

## · 论著 ·

# Wilms 瘤基因 1 低表达和过表达乳腺癌细胞模型的建立

齐晓伟 杨新华 张毅 范林军 张帆 陈莉 唐振宁 张彦 杨晓宁 宗贝歌  
胡保全 王明浩 姜军

**【摘要】** 目的 应用 RNA 干扰(RNAi)和 RNA 激活(RNAa)技术,分别构建小干扰 RNA(siRNA)和双链 RNA(dsRNA),建立 Wilms 瘤基因 1(WT1)低表达和过表达的乳腺癌细胞模型。方法 以国外学者提供的 3 条序列(siRNA-516、siRNA-803、siRNA-1029)构建 WT1 siRNA 干扰表达 WT1,以研究已证实可上调 WT1 表达的序列(dsRNA-319)构建 dsRNA 过表达 WT1,通过脂质体(Lipofectamine™ 2000)分别将 siRNA 和 dsRNA 转入 MDA-MB-321 和 MCF-7 细胞。WT1 有效 siRNA 筛选实验分为 6 组:WT1 siRNA-516、WT1 siRNA-803、WT1 siRNA-1029、阴性对照、脂质体组和空白细胞组;观察转染效率的时间点为转染后 24、48、72 h。WT1 dsRNA 的筛选实验分为 3 组:WT1 dsRNA-319、阴性对照组和空白细胞组;观察转染效率的时间点为转染后 48、72、96 h。通过实时定量 PCR(qRT-PCR)和 Western Blotting 筛选作用效果最明显的 siRNA 和 dsRNA。使用单因素方差分析进行统计学分析。结果 成功构建 WT1 siRNA-516、WT1 siRNA-803 和 WT1 siRNA-1029 共 3 个 siRNA,并转染到 MDA-MB-231 细胞中,转染效率达 90% 以上。上述 3 个 WT1 siRNA 均能够抑制 WT1 mRNA 和蛋白的表达,以转染后 48 h WT1 siRNA-1029 的效果最为显著[WT1 siRNA-1029 组 WT1 mRNA 表达水平与空白细胞组相比显著降低( $0.49 \pm 0.02$  比  $1.00 \pm 0.08$ ,  $P=0.00$ ),其蛋白表达水平也明显降低]。成功将 WT1 dsRNA-319 转染到 MCF-7 细胞中,转染效率达 90% 以上。50  $\mu\text{mol/L}$  的 WT1 dsRNA-319 转染后 96 h, MCF-7 细胞的 WT1 过表达最为显著[WT1 dsRNA-319 组的 WT1 mRNA 表达水平与空白细胞组相比显著升高( $319.06 \pm 14.84$  比  $1.00 \pm 0.07$ ,  $P=0.00$ ),其蛋白表达水平也明显升高]。结论 成功建立低表达 WT1 的 MDA-MB-231 细胞和过表达 WT1 的 MCF-7 细胞模型,为后续进一步研究 WT1 在乳腺癌中的生物学行为奠定了基础。

**【关键词】** Wilms 瘤基因 1; RNA 干扰; RNA 激活; 乳腺肿瘤

**【中图分类号】** R737.9 **【文献标志码】** A

**Establishment of the Wilms' tumor gene 1 low and over-expression models in breast cancer cells** QI Xiao-wei, YANG Xin-hua, ZHANG Yi, FAN Lin-jun, ZHANG Fan, CHEN Li, TANG Zhen-ning, ZHANG Yan, YANG Xiao-ning, ZONG Bei-ge, HU Bao-quan, WANG Ming-hao, JIANG Jun. Department of Breast Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Corresponding author: JIANG Jun, Email: jcbd@medmail.com.cn

**【Abstract】 Objective** To construct small interfering RNA (siRNA) and double strands RNA (dsRNA) by RNA interference (RNA interference, RNAi) and RNA activation (RNA activating, RNAa), and establish the low and over-expression model of Wilms' tumor gene 1 (WT1) in breast cancer cells.

**Methods** Three sequences (siRNA-516, siRNA-803 and siRNA-1029) established by foreign scholars were adopted to construct WT1 siRNA; one sequence (dsRNA-319) which demonstrated to be able to up-regulate WT1 expression was adopted to construct WT1 dsRNA. siRNA and dsRNA were transfected into MDA-MB-321 and MCF-7 cells by Lipofectamine™ 2000, respectively. WT1 siRNA screening experiment contained six groups:

WT1 siRNA-516, WT1 siRNA-803, WT1 siRNA-1029, negative control, transfection reagent and blank groups, and the points of time for observation were at 24, 48 and 72 h after transfection, respectively. WT1 dsRNA screening experiments contained three groups: WT1 dsRNA-319, negative control and blank group, and the point of time for observation was at 48, 72 and 96 h after transfection respectively. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western Blotting were performed to select siRNA and dsRNA with obvious impacts on WT1 expression. The one-way ANOVA was used for statistical analysis. **Results** Three WT1 siRNAs (WT1 siRNA-516, WT1 siRNA-803 and WT1 siRNA-1029) were successfully constructed and transfected into MDA-MB-231 cells with transfection efficiency >90%. WT1 siRNAs could effectively inhibit the expression of WT1 mRNA and protein, among which siRNA-1029 could inhibit the WT1 mRNA expression at 48 h after transfection most significantly ( $0.49 \pm 0.02$  for WT1 siRNA-1029 group vs  $1.00 \pm 0.08$  for blank group,  $P=0.00$ ; the protein expression was also decreased dramatically). WT1 dsRNA-319 could increase the expression of WT1 mRNA in MCF-7 cell with transfection efficiency >90%. The most significant impact was achieved in  $50 \mu\text{mol/L}$  WT1 dsRNA-319 group at 96 h after transfection ( $319.06 \pm 14.84$  for WT1 dsRNA-319 group vs  $1.00 \pm 0.07$  for blank group,  $P=0.00$ ; the protein expression was also increased remarkably). **Conclusion** The low expression WT1 model in MDA-MB-231 cells and the over-expression WT1 model in MCF-7 cells are successfully established, which provides a basis for subsequent study on WT1 biological behaviors in breast cancer.

**【Key words】** Wilms' tumor gene 1; RNA interference; RNA activating; Breast neoplasms

乳腺癌是女性最常见和病死率最高的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>,但具体发病和进展过程及机制至今尚不明确。因此,进一步揭示已知癌基因或抑癌基因的功能,对阐明恶性肿瘤发生和演进机制具有重要意义<sup>[2]</sup>。Wilms 瘤基因 1 (Wilms' tumor gene 1, WT1) 首先在肾母细胞瘤(又称 Wilms 瘤)中作为抑癌基因被克隆鉴定,定位于 11p13<sup>[3]</sup>。WT1 在成人组织中的异常表达与多种恶性肿瘤的发生密切相关,但根据细胞特征不同,其可发挥癌基因或抑癌基因作用<sup>[4]</sup>。笔者前期的研究结果<sup>[5]</sup>以及其他学者的研究<sup>[6]</sup>均提示 WT1 在乳腺癌的发生过程中起癌基因作用,但 WT1 是否参与乳腺癌的侵袭转移过程、具体作用及分子机制如何,至今尚不清楚。为进一步探讨上述问题,本研究拟应用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)和 RNA 激活(RNA activating, RNAa)方法,利用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 和双链 RNA (double strands RNA, dsRNA) 分别建立 WT1 低表达和高表达的乳腺癌细胞模型,以期为进一步研究 WT1 在乳腺癌中的生物学功能提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

乳腺癌 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库/中国科

学院上海生命科学研究院细胞资源中心;DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) 高糖培养基购自美国 Hyclone 公司;FBS 购自美国 Gibco 公司;WT1 兔单克隆抗体及羊抗兔二抗抗体均购于美国 Santa 公司;GAPDH 兔单克隆抗体购自美国 Epitomics 公司;脂质体 (Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000) 购于美国 Introgen 公司;RNA 裂解液、实时定量 PCR (quantitative real-time-PCR, qRT-PCR) 试剂盒均购于中国 TaKaRa 公司;WT1 及 GAPDH 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;倒置荧光显微镜为德国 Olympus 公司产品。

### 1.2 细胞培养及传代

将 MDA-MB-231 及 MCF-7 细胞培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养基,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的孵育箱中培养,常规用 0.25% 胰酶消化传代。实验所用细胞均处于对数生长期。

### 1.3 研究设计

将不同比例的脂质体与 siRNA (a: 0.25  $\mu\text{L}$  脂质体 : 2.5 pmol siRNA; b: 0.25  $\mu\text{L}$  脂质体 : 5 pmol siRNA; c: 0.5  $\mu\text{L}$  脂质体 : 5 pmol siRNA; d: 1  $\mu\text{L}$  脂质体 : 10 pmol siRNA) 混合后,分别转染 MDA-MB-231 细胞,从中筛选出最佳比例的脂质体和 siRNA,之后通过 qRT-PCR 以及 Western Blotting 筛选有效的 siRNA 序列和转染时间点。

按照文献[7]推荐的浓度 (50  $\mu\text{mol/L}$ ),在 MCF-7 细胞中转染 dsRNA,之后通过 qRT-PCR 筛

选有效时间点,并用 Western Blotting 在蛋白水平进一步评估 qRT-PCR 筛选出的时间点的有效性。

#### 1.4 实验分组及转染观察时间点

MDA-MB-231 细胞 WT1 有效 siRNA 筛选的实验分为 6 组,即 WT1 siRNA-516 转染组、WT1 siRNA-803 转染组、WT1 siRNA-1029 转染组、阴性对照组(negative control, NC; WT1 siRNA 携带无关序列)、脂质体组和空白细胞组。观察转染效率的时间点为转染后 24、48、72 h。

MCF-7 细胞 WT1 dsRNA 的筛选实验分 3 组,即 WT1 dsRNA-319 转染组、阴性对照组和空白细胞组。根据文献[7-8],选取 50  $\mu\text{mol/L}$  为 dsRNA 的转染浓度。观察转染效率的时间点为转染后 48、72、96 h。

#### 1.5 WT1 siRNA 的合成

WT1 siRNA 序列由西班牙纳瓦拉大学(University of Navarra)的 Carmen Berasain 教授友情提供<sup>[9]</sup>。分别针对 WT1 基因外显子 4、7 和 10 设计的 WT1 siRNA-516、WT1 siRNA-803 和 WT1 siRNA-1029 序列,以及 siRNA-NC 序列均由上海吉玛制药有限公司提供(所有序列见表 1)。羧基荧光素(carboxyfluorescein, FAM)标记的 WT1 siRNA-516、WT1 siRNA-803、WT1 siRNA-1029 及 WT1 siRNA-NC 均由上海吉玛制药有限公司合成,并通过测序等质检过程。

#### 1.6 WT1 dsRNA 的合成

WT1 dsRNA 序列(WT1 dsRNA-319 和 WT1 dsRNA-NC,序列见表 2)由美国加利福尼亚大学(University of California)的 Li Cheng-long 教授设

计<sup>[7]</sup>。高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)纯化的 WT1 dsRNA-319 和荧光标记的 WT1 dsRNA-NC 均由上海吉玛制药有限公司合成,并通过测序等质检过程。

#### 1.7 WT1 siRNA 和 WT1 dsRNA 的转染

siRNA 以及 dsRNA 的转染均严格按照脂质体操作说明书进行操作。

siRNA 转染:转染前 1 d,将  $(3 \sim 5) \times 10^5$  个 MDA-MB-231 细胞接种于 6 孔板中,使转染时细胞融合度能够达到 30% ~ 50%。转染时,首先取 5  $\mu\text{l}$  脂质体(使用前轻轻摇匀),用 250  $\mu\text{l}$  Opti-MEM 减血清培养基稀释,轻轻混和后在室温孵育 5 min;之后,取 5  $\mu\text{l}$  FAM-siRNA,用 250  $\mu\text{l}$  Opti-MEM 减血清培养基稀释,轻轻混和均匀;随后,将稀释的脂质体与稀释 FAM-siRNA 轻轻混和,室温静置 20 min,以形成 FAM-siRNA-转染试剂混和液;最后,将 FAM-siRNA-转染试剂混和液加入含有细胞及培养液(约含 1.5 ml)的孔中,轻轻摇晃孔板,使之混和,并置于 37  $^{\circ}\text{C}$  的  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。4 ~ 6 h 后,将培养基换为含血清的完全培养基,同时利用荧光显微镜观察荧光标记细胞与总细胞的比例,评估转染效率<sup>[10]</sup>。

dsRNA 转染 MCF-7 细胞的方法和转染效率评价同上。

#### 1.8 qRT-PCR 检测各组 WT1 mRNA 的表达情况

按上述实验分组和转染观察时间点,提取细胞总 RNA,按 TaKaRa 试剂盒说明书进行反转录和 PCR 反应。引物序列:WT1 上游引物 5'-ccacac caggactcatcagg-3',下游引物 5'-atgttgatggcggactaa

表 1 Wilms 瘤基因 1(WT1) 小干扰 RNA(siRNA)序列

siRNA	靶点	序列	荧光标记
WT1 siRNA-516	外显子 4	5'-GACAAUUUUAACCAAAUGATT-3'	FAM
WT1 siRNA-803	外显子 7	5'-GCUGUCCACUACAGAUGdTdT-3'	FAM
WT1 siRNA-1029	外显子 10	5'-AAGCCCUUCAGCUGUCGGUdTdT-3'	FAM
WT1 siRNA-NC		5'-CGUACGCGGAUACUUCGAdTdT-3'	FAM

NC:阴性对照;FAM:羧基荧光素

表 2 Wilms 瘤基因 1(WT1) 双链 RNA(dsRNA)序列

dsRNA	序列	末端标记
WT1 dsRNA-319	5'-FGACUCACUGCUUACCUGAA[ dT ][ dT ] -3'	HPLC
	5'-RUUCAGGUAAGCAGUGAGUC[ dT ][ dT ] -3'	
WT1 dsRNA-NC	5'-ACUACUGAG UGACAGUAGA[ dT ][ dT ] -3'	FAM
	5'-UCUACUGUCACUCAGUAGU[ dT ][ dT ] -3'	

NC:阴性对照;FAM:羧基荧光素;HPLC:高效液相色谱法



t-3'; GAPDH 上游引物 5'-ctttggtatcgtggaaggactc-3', 下游引物 5'-gtagaggcagggatgatgttct-3'。反转录条件: 42 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C 5 min。qRT-PCR 反应条件: 95 °C 预变性 90 s, 95 °C 5 s, 62.5 °C 30 s 共 40 个循环进行扩增, 65 °C 1 s 进行融解曲线分析。实验重复 3 次, 根据  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>[10-11]</sup> 计算 WT1 mRNA 相对表达量(即目的基因的 Ct 值与 GAPDH Ct 值的比值)并进行统计。

### 1.9 Western Blotting 检测 WT1 蛋白的表达情况

按上述实验分组和转染观察时间点, 用细胞裂解液提取各组细胞上清液中的总蛋白, 用 Bradford 法检测其浓度。取 50  $\mu$ g WT1 蛋白行 12% 的 SDS-PAGE 并转聚偏二氟乙烯膜, 用含 5% 脱脂奶粉的封闭液室温封闭 4 h, 加 1:1000 稀释的一抗 37 °C 孵育 4 h, 用洗涤缓冲液漂洗后加 1:2500 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗, 于 37 °C 孵育 2 h 后, 加电化学发光显色试剂在暗室中进行曝光和显影。通过对胶片进行扫描, 比较各组灰度值的变化。

### 1.10 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组数据比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD(方差整齐)或者 Tamhane's T2(M)(方差不齐)检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 在 MDA-MB-231 细胞中确定最佳的脂质体与 siRNA 的比例

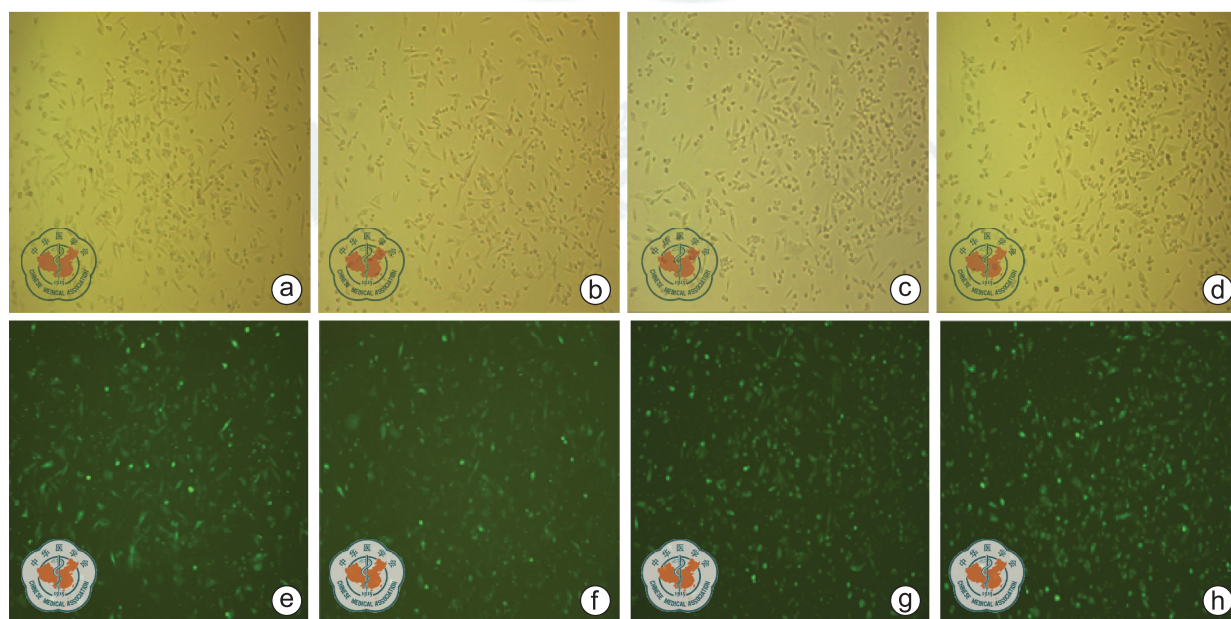
显微镜下观察, 不同比例的脂质体: siRNA 组均能达到 90% 左右转染效率(图 1)。综合考虑不同比例组的转染效率及细胞状态, 后续实验以 0.25  $\mu$ l 脂质体: 2.5 pmol siRNA 的比例转染 MDA-MB-231 细胞。按此比例(脂质体/siRNA)扩大培养体积在六孔板中进行细胞转染, 荧光显微镜下观察到转染效率达 90% 以上(图 2)。

### 2.2 WT1 siRNA 有效序列的筛选

与空白细胞组相比, WT1 siRNA-516、WT1 siRNA-803 和 WT1 siRNA-1029 在转染后 24、48、72 h 均能显著降低 MDA-MB-231 细胞的 WT1 mRNA 表达水平(统计结果详见表 3)。WT1-siRNA-1029 在转染后 48 h 时可显著降低 MDA-MB-231 细胞中 WT1 蛋白的表达水平(图 3)。结合 qRT-PCR 与 Western Blotting 结果, 确定 WT1 siRNA-1029 在转染后 48 h 对 MDA-MB-231 细胞的干扰效率最佳, 可以此作为后续功能实验的转染对象和条件。

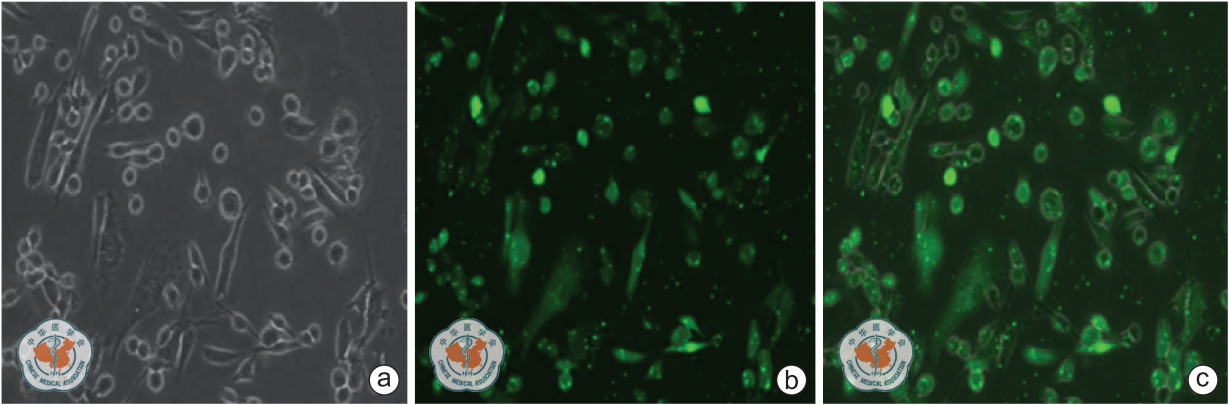
### 2.3 WT1 dsRNA 转染效率的评价

用 50  $\mu$ mol/L WT1 dsRNA-319 转染 MCF-7 细胞 4~6 h 后, 在荧光显微镜下观察转染效率均能达到 90% 左右(图 4)。



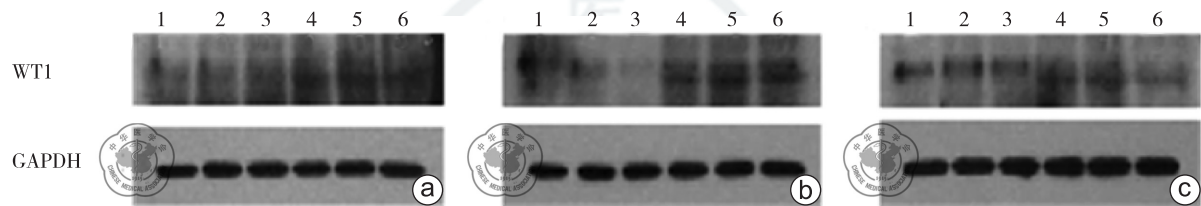
a, e: 0.25  $\mu$ l 脂质体: 2.5 pmol siRNA; b, f: 0.25  $\mu$ l 脂质体: 5 pmol siRNA; c, g: 0.5  $\mu$ l 脂质体与: 5 pmol siRNA; d, h: 1  $\mu$ l 脂质体: 10 pmol siRNA (a~d: 倒置相差显微镜观察; e~h: 荧光显微镜观察)

图 1 显微镜下观察不同比例的脂质体与羧基荧光素(FAM)-小干扰 RNA 转染 MDA-MB-231 细胞的效率( $\times 200$ )



a:白光图;b:荧光图;c:白光图与荧光图合成的图像

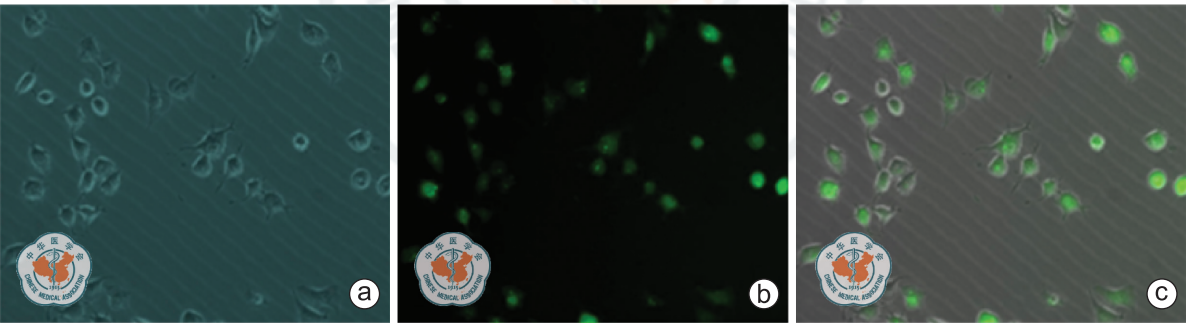
图 2 荧光显微镜观察羧基荧光素 (FAM)-小干扰 RNA 转染 MDA-MB-231 细胞的效果 (×400)



a:转染后 24 h;b:转染后 48 h;c:转染后 72 h

1~6 分别代表 WT1 siRNA-516、WT1 siRNA-803、WT1 siRNA-1029、阴性对照、脂质体和空白细胞组; WT1: Wilms 瘤基因 1

图 3 Western Blotting 检测 WT1 小干扰 RNA 转染后 24、48、72 h MDA-MB-231 细胞中 WT1 蛋白的表达水平



a:白光图;b:荧光图;c:白光图与荧光图合成的图像

图 4 荧光显微镜观察羧基荧光素 (FAM)-Wilms 瘤基因 1 (WT1) 双链 RNA-319 转染 MCF-7 细胞的效果 (×400)

表 3 siRNA 转染后 24、48、72 h 各组 MDA-MB-231 细胞的 WT1 mRNA 相对表达量比较

组别	实验次数	WT1 mRNA 相对表达量		
		24 h <sup>a</sup>	48 h <sup>b</sup>	72 h <sup>b</sup>
空白细胞组	3	1.00±0.08	1.00±0.08	1.00±0.01
脂质体组	3	0.94±0.04	0.94±0.04	0.85±0.02
阴性对照组	3	1.02±0.18	0.91±0.09	0.93±0.02
WT1 siRNA-516 组	3	0.75±0.05	0.49±0.03 <sup>c</sup>	0.55±0.02 <sup>c</sup>
WT1 siRNA-803 组	3	0.66±0.05	0.45±0.04 <sup>c</sup>	0.58±0.01 <sup>c</sup>
WT1 siRNA-1029 组	3	0.71±0.06	0.49±0.02 <sup>c</sup>	0.70±0.01 <sup>c</sup>
F 值		9.60	63.35	345.71
P 值		0.00	0.00	0.00

a:方差不齐,组间两两比较采用 Tamhane's T2 (M) 检验;

b:方差整齐,组间两两比较采用 LSD 检验; c: P<0.05,与空白细胞组比较; WT1: Wilms 瘤基因 1

#### 2.4 WT1 dsRNA 有效作用时间的筛选

与空白细胞组相比,WT1 dsRNA-319 在转染 MCF-7 细胞后 72、96 h 均可显著提高 WT1 mRNA 表达水平,并且 96 h 时最为显著(统计结果详见表 4)。同时,在 96 h 时检测 WT1 dsRNA-319 和空白细胞组的 WT1 蛋白表达情况,同样发现 WT1 dsRNA-319 可以增强 WT1 蛋白的表达(图 5),进一步证实了 96 h 为最佳转染时间点。

#### 3 讨论

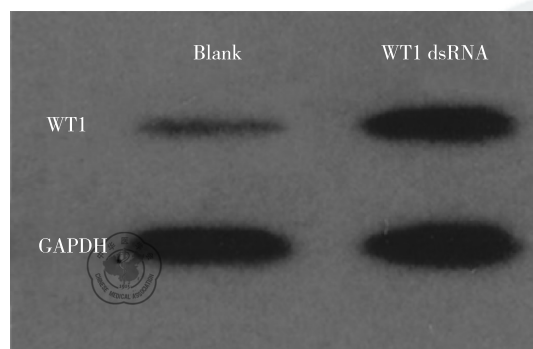
WT1 编码产物是一种具有转录激活和抑制双重功能的锌指转录因子。在发育过程中,WT1



**表 4** dsRNA 转染 48、72、96 h 后各组 MCF-7 细胞的  
WT1 mRNA 相对表达量比较

组别	实验 次数	mRNA 相对表达量		
		48 h <sup>a</sup>	72 h <sup>b</sup>	96 h <sup>b</sup>
空白细胞组	3	1.00±0.07	1.00±0.08	1.00±0.07
阴性对照组	3	0.94±0.02	0.92±0.05	0.94±0.03
WT1 dsRNA-319	3	0.69±0.07 <sup>c</sup>	1.53±0.01 <sup>c</sup>	319.06±14.84 <sup>c</sup>
<i>F</i> 值		22.28	117.58	1378.27
<i>P</i> 值		0.00	0.00	0.00

a: 方差整齐, 组间两两比较采用 LSD 检验; b: 方差不齐, 组间两两比较采用 Tamhane's T2(M) 检验; c:  $P < 0.05$ , 与空白细胞组比较; WT1: Wilms 瘤基因 1



Blank: 空白细胞组; WT1: Wilms 瘤基因 1; dsRNA: 双链 RNA

**图 5** Western Blotting 检测 WT1 dsRNA 转染后 96 h MCF-7 细胞的 WT1 蛋白表达水平

通过调控多种靶基因和信号通路参与心脏、肾脏和脾脏等器官的形成。在成人组织中, WT1 对靶基因的转录起激活还是抑制作用具有高度的细胞和组织特异性<sup>[12]</sup>。一方面, 在 Wilms 瘤中 WT1 通过干扰细胞增殖信号等途径抑制细胞生长, 发挥抑癌基因作用<sup>[3]</sup>; 另一方面, WT1 可增强肿瘤细胞的抗凋亡能力<sup>[13]</sup>, 并通过调控原癌基因 K-ras 促进细胞增殖<sup>[14]</sup>, 提示 WT1 也能发挥癌基因作用。乳腺癌是一种具有多种组织学和病理学特征的恶性肿瘤<sup>[15]</sup>, 目前关于 WT1 在乳腺癌进展中的具体作用和机制至今尚不清楚, 其促进还是抑制细胞增殖尚存争议, 而其是否参与乳腺癌的侵袭转移过程、具体作用及分子机制如何, 鲜见文献报道。因此, 有必要开展进一步的临床和基础研究对上述问题进行深入探讨, 而在乳腺癌细胞中建立 WT1 干预表达的细胞模型是开展相关工作的基础。

RNA 干扰是通过 dsRNA 特异性阻断靶基因, 导致其 mRNA 降解, 诱使目的基因表达或功能丧失或表现出特定基因缺乏的表型, 从而达到转录

后水平的基因沉默的过程, 目前已广泛用于基因功能及基因治疗的研究<sup>[16]</sup>。RNA 激活是一种由多种小分子 RNA 介导的基因激活机制, 这些小分子 RNA 被称为小激活 RNA (small activating RNA, saRNA), saRNA 包括 dsRNA、微小 RNA (microRNA, miRNA) 和 piwi 相关作用 RNA (piwi-interacting RNA, piRNA) 等。saRNA 可与特定基因启动子区域和基因反义转录物靶向结合, 通过表观遗传学机制调控靶基因的转录, 也可直接促进靶 mRNA 的翻译或拮抗 miRNA 与靶 mRNA 3'UTR 区 (3' untranslated region, 3'UTR) 的结合, 从而增强基因的转录后表达。saRNA 具有独特的基因表达调控方式和特点, 其干预基因表达具有较好的靶向特异性、靶基因及靶位点选择的灵活性和作用的持久性和强效性<sup>[17-20]</sup>。RNAi 和 RNAa 技术在恶性肿瘤发病机制研究和肿瘤治疗方面具有广阔的应用前景。乳腺癌的发生是多个基因改变的结果, 是上述技术应用的最佳的肿瘤模型之一。

本研究在前期发现 MDA-MB-231 细胞高表达 WT1、MCF-7 细胞低表达 WT1 的基础上<sup>[21]</sup>, 成功构建 WT1 siRNA-516、WT1 siRNA-803 和 WT1 siRNA-1029 并转染到 MDA-MB-231 细胞中, 且确定最佳转染比例为 0.25  $\mu$ l 脂质体 : 2.5 pmol siRNA, 同时发现上述 3 个 siRNA 均能够有效抑制 WT1 mRNA 和蛋白的表达, 并且在转染后 48 h 时, 3 个 siRNA 均能有效抑制 WT1 mRNA 水平, 以 WT1 siRNA-803 最为明显, WT1 siRNA-1029 和 WT1 siRNA-506 次之, 但 WT1 siRNA-1029 对 WT1 蛋白表达水平抑制效果最为明显, 远高于其他 2 个 siRNA, 综合考虑确定 WT1 siRNA-1029 在转染后 48 h 时对 MDA-MB-231 细胞的 WT1 表达水平抑制最为明显。此外, 本研究还成功将 WT1 dsRNA-319 转染到 MCF-7 细胞中, 转染效率达 90% 以上。并且, 50  $\mu$ mol/L WT1 dsRNA-319 转染 MCF-7 细胞后 96 h 时 WT1 mRNA 过表达水平最为显著, 进一步通过 Western Blotting 检测证实, WT1 dsRNA-319 转染 MCF-7 细胞后 96 h 时 WT1 蛋白的表达水平升高最为明显。但由于实验设计及具体操作等问题, 未能在各个时间点均对 MCF-7 细胞进行 WT1 蛋白表达的检测, 需要在后续的实验补充完善。

综上所述, 本研究成功应用 RNAi 和 RNAa 方法分别建立了 WT1 低表达和高表达的乳腺癌细

胞模型,为后续开展 WT1 的功能学实验奠定了基础。

### 参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- [2] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5):646-674.
- [3] Huff V. Wilms' tumours: about tumour suppressor genes, an oncogene and a chameleon gene [J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(2):111-121.
- [4] 齐晓伟, 姜军. Wilms 瘤基因 1 与实体肿瘤发生、演进关系的研究进展[J]. 中华外科杂志, 2013, 51(5):461-463.
- [5] Qi XW, Zhang F, Yang XH, et al. High Wilms' tumor 1 mRNA expression correlates with basal-like and ERBB2 molecular subtypes and poor prognosis of breast cancer [J]. Oncol Rep, 2012, 28(4):1231-1236.
- [6] Miyoshi Y, Ando A, Egawa C, et al. High expression of Wilms' tumor suppressor gene predicts poor prognosis in breast cancer patients [J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(5):1167-1171.
- [7] Huang V, Qin Y, Wang J, et al. RNAi is conserved in mammalian cells [J]. PLoS ONE, 2010, 5(1):e8848.
- [8] Qin Q, Lin YW, Zheng XY, et al. RNAi-mediated overexpression of WT1 induces apoptosis in HepG2 cells [J]. World J Surg Oncol, 2012, 10:11.
- [9] Perugorria MJ, Castillo J, Latasa MU, et al. Wilms' tumor 1 gene expression in hepatocellular carcinoma promotes cell dedifferentiation and resistance to chemotherapy [J]. Cancer Res, 2009, 69(4):1358-1367.
- [10] 刘安定, 董学君, 杨明峰. siRNA 沉默 hTERT 基因表达对人乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响 [J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2008, 2(5):538-546.
- [11] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> Method [J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [12] Yang L, Han Y, Suarez Saiz F, et al. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story [J]. Leukemia, 2007, 21(5):868-876.
- [13] Hartkamp J, Carpenter B, Roberts SG. The Wilms' tumor suppressor protein WT1 is processed by the serine protease HtrA2/Omi [J]. Mol Cell, 2010, 37(2):159-171.
- [14] Vicent S, Chen R, Sayles LC, et al. Wilms tumor 1 (WT1) regulates KRAS-driven oncogenesis and senescence in mouse and human models [J]. J Clin Invest, 2010, 120(11):3940-3952.
- [15] 齐晓伟, 姜军. 2012 年第 4 版《WHO 乳腺肿瘤组织学分类》介绍 [J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2012, 6(5):586-591.
- [16] 胡小辉, 李建文. RNA 干扰技术在乳腺癌治疗中的研究进展 [J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2013, 7(1):47-51.
- [17] Portnoy V, Huang V, Place RF, et al. Small RNA and transcriptional upregulation [J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2011, 2(5):748-760.
- [18] Pushparaj PN, Aarthi JJ, Kumar SD, et al. RNAi and RNAa—the yin and yang of RNAome [J]. Bioinformation, 2008, 2(6):235-237.
- [19] Place RF, Noonan EJ, Földes-Papp Z, et al. Defining features and exploring chemical modifications to manipulate RNAa activity [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2010, 11(5):518-526.
- [20] Wang J, Li LC. Small RNA and its application in andrology and urology [J]. Transl Androl Urol, 2012, 1(1):33-43.
- [21] 齐晓伟. WT1 在乳腺癌进展中的作用及机制研究[D]. 重庆:第三军医大学, 2012.

(收稿日期:2013-07-10)

(本文编辑:罗承丽)

齐晓伟, 杨新华, 张毅, 等. Wilms 瘤基因 1 低表达和过表达乳腺癌细胞模型的建立 [J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2013, 7(4):238-244.