

• 基础研究 •

慢病毒介导的靶向 SNCG 敲除对人结肠癌 SW1116 裸鼠结肠癌肝转移实验模型的影响

福建医科大学附属肿瘤医院 福建省肿瘤医院 (福州 350001) 许少华 周 东¹ 张 辉 陈昭硕

【摘要】目的 研究慢病毒介导的 γ 突触核蛋白 (SNCG) 基因敲除对人结肠癌 SW1116 细胞在裸鼠结肠癌肝转移实验模型中的影响。**方法** 前期实验中, 通过 SNCG 基因敲除并慢病毒转染, 构建稳定表达的 SNCG 敲除实验组 (RNAi 组)、转染空质粒的空质粒对照组 (NC 组)。复苏基因敲除实验组 (RNAi 组)、空质粒对照组 (NC 组) 及空白对照组 (CON 组) 的野生型 SW1116 细胞, 保脾法建立裸鼠结肠癌肝转移模型, 免疫组化染色、逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR)、蛋白质免疫印迹 (Western blot) 检测 SNCG 基因的表达。**结果** 1) 成功构建裸鼠结肠癌肝转移模型。2) 与对照组比较, RNAi 组裸鼠移植瘤生长缓慢, 原位成瘤率及肝转移率均明显下降。3) 免疫组化、RT-PCR 及 Western blot 结果显示, RNAi 组 SNCG mRNA 和蛋白表达均明显下降。**结论** SNCG 基因沉默后, 裸鼠脾脏原位移植瘤及转移瘤的数量变少, 体积变小。在体内, 靶向 SNCG 敲除降低了原位移植瘤及肝脏转移瘤中 SNCG 基因的 mRNA 及蛋白表达, 表明 SNCG 基因对结肠癌的增生、侵袭起积极推动作用。利用 RNAi 技术抑制 SNCG 基因的表达有望为结肠癌的基因治疗提供新靶点、新手段。

【关键词】 慢病毒载体; SNCG 基因; 基因敲除; 裸鼠; 结肠癌肝转移

【中图分类号】 R735 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2019)05-0120-04

The effect of the lentivirus-mediated RNA interference targeting SNCG gene on the growth of human colorectal carcinoma cell SW1116 in nude mice

XU Shaohua, ZHOU Dong, ZHANG Hui, CHEN Zhaoshuo. Fujian Provincial Tumor Hospital, the Affiliated Tumor Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350014, China

【Abstract】 Objective To study the effect of the lentivirus-mediated RNA interference targeting γ -synuclein (SNCG) gene on the growth of human colorectal carcinoma cell SW1116 in vivo of nude mice. **Methods** In earlier experiment, we first to screen SNCG RNAi effective target genes, then, transfected and packaged by the lentiviral vectors. Recombinant lentiviral vectors respectively carrying the SNCG-RNAi and SNCG-NC were successfully constructed. The SNCG-RNAi (RNAi group), SNCG-NC (NC group), and non-transfected Human colorectal carcinoma SW1116 cells (CON group), were thawed. And then the colon cancer liver metastasis model in nude mice was established. In order to find out the difference, SNCG gene expression in these tumor tissues were detected by Immunohistochemistry assay, RT-PCR and Western blot. **Results** 1) The colon cancer liver metastasis model in nude mice was successfully established. 2) Compared with those in NC group and CON group, the tumor in the RNAi group grew slowly and metastasis was evidently suppressed. 3) The mRNA and protein expression of SNCG of the tumor in the RNAi group were significantly lower according to the IHC result, RT-PCR and Western blot. **Conclusion** Recombinant lentivirus vector SNCG-RNAi decreased the growth and quantity of the tumor in the colon cancer liver metastasis model, including the primary and metastatic, and it can obviously inhibit SNCG gene mRNA and protein expression. So it prompt that the expression of SNCG gene promoted colorectal cancer to grow and transfer. SNCG is expected to become a potent target for the treatment of colon cancer.

【Key words】 lentiviral vector; SNCG Gene; RNA interference; nude mice; hepatic metastasis of colon carcinoma

早年 Lavedan 等^[1]研究认为, γ -synuclein (SNCG) 与帕金森、阿尔茨海默症等神经变性疾病密切相关。近年发现, SNCG 在一些肿瘤中散失组织特异性, 在乳腺癌、胰腺癌、结肠癌组织中高度表达^[2-4]。分子水平的研究发现, SNCG 基因具有癌基因的特性, 通过多种途径抑制细胞凋亡, 促进肿瘤的发生发展。但 SNCG 基因参与结肠癌发生发展的调控机制、作用靶点仍未明确。为了验证该基因对结肠癌肝转移的影响, 笔者通过建立裸鼠结肠癌肝转移模型, 观察原位肿瘤及转移瘤生长情况, 通过检验 SNCG 基因的表达, 进一步验证其对结肠癌肝转移的影响及能否成为结肠癌靶向治

疗的一个新靶点。

1 材料与方法

1.1 材料: SW1116 细胞系 (中国科学院上海细胞库)。转染 LV-SNCG-RNAi-EGFP 慢病毒质粒及转染空质粒的 SW1116 人结肠癌细胞已由前期实验构建完成。BALB/c nu/nu 裸小鼠, 雄性, 4~6 周龄, 20~25 g, SPF 级 (上海斯莱克实验动物有限公司, 动物合格证号: 2007000551268; 生产许可证号: SCXK (沪) 2012-0002)。一抗羊抗人 SNCG 抗体、羊抗 GAPDH 单抗、二抗 AP 标记的鼠抗羊 IgG (美国 Santa Cruz 公司)。

1.2 方法:

1.2.1 细胞复苏及收集: 复苏已制备的实验组、对照组及空白对照的野生型 SW1116 细胞, 传代、分装后调整细胞浓度至 $1 \times 10^7 / \text{mL}$, 冰浴保存, 30 min 内进行接种。

1.2.2 裸鼠结肠癌肝转移模型的建立: 将雄性裸小鼠按完全随机化原则分成 3 组, 每组 7 只, 根据注射肿瘤细胞类型分别标记为 SNCG 敲除的实验组 (RNAi 组)、空质粒的对照组 (NC 组)、空白对照的野生组 (CON 组)。保脾法建模, 参照文献方法^[5], 6 周后处死裸鼠, 解剖腹腔。

1.2.3 各实验组免疫组织化学染色: 分别取各实验组切片, 应用一抗羊抗人 SNCG 抗体、羊抗 GAPDH 单抗、二抗 AP 标记的鼠抗羊 IgG, 采取 SABC 法进行免疫组织化学染色。SNCG 蛋白位于肿瘤细胞的胞浆内, 呈棕黄色颗粒状散在或片状分布。

1.2.4 RT-PCR 检测各组标本 SNCG mRNA 的表达: 分别取各标本组织 50 mg, 研碎后依次进行 RNA 的提取、纯度鉴定、cDNA 的合成, SNCG 上游引物: 5'-TGGGTGCG-GTGGAAAAG-3', 下游引物 5'-GTTGACGCTGCTCAC-CACA-3'; GAPDH 上游引物 5'-TGACTTCAACAGCGA-CACCCA-3', 下游引物 5'-CACCTGTTGCTGTAGCCAAA-3'。以 GAPDH 为内参, 用 Carestream MI 图像分析软件进行半定量分析。

1.2.5 Western blot 检测各组标本 SNCG 蛋白的表达: 取各组冻存组织 50 mg, BCA 法测定蛋白浓度后进行 SDS-PAGE 电泳, 免疫反应时先加入一抗 (羊抗人 SNCG 抗体, 1:500), 置于 4℃ 环境过夜, 加入二抗 (AP 标记的鼠抗羊 IgG, 1:5000), 以 GAPDH 为内参, 用 Carestream MI 图像分析软件进行半定量分析。

1.3 统计学分析: 应用 SPSS 17.0 软件统计学处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间样本均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。RT-PCR 数值分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析法。

2 结果

2.1 裸鼠结肠癌肝转移模型构建情况: 建模后 6 周 CON 组及 NC 组均可见精神萎靡, 进食差, 四肢消瘦, 体质量下降至 16~19 g (其中 NC 组 1 只裸鼠因术后出血于术后第 1 天死亡)。两组裸鼠在脾区均可触及明显肿物, 质硬, 不可推动。CON 组有 4 只可在肝区触及质硬肿物。NC 组有 3 只可在肝区明显触及质硬肿物。两组均可发现明显腹部膨隆。RNAi 组共 2 只可在脾区触及肿物, 其余裸鼠精神、活动正常, 腹部未见阳性体征。

脾脏原位成瘤方面, RNAi 组成瘤率 28.57%, 成瘤率明显降低 (表 1)。在肝脏转移方面, RNAi 组肝转移率 14.29%, 较 CON 组及 NC 组明显下降。就成瘤个数而言, RNAi 组亦明显减少 [$P < 0.05$ (表 2)]。

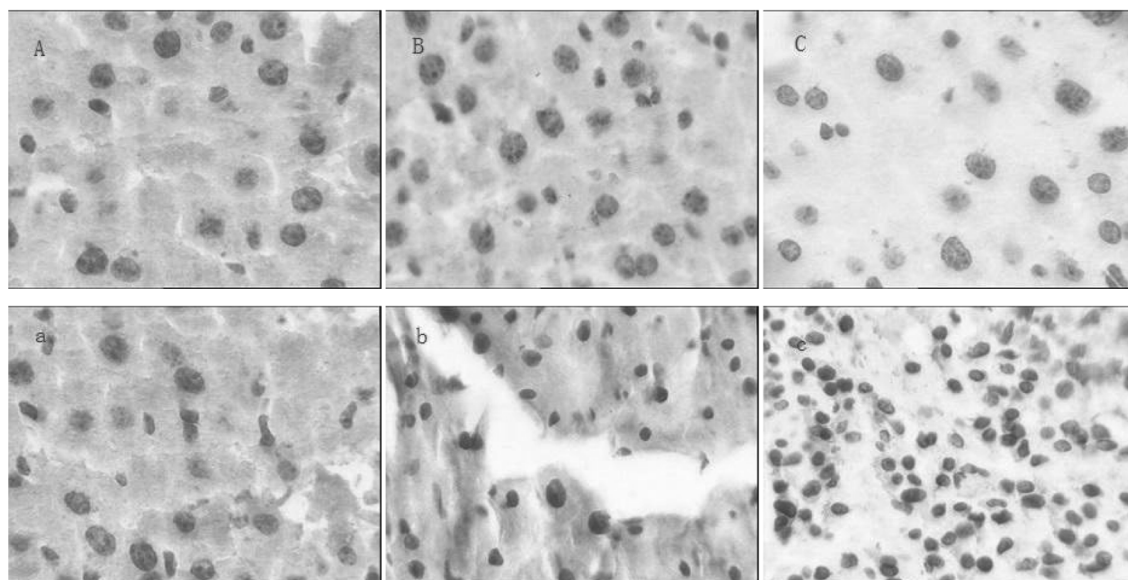
表 1 裸鼠脾脏、肝脏成瘤或腹腔播散情况比较

组别	脾脏原位肿瘤	肝脏转移瘤	腹腔播散
CON 组	7/7 (100.00%)	5/7 (71.43%)	3/7 (42.86%)
NC 组	6/6 (100.00%)	4/6 (66.67%)	2/6 (33.33%)
RNAi 组	2/7 (28.57%)	1/7 (14.29%)	0/7 (0)

表 2 裸鼠脾脏、肝脏成瘤或腹腔播散结节数比较

组别	脾脏成瘤数	肝脏成瘤数	腹腔结节数
CON 组	21	29	12
NC 组	16	27	11
RNAi 组	3	5	0

2.2 免疫组化染色结果: SNCG 蛋白位于肿瘤细胞的胞浆内, 呈棕黄色颗粒状散在或片状分布。实验结果显示, RNAi 组瘤体组织几乎不染色, CON 及 NC 组呈中度或强染色 (图 1)。



注: A/a、B/b、C/c 分别为 CON 组、NC 组、RNAi 组脾脏/肝脏免疫组化染色图

图 1 各组免疫组化染色镜检图 ($\times 400$)

2.3 RT-PCR 检测脾脏原位肿瘤及肝脏转移瘤 SNCG mRNA

表达结果: 如表 3 所示, 所得结果经各实验组的目的基因与内参照 GAPDH 的灰度比值。与 NC 组及 CON 组比较, RNAi 组灰度比值明显下降 ($P < 0.05$)。

表 3 脾脏原位肿瘤及肝脏转移瘤 SNCG mRNA 表达

SNCG/内参基因 (GAPDH)	脾脏	肝脏
空白对照组	0.376866226	0.299759312
NC 组	0.308630485	0.281629268
RNAi 组	0.15422739	0.100369443

2.4 蛋白质免疫印迹检测脾脏原位肿瘤及肝脏转移瘤

SNCG 蛋白结果: 蛋白质免疫印迹结果显示, 与 CON 组 (蛋白相对表达量: 脾脏 59.00, 肝脏 31.83)、NC 组细胞 (蛋白相对表达量: 脾脏 67.15, 肝脏 29.67) 比较, RNAi 组 (蛋白相对表达量: 脾脏 33.53, 肝脏 9.687) SW1116 细胞表达 γ -synuclein 蛋白明显减少 ($P < 0.05$)。

3 讨论

近年来, 尽管结肠癌早期诊断技术不断提高, 但仍有 40%~50% 患者初诊时已出现局部复发和 (或) 远处转移^[6], 其中肝转移仍是最常见的远处转移部位^[7]。因此, 抑制肿瘤浸润生长、远处转移对于治疗结肠癌显得愈加关键。既往研究发现, SNCG 在结肠癌组织中异常高表达, 且与临床病理分期及淋巴结转移、远处转移显著相关^[8]。那么 SNCG 是否增强结肠癌细胞的生长繁殖、侵袭转移的能力? 在结肠癌的演变过程中如何起到调控作用? 这些问题都尚待研究。Shao 等^[9]发现, SNCG 作为新型靶点作用于 TGF- β -Smad-Twist1 轴进而促进肿瘤进展。Ye 等^[10]的研究也发现, 干扰 SNCG 表达可使结肠癌体外增殖能力、侵袭能力均明显下降, 提示 SNCG 基因在人结肠癌细胞的生长和侵袭方面具有重要作用^[11], 但目前尚未见动物体内实验进一步验证的报道。

本试验在前期构建稳定表达 SNCG RNAi 基因的慢病毒载体的基础上, 通过体内实验进一步验证 SNCG 基因与结肠癌的关联情况。实验中我们采取保脾法构建裸鼠结肠癌肝转移模型。通过此次造模实验, 笔者体会如下: 1) 麻醉剂量的控制: 术前应准确测量裸鼠体质量, 因裸鼠对水合氯醛敏感性高, 剂量安全范围窄, 应严格按照 4 mL/kg 的剂量给药, 避免麻醉死亡; 2) 穿刺角度及深度: 进针后角度趋近于脾脏长轴水平面, 倾斜角过大易穿透脾脏。深度最深不超过脾脏后 1/3, 太深则损伤深部血管的可能性增大, 太浅容易使细胞悬液漏出, 形成区域种植。

人们普遍认为, 结肠癌从正常结肠上皮细胞到腺瘤再到癌最后发生转移, 需要经历一系列分子事件, 包括细胞外基质的降解、肿瘤细胞的局部浸润, 新生血管形成、免疫逃逸、恶变肠上皮细胞的侵袭和转移等^[12-13], 显然, 在这一系列过程中, 生长增殖能力是肿瘤发生发展的基础, 而侵袭能力则是发生侵袭转移的关键步骤。本实验在前期 SNCG 基因敲除、转染基础上进行裸鼠结肠癌肝转移模型实验。如前所说, 体外试验中, 实验组抑制 SNCG 基因的表达后使

SW1116 细胞侵袭能力下降, 说明 SNCG 可能与结肠癌细胞 SW1116 的侵袭相关, 其高表达在一定程度上促进了结肠癌细胞的侵袭转移。而裸鼠体内试验结果显示, 与空白对照 NC 组及野生型对照 CON 组比较, SNCG-RNAi 实验组原位肿瘤、转移瘤、腹腔转移肿瘤的数量、体积明显减少, 通过免疫组化染色、RT-PCR 及 Western blot 证实 SNCG mRNA 及蛋白表达均明显减少, 说明靶向干扰 SNCG 基因表达后人结肠癌细胞裸鼠移植瘤生长、转移能力明显受到抑制, 此结果与体外实验结果相互验证, 更进一步说明 SNCG 基因促进结肠癌生长繁殖、侵袭转移的能力。因此, SNCG 基因有望成为结肠癌基因治疗的一个新靶点。

参考文献

- [1] Lavedan C, Leroy E, Dehejia A, et al. Identification, localization and characterization of the human gamma-synuclein gene [J]. Hum Genet, 1998, 103 (1): 106-112.
- [2] Bruening W, Giasson BI, Klein-Szanto AJ, et al. Synucleins are expressed in the majority of breast and ovarian carcinomas and in preneoplastic lesions of the ovary [J]. Cancer, 2000, 88 (9): 2154-2163.
- [3] Hibi T, Mori T, Fukuma M, et al. Synuclein-gamma is closely involved in perineural invasion and distant metastasis in mouse models and is a novel prognostic factor in pancreatic cancer [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15: (8) 2864-2871.
- [4] Iwaki H, Kageyama S, Isono T, et al. Diagnostic potential in bladder cancer of a panel of tumor markers (calreticulin, gamma-synuclein, and catechol-o-methyltransferase) identified by proteomic analysis [J]. Cancer Sci, 2004, 95 (12): 955-961.
- [5] Fleten K G, Bakke K M, Mlandsmo G M, et al. Use of non-invasive imaging to monitor response to aflibercept treatment in murine models of colorectal cancer liver metastases [J]. ClinExp Metastasis, 2017, 34 (1): 51-62.
- [6] Kelly C, Cassidy J. Chemotherapy in metastatic colorectal cancer [J]. Surg Oncol, 2007, 16 (1): 65-70.
- [7] Rothbarth J, van de Velde CJ. Treatment of liver metastases of colorectal cancer [J]. Ann Oncol, 2005, 16 (2): 144-149.
- [8] 叶青, 冯波, 彭远飞, 等. 结直肠癌 γ -synuclein 基因启动子 CpG 岛的去甲基化及其临床意义 [J]. 中华胃肠外科杂志, 2010, 13 (6): 440-444.
- [9] Shao T, Song P, Hua H, et al. Gamma synuclein is a novel Twist1 target that promotes TGF- γ -induced cancer cell migration and invasion [J]. Cell Death Dis, 2018, 9 (6): 625.
- [10] Ye Q, Zheng M H, Cai Q, et al. Aberrant expression and demethylation of γ -synuclein in colorectal cancer, correlated with progression of the disease [J]. Cancer Sci, 2008, 99 (10): 1924-1932.
- [11] 黄峰, 许少华, 叶青, 等. RNA 干扰抑制 γ 突触核蛋白的表达对人结肠癌细胞株增殖和侵袭能力的影响 [J]. 中华胃肠外科杂志, 2016, 19 (4): 446-452.
- [12] Boedfeld W M, Bland K I, Heslin M J. Recent insights into angiogenesis, apoptosis, invasion, and metastasis in colorectal carcinoma [J]. Ann Surg Oncol, 2003, 10 (8): 829-851.

- [13] Rudmik LR, Magliocco AM. Molecular mechanism of hepatic metastasis in colorectal cancer [J]. J Surg Oncol, 2005, 92 (4): 347-359.

• 基础研究 •

仿生聚己内酯-壳聚糖复合骨组织支架的制备研究

福建省福州市第二医院骨科 (福州 300007) 翁 艳 郑 竑¹

【摘 要】 目的 以 CPC (磷酸钙骨水泥) 为基体, 以 PCL-CS (聚己内酯-壳聚糖) 为增强基体支架来制备微结构及力学性能优良的仿生网络结构复合多孔支架。**方法** 采用烧制、减压灌液法和相分离技术制备 PCL-CS/CPC 复合骨组织工程支架并进行表征。以 MTT 法及细胞计数板法分别测定 PCL-CS/CPC 复合骨组织工程支架及 CPC 支架内细胞活力及细胞黏附率。**结果** PCL-CS/CPC 复合骨组织工程支架孔容 $27.62 \text{ cm}^3/\text{g}$ 、平均孔径 $378.56 \mu\text{m}$ 、孔隙率 92.14% 、比表面积 $61.4 \text{ m}^2/\text{g}$ 、支架内各组细胞活力及细胞黏附率随着培养天数的增加而增长, PCL-CS/CPC 复合骨组织工程支架从第 4 天开始的支架内细胞增殖活力较 CPC 支架显著增强 ($P < 0.05$), 从第 2 天开始, PCL-CS/CPC 复合骨组织工程支架细胞黏附率显著高于 CPC 支架 ($P < 0.05$)。**结论** 成功制备了 PCL-CS/CPC 复合骨组织工程支架, 相较于传统的 CPC 骨架, 其在力学性能和生物学性能上均有所提高。

【关键词】 聚己内酯-壳聚糖/磷酸钙; 骨水泥; 骨组织工程支架; 复合材料

【中图分类号】 R608 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2019)05-0123-03

在替代与修复骨组织的众多材料中, 骨组织工程支架作为新兴材料对于骨组织缺损修复起着至关重要的作用。目前, 在骨组织工程支架中应用广泛的磷酸钙骨水泥 (CPC) 比传统材料具有任意塑形、降解速度慢、操作方便等优点, 但其韧性低、脆性差、机械性能低, 因此研究性能更好的材料刻不容缓。

本研究以 CPC 为基础物, 以聚己内酯-壳聚糖 (PCL-CS) 为增强物, 利用壳聚糖 (CS)、聚己内酯 (PCL) 和 CPC 材料的互补性, 不同材料自身结构及降解速率的差异性来构建复合型组织工程材料, 并对聚己内酯-壳聚糖磷酸钙骨水泥复合骨组织工程支架的结构进行表征, 同时考察其生物相容性, 为聚己内酯-壳聚糖磷酸钙骨水泥复合骨组织工程支架在替代及骨修复中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器: α -磷酸三钙 (α -TCP)、二水磷酸氢钙 (DCPD) (湖北鑫润德化工有限公司)、固相添加剂羟基磷灰石 (HA) (北京德科岛金科技有限公司)、无水 CaCO_3 (北京化工有限公司)、 Na_2HPO_4 (国安化学化工有限公司)、壳聚糖 (CS) (西安瑞禧生物科技有限公司)、聚己内酯-壳聚糖 (PCL) (深圳市光华伟业实业有限公司)、乙醇、戊二醛、豚鼠、新西兰兔、胎牛血清、DMEM- α 培养基; 差示扫描量热仪 (北京恒久实验设备有限公司)、X-射线衍射仪 (奥林巴斯仪器有限公司)、全自动比表面积和孔径分布分析仪 (美国麦克仪器公司)、S3500 激光粒度仪 (美国麦奇克有限公司)、场发射扫描电镜 [复纳科学仪器 (上海)

有限公司]、深温冷冻粉碎机 (青岛微纳粉体机械有限公司) 等。

1.2 方法:

1.2.1 CS/CPC 多孔支架的制备:

1.2.1.1 α -TCP 体系 CPC 固相粉末及固化液的配制: 按粉体重量比 $100 : 6 : 6 : 6$ 称取 α -TCP、DCPD、HA 和 CaCO_3 , 将它们放入陶瓷研钵中混合研磨 3 h, 过筛后得到平均粒径为 $4 \mu\text{m}$ 的 α -TCP 体系 CPC 固相粉末, 随后配制 2% 的 Na_2HPO_4 溶液作为固化液。

1.2.1.2 CS/CPC 的注塑: 将干燥后的 α -TCP 体系 CPC 粉末和 CS 微球与 1 L Na_2HPO_4 固化液混合, 装入准备好的圆柱形器具中凝固, 35°C 、 95% 以上湿度的空气中养护 $40 \sim 48 \text{ h}$ [1]。

1.2.1.3 CS/CPC 多孔支架的烧结: 将 CPC 及 CPC/CS 圆柱坯体烘干, $20^\circ\text{C}/\text{min}$, 1200°C 实验箱式烧结炉中进行烧结, 自然冷却后即得 CPC 多孔支架。

1.2.2 PCL-CS/CPC 多孔复合支架的制备及表征: 分别取 5 g PCL 和 CPC/CS 多孔支架按质量比 $1 : 1$ 的比例混合后溶解在 0.5 L 、 5.2% 的 TCP 溶液中, 其中 PCL 颗粒溶解前需在深温冷冻机中粉碎均匀并煅烧, 随后加入 5 mL 、 6.0% 的戊二醛, 在减压下灌入备好的 CPC 多孔支架中, 采用 TD-4 低速台式离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司) 以 $4000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 4 min 后取出, 40°C 干燥后即得 PCL-CS/CPC 多孔复合支架。利用场发射扫描电镜带能谱仪观察所制备的支架的表面微观形貌及平均孔径, 利用全自动比表

基金项目: 2018 年福建省自然科学基金面上项目 (2018J01358); 2017 年福建省自然科学基金面上项目 (2017J01337); 2018 年福建省临床重点专科建设项目

1 通信作者, Email: zhenghong_fj@126.com