

RNAi 抑制 *iASPP* 基因表达对大肠癌细胞凋亡的影响及机制

孙留生¹, 韩朝阳¹, 李爱云², 凌艳霞¹

(1. 焦作市第二人民医院, 河南 焦作 454000; 2. 焦作市人民医院, 河南 焦作 454000)

摘要: [目的] 探讨 RNAi 抑制 *iASPP* 基因表达对大肠癌细胞凋亡的影响。[方法] 参照脂质体 LipofectamineTM2000 转染说明转染 *iASPP* 的 siRNA (*iASPP*-siRNA 组) 进入人大肠癌 LoVo 细胞株, 并设置阴性对照组 (转染无义的 siRNA 序列) 和空白对照组 (仅加入脂质体), Western blotting 检测转染 48h 的 3 组细胞中 *iASPP* 的蛋白表达; CCK8 法于转染的 24h、48h、72h 检测细胞活力; 流式细胞术检测转染 48h 的细胞凋亡率; Western blotting 检测 Ki-67、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (Caspase3)、STAT3 和磷酸化的信号转导与转录因子 3 (p-STAT3) 的蛋白表达。[结果] *iASPP*-siRNA 组 (0.108±0.013) LoVo 细胞株 *iASPP* 的蛋白表达显著低于空白对照组 (0.389±0.036) ($P<0.05$); *iASPP*-siRNA 组细胞在 24h (0.267±0.034)、48h (0.495±0.067) 和 72h (0.682±0.068) 的活力细胞均显著低于空白对照组 (0.385±0.042、0.688±0.074、0.977±0.097) ($P<0.05$), 在 48h 的细胞凋亡率 (11.18%±0.78%) 显著高于空白对照组 (2.13%±0.45%) ($P<0.05$)。Ki-67 (0.126±0.018) 和 p-STAT3 (0.110±0.012) 的蛋白表达水平显著低于空白对照组 (0.365±0.045、0.169±0.018), Caspase3 (0.197±0.020) 表达水平高于空白对照组 (0.086±0.009) ($P<0.05$), 3 组间 STAT3 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。[结论] 通过 RNAi 抑制 *iASPP* 基因表达可降低大肠癌细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 机制可能是下调 STAT3 信号, 对细胞增殖的影响是下调 Ki-67 表达, 凋亡的影响是上调 Caspase3 表达。

关键词: *iASPP* 基因; 大肠肿瘤; 凋亡; STAT3 信号通路; RNA 干扰

中图分类号: R735.3+4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)04-0300-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.04.B003

Effect of Inhibiting of *iASPP* Gene Expression by RNA Interference on Apoptosis of Colorectal Cancer Cells

SUN Liu-sheng¹, HAN Chao-yang¹, LI Ai-yun², LING Yan-xia¹

(1. Jiaozuo Second People's Hospital, Jiaozuo 454000, China; 2. Jiaozuo People's Hospital, Jiaozuo 454000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of inhibiting *iASPP* gene expression by RNA interference on apoptosis of colorectal cancer cells. [Methods] Human colorectal cancer LoVo cells were transfected with *iASPP* siRNA (*iASPP*-siRNA group), nonsense sequence siRNA (negative control group) or liposome alone (blank control group) for 24, 48 and 72h, respectively. The expression of *iASPP* protein in three groups was detected by Western blotting; cell viability was detected by CCK8 assay, cell apoptosis was detected by flow cytometry; the expression of Ki-67, Caspase3, STAT3 and p-STAT3 proteins was detected by Western blotting. [Results] The expression of *iASPP* protein in *iASPP*-siRNA group (0.108±0.013) was significantly lower than that in blank control group (0.389±0.036) ($P<0.05$). The cell activity in *iASPP*-siRNA group at 24h (0.267±0.034), 48h (0.495±0.067) and 72h (0.682±0.068) were significantly decreased compared with the control group (0.385±0.042, 0.688±0.074, 0.977±0.097). Cell apoptosis rate (11.18%±0.78%) increased significantly at 48h compared with the blank control group (2.13%±0.45%)%. The expression of Ki-67 (0.126±0.018) and p-STAT3 protein (0.110±0.012) was significantly decreased compared with the control group (0.365±0.045, 0.169±0.018), and the Caspase3 protein expression (0.197±0.020) was significantly increased compared with the control group (0.086±0.009) (all $P<0.05$). There was no significant difference in protein expression of STAT3 among three groups ($P>0.05$). [Conclusion] Inhibition of *iASPP* expression by RNA interference can reduce the proliferation of colorectal cancer cells and induce cell apoptosis, which is associated with the down-regulation of p-STAT3 and Ki-67 expression, and up-regulation of Caspase3 expression.

Subject words: *iASPP* gene; colorectal cancer; apoptosis; STAT3 signaling pathway; RNA interference

通信作者: 韩朝阳, 主任医师, 硕士; 河南省焦作市第二人民医院普外科一区, 河南省焦作市民主南路 17 号 (454000); E-mail: hanzhaoyang@126.com

收稿日期: 2018-03-28; 修回日期: 2018-07-17

大肠癌是常见的人类消化道恶性肿瘤之一,近年来我国大肠癌的发病率呈上升趋势。外科手术是其主要治疗手段,但术后复发率高,且5年生存率低^[1]。p53 凋亡刺激蛋白家族抑制成员 (inhibitor member of the apoptosis stimulating protein of p53 family, i-ASPP) 是 ASPP 家族成员,能够抑制 p53 的促凋亡活性。有研究表明,在前列腺癌、肺癌等多种肿瘤中 iASPP 表达升高,结合病理及临床资料发现 iASPP 的表达与病理分级、淋巴结转移、复发时间等相关^[2,3]。也有研究者发现,在多种实体肿瘤中过表达 iASPP 可促进肿瘤的生长增殖及侵袭能力,抑制凋亡,并产生化疗抗性,推动肿瘤的发生及发展,而抑制其表达则有相反作用^[4,5]。iASPP 在大肠癌中也呈现高表达^[6],但目前关于其对癌细胞生物学特性及机制研究还未明确。因此,本研究通过 RNA 干扰技术沉默大肠癌中 iASPP 基因表达,检测细胞增殖及凋亡情况,并探讨其作用机制,为其治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

胎牛血清、RPMI1640 培养基、胰蛋白酶均购自美国 Gibco; LipofectamineTM2000 购自美国 Invitrogen 公司; iASPP、ki67、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (cysteinyI aspartate specific proteinase 3, Caspase3)、STAT3 和磷酸化的信号转导与转录因子 3 (phosphorylated Signal transducers and activators of transcription 3, p-STAT3) 抗体均购自美国 Cell signal 公司; CCK8 试剂盒、膜联蛋白 V-FITC (Annexin V-FITC)/碘化丙锭 (PI) 细胞凋亡试剂盒均购自碧云天生物技术有限公司; 酶标仪购自美国 BIO-RAD 公司; 流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司。

1.2 细胞及其培养

人大肠癌 LoVo 细胞株购自中科院上海细胞库。取出在液氮罐中保存的 LoVo 细胞, 37℃ 解冻后将细胞置于 37℃, 体积分数为 5% CO₂, 95% 饱和湿度的培养箱中用 RPMI1640 培养液 (含有 10% 胎牛血清及青链霉素各 100mg/L) 培养。每 2d 换液一次, 细胞生长融合度达 80% 以上时进行传代。实验为生长期至对数期的细胞。

1.3 iASPP 的 siRNA 转染 LoVo 细胞

细胞转染参照脂质体 LipofectamineTM2000 转染说明进行操作。LoVo 细胞分为空白对照组 (仅加

入脂质体, Blank 组)、阴性对照组 (转染无义的 siRNA 序列, NC 组) 和 iASPP-siRNA 组 (转染靶向 i-ASPP 的 siRNA 序列)。LoVo 细胞转染前 1d 接种于 6 孔板 (5×10⁵ 密度), 观察到细胞生长融合度达 70%~80% 时进行转染。收集转染 48h 的细胞, 用于转染效果检测及后续实验研究。

1.4 iASPP 的 siRNA 转染 LoVo 细胞效果检测

提取转染 48h 的 3 组细胞总蛋白, Bio-Rad 法测定蛋白的含量, 配置的分离胶及浓缩胶的浓度分别为 10% 和 5%, 取等量 50μg 蛋白样品行 SDS-PAGE 电泳 (电压为 110V, 电泳 1.5h), 电泳结束后转硝酸纤维素膜 (NC 膜), 5% 脱脂奶粉封闭, 4℃ 孵育按照 1:1000 稀释的 iASPP 和 GAPDH 抗体过夜, 洗膜, 加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗 (1:10000 稀释), 室温孵育 2h。化学发光法显色。实验重复 3 次。

1.5 细胞增殖检测

以每孔 5×10³ 个细胞密度接种 3 组细胞于 96 孔板, 每组设置 6 个复孔, 并设置只加入培养液空白对照孔, 分别于转染的 24h、48h 和 72h 收集细胞, 于每孔细胞加入 10μl CCK8 溶液, 37℃ 孵育 2h, 酶标仪检测 570nm 波长下的光密度值 (OD), 每组设置 5 个复孔, 以光密度值反映细胞活力, 间接反映出细胞增殖能力。实验重复 3 次。

1.6 细胞凋亡检测

收集转染 48h 的细胞, 制备为单细胞悬液, 预冷的磷酸盐缓冲液洗涤细胞, 离心, 弃上清, 结合缓冲液调整细胞浓度为每毫升含 5×10⁵ 个细胞, 采用 Annexin-FITC/PI 双标记试剂盒, 利用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况。实验重复 3 次。

1.7 Ki-67、Caspase3、STAT3、p-STAT3 蛋白表达检测

增殖相关蛋白 Ki-67、凋亡相关蛋白 Caspase3 及 STAT3、p-STAT3 蛋白表达检测参照 1.4 方法。

1.8 统计学处理

所有实验数据采用 SPSS 21.0 软件进行分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组差异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 iASPP 的 siRNA 转染 LoVo 细胞效果

iASPP-siRNA 转染 LoVo 细胞 48h, Western blotting 检测细胞中 iASPP 的蛋白表达, 结果如 Fig-

ure 1 所示,空白对照组、阴性对照组和 iASPP-siRNA 组 iASPP 的蛋白表达水平分别为 0.389 ± 0.036 、 0.402 ± 0.042 、 0.108 ± 0.013 , 3 组比较差异有统计学意义 ($F=76.912$, $P<0.001$), iASPP-siRNA 组 iASPP 的蛋白表达显著低于空白对照组 ($t=10.490$, $P<0.001$), 而阴性对照组 iASPP 的蛋白表达与空白对照组比较差异无统计学意义 ($t=0.485$, $P=0.645$)。

2.2 iASPP 的 siRNA 转染降低 LoVo 细胞活力

各组细胞活力检测结果如 Table 1 所示。与空白对照组比较, iASPP-siRNA 组细胞在转染 24h、48h 和 72h 的细胞活力均显著降低 ($t_{24h}=3.690$, $P_{24h}=0.010$; $t_{48h}=3.154$, $P_{48h}=0.020$; $t_{72h}=4.121$, $P_{72h}=0.006$)。

2.3 iASPP 的 siRNA 转染诱导 LoVo 细胞凋亡

流式细胞术检测各组细胞凋亡结果如 Figure 2 所示,空白对照组、阴性对照组和 iASPP-siRNA 组细胞凋亡率分别为 $2.13\% \pm 0.45\%$ 、 $2.04\% \pm 0.41\%$ 、 $11.18\% \pm 0.78\%$, 与空白对照组比较, iASPP-siRNA 组细胞凋亡率显著升高 ($t=19.403$, $P<0.001$)。

2.4 iASPP 的 siRNA 转染对 LoVo 细胞 Ki-67、Caspase3、STAT3、p-STAT3 蛋白表达的影响

Western blotting 检测各组细胞中增殖相关蛋白 ki67、凋亡相关蛋白 Caspase3 及 STAT3、p-STAT3 的蛋白表达,结果如 Figure 3 和 Table 2 所示。与空白对照组比较, iASPP-siRNA 组 Ki-67 和 p-STAT3 蛋白表达显著降低 ($t_{Ki-67}=6.846$, $P_{Ki-67}=0.001$; $t_{p-STAT3}=4.151$, $P_{p-STAT3}=0.006$), Caspase3 蛋白表达显著升高 ($t=9.769$, $P<0.001$); 3 组间 STAT3 的蛋白表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

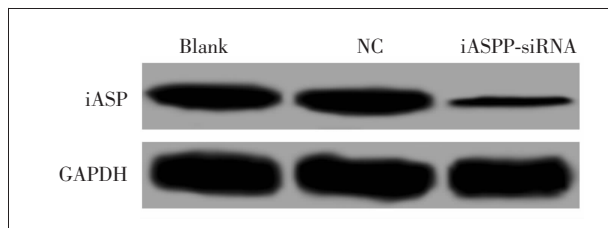


Figure 1 The effect of iASPP siRNA transfection on LoVo cells

Table 1 The effect of iASPP siRNA transfection on LoVo cell viability (n=3)

Groups	OD ₅₇₀		
	24h	48h	72h
Blank group	0.385±0.042	0.688±0.074	0.977±0.097
NC group	0.372±0.041	0.671±0.083	0.953±0.095
iASPP-siRNA group	0.267±0.034*	0.495±0.067*	0.682±0.068*
F	8.189	6.098	10.476
P	0.019	0.036	0.011

Note: Compared with blank group, *: $P<0.05$

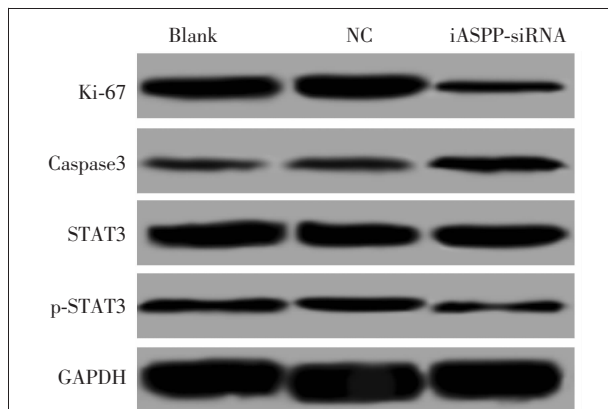


Figure 3 The effect of iASPP siRNA transfection on expression of Ki-67, Caspase3, STAT3, p-STAT3 protein in LoVo cells

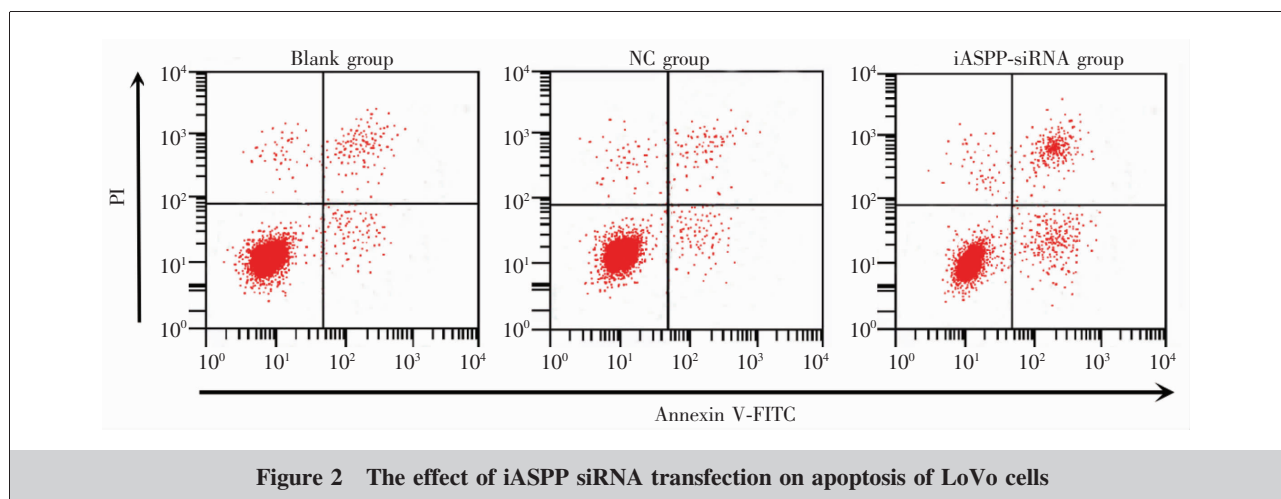


Figure 2 The effect of iASPP siRNA transfection on apoptosis of LoVo cells

Table 2 The relative expression of Ki-67, Caspase3, STAT3 and p-STAT3 proteins in each groups(n=3)

Groups	Ki-67	Caspase3	STAT3	p-STAT3
Blank group	0.365±0.045	0.086±0.009	0.545±0.056	0.169±0.018
NC group	0.386±0.056	0.097±0.010	0.522±0.051	0.180±0.021
iASPP-siRNA group	0.126±0.018*	0.197±0.020*	0.534±0.058	0.110±0.012*
F	34.228	57.940	0.131	14.030
P	0.001	0.000	0.880	0.006

Note: Compared with blank group, *: P<0.05

3 讨 论

细胞凋亡对维持机体正常生理过程发挥重要作用,异常凋亡引起细胞增生过度,是肿瘤形成及发展的主要原因,近些年的研究已发现大量影响肿瘤形成和发现的凋亡促进和抑制因子。P53 是重要的抑癌基因,可诱导细胞凋亡和细胞生长停滞^[7],iASPP 是 p53 调节家族中的一个抑制性成员,与 ASPP1 和 ASPP2 有高度的同源性,对 p53 的促凋亡活性抑制可能是与 ASPP1 和 ASPP2 竞争性结合 p53 有关^[8]。研究表明,在多种肿瘤中 iASPP 有高表达,头颈鳞癌中沉默 iASPP 的表达可增加紫杉醇对细胞凋亡和细胞周期阻滞作用,从而增强化疗敏感性^[9];大肠癌中 iASPP 的高表达与肿瘤浸润程度、肿瘤分化、淋巴结转移有关,抑制大肠癌中 iASPP 表达可降低细胞增殖^[10,11]。本研究中通过 RNA 干扰技术沉默大肠癌 iASPP 的表达,通过 CCK8 法及流式细胞术分别检测细胞增殖活力及凋亡情况,结果显示,iASPP 的表达受到抑制后细胞增殖活力明显降低,凋亡率增加。

Ki-67 是一个与细胞增殖相关的核抗原,可作为肿瘤细胞增殖活性评估的重要标志物,可作为包括大肠癌在内的多种肿瘤增殖活性评价的指标^[12]。细胞凋亡过程中 Caspase 家族发挥关键作用,均以酶原这种无活性的形式存在,Caspase3 是处在 Caspase 级联反应下游的一个关键酶,作为凋亡执行者之一,活化的 Caspase3 可使凋亡进入不可逆阶段^[13]。研究发现,大肠癌中 Caspase3 的表达低于正常黏膜组织,其下调表达影响大肠癌的发生发展,可作为判定预后和生物学行为的临床参考指标^[14]。STAT3 是一个新近发现的核转录因子,与多种肿瘤细胞的增殖、转移、凋亡等生物学行为有关,作为一个癌基因在多种肿瘤中处于激活状态,异常持续激活的 STAT3

可促进肿瘤形成和发展^[15,16]。研究发现,大肠癌中 STAT3 的高表达与肿瘤分化程度、临床分期等有关,利用 RNA 干扰技术沉默其表达可抑制大肠癌细胞增殖,诱导凋亡及阻滞细胞周期^[17,18]。本研究检测结果显示,抑制 iASPP 的表达后 Ki-67 表达下调,Caspase3 表达上调,p-STAT3 表达下调,STAT3 表达无明显变化。

综上所述,抑制 iASPP 基因表达可降低大肠癌细胞增殖,诱导细胞凋亡,机制是下调 STAT3 信号,对细胞增殖的影响是下调 Ki-67 表达,凋亡的影响是上调 Caspase3 表达。本研究结果为大肠癌的诊断及治疗提供了一定的理论基础。iASPP 在大肠癌中其他生物学特性及作用机制还未明确,值得进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Han Y, Yang Y, Yuan H, et al. UCA1, a long non-coding RNA up-regulated in colorectal cancer influences cell proliferation, apoptosis and cell cycle distribution [J]. Pathology, 2014, 46(5): 396-401.
- [2] Chen J, Xiao H, Huang Z, et al. MicroRNA124 regulate cell growth of prostate cancer cells by targeting iASPP[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(5): 2283-2290.
- [3] Tang Y, He R, An J, et al. lncRNA XIST interacts with miR-140 to modulate lung cancer growth by targeting iASPP[J]. Oncol Rep, 2017, 38(2): 941-948.
- [4] Wang LL, Xu Z, Peng Y, et al. Downregulation of inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53 inhibits proliferation and promotes apoptosis of gastric cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(2): 1653-1658.
- [5] Chen Y, Yan W, He S, et al. In vitro effect of iASPP on cell growth of oral tongue squamous cell carcinoma [J]. Chin J Cancer Res, 2014, 26(4): 382-390.
- [6] Xin C, Zhang H, Liu Z. miR-154 suppresses colorectal cancer cell growth and motility by targeting TLR2 [J]. Mol Cell Biochem, 2014, 387(1-2): 271-277.
- [7] Zhu YX, Zhao MX, Jiang DG, et al. Expression of tumor suppressor gene p53, apoptosis-suppressing gene Bcl-2, pro-apoptotic gene Bax in gastric cancer and precancerous lesions [J]. Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2016, 25(9): 1040-1043. [朱玉侠, 赵明星, 姜登鸽, 等. 抑癌基因 p53, 凋亡抑制基因 Bcl-2, 促凋亡基因

- Bax 在胃癌及癌前病变中的表达[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2016, 25(9): 1040–1043.]
- [8] Liu H, Chen F, Zhang L, et al. A novel all-trans retinoic acid derivative 4-amino-2-trifluoromethyl-phenyl retinate inhibits the proliferation of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by inducing G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis via upregulation of p53 and ASPP1 and down-regulation of iASPP[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(1): 333–341.
- [9] Kim JW, Roh JL, Park Y, et al. Cytoplasmic iASPP expression as a novel prognostic indicator in oral cavity squamous cell carcinoma[J]. *Ann Surg Oncol*, 2015, 22(2): 662–669.
- [10] Amirkhah R, Schmitz U, Linnebacher M, et al. MicroRNA-mRNA interactions in colorectal cancer and their role in tumor progression [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2015, 54(3): 129–141.
- [11] Sun Y, Zhao X, Luo M, et al. The pro-apoptotic role of the regulatory feedback loop between miR-124 and PKM1/HNF4 α in colorectal cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(3): 4318–4332.
- [12] Melling N, Kowitz CM, Simon R, et al. High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer[J]. *J Clin Pathol*, 2016, 69(3): 209–214.
- [13] Ren JX, Liu S, Sun Y, et al. Inhibitory effect of neostatin on C6 glioma cells [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2016, 36(19): 4705–4706. [任吉祥, 刘爽, 孙洋, 等. 新型肿瘤抑制剂对 C6 神经胶质瘤细胞抑制作用的影响[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(19): 4705–4706.]
- [14] Yin D, Liu Z, Zhang E, et al. Decreased expression of long noncoding RNA MEG3 affects cell proliferation and predicts a poor prognosis in patients with colorectal cancer[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(6): 4851–4859.
- [15] Liu L, Wang Y, Sang JZ. Expression and significance of p-Stat3 and its downstream target gene c-myc in laryngeal squamous cell carcinoma tissues and cells [J]. *Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*, 2016, 30(2): 123–125. [刘丽, 王莹, 桑建中. p-Stat3 及其下游靶基因 c-myc 在喉鳞癌组织和细胞中的表达及意义[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2016, 30(2): 123–125.]
- [16] Kim C, Kim JH, Oh EY, et al. Blockage of STAT3 signaling pathway by morusin induces apoptosis and inhibits invasion in human pancreatic tumor cells [J]. *Pancreas*, 2016, 45(3): 409–419.
- [17] Sanchez-Lopez E, Flashner-Abramson E, Shalapour S, et al. Targeting colorectal cancer via its microenvironment by inhibiting IGF-1 receptor-insulin receptor substrate and STAT3 signaling[J]. *Oncogene*, 2016, 35(20): 2634–2644.
- [18] Zhao B, Dong AS. MiR-874 inhibits cell growth and induces apoptosis by targeting STAT3 in human colorectal cancer cells[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(2): 269–277.