

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.05.007

# 靶向 Bcl-x<sub>L</sub> 基因 siRNA 在前列腺癌细胞增殖和凋亡中的作用

王政华,牟平,刘晓梅,朱志图

## Effect of siRNA Targeted against Bcl-x<sub>L</sub> on Cell Proliferation and Apoptosis of Prostate Cancer Cells

WANG Zheng-hua, MU Ping, LIU Xiao-mei, ZHU Zhi-tu

Department of Tumor, The First Affiliated Hospital, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China

Corresponding Author: ZHU Zhi-tu, E-mail: heroiheart@163.com

**Abstract: Objective** To investigate the effect of siRNA targeted against Bcl-x<sub>L</sub> on cell proliferation and apoptosis of PC-3 prostate cancer cells. **Methods** A siRNA plasmid expression vector against Bcl-x<sub>L</sub> was constructed and transfected into PC-3 cells. The changes of Bcl-x<sub>L</sub> mRNA and protein expression were detected by semi-quantitative RT-PCR and Western blot respectively. Cell proliferation was detected by MTT assay. Cell apoptosis was evaluated by flow cytometry. **Results** The sequence-specific siRNA effectively suppressed Bcl-x<sub>L</sub> expressing at both mRNA and protein levels. Bcl-x<sub>L</sub> expression significantly inhibited the proliferation ( $P < 0.001$ ) and induced apoptosis of PC-3 cells ( $P < 0.001$ ) respectively. **Conclusion** siRNA targeted against Bcl-x<sub>L</sub> could effectively suppress PC-3 cell proliferation and significantly induce PC-3 cell apoptosis.

**Key words:** Bcl-x<sub>L</sub>; RNA interference; Prostate cancer; Proliferation; Apoptosis

**摘要:目的** 研究 Bcl-x<sub>L</sub> 基因特异性 RNA 干扰对前列腺癌 PC-3 细胞株体外增殖能力和凋亡的影响。**方法** 构建靶向 Bcl-x<sub>L</sub> 的小干扰 RNA (siRNA) 表达载体, 转染 PC-3 细胞后, 采用半定量 RT-PCR 和 Western blot 法检测转染前后 Bcl-x<sub>L</sub> mRNA 及蛋白表达水平的改变; 采用噻唑兰 (MTT) 法检测细胞生长增殖情况; TUNEL 试剂盒测定细胞的凋亡情况。**结果** 靶向 Bcl-x<sub>L</sub> 的序列特异性的 siRNA 可以有效地抑制 PC-3 细胞 Bcl-x<sub>L</sub> 基因的表达。转染靶向 Bcl-x<sub>L</sub> 的 siRNA 表达质粒可以显著抑制 PC-3 细胞的增殖 ( $P < 0.001$ ), 诱导细胞凋亡 ( $P < 0.001$ )。 **结论** Bcl-x<sub>L</sub> 基因特异性 RNA 干扰可以显著抑制前列腺癌 PC-3 细胞的体外增殖并诱导细胞凋亡。

**关键词:** Bcl-x<sub>L</sub>; RNA 干扰; 前列腺癌; 细胞增殖; 细胞凋亡

**中图分类号:** R737.25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)05-0509-03

## 0 引言

Bcl-x<sub>L</sub> 是 Bcl-2 家族中一个重要的凋亡抑制基因, 它在多种恶性肿瘤中高表达, 与肿瘤的发生、发展及预后密切相关<sup>[1-3]</sup>; 它的高表达与某些恶性肿瘤如鳞状细胞癌、肝癌、大肠癌和乳腺癌细胞的侵袭、转移具有重要的关系<sup>[2-6]</sup>。体外试验中发现, Bcl-x<sub>L</sub> 基因表达水平增高或降低后, 癌细胞侵袭性也相应地增强或者减弱<sup>[7-9]</sup>。由此提示, Bcl-x<sub>L</sub> 基因在某些癌细胞侵袭中发挥着重要的作用。本研究采用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术, 以化学

合成的 Bcl-x<sub>L</sub> 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 转染前列腺癌细胞 PC-3, 观察其在前列腺癌细胞增殖和凋亡中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人前列腺癌 PC-3 细胞购于 American Type Culture Collection, Manassas, VA; RPMI1640 培养液、胎牛血清 (FBS)、胰蛋白酶购自 Gibco 公司; Lipofect A mine plus 试剂购自 Invitrogen 公司; PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司; A-MLV 反转录试剂盒购自 Promega 公司; Bcl-x<sub>L</sub> 和  $\beta$ -actin 抗体购自 Cell Signalling 公司; ECL 化学发光检测试剂盒购自安玛西亚公司; TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自上海凯基生物技术有限公司, z-VAD-FMK 和 STS 购自 Sigma 公司。

收稿日期: 2010-07-15; 修回日期: 2010-11-26

作者单位: 121001 辽宁锦州, 辽宁医学院附属第一医院肿瘤科

通信作者: 朱志图, E-mail: heroiheart@163.com

作者简介: 王政华 (1977-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤病理的研究

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 前列腺细胞系 PC-3, 具有雄激素依赖特征, 培养在改良的 F-12 培养液中, 含 10% 热灭活胎牛血清, 37°C、5%CO<sub>2</sub> 孵箱中。

1.2.2 siRNA 的构建 四对 siRNA 靶向人 Bcl-x<sub>L</sub> mRNA(序列号为 NM\_138578) 和一个随机对照 siRNA 序列。根据序列特异于 Bcl-x<sub>L</sub> 设计 siRNA, 所有的 siRNA 由 Dharmacom 公司合成(Lafayette, CO)。

1.2.3 siRNA 体外转染 siRNA 转染实验采用脂质体 Lipofect A mine plus 介导。在 4°C 条件下, siRNA 预先包埋在 6 孔培养板中, 每孔含 100 pmol/0.5ml 的 siRNA, PC-3 细胞接种于 6 孔培养板中, 细胞浓度为 1 × 10<sup>5</sup>/孔, 72 h 后细胞裂解。

1.2.4 RT-PCR 和实时 PCR 总 RNA 以细胞中抽提, 用 RT-PCR 和实时 PCR 分析。人 Bcl-x<sub>L</sub>、Bcl-2、Mcl-1 和 BAX 根据 Zhang 等<sup>[10]</sup> 和 Komnro 等<sup>[11]</sup> 的论文设计, 针对 Bcl-xS 的正义链为 5'-GCTTTGAACAGGATACTTTTGTGG-3', 反义链为 5'-AAGGCAATCTAGTCTCCTTTCTGG-3'。PCR 条件: 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min。循环 30 次。

1.2.5 蛋白印迹分析 细胞用缓冲液 E 裂解(用 PBS 配液, 1% NP-40, 0.5% 脱氧化酶, 0.1% 十二烷基硫化物, 50 nm 氟化钠), 蛋白浓度用 Bio-rad Dc 蛋白试剂盒测定。等量蛋白(每孔 30 μg)用 12% SDS-PAGE 电泳分离, 电转至纤维素膜上, 在含有 0.1% Tween-20 的 5% 脱脂奶粉中, 室温封闭 1h。然后用鼠抗人 Bcl-x<sub>L</sub> 抗体室温培养 1h, 用含 0.1% Tween-20 的 PBS 洗膜, 最后采用羊抗鼠辣根过氧化物酶法测定(按照试剂盒说明书操作)。

1.2.6 细胞增殖分析 为测定 Bcl-x<sub>L</sub>-siRNA 对细胞增殖的影响, 细胞分别被 Bcl-x<sub>L</sub>-siRNA 和阴性对照 Bcl-x<sub>L</sub>-siRNA-SCR 转染, 接种在 96 孔培养板。细胞密度为每孔 1 × 10<sup>4</sup> 个, 12 h 后, 培养液换成无血清培养液。在特定时间里, 用细胞计数试剂盒测定细胞活性。

1.2.7 TUNEL 实验 细胞用 Bcl-x<sub>L</sub>-siRNA(或 Bcl-x<sub>L</sub>-siRNA-SCR)转染 48 h 后, 重新接种 8 个平皿中。细胞浓度为每皿 3 × 10<sup>4</sup> 个, 72 h 后进行 TUNEL 实验。TUNEL 阳性细胞用 MetaMoyoh 软件计数。

1.2.8 统计学方法 实验数据应用 SPSS 12.0 软件处理, 采用 t 检验法, P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 siRNA 的选择

首先挑选有效的 siRNA, 通过转染 4 个 Bcl-x<sub>L</sub>-

siRNA 进入 PC-3 细胞, 采用 Lipofect A mine Plus 转染 PC-3 细胞后。3 号显示 99% 基因沉默 Bcl-x<sub>L</sub> 蛋白表达, 见图 1。因此我们挑选 3 号 siRNA 作为最有效的 siRNA 进行后续试验, 其几乎完全抑制 Bcl-x<sub>L</sub> 蛋白表达及其 mRNA 含量。而阴性对照 siRNA 既没有降低蛋白表达也没有影响 mRNA 水平。

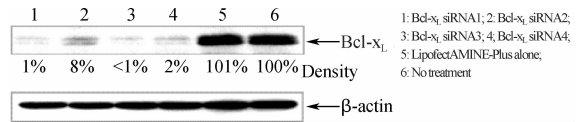


图 1 Western 印迹法检测 Bcl-x<sub>L</sub> 蛋白表达水平  
Figure 1 Bcl-x<sub>L</sub> expressions in the prostate cancer cells PC-3 detected by Western blot

### 2.2 Bcl-x<sub>L</sub>-siRNA 特异抑制 PC-3 细胞中的 Bcl-x<sub>L</sub> mRNA

用 RT-PCR 方法, 观察 Bcl-x<sub>L</sub>-siRNA 是否对 Bcl-2 家族其他成员有影响。结果显示: Bcl-x<sub>L</sub>-siRNA 特异抑制 Bcl-x<sub>L</sub> 的表达, 而不影响 Bcl-2 家族其他成员(Bcl-xS、Bcl-2、Mcl-1、Bax)的表达, 见图 2。

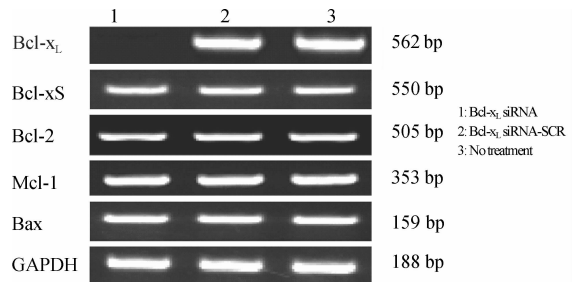


图 2 RT-PCR 检测 PC-3 细胞中其他 Bcl-2 家族成员的表达  
Figure 2 Levels of other Bcl-2 family members in prostate cancer cells PC-3 detected by RT-PCR

### 2.3 Bcl-x<sub>L</sub> 下调抑制 PC-3 细胞生长

转染 Bcl-x<sub>L</sub>-siRNA 或对照 SCR-siRNA 进入 PC-3 细胞, 48 h 后, 观察其对细胞增殖的影响。对比 Bcl-x<sub>L</sub>-siRNA 和 Bcl-x<sub>L</sub>-siRNA-SCR 的生长曲线, 发现 Bcl-x<sub>L</sub>-siRNA 显著抑制细胞生长( $t_{siRNA} = 5.82, P < 0.001; t_{SCR} = 1.03, P > 0.05$ ), 见图 3。

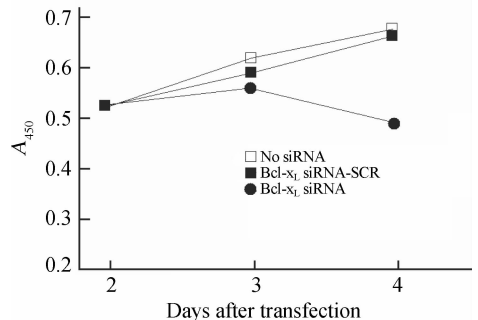


图 3 细胞生长曲线

Figure 3 The cell growth curve of the cells transfected with Bcl-x<sub>L</sub>-siRNA or Bcl-x<sub>L</sub>-siRNA-SCR

### 2.4 Bcl-x<sub>L</sub>-siRNA 在体外增加 PC-3 细胞凋亡

用 Bcl-x<sub>L</sub>-siRNA 处理 PC-3 细胞显示有高比例的 TUNEL 阳性细胞 ( $t_{No\ siRNA} = 4.68, P < 0.001$ )。对比 Bcl-x<sub>L</sub>-siRNA-SCR 和 Bcl-x<sub>L</sub> siRNA 加 z-VAD-FMK 共孵育时,得到相似结果 ( $t_{SCR} = 4.97, P < 0.001; t_{z-VAD-FMK} = 5.21, P < 0.001$ ),见图 4。可见在 PC-3 细胞中 Bcl-x<sub>L</sub> 下调通过 Caspase-3 途径诱导凋亡。

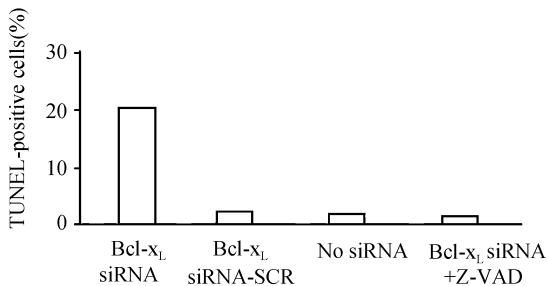


图 4 TUNEL 实验检测 Bcl-x<sub>L</sub>-siRNA 对前列腺癌 PC-3 细胞凋亡的影响

Figure 4 Effect of Bcl-x<sub>L</sub>-siRNA on apoptosis of prostate cancer cells PC-3 detected by TUNEL

### 3 讨论

Bcl-x<sub>L</sub> 作为 Bcl-2 家族中一个重要的凋亡抑制基因,在多种恶性肿瘤中高表达,与肿瘤的发生、发展及预后密切相关。Bcl-x<sub>L</sub> 基因高表达与肝癌、大肠癌和乳腺癌等恶性肿瘤细胞侵袭、转移具有重要的关系。体外试验研究发现,Bcl-x<sub>L</sub> 基因表达水平增高或降低后,癌细胞侵袭性也相应地增强或者减弱。由此提示,Bcl-x<sub>L</sub> 基因在某些癌细胞侵袭中发挥着重要的作用。本实验对 Bcl-x<sub>L</sub> 与前列腺癌关系的研究表明,Bcl-x<sub>L</sub> 在前列腺癌中存在着高表达,并通过抑制细胞凋亡参与前列腺癌的发生、发展。这些研究提示 Bcl-x<sub>L</sub> 有望成为前列腺癌基因治疗中的有效靶点。

RNAi 是一种由双链 RNA 介导的序列特异性的转录后基因沉默过程。自发现以来,siRNA 已广泛应用于基因功能、肿瘤、病毒性疾病等的治疗研究,用 RNAi 沉默 survivin 和 VEGF 基因表达对前列腺癌细胞系 PC-3 的研究已见报道<sup>[13-14]</sup>。本研究构建了靶向 Bcl-x<sub>L</sub> 基因的 siRNA 表达质粒并转染前列腺癌细胞 PC-3,通过半定量 RT-PCR 及 Western blot 检测结果表明,所构建的靶向 Bcl-x<sub>L</sub> 的 siRNA 表达载体具有高度的特异性,可有效地抑制 PC-3 细胞中 Bcl-x<sub>L</sub> 基因 mRNA 及蛋白的表达;抑制 PC-3 细胞 Bcl-x<sub>L</sub> 基因的表达可以显著抑制细胞的增殖并诱导明显的细胞凋亡。本研究结果不但证

实了 Bcl-x<sub>L</sub> 通过抑制细胞凋亡参与前列腺癌的发生、发展,而且提示了靶向 Bcl-x<sub>L</sub> 的 siRNA 在前列腺癌的治疗中可能具有实际的价值。

### 参考文献:

- [1] Krecicki T, Fraczek M, Kozlak J, et al. Bcl-xL protein expression in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Clin Otolaryngol, 2004, 29(1): 55-58.
- [2] Zhao WL, Daneshpouy ME, Mounier N, et al. Prognostic significance of bcl-xL gene expression and apoptotic cell counts in follicular lymphoma [J]. Blood, 2004, 103(2): 695-697.
- [3] Watanabe J, Kushihata F, Honda K, et al. Prognostic significance of Bcl-xL in human hepatocellular carcinoma [J]. Surgery, 2004, 135(6): 604-612.
- [4] Ogura E, Senzaki H, Yamamoto D, et al. Prognostic significance of Bcl-2, Bcl-xL/S, Bax and Bak expressions in colorectal carcinomas [J]. Oncol Rep, 1999, 6(2): 365-369.
- [5] Han HS, Park YM, Hwang TS. Differential expression of Bcl-2, Bcl-xL and p53 in colorectal cancer [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2006, 21(7): 1108-1114.
- [6] Zhang YL, Pang LQ, Wu Y, et al. Significance of Bcl-xL in human colon carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(19): 3069-3073.
- [7] España L, Fernández Y, Rubio N, et al. Overexpression of Bcl-xL in human breast cancer cells enhances organ-selective lymph node metastasis [J]. Breast Cancer Res Treat, 2004, 87(1): 33-44.
- [8] Weiler M, Bähr O, Hohlweg U, et al. Bcl-xL: time-dependent dissociation between modulation of apoptosis and invasiveness in human malignant glioma cells [J]. Cell Death Differ, 2006, 13(7): 1156-1169.
- [9] Fernández Y, España L, Mañas S, et al. Bcl-xL promotes metastasis of breast cancer cells by induction of cytokines resistance [J]. Cell Death Differ, 2000, 7(4): 350-359.
- [10] Zhang L, Zhao H, Sun A, et al. Early down-regulation of Bcl-xL expression during megakaryocytic differentiation of thrombopoietin-induced CD34<sup>+</sup> bone marrow cells in essential thrombocythemia [J]. Haematologica, 2004, 89(10): 1199-1206.
- [11] Komuro I, Yasuda T, Iwamoto A, et al. Catalase plays a critical role in the CSF-independent survival of human macrophages via regulation of the expression of BCL-2 family [J]. J Biol Chem, 2005, 280(50): 41137-41145.
- [12] Ohga S, Nomura A, Takada H, et al. Dominant expression of interleukin-10 and transforming growth factor-beta genes in activated T-cells of chronic active Epstein-Barr virus infection [J]. J Med Virol, 2004, 74(3): 449-458.
- [13] 沈建军, 刘家云, 苏明权, 等. 用 RNAi 沉默 survivin 基因表达对前列腺癌细胞系 PC3 的影响 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2006, 13(1): 37-41.
- [14] 李然伟, 王珂, 杨泽成, 等. siRNA 抑制人前列腺癌 PC-3 细胞株 VEGF 的表达及细胞增殖 [J]. 吉林大学学报(医学版) 2008, 34(4): 585-589.