection of infection efficiency of lentivirus($\times 200$)

2.2 p55PIK 反义 RNA 细胞株的鉴定

收集未处理组、随机对照病毒组、反义 p55PIK 病毒组细胞, 提细胞总蛋白并定量后用 Western blot 法检测各组细胞的 p55PIK 蛋白表达水平。如图 2A 所示: 反义 p55PIK 病毒组 p55PIK 的蛋白表达水平显著低于未处理组和随机对照病毒组。Real-time PCR 法检测 p55PIK mRNA 表达水平如图 2B 所示: 设未处理组为 100%, 随机对照病毒组为未处理组的 $(94 \pm 7)\%$, 无明显变化 ($P > 0.05, n = 3$), 反义 p55PIK 病毒组为未处理组的 $(47 \pm 8)\%$ ($P < 0.01, n = 3$), 明显降低。上述结果表明反义 p55PIK 慢病毒能够显著降低 FTC236 细胞中 p55PIK 的 mRNA 表达和蛋白表达水平。

2.3 反义 p55PIK 慢病毒对 FTC236 细胞增殖影响

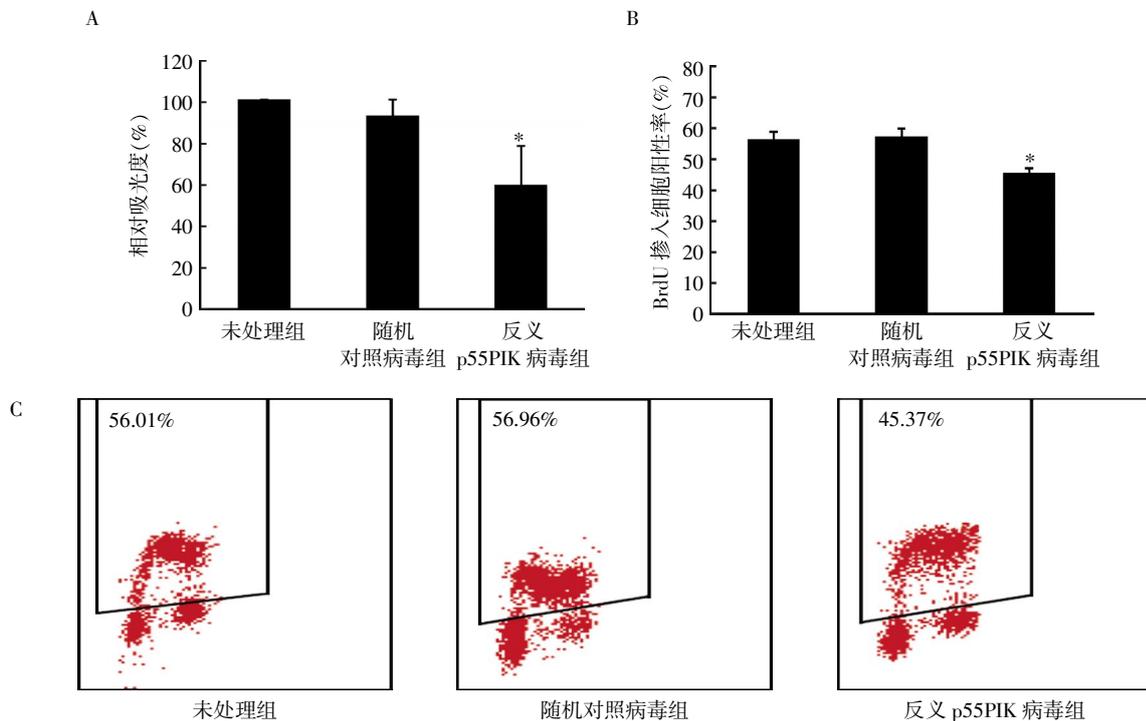
MTT 法检测未处理组、随机对照病毒组和反义 p55PIK 病毒组 3 组细胞的增殖情况, 结果如图 3A 所示, 设定未处理组的吸光度值为 100%, 则随机对照病毒组为未处理组的 $(92 \pm 8)\%$ ($P > 0.05, n = 3$), 无明显变化, 而反义 p55PIK 病毒组则为未处理组细胞的 $(59 \pm 19)\%$ ($P < 0.05, n = 3$), 明显降低, 结果说明反义 p55PIK 慢病毒抑制了 FTC236 细胞



A: Western blot 检测各组细胞 p55PIK 蛋白表达水平; B: Real-time PCR 检测各组细胞 p55PIK 的 mRNA 表达水平。与未处理组比较, * $P < 0.01$ ($n = 3$)。

图 2 反义 p55PIK 慢病毒对 FTC236 细胞内 p55PIK 表达量的影响

Figure 2 The changes of p55PIK expression in FTC236 cells after infected by p55PIK antisense lentivirus



A: MTT 法检测细胞增殖(与未处理组比较, * $P < 0.05$, $n = 3$); B: BrdU 掺入法定量分析(与未处理组比较, * $P < 0.05$, $n = 3$); C: BrdU 掺入法检测 DNA 合成。

图 3 反义 p55PIK 慢病毒对 FTC236 细胞增殖的影响

Figure 3 Effect of p55PIK antisense lentivirus on the proliferation of FTC236 cells

IB 两个亚型,跟肿瘤密切相关的就是 IA 型。IA 型 PI3K 为含有 1 个催化亚基和调节亚基的二聚体蛋白,催化亚基包括 p110 α 、p110 β 、p110 δ ,调节亚基则

的增殖能力。

同时,还用 BrdU 掺入法检测了细胞的 DNA 合成情况,如图 3B、3C 所示;3 组的平均 BrdU 掺入比率分别是:未处理组 56.01%,随机对照病毒组 56.96%,反义 p55PIK 病毒组 45.37%,结果显示反义 p55PIK 病毒组比未处理组下降 10.64% ($P < 0.05$, $n = 3$),比随机对照病毒组下降 11.6% ($P < 0.05$, $n = 3$),而随机对照组和未处理组之间无明显差异 ($P > 0.05$, $n = 3$),说明反义 p55PIK 慢病毒显著降低细胞的 DNA 合成。

3 讨论

肿瘤细胞的一个特征是过度增殖^[7]。抑制肿瘤的生长,减少瘤负荷是目前治疗肿瘤的主要手段之一。肿瘤的失控性生长源于多种基因突变的共同作用,研究表明 PI3K 信号通路对于肿瘤细胞的生长有着至关重要的作用^[8],已有多种针对 PI3K 信号通路的药物处于研究中^[9-10]。PI3K 根据结构可分为 3 类: I 型、II 型、III 型,其中 I 型 PI3K 又分为 IA 和

有 p85 α 、p85 β 、p55 α 、p50 α 、p55 γ 。目前的基因干预多是针对催化亚基 p110 α 和主要的调节亚基 p85 α 、p85 β 。p55 γ 又可命名为 p55PIK,是近年来新发现的

一个IA型PI3K的调节亚基。Hu等^[11]发现高表达p55PIK的N末端短肽竞争性抑制p55PIK后可以有效抑制胃癌细胞增殖。说明p55PIK可能是促进肿瘤细胞增殖的一个重要基因。

反义核酸作为基因治疗药物,具有高度特异性、高效性、低毒安全的优点,是一种优化的药物设计,本质上是应用基因的天然顺序信息^[12-13]。而慢病毒比逆转录病毒和腺病毒载体相比具有更多优势,可感染非分裂期细胞,可实现稳定表达,可容纳大片段DNA等,是相对理想的基因治疗载体^[16]。

本研究构建慢病毒载体将p55PIK的反义RNA导入甲状腺癌FTC236细胞中,同时观察对细胞生长的影响。结果显示,感染了反义p55PIK病毒的FTC236细胞中,p55PIK蛋白表达量明显降低,同时细胞的生长速率减低,3d的相对生长率仅为正常细胞的(59 ± 19)% ($P < 0.05$),而随机对照病毒组变化不大。同时BrdU掺入法检测发现反义p55PIK病毒组的BrdU掺入率比随机对照病毒组下降了11.6% ($P < 0.05$),而随机对照病毒组和未处理组之间无明显差异。增殖实验的结果说明抑制p55PIK的表达可能抑制甲状腺癌FTC236细胞的增殖。

本研究结果说明p55PIK可能是一个促进肿瘤细胞增殖的基因,结合前期的相关研究,它促进增殖的机制可能与其N末端可以和Rb结合进而影响细胞周期的进程有关^[15],而反义p55PIK慢病毒使细胞内p55PIK蛋白量降低从而打断了这个进程。

本研究将基因治疗中相对安全的靶基因反义RNA通过慢病毒系统有效地导入到甲状腺癌细胞系中,抑制了甲状腺癌细胞的增殖,为继续研究p55PIK在肿瘤发生发展中的作用提供了良好的分子干预手段。

[参考文献]

- [1] Almhanna K, Strosberg J, Malafa M. Targeting AKT protein kinase in gastric cancer [J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(12):4387-4392
- [2] Dituri F, Mazzocca A, Antonaci S, et al. PI3K functions in cancer progression, anticancer immunity and immune evasion by tumors [J]. *Clin Dev Immunol*, 2011, 2011: 947858
- [3] Xia XM, Cheng AW, Hamburger AW, et al. The N-terminal 24 amino acids of the p55 gamma regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase binds Rb and induces cell cycle arrest [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(5):1717-1725
- [4] 黄焕军, 胡俊波, 龚建平, 等. p55PIK N末端24个氨基酸抑制甲状腺癌细胞增殖的研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2008, 25(9):1158-1160
- [5] 吕峰, 王桂华, 邓豫, 等. 穿膜融合多肽TAT-N24对S180腹水瘤生长的抑制作用 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2010, 39(3):369-371, 380
- [6] 陈小艳, 张弓, 赵彤, 等. LMP1基因重组慢病毒载体的构建及体外表达 [J]. *南方医科大学学报*, 2009, 29(5):837-840
- [7] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell*, 2011, 144(5):646-674
- [8] Hanai J, Doro N, Sukhatme VP, et al. Inhibition of lung cancer growth: ATP citrate lyase knockdown and statin treatment leads to dual blockade of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT pathways [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(4): 1709-1720
- [9] Phillips PA, Sangwan V, Saluja AK, et al. Myricetin induces pancreatic cancer cell death via the induction of apoptosis and inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway [J]. *Cancer Lett*, 2011, 308(2):181-188
- [10] Chen PS, Shih YW, Cheng HW, et al. Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits migration and invasion of human prostate cancer PC-3 cells by reducing matrix metalloproteinases expression [J]. *PLoS One*, 2011, 6(5):e20164
- [11] Hu J, Liu S, Wang J, et al. Overexpression of the N-terminal end of the p55 gamma regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase blocks cell cycle progression in gastric carcinoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2005, 26(5): 1321-1327
- [12] Popplewell LJ, Malerba A, Dickson G. Optimizing antisense oligonucleotides using phosphorodiamidate morpholino oligomers [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 867:143-167
- [13] Huo X, Ren L, Wang J, et al. Effect of WT1 antisense mRNA on the induction of apoptosis in ovarian carcinoma SKOV3 cells [J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2011, 32(6):651-656
- [14] Maciej Wiznerowicz, Didier Trono, et al. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference [J]. *J Virol*, 2003, 77(16):8957-8961
- [15] Ayhan S, Isisag A, Kucukmetin NT, et al. The role of pRB, p16 and cyclin D1 in colonic carcinogenesis [J]. *Hepatogastroenterology*, 2010, 57(98):251-256

[收稿日期] 2012-01-07