

siRNA 干扰 ski 基因的表达对人肝癌 HepG2 细胞生物学功能的影响

姜丹丹,杨生生,陈 欢,陈 松,郝 强,陈励藻,蔡在龙*

第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室,上海 200433

[摘要] 目的:设计并化学合成针对原癌基因 ski 的 siRNA 分子片段,转染人肝癌 HepG2 细胞,观察其对 HepG2 细胞增殖、细胞周期和凋亡等生物学功能方面的影响。方法:设计并化学合成针对原癌基因 ski 的 3 个 siRNA 分子序列,阳离子脂质体法瞬间转染 HepG2 细胞,运用实时定量 PCR 法和 Western 印迹法检测细胞中 ski 基因在 mRNA 水平和蛋白水平的变化。然后利用 MTT 法和流式细胞术检测转染 ski-siRNA 的 HepG2 细胞增殖、细胞周期和凋亡等生物学功能方面指标的变化。结果:3 对特异性 ski-siRNA 均有效地抑制了 ski 基因的表达,以 siRNA-B 抑制效果最好,可达到 70%,而且随着转染时间的延长,ski 的表达呈逐步下降趋势。转染 ski-siRNA 后 HepG2 细胞的增殖能力明显受到抑制($P<0.05$),S 期细胞明显减少,是阴性对照组的 2 倍以上。结论:靶向 ski 基因的 siRNA 分子片段可以有效地抑制人肝癌 HepG2 细胞的生长,使进入 S 期的细胞明显减少,其作用与下调 ski 基因的表达有关,ski 可能是肝癌治疗的一个潜在靶点。

[关键词] 肝肿瘤;ski 基因;siRNA 干扰;瞬间转染

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)09-1025-04

Effect of ski-siRNA on biological function of human hepatoma cell line HepG2

JIANG Dan-dan, YANG Sheng-sheng, CHEN Huan, CHEN Song, HAO Qiang, CHEN Li-zao, CAI Zai-long*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To design and prepare siRNAs targeting ski gene and to observe its influence on the biological functions of HepG2 cells, such as proliferation, cell cycle, apoptosis, etc.. **Methods:** Three specific siRNAs of ski were designed and synthesized, and were transiently transfected into HepG2 *via* cathodolyte liposome transfection method. Real-time PCR and Western blotting were used to measure ski expression at mRNA and protein levels. The cell proliferation was assessed by MTT assay and the changes in cell cycle and apoptosis were evaluated by flow cytometry. **Results:** All the 3 specific ski-siRNA (A, B, C) effectively inhibited the expression of ski gene, with ski-siRNA-B having the highest inhibition rate (70%). Furthermore, the ski expression had a decreasing tendency with the transfection time. The proliferation of HepG2 cells was markedly inhibited by ski-siRNAs ($P<0.05$); the number of cells at S stage was obviously decreased, being 2 folds that of the negative control group. **Conclusion:** The siRNA of ski gene can effectively induce growth inhibition of HepG2 cells and reduce cells of S stage, which is possibly through down-regulation of ski gene.

[KEY WORDS] liver neoplasms; ski gene; siRNA interference; transient transfection

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(9):1025-1028]

Ski 基因是 Stavanezer 等^[1]于 1986 年首先在感染了禽类白血病转化缺陷病毒 Bratislava77 的鸡胚细胞中发现的。Ski 作为细胞内的原癌蛋白,具有多种生物活性,参与体内多种生理病理过程^[2-4]。Ski 蛋白是转化生长因子 β (TGF- β) 通路的主要负性调控因子^[5],它通过抑制 Smad 家族复合物来拮抗 TGF- β 对细胞生长的抑制作用^[6],与肿瘤的发生发

展关系密切^[7-9]。本实验室的前期研究发现,Ski 在肝癌 HepG2 细胞中异常高表达,表达量是人正常肝细胞 L02 的 18 倍左右,提示 Ski 与肝癌的发生关系密切,所以 ski 基因有可能成为肝癌治疗的新型靶点。针对 ski 基因的 RNA 干扰技术的应用在肿瘤治疗方面具有重要意义。本研究主要观察 ski-siRNA 抑制 HepG2 细胞中 ski 基因表达及其对细胞生

[收稿日期] 2008-01-03 [接受日期] 2008-06-26

[基金项目] 国家自然科学基金(30471676). Supported by National Natural Science Foundation of China(30471676).

[作者简介] 姜丹丹,硕士生. E-mail: sigema9136@sina.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25074234, E-mail: czl8003@hotmail.com

物学功能方面的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株 HepG2 由本实验室保存;hski-siRNA 序列由上海吉凯公司合成;MEM 液体培养基、opti-MEM 无血清液体培养基(Gibco 公司);胎牛血清(兰州民海生物公司);0.25%胰蛋白酶、青-链霉素(10 000 U/ml)(上海博光公司);TRIzol 试剂、一抗 β -actin(Sigma 公司);转染试剂 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司);RevertAid First strand cDNA synthesis kit(MBI Fermentas 公司);Syber Green Mix(ToYoBo 公司);实时 PCR SKI、内参照 β -actin 引物(上海生工生物工程技术有限公司);5 $\times$ 蛋白裂解液(Promega 公司);一抗 SKI(H-329)(Santa Cruz 公司);羊抗兔 HRP 标记二抗(PTGLAB 公司);考马斯亮蓝染料、牛血清白蛋白 BSA(Tiangen 公司);免疫印迹凝胶配制试剂(上海博光、华舜公司);免疫印迹配胶、电泳、电转装置(Bio-Rad 公司);免疫印迹化学发光剂 ECL(Santa Cruz 公司);蛋白核酸定量仪(Eppendorf 公司);Model 550 Microplate reader(Bio-Rad 公司);Annexin V/FITC 试剂盒(深圳晶美生物公司);PI 染料(上海华舜公司);流式细胞仪(BD 公司)。

1.2 Ski-siRNA 靶序列的设计与合成 根据 GenBank 公布的 hski mRNA(NM_003036)全长序列,遵循 siRNA 的设计原则,利用 Invivogen 公司 Wizard 在线软件筛选出 3 条 21 nt 的 ski-siRNA 序列,并自行设计阴性对照。由上海吉凯基因技术有限公司合成,并赠送 GAPDH 阳性对照。其中,阳性对照用于监测及优化转染、检测条件;阴性对照用于排除非特异性影响。序列如下(只列出正义链)ski-A (start:2 566):CAG UAA GGA GAC UUG AAA tt;ski-B(start:1 278):ACA GCU UCU ACU CCU ACA tt;ski-C(start:2 364):CGU CUU ACC GUG CCU AUU Att;Non-silencing(阴性对照):UCU CCG AAC GUG UCA CGU tt;GAPDH-silencing(阳性对照):GUG GAU AUU GUU GCC AUC Att。用 Blast 进行序列比对,阴性对照的 siRNA 分子序列与 ski 基因以及靶细胞内的其他基因没有明显的同源性。

1.3 细胞复苏与培养 液氮中取出 HepG2 细胞,37℃水浴化冻,快速放入含 10%胎牛血清、0.5%青链霉素的 MEM 液体培养基中,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中孵育,生长至 90%密度时传代,转染前 1 d 换无抗生素的培养基过夜。

1.4 细胞转染 转染前 1 d 取对数生长期的 HepG2 细胞以 2×10^5 /孔的密度接种于 24 孔板。无抗生素 MEM 培养基(10%FBS)培养过夜。待细胞融合达 80%时进行转染。方法参照转染试剂 Lipofectamine 2000 的说明书进行,siRNA 终浓度为 127 nmol/L。实验分为阴性对照组、阳性对照组、ski-A 组、ski-B 组和 ski-C 组。每组设 3 个复孔。为避免 Lipofectamine 2000 毒性对细胞的损伤,转染后 8 h 换成完全培养液。

1.5 实时定量 PCR 检测 ski mRNA 水平的表达 转染 24~36 h 后弃原培养液,PBS 洗 3 遍,TRIzol 裂解细胞提取总 RNA。RNA 定量后,用 RevertAid First strand cDNA synthesis kit 进行 RT-PCR,20 μ l 体系中 1 μ g RNA 为模板逆转录生成 cDNA(用 ddH₂O 稀释 5 倍备用),再以 cDNA 为模板,分别对 ski 基因和 β -actin 内参进行实时 PCR 扩增,反应体系为 cDNA 5 μ l,2 $\times$ Syber Green Mix 10 μ l,10 μ mol/L 上下游引物各 0.8 μ l,ddH₂O 3.4 μ l。扩增条件为 95℃变性 1 min,随后 95℃ 15 s,60℃,1 min 循环 40 次,72℃延伸 5 min。扩增过程及荧光信号检测、数据储存和分析均由 ABI 公司 7300 实时 PCR 仪完成,使用 SDS1.1 软件对结果进行计算和分析。每个样品设 2 个复孔,并用 β -actin 作为内参,实验重复 3 次。计算 Ct 均值,应用相对定量法($\Delta\Delta C_t$)进行定量分析,按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值作图来表示相对于阴性对照组的其他组的干扰效果。抑制效率(%)=(1-实验组表达量/阴性对照组表达量) $\times$ 100%。根据人来源 cDNA 序列,应用 ABI 公司的实时定量 PCR 设计软件 Primer Express 3.0 设计引物。Human ski:上游引物 5'-CAA GCG AGT GTT TGT AAC CAT GTA G-3',下游引物 5'-CGC GGC TTA CTC ACT TGA ACT-3';Human β -actin:上游引物 5'-CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG T-3',下游引物 5'-CGC AAC TAA GTC ATA GTC CGC C-3';Human GAPDH:上游引物 5'-GGT CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG-3',下游引物 5'-GTG GTG AAG ACG CCA GTG GAC TC-3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,用 ddH₂O 溶解后,调整浓度至 10 μ mol/L 待用。

1.6 Western 印迹检测 Ski 蛋白水平的表达 按照前述方法对 HepG2 细胞进行铺板(6 孔板)、转染(干扰效果最强的 siRNA 片段)。分别在转染后 0、48、72 和 96 h 采用蛋白裂解液冰上裂解细胞,Bradford 考马斯亮蓝 G-250 染色,以牛血清白蛋白 BSA

为标准对照做标准曲线,对样品进行蛋白定量。将不同浓度的样品用蛋白裂解液稀释成同一浓度,并加入 5×Protein Loading Buffer,煮沸 10 min,使蛋白充分变性,−80℃ 保存。每个泳道 80 μg 蛋白量上样,PreStained Protein Ladder 为 Marker 标准,进行 8%SDS-PAGE。再经过电转、封闭、抗体孵育、显色、曝光、显影、定影等一系列步骤后,扫描仪扫描图像。同时设阴性对照组,每组设 2 个复孔。

1.7 MTT 法检测细胞增殖活力 取对数生长期的细胞以 0.5×10^5 /孔密度接种 96 孔板,当细胞融合度达到 80%左右时进行转染,方法、试剂同前。分别在转染后 2、3、4、5 和 6 d,加入 5 g/L 的 MTT 20 μl,37℃ 避光孵育 4 h,弃培养液,每孔加 150 μl DM-SO,避光 10 min,完全溶解后,酶标仪 570 nm 检测光密度值(*D*)。同时设对照组,每组 3 个复孔,实验重复 3 次。细胞生长抑制率(%)=(1−转染组 *D*₅₇₀ 值/对照组 *D*₅₇₀ 值)×100%。

1.8 流式细胞术检测细胞周期 铺板→转染→消化细胞→单细胞悬液→PBS 洗 3 次→−20℃ 预冷乙醇固定 1 h→2 000×*g*, 3 min→PI(终浓度 50 μg/ml)避光染色 40 min→流式细胞仪检测各期细胞百分比。

1.9 流式细胞术检测细胞凋亡 细胞铺板、转染、消化步骤同上,用 Annexin V /FITC 试剂盒对细胞进行双染,避光染色 15 min,流式细胞仪检测早期凋亡细胞百分比。

1.10 统计学处理 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 软件,组间用非配对 *t* 检验来比较均数差异的显著性,*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 siRNA 对 ski 基因 mRNA 的抑制作用 实时 PCR 结果显示 siRNA 转染 36 h 后,明显降低了 HepG2 细胞中 ski 基因的 mRNA 表达水平(*P*<0.05)。其中 siRNA-B 的干扰效果最强,与阴性对照相比抑制率达到 70%左右(图 1),被用于后续生物学功能实验的转染。

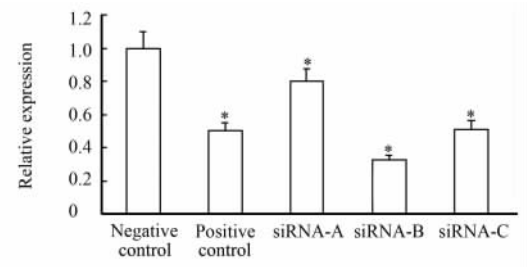


图 1 实时定量 PCR 检测 Ski 基因表达水平
Fig 1 Changes of ski mRNA expression by RT-PCR
* *P*<0.05 vs negative control; *n*=3, $\bar{x}\pm s$

2.2 siRNA 对 ski 蛋白的抑制作用 Western 印迹条带经扫描后计算灰度值,结果显示 siRNA-B 转染后随细胞培养时间的延长,ski 蛋白的表达量呈下降趋势(*P*<0.05),见图 2。

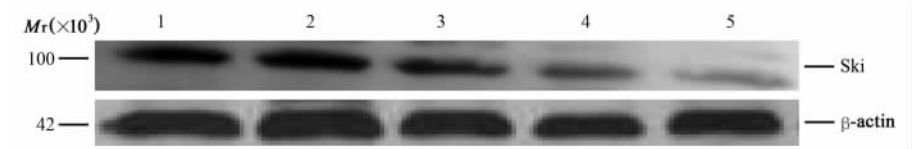


图 2 Western 印迹法检测 Ski 蛋白表达水平
Fig 2 Ski expression changes at protein level by Western blotting
1: Negative control; 2: Transfect 0 h; 3: Transfect 48 h; 4: Transfect 72 h; 5: Transfect 96 h

2.3 siRNA 对 HepG2 细胞增殖的抑制 siRNA-B 转染后 4~5 d 可见 HepG2 细胞的增殖活力明显下降(*P*<0.05),与各自对照组相比,5 d 组的抑制率达到了 61.3%,转染后 6 d 时,对细胞增殖的抑制不再增加(图 3)。

2.4 siRNA 对 HepG2 细胞周期的影响 siRNA-B 转染 48 h 后的 HepG2 细胞与阴性对照组比较,其 S 期细胞所占百分比从 43.55%降至 22.3%,说明细胞的生长受到了抑制。

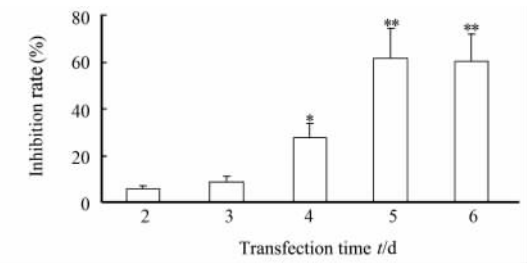


图 3 siRNA 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用
Fig 3 Ski-siRNA inhibits proliferation of HepG2 cells
* *P*<0.05, ** *P*<0.01 vs negative control; *n*=3, $\bar{x}\pm s$

2.5 siRNA 诱导 HepG2 细胞凋亡 通过 Annexin V-FITC/PI 双染流式分析发现, siRNA-B 转染 HepG2 48、72 h 后,早期凋亡细胞的百分比仅比阴性对照组仅上调了 3 个百分点,变化均不显著。

3 讨论

研究表明 Ski 蛋白具有促进细胞恶性转化的作用。由于其没有内在的催化活性,所以必须通过与其他细胞成分如 Smad 蛋白的相互作用来实现这一功能,而 TGF-β-SmadS 转导通路是已知与 Ski 致癌作用关系最为密切的家族之一^[10]。同时,大量临床病例显示,Ski 在肿瘤发生发展中的作用是复杂的:一方面,在人类许多肿瘤如恶性黑素瘤、乳腺癌、食管癌、肺癌、胃癌、表皮样瘤及前列腺癌中均已发现 Ski 的过量异常表达,并被证实是食管癌、乳腺癌、大肠癌预后不良的重要因素之一^[11];另一方面,Ski 在少数情况下有一定的肿瘤抑制作用,如鼠 ski 基因的非等位缺失能提高其对化学诱癌的敏感性^[12]。Ski 是 TGF-β 通路的主要负性调控因子,它在肿瘤发生过程中的多样性与 TGF-β 对肿瘤的双重作用(早期抑制,中后期促进浸润和转移)之间是否存在着重大关系,是目前分子医学急需攻克的难题。

siRNA 干扰技术是一种高效、特异的基因沉默手段。与目的基因 mRNA 的同源序列互补结合,会导致整条 mRNA 失去翻译成蛋白质的功能^[13]。本实验根据 siRNA 的设计原则,利用在线软件设计并在体外化学合成 3 对 ski-siRNA 序列,利用阳离子脂质体转染法转入人肝癌 HepG2 细胞中,通过实时 PCR 和 Western 印迹技术检测转染后 ski 基因 mRNA 水平和蛋白水平的表达。实验数据证实这 3 对序列均可产生干扰作用,其中以 B 序列的效果最强,可用于后续实验。对 ski 基因干扰后 HepG2 细胞生物学功能方面的研究显示,ski 基因沉默后其促进细胞增殖的能力被逐步削弱,在转染 4~5 d 后抑制的效率达到最高,证明了 Ski 在促进细胞生长分化方面起重要作用。但它促凋亡效果却不明显,其原因可能是细胞发生凋亡是由多个信号转导通路共同作用的结果,ski-siRNA 对凋亡的促进作用极有可能被其他通路代偿掉了,所以没有明显的变化。Ski 对凋亡的调控机制有待于进一步研究。

以上事实进一步提示我们,ski 基因与肝癌的发生发展密切相关,对其进行 RNA 干扰可以有效地遏制肝癌细胞的恶性增殖,对肿瘤治疗方法的进一步完善具有重要意义。

[参考文献]

[1] Stavnezer E, Barkas A E, Brennan L A, Brodeur D, Li Y. Transforming Sloan-Kettering viruses generated from the cloned v-ski oncogene by *in vitro* and *in vivo* recombinations [J]. J Virol, 1986, 57: 1073-1083.

[2] Phillips R L, Ernst R E, Brunk B, Ivanova N, Mahan M A, Deanehan J K, et al. The genetic program of hematopoietic stem cells[J]. Science, 2000, 288: 1635-1640.

[3] Vivien D, Ali C. Transforming growth factor-beta signalling in brain disorders[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2006, 17: 121-128.

[4] Reed J A, Lin Q, Chen D, Mian I S, Medrano E E. SKI pathways inducing progression of human melanoma[J]. Cancer Metastasis Rev, 2005, 24: 265-272.

[5] Luo K. Ski and SnoN: negative regulators of TGF-beta signaling[J]. Curr Opin Genet Dev, 2004, 14: 65-70.

[6] Xu W, Angelis K, Danielpour D, Haddad M M, Bischof O, Campisi J, et al. Ski acts as a co-repressor with Smad2 and Smad3 to regulate the response to type beta transforming growth factor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 5924-5929.

[7] Miyazono K, Suzuki H, Imamura T. Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors[J]. Cancer Sci, 2003, 94: 230-234.

[8] Leong G M, Subramaniam N, Issa L L, Barry J B, Kino T, Driggers P H, et al. Ski-interacting protein, a bifunctional nuclear receptor coregulator that interacts with N-CoR/SMRT and p300 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 315: 1070-1076.

[9] Kokura K, Kim H, Shinagawa T, Khan M M, Nomura T, Ishii S. The Ski-binding protein C184M negatively regulates tumor growth factor-beta signaling by sequestering the Smad proteins in the cytoplasm[J]. J Biol Chem, 2003, 278: 20133-20139.

[10] Le Scolan E, Zhu Q, Wang L, Bandyopadhyay A, Javelaud D, Mauviel A, et al. Transforming growth factor-beta suppresses the ability of Ski to inhibit tumor metastasis by inducing its degradation[J]. Cancer Res, 2008, 68: 3277-3285.

[11] Fukuchi M, Nakajima M, Fukui Y, Miyazaki T, Masuda N, Soda M, et al. Increased expression of c-Ski as a co-repressor in transforming growth factor-beta signaling correlates with progression of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Int J Cancer, 2004, 108: 818-824.

[12] Shinagawa T, Nomura T, Colmenares C, Ohira M, Nakagawara A, Ishii S. Increased susceptibility to tumorigenesis of ski-deficient heterozygous mice[J]. Oncogene, 2001, 20: 8100-8108.

[13] Zhou H J, Tsai S Y, Tsai M J. RNAi technology and its use in studying the function of nuclear receptors and coregulators[J]. Nucl Recept Signal, 2003, 1: e008.

[本文编辑] 曹 静