

RNA干扰沉默*DcR3*对人胰腺癌细胞化疗药物敏感性影响的实验研究

肖华平^{1,2}, 谢辉¹, 罗春阳¹, 李庆¹, 方玉江²

1. 湘南学院附属医院肿瘤防治中心, 湖南 郴州 423000;

2. 美国密苏里大学医学院 Ellis Fischel 肿瘤中心, 密苏里州 哥伦比亚 65212

[摘要] **背景与目的:** 大部分胰腺癌具有高表达诱骗受体-3(decoy receptor 3, DcR3)的特征, 而后者与FasL凋亡途径相关, 可能导致胰腺癌对化疗耐药。该研究旨在探讨RNA干扰沉默*DcR3*基因对人胰腺癌细胞化疗药物敏感性的影响及其可能机制。**方法:** 构建带有*DcR3*-siRNA序列的稳定表达质粒, 通过LipofectamineTM2000转染至人胰腺癌细胞AsPC-1细胞株, 筛选出转染后稳定低表达*DcR3*的胰腺癌细胞, 同时设未转染对照组(control组)和转染阴性质粒对照组(mock组)。应用ELISA和蛋白[质]印迹法(Western blot)检测各组AsPC-1细胞中*DcR3*的蛋白表达; MTT实验检测各组AsPC-1细胞对吉西他滨的敏感性; 流式细胞术检测各组AsPC-1细胞凋亡情况; Western blot和实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)检测各组AsPC-1细胞中FasL、Caspase-8、Caspase-3蛋白和mRNA的表达。**结果:** 转染*DcR3*-siRNA后AsPC-1细胞中*DcR3*蛋白较其他对照组明显降低; 转染*DcR3*-siRNA后AsPC-1细胞对吉西他滨的敏感性显著增加; 沉默*DcR3*基因可以上调FasL、Caspase-8和Caspase-3的表达并促进吉西他滨诱导的细胞凋亡。**结论:** RNA干扰沉默*DcR3*基因可激活FasL/Caspase凋亡途径, 促进肿瘤细胞凋亡, 增加人胰腺癌AsPC-1细胞对化疗药物的敏感性。

[关键词] 诱骗受体-3; RNA干扰; 胰腺癌; 凋亡; 化疗敏感性

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2017.11.006

中图分类号: R735.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2017)11-0873-06

Effect of RNA interference silencing *DcR3* on chemosensitivity of human pancreatic cancer cells XIAO Huaping^{1,2}, XIE Hui¹, LUO Chunyang¹, LI Qing¹, FANG Yujiang² (1. Cancer Center, the Affiliated Hospital of Xiangnan University, Chenzhou 423000, Hunan Province, China; 2. Ellis Fischel Cancer Center, University of Missouri School of Medicine, Columbia 65212, Missouri, USA)

Correspondence to: XIAO Huaping E-mail: xiaohuaping1@163.com

[Abstract] **Background and purpose:** It has been demonstrated that decoy receptor 3 (DcR3) is over-expressed in pancreatic cancer, and DcR3 correlates with the expression of FasL, which may contribute to chemotherapy resistance in pancreatic cancer. The purpose of this study was to investigate the effect of RNA interference silencing *DcR3* gene on chemosensitivity of human pancreatic cancer cells and its possible mechanism. **Methods:** A stable expression plasmid with *DcR3*-siRNA sequence was constructed and transfected into human pancreatic cancer cell line AsPC-1 by LipofectamineTM2000. The *DcR3*-expressing pancreatic cancer cells with stable and low expression were selected. The protein expression of *DcR3* in AsPC-1 cells was detected by ELISA and Western blot. MTT assay was used to detect the sensitivity of each group of AsPC-1 cells to gemcitabine. Flow cytometry was used to detect the apoptosis of AsPC-1 cells after treatment with gemcitabine. The expressions of FasL, Caspase-8, Caspase-3 and mRNA in AsPC-1 cells were detected by Western blot and real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR). **Results:** The expression of *DcR3* protein in AsPC-1 cells was significantly lower than those in the other control groups. The sensitivity of AsPC-1 cells to gemcitabine was significantly increased after transfection with *DcR3*-siRNA compared with control and mock cell lines. Transfection of *DcR3*-siRNA significantly increased the apoptosis

of AsPC-1 cells induced by chemotherapeutic drugs. The expression of FasL, Caspase-8 and Caspase-3 protein and mRNA were up-regulated after transfection with DcR3-siRNA. **Conclusion:** RNA interference silencing *DcR3* gene can activate FasL/Caspase apoptosis pathway, promote tumor cell apoptosis and increase the sensitivity of human pancreatic cancer AsPC-1 cells to gemcitabine.

[**Key words**] Decoy receptor 3; RNA interference; Pancreatic cancer; Apoptosis; Chemosensitivity

胰腺癌是一种临床表现隐匿、发展迅速、预后极差的消化道恶性肿瘤, 由于胰腺癌早期症状隐匿, 诊断困难, 因而存活率极低^[1]。化疗是其重要的治疗方法, 然而至今单纯的化疗并没有给患者带来明显的生存获益。更为遗憾的是, 至今还未找到在胰腺癌对化疗药物耐受机制中起重要作用的耐受基因。一般认为, 化疗无效是由于凋亡受体或凋亡相关蛋白发生改变, 使凋亡信号不能顺利继续传递所致^[2-3]。因此, 我们在胰腺癌细胞中寻找能够影响其凋亡通道信号顺利传递的基因, 通过基因敲除减少该基因对凋亡通道的影响, 以期达到提高胰腺癌治疗效果的目的。

Fas是广泛存在于正常细胞和肿瘤表面的I型跨膜蛋白, Fas配体(Fas ligand, FasL)是Fas的天然配体, 属于II型膜蛋白。在部分恶性肿瘤细胞中FasL与Fas的结合产生的死亡信号是诱导肿瘤细胞凋亡的重要途径之一, 诱骗受体-3(decoy receptor 3, DcR3)是Pitti等^[4]在1998年发现的肿瘤坏死因子受体超家族成员, 是一种分泌型的可溶性的蛋白分子, 在它的氨基酸序列中缺少明显的跨膜结构, 其配体包括FasL、LIGHT和LT β R。有研究发现, DcR3通过竞争性抑制Fas和FasL的结合, 以及阻断LIGHT和LT β R及HVEM/TR2的相互作用, 从而阻断FasL和LIGHT介导产生的细胞凋亡, 被认为与肿瘤的发生、发展及免疫逃逸密切相关^[5-7]。本研究采用RNA干扰技术沉默*DcR3*, 旨在观察DcR3-siRNA对人胰腺癌AsPC-1细胞凋亡和化疗敏感性的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及细胞株

HiPerFect Transfection Reagent试剂盒购自

德国QIAGEN公司, ELISA检测试剂盒购自美国Bio-Techne公司, DcR3、 β -actin、Caspase-8和Caspase-3抗体购自美国Cell Signaling Technology公司, FasL抗体购自美国Santa Cruz Biotechnology公司, 核蛋白提取试剂盒购自美国Pierce公司, TRIzol购自美国Gibco公司, 碱性磷酸酶共轭抗兔及抗鼠IgG二抗购自美国Sigma公司, 实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)试剂盒购自美国Thermo Fisher Scientific公司, Annexin-V/PI凋亡检测试剂盒和流式细胞仪购自美国BD公司, 注射用吉西他滨购自美国Eli Lilly公司(批准文号: H20110535); 人胰腺癌细胞株AsPC-1由美国密苏里大学医学院Ellis Fischel肿瘤中心方玉江教授惠赠。

1.2 DcR3-siRNA的构建

应用筛选siRNA的软件, 选取DcR3靶序列为5'-CGCUGCAGCCUCUUGAUGGAGAUGUCC-3', 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成DcR3特异性siRNA序列。正义链序列: 5'-ACACCCACCUACCCUGGCTT-3'; 反义链序列: 5'-GCCAGGGGUAGGUGGGUGUTT-3'。同时将上述寡核苷酸序列打乱重新组合, 设计5'-GACACACCACCUCCCCUGCTT-3'和5'-GGCGACGGGUGUGAGGUGUTT-3'作为阴性对照。

1.3 细胞培养

人胰腺癌细胞株AsPC-1培养条件为: 含10%小牛血清PRMI-1640培养基(内含100 U/mL青霉素和0.1 mg/mL链霉素), 置于37 °C、CO₂体积分数为5%的培养箱中培养。

1.4 基因转染

按照HiPerFect Transfection Reagent转染试剂说明书中的实验步骤进行。用胰酶消化细

胞后,接种于6孔板上,转染时细胞每孔达到30%~50%。用Opti-MEM无血清培养基将已经构建的DcR3-siRNA稀释至100 nmol/L,混合均匀后加入HiPerFect,混合均匀后加入培养孔中。置于37℃、CO₂体积分数为5%的培养箱中继续培养48 h后可进行表达检测。同时设未转染对照组(control组)和转染阴性质粒对照组(mock组)。

1.5 ELISA实验

应用核蛋白提取试剂盒提取细胞蛋白,进行ELISA实验。首先用浓度100 μL/孔的抗DcR3单克隆抗体包被ELISA板,置于37℃下4 h;再加入5%小牛血清置于37℃下封闭40 min,封闭时将封闭液加满各反应孔,封闭结束后用洗涤液满孔洗涤3遍,每遍3 min;将稀释好的DcR3纯标品和待测样品加入酶标反应孔中,每样品至少加双孔,每孔100 μL,置于37℃下40~60 min,用洗涤液满孔洗涤3遍,每遍3 min;最后将生物素标记的抗DcR3抗体加入板中,室温温育1 h,每孔加入底物TMB 100 μL置于37℃条件下避光放置10 min,加入终止液显色,用酶标仪于492 nm处测定吸光度(D)值。

1.6 MTT实验

取对数生长期未转染的AsPC-1细胞、转染阴性质粒的AsPC-1细胞及转染DcR3-siRNA的AsPC-1细胞,分别接种于96孔培养板上,每5孔为1复孔,每孔接种1×10⁴个细胞,放入培养箱中培养,24 h后分别加入不同浓度的吉西他滨(0、0.01、0.1、1、10和100 μg/mL),设空白对照,加入等量培养基;72 h后加入5 mg/mL的MTT试剂10 μL;4 h后移去上清液,加入DMSO溶解沉淀,30 min后用酶标仪于490 nm处测定D值,细胞存活率=(实验组D值/对照组D值)×100%,以横坐标为药物浓度,纵坐标为细胞存活率,绘制细胞存活曲线;计算IC₅₀, $IC_{50} = \lg^{-1} [Xm - i(\Sigma P - 0.5)]$,其中,Xm为设计的最大浓度的对数值,i为各浓度倍比浓度的对数值,ΣP为各组生长抑制率之和,0.5为经验常数^[8],重复4次,取平均值。

1.7 流式细胞术Annexin-V/PI双染色实验

取用浓度为10 μg/mL的吉西他滨处理48 h

后的细胞用胰酶消化成悬液,收集细胞(5×10⁵个),PBS清洗2次,1×结合缓冲液再洗1次,按照Annexin-V/PI凋亡检测试剂盒说明书进行实验操作,即每份细胞加入100 μL的Binding Buffer、3 μL Annexin-V和3 μL PI,混匀,室温、避光、反应15 min,1 h内上流式细胞仪检测。

1.8 蛋白[质]印迹法(Western blot)

收集各组细胞,加入细胞裂解液(裂解缓冲液和蛋白酶抑制剂等体积混合,再加入DTT溶液,浓度为1 mmol/L)裂解细胞,提取总蛋白。用Bradford法测定蛋白浓度后各组取200 μg蛋白样本进行SDS-PAGE,通过电转印法将蛋白从SDS上转移至PVDF膜,5%脱脂奶室温封闭2 h,加入一抗(DcR3和FasL为1:1 000;Caspase-8和Caspase-3为1:500;β-actin为1:2 000),于4℃下温育过夜,TBST洗膜后加入辣根过氧化物酶连接的二抗(1:2 000)室温振荡温育1 h,最后NBT/BCIP显影,以目的条带与β-actin条带灰度值的比值计算目的蛋白的相对表达量。

1.9 RTFQ-PCR

用TRIzol提取各组细胞的总RNA,各取1 μg RNA反转录为cDNA,取2 μL cDNA以FasL引物(上游5'-GGTTGCCTTGGTAGGATTGG-3',下游5'-CCTTGAGTTGGACTTGCCTGTT-3',产物长度为196 bp)、Caspase-8引物(上游5'-TACTACCGA A A C T T G G A C C - 3',下游5'-GTGAAAGTAGGTTGTGGC-3',产物长度为515 bp)、Caspase-3引物(上游5'-ATGGAGAACAATAAAACCT-3',下游5'-CTAGTGATAAAAGTAGAGTTC-3',产物长度为834 bp)及GAPDH引物(上游5'-TGA C T T C A A C A G C G A C A C C C A C - 3',下游5'-A A C T G T G A G G A G G G G A G A T T C - 3',产物长度为277 bp)进行PCR扩增,分别检测各组中的FasL、Caspase-8、Caspase-3和内参GAPDH的mRNA表达水平。PCR反应条件为:94.0℃变性45 s;60.0℃(FasL)、50.6℃(Caspase-8)、

50.0 °C(Caspase-3)退火60 s, 进行30个循环, 72.0 °C延伸5 min。最后取扩增产物在1.5%的琼脂糖凝胶上电泳, 产物条带用凝胶成像系统照相并进行灰度分析, 目的片段的相对表达量=目的基因的灰度值/GAPDH的灰度值。

1.10 统计学处理

采用SPSS 20.0软件进行统计学分析, 细胞存活率、抑制率及凋亡率用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用LSD-*t*检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 转染DcR3-siRNA后AsPC-1细胞中DcR3蛋白水平的变化

采用ELISA检测DcR3蛋白量, 结果显示, DcR3-siRNA组的DcR3蛋白量明显少于control组和mock组($P<0.01$, 图1A)。Western blot结果进一步证实, DcR3-siRNA组中DcR3蛋白的表达水平明显低于control组和mock组($P<0.01$, 图1B)。DcR3-siRNA对DcR3蛋白表达具有特异性的基因沉默效应, 其沉默的效率与ELISA结果一致。

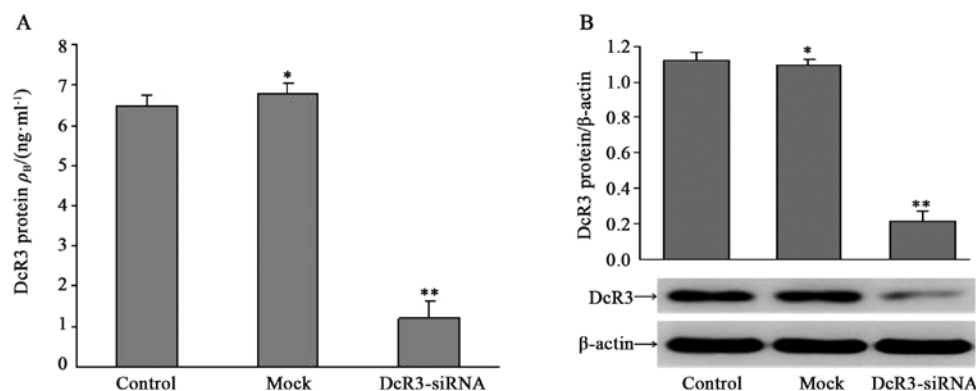


图1 各组细胞中DcR3蛋白的表达

Fig. 1 The expression of DcR3 protein in Aspc-1 cells

A: Changes in DcR3 protein quantity of each group; B: Changes in DcR3 protein expression of each group. *: $P>0.05$, compared with control group; **: $P<0.05$, compared with control group and mock group

2.2 转染DcR3-siRNA后AsPC-1细胞对吉西他滨化疗敏感性的变化

应用MTT实验检测AsPC-1细胞对吉西他滨的敏感性。结果显示, control组、mock组和DcR3-siRNA组AsPC-1细胞的存活率随着吉西他滨浓度增加而降低, DcR3-siRNA组AsPC-1细胞的存活率降低更显著(图2A); DcR3-siRNA组AsPC-1细胞对吉西他滨的 IC_{50} 值为 (0.21 ± 0.02) $\mu\text{g}/\text{mL}$, mock组AsPC-1细胞对吉西他滨的 IC_{50} 值为 (2.25 ± 0.32) $\mu\text{g}/\text{mL}$, control组AsPC-1细胞对吉西他滨的 IC_{50} 值为 (2.16 ± 0.35) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。转染DcR3-siRNA后, AsPC-1细胞对吉西他滨的敏感性明显增加, 与mock组和control组相比, 差异均有统计学意义

($P<0.05$, 图2B)。

2.3 吉西他滨处理后各组AsPC-1细胞凋亡的变化

流式结果显示, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 吉西他滨处理48 h后control组、siRNA(-)组和DcR3-siRNA组细胞凋亡率分别为 $11.2\%\pm 0.34\%$ 、 $11.5\%\pm 1.15\%$ 和 $54.1\%\pm 2.76\%$, DcR3-siRNA组凋亡率明显高于control组和mock组($P<0.05$, 图3), 提示吉西他滨处理后的DcR3-siRNA组细胞凋亡现象更加严重。

2.4 转染DcR3-siRNA后各组细胞中FasL、Caspase-8、Caspase-3蛋白和mRNA表达的变化

Control组、mock组和DcR3-siRNA组细胞

接受吉西他滨处理后,采用Western blot检测各组FasL、Caspase-8和Caspase-3的蛋白表达,结果显示,DcR3-siRNA组FasL、Caspase-8和Caspase-3的蛋白表达水平明显高于其他各组,三者之间差异有统计学意义($P < 0.05$,图4A、

B、C)。RTFQ-PCR进一步证实,转染DcR3-siRNA后可以上调FasL、Caspase-8和Caspase-3 mRNA的表达(图4D、E、F),其上调的效应与Western blot结果一致。

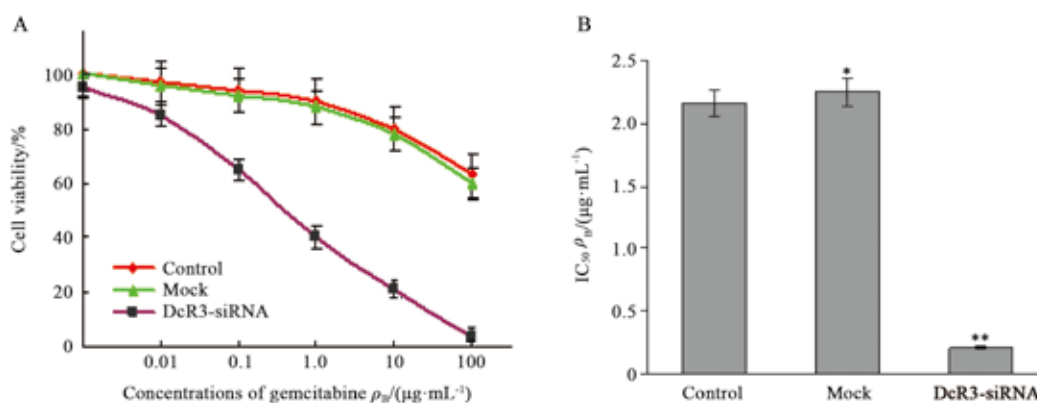


图2 不同浓度吉西他滨处理后各组细胞存活曲线和 IC_{50}

Fig. 2 The cell viability and IC_{50} of different concentrations of gemcitabine after treatment

A: The survival rates of AsPC-1 cells in control group, mock group and DcR3-siRNA group decreased as the concentration of gemcitabine increased, and the survival rate of AsPC-1 cells in DcR3-siRNA group decreased more significantly. B: Changes in IC_{50} of each group. *: $P > 0.05$, compared with control group; **: $P < 0.05$, compared with control group and mock group

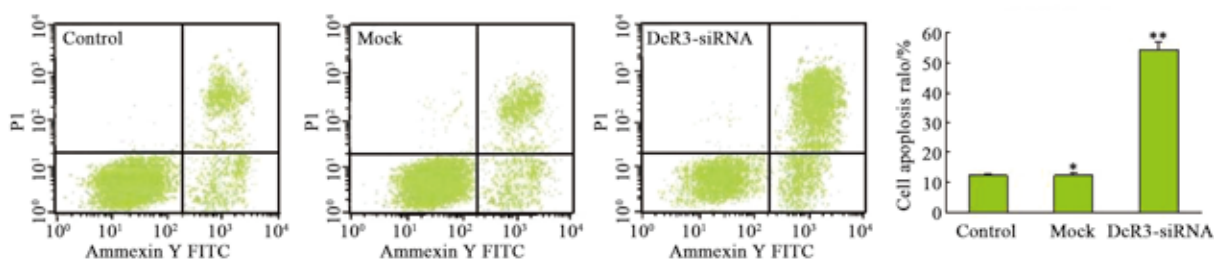


图3 吉西他滨处理后各组AsPC1细胞的凋亡情况

Fig. 3 Apoptosis of AsPC1 cells in each group treated with gemcitabine

Control, mock and DcR3-siRNA cells treated with gemcitabine and then tested by Annexin V/PI. Three independent experiments were shown as error bars on the right. *: $P > 0.05$, compared with control group; **: $P < 0.05$, compared with control group and mock group. The experiments were repeated for three times

3 讨论

多项研究发现, DcR3在胰腺癌中高表达,与胰腺癌化疗敏感性密切相关^[8-10]。Sung等^[9]研究肺癌细胞发现, DcR3的高表达增强了肿瘤细胞对放射的抵抗,当敲除DcR3基因后,可以明显增加肿瘤细胞凋亡,从而增加肺癌细胞的化疗敏感性。Wang等^[10]研究提示,沉默胰腺癌中DcR3高表达,可以增加胰腺癌细胞对吉西他滨的敏感性。

本实验将DcR3-siRNA转染至AsPC-1细胞

后,通过药物敏感性实验发现,沉默DcR3基因组的AsPC-1细胞对放射的敏感性明显要高于未沉默的细胞组。化疗药物处理后,沉默DcR3基因的AsPC-1细胞组凋亡率明显高于未沉默组的细胞凋亡率。提示沉默DcR3基因后可以促进化疗诱导的凋亡而增加人胰腺癌AsPC-1细胞的化疗敏感性。

DcR3调节细胞的凋亡是通过与FasL竞争性的结合而阻断凋亡信号转导来实现的。FasL凋亡信号转导与Caspase的激活密切相关,本实验发现,转染DcR3-siRNA后AsPC-1细胞中的FasL、Caspase-8和Caspase-3都存在明显的上调

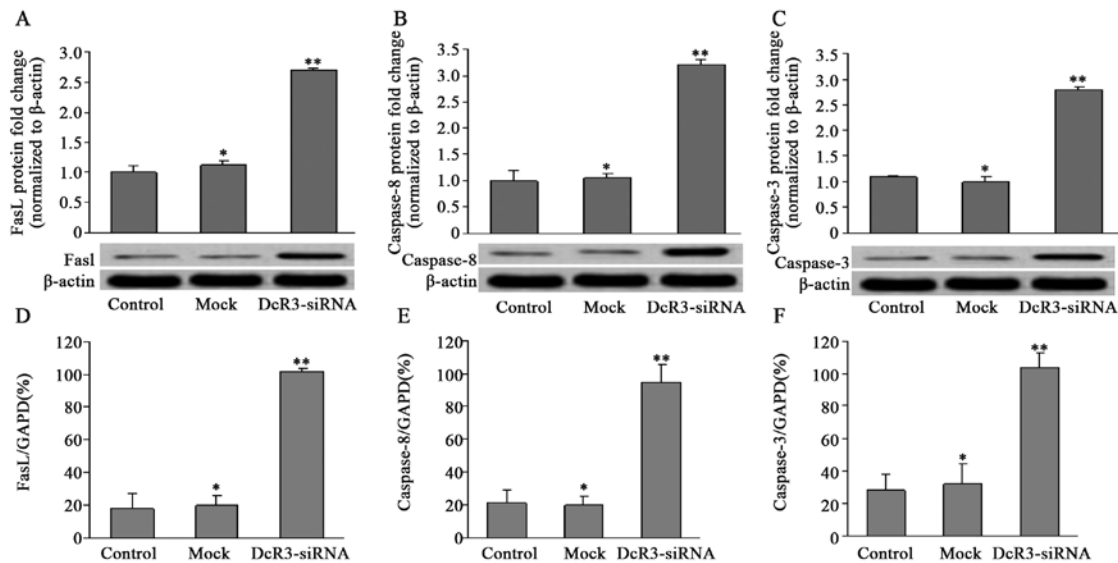


图4 转染DcR3-siRNA后可激活FasL、Caspase-8和Caspase-3的表达

Fig. 4 The expression of FasL, Caspase-8 and Caspase-3 after transfect DcR3-siRNA

A: Changes in FasL protein expression of each group; B: Changes in Caspase-8 protein expression of each group; C: Changes in Caspase-3 protein expression of each group, D, E, F: Changes in FasL, Caspase-8 and Caspase-3 mRNA of each group; *: $P>0.05$, compared with control group; **: $P<0.05$, compared with control group and mock group

现象。Caspase-8基因是FasL途径凋亡通路的启动基因，其下游就是Caspase-3基因，Caspase-3基因被认为是FasL凋亡途径的最终执行者^[11]。本实验结果提示，DcR3-siRNA诱导细胞凋亡增加细胞放射敏感性可能是通过激活FasL/Caspase途径来实现的。

本研究表明，RNA干扰沉默DcR3基因可以增加人胰腺癌AsPC-1细胞对吉西他滨的敏感性，可能是沉默DcR3基因可激活FasL/Caspase凋亡途径，促进细胞凋亡所致。提示DcR3→FasL→Caspase通路在人胰腺癌细胞对化疗的敏感性起着至关重要的作用，有望成为人胰腺癌细胞基因治疗新的靶点之一。

[参 考 文 献]

- [1] 倪泉兴, 虞先濬, 刘 亮. 中国胰腺癌临床诊断标准的探讨 [J]. 中国癌症杂志, 2012, 22(2): 81-87.
- [2] WU Z H, LIN C, LIU M M, et al. Src inhibition can synergize with gemcitabine and reverse resistance in triple negative breast cancer cells via the AKT/c-Jun pathway [J]. PLoS One, 2016 11(12): e0169230.
- [3] SAROSIEK K A, FRASER C, MUTHALAGU N, et al. Developmental regulation of mitochondrial apoptosis by c-Myc governs age- and tissue-specific sensitivity to cancer

therapeutics [J]. Cancer Cell, 2017, 31 (1): 142-156.

- [4] PITTI R M, MARSTERS S A, LAWRENCE D A, et al. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer [J]. Nature, 1998, 396(6712): 699-703.
- [5] ZHANG Y, LI D, ZHAO X, et al. Decoy receptor 3 suppresses FasL-induced apoptosis via ERK1/2 activation in pancreatic cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 463(9): 1144-1151.
- [6] ZHOU J, SONG S, HE S, et al. Silencing of decoy receptor 3 (DcR3) expression by siRNA in pancreatic carcinoma cells induces Fas ligand-mediated apoptosis *in vivo* and *in vivo* [J]. Int J Mol Med, 2013, 32(3): 653-660.
- [7] LIN W W, HSIEH S L. Decoy receptor 3: a pleiotropic immunomodulator and biomarker for inflammatory diseases, autoimmune diseases and cancer [J]. Biochem pharmacol, 2011, 81(7): 838-847.
- [8] 蒋知俭主编. 医学统计学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 138-140.
- [9] SUNG H Y, WU H G, AHN J H, et al. Der3 inhibit p53-dependent apoptosis in gamma-irradiated lung cancer cells [J]. Int J Radiat Biol Cancer, 2010, 86(9): 780-790.
- [10] WANG X, ZHANG M, SUN W, et al. Reduction of decoy receptor 3 enhances TRAIL-mediated apoptosis in pancreatic cancer [J]. PLoS One, 2013, 8(10): e74272.
- [11] YUAN J, NAJAFOV A, PY B F. Roles of Caspases in necrotic cell death [J]. Cell, 2016, 167(7): 1693-1704.

(收稿日期: 2017-05-10 修回日期: 2017-10-09)