

siRNA 沉默 HER2 对人胰腺癌细胞 PANC-1 侵袭能力的影响

公伟¹ 梁飞² 刘军¹ 李春友¹ 杨凤辉¹ 郑顺贞¹ 李光兵¹

山东大学附属省立医院 ¹器官移植、肝胆外二科 ²乳腺甲状腺外科 (山东 济南 250021)

【摘要】目的: 探讨慢病毒介导的 siRNA 沉默 HER2 对人胰腺癌细胞株 PANC-1 侵袭能力的影响。方法: 运用 HER2 基因小干扰 RNA(siRNA)的重组慢病毒稳定转染 PANC-1 细胞, 荧光定量 RT-PCR 和 Western blotting 观察 HER2 mRNA 和蛋白表达的改变, 体外侵袭实验检测细胞侵袭能力的变化。结果: HER2 基因小干扰 RNA 的重组慢病毒稳定转染 PANC-1 细胞可显著抑制 HER2 mRNA 和蛋白表达; 体外侵袭实验显示 siRNA 沉默 HER2 后, PANC-1 细胞侵袭能力明显下降。结论: HER2 基因小干扰 RNA 的重组慢病毒能有效抑制 HER2 的表达, 抑制胰腺癌细胞体外侵袭能力。siRNA 沉默 HER2 可能为预防和治疗胰腺癌的侵袭转移提供一种新的策略。

【关键词】胰腺肿瘤·RNA 干扰·HER2·侵袭

【中图分类号】R735.9

【文献标识码】A doi:10.3969/j.issn.1009-9905.2014.09.003

【文章编号】1009-9905(2014)09-0678-05

Effect of siRNA-mediated HER2 gene silencing on the invasiveness of human pancreatic cancer PANC-1 cell

GONG Wei¹, LIANG Fei², LIU Jun¹, LI Chun-you¹, YANG Feng-hui¹, ZHENG Shun-zhen¹, LI Guang-bing¹

¹Department of Organ Transplantation and Second Hepatobiliary Surgery, ²Department of Mammary Gland Thyroid Surgery, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University(Jinan 250021, China)

【ABSTRACT】 **Objective:** To investigate the effect of siRNA-mediated HER2 gene silencing on the invasiveness of human pancreatic cancer PANC-1 cell. **Methods:** The lentivirus of small interference RNA targeting HER2 gene was stably transfected to PANC-1 cell. HER2 mRNA and protein expression were examined using fluorescence quantitative PCR and Western blotting respectively.

【基金项目】 山东省医药卫生科技发展计划(2009HW064)

【作者简介】 公伟(1975-04~),男,博士,副主任医师,研究方向:肝胆外科、肝脏移植。E-mail:gongwei75@126.com

【通讯作者】 刘军(1967-02~),男,博士后,主任医师,教授,研究方向:肝胆外科、肝脏移植。E-mail:doctor_liujun@hotmail.com

The invasion ability of PANC-1 cell was determined by cell invasion assay in vitro. **Results:** mRNA and protein expression of HER2 were inhibited significantly by stable transfection of the lentivirus of siRNA targeting HER2 gene. HER2 silence with siRNA significantly inhibited the invasion ability of PANC-1 cell. **Conclusion:** HER2 silence with siRNA significantly inhibits the expression of HER2 and the invasion ability of pancreatic cancer PANC-1 cell.

[KEY WORDS] Pancreatic cancer•RNA interference•Invasion•Metastasis

HER2 是由 HER2/neu 基因编码的一种酪氨酸蛋白激酶,具有自动磷酸化作用,属表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)家族,与肿瘤的发生、转移、肿瘤血管形成等有关,人类胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌及胃腺癌等恶性肿瘤存在 HER2 过表达。本研究利用慢病毒介导的 RNA 干扰方法,沉默胰腺癌细胞株 PANC-1 中 HER2 的表达,观察其对 PANC-1 细胞体外侵袭能力的影响,旨在为防治胰腺癌的侵袭转移提供一种新的策略。

1 材料和方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞系 PANC-1 为本室保存,DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Hyclone 公司。Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司,M-MLV 逆转录酶、dNTPs、oligo dT、Rnase Inhibitor 购自 Promega 公司,PCR 引物由上海吉凯基因化学技术有限公司合成,荧光定量 PCR 仪为 TAKARA 公司 TP800。兔抗人 HER2 多克隆抗体购自美国 Immunoway 公司,小鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)的 HER2 小干扰 RNA(siRNA)的重组慢病毒 HER2-RNAi-Lv 由上海吉凯基因化学技术有限公司筛选构建,由上海美孚生物技术有限公司测序,病毒滴度为 2×10^9 TU/mL。HER2 的 shRNA 靶序列:5'-TCTCTGCGGTGGTTGCCATTC-3'。细胞侵袭测定试剂盒购自美国 Chemicon 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组慢病毒转导胰腺癌 PANC-1 细胞 接种胰腺癌 PANC-1 细胞于 6 孔板,每孔 5×10^5 细胞。实验分空白对照组(CON 组)、慢病毒阴性对照组(NC 组)及干扰慢病毒 HER2-RNAi-LV 组(KD 组)3 组。培养 24 h,待细胞密度达 30%~50%时弃培养液,用 HER2-RNAi-LV 以 MOI 为 20 感染 PANC-1 细胞,添加 polybrene 终浓度为 $8 \mu\text{g/mL}$,12 h 后更换含 10%胎牛血清的培养基继续培养。72 h 后用荧光显微镜观察,检测 GFP 蛋白表达阳性的细胞数,计算出重组慢病毒转导效率。

1.2.2 实时定量 PCR 检测 根据 Invitrogen 公司的 Trizol 操作说明书提取各组细胞总 RNA;根据 Promega 公司的 M-MLV 操作说明书使用逆转录试剂盒将 mRNA 逆转录为 cDNA。HER2 上、下游引物序列分别为 5'-AGCCCTGGTCACCTACAACA-3',5'-GCACTGGTAACTGCCCTCAC-3',合成产物为 270 bp。选择 GAPDH 作为内参照,GAPDH 的上、下游引物序列为 5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3',5'-CACCTGTTGCTGTAGCCAAA-3',合成产物为 121 bp。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次,PCR 反应体系 20 μL ,反应条件:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$,15 s,然后每个循环 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,退火延伸 60 $^{\circ}\text{C}$,30 s,共进行 45 个循环。每次在延伸阶段读取吸光值。反应结束后制作熔解曲线验证 PCR 产物的特异性。采用实时定量 PCR 仪进行 PCR 扩增,得到每个标本不同指标的 Ct 值。实时荧光定量结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 分析法进行相关数据的统计处理。

1.2.3 Western blotting 分析 取出对数生长期细胞,弃去细胞培养液,PBS 洗涤 2 次,加入适量预冷的细胞裂解液,刮下细胞,将样品转移入 Ep 管中,冰上裂解细胞 10~15 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 15 min,取上清。调整蛋白终浓度均为 $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$,加入相同体积的 2 \times 上样缓冲液,混匀,沸水浴煮 5 min。10% SDS-PAGE 后转膜,封闭。加入一抗(兔抗人 HER2 多克隆抗体 1:500,鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体 1:4 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入相应的二抗孵育 PVDF 膜 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加 ECL 发光剂,显影、定影。用 Quantity one 图像分析软件进行光密度积分值分析,以 HER2 与 GAPDH 光密度积分值的比值表示蛋白的相对表达量。

1.2.4 细胞体外侵袭实验 取各组对数生长期细胞,用含 1%血清的 DMEM 重悬,制成 $1.5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的单细胞悬液,按照细胞侵袭测定试剂盒说明,将 300 μL 细胞接种于已水化的包被 ECM 胶(人工重组基底膜)的小室内,将小室放置于含 30%胎牛血清培养基的 24 孔板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 48 h,用 PBS 浸湿

的棉签擦去小室内部上表面的细胞和ECM胶, Giemsa染色液染色20 min, 光学显微镜下观察穿透的细胞染为蓝色。在400倍光学显微镜下观察, 随机计数5个视野中侵袭细胞的数量, 实验重复3次。

1.3 统计学处理 采用GraphPadPrism 5.0软件进行统计分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组慢病毒转导效率 荧光显微镜下可见, 重组慢病毒转导PANC-1细胞72 h后, 几乎所有的细胞GFP蛋白表达呈阳性, 阳性率达80%以上, 说明重组慢病毒对PANC-1细胞有较好的亲嗜性。

2.2 HER2 siRNA对PANC-1细胞中HER2 mRNA的抑制 实时定量结果: 阴性对照组HER2 mRNA相对表达量与空白组差异无统计学意义($P > 0.05$)。HER2-RNAi-Lv组细胞HER2 mRNA相对表达量为空白组的10.69%, 与空白对照组及阴性对照组相比, HER2-RNAi-Lv组细胞HER2 mRNA表达水平明显降低, 差异有统计学意义, 表明慢病毒介导的siRNA可有效沉默HER2的表达(图1)。

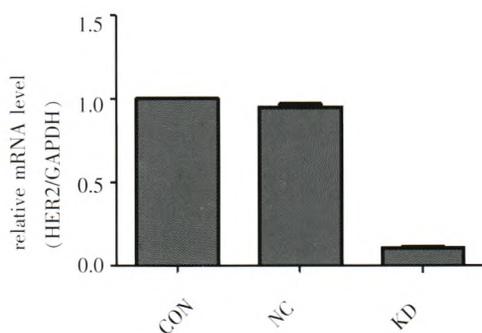


图1 siRNA对PANC-1 HER2 mRNA表达的抑制

2.3 HER2 siRNA对PANC-1细胞中HER2蛋白的抑制 与空白对照组、阴性对照组相比, HER2-RNAi-Lv组细胞HER2蛋白的表达显著受到抑制, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图2)。

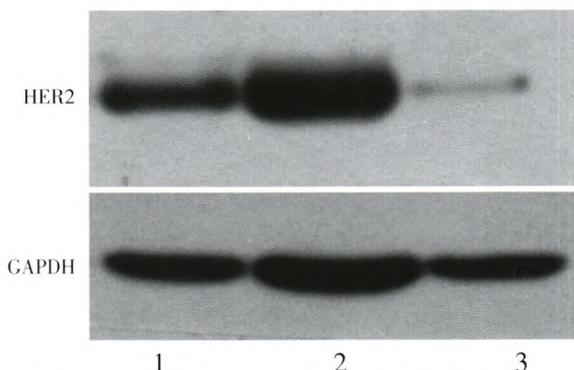


图2 siRNA对PANC-1 HER2蛋白表达的抑制
1: CON细胞; 2: NC组细胞; 3: KD组细胞

2.4 RNAi沉默HER2对PANC1细胞体外侵袭能力的抑制 HER2-RNAi-Lv组细胞穿膜细胞数(105.7 ± 2.03)明显少于空白对照组穿膜细胞数(194.3 ± 1.20)和阴性对照组穿膜细胞数(190.7 ± 0.88), 差异有统计学意义($P < 0.01$), 空白对照组和阴性对照组穿膜细胞数差异无统计学意义($P > 0.05$, 图3)。

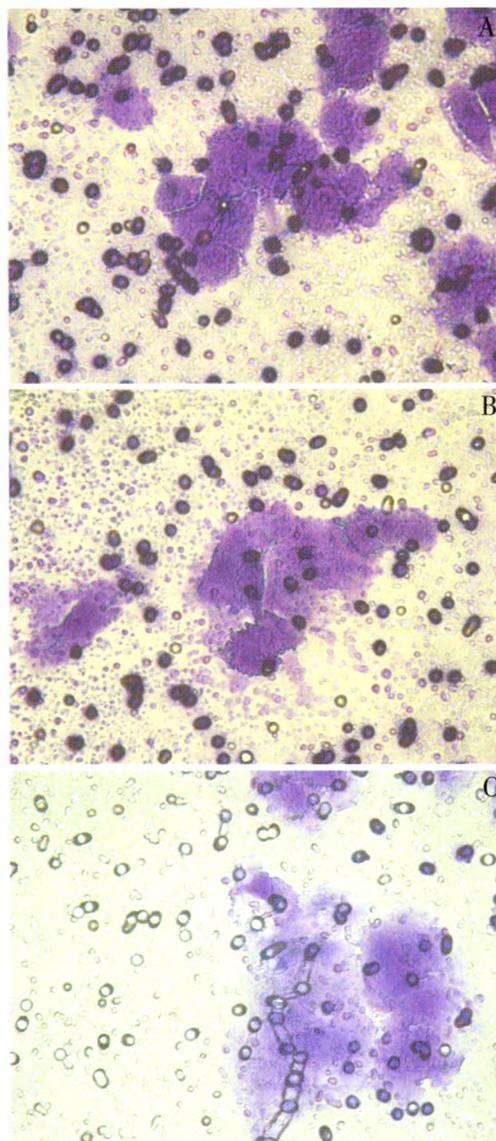


图3 siRNA沉默HER2对PANC-1细胞体外侵袭能力的影响
A: CON细胞; 2: NC组细胞; 3: KD组细胞

3 讨论

HER2是由原癌基因HER2/neu编码的具有酪氨酸激酶活性的跨膜糖蛋白, 包括细胞内区、跨膜区和细胞外区三部分, 属于EGFR家族。研究表明, HER2的过表达与肿瘤的恶性程度和转移能力密切相关。HER2的过度表达通过启动多种转移相关机制而增加转移能力, 包括细胞迁移率、体外侵袭力、实验性肺转移等^[1]。HER2过度表达也影响某些黏附分子如上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)等合成, 从而促进转移^[2]。进一步的研究表明, HER2在肿瘤

的侵袭过程中具有一定的促进作用,HER2 可通过影响基质金属蛋白酶促进肿瘤细胞的浸润,还可通过 MAPK、PI3K/Akt 等信号转导途径对血管内皮生长因子进行调控,通过增加血供来增强肿瘤的恶性程度。Kunitomo 等^[3]在对一个乳腺癌患者施行手术 21 个月后,在患者肝脏和胸膜发现了转移,发现两种转移的细胞表面都过表达 HER2 分子,用化疗配合 Trastuzumab 进行治疗,肝脏部位肿瘤得到了较为明显的抑制。Lee 等^[4]研究了 58 例淋巴结转移的胃癌患者,发现 1 例患者的淋巴结转移灶中有 HER2/neu 基因突变,而原发病灶中没有,说明 HER2 激酶区的突变会发生在转移性胃癌中,在胃癌的转移过程中可能起了一定的作用。Ougolkov 等^[5]发现,胃癌肝转移的患者 HER2/neu 高表达比没有肝转移者更常见,说明 HER2 的激活可能参与了肝转移的过程,提示 HER2 高表达的胃癌患者更容易发生肝转移。Pantel 和 Woelfle^[6]研究发现在癌症患者骨髓中发现转移细胞表面有过表达的 HER2 分子,并且观察到在肿瘤发生的早期就会发生 HER2 阳性细胞的转移。另外,44%的成骨肉瘤细胞过表达 HER2,且其过表达增加成骨肉瘤肺转移的危险性^[7]。Bolenz 等^[8]研究发现,膀胱癌中 HER2 表达与淋巴结转移有显著性相关,HER2 过表达的患者有较高的复发率及死亡率,可作为膀胱癌的预后指标。

研究表明,HER2 蛋白表达和基因扩增仅出现于胰腺癌组织中,正常胰腺导管腺体无表达和扩增,表明 HER2 蛋白表达和基因扩增具有一定的肿瘤特异性,进一步证明其作为肿瘤治疗靶点的可行性。文献报道胰腺癌中 HER2 基因的过表达率是 16%~69%,基因扩增比率是 25%,且有研究表明,胰腺癌中 HER2 蛋白表达和基因扩增与淋巴结转移有显著相关性,在有肝转移病例中更易检测到 HER2 蛋白表达和基因扩增^[9]。Masahiro 等^[10]研究发现过表达 HER2 的胰腺癌术后患者的生存期明显缩短,HER2 过表达可作为胰腺癌患者术后的独立预后指标。我们前期的研究也表明,HER2 在胰腺癌细胞中存在不同程度的表达,且其表达程度与细胞的侵袭性相关,表达强的胰腺癌细胞具有更强的侵袭性。实验研究表明,增加 HER2 的表达,则增加肿瘤发生和癌细胞的转移潜能^[11-13]。

RNA 干扰为近几年来兴起的基因治疗技术,可快捷、高效的抑制特异基因表达。有学者应用 ANT2 shRNA 下调乳腺癌中 HER2 的表达,结果肿瘤的侵袭转移能力明显下降^[14]。因此,通过 RNA 干涉等方法抑制肿瘤细胞中 HER2 的表达,可以在一

定程度上逆转细胞的恶性表型,抑制细胞侵袭能力。慢病毒载体是一种复制缺陷型逆转录病毒载体,以 HIV-1 为基础发展而来,能够转染非分裂期细胞和分裂期细胞,而且病毒的遗传物质能够整合到宿主的基因组,具有转移基因片段容量大、目的基因表达时间长、作用持久、不易诱发宿主免疫反应等优点,成为当前基因治疗载体研究的热点^[15]。本研究用 HER2 基因小干扰 RNA 的重组慢病毒稳定转染 PANC-1 细胞,与空白对照及慢病毒阴性对照组相比,HER2-RNAi-Lv 的 mRNA 表达明显降低,同时 HER2 在蛋白水平的表达也明显受到抑制,说明 HER2 基因小干扰 RNA 的重组慢病毒的稳定转染能够高效、特异的抑制 PANC-1 细胞中 HER2 基因表达。进一步体外侵袭实验发现 HER2 表达被抑制后,穿过人工基底膜的细胞数明显少于空白组及慢病毒阴性对照组,表明 siRNA 沉默 HER2 可明显抑制 PANC-1 细胞的体外侵袭能力。

总之,HER2 基因小干扰 RNA 的重组慢病毒能有效抑制 HER2 的表达,显著抑制胰腺癌细胞体外侵袭能力。siRNA 沉默 HER2 的治疗策略可能为防治胰腺癌的侵袭转移提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Galiegue S, Caeellas P, Krarttar A, et al. Immunohistochemical assessment of the peripheral benzodieupine receptor in breast cancer and its relationship with survival[J]. *Clin Cancer Res*, 2004,10(6): 2058-2064.
- [2] Kleer CG, Van Golen KL, Braun T, et al. Persistent E-cadherin expression in inflammatory breast cancer[J]. *Mod Pathol*, 2001,14(5): 458-464.
- [3] Kunitomo K, Inoue S, Ichihara F, et al. A case of metastatic breast cancer with outgrowth of HER2-negative cells after eradication of HER2-positive cells by humanized anti-HER2 monoclonal antibody (trastuzumab) combined with docetaxel [J]. *Hum Pathol*, 2004,35(3):379-381.
- [4] Lee JW, Soung YH, Kim SY, et al. ERBB2 kinase domain mutation in a gastric cancer metastasis[J]. *APMIS*, 2005,113:683-687.
- [5] Ougolkov A, Yamashita K, Bilim V, et al. Abnormal expression of E-cadherin, beta-catenin, and c-erbB-2 in advanced gastric cancer: its association with liver metastasis [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2003,18:160-166.
- [6] Pantel K, Woelfle U. Detection and molecular characterisation of disseminated tumour cells: implications for anti-cancer therapy[J]. *Biochim Riophys Acta*, 2005,1756(1):53-64.
- [7] Zhou H, Randall RL, Brothman AR, et al. Her-2/neu expression in osteosarcoma increases risk of lung metastasis and can be associated with gene amplification[J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2003,25(1):27-32.

- [8] Bolenz C, Shariat SF, Karakiewicz PI, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 expression status provides independent prognostic information in patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder[J]. BJU INT, 2010,106(8):1216-1222.
- [9] 任新瑜,尹玉峰,高洁,等.中国人群胰腺癌与胃癌HER2/neu基因表达[J].协和医学杂志,2012,3(1):21-25.
- [10] Masahiro K, Bunzo N, Ryosuke A, et al. HER2 overexpression correlates with survival after curative resection of pancreatic cancer[J]. Cancer Sci, 2009,100(7):1243-1247.
- [11] Niu G, Carter WB. Human epidermal growth factor receptor 2 regulates angiopoietin-2 expression in breast cancer via AKT and mitogen-activated protein kinase pathways [J]. Cancer Res, 2007,67(4):1487-1493.
- [12] Saal LH, Iohansson P, Holm K, et al. Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007,104(18):7564-7569.
- [13] Yokoyama H, Ikehara Y, Kidera Y, et al. Molecular basis for sensitivity and acquired resistance to gefitinib in HEB2-overexpressing human gastric cancer cell lines derived from liver metastasis[J]. Br J Cancer, 2006,95(11):1504-1513.
- [14] Morris KV, Rossi JJ. Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy[J]. Gene Ther, 2006,13:553-558.
- [15] Ji-Young Jang, Yoon-KYung Jeon, Chin-Woo Kim. Degradation of HER2/neu by ANT2 shRNA suppresses migration and invasiveness of breast cancer cells[J]. BMC Cancer, 2010,10:391-400.

(收稿日期:2014-05-20)

(本文编辑:张垚;技术编辑:张珂)

【文章编号】1009-9905(2014)09-0682-01

doi:10.3969/j.issn.1009-9905.2014.09.004

壶腹癌局部切除术 30 例

潘思波 车斯尧 黎福良

广东省高州市人民医院 肝胆外科一区 (广东 高州 525200)

对壶腹癌传统的手术治疗方式是行胰十二指肠切除术,但对黄疸重、高龄、体质差患者难以承受此类大手术,往往行姑息性胆肠内引流术解除胆道梗阻。我院2000年1月—2010年1月共行壶腹癌局部切除术30例,取得满意效果,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本组30例,其中男13例,女17例;年龄49~81岁,平均年龄61岁。病程1周~2.5个月。29例有梗阻性黄疸,血清总胆红素在195.8~503.2 $\mu\text{mol/L}$,1例无梗阻性黄疸,仅右上腹胀不适伴纳差、消瘦症状;肿瘤标志物CA199均明显升高。术前行B超、胸片、上腹CT或上腹MRI检查,肿瘤直径1.0~2.5 cm,未见腹腔淋巴结肿大或肝、肺转移;20例行十二指肠镜检查,3例见十二指肠乳头肿物,取活检确诊十二指肠乳头高分化腺癌。8例合并高血压,4例合并糖尿病,3例合并冠心病,2例合并慢性支气管炎并双肺气肿。

1.2 手术方法 作右上腹腹直肌切口或肥胖者作右上腹肋下缘切口入腹,探查腹腔特别是肝十二指肠韧带无肿大淋巴结,肝无转移灶,壶腹肿瘤直径 $<2.5\text{ cm}$,与术前影像检查结果相符,游离十二指肠降段,在十二指肠前外侧壁(其对应十二指肠乳头)处作一斜切口长约4 cm,暴露十二指肠乳头及肿瘤,在肿瘤上缘1.0~1.5 cm处切开十二指肠壁及胆总管下端,将切开十二指肠壁的近端边缘与切开的胆总管前壁近侧缘用0号线作间断缝合,分别向内外,环绕肿瘤基底上1.0~1.5 cm处,边切边缝,直至将肿瘤切除,在切至内下方时,可切断胰管末端,将胰管断端与相邻胆总管断端并拢缝合行胰胆管

整形,再将胰管断端与十二指肠壁间断缝合。胆总管内放置T型管引流,于胰管内置一粗细适当硅胶管作支架胰液引流,硅胶管保留长约10 cm其远端送入十二指肠远端,横行间断缝合关闭十二指肠切口,胆总管内留置T型管,其中6例肿瘤较大者,为防术后肿瘤早期复发后出现梗阻性黄疸,作胆总管空肠吻合术。术中切除肿瘤行快速冷冻病理检查,证实切缘无癌细胞残留。

2 结果

本组无死亡病例,1例术后出现十二指肠乳头创面出血,1例切口感染,均保守治愈,并发症发生率6.7%。术后病理结果:21例壶腹腺癌,4例十二指肠乳头腺癌,5例胆总管末端癌,手术切缘均未见癌细胞。30例全部随访,存活5年以上13例,10例术后2~3年内死于肿瘤复发或腹腔转移,7例肿瘤较大者于术后1~2年内死于肿瘤复发。

3 讨论

壶腹肿瘤来源于 Vater 壶腹、Vater 乳头及胆总管下端肿瘤。据统计胆胰管汇合形成 Vater 壶腹并开口于十二指肠大乳头,呈“Y”型者占46.7%。胆管胰管并行但共同开口于大乳头呈“V”型者占50%,胆管胰管完全分开并分别开口于十二指肠者仅占3.1%^[1],这就有了壶腹癌局部切除时可切除胆总管下端约2 cm,将胆总管下端与胰管开口处整形再与十二指肠吻合的解剖学基础。Vater 壶腹癌位于胆总管下端,早期易出现梗阻性黄疸,可早期诊断,使壶腹癌局部切除术成可行性手术。

(下转第 691 页)