

CyclinD1 干扰 RNA 对肝癌细胞 HepG2 增殖和凋亡的作用

白瑞霞¹, 赵鹏伟², 贾宇臣²

(1. 内蒙古自治区人民医院, 内蒙古 呼和浩特 010017;

2. 内蒙古医科大学, 内蒙古 呼和浩特 010059)

摘要: [目的] 探讨干扰 RNA 对人肝癌细胞株 HepG2 的 *CyclinD1* 基因表达以及细胞增殖、凋亡的影响。[方法] 将表达 *CyclinD1* siRNA 的重组质粒 pU6-*CyclinD1*-siRNA 导入 HepG2 细胞, 同时设立阴性对照空载体转染组及空白对照组。倒置荧光显微镜观察 G418 筛选稳定转染的细胞。MTT 法检测细胞生长增殖率, 流式细胞术检测细胞凋亡, RT-PCR、Western Blot 方法检测 *CyclinD1* 沉默效果。[结果] 与阴性对照组及空白对照组相比, 转染组细胞生长速度减慢, 凋亡率上升, *CyclinD1* mRNA 和蛋白表达水平均明显下降 ($P < 0.05$)。[结论] RNA 干扰技术可有效抑制细胞增殖, 导致细胞凋亡, 使 *CyclinD1* mRNA 及蛋白表达水平均明显下降。

关键词: *CyclinD1*; 肝肿瘤; HepG2; RNA 干扰

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)11-0920-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.11.B010

Effect of CyclinD1 Interference RNA on the Proliferation and Apoptosis in Hepatoma Cell Line HepG2

BAI Rui-xia¹, ZHAO Peng-wei², JIA Yu-chen²

(1. Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot 010017, China; 2. Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010059, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the influence of *CyclinD1* silenced on cell proliferation and apoptosis in human hepatoma cell line HepG2. [Methods] The recombinant plasmid pU6-*CyclinD1*-siRNA (*CyclinD1* siRNA) was imported into HepG2 cells. Meanwhile the blank group and blank plasmid group were constructed. Stable transfection of cell was selected by G418. Rate of cell growth and proliferation was detected by MTT. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. The expression of *CyclinD1* was detected by RT-PCR and Western Blot. [Results] Compared with the blank group and blank plasmid group, in the stable transfection group, the cell proliferation was slower, apoptosis rate was higher and the expression of *CyclinD1* was lower ($P < 0.05$). [Conclusion] RNA interference technique can inhibit cell proliferation, induce cell apoptosis and downregulate expression of *CyclinD1* mRNA and protein significantly.

Subject words: *CyclinD1*; liver neoplasms; HepG2; RNA interference

细胞周期失控地超常运行是恶性肿瘤的重要特征。近年来,随着细胞周期调控机制的阐明,细胞周期调控因子在恶性肿瘤发病机制中的作用受到人们重视。细胞周期的进程受到 *Cyclin* 和 *CDK* 基因的调控, *Cyclin* (C, D1, 3, E) 在 G_1 期表达而具活性最大, 调节 $G_1 \rightarrow S$ 期进程, 其过度表达与肿瘤发生发展密切相关^[1-3]。本试验通过 *CyclinD1* siRNA 转染人肝

癌细胞株 HepG2, 观察 *CyclinD1* siRNA 对肝癌细胞的增殖、凋亡、*CyclinD1* mRNA 和蛋白水平的影响。为 *CyclinD1* 介导的肿瘤基因沉默疗法提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

肝癌细胞株 HepG2 由解放军 304 医院提供; 转染试剂 Lipofectamine 2000 (Invitrogen), RT-PCR 等相关试剂购自大连宝生物工程公司; *CyclinD1* 干扰

通讯作者: 赵鹏伟, 讲师, 博士; 内蒙古医科大学基础医学院病原生物与免疫学教研室, 内蒙古自治区呼和浩特市新华西街 5 号 (010059); E-mail: pengwzhao@126.com

收稿日期: 2014-01-17; **修回日期:** 2014-02-17

RNA 及质粒表达载体由上海英潍捷基贸易服务有限公司合成),Annexin V-FITC 联合 PI 双染凋亡试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司)。

1.2 主要仪器

倒置荧光镜成像系统 (Nikon,TE2000);CO₂ 饱和湿度培养箱 (南京,WJ-160B-II);PCR 仪 (美国 MJ,RTC-100);凝胶成像分析系统(上海天能科技,Tanon Gis-1000)。

1.3 CyclinD1 siRNA 的设计和表达载体的构建

依照 siRNA 的设计原则,由上海英潍捷基贸易服务有限公司合成针对 CyclinD1 的双链小 RNA。其正义链:5'-UGACCCCGCAGCAUUCUAU-3',反义链:5'-AUGAAAUCGUGCGGGGUCA-3',同时引入酶切位点 *Bam*H I 和 *Eco*R I。利用 BLAST 在 EST 数据库查询,证实与人类基因组其他序列无同源性。CyclinD1 siRNA 的正义链和反义链退火,形成 shRNA 的表达模板,与经酶切后的质粒载体连接,转化感受态细菌 DH5 α ,经抗性筛选、酶切鉴定、测序后提取符合要求的质粒载体,命名为 pU6-CyclinD1-siRNA(由上海英潍捷基贸易服务有限公司完成)。

1.4 细胞转染

当细胞生长至 80%融合时,按照 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书将重组质粒及阴性对照质粒分别转入人肝癌细胞株 HepG2 细胞中,转染 96h 后,再加入 500 μ g/ml G418 的 RPMI-1640 培养基,筛选 2 个月后,将 G418 改为 250 μ g/ml 继续维持培养。同时设立阴性对照组(HepG2-neo)和空白对照组(HepG2)。将稳定转染 pU6-CyclinD1-siRNA 和 pU6 重组质粒的细胞株分别命名为 HepG2-CyclinD1 siRNA 和 HepG2-neo。

1.5 RT-PCR 检测细胞 CyclinD1 mRNA 表达

转染 72h 后,取各组细胞,RT-PCR 检测 CyclinD1 mRNA 表达。CyclinD1 与内参 β -actin 的引物由上海英潍捷基贸易服务有限公司合成 (Table 1)。提取

RNA,反转录后 PCR。RT 反应条件为:37 $^{\circ}$ C、15min,使 RNA 反转录为 cDNA;85 $^{\circ}$ C、5s 使反转录酶失活 PCR 反应体系 25 μ l,其中 2 $\times$ PCR Master Mix 12.5 μ l (TaKaRa)、上下游引物各 0.2 μ l(10mol/L)、cDNA 2 μ l、dH₂O 7 μ l,于 PCR 仪进行反应。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min,94 $^{\circ}$ C 变性 30s,62 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2min,循环 35 次。

1.6 Western Blot 检测 CyclinD1 蛋白的表达

取空白组、阴性对照组、转染 72h 各组细胞,Western Blot 检测细胞 CyclinD1 蛋白的表达。裂解细胞提取蛋白,取 25 μ g 蛋白用 12% SDS-PAGE 电泳分离。再将凝胶中的蛋白质转移至 NC 膜上,5% 脱脂奶粉封闭,加 1:1 000 稀释的 CyclinD1 兔抗人的一抗(Millipore),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗 2 次,各 10min, TBS 洗 1 次,10min。加入对应的 1:3 000 的人抗兔的碱性磷酸酶标记的 IgG(Millipore),室温振荡孵育 1h,TBST 洗 2 次,各 10min,TBS 洗 1 次,10min。将 ECL 试剂盒中底物液 A 液和 B 液按 1:1 混合,滴在 NC 膜的蛋白面上 1min,甩干后显影并拍照,获得蛋白印迹结果。然后重复上述操作,将同一张 NC 膜与内参 GAPDH 一抗(Millipore,1:1 000)进行杂交,获得 GAPDH 蛋白印迹结果。照片在 Fluors Mutilmager 图像分析仪 (Bio-Rad 公司)上用 Quantity One 4.1 版图像分析软件进行分析。

1.7 MTT 法绘制生长曲线

采用 MTT 法测定,取对数生长期的 HepG2-CyclinD1 siRNA 组、HepG2-neo 组和 HepG2 组三组细胞分别接种于 96 孔板,每组取 6 个孔。培养 24h 后,分别于第 1、2、3、4、5d 每个复孔中加入 20 μ l 50mg/ml 的 MTT 液,继续培养 4h 后,在 570nm 波长的酶联仪上检测各组细胞的 A 值(光吸收值),以时间为横坐标,A 值为纵坐标,绘制细胞生长曲线。

1.8 流式细胞术分析

收集细胞,提取 1 $\times$ 10⁶ 的细胞,加入碘化吡啶

Table 1 Primers used for RT-PCR activation

Target Genes	Genbank accession no.	Primer sequence	Product size	Annealing temperature($^{\circ}$ C)
CyclinD1	BC001501		483bp	62
Up primer	P ₁	5'-CTGGCCATGAACTACCTGGA-3'		
Down primer	P ₂	5'-GTCACACTTGATCACTCTGG-3'		
β -actin	NM_139045		309bp	59
Up primer	P ₃	5'-AGCGGGAAATCGTGCGTG-3'		
Down primer	P ₄	5'-CAGGGTACATGGTGTTGCC-3'		

(PI)和以FITC 标记的 Annexin V 染色,上机检测。

1.9 统计学处理

实验数据采用 SPSS11.0 软件进行单因素方差分析,结果以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 倒置荧光显微镜观察转染结果

倒置荧光显微镜下分别观察 G418 筛选的转染 72h (Figure 1A)、稳定转染 (Figure 1B)的细胞,发现细胞形态无明显改变,而且部分细胞胞浆内有绿色荧光蛋白表达。

2.2 MTT 法检测细胞增殖

从第 3d 开始,HepG2-CyclinD1 siRNA 组细胞生长速度变慢,明显低于 HepG2 组和 HepG2-neo 组,差异有统计学意义 ($P<0.05$);而 HepG2-neo 组和 HepG2 组细胞生长速度没有统计学差异($P>0.05$)(Figure 2)。

2.3 流式细胞术检测细胞凋亡

对空白对照组、转染空载体的阴性对照组、CyclinD1 siRNA 转染 48h 实验组、CyclinD1 siRNA 转染 72h 实验组进行 Annexin V 和 PI 染色分析。空白对照组、转染空载体的阴性对照组、CyclinD1 siRNA 转染 48h 实验组、CyclinD1 siRNA 转染 72h 实验组 Annexin V 阳性而 PI 阴性的早期凋亡细胞比率分别为 5.3%、6.9%、35.5%、43.6%;Annexin V 和

PI 染色均阳性的坏死细胞均低于 3%(Figure 3)。

2.4 RT-PCR 检测 CyclinD1 mRNA 水平

在 1、2、3 泳道分别可见与 CyclinD1 的预计大小 483bp 和与 β -actin 的预计大小 309bp 的特异性条带,且条带间亮度差异明显。根据凝胶分析软件得出各条带的综合光密度值 (IDV) 分别为 273655.5、395423.6、417358.3。各目的基因片段 IDV 与 β -actin 基因的 IDV 比值即为目的基因的相对 DNA 含量。统计结果显示,与未转染组 HepG2 细胞比较,转染

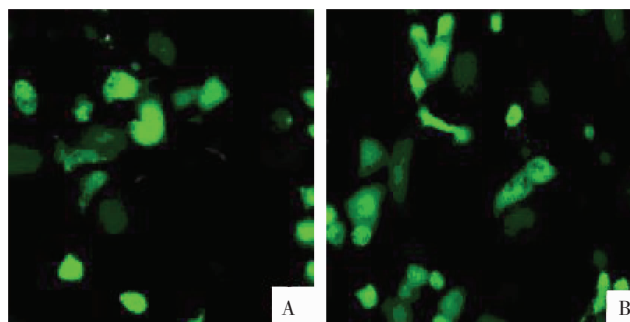


Figure 1 The green fluorescence protein observed by inverted fluorescence microscope($\times 400$)

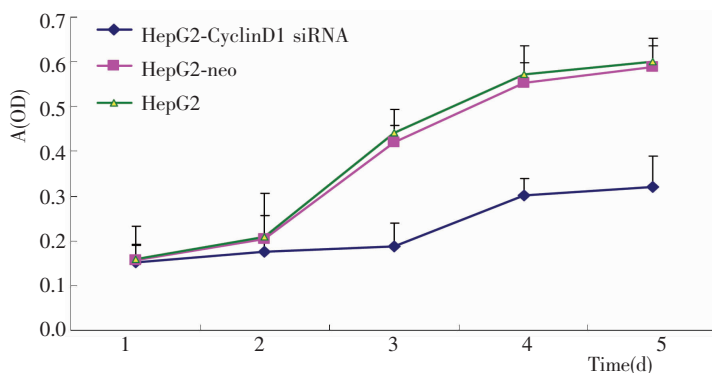
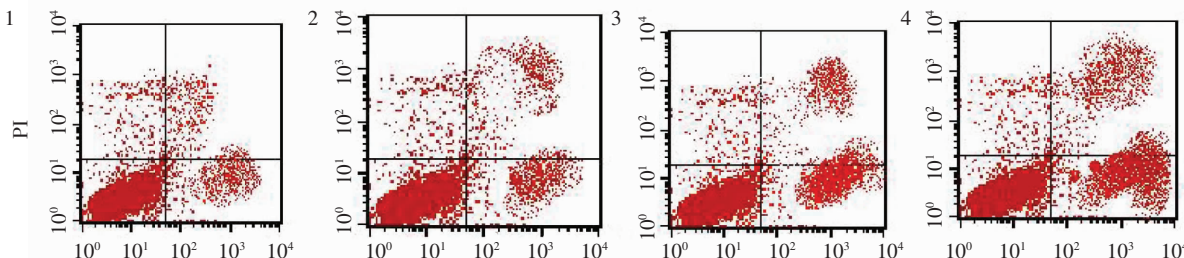


Figure 2 The cell growth curves



Note: 1: Blank cells; 2: Transfection negative vector cells; 3: After 48h of CyclinD1 siRNA transfection; 4: After 72h of CyclinD1 siRNA transfection.

Figure 3 The influence of CyclinD1 siRNA on apoptosis of HepG2 cells

阴性对照组 HepG2-neo 细胞的 *CyclinD1* mRNA 表达量未见明显改变,而稳定转染组 HepG2-*CyclinD1* siRNA 细胞的 *CyclinD1* mRNA 表达水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)(Figure 4)。

2.5 Western Blot 检测 *CyclinD1* 蛋白的表达

Western Blot 检测 *CyclinD1* 蛋白表达,每一条带的蛋白含量用此条带的吸光度值乘以条带的面积与同一样本的 GAPDH (内参)条带的吸光度值乘以条带的面积的比值表示。结果显示转染 72h 的 *CyclinD1* 蛋白表达量较空白组相比显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);空白组与阴性对照组相比,*CyclinD1* 蛋白表达量无明显改变,差异无统计学意义($P>0.05$)(Figure 5)。

3 讨论

干扰 RNA(RNA-mediated interference, RNAi)技术具有保守性、高效性、特异性等特点,目前已被广泛地应用于基因功能研究、病毒性疾病和肿瘤学等研究领域^[4]。*Cyclin* 和 *CDK* 基因严格调控细胞周期的启动与进程,*CyclinD1* 与 *CDK4* 蛋白形成复合体,参与细胞周期 G_1 期限制点的调控。增殖失控又是癌细胞的一个主要特征^[5]。肿瘤的发生、发展与细胞周期调控的分子机制紧密联系。现代研究表明,细胞癌变是细胞过度增殖、凋亡减少与分化受阻的结果。而且,近年在癌细胞中对 *CyclinD1* 基因的各种变异进行了广泛的研究。现在已有研究证明 *CyclinD1* 与肿瘤的发生、发展密切相关^[2]。

本研究以 *CyclinD1* 为靶基因,合成了 *CyclinD1* 干扰 RNA (siRNA),并将 *CyclinD1* siRNA 成功转染人肝癌细胞株 HepG2,观察 *CyclinD1* siRNA 对肝癌细胞的细胞增殖、细胞凋亡、*CyclinD1* mRNA 及蛋白水平表达的影响。为 *CyclinD1* 的作用机制、肝癌发病机制的研究以及治疗寻求一条新的途径。

通过将 *CyclinD1* 表达受到抑制的细胞与对照细胞的生长速率相比较可知从第三天开始,HepG2-*CyclinD1* siRNA 组细胞生长速度其细胞生长速率明显下降,生长速度均明显受到抑制,表明 *CyclinD1* 基因的表达抑制后可以延缓细胞的增殖。这一结果与以往在乳腺癌及其他肿瘤细胞中的研究结果一致,对于促进肝癌细胞的凋亡和提高化疗放疗的敏

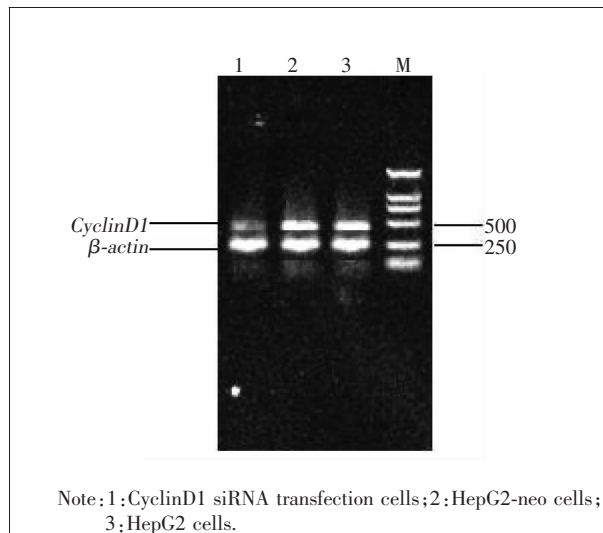


Figure 4 Expression of *CyclinD1* mRNA in HepG2 cells transfected with siRNA

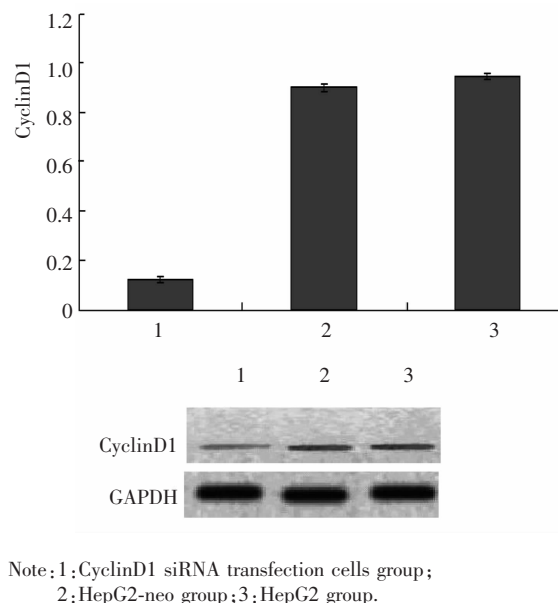


Figure 5 Expression of *CyclinD1* by Western Blot

感性具有重要作用。

流式细胞术的分析结果也显示,转染 *CyclinD1* siRNA 的细胞,随着培养时间的延长,细胞凋亡率增加;而转染空载体的细胞没有导致细胞凋亡。

在对细胞增殖能力和细胞凋亡变化进行分析的同时,本研究还对 *CyclinD1* 表达受到抑制后,*CyclinD1* mRNA 及蛋白水平表达进行了分析,结果显示,*CyclinD1* 表达受到抑制后,*CyclinD1* mRNA 及蛋白水平均显著下调。因此我们推测尽管细胞的癌变

是由多个基因变异,并由多个步骤形成,但 *CyclinD1* 基因的变异无疑是其中一个主要的因素。同时,也使得抑制 *CyclinD1* 的表达而阻止肝癌细胞的异常增殖成为可能。

综上所述 *CyclinD1* 在肝癌的发生、发展中起重要作用,随着分子生物学的发展和肝癌分子生物研究的进一步深入,为 *CyclinD1* 介导的肿瘤基因沉默疗法提供实验依据。

参考文献:

- [1] Korulu S, Yildiz-Unal A, Yuksel M, et al. Protein kinase C activation causes neurite retraction via cyclinD1 and p60-katanin increase in rat hippocampal neurons [J]. Eur J Neurosci, 2013, 37(10): 1610-1619.
- [2] Shimura T, Noma N, Oikawa T, et al. Activation of the AKT/cyclin D1/Cdk4 survival signaling pathway in radiore-

sistant cancer stem cells[J]. Oncogenesis, 2012, 1(6): e12.

- [3] Sun Y, Luo D, Liao DJ. CyclinD1 protein plays different roles in modulating chemoresponses in MCF7 and MDA-MB231 cells[J]. J Carcinog, 2012, 11(1): 12.
- [4] Wang WL, Li LM, Guan ZH, et al. Effects of CDK2 siRNA on cell cycle and proliferation of human hepatoma cells HepG2[J]. Acta Academiae Medicinae Neimongol, 2008, 30(3): 153-157. [王文礼, 李丽梅, 关则红, 等. CDK2 干扰 RNA 对人肝癌细胞 HepG2 细胞周期和增殖的影响[J]. 内蒙古医学院学报, 2008, 30(3): 153-157.]
- [5] Li TJ, Liu CW, Huang ZB, et al. Expressions of p-c-jun and CyclinD1 between vascular smooth muscle cells and endothelial cells exposed to cigarette smoke extract[J]. Acta Academiae Medicinae Sinicae, 2013, 35(2): 185-189. [李天佳, 刘昌伟, 黄泽彬, 等. 烟雾染毒下血管平滑肌细胞和内皮细胞中 p-c-jun 与细胞周期蛋白 D1 的表达[J]. 中国医学科学院学报, 2013, 35(2): 185-189.]

第七届全国鼻咽癌学术会议第一轮会议通知及征文启事

第七届全国鼻咽癌学术会议将于 2015 年 3 月 26~28 日在浙江杭州举行。本届大会由中国抗癌协会鼻咽癌专业委员会和中华医学会放射肿瘤治疗学分会联合主办,浙江省肿瘤医院、浙江省抗癌协会鼻咽癌专业委员会和肿瘤学杂志社承办,浙江省放射肿瘤学重点实验室、浙江省肿瘤诊治质控中心协办。

第七届全国鼻咽癌学术会议为 2015 年国家继续教育培训项目,将不断地求新求发展,力争搭建为鼻咽癌专业领域最具影响力的平台。本届大会将以“鼻咽癌规范化与个体化治疗、学科协同与发展”为主题,深入探讨以下议题:

①在现代化诊疗技术的综合应用下,鼻咽癌总体 5 年生存率已经提高至 80%以上。接下来,如何进行个体化治疗决策?如何实现精确性治疗?

②如何让中国鼻咽癌研究的好声音展示于世界舞台? AJCC 第 8 版 TNM 临床分期改版在即,中国将在这个改进过程中呈现哪些研究成果? NCCN 指南的更新,中国又将贡献什么样的知识?让我们拭目以待。

③“多中心研究”、“协作组”已经成为我们研究工作不可或缺的一部分,如何设计一个好的临床研究?如果做好项目中后期质控?如何让统计学专家有效地介入并发挥作用?如何进行学科建设和人才培养?

本次会议将邀请在综合治疗、放射治疗新技术等方面的国内外学者共同交流,品味鼻咽癌研究中最新的进展。全程参会者经考试合格后授予国家级 I 类继续教育学分。

大会同时面向广大医务工作者征集稿件,欢迎踊跃投稿、报名参加!

征文主题:鼻咽癌相关的临床研究(包括分期及预后研究、新技术的应用、联合化疗或靶向的综合治疗、放射性损伤或生存质量)、放射生物学研究、放射物理学研究(文章尚未公开发表)。

投稿格式:摘要或全文均可;不超过 5000 字;须有关键词;宋体、小四、1.5 倍行间距;附有作者、单位、地址、邮编、联系电话及 E-mail。

截稿日期:2015 年 1 月 31 日

联系人:姜锋(13858065192) 李斌(13858065570) 陈晓钟(13505717886) 夏庆民(13757142507)

投稿/联系 E-mail:npc2015@sohu.com