

RNA 干扰 HCCR-2 基因表达对食管癌 EC9706 细胞凋亡及周期的影响

姜琳 于鸿 孙灿林 焦霞 朱晓蔚 戴桂红 肖蔚 吴振东 林梅 黄俊星

【摘要】 目的 采用 RNA 干扰技术探讨人宫颈癌癌基因-2 (HCCR-2) 对人食管癌细胞凋亡及增殖周期的影响及其可能的分子机制。方法 采用脂质体介导将 pGCsi-shHCCR-2 与 pGCsi 质粒转染人食管癌细胞株 EC9706, 经 G418 筛选获得稳定抑制 HCCR-2 表达的食管癌细胞模型; 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR) 及 Western blot 检测转染细胞 HCCR-2、P21、P27 mRNA 与蛋白表达; 流式细胞仪检测各组细胞凋亡及增殖周期。结果 成功构建稳定抑制 HCCR-2 表达的食管癌细胞模型。反义组、空载体组和对照组细胞 HCCR-2 mRNA 表达量分别为 0.19 ± 0.07 、 0.43 ± 0.22 、 0.45 ± 0.21 ; 相应的 P21 mRNA 表达量分别为 0.25 ± 0.09 、 0.12 ± 0.04 、 0.11 ± 0.05 ; 相应的 P27 mRNA 表达量分别为 0.28 ± 0.13 、 0.13 ± 0.05 、 0.15 ± 0.08 ; 相应的 HCCR-2 蛋白表达量分别为 0.42 ± 0.23 、 0.88 ± 0.41 、 0.91 ± 0.46 ; 相应的 P21 蛋白表达量分别为 0.78 ± 0.34 、 0.36 ± 0.15 、 0.35 ± 0.17 ; 相应的 P27 蛋白表达量分别为 0.81 ± 0.38 、 0.41 ± 0.17 、 0.43 ± 0.24 , 较其他组, 反义组细胞 HCCR-2 mRNA 及蛋白表达量显著降低 ($P < 0.01$), 而 P21、P27 mRNA 及蛋白表达量显著增加 ($P < 0.01$)。反义组、空载体组和对照组细胞凋亡率分别为 (19.64 ± 3.35)%、(6.75 ± 0.91)%、(6.79 ± 0.98)%, 反义组较其他组细胞凋亡显著增加 ($P < 0.01$); 相应的 G0/G1 期细胞百分数分别为 (56.58 ± 11.37)%、(41.32 ± 8.52)%、(42.65 ± 8.63)%, 反义组较其他组处于 G0/G1 期细胞数显著增加 ($P < 0.01$)。结论 下调 EC9706 细胞 HCCR-2 表达后, 细胞凋亡增加, 细胞周期出现 G0/G1 期阻滞, 其作用机制与 P21 与 P27 表达增加有关。

【关键词】 RNA 干扰; 细胞凋亡; 细胞周期; 人宫颈癌癌基因; P21; P27

Inhibition of HCCR-2 gene expression in esophageal cancer EC9706 cells by RNA interference and its effect on their apoptosis and cell cycle

JIANG Lin, YU Hong, SUN Can-lin, JIAO Xia, ZHU Xiao-wei, DAI Gui-hong, XIAO Wei, WU Zhen-dong, LIN Mei, HUANG Jun-xing. Department of Anesthesiology, Taizhou People's Hospital, Taizhou 225300, China

Corresponding author: SUN Can-lin, Email: yuhongmiaomiao@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of human cervical cancer oncogene-2 (HCCR-2) silencing by RNA interference on the apoptosis and cell cycle of esophageal cancer cell line EC9706. **Methods** pGCsi-shHCCR-2 and pGCsi plasmids were transfected into EC9706 cells. The expression of HCCR-2, P21 and P27 in EC9706 cells were confirmed by RT-PCR and Western blot. The apoptosis and cell cycle arrest were analyzed using flow cytometry. **Results** The levels of HCCR-2, P21 and P27 mRNA in pGCsi-shHCCR-2, pGCsi and control groups were: HCCR-2 0.19 ± 0.07 , 0.43 ± 0.22 and 0.45 ± 0.21 , respectively; P21 0.25 ± 0.09 , 0.12 ± 0.04 and 0.11 ± 0.05 , respectively; P27 0.28 ± 0.13 , 0.13 ± 0.05 and 0.15 ± 0.08 , respectively. The protein levels in pGCsi-shHCCR-2, pGCsi and control groups were: HCCR-2 0.42 ± 0.23 , 0.88 ± 0.41 and 0.91 ± 0.46 , respectively; P21 0.78 ± 0.34 , 0.36 ± 0.15 and 0.35 ± 0.17 , respectively; P27 0.81 ± 0.38 , 0.41 ± 0.17 and 0.43 ± 0.24 , respectively. The mRNA and protein expression levels of HCCR-2 were significantly reduced, whereas the mRNA and protein expression levels of P21 and P27 were significantly increased in pGCsi-shHCCR-2 transfected group compared to those in the other two groups ($P < 0.01$). The apoptosis rate in pGCsi-shHCCR-2, pGCsi and control groups were (19.64 ± 3.35)%, (6.75 ± 0.91)% and (6.79 ± 0.98)%, respectively. The apoptosis of EC9706 cells was

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.21.052

基金项目: 江苏省“333工程”培养资金资助项目(200924); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2010357)

作者单位: 225300 江苏省泰州市人民医院麻醉科(姜琳、孙灿林), 病理科(于鸿、焦霞、朱晓蔚、戴桂红、肖蔚), 肿瘤科(吴振东、林梅、黄俊星)

通讯作者: 孙灿林, Email: yuhongmiaomiao@163.com

significantly increased in pGCsi-shHCCR-2 transfected group compared to those in the other two groups ($P < 0.01$). The percentage of G0/G1 phase cells in pGCsi-shHCCR-2, pGCsi and control groups were $(56.58 \pm 11.37)\%$, $(41.32 \pm 8.52)\%$ and $(42.65 \pm 8.63)\%$, respectively. The number of cells in the G0/G1 phase was significantly increased in pGCsi-shHCCR-2 transfected group compared to the other two groups ($P < 0.01$). **Conclusion** Down-regulation of HCCR-2 can blocks the cell cycle in the G0-G1 phase and induce cell apoptosis in EC9706 cells by the upregulation of the P21 and P27 expression.

【Key words】 RNA interference; Apoptosis; Cell cycle; Human cervical cancer oncogene; P21; P27

人宫颈癌癌基因 (human cervical cancer oncogene, HCCR) 是一种近年来从人宫颈癌组织中发现的癌基因, 位于人染色体 12q, 根据其前体 mRNA 剪接加工结果的不同分为 HCCR-1 及 HCCR-2 两种亚型, HCCR-2 较 HCCR-1 具有更强的致癌性^[1]。研究证实, HCCR 在宫颈癌、肝癌、乳腺癌、胃癌、食管癌、结肠癌等其他恶性肿瘤中均有过度表达, 并且可作为肝癌及乳腺癌早期诊断的标志物^[2]。然而, 迄今未见有关 HCCR 对食管癌细胞生物学特征的影响及其相关调节机制的研究报道。RNA 干扰 (RNAi) 是一种转录后基因沉默现象, 通过短双链 RNA 与 mRNA 中的同源序列结合形成 RNA 诱导沉默复合物, 诱导靶基因降解, 进而高效特异性的阻断目的基因的表达, 目前已成为肿瘤基因研究及治疗过程中广泛使用的生物工具。本实验通过 RNA 干扰技术特异性沉默人食管鳞癌细胞株 EC9706 中 HCCR-2 的表达, 观察其对 EC9706 细胞 P21、P27 表达及细胞凋亡、增殖周期的影响, 并探讨 HCCR-2 对 EC9706 细胞生物学特征影响的可能分子机制。

材料和方法

一、主要材料

高分化人食管鳞癌细胞株 EC9706 购自中国科学院上海细胞研究所; Lipofectamine 2000 转染试剂盒美国 Invitrogen 公司; Trizol 试剂、Quant 逆转录试剂盒、PVDF 膜、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自德国 Roche 公司; DMEM 培养基、BCA 蛋白定量试剂盒及 ECL 化学发光试剂盒购自美国 Pierce 公司; 氨基糖苷类抗生素 G418、DMEM 培养基及胎牛血清购自美国 Gibco 公司; 空白质粒 pGCsi 和重组质粒 pGCsi-shHCCR-2 由上海吉凯基因化学技术有限公司设计合成; 小鼠抗人 HCCR-2、小鼠抗人 P21、小鼠抗人 P27 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司; PCR 引物由上海生物工程技术有限公司合成。

二、细胞培养、转染及实验分组

EC9706 细胞株接种于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素及 100 U/ml 链霉素的 DMEM 培养液中, 置于 37 °C、相对湿度 100%、5% CO₂ 培养箱中培养。转染

前将生长状态良好的 EC9706 细胞, 以 2×10^5 细胞密度接种于 6 孔板中, 倒置显微镜下观察, 待细胞生长至 60%~70% 融合时, 将 pGCsi-shHCCR-2 和阴性对照质粒转染 EC9706 细胞。实验分为反义组 (转染 pGCsi-shHCCR-2 的 EC9706 细胞)、空载体组 (转染 pGCsi 的 EC9706 细胞) 及对照组 (未转染 EC9706 细胞)。转染后 48 h, 换含 G418 (500 mg/ml) 的培养液进行抗性筛选约 3 周, 对照组细胞全部死亡, 反义组和空载体组均有克隆形成, 用克隆环挑取单细胞阳性克隆继续在含 G418 (200 mg/ml) 的培养液中扩大培养及鉴定。

三、RT-PCR 法与 Western blot 法检测各组细胞 HCCR-2、P21 及 P27 表达

1. RT-PCR 法: Trizol 试剂提取各组细胞总 RNA, 经紫外分光光度计定量, 取 2 μ g RNA 按照 Quant 试剂盒说明书进行逆转录反应。以逆转录产物为模板进行 PCR 扩增。反应条件为: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 32 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 引物序列如下: 内参 β -actin 上游 5'-GATGTGGATATTCGCAAGGATCT-3'; 下游 5'-TAGTGTAACCCAGCAAACCCATC-3', 产物 450 bp。HCCR-2 引物: 上游 5'-GAAACTCCTGTTTGGAGAAGGGT-3'; 下游 5'-CCGGTCTCGGAGGAAACAGCATC-3', 产物 324 bp。P21 引物: 上游 5'-GACACATGAGCAGTTCAAGGCTG-3'; 下游 5'-GACATCGTCTCCAAGTCAGGCT-3', 产物 310 bp。P27 引物: 上游 5'-CCTATCGAACTCAGTTATAGAAG-3'; 下游 5'-GAAAAGCATGTACAGGTGGCTGT-3', 产物 275 bp。扩增产物经电泳分离、扫描, 以目的条带与内参 β -actin 条带灰度比值表示 mRNA 相对表达量。实验重复 3 次, 结果取均值。

2. Western blot 法: 各组细胞用预冷的 PBS 洗涤 3 次后, 采用本实验常规方法^[3]抽提总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度后, 置 -70 °C 冰箱保存。取 50 μ g 蛋白行 8% SDS-PAGE 电泳, 电转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后 TBST 漂洗。一抗分别为鼠抗人 HCCR-2、鼠抗人 P21 及鼠抗人 P27 单克隆抗体 (1:200), 4 °C 孵育过夜, TBST 漂洗。加入辣根过氧化

物酶标记的山羊抗小鼠二抗(1:2000)室温孵育2h, TBST漂洗,按ECL化学发光试剂盒说明书进行曝光显影,结果扫描并保存。以目的条带与内参β-actin条带灰度比值表示蛋白相对表达量。实验重复3次,结果取均值。

四、流式细胞仪检测细胞凋亡及增殖周期

收集各组细胞,4℃ PBS洗涤2次,重悬细胞,按照Annexin V-FITC试剂说明书,加入Annexin V-FITC及PI各5μl,混匀避光孵育15min,再加入400μl 1×结合缓冲液,混匀后置FACSCalibur流式细胞仪(美国BD公司)检测细胞凋亡率。实验重复3次,结果取均值。

各组细胞采用0.25%胰蛋白酶消化后离心,制成5×10⁵/ml单细胞悬液,离心,加入70%预冷乙醇5ml固定,4℃固定过夜,PBS洗涤,将细胞重悬于含0.1mg/ml碘化丙啶染液中,室温避光染色30min,置于流式细胞仪检测细胞周期,计数5000个细胞。实验重复3次,结果取均值。

五、统计学处理

定量资料数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用One-Way ANOVA作方差分析后,组间两两比较使用Bonferroni's post-hoc检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组细胞HCCR-2、P21及P27的表达

RT-PCR结果显示,反义组HCCR-2 mRNA表达较空载体组显著降低($P < 0.01$),空载体组与对照组之间HCCR-2 mRNA表达差异无统计学意义($P > 0.05$);反义组P21 mRNA表达较空载体组显著增高($P < 0.01$),空载体组与对照组之间P21 mRNA表达差异无统计学意义($P > 0.05$);反义组P27 mRNA表达较空载体组显著增高($P < 0.01$),空载体组与对照组之间P27 mRNA表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图1,表1。

Western blot结果显示,反义组HCCR-2蛋白表达较空载体组显著降低($P < 0.01$),空载体组与对照组之间HCCR-2蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$);反义组P21蛋白表达较空载体组显著增高($P < 0.01$),空载体组与对照组之间P21蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$);反义组P27蛋白表达较空载体组显著增高($P < 0.01$),空载体组与对照组之间P27蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图2,表2。

二、各组细胞凋亡率及增殖周期的改变

流式细胞仪检测结果显示,反义组细胞凋亡率较

空载体组显著增加($P < 0.01$);与空载体组相比,反义组G0/G1期细胞比例显著增加($P < 0.01$),S期及G2/M期细胞比例均显著降低($P < 0.01$)。见图3,表3。

表1 各组细胞HCCR-2、P21及P27 mRNA表达的变化($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	HCCR-2	P21	P27
反义组	0.19±0.07	0.25±0.09	0.28±0.13
空载体组	0.43±0.22 ^a	0.12±0.04 ^a	0.13±0.05 ^a
对照组	0.45±0.21 ^a	0.11±0.05 ^a	0.15±0.08 ^a
F值	68.473	56.224	79.153
P值	<0.01	<0.01	<0.01

注:与反义组比较,^a $P < 0.01$

表2 各组细胞HCCR-2、P21及P27蛋白表达的变化($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	HCCR-2	P21	P27
反义组	0.42±0.23	0.78±0.34	0.81±0.38
空载体组	0.88±0.41 ^a	0.36±0.15 ^a	0.41±0.17 ^a
对照组	0.91±0.46 ^a	0.35±0.17 ^a	0.43±0.24 ^a
F值	73.946	65.221	63.784
P值	<0.01	<0.01	<0.01

注:与反义组比较,^a $P < 0.01$

表3 siRNA抑制HCCR-2表达对EC9706细胞凋亡率及增殖周期的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	凋亡率	G0/G1期	S期	G2/M期
反义组	19.64±3.35	56.58±11.37	26.33±6.23	17.09±3.18
空载体组	6.75±0.91 ^a	41.32±8.52 ^a	37.42±9.57 ^a	21.26±3.51 ^a
对照组	6.79±0.98 ^a	42.65±8.63 ^a	37.78±9.21 ^a	19.57±2.84 ^a
F值	50.633	60.324	63.357	53.513
P值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与反义组比较,^a $P < 0.01$

讨 论

HCCR基因作为近年来发现的原癌基因,不仅在人类宫颈癌组织中异常高表达,在其他肿瘤如肝癌、乳腺癌、食管癌、胰腺癌、胃癌、结肠癌和肾癌中也有过度表达,而且与多种恶性肿瘤的发生、发展及预后密切相关^[4]。杨燕等^[5]采用siRNA干扰肝癌HepG2细胞HCCR表达后,结果发现该细胞增殖降低,细胞凋亡增加,细胞周期停滞在G0/G1期,其机制与HepG2细胞P53表达降低而P15表达增加有关。我们在前期研究中亦发现,应用反义寡核苷酸干扰技术沉默胰腺癌PANC-1细胞HCCR-2基因后,细胞增殖受到抑制,细胞凋亡增加,其作用机制与Bcl-2表达降低而Bax表达升高有关^[6]。本实验为探讨HCCR-2对食管癌细胞生物学特征影响的作用机制,采用RNA干扰技术,构建编码人HCCR-2 mRNA的短发夹状质粒载体

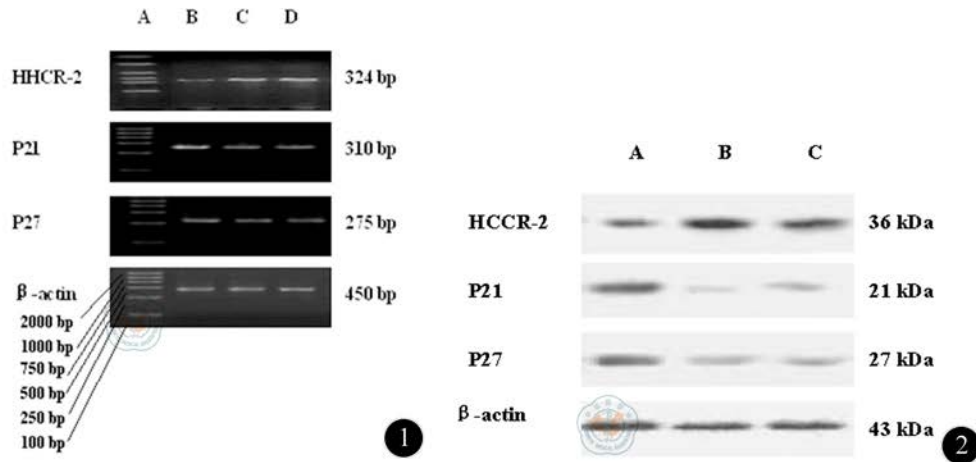


图1 RT-PCR法检测各组细胞HCCR-2、P21及P27 mRNA的表达; A: DL-2000 DNA标准参照物; B: 反义组; C: 空载体组; D: 对照组 图2 Western blot法检测各组细胞HCCR-2、P21及P27蛋白的表达; A: 反义组; B: 空载体组; C: 对照组

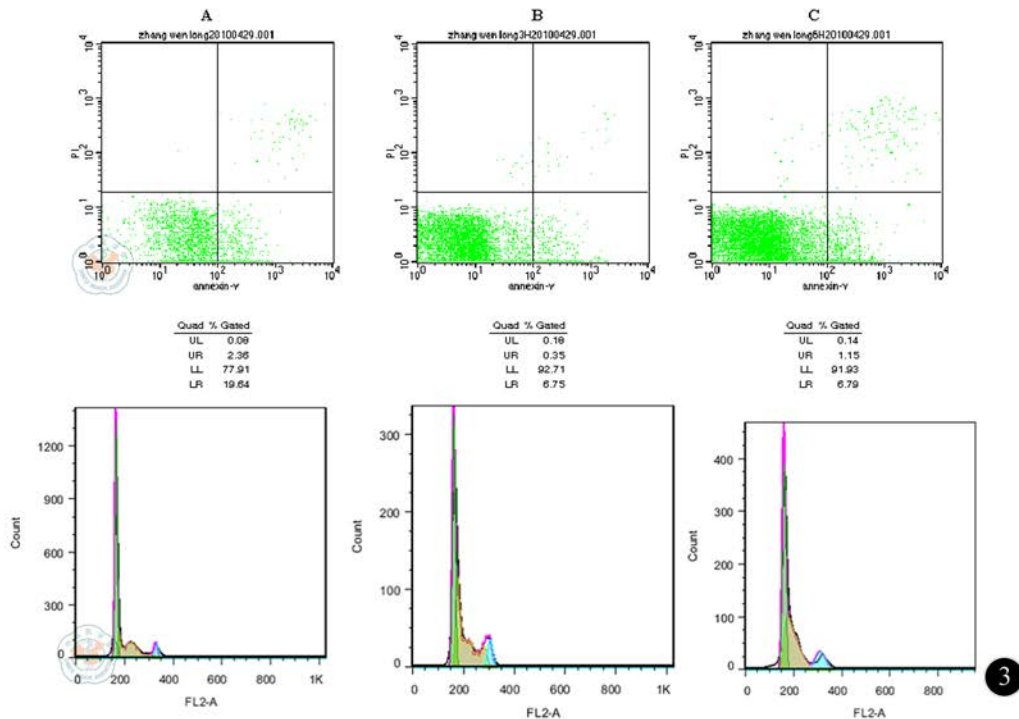


图3 流式细胞仪检测细胞凋亡率(上)及增殖周期(下); A: 反义组; B: 空载体组; C: 对照组

pGCsi-shHCCR-2, 经脂质体介导转染人食管癌鳞癌细胞株 EC9706, 利用载体上的 G418 抗性基因筛选获得细胞克隆后扩大培养, RT-PCR 和 Western blot 检测结果显示, 反义组 HCCR-2 mRNA 及蛋白表达均明显低于对照组, 该结果证实 pGCsi-shHCCR-2 转染可以从转录及翻译水平有效抑制 EC9706 细胞 HCCR-2 的表达。本实验结果还显示, pGCsi-shHCCR-2 转染 EC9706 细胞后, 与对照组相比, 不仅细胞凋亡显著增加, 而且出现细胞周期 G0/G1 期停滞, S 期细胞比例明显减少, 表明 RNA 干扰 HCCR-2 表达使 EC9706 细胞凋亡增加, 而细胞分裂速度减慢, 提示 HCCR-2 参与食管

癌 EC9706 细胞周期的调控, 并与细胞生长增殖及凋亡有关。

大量研究证实, 恶性肿瘤的发生、发展与细胞周期的失调密切相关, 而细胞周期调控机制的核心是细胞周期依赖性蛋白激酶 (CDKs)^[7]。抑癌基因 P21 与 P27 均为细胞周期蛋白依赖激酶抑制剂 (CKIs) 家族成员, 属于细胞周期负性调控因子, P21 及 P27 低表达或缺失将促使细胞进入分裂期, 进而促进肿瘤的发生及发展^[8]。Guo 等^[9]研究显示, HCCR 基因是抑癌基因 P53 的负性调节因子, HCCR 异常高表达可以使 P53 及其相关基因 P21、Bax 表达下调或失活, 从而导

致肿瘤的发生和进展。本实验结果显示,与对照组相比,反义组 P21 和 P27 mRNA 及蛋白表达均显著增高,该结果提示 siRNA HCCR-2 抑制 EC9706 细胞 HCCR-2 表达后,EC9706 细胞出现细胞凋亡增加而细胞周期阻滞,是通过上调 P21 和 P27 的表达实现的。然而,HCCR 基因作为一种候选的基因治疗靶点,目前对于其促进食管癌的生长、侵袭及转移的作用机制及相关调控机制尚未完全明确。近年来研究发现,不仅 EGF/PI3K/AKT、Ras/Raf/MEK、TGF- β /Smad 及 TCF/ β -catenin 等信号通路可调节 HCCR 基因的表达,而且 HCCR 基因也可调节 P53 信号通路相关基因的表达^[10-11]。因此,今后我们还需不断探索细胞内各种不同信号通路之间的联系并加强体内实验研究,才可能从本质上阐明 HCCR 的促癌机制,从而为食管癌早期诊断和临床治疗提供新的基因靶点。

志谢 对泰州市人民医院临床实验中心叶军副主任技师在本文流式细胞仪实验方面给予的指导和帮助表示感谢

参 考 文 献

- [1] Ko J, Lee YH, Hwang SY, et al. Identification and differential expression of novel human cervical cancer oncogene HCCR-2 in human cancers and its involvement in p53 stabilization. *Oncogene*, 2003, 22: 4679-4689.
- [2] Yoon Sk, Lim NK, Ha SA, et al. The human cervical cancer oncogene protein is a biomarker for human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 2004, 64: 5434-5441.
- [3] Yu H, Zhao G, Li H, et al. Candesartan antagonizes pressure overload-evoked cardiac remodeling through Smad7 gene-dependent MMP-9 suppression. *Gene*, 2012, 497: 301-306.
- [4] Jung SS, Park HS, Lee JJ, et al. The HCCR oncoprotein as a biomarker for human breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 7700-7708.
- [5] 杨燕, 周学峰, 刘安定, 等. 人宫颈癌基因小干扰 RNA 抑制 HepG2 细胞生长的作用及其机制. *中华肝病杂志*, 2008, 16: 612-615.
- [6] 姜琳, 孙灿林, 黄俊星, 等. 沉默 HCCR-2 基因对胰腺癌细胞 Bcl-2 和 Bax 表达及细胞增殖与凋亡的影响[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012, 116: 7208-7213.
- [7] Ling H, Samarasinghe S, Kulasiri D. Computational experiments reveal the efficacy of targeting CDK2 and CKIs for significantly lowering cellular senescence bar for potential cancer treatment. *Biosystems*, 2013, 111: 71-82.
- [8] Yoon MK, Mitrea DM, Ou L, et al. Cell cycle regulation by the intrinsically disordered proteins p21 and p27. *Biochem Soc Trans*, 2012, 40: 981-988.
- [9] Guo J, Yang L, Zhang Y, et al. Silencing of the HCCR2 gene induces apoptosis and suppresses the aggressive phenotype of hepatocellular carcinoma cells in culture. *J Gastrointest Surg*, 2011, 15: 1807-1813.
- [10] Qiao SS, Cui ZQ, Gong L, et al. Simultaneous measurements of serum AFP, GPC-3 and HCCR for diagnosing hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 2011, 58: 1718-1724.
- [11] Cho GW, Kim MH, Kim SH, et al. TCF/ β -catenin plays an important role in HCCR-1 oncogene expression. *BMC Mol Biol*, 2009, 10: 42.

(收稿日期: 2013-07-23)

(本文编辑: 戚红丹)

姜琳, 于鸿, 孙灿林, 等. RNA 干扰 HCCR-2 基因表达对食管癌 EC9706 细胞凋亡及周期的影响 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7 (21): 9619-9623.

中 华 临 床 医 生 杂 志
中 华 医 学 会