

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.05.004

RNA 干扰抑制 BMP-2 基因表达对人肝癌 SMMC7721 细胞增殖和凋亡的影响

吴建兵,傅华群,刘安文,张吉翔

BMP-2-siRNA Mediated Apoptosis and Proliferation of Human Hepatoma Cell Line SMMC7721

WU Jian-bing, FU Hua-qun, LIU An-wen, ZHANG Ji-xiang

Department of Oncology, The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China

Abstract: Objective To design and synthesis siRNAs targeting Bone Morphogenetic Protein2 (BMP-2) gene and to observe its influence on the proliferation and apoptosis of SMMC7721 cells. **Methods** Three specific siRNAs of BMP-2 were designed and synthesized, and were transiently transfected into SMMC7721 via cathodolyte liposome transfection method. Reverse transcriptase PCR and Western blotting were used to measure BMP-2 expression at mRNA and protein level, respectively. 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 BMP-2-siRNA (A, B, C) could effectively inhibit the expression of BMP-2 gene, BMP-2-siRNA-B had the highest inhibitive effect. The proliferation of SMMC7721 cells was markedly inhibited and the apoptosis of SMMC7721 cells was increased transfected by BMP-2-siRNAs ($P < 0.05$). **Conclusion** The siRNA of BMP-2 could effectively inhibit the expression of BMP-2 and induce the growth inhibition and apoptosis increase in SMMC7721 cells.

Key words: Liver cancer; Bone Morphogenetic Proteins; RNA interference; Proliferation; Apoptosis

摘要:目的 设计并化学合成针对骨形态发生蛋白 2 (BMP-2) 的 siRNA 分子片段, 转染人肝癌 SMMC7721 细胞, 观察其对 SMMC7721 细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 阳离子脂质体法瞬间转染 SMMC7721 细胞, 半定量逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 法和 Western 印迹法检测转染 BMP-2-siRNA 后细胞 BMP-2 mRNA 水平和蛋白水平的变化, MTT 法和流式细胞术检测转染 BMP-2-siRNA 后 SMMC7721 细胞增殖、细胞周期和凋亡的变化。**结果** 3 对特异性 BMP-2-siRNA 均有效地抑制了 BMP-2 基因的表达, 以 siRNA-B 抑制效果最好。转染 BMP-2-siRNA 后 SMMC7721 细胞的增殖能力明显受到抑制 ($P < 0.05$) 且明显促进了 SMMC7721 细胞的凋亡。**结论** 靶向 BMP-2 基因的 siRNA 分子片段可以有效地抑制人肝癌 SMMC7721 细胞的增殖并促进其凋亡。

关键词: 肝癌; 骨形态发生蛋白; RNA 干扰; 增殖; 凋亡

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2010)05-0503-04

0 引言

骨形态发生蛋白 (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs) 是一组能广泛参与调节多种细胞增殖、分化和凋亡的生物学过程的功能蛋白, 能诱导前体细胞的迁移和分化, 近期研究认为 BMPs 的表达不但涉及到胚胎、器官的形成, 更包括肿瘤的形成和发展, 尤其在肿瘤的增殖和凋亡特性中, BMPs 扮演了十分重要的角色, 其中 BMP-2 与肿瘤的关系最为密切。因此, 本研

究旨在采用 RNA 干扰技术抑制肝癌 SMMC7721 细胞中 BMP-2 基因的表达, 观察其对肝癌 SMMC7721 细胞增殖和凋亡方面的影响, 为进一步研究 BMPs 在人肝癌发生、发展及生物学特性中所起的作用提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人肝癌细胞株 SMMC7721 购自上海麦莎生物科技有限公司, RPMI1640 培养液 (美国 Hyclone 公司), 二甲基亚砜 (DMSO) (美国 Sigma 公司), 胰蛋白酶 (北京 Solarbio 公司), 胎牛血清 (杭州四季青公司),

收稿日期: 2009-03-10; 修回日期: 2009-09-10

作者单位: 330006 南昌大学第二附属医院肿瘤科

作者简介: 吴建兵 (1970-), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事肿瘤综合治疗工作

Trizol 试剂(北京天更公司), Lipofectamine2000 (Invitrogen 公司), 逆转录试剂盒 (Fermentas 公司), BMP-2 鼠抗人单克隆抗体、Actin 兔抗人多克隆抗体 (Santa Cruz 公司), 山羊抗鼠二抗、山羊抗兔二抗 (北京中杉金桥生物公司), 免疫印迹配胶、电泳、电转装置 (Bio-Rad 公司), 流式细胞仪 (BD 公司)。

1.2 细胞复苏与培养

液氮中取出 SMMC7721 细胞, 37℃ 水浴化冻, 快速放入含 10% 胎牛血清、RPMI1640 培养液中, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育, 生长至 90% 密度时无菌条件下 0.25% 胰酶 37℃ 消化传代。

1.3 BMP-2-siRNA 靶序列的设计与合成

从 GenBank 中检索出人类 hBMP-2 mRNA 全序列 (NM_001200), 通过同源性比对, 找出 BMP-2 的保守区。利用保守区序列进一步与人类基因组进行比对, 找出 BMP-2 的特异序列, 针对这些特异序列设计合成 3 对 hBMP-2-siRNA 序列, 分别命名为 BMP-2-siRNA-A, BMP-2-siRNA-B 及 BMP-2-siRNA-C 并设计阴性对照。siRNA 转录模板由广州锐生生物工程公司合成, 序列见表 1。

1.4 分组及转染

细胞转染时常规分为以下 6 组: I 组为正常对照组 (未经转染的细胞); II 组为空白对照组 (只转染脂质体, 无特异性 siRNA); III 组为阴性对照组 (转染非特异性 siRNA); IV, V, VI 组为转染组 (分别转染 BMP-2-siRNA-A, BMP-2-siRNA-B 及 BMP-2-siRNA-C)。调节细胞浓度为 2×10^5 /ml, 接种于六孔板内, 培养箱培养 24 h, 细胞密度约达 40% ~ 50% 融合时用于转染。转染前细胞用无血清 RPMI1640 培养液 3 ml 培养 2 h。按转染试剂盒说明书操作。转染后 6 h, 换成常规含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液继续培养至 48 h。

1.5 半定量 PCR 检测 BMP-2 mRNA 水平的表达

采用一步法提取总 RNA。BMP-2 及 GAPDH 内参引物由广州锐生生物工程有限公司合成。BMP-2 引物上游 5'-AACCTGCAACAGCCAACT-3'; 下游 5'-GGAGCCACAATCCAGTCAT-3', PCR 产物长度 418 bp, 内参 GAPDH 引物上游 5'-GAAGGTCCGAGTCAACGG-3', 下游 5'-GCTCAGTGTAGCCAGGAT-3', PCR 产物长度为 825 bp。PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 2 min, 然后 94℃ 变性 45 s, 52℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后观察结果。

1.6 Western 印迹检测 BMP-2 蛋白水平的表达

蛋白质的提取: 将预冷至 4℃ 的 5 倍体积的裂解缓冲液加入到经 PBS 漂洗的各培养组细胞中, 冰

上作用 20 min, 于 4℃, 12 000 g 离心 2 min 后取上清液 -20℃ 保存备用。采用 Bradford 法测定蛋白质浓度, 以每孔 50 μg 上样, 在非还原的条件下经 12% 的 SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离后, 转移至硝酸纤维素膜上, 在含 5% 脱脂奶粉的 PBS 中 4℃ 封闭过夜, 加入 1:200 稀释的鼠抗人 BMP-2 抗体, 室温下反应 2 h, 经 0.05% Tween-PBS 洗涤 3 次后, 再与 1:2 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 作用 2 h, 0.05% Tween-PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min。最后, ECL 显影, 压片, 观察结果。以 GAPDH 为内参照, 目的蛋白量 = 目的蛋白条带吸光度 / GAPDH 条带吸光度, 实验重复 3 次。

1.7 噻唑蓝 (MTT) 比色实验

MTT 实验检测细胞生长抑制情况, 转染前 1 天胰酶消化细胞并计数, 铺于 96 孔板, 细胞密度为每孔 1×10^4 , 24 h 后加 20 μl 浓度为 5 g/L 的 MTT 终止干扰, 37℃ 孵育 4 h, 弃上清液, 加 100 μl 二甲基亚砜 (DMSO), 避光条件下, 在微震器上震荡 10 min 使结晶溶解, 经酶联检测仪 490 nm 波长检测吸光度 (A) 值。按以下公式计算各组抑制率: 抑制率 (%) = (对照组 A 均值 - 实验组 A 均值) / 对照组 A 均值 × 100%。

1.8 FCM 法检测细胞周期分布及凋亡情况

转染 48 h 后消化细胞, 调整细胞浓度为 1×10^6 个细胞/ml。一部分用 70% 的冰乙醇 4℃ 条件下固定 12 h, 随后用含 RNase 及碘化丙啶 (PI) 的染液处理 30 min, FCM 法分析细胞周期。另一部分按 Annexin / FITC 及 PI 试剂盒提供方法依次加入结合缓冲液。Annexin / FITC 及 PI 4℃ 避光处理 30 min 后, 流式细胞仪检测, 分析软件计算细胞凋亡率, 实验重复 3 次。

1.9 统计学方法

实验数据均应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMP-2 基因沉默对 SMMC7721 细胞中 BMP-2 mRNA、蛋白表达的影响

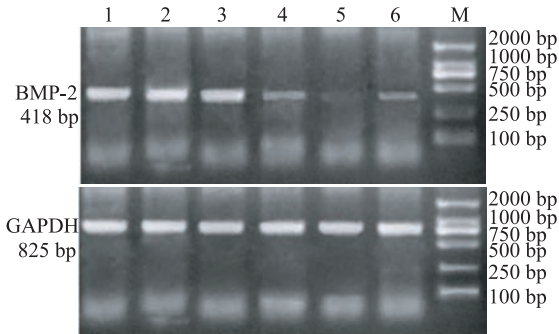
脂质体法转染 SMMC7721 细胞后 48 h, 经半定量 RT-PCR 结果显示各组样品在 825 bp 处有 GAPDH 基因条带, BMP-2 基因条带在约 418 bp 处, 见图 1。各组条带经吸光度测定、计算 BMP-2 / GAPDH 比值并进行比较, 可见 3 个干扰组细胞 BMP-2 表达均低于与其他对照组 ($P < 0.05$)。其中, BMP-2-siRNA-B 干扰组干扰效果最好, mRNA

表达最低 ($P < 0.01$)。吸光度分析结果, 见图 2。Western 印迹法检测结果显示 BMP-2-siRNA-B 组转染后干扰效果最好, BMP-2 蛋白的表达量明显下降, ($P < 0.05$), Western blot 检测结果与 RT-PCR 一致, 见图 3。

表 1 特异性 BMP-2-siRNA 序列

Table 1 Specific BMP-2-siRNA sequence

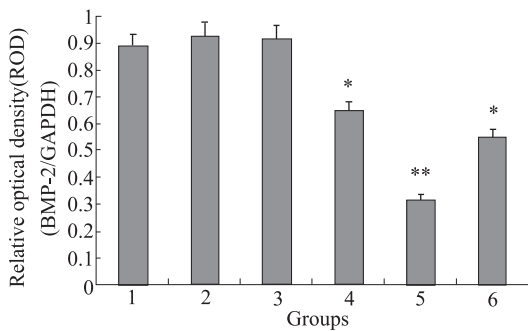
Sequence name	Sequence(5'-3')
BMP-2-siRNA-A sense:	5'GCAGGUCUUUGCACCAAGA dTdT 3'
Anti-sense:	5'UCUUGGUGCAAAGACCCUGC dTdT 3'
BMP-2-siRNA-B sense:	5'GCAACAGCCAACUCGAAAU dTdT 3'
Anti-sense:	5'AUUCGAGUUGGCUGUUGC dTdT 3'
BMP-2-siRNA-C sense:	5'GCGUACCUUGACGAGAAU dTdT 3'
Anti-sense:	5'AUUCUCGUC AAGGUACAGC dTdT 3'



M: marker; 1: normal control; 2: control group; 3: negative control; 4: BMP-2-siRNA-A; 5: BMP-2-siRNA-B; 6: BMP-2-siRNA-C

图 1 半定量 RT-PCR 方法检测

SMMC7721 细胞中 BMP-2mRNA 表达
Figure 1 BMP-2mRNA level in hepatoma cells SMMC7721 detected by RT-PCR



*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ vs. normal control, control group and negative control, I: normal control; II: control group; III: negative control; IV: BMP-2-siRNA-A; V: BMP-2-siRNA-B; VI: BMP-2-siRNA-C

图 2 SMMC7721 细胞中 BMP-2mRNA 表达的吸光度测定结果

Figure 2 Spectordensitometry assay of BMP-2 expression in hepatoma cells SMMC7721 detected by RT-PCR

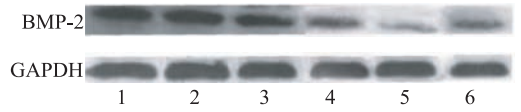
2.2 MTT 法检测 SMMC7721 细胞增殖抑制效果

结果显示, BMP-2-siRNA-B 组细胞与各对照组相比, 出现了明显的生长抑制现象, 见表 2。

2.3 BMP-2 基因沉默对 SMMC7721 细胞凋亡的

影响

检测结果显示, BMP-2-siRNA 组与其他三个对照组各两两比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2, 图 4。



1: normal control; 2: control group; 3: negative control; 4: BMP-2-siRNA-A; 5: BMP-2-siRNA-B; 6: BMP-2-siRNA-C

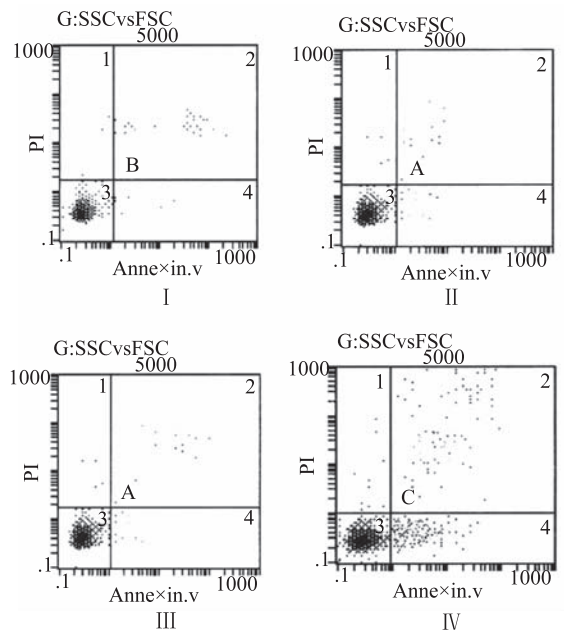
图 3 Western 印迹法检测各组 BMP-2 蛋白表达水平
Figure 3 BMP-2 expression in the the hepatoma cells SMMC7721 detected by Western blot

表 2 BMP-2-siRNA 对肝癌 SMMC7721 细胞增殖和凋亡的影响

Table 2 Effect of BMP-2-siRNA on proliferation and apoptosis of hepatoma cells SMMC7721

Group	Proliferate inhibition ratio(%)	Appottosis ratio(%)
Normal control group	2.1 ± 0.2	1.7 ± 0.5
Control group	2.7 ± 0.3	1.9 ± 0.7
Negative control group	3.1 ± 0.5	2.0 ± 0.7
BMP-2-siRNA group	47.5 ± 1.4*	10.3 ± 1.5#

Note: *: $P < 0.01$ vs. normal control, control group and negative control, #: $P < 0.05$ vs. normal control, control group and negative control



I: normal control; II: control group; III: negative control; IV: BMP-2-siRNA

图 4 流式细胞仪检测 BMP-2-siRNA 对肝癌 SMMC7721 细胞凋亡的影响

Figure 4 Effect of BMP-2-siRNA on apoptosis of hepatoma cells SMMC7721 by Flow Cytometry

3 讨论

目前已确定多种恶性肿瘤中存在 BMP-2 表达

异常以过表达为主,其中尤以 BMP-2、3、4、5、6、7 的表达更为常见且重要^[1-4],BMP-2 在 98% 的非小细胞肺癌中过表达^[5],Langenfeld 等^[6]研究发现 BMP-2 在人类非小细胞肺癌中异常高表达,在肺良性肿瘤及正常肺组织中无表达,BMP-2 在前列腺癌、大肠癌、黑色素瘤及骨髓瘤及头颈部肿瘤中均过表达^[7-9],Iantosca 等^[10]研究 BMP-2、4、6 对未分化的小脑原始神经外胚层肿瘤细胞系 DAOY 的作用,发现在 BMP-2 和 BMP-4 处理组中,凋亡细胞数明显减少,由此认为,细胞数增加是 BMP-2 和 BMP-4 抑制细胞凋亡的结果,这种抗凋亡作用对于神经外胚层肿瘤具有重要的临床意义。最新的研究发现 BMP-2 刺激乳腺癌和肺癌生长是由于其在乳腺癌和肺癌细胞中诱导 Id-1 的表达^[11],而 Id-1 被证明可以刺激癌细胞的增殖和转移。另外,BMP-2 还可以通过 PI3k/mTOR 信号途径增加细胞周期蛋白 E mRNA 的水平,从而调节肿瘤细胞的增殖周期^[12]。Piccirillo 等^[13]报道 BMP-BMPR 信号系统控制正常脑干细胞的活动,在恶性胶质瘤形成初期起关键的抑制作用,BMP-2、4 可以作为人恶性胶质瘤一个非细胞毒治疗的新靶点。Busch 等^[14]发现 BMP-2 可以增加黑色素瘤 B16-F1 细胞的侵袭性,Montesano^[15]发现 BMP-4 可促进乳腺上皮细胞侵袭性生长,在(1~10) $\mu\text{g/L}$ 的溶度时,BMP4 诱导乳腺上皮细胞向外侵袭性生长,在较高的溶度(20~100) $\mu\text{g/L}$ 时,BMP4 可导致细胞与细胞之间粘连的断裂,使细胞分散,并促使个体细胞进入周围的胶原基质中,从而增加细胞的侵袭性,促使乳腺癌的形成。在前期的研究中,我们应用半定量逆转录聚合酶链反应和 Western blot 方法检测了正常肝脏组织和肝癌组织的 BMP-2 的表达水平,发现肝癌组 BMP-2 mRNA 水平和蛋白水平的相对表达量显著高于正常肝脏组织,提示 BMP-2 与肝癌具有密切的关系^[16],但其具体的生物学功能还不清楚。本实验设计并在体外化学合成 3 对 BMP-2-siRNA 序列,利用阳离子脂质体转染法转入人肝癌 SMMC7721 细胞中,通过 RT-PCR 和 Western 印迹技术检测转染后 BMP-2 基因 mRNA 水平和蛋白水平的表达,对 BMP-2 基因干扰后 SMMC7721 细胞生物学功能方面的研究显示,BMP-2 基因沉默后其促进细胞增殖的能力被减弱,结果证实 BMP-2-siRNA 可以诱导 SMMC7721 细胞凋亡,但目前对 BMP-2 诱导细胞凋亡的信号传递系统认识尚不完善。

以上实验证实了 BMP-2-siRNA 能够有效地干扰肝癌细胞系 SMMC7721 中 BMP-2 的表达,抑制肿瘤细胞的生长,诱导肿瘤细胞的凋亡。BMP-2 有

可能成为肝癌治疗的新的靶基因。

参考文献:

- [1] Wu WK, Sung JJ, Wu YC, et al. Bone morphogenetic protein signalling is required for the anti-mitogenic effect of the proteasome inhibitor MG-132 on colon cancer cells[J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 154(3):632-638.
- [2] Dai J, Hall CL, Escara-Wilke J, et al. Prostate cancer induces bone metastasis through Wnt-induced bone morphogenetic protein-dependent and independent mechanisms[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(14):5785-5794.
- [3] Lai TH, Fong YC, Fu WM, et al. Osteoblasts-derived BMP-2 enhances the motility of prostate cancer cells via activation of integrins[J]. *Prostate*, 2008, 68(12):1341-1353.
- [4] Darby S, Cross SS, Brown NJ, et al. BMP-6 over-expression in prostate cancer is associated with increased Id-1 protein and a more invasive phenotype[J]. *J Pathol*, 2008, 214(3):394-404.
- [5] Langenfeld EM, Bojnowski J, Perone J, et al. Expression of bone morphogenetic proteins in human lung carcinomas[J]. *Ann Thorac Surg* 2005, 80(3):1028-1032.
- [6] Langenfeld EM, Calvano SE, Abou-Nukta F, et al. The mature bonemorphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells[J]. *Carcino-genesis*, 2003, 24(9):1445-1454.
- [7] Rothhammer T, Poser I, Soncin F, et al. Bone morphogenic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(2):448-456.
- [8] Beck SE, Jung BH, Fiorino A, et al. Bone morphogenetic protein signaling and growth suppression in colon cancer[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 291(1):135-145.
- [9] Yang S, Pham LK, Liao CP, et al. A novel bone morphogenetic protein signaling in heterotypic cell interactions in prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(1):198-205.
- [10] Iantosca MR, Smith JS, Sato K, et al. Investigation of germline PTEN, P53, P16(INK4A)P14(ARF), and CDK4 alterations in familial glioma[J]. *Am J Med Genet*, 2000, 9(2):136-141.
- [11] Langenfeld EM, Kong Y, Langenfeld J. Bone morphogenetic protein 2 stimulation of tumor growth involves the activation of Smad-1/5[J]. *Oncogene*, 2006, 25(5):685-692.
- [12] Langenfeld EM, Kong Y, Langenfeld J. Bone morphogenetic protein-2 induced transformation involves the activation of mammalian target of rapamycin[J]. *Mol Cancer Res*, 2005, 3(12):679-684.
- [13] Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, et al. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells[J]. *Nature*, 2006, 444(7120):761-765.
- [14] Busch C, Drews U, Eisele SR, et al. Noggin blocks invasive growth of murine B16-F1 melanoma cells in the optic cup of the chick embryo[J]. *Int J Cancer*, 2008, 122(3):526-533.
- [15] Montesano R. Bone morphogenetic protein-4 abrogates lumen formation by mammary epithelial cells and promotes invasive growth[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 353(3):817-822.
- [16] 吴建兵,傅华群,黄龙璋,等.骨形态发生蛋白 2、6 在肝癌中的表达及意义[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(8):834-837.

[编辑:刘红武;校对:黄园玲]