



·论 著·

siRNA 靶向抑制 SW480 细胞 GHR 表达的效果观察*

李 卫 卢先州 王 松 陈诗怡 (南华大学附属南华医院 普通外科 湖南衡阳 421002)

摘要:目的 观察 siRNA 靶向抑制结直肠癌 SW480 细胞 ghR (人生长素受体) 表达的效果。方法 获取 SW480 细胞 ghR 的总 Rna 片段后, 利用 siRNA 技术靶向抑制不同位点基因表达情况, 体外合成 ghR 无序无意义片段、hoMo-471、hoMo-944、hoMo-1172 和 hoMo-2076 片段, 以 Western Blot 法测定各片段中 ghR 蛋白水平, 以 q-PCR 法检测 ghR 基因表达情况。结果 hoMo-471 片段中 ghR 蛋白 (OD=0.39)、mRna (0.20 ± 0.02) 均明显低于其他片段 ($P < 0.05$)。结论 siRNA 靶向抑制 ghR 基因表达能够降低结直肠癌细胞中的 ghR 蛋白和 mRna 表达, 其抑制效果最佳片段可能是 hoMo-471。

关键词: 结直肠癌 siRNA 技术 人生长素受体

*基金编号: 湖南省教育厅科学研究基金项目 (No: 13C831)

中图分类号: R632.6

文献标识码: A

文章编号: 1009-5187 (2017) 13-038-01

结直肠癌具有恶性度高、转移率高、扩散容易的特点, 随着基因技术发展, 通过干预癌基因表达或沉默达到抗肿瘤治疗目的越来越受到关注。人生长素受体 (GHR) 作为公认的促癌因子, 其在癌症发生、转移等恶化进程中有促进作用, 因此, GHR 基因沉默可能会产生抑癌作用, 但是目前临床相关研究仍比较缺乏。本文通过分析 GHR 不同位点基因沉默对 SW480 细胞 GHR 表达水平的影响, 旨在初步分析, 靶向干扰 GHR 基因沉默的抗肿瘤治疗价值。

1 资料和方法

1.1 实验材料。

1.1.1 实验细胞结直肠癌 SW480 细胞。

1.1.2 主要试剂和设备细胞培养瓶 (美国 FALCON); 96 孔板 (美国 CI 公司); CCK-8 试剂 (日本同仁化工); 凝胶电泳、Western Blotting 试剂 (南京凯基生物); 超净工作台 (苏州净化); 倒置显微镜 (日本奥林巴斯); 酶标仪 (美国 BioTek); 电泳仪 (美国 BR 公司); 凝胶成像分析系统 (Wealtec 公司)。

1.2 实验方法。体外细胞培养并制成细胞悬液之后, 在培养液中完成传代培养,

在细胞覆盖率在 80%-90% 之间是, 加胰蛋白酶消化后重悬细胞继续培养[1-3], 取细胞样本提纯 RNA, 进行 siRNA 靶向干预, 根据干预片段分别合成无序无意义片段 (control 组)、HOMO-471 (siRNA1 组)、HOMO-944 (siRNA2 组)、HOMO-1172 (siRNA3 组) 和 HOMO-2076 (siRNA4 组), 将上述片段分别进行 GHR siRNA 转染 GHR-siRNA 片段 (依次为 control 组、GHR-siRNA1 组、GHR-siRNA2 组、GHR-siRNA3 组、GHR-siRNA4 组), 为转染 siRNA 片段设为 NC 组, 内参照物取 GAPDH。

1.3 观察指标。Western Blot 检测 GHR 蛋白表达水平, 分析软件为 GelPro32。Rt-PCR 法检测基因表达, GAPDH 是内参物, 反应过程共 40 个循环。

1.4 统计学分析。用 SPSS 18.0 分析实验数据, 组间计量结果两两比较用 LSD-T, $P < 0.05$, 差异有统计学意义。

2. 结果

2.1 组间 GHR 蛋白比较。Control 组 OD/Actin 为 1.05, NC 组 OD/Actin 为 0.87, siRNA1 组 OD/Actin 为 0.39, siRNA2 组 OD/Actin 为 0.61, siRNA3 组 OD/Actin 为 0.98, siRNA4 组 OD/Actin 为 0.85, siRNA1 组 OD/Actin 与其他组相比, 差异显著 ($P < 0.05$)。

第一作者: 李卫, 男, (1979--) 副教授, 副主任医师, 主要从事肝胆胃肠肿瘤研究。

2.2 组间 GHRmRNA 比较 Control 组 mRNA 为 (1.00 ± 0.07), NC 组 mRNA 为 (0.98 ± 0.02), siRNA1 组 mRNA 为 (0.20 ± 0.02), siRNA2 组 mRNA 为 (0.46 ± 0.05), siRNA3 组 mRNA 为 (1.31 ± 0.07), siRNA4 组 mRNA 为 (0.79 ± 0.04), siRNA1 组 OD/Actin 与其他组相比, 差异显著 ($P < 0.05$)。

3. 讨论

基因学研究证实消化道肿瘤与癌基因表达或沉默有重要关系, 癌相关基因异常突变是肿瘤发生重要机制之一[1-2]。GHR 是体内重要的影响细胞增殖、生长、分化的因子, 其在体内发挥作用的途径主要是通过 GHR 靶向结合。杨小东等[3]发现结直肠癌 GHR 以过表达为主, GHR 越高往往预后不良。郑立平等[4]发现结直肠癌 GH、GHR 均异常升高, 且二者表达量能够反应肿瘤分期和分化情况。周东等[5]发现利用 siRNA 对人结直肠癌细胞进行基因靶向感染, 能够降低癌细胞内 GHR 水平。本院先期研究发现证实 siRNA 能够对 SW480 细胞基因表达进行靶向干预, 其靶向抑制作用能干扰细胞增殖过程。虽然上述证实了 GHR 对于结直肠进展的影响, 并初步验证了 siRNA 靶向干扰 GHR 表达具有抑制癌细胞增殖的效果, 但是目前仍未见关于确定最佳干预基因片段的研究。本实验中发现 siRNA 靶向抑制不同 GHR 片段, 细胞组织中的 GHR 蛋白和 mRNA 有明显不同, 其中干扰 HOMO-471 沉默能够降低 GHR 表达效果最显著, 说明 siRNA 靶向抑制不同 GHR 基因片段所产生的 GHR 抑制效果不完全抑制, HOMO-471 是抑制 GHR 表达的最佳片段。综上所述, siRNA 靶向抑制 GHR 的 HOMO-471 位点, 能够显著抑制癌细胞 GHR 表达, 其可能是结直肠癌最佳抗肿瘤靶点之一。

参考文献

- [1]张静, 沈淑萍, 居红格. EGFR 基因在消化道肿瘤中的研究进展[J]. 包头医学院学报, 2012, 28 (4): 125-126.
- [2]常江, 林东昕. 我国肿瘤遗传易感性研究进展[J]. 癌变畸变突变, 2015, 27 (5): 329-331.
- [3]杨小冬, 黄平, 王锋, 等. 结直肠癌患者预后相关因素分析[J]. 江苏医药, 2010, 36 (24): 2903-2906.
- [4]郑立平, 钟征翔, 王晓光, 等. 生长激素及其受体在结直肠癌中的表达及临床意义[J]. 安徽医药, 2016, 20 (2): 300-303.
- [5]周东, 张毅, 梁道明, 等. siRNA 靶向抑制 GHR 对人结肠癌 SW480 细胞增殖的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2011, 20 (9): 945-950.