

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2009.01.007

# siRNA 抑制人前列腺癌细胞 PC3 的 MDM2 表达及细胞增殖

李然伟<sup>1</sup>, 赵燕颖<sup>2</sup>, 杨泽城<sup>3</sup>, 张舵舵<sup>4</sup>, 吕佳音<sup>5</sup>, 刘喜春<sup>4</sup>

## siRNA Inhibits MDM2 Expression and Cell Proliferation in PC-3 Cell Line

LI Ran-wei<sup>1</sup>, ZHAO Yan-ying<sup>2</sup>, YANG Ze-cheng<sup>3</sup>, ZHANG Duo-duo<sup>4</sup>, LV Jia-yin<sup>5</sup>, LIU Xi-chun<sup>4</sup>

1. Department of Urinary Surgery, The second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China; 2. Department of internal medicine, Shenzhen Shekou Peodlé's Hospital; 3. Department of Surgery, China-Japan Union Hospital of Jilin University, 4. Department of Radiotherapy, 5. Department of Orthopedics  
Corresponding Author: ZHAO Yan-ying, E-mail: yanying0609@163.com

**Abstract: Objective** To study the effect of siRNA to MDM2 on cell proliferation and MDM2 expression in prostate the cancer cell PC3. **Methods** PGCsilencer<sup>TM</sup>-MDM2 siRNA was constructed and transfected into the PC3 cells. MDM2 gene expression was detected by RT-PCR and protein expression was analyzed using western blot. The inhibitory effect on cell proliferation was determined by MTT assay. The cell apoptosis was observed by flow cytometer. **Results** The results of RT-PCR and western blot showed that the expression of MDM2 was inhibited in the siRNA transfected group and the highest inhibitory rate was 65%. The results of MTT and flow cytometer showed that siRNA could suppress the proliferation and induce apoptosis of PC3 cells. **Conclusion** siRNA of MDM2 could significantly inhibit MDM2 expression, the proliferation of PC3 cells and induce apoptosis of PC3 cells.

**Key words:** siRNA; MDM2; Prostate cancer; RT-PCR; Flow cytometry

**摘要:目的** 研究 siRNA MDM2 对人前列腺癌细胞 PC3 的 MDM2 表达和细胞增殖的作用。**方法** 构建 PGCsilencer<sup>TM</sup>-MDM2 siRNA, 并转染入 PC3 细胞, 分别用 RT-PCR 和 Western blot 检测 siMDM2 对 PC3 细胞 MDM2 基因和蛋白表达的抑制作用; 用 MTT 法检测 siMDM2 对 PC3 增殖抑制的作用, 用流式细胞术检测 siMDM2 对 PC3 细胞凋亡的影响。**结果** RT-PCR 和 Western blot 结果显示 siMDM2 能显著抑制 PC3 细胞 MDM2 基因和蛋白的表达, 抑制率最高可达 65%; MTT 和流式细胞术结果证明 siMDM2 能显著抑制 PC3 细胞增殖并诱导细胞凋亡。**结论** siMDM2 能特异有效地抑制 MDM2 在 PC3 中的表达, 并抑制 PC3 细胞增殖, 促进其凋亡。

**关键词:** siRNA; MDM2; 前列腺癌; RT-PCR; 流式细胞术

**中图分类号:** R735.25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2009)01-0024-04

### 0 引言

前列腺癌是 50 岁以上男性中最常见的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。MDM2 癌基因在许多癌症都过表达, 包括前列腺癌、肉瘤、血液恶性肿瘤、乳腺癌和结肠癌<sup>[2]</sup>。siRNA 技术的有效和特异基因阻断特点, 使其在肿瘤治疗上的应用已成为研究的热点。本文主要研究 siRNA MDM2 对 PC3 人前列腺癌细胞 MDM2 表达、增殖和凋亡的影响, 为基因治疗前列腺癌提供新

的思路和实验依据。

### 1 材料方法

#### 1.1 材料

胎牛血清, IMDM 培养基购自 Gibco 公司; Silencer siRNA construction 试剂盒购自 Ambion 公司; Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 转染试剂和 Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司; MTT 为 Sigma 公司产品; 兔抗人 MDM2 多克隆抗体和碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG 多克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司。

#### 1.2 siRNA 重组质粒构建及鉴定

根据已知 Genebank MDM2 mRNA 序列和 siRNA 的设计原则<sup>[3]</sup>, 利用 Ambion 公司的在线设计来寻找靶序列, 并排除和其他编码序列或 EST 同源的

收稿日期: 2007-07-12; 修回日期: 2007-12-14  
基金项目: 吉林省科委社会发展资助项目(200505118)  
作者单位: 1. 130041 长春, 吉林大学第二临床医院泌尿外科; 2. 深圳市蛇口人民医院内科; 3. 吉林大学中日联谊医院普外科, 4. 放疗科, 5. 骨科  
通信作者: 赵燕颖, E-mail: yanying0609@163.com  
作者简介: 李然伟(1968-), 男, 硕士, 副教授, 主要从事泌尿外科肿瘤的临床和基础研究

序列, siRNA 和靶序列, 见表 1。用 Silencer siRNA construction kit 体外合成针对人 MDM2 基因序列特异的 si MDM2-1、si MDM2-2 和 si MDM2-3, 严格按照试剂盒工作手册进行操作, 阴性对照 control siRNA 与任何编码序列无同源性购于 Ambion。将 PGCSilencer™-MDM2 siRNA 用 *Hind* III/*Bam* HI 双酶切鉴定, 并将 0.8 ml 培养扩增(摇至对数晚期)的细菌加甘油 0.2 ml, 送上海生工检测核苷酸序列。

表 1 siRNA 序列  
Tab 1 siRNA sequence

目的基因组别 Groups	siRNA 序列	
	Sense strand	Anti-sense strand
siMDM2-1	5'-AAGAAGAGAGT-GTGGAACTCA	TAGATTCCA-CACTCTCTTCTT-3'
siMDM2-2	5'-CCACCTCACAGAT-TCCAGC	GCTGGAATCTGT-GAGGTGG-3'
siMDM2-3	5'-AAGATTATAGC-CTTAGTGAAG	CTTACTAAGGC-TATAATCTT-3'

1.3 细胞培养及转染

人前列腺癌细胞 PC3 购自中国科学院上海细胞生物学研究所。PC3 细胞于 IMDM 培养液(含 10% 胎牛血清, 青霉素 100 μg/ml, 链霉素 100 μg/ml), 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱内培养。转染前取对数生长期细胞用无抗生素 IMDM 培养, 待细胞达 80%~95% 融合时分组转染: 空白组(只加转染试剂)、对照组(转染 control siRNA)和 siMDM2 实验组(分别转染 siMDM2-1、siMDM2-2、siMDM2-3)。严格按照 Lipofectamine™2000 试剂说明书进行操作。

1.4 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)

收集转染 48 h 后各组细胞(转染 3 组 siMDM2 的终浓度为 1.6 mg/L, 转染 control siRNA 的 control 和空白组 mock), 按 Trizol 操作说明, 提取个组细胞总 RNA。逆转录反应合成 cDNA 第一链后以 β-actin 为内参照进行 PCR 反应, MDM2 扩增片断长度 300 bp 上游引物为 5'-AACCACCTCACAGATTCCAG-3', 下游引物为 5'-TCAAGGTGACACCTGTTCTC-3'; β-actin 扩增产物为 520 bp, 上游引物为: 5'-GGGACCTGACAGACTACCT-3' 下游引物为: 5'-CGTACTCCTGCTTGCTGA-3'(引物序列设计合成均由上海生工完成)。所有操作均按 RT-PCR 试剂盒说明书进行, PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 56℃ 45 s, 72℃ 1 min 共 28 个循环; 72℃ 延伸 7 min。取 10 μl 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳, 对照分子量标准检测扩增结果, 用凝胶成像仪观察分析条带峰面积来反映 MDM2 表达的变化。

1.5 蛋白免疫印迹(Western blot)

收集转染 72 h 后各组细胞(分组同 RT-PCR), 用 PBS 洗一次, 按 1×10<sup>7</sup> 细胞加入 100 μl 预冷的裂解液, 轻微超声粉碎细胞, 低温离心 30 min, 上清即总蛋白。用 Bradford 法蛋白定量后, 取 50 μg 蛋白上样, 通过 12% SDS-PAGE 分离后转至 PVDF 膜上, 脱脂奶粉封闭 4℃ 过夜; 加入兔抗人 MDM2 抗体(1:500), 4℃ 过夜; 用 TBST 洗膜 10 min, 3 次, 加入 1:2 000 稀释的羊抗兔二抗, 室温振荡 1h, TBST 洗膜后, 显色, 至理想条带出现, 水冲洗, 照相。用图像分析系统测定各条带灰度值, 来反映 MDM2 蛋白的表达变化。

1.6 MTT 法检测 PC3 细胞的增殖能力

(1) 剂量效应: 取对数生长期细胞, 接种于 96 孔板(每孔 1×10<sup>4</sup> 个细胞), 转染 3 个浓度(0.8、1.6、3.2 mg/L)的 siMDM2 和 control siRNA, 并设空白组, 转染 48 h 后每孔加入 15 μl MTT(5 mg/ml)继续培养 4 h, 再加入 150 μl 的 DMSO, 振荡 10 min, 酶标仪 570 nm 测定吸光度(A)值。(2) 时间效应: 取对数生长期细胞, 接种于 96 孔板(每孔 5×10<sup>3</sup> 个细胞), 转染 siMDM2(使其终浓度达 1.6 mg/L)和 control siRNA, 并设空白组。分别于转染 24、48、96 h 后, 每孔加入 15 μl MTT(5 mg/ml)继续培养 4 h, 再加入 150 μl 的 DMSO, 振荡 10 min, 酶标仪 570 nm 处测定吸光度(A)值。根据公式: 细胞增殖抑制率(%) = (1 - 处理组吸光度) / 未处理组吸光度 × 100%, 计算出抑制率。每组 3 复孔, 并重复 3 次。

1.7 流式细胞术分析细胞凋亡变化

转染 72 h 后, 收集转染 1.6 mg/L 的 3 个 siMDM2 实验组, 对照组和空白组细胞, 注意将培养上清中和贴壁生长的细胞一并收集, PBS 洗两次, 分散成单细胞悬液, 用 -20℃ 预冷的 70% 乙醇 4℃ 固定过夜。上机前离心收集细胞, 细胞团重悬于 PBS 中, 20 μg/ml 碘化丙啶(PI), 使终浓度为 100 μg/ml, 37℃ 避光染色 30 min, 上流式细胞仪检测。

1.8 统计学方法

本实验数据采用 SPSS 11.0 统计学软件, 行 χ<sup>2</sup> 检验和方差分析。

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定

(1) 重组质粒的酶切鉴定: PGCSilencer™-MDM2 siRNA 经 *Hind* III/*Bam* HI 双酶切后 2% 琼脂糖电泳, 出现两条电泳带, 分别为大片段的载体片段和约 63 bp 的目的片段, 见图 1, 说明成功构建重组质粒。(2) 重组质粒的测序鉴定: 测序引物根据载体序列设计为: 5'-AAGAAGAGAGTGTGGAATCTA-3', 测序

结果与目的序列相同,序列完全正确,进一步表明 PGCsilencer™-MDM2 siRNA 构建成功。

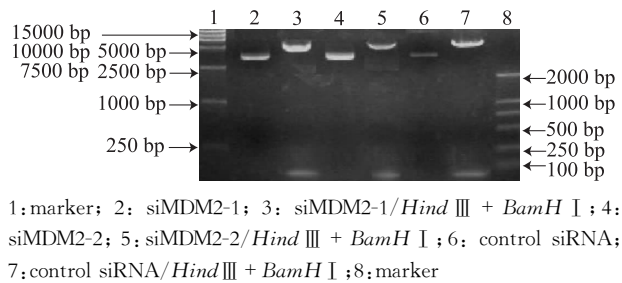


图 1 重组质粒双酶切鉴定

Fig 1 Identification of recombinant plasmid PGCsilencer™-MDM2-siRNA after restriction

### 2.2 MDM2 mRNA RT-PCR 结果

MDM2 和  $\beta$ -actin 扩增产物经电泳和 EB 染色后,结果显示扩增片段大小与所设计的大小完全一致,分别为 300 bp 和 520 bp。转染 siMDM2-1、2、3 的 PC3 中 MDM2 mRNA 的表达量较对照组和空白组有不同程度的下调,而对对照组和空白组的 MDM2 mRNA 表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 2。对照组和转染 siMDM2-1、2、3 组的 MDM2 扩增产物的强度与内参照  $\beta$ -actin 的比值分别为( $0.986 \pm 0.032$ )、( $0.354 \pm 0.054$ )、( $0.445 \pm 0.065$ )和( $0.768 \pm 0.084$ ),siMDM2-1、2 组与对照组比 MDM2 表达差异有统计学意义( $P < 0.01, n = 3$ )。转染 siMDM2-1、2、3 组的 MDM2 表达水平分别下调为空白组的 35.4%, 44.1% 和 76.8%。

### 2.3 MDM2 蛋白 Western blot 结果

转染 siMDM2 的 PC3 细胞 MDM2 蛋白表达被抑制,而  $\beta$ -actin 不受影响。与空白组比,转染 siMDM2-1、2、3 后,细胞所表达的 MDM2 蛋白量有不同程度的

减少,而转染 control siRNA 的蛋白表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 3,表明 siMDM2 可以有效特异的抑制 MDM2 蛋白的表达。与空白组比转染 siMDM2-1、2 后 MDM2 蛋白分别下降了 63.5% 和 55.8%,差异有统计学意义( $P < 0.01, n = 3$ ),转染 siMDM2-3 的 PC3 细胞 MDM2 蛋白下降了 29.0%,和 MDM2 mRNA 下降趋势基本相同。

RT-PCR 和 Western blot 结果推断:可能由于 siRNA 抑制肿瘤细胞 MDM2 mRNA 表达,而导致肿瘤细胞 MDM2 蛋白合成减少,也就是说肿瘤细胞合成 MDM2 蛋白下降是由于 siRNA 抑制 MDM2 基因表达的结果。

### 2.4 细胞增殖抑制实验结果

不同浓度 siMDM2 转染 PC3 细胞 48 h 后,可见抑制率随浓度的增加而增高( $P < 0.05$ ),具有剂量依赖性,见图 4。1.6 mg/L 的 siMDM2 转染 PC3 细胞 24、48、96 h 后,抑制率随时间的增加而增高( $P < 0.01$ ),具有时间依赖性,见图 4。siMDM2 的抑制率和空白组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ );阴性对照组的抑制率和空白组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 2.5 流式细胞计数仪检测细胞凋亡

流式细胞术分析表明,与空白组相比,转染 control siRNA 的 PC3 未检测到凋亡,转染 siMDM2-1、siMDM2-2 的 PC3 凋亡非常显著,细胞凋亡率分别为 42.5% 和 33.9%,而且细胞周期的百分比发生了变化,PC3 细胞  $G_0/G_1$  期细胞百分数提高 36%,S 期细胞减少 34%, $G_2 \sim M$  期细胞百分数减少了 20.07%。而转染 siMDM2-3 诱导 PC3 凋亡的效果没有 siMDM2-1 和 2 显著,见图 5。

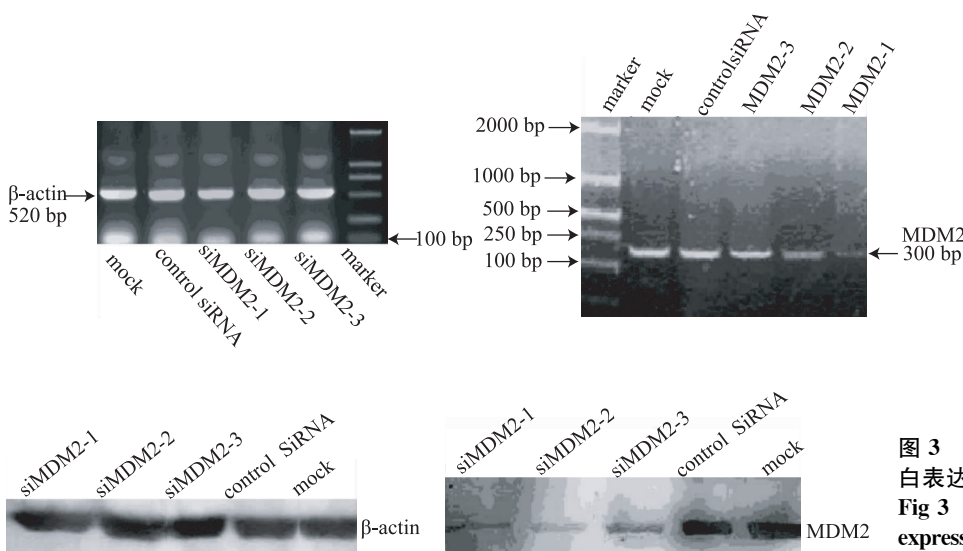
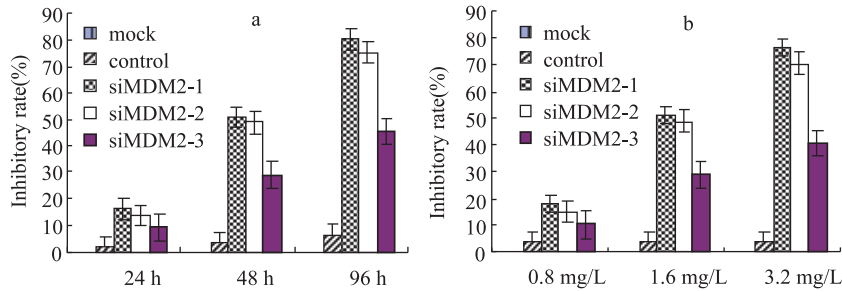


图 2 转染后 PC3 中 MDM2 mRNA 的表达的变化

Fig 2 Expression of MDM2 mRNA in PC3 that transfected with plasmid PGCsilencer™-MDM2-siRNA

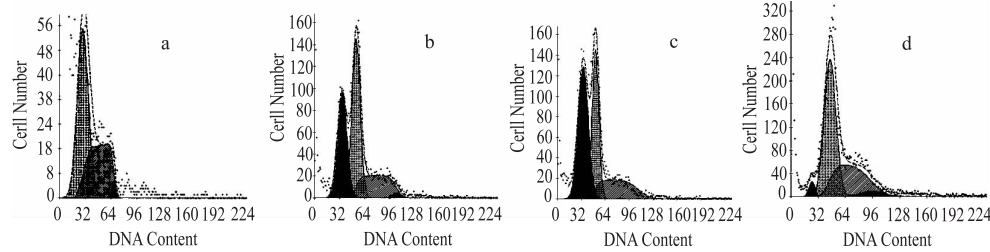
图 3 Western blot 分析 MDM2 蛋白表达变化  
Fig 3 Western blot analysis of the expression of MDM2 protein



a: the same concentration and different time periods interval; b: the different concentration in both 48 h

图 4 siMDM2 对 PC3 细胞的增殖抑制作用

Fig 4 Inhibitory effects of siMDM2 on PC3 cell



a: control siRNA; b: siMDM2-1; c: siMDM2-2; d: siMDM2-3

图 5 流式细胞仪分析 siRNA MDM2 对 PC3 细胞周期相分布及凋亡率的影响

Fig 5 The apoptosis and cell cycle of PC3 cells treated with siMDM2 using flow cytometry

### 3 讨论

有研究表明前列腺癌的发生与原癌基因和(或)抑癌基因失衡有关,细胞动力学研究证实,前列腺癌发病是由于细胞增殖和凋亡失衡而导致的细胞数目增加<sup>[4]</sup>。MDM2 是一个与前列腺癌密切相关的癌基因,MDM2 可使前列腺细胞异常转化而具有成瘤性,并促进移植瘤的快速形成<sup>[5]</sup>。前列腺癌组织中 MDM2 的异常扩增和过表达可导致野生型 p53 的抑癌活性丧失。MDM2 直接结合 p53 形成一个“负反馈调节环”,MDM2 抑制 p53 的转录活性严格控制 p53 蛋白水平,MDM2 表达过强可封闭 p53 介导的反式激活作用使 p53 功能丧失<sup>[6-7]</sup>。

应用 siRNA 技术有针对性地封闭在细胞癌变过程中发挥重要作用的癌基因,使其表达降低,癌细胞生长受抑制,从而达到治疗的目的<sup>[8]</sup>。现有的研究证实了 siRNA 在体外和体内水平抗肿瘤治疗的有效性,虽然 siRNA 在临床肿瘤治疗上的应用还有待于进一步研究,但与反义 RNA 技术相比,siRNA 具有稳定性好、特异性强、细胞毒性低以及作用持久、强大等优点,这些优点使 siRNA 成为研究基因功能、治疗肿瘤的有力工具,开辟了治疗癌症、遗传病等多种疾病的一条新途径。

本文构建了针对 MDM2 的 siRNA 真核表达载体,并将其转染至 PC3 细胞内。RT-PCR 和 Western blot 结果表明 siMDM2-1 和 siMDM2-2 可以显著地抑制 MDM2 基因、蛋白的表达,效率最高可达 65%左右。同时 MTT 和流式细胞检测结果证实了 siMDM2-1、siMDM2-2 可明显地诱导 PC3 细胞凋亡和降低 PC3 增殖活性,而 siMDM2-3 的抑制效果没有 siMDM2-1 和 2 明显,这可能因为并不是所有

的 siRNA 都能够接近靶序列 RNA。转染 control siRNA 的细胞和空白组比 MDM2 表达没有受到抑制,也没有诱导细胞凋亡产生。以上结果表明 siMDM2 使 MDM2 基因、蛋白表达受到了抑制,而由此促进了癌细胞增殖抑制及凋亡。MDM2 降解可以恢复和提高细胞 p53 水平,增强 p53 在 G<sub>1</sub>~S 期和 G<sub>2</sub>~M 期的限制点效应,最终使细胞阻滞于 G<sub>1</sub> 期和 G<sub>2</sub> 期,从而触发细胞凋亡。所以 MDM2 可作为前列腺癌基因治疗的一个较好的靶位点,siRNA 技术可作为肿瘤基因治疗的新策略,从而为前列腺癌的基因治疗提供理论基础。

### 参考文献:

- [1] Jonler M, Pedersen KV. Diagnosis, evaluation and follow-up of patients with prostatic cancer [J]. Ugeskr Laeger, 2007 169 (20): 1889-1891.
- [2] Bianco R, Ciardiello F, Tortora G. Chemosensitization by antisense oligonucleotides targeting MDM2 [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2005, 5(1): 51-56.
- [3] Elbashir SM, Harborth J, Weber K, et al. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs [J]. Methods, 2002, 26(2): 199-213.
- [4] Willietta Gibson, Ashley Green, Rebecca S, et al. Inhibition of PAX2 expression results in alternate cell death pathways in prostate cancer cells differing in p53 status [J]. Cancer Letters, 2007, 248(2): 251-261.
- [5] Zhuo Zhang, Mao Li, Hui Wang, et al. Antisense therapy targeting MDM2 oncogene in prostate cancer: Effects on proliferation, apoptosis, multiple gene expression, and chemotherapy [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(20): 11636-11641.
- [6] 孙艳花, 钟雪云, 陈运贤, 等. 星形细胞瘤中 Mdm2、p53 的表达及调控机制探讨 [J]. 肿瘤防治研究 2004, 31(8): 477-479.
- [7] Lind H, Zienolddiny S, Ekstrom PO, et al. Association of a functional polymorphism in the promoter of the MDM2 gene with risk of nonsmall cell lung cancer [J]. Int J Cancer, 2006, 2(22): 24-26.
- [8] Yin JQ, Gao GS, Shao RG, et al. SiRNA agents inhibit oncogene expression and attenuate human tumour cell growth [J]. Exp Ther Oncol, 2003, 3(4): 194-204.