

• 生物治疗 •

TIPE3 干扰质粒对 SW480 结肠癌细胞生长的作用及相关机制探讨^①

叶宇涵^{②③} 刘忠臣^{②③} 齐忠权^④ 庄国洪^④ 殷平^⑤ (福建医科大学基础医学院 福州 350004)

中图分类号 R735.3 文献标志码 A 文章编号 1000-484X(2017)03-0378-06

[摘要] 目的: 通过 TIPE3 干扰质粒转染 SW480 结肠癌细胞, 验证干扰 TIPE3 表达对 SW480 结肠癌细胞生长的影响并探讨相关机制。方法: 构建 TIPE3-shRNA-pSIREN-RetroQ 干扰质粒, 通过脂质体转染法成功将干扰质粒导入 SW480 细胞, 通过 RT-PCR、Western blot 检测重组质粒的干扰效率。应用 CCK-8 方法检测 SW480 细胞生存率。AnnexinV-FITC/PI 流式细胞法检测细胞凋亡。使用 Western blot 检测细胞增殖、凋亡相关分子的表达情况。结果: 成功设计、构建和筛选具有生物活性且干扰效率最佳的 TIPE3-shRNA-pSIREN-RetroQ 干扰质粒。CCK-8 检测证实干扰 SW480 结肠癌细胞 TIPE3 表达可以抑制细胞生长。流式结果显示, TIPE3-shRNA3 干扰组的凋亡率为 (27.99±1.087)% , 显著高于正常细胞组 (12.10±2.213)% 及转染空载质粒组 (11.44±0.2770)% 。证实了降低 TIPE3 表达可以增加 SW480 对 aDR5ScFv 所诱导的细胞凋亡敏感性。Western blot 结果显示干扰 TIPE3 表达可以活化 caspase3 蛋白, 降低 p-AKT、p-PDK1、PCNA 等分子的表达。结论: 干扰 TIPE3 的表达对 SW480 结肠癌细胞具有促进凋亡、抑制增殖的作用。

[关键词] TIPE3shRNA; 结肠癌; 凋亡; 增殖

Effect and mechanism of TIPE3 interference plasmid on SW480 colorectal cancer growth

YE Yu-Han, LIU Zhong-Chen, QI Zhong-Quan, ZHUANG Guo-Hong, YIN Ping. The School of Basic Medical Sciences, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China

[Abstract] **Objective:** To study the effect of interference TIPE3 on the colon cancer cell growth by transfecting SW480 colon cancer cells with the TIPE3 interference plasmid were detected. **Methods:** Transfecting the constructed TIPE3-shRNA-pSIREN-RetroQ plasmid to SW480 cells. To determine the highest interference efficiency plasmid, the mRNA and protein levels of recombinant plasmid were detected by RT-PCR and Western blot separately and tested the cell proliferation with CCK8. Meanwhile, apoptosis rate of SW480 cells was determined by flow cytometry assay with AnnexinV-FITC/PI. To further determined the effects of recombinant plasmid on cell development, the level of protein involved in proliferation and apoptosis were detected by Western blot. **Results:** The most efficient interference plasmids were successfully constructed. We found that the cell survival rate decreased when interference TIPE3 gene expressing in colorectal cancer cells. Flow cytometry indicated that interfering the expression of TIPE3 would increase the sensitivity of SW480 cell to apoptosis induced by aDR5ScFv. The results of Western blot showed that low expression of TIPE3 would activate caspase3 and downregulate the expression of p-AKT, p-PDK1 and PCNA. **Conclusion:** Interference TIPE3 could promote apoptosis and inhibit proliferation in SW480 colon cancer cells.

[Key words] TIPE3 shRNA; Colon cancer; Apoptosis; Proliferation

①本文为国家自然科学基金(81272720)和福建省属公益类科研院所基本科研专项项目(2016R1102)资助。

②共同第一作者。

③同济大学第十人民医院普通外科,上海 200072。

④厦门大学抗癌研究中心,器官移植研究所,厦门 361004

⑤厦门大学附属中山医院病理科,厦门 361004。

作者简介:叶宇涵(1991年-),女,在读硕士,主要从事结肠癌分子病理学研究, E-mail: yeyuhan2688@hotmail.com。

通讯作者及指导教师:庄国洪(1969年-),女,博士,副教授,主要从事肿瘤免疫研究, E-mail: zghxmu@163.com。

殷平(1963年-),男,博士,教授,主要从事炎症及肿瘤分子病理学研究, E-mail: yinping2002@163.com。

肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白 8 (Tumor necrosis factor- α induced protein 8, TNFAIP8 或称 TIPE) 家族是近年来发现的一组蛋白质,具有维持免疫平衡、调节肿瘤生长的作用^[1]。哺乳动物 TNFAIP8 家族包括四个成员,即 TIPE、TIPE1、TIPE2 与 TIPE3^[2],它们在结构上具有高度同源性,均包含 7 个高度保守的 α 螺旋($\alpha 0 \sim \alpha 6$) 以及由 α 螺旋组成的疏水性空腔^[3]。TIPE3(又称 TNFAIP8L3)作为磷脂酰肌醇通路中的第二信使转移蛋白促进肿瘤的发生^[4]。TIPE3 在 N 端具有独特的 19 个氨基酸序列,称为 N 端结构域(NT),TIPE 家族的其他成员没有该结构域,删除这段序列 TIPE3 将从促增殖蛋白质转换为促死亡蛋白^[5]。

TIPE3 在食管癌、卵巢癌、胃癌等肿瘤细胞系中表达^[5,6],降低 TIPE3 表达对肿瘤生长的研究有助于进一步揭示 TIPE3 在肿瘤发生发展中的可能机制。因此我们构建 TIPE3-shRNA-pSIREN-RetroQ 干扰质粒,降低 TIPE3 在结肠癌中的表达来研究 TIPE3 对其生长的影响,进而了解 TIPE3 在肿瘤增殖、凋亡中的作用,为结肠癌治疗的分子治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 T4 DNA Ligase、BamH I 限制性内切酶、EcoR I 限制性内切酶、PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、DL5000 DNA marker 购自宝生生物工程(大连)有限公司;PCR 产物胶回收试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司;ExFectTM Transfection Reagent 购自 Vazyme 公司;CCK 购于北京全式金有限公司;流式凋亡检测试剂盒购于 BD 公司;PCR 引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成;质粒测序由上海英骏公司完成;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 购厦门英伟生物技术有限公司;TIPE3 抗体购自药明康德新药开发有限公司;caspase3、caspase3-cleaved、AKT、pAKT、PDK、pPDK 抗体购于 abcam 公司。

1.1.2 载体和菌种 shRNA 载体 pSIREN-RetroQ 由厦门大学医学院金光辉老师馈赠,DH5 α 菌株购于北京全式金公司,引物及干扰片段由厦门大学医学院高淑彬老师设计,上海 Sangon 合成,人结肠癌细胞 HT-29、人结肠腺癌细胞 SW480、人肾胚细胞 HKE293 细胞株由厦门大学医学院抗癌研究中心保存。

1.2 方法

1.2.1 TNFAIP8 干扰质粒的构建

1.2.1.1 RNA 干扰片段的设计与合成 取 pSIREN-RetroQ 为 shRNA 载体。转化提取质粒 pSIREN-RetroQ 后,用限制性内切酶 BamH I 和 EcoR I 对质粒 pSIREN-RetroQ 进行双酶切,双酶切后采用 TIANGEN Universal DNA 纯化回收试剂盒纯化回收 DNA 溶液。

登陆 GeneBank 查找并获取人源性 TIPE3 基因序列,从 TIPE3 的 ORF 中选择评分最高的靶序列位点三处,分别命名为 TIPE3 shRNA1;TIPE3 shRNA2;TIPE3 shRNA3 (GCGAGATCTTTGATGAGCT; ACAA-GACTCATCCCCTTAT; GAGCAAAATAGCCAGCAAA)。利用 SiRNA Construct Builder 软件,构建 TIPE3 干扰片段序列(含黏性末端)。将该序列送至上海 Sangon 合成 DNA 单链,退火形成互补片段。酶切后的胶回收的质粒和退火片段用 T4 连接酶连接。

1.2.1.2 TIPE3-shRNA-pSIREN-RetroQ 重组质粒的转化、鉴定及测序 将连接产物转化至感受态中。经培养后挑取饱满单克隆菌落进行培育。并进行初筛、复筛以排除假阳性克隆的出现。重组质粒的初筛鉴定引物具体序列如下(设计的引物送上海 Sangon 合成): Forward primer = GGGCAGGAAGAGGGCCTAT; TIPE3-shRNA1 reverse primer = ACGCGTAAA-AAAGCGAGA; TIPE3-shRNA2 reverse primer = ACGCGTAAAAAACAAGA; TIPE3-shRNA3 reverse primer = ACGCGTAAAAAAGAGCAA; 复筛采用质粒手册中的通用引物 MSCV_primer 和 MSCV_rev_primer。

行菌液 PCR 鉴定阳性克隆,所得产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,在 Bio-Rad 凝胶成像仪上鉴定。将阳性菌落送上海英俊公司测序。

1.2.2 重组干扰质粒的干扰效率检测及最佳干扰效率质粒的筛选

1.2.2.1 检测人结肠癌细胞 HT-29、人结肠腺癌细胞 SW480 细胞株 TIPE3 表达情况 复苏 HT-29、SW480 细胞,待细胞长至 70% ~ 80% 后收集细胞,制备 RNA 样品,并逆转录为 cDNA,行 PCR 检测 TIPE3 在两株结肠癌细胞中的基因水平表达情况。 β -actin 上游引物 5'-AGCGAGCATCCCCCAAAGTT-3'; 下游引物: 5'-G GGCACGAAGGCTCATCATT-3'。TIPE3 上游引物: 5'-CGCAGCATGGA TTCGGATT-3'; 下游引物: 5'-TCAAAGATCTCGCTGCTGGTGT-3'。PCR 反应条件为: (1) 94 $^{\circ}$ C、5 min; (2) 94 $^{\circ}$ C、0.5 min; (3) 56 $^{\circ}$ C、0.5 min; (4) 72 $^{\circ}$ C、0.5 min; (5) 72 $^{\circ}$ C、5 min; 其中(2) ~ (4) 循环 35 次。产物存于 4 $^{\circ}$ C。所得产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,在 Bio-Rad 凝胶成像仪上鉴定。行 Western blot 检测 TIPE3

在两株结肠癌细胞中蛋白水平的表达情况。PBS 洗涤 2 次。弃上清,取细胞沉淀,加入含有蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液裂解细胞并提取蛋白。行 SDS-PAGE 电泳并转印至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,滴加一抗(1:1 000) 4℃ 孵育过夜,滴加二抗(1:10 000),室温孵育 1 h,ECL 显色。用已知高表达 TIPE3 的 HEK293 细胞作为对照^[6]。

1.2.2.2 人结肠腺癌细胞 SW480 细胞转染及检测干扰效率 采用 ExFect™ Transfection Reagent 转染试剂将 TIPE3-shRNA-pSIREN-RetroQ 重组质粒转染至 SW480 细胞。选择细胞状态好且处于生长对数期的 SW480 细胞作为转染对象。将 Transfection Reagent 加入分别含 pSIREN-RetroQ、GFP-pSIREN-RetroQ、TIPE3-shRNA-pSIREN-RetroQ 等质粒的不完全培养基中制备成转染复合物。转染复合物与 SW480 细胞混匀后将之置于恒温培养箱中进行转染。48 h 后利用荧光显微镜观察 GFP-pSIREN-RetroQ 转染效率。取各组转染细胞制备 RNA 样品,并逆转录为 cDNA,行 PCR 对 TIPE3 的表达进行验证和分析。行 Western blot 检测转染 TNFAIP8-shRNA-pSIREN-RetroQ 重组质粒的 SW480 细胞 TIPE3 干扰效率及 TIPE3 蛋白的表达。

1.2.3 CCK 检测转染 TIPE3-shRNA-pSIREN-RetroQ 干扰质粒 SW480 细胞的存活率 行 CCK 检测转染细胞生长情况:取 3.0×10³ 细胞接种到 96 孔板中,置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养 24、48 h 后,加入 10% Cell Counting Kit-8(CCK-8)的完全培养基 4 h 后,置于 450nm 波长测其吸光度。

1.2.4 AnnexinV-FITC/PI 流式细胞检测 aDR5ScFv 诱导转染 TIPE3 干扰质粒 SW480 细胞的凋亡情况。用流式法检测 aDR5ScFv 诱导细胞凋亡情况。在消化前 4 h 加入终浓度 150 μg/ml 的 aDR5ScFv 培养基。用不含 EDTA 的 0.25% 的胰酶消化细胞,计数 1×10⁶ 个细胞,用遇冷的 PBS 1 000 r/min 4℃ 离心 10 min 弃上清洗涤 2 次后,100 μl binding buffer 重

悬细胞,分别加入 5 μl 的 PI 和 Annexin V-FITC 避光室温孵育 15 min,在 1 h 内上机完成检测。

1.2.5 检测转染 TIPE3 干扰质粒的 SW480 细胞相关分子 pro-caspase3、cleaved caspase3、AKT、p-AKT、PDK、p-PDK、PCNA 等表达活化 将转染干扰质粒 48 h 后的 SW480 细胞提取蛋白,另设正常细胞组,空载细胞组,行 Western blot 检测 caspase3、AKT、PDK、PCNA 等相关分子的表达情况。探讨 TIPE3 干扰质粒影响细胞增殖、凋亡的可能机制。

1.3 统计学处理 全部数据使用 SPSS13.0、Graph-Pad Prism5 和 Excel 软件做统计学处理。P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TIPE3-shRNA-pSIREN-RetroQ 干扰质粒阳性克隆初筛、复筛鉴定 从连接转化后所得菌落制备 PCR 模板,以初筛引物进行菌液 PCR 初筛鉴定。取初筛为阳性的菌种作为 PCR 模板,以质粒 pSIREN-RetroQ 的通用引物 MSCV_primer 和 MSCV_rev_primer 为引物,进行复筛,将筛选为阳性的菌种送上海英俊公司测序。复筛鉴定 1、2 为 TIPE3-shRNA1 阳性克隆。鉴定 3、4 为 TIPE3-shRNA2 阳性克隆。鉴定 5、6 为 TIPE3-shRNA3 阳性克隆。复筛鉴定的 PCR 产物大小为 410 bp(图 1)。

2.2 TIPE3-shRNA-pSIREN-RetroQ 测序结果比对 测序结果经 DNAMAN 软件比对,与设计靶序列一致(图 2)。

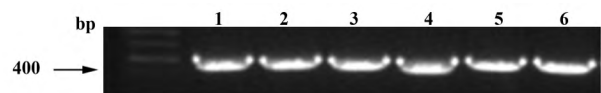


图 1 重组质粒阳性克隆复筛鉴定

Fig. 1 Rescreen positive recombinant plasmid clones

Note: 1, 2. Positive clones of TIPE3-shRNA1; 3, 4. Positive clones of TIPE3-shRNA2; 5, 6. Positive clones of TIPE3-shRNA3.



图 2 TIPE3-shRNA-pSIREN-RetroQ 重组质粒的测序图谱和序列比对

Fig. 2 Sequence comparison of TIPE3-shRNA-pSIREN-RetroQ recombinant plasmid

2.3 检测人结肠癌细胞 HT-29、人结肠腺癌细胞 SW480 细胞株 TIPE3 表达情况 通过 PCR 及 Western blot 比较人肾胚细胞 HEK293、人结肠癌细胞 HT-29、SW480 中 TIPE3 表达特点。文献报道 TIPE3 在 HEK293 细胞高表达,与 HEK293 细胞相比, TIPE3 在人结肠癌细胞 HT-29、SW480 也为高表达,且在表达上没有差异。由此,我们选择 SW480 作为干扰细胞株(图 3)。

2.4 人结肠腺癌细胞系 SW480 细胞培养及转染 经脂质体转染 48 h 后,转染了 GFP-pSIREN-RetroQ 质粒的 SW480 细胞,在 100 倍荧光显微镜下观察,视野下大量绿色荧光蛋白表达。对比自然光光镜下 SW480 细胞数量,可见转染 GFP-pSIREN-RetroQ 质粒转染效率达 70%。相对较高的转染效率为后面所构建干扰质粒干扰效果的检测提供有力基础(图 4)。

2.5 TIPE3-shRNA-pSIREN-RetroQ 质粒干扰效率检测 收集转染 48 h 后的 SW480 细胞,提取 RNA 并逆转录为 cDNA,检测 TIPE3 的基因表达情况。与正常细胞(泳道 1)相比,转染 TIPE3-shRNA1、TIPE3-shRNA2、TIPE3-shRNA3 质粒(泳道 2~4)的 SW480 细胞, TIPE3 的表达量均降低,且转染 TIPE3-

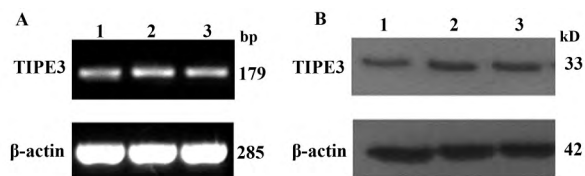


图 3 SW480、HT-29 与 HEK293 细胞 TIPE3 表达情况的比较

Fig. 3 Comparison of expression of TIPE3 in HEK293, SW480 and HT-29

Note: A. RT-PCR; B. Western blot; 1. HEK293 cell; 2. SW480 cell; 3. HT-29 cell.

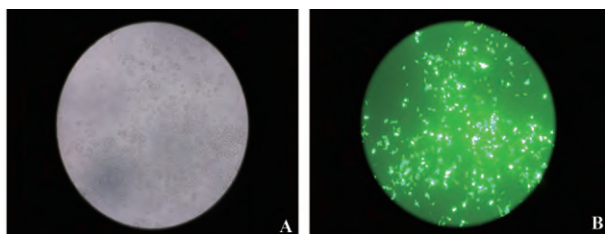


图 4 同一视野下荧光显微镜观察 GFP-pSIREN-RetroQ 转染 SW480 细胞

Fig. 4 SW480 cell observed by fluorescence after GFP-pSIREN-RetroQ transfection at same field of vision

Note: A. Observation under natural light; B. Observation under blue light.

shRNA3 质粒干扰效率最高(图 5)。转染 48 h 后提取 SW480 细胞蛋白进行 Western blot 检测。TIPE3-shRNA3 干扰组中 TIPE3 表达量明显降低,低于空载质粒和 TIPE3-shRNA1/2 干扰质粒转染组。泳道 1~5 分别为正常细胞、pSIREN-RetroQ、TIPE3-shRNA1、TIPE3-shRNA2 和 TIPE3-shRNA3 质粒转染组。综上测试结果,构建的 TIPE3-shRNA3-pSIREN-RetroQ 干扰质粒在蛋白和 RNA 水平均能较好地干扰 TIPE3 的表达(图 6)。

2.6 CCK-8 检测 TIPE3-shRNA-pSIREN-RetroQ 干扰质粒转染后 SW480 细胞的生长 为了进一步验证干扰 TIPE3 的表达对结肠癌细胞的影响,分别在转染后 24、48 h 对结肠癌细胞行 CCK-8 检测,结果表明无论是 24 h 还是 48 h,与正常的细胞相比,空载组的细胞存活率远高于实验组不同干扰序列组,表明干扰 TIPE3 后细胞生长能力受限。且 48 h

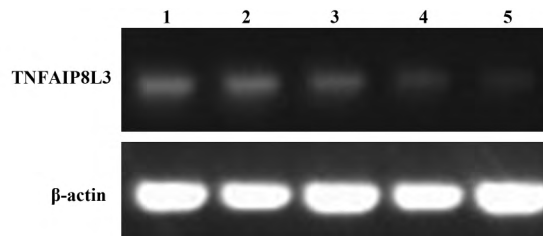


图 5 应用 RT-PCR 检测构建质粒的干扰效果

Fig. 5 Detection of interference of recommend plasmid by RT-PCR

Note: 1. Normal SW480 cell; 2. SW480 cell transfected with pSIREN-RetroQ empty control plasmid; 3. SW480 cell transfected with TIPE3-shRNA1 plasmid; 4. SW480 cell transfected with TIPE3-shRNA2 plasmid; 5. SW480 cell transfected with TIPE3-shRNA3 plasmid.

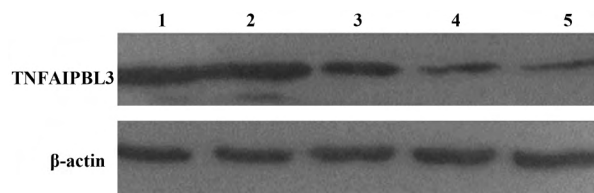


图 6 TIPE3-shRNA 质粒转染 SW480 细胞蛋白水平表达的检测

Fig. 6 Detection of protein expression of TNFAIP8L3-shRNA plasmid transfected SW480 cells

Note: 1. Normal SW480 cell; 2. SW480 cell transfected with pSIREN-RetroQ empty control plasmid; 3. SW480 cell transfected with TIPE3-shRNA1 plasmid; 4. SW480 cell transfected with TIPE3-shRNA2 plasmid; 5. SW480 cell transfected with TIPE3-shRNA3 plasmid.

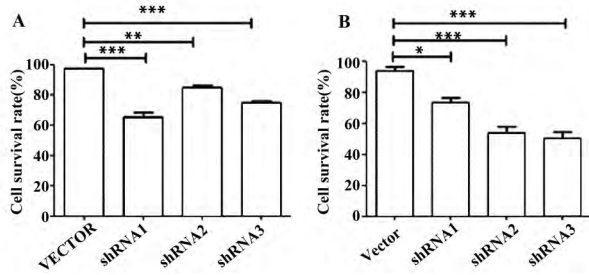


图7 CCK-8 检测 shRNA 干扰 TIPE3 表达对 SW480 结肠癌细胞存活率的影响

Fig. 7 CCK-8 detect shRNA impact of SW480 cell survival rate

Note: A. 24 h; B. 48 h; * . $P < 0.05$; ** . $P < 0.01$; *** . $P < 0.0001$.

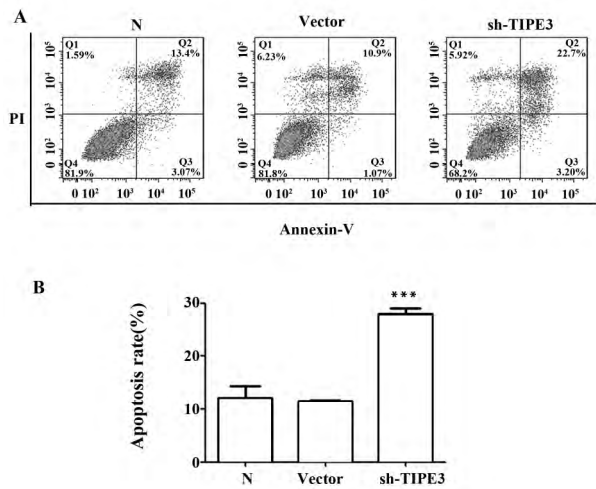


图8 流式检测 aDR5ScFv 诱导 SW480 细胞的凋亡

Fig. 8 Flow cytometry detect aDR5ScFv induced SW480 cells apoptosis

Note: *** . $P < 0.0001$.

时, TIPE3-shRNA3 表现出最强的抑制作用, 细胞存活率与 TIPE3 蛋白干扰时间成负相关。说明构建的 TIPE3 干扰质粒具有抑制肿瘤细胞生长的作用, 并呈时间依赖性(图 7)。

2.7 流式检测 TIPE3-shRNA3-pSIREN-RetroQ 干扰质粒对细胞凋亡的影响 本实验室前期实验结果已证实 aDR5ScFv(抗人死亡受体 5 单链抗体) 可以通过结合 DR5 受体诱导肿瘤细胞的凋亡^[7,8]。流式细胞术检测结果表明终浓度 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 aDR5ScFv 作用 6 h 后, 正常 SW480 细胞凋亡率为 (12.10 \pm 2.213) % 转染空载质粒的 SW480 细胞凋亡率为 (11.44 \pm 0.277) % , TIPE3-shRNA3 干扰组的凋亡率为 (27.99 \pm 1.087) % 。与前者相比干扰组细胞凋亡增加明显, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。而正常 SW480 细胞组与转染空载质粒的 SW480 细胞组

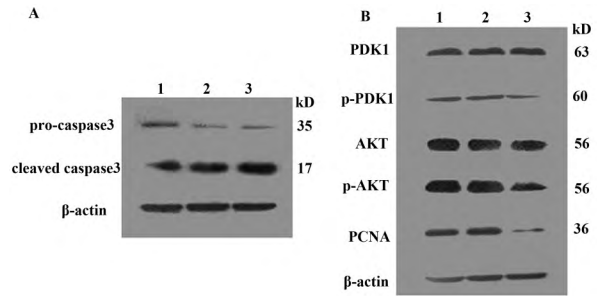


图9 Western blot 检测 caspase3、PDK1、AKT、PCNA 等蛋白的表达

Fig. 9 Detection of expression of caspase3 ,PDK1 ,AKT and PCNA by Western blot

Note: 1. Normal SW480 cell; 2. SW480 cell transfected with empty control plasmid; 3. SW480 cell transfected respectively with TIPE3-shRNA3 plasmid.

相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。比较正常组、空载组、干扰组细胞早期凋亡 (Q3 象限) 发现, 三者差异无统计学意义 (图中未显示)。说明构建的 TIPE3 干扰质粒能够提高结肠癌细胞 SW480 对 aDR5ScFv 的敏感性, 主要通过增加中晚期凋亡促进肿瘤细胞凋亡的作用 (图 8)。

2.8 Western blot 检测细胞凋亡、增殖相关蛋白分子的表达情况 应用 Western blot 检测 caspase 家族成员: pro-caspase3 与 cleaved caspase3 的表达情况。结果可见, 与正常细胞组及空载细胞组比较, SW480 细胞干扰组其 cleaved caspase3 明显升高。caspase3 作为细胞凋亡的 executor, 活化的 cleaved caspase3 表达增高表明降低 TIPE3 表达可以促进细胞凋亡 (图 9A)。并且在 Total PDK1、AKT 表达无明显差异的情况下, 干扰质粒组 p-PDK1、p-AKT 蛋白质的表达明显下调, 而正常细胞组与空载质粒组表达量没有明显差异。结果提示干扰 TIPE3 表达可能降低 PDK1、AKT 磷酸化, 进而抑制磷脂酰肌醇信号通路, 使结肠癌细胞增殖减少。同时细胞增殖状态的 PCNA 蛋白减少明显, 进一步证实了结肠癌细胞生长受到抑制 (图 9B)。

3 讨论

超过 50% 的人类肿瘤细胞有异常的磷脂酰肌醇信号活化, 虽然一大部分原因可以由 PTEN、Ras 或者 PI3KCA 的突变做出解释^[9,10], 但肯定存在其他的机制上调了该信号的活化。TIPE3 作为磷脂酰肌醇转运蛋白, 可以使肿瘤细胞中的磷脂酰肌醇信号的异常活跃, 能够直接调节 PtdIns (3,4,5) P3、PtdIns (4,5) P2 的含量, 阐述了另外一种肿瘤发生、发

展的机制,可为肿瘤治疗提出了新的靶点。但现在对 TIPE3 的研究成果很少, PubMed 中针对 TIPE3 的试验研究有且只有 2 篇。TIPE3 对肿瘤的增殖、迁移、侵袭的机制有待进一步探讨,为了更好地研究其对肿瘤细胞的影响,我们构建了 TIPE3-shRNA-pSIREN-RetroQ 干扰质粒。

shRNA 是常被用于沉默靶基因的短发夹 RNA 序列^[11],与内源性 mRNA 一致的两个短反向重复序列,是 RNA 干扰的靶点。我们成功构建了质粒 TIPE3-shRNA1-pSIREN-RetroQ、TIPE3-shRNA2-pSIREN-RetroQ 和 TIPE3-shRNA3-pSIREN-RetroQ。由于载体不具有绿色荧光标记,我们用具有 GFP 标签的 GFP-pSIREN-RetroQ 质粒作为判断转染效率的标准。我们通过 RT-PCR、Western blot 筛选发现, TIPE3-shRNA2 和 TIPE3-shRNA3 都可以干扰 TIPE3 的表达,而 TIPE3-shRNA3 质粒具有最佳的干扰效率,可以显著降低 TIPE3 在细胞中的表达。所以我们将应用 TIPE3-shRNA3 质粒干扰 TIPE3 在 SW480 中的表达来探讨 TIPE3 对结肠癌细胞生长的影响。

我们通过 CCK-8 检测发现,在 24 h 与 48 h 的时间点,与正常细胞相比,空载组的细胞存活率达到 90%;转染了不同干扰序列的细胞组与正常细胞组及空载组相比差异显著,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。经 RT-PCR、Western blot 验证转染 48 h 的细胞存活率与 24 h 相比差异明显。以上结果表明干扰 TIPE3 表达具有抑制肿瘤细胞生存的作用。文献报道 TIPE3 促进肿瘤细胞的生长^[5]。我们的实验结果与文献报道 TIPE3 在肿瘤生长方面起正向调控作用相符。干扰该基因表达,肿瘤生存受到抑制。

肿瘤的生长、存活与肿瘤凋亡、肿瘤增殖密不可分。为了验证干扰 TIPE3 表达,降低肿瘤生存率是通过促进肿瘤凋亡还是抑制肿瘤增殖发挥作用,我们选择具有干扰效果最强的 TIPE3-shRNA3 质粒转染的细胞,并进行流式细胞术检测。结果发现终浓度 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 aDR5ScFv 作用 6 h,干扰组细胞的凋亡率增加明显,与正常细胞和空载组细胞相比差异显著。Western blot 结果显示,干扰组中 caspase3 活化增强。caspase 家族参与的细胞凋亡信号转导,其中 caspase3 是主要的凋亡执行者^[12]。干扰 TIPE3 在 SW480 细胞中的表达可以增强 SW480 细胞对 aDR5ScFv 诱导的凋亡敏感性,并且,干扰 TIPE3 表达可以通过激活 caspase 通路增加 SW480 细胞的凋亡。

众所周知, PDK1/AKT 通路作为磷脂酰肌醇信号转导中的重要节点,调节细胞生长、增殖、分化、迁移等^[13,14]。Western blot 结果证实干扰 TIPE3 表达可以

抑制 AKT、PDK 磷酸化、降低磷脂酰肌醇信号转导,减少肿瘤细胞增殖。PCNA 作为细胞增殖蛋白,在结肠癌分期、预后判断具有重要意义^[15], PCNA 蛋白表达下调,表明细胞增殖受到抑制,我们的结果进一步证明干扰 TIPE3 表达抑制 SW480 细胞增殖。

综上所述, TIPE3 对调控肿瘤生长具有重要作用,主要通过影响肿瘤细胞增殖、凋亡发挥效果。干扰其表达为以后临床分子靶向治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] Freundt EC, Bidere N, Lenardo MJ. A different TIPE of immune homeostasis [J]. *Cell* 2008, 133(3): 401-402.
- [2] Sun H, Gong S, Carmody RJ *et al.* TIPE2, a negative regulator of innate and adaptive immunity that maintains immune homeostasis [J]. *Cell* 2008, 133(3): 415-426.
- [3] Zhang X, Wang J, Fan C *et al.* Crystal structure of TIPE2 provides insights into immune homeostasis [J]. *Nat Struct Mol Biol* 2009, 16(1): 89-90.
- [4] Fayngerts SA, Wu J, Oxley CL *et al.* TIPE3 is the transfer protein of lipid second messengers that promote cancer [J]. *Cancer Cell*, 2014, 26(4): 465-478.
- [5] Moniz LS, Vanhaesebroeck B. A new TIPE of phosphoinositide regulator in cancer [J]. *Cancer Cell* 2014, 26(4): 443-444.
- [6] Cui J, Hao C, Zhang W *et al.* Identical expression profiling of human and murine TIPE3 protein reveals links to its functions [J]. *J Histochem Cytochem* 2015, 63(3): 206-216.
- [7] 孟庆宇, 程小峰, 张佳锴, 等. 抗人 DR5 单链抗体诱导 HepG2 细胞凋亡的实验研究 [J]. *免疫学杂志* 2010, 26(7): 585-593.
- [8] 孟庆宇, 程晓峰, 张佳锴, 等. 抗人死亡受体 5 单链抗体 ZF1 对鼠 H22 肝癌细胞的作用分析 [J]. *中国免疫学杂志*, 2010, 26(9): 801-809.
- [9] Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme [J]. *Oncogene* 2008, 27(41): 5497-5510.
- [10] Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway in human cancer [J]. *Nat Rev Cancer* 2002, 2(7): 489-501.
- [11] Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E *et al.* Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells [J]. *Genes Dev* 2002, 16(8): 948-958.
- [12] Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis [J]. *Cell Death Differ* 1999, 6(2): 99-104.
- [13] Itoh N, Semba S, Ito M *et al.* Phosphorylation of Akt/PKB is required for suppression of cancer cell apoptosis and tumor progression in human colorectal carcinoma [J]. *Cancer* 2002, 94(12): 3127-3134.
- [14] Lee SH, Kim HS, Park WS *et al.* Non-small cell lung cancers frequently express phosphorylated Akt; an immunohistochemical study [J]. *APMIS* 2002, 110(7-8): 587-592.
- [15] al-Sheneber IF, Shibata HR, Sampalis J *et al.* Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in colorectal cancer [J]. *Cancer* 1993, 71(6): 1954-1959.

[收稿 2016-10-19 修回 2016-12-27]

(编辑 张晓舟)