

文章编号:1005-6947(2007)08-0774-04

· 基础研究 ·

靶向 IGFIR 的 siRNA 抑制人肝癌裸鼠移植瘤的实验研究

牛坚¹, 李向农¹, 韩泽广²

(1. 徐州医学院附属医院 普通外科, 江苏 徐州 221004; 2. 国家人类基因组南方研究中心, 上海 201203)

摘要:目的 探讨人胰岛素样生长因子1类受体(IGFIR)干扰质粒(PSUPER-siRNA-IGFIR)对人肝癌细胞株 SMMC7721 裸鼠移植瘤生长的抑制作用。方法 建立人肝癌细胞株 SMMC7721 裸鼠移植瘤模型,将 PSUPER-siRNA-IGFIR 质粒转染入移植瘤中,观察对肿瘤生长的作用。结果 PSUPER-siRNA-IGFIR 对人肝癌细胞株 SMMC7721 裸鼠移植瘤有生长抑制作用。与对照组相比 IGFIR 和 MVD 的表达明显下降。结论 PSUPER-siRNA-IGFIR 能抑制肝癌裸鼠移植瘤的生长。

[中国普通外科杂志,2007,16(8):774-777]

关键词: 肝肿瘤; RNA 干扰; 人胰岛素样生长因子1类受体; 微血管密度; 基因表达; 疾病模型, 动物
中图分类号: R 735.7; R 34-33 **文献标识码:** A

PSUPER-siRNA-IGFIR inhibition of human liver cancer xenograft in nude mice

NIU Jian¹, LI Xiang-Nong¹, HAN Ze-Guang²

(1. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221004, China; 2. Chinese National Human Genome Center, Shanghai 201203, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of PSUPER-siRNA-IGFIR plasmid in inhibiting the growth of human liver cancer cell SMMC7721. **Methods** Cancer xenograft was established by transplanting SMMC7721 cell to nude mice, and the PSUPER-siRNA-IGFIR plasmid was constructed and the graft cancer was treated with PSUPER-siRNA-IGFIR plasmid. The effect on tumor growth was monitored.

Results PSUPER-siRNA-IGFIR plasmid can inhibit the growth of human liver cancer cell SMMC7721. The expression of IGFIR and MVD in human liver cancer cell SMMC7721 was decreased significantly in the gene transfected group as compared to that of control group. **Conclusions** The PSUPER-siRNA-IGFIR plasmid can inhibit the growth of human transfected liver-cancer in nude mice.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(8): 774-777]

Key words: Liver Neoplasma; RNA Interference; Human Insulin Like Growth Factor Receptor 1; MVD; Gene Expression; Disease Models, Animal

CLC number: R 735.7; R 34-33

Document code: A

在细胞周期中,一旦细胞进入 G₁ 期,在其他生长因子缺乏的情况下胰岛素样生长因子1(IGF1)可促使细胞增殖周期完成^[1]。而 IGF1 的活性主要是由 IGF1 受体(IGFIR)所介导;后者在很大程度上决定了细胞增殖状况。IGF1 与肿瘤的发

生、发展、转移密切相关。研究^[2-3]表明 IGFIR 在某些恶性肿瘤中有高表达。双链 RNA(dsRNA)可以特异性地诱导与之同源的內源信使核糖核酸(mRNAs)降解,从而特异性地使相应基因表达沉默。此现象称为 RNA 干扰(RNAi)。siRNA 为研究未知功能的基因提供了新的反向遗传学手段,同时在人类基因治疗方面具有潜在的应用价值。本研究采用 PSUPER-siRNA-IGFIR 质粒对人肝癌裸鼠移植瘤进行治疗研究,以探讨对肝癌治疗的新方法。

收稿日期:2007-03-16; **修订日期:**2007-08-13。

作者简介:牛坚,男,江苏连云港人,徐州医学院附属医院主治医师,主要从事肝胆外科方面的研究。

通讯作者:牛坚 E-mail:njn_001@163.com

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 BALB/C 裸小鼠 18 只由中科院上海实验动物中心提供。鼠龄 4~6 周,体重 18~20 g,雌雄共用,在无特殊病原 (specific-Pathogen free, SPF) 条件下饲养。

1.1.2 主要试剂 脂质体 (lipofectamin2000) 购自 Invitrogen 公司;兔抗人 IGFIR 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;兔抗人 VIII 因子相关抗原抗体购自 DAKO 公司;HistostainTM-SP (链霉卵白素-过氧化物酶) 免疫组织化学 (免疫组化) 试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。

1.1.3 其他材料 PSUPER-siRNA-IGFIR 质粒、对照质粒 PSUPER-IGFIR-mutation 和人肝癌细胞株 SMMC7721 由国家人类基因组南方研究中心提供^[4]。

1.2 实验方 法

1.2.1 移植瘤裸鼠模型的建立 待 SMMC7721 细胞长至对数生长期 (50%~70%),用 1% 胰酶消化;收集培养的 SMMC7721 细胞 5×10^7 ,以 1 000r/min 离心 5 min;弃上清液,无血清 DMEM 洗涤细胞,再次离心;加少许无血清 DMEM 洗液将细胞混匀,总体积至 1 mL。取上述备好的 SMMC7721 细胞悬液 0.1 mL,用微量注射器注射至裸鼠腹部的前肢皮下。待肿瘤长至 3.0 mm × 4.0 mm × 3.5 mm ~ 3.5 mm × 4.2 mm × 5.0 mm 时用于下一步实验。

1.2.2 动物分组和处理 将已证实成功建立模型的裸小鼠 18 只随机分为 3 组,每组 5 只,另每组多设动物 1 只,以备意外死亡时补充。IGFIR-siRNA 治疗组 (5 只):瘤体内多点注射脂质体包裹的 PSUPER-siRNA-IGFIR 质粒,剂量为 8 μg/kg;空白对照组 (5 只):多点注射脂质体包裹的 PSUPER-IGFIR-mutation 质粒,剂量为 8 μg/kg;脂质体对照组 (5 只):多点注射等容积空白脂质体,均每天 1 次,共连续 7 d。治疗结束后,在第 8 天处死动物,检测实验指标。

1.2.3 逆转录-多聚酶链反应 (RT-PCR) 检测 IGFIR 基因表达 Trizol 法提取各组细胞的总 RNA 逆转录反应使用随机引物 OligdT s 合成第一链 (严格按厂家说明书进行),在 20 μL 反应体系中加入 2 μg 总 RNA。PCR 引物序列如下:IGFIR,上游为 5'-GGAGGCTGAATACCGCAAAGTC-3';下游为 5'-AAAGACGAAGTTGGAGCGCT-3';扩增产物为 245 bp;内参照 - actin,上游为 5'-GTGAAG-GTGACAGCAGTCGGTT-3';下游为 5'-CAGTGTA-CAGGTAAGCCCTG-3'。退火温度均为 55℃。在同一条件下,每次 PCR 以 -actin 为内参照。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪扫描成像,表达丰度以特异基因条带亮度与内参照的比值表示。

1.2.4 免疫印迹 (Western-blot) 检测细胞 IGFIR 蛋白的变化 取 40 μg 细胞裂解液与上样缓冲液混合,煮沸 10 min 后上样,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳条件:60V,30 min;160V,1.5 h。电泳结束后,电转移法将蛋白从凝胶中转移至膜上,甲醇固定 PVDF 膜后,用含 5% 脱脂奶粉的封闭液于 40℃ 孵育过夜。一抗 10 mL (1:1 000 稀释) 室温孵育 2 h,二抗 10 mL (1:5 000 稀释) 室温孵育 2 h 后,PVDF 膜用 ECL 化学发光试剂盒处理并在暗室显影。

1.2.5 肿瘤的生长指数 处死动物后,进行详细的解剖学检查,大体观察移植瘤的生长状况及周围脏器受累情况。测量肿瘤 a 径和 b 径。以 $V = ab^2/2$ 计算肿瘤的体积,肿瘤生长指数 = V 治疗前/ V 治疗后 × 100%。

1.2.6 瘤组织 HE 染色 拉颈处死裸鼠后,剪开肿瘤表皮,切下肿瘤置于纸板上;用双面刀片切取瘤体成 1 cm × 1 cm 大小的组织块,浸入 4% 多聚甲醛内固定 24 h。标本经脱水、透明、浸蜡、包埋后切片;切片经二甲苯脱蜡 (10 min × 2) 后置入无水乙醇中 10 min;浸入苏木精 5~10 min 后自来水浸洗;稀盐酸 + 乙醇溶液分色数秒;自来水浸洗;淡氨水中胞核蓝化 3~5 min;70%,80%,90% 乙醇 10 min 浸洗各 1 次;伊红染色 10 min;95% 乙醇浸 2 次,100% 乙醇浸 1 次,各 5 min;二甲苯 10 min × 3 次;树脂封片。

1.2.7 免疫组化 S-P 法检测瘤组织内微血管 (MVD) 的表达 MVD 检测参照 Weidner^[5] 报道的方法,用免疫组化法抗 VIII 因子相关抗原单克隆抗体染色标记血管内皮细胞,计算肿瘤内着色的微血管。用计算机辅助图象分析系统以 5 个随机 200 倍视野血管的均数表示该组织的 MVD。

1.3 统计学处理

测定值以均数 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 Fisher,s 确切概率法,方差分析进行假设检验。 $P < 0.05$ 差异有显著性。

2 结 果

2.1 移植瘤组织内 IGFIR mRNA 的表达

移植瘤组织 RT-PCR 产物经电泳,可见一特异性条带。SMMC7721-IGFIR-siRNA 中 IGFIR 的表达较对照组 SMMC7721 和 SMMC7721-IGFIR-mutation 明显减低;经灰度扫描及与内参照比较,SMMC7721-IGFIR-siRNA 的 IGFIR mRNA 的表达量仅为空白对照组和脂质对照组的 12%,10% ($P < 0.05$) 和 13%,15% ($P < 0.05$) (图 1),表明针对 IGFIR 的 siRNA 能干扰 IGFIR mRNA 的表达。

2.2 移植瘤组织内 IGFIR 蛋白的表达

干扰组 SMMC7721-IGFIR-siRNA 中 IGFIR 的表达明显低于对照组,经灰度扫描分析,其蛋白表达

量为空白对照组和脂质对照组的 28% , 27% ($P < 0.05$) 和 12% , 13% ($P < 0.05$) (图 2)。

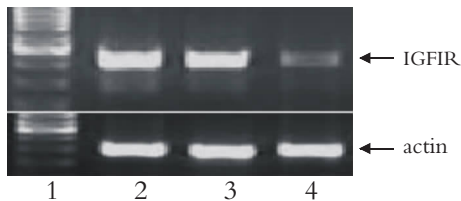


图 1 RT-PCR 检测 SMMC7721 干扰前后 IGFIRmRNA 的表达 1:100 bp Marker; 2:SMMC7721; 3:SMMC7721-IGFIR-mutation; 4:SMMC7721-IGFIR-siRNA

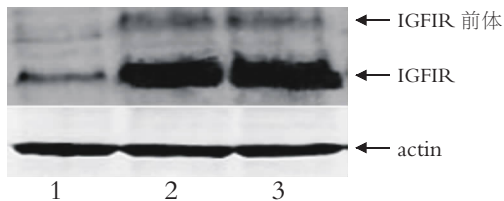


图 2 Western-blot 检测 SMMC7721 干扰前后 IGFIR 蛋白的表达 1:SMMC7721-IGFIR-siRNA; 2:SMMC7721; 3:SMMC7721-IGFIR-mutation

2.3 肿瘤的生长指数

IGFIR-siRNA 治疗组与空白对照组和脂质体对照组相比,其肿瘤生长指数显著降低,生长明显受抑 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 各组肿瘤的生长指数

组别	动物数	原位肿瘤的体积(mm^3)		生长指数(%)
		$V_{\text{治疗前}}$	$V_{\text{治疗后}}$	$V_{\text{治疗后}}/V_{\text{治疗前}}$
空白对照	5	91.47 ± 4.41	290.43 ± 7.29 [†]	330 ± 28.7 [†]
脂质体对照	5	92.75 ± 5.78	292.93 ± 10.1 [†]	322 ± 33.9 [†]
治疗组	5	91.3 ± 3.84	105.43 ± 6.8	108 ± 11.2

注:† 与治疗组相比, $P < 0.05$

2.4 瘤组织 HE 染色

空白对照组及脂质对照组癌组织形态:细胞体积大、胞浆丰富、核/浆比例大、染色深、可见巨核细胞、有丝分裂多见、癌巢大、细胞丰富、排列紧密、间质稀少、血窦丰富,结节外部分有极薄层结缔组织被膜与周围的正常组织分隔,但包膜多不完整。SMMC7721-IGFIR-siRNA 组癌组织的形态:细胞较少、细胞分界清、癌巢小、间质丰富、血窦稀少,并可见散在的部分细胞核与浆呈固缩坏死样改变,不伴炎症反应,结节的纤维包裹明显且完整(图 3)。

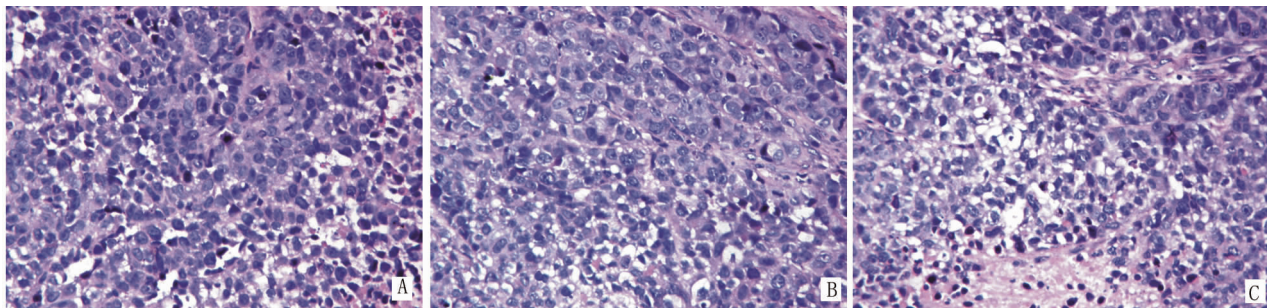


图 3 3 组裸鼠皮下移植瘤组织形态(HE × 200) A:SMMC7721; B:SMMC7721-IGFIR-突变; C:SMMC7721-IGFIR-siRNA

2.5 微血管密度(MVD)

癌组织内微血管分布呈异质性,不同区域的微血管计数不同,形态不规则,部分血管无明显管腔,部分呈发芽状(图 4)。对照组 MVD 明显高于实验组。组间差异有显著性 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 各组肿瘤组织的 MVD 记数

动物分组	动物数	MVD 记数
空白对照	5	36.7 ± 7.6
脂质体对照	5	28.4 ± 6.5
siRNA 治疗	5	11.3 ± 3.3

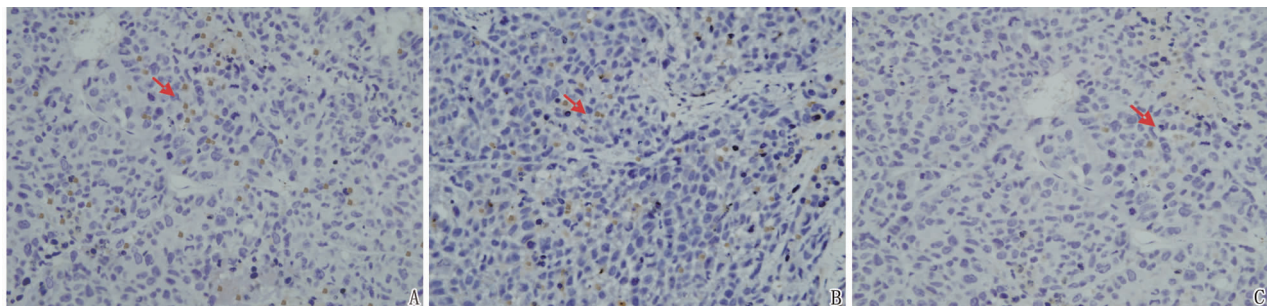


图 4 各组移植瘤组织中 MVD (红色箭头表示新生微血管) (S-P × 200) A:SMMC7721; B:SMMC7721-IGFIR-mutation; C:SMMC7721-IGFIR-siRNA

3 讨论

裸鼠皮下移植瘤模型是常用的一种肿瘤实验研究模型。它具有移植方法简便、移植后潜伏期短、易于直接观察等优点;且同一动物肿瘤在生长的不同时间其体积测量也极为方便,因而在肿瘤研究中得以广泛应用。故本实验选择了该模型研究体内 IGFIR-siRNA 转染阻断 IGFIR 的表达对肿瘤细胞一般生物学特性的影响。

本研究结果发现,IGFIR-siRNA 阻断 IGFIR 表达后,SMMC7721 肝癌细胞移植瘤在裸鼠皮下的生长受到显著抑制;与 2 个对照组相比,其瘤组织纤维包裹显著而完整,间质丰富。且瘤组织中血窦形成明显少于对照组,表明 IGFIR-siRNA 转染可能还与抑制肿瘤血管生成相关。病理性血管形成在癌的生长和转移过程中是一个非常重要的事件,其与肿瘤发展的阶段和血管侵袭密切相关。血管生成不仅是原位瘤生长所必需,也是肿瘤转移灶形成的前提。实体肿瘤的发展可分为血管形成前期和血管形成期。在血管形成前期,肿瘤无诱导血管形成的能力,且肿瘤的体积也有限。但肿瘤细胞会分泌血管形成因子来诱发新血管的形成,从而满足肿瘤继续增殖所需的氧和营养物质的需要。新生血管形成往往与癌转移程度呈正相关。肿瘤组织的 MVD 测定是反应肿瘤血管形成的一项有效方法,并可作为预后的独立指标。本研究结果显示 IGFIR-siRNA 转染均显著抑制 MVD 的表达。说明 IGFIR-siRNA 对肿瘤血管形成起着显著的抑制作用。

IGFIR-siRNA 转染的 SMMC7721 肝癌细胞株在裸鼠皮下生长被受到抑制,以及与肿瘤细胞侵袭性密切相关的 MVD 表达的降低,表明 IGFIR 表达阻断使肝癌细胞在体内的侵袭能力受到明显抑制。

IGFIR 在恶性肿瘤中有选择性表达的特性,使其可望成为肿瘤治疗的有效靶点^[6-7]。Resnicoff 等^[8]认为,体内细胞凋亡程度与 IGFIR 数量减少有关,肿瘤的发生严格依赖于细胞逃逸凋亡的数量,IGFIR 数量减少可诱导凋亡。实验显示在将成纤维细胞置于大鼠皮下的生物扩散时,细胞逐渐凋亡,而过表达 IGFIR 的成纤维细胞及受体表达增加的肿瘤起源细胞的生存时间显著延长^[8]。此外研究^[6]还表明 IGFIR 的数量在细胞生存中起

着决定性作用;只有达到某一水平,才能将细胞由不进行有丝分裂的模式转化为有丝分裂模式。据报道,在无血清基质中细胞 IGFIR 数目低于 15 000,补充 IGF1 亦无细胞生长;当受体数目为 15 000 ~ 30 000 时,一旦有 IGF1 细胞便会生长。当受体数目为 30 000 时,细胞则可在软琼脂上生长,表明细胞转化能力已提高^[8]。实验表明以 IGFIR 为靶点是合理而行之有效的。笔者^[4]也证实了在体外用 IGFIR-siRNA 转染 IGFIR 表达阳性的肝癌细胞株 SMMC7721 后,抑制细胞增殖。本文在裸鼠体内建立皮下移植肝癌模型,证实 IGFIR-siRNA 可下调肿瘤组织 IGFIR 蛋白表达,抑制肿瘤生长。理想的人类肿瘤动物移植模型的建立是研究肿瘤生物学和抗肿瘤实验治疗的重要工具。本实验模型的成功率达 100%,为后续原位肿瘤模型实验奠定了良好基础。

参考文献:

- [1] Russell WE, Van Wyk JJ, Pledger WJ, *et al.* Inhibition of the mitogenic effect of plasma by amonoclonal antibody to somatomedin C [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81 (8): 2389 - 2393.
- [2] Valentinis B, Baserga R. IGF1 receptor signalling in transformation and differentiation [J]. *Mol Pathol*, 2001, 54 (3): 133 - 137.
- [3] Hellowell GO, Turner GD, Davies DR, *et al.* Expression of the type insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease [J]. *Cancer Res*, 2002, 62 (10): 2942 - 2950.
- [4] 牛坚,黄健,韩泽广,等. RNA 干涉胰岛素样生长因子 1 类受体的研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 23 (7): 872 - 873.
- [5] Weidner N. Intratumor microvessel density as prognostic factor in cancer [J]. *Am J Pathol*, 1995, 147(1): 9 - 13.
- [6] Valentinis B, Baserga R. IGF1 receptor signalling in transformation and differentiation [J]. *Mol Pathol*, 2001, 54 (3): 133 - 137.
- [7] Hellowell GO, Turner GD, Davies DR, *et al.* Expression of the type insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease [J]. *Cancer Res*, 2002, 62 (10): 2942 - 2950.
- [8] Resnicoff M, Burgaud JL, Rotman HL, *et al.* Correlation between apoptosis, tumorigenesis, and levels of insulin like growth factor 1 receptors [J]. *Cancer Res*, 1995, 55 (17): 3739 - 3741.