

短发夹 RNA 沉默血红素氧合酶-1 基因表达对胃癌细胞系 SGC-7901 生物学行为的影响

陈洪元 张黎 程力 刘立青 崔彬 苗瑞政

【摘要】 目的 观察血红素氧合酶-1 (HO-1) 基因沉默对胃癌细胞系 SGC-7901 生长、增殖的影响。方法 构建靶向 HO-1 的短发夹 RNA (shRNA-HO-1) 干扰质粒转染人胃癌细胞系 SGC-7901, 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)、细胞免疫化学分别在 mRNA、蛋白质水平检测抑制效果。流式细胞仪和噻唑蓝 (MTT) 检测 HO-1 基因沉默后细胞的细胞周期和生长情况。结果 shRNA-HO-1 在 mRNA、蛋白质水平高效特异地抑制了细胞 SGC-7901 中 HO-1 的表达 (抑制率分别为 62.4%、67.6%); 较对照质粒组, HO-1 的表达被抑制后, G_0/G_1 期细胞百分比明显减少 (52.025 ± 1.638 比 67.525 ± 1.938 , $P < 0.05$), 细胞生长受抑制 [2.036 ± 0.072 比 2.783 ± 0.067 (72 h A 值), $P < 0.05$]。结论 shRNA-HO-1 可有效抑制胃癌细胞中 HO-1 的表达; HO-1 的表达减少抑制肿瘤细胞生长。

【关键词】 胃肿瘤; RNA 干扰; 血红素氧合酶-1

Effects of heme oxygenase-1 short hairpin RNA transfection on biological behaviors of gastric cancer line SGC7901 CHEN Hong-yuan, ZHANG Li, CHENG Li, et al. Department of Gastrointestinal Surgery, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan, 250021, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of heme oxygenase-1 short hairpin RNA transfection on biological behaviors of gastric cancer line SGC7901. **Methods** A eukaryotic expression plasmid of shRNA targeting on HO-1 was constructed and was transiently transfected into human gastric cancer line SGC7901. Expression of HO-1 mRNA and protein were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunocytochemical staining. Cell proliferation and cell cycle were determined by MTT and flow cytometry assay. **Results** HO-1 shRNA effectively inhibited the expression of HO-1 mRNA (62.4%) and protein (67.6%), cell growth [2.036 ± 0.072 vs 2.783 ± 0.067 (72 h), $P < 0.05$], and decreased the cells in G_0/G_1 phase (52.025 ± 1.638 vs 67.525 ± 1.938 , $P < 0.05$). **Conclusion** HO-1 shRNA effectively inhibited the expression of HO-1, thus inhibiting the growth of the tumor cells.

【Key words】 Stomach neoplasms; RNA interference; Heme oxygenase-1

血红素氧合酶 (HO) 是生物体内催化血红素分解的限速酶, 有着重要的生物学作用^[1]。近年来发现它除了原有的降解血红素功能外, 还在许多生理和病理过程中起重要的调节作用, 其与肿瘤发生、发展的关系已成为目前研究热点^[2]。HO-1 为其诱生型, 又称热休克蛋白 32 (HSP32)。RNA 干扰是指在真核细胞中引入双链 RNA (ds RNA) 分子从而导致具有序列同源性的基因产生特异性基因沉默 (gene silencing) 的现象^[3]。我们通过构建靶向 HO-1 的短发卡双链 RNA (shRNA) 的表达质粒, 转染人胃癌细胞系 SGC-7901, 抑制细胞中 HO-1 的表达, 观察 HO-1 对肿瘤细胞生物学行为的影响。

材料与方法

1. 材料: 人胃癌细胞株 SGC-7901 由山东省医学科学院细胞室提供。靶向 HO-1 的 shRNA 干扰质粒由上海吉凯基因化学技术有限公司协助设计构建, 其干扰靶序列为 aaTGCTGAGTTCATGAGGAAC, 质粒载体为 PGCsi3.0, 含有人 U6 启动子和编码绿色荧光蛋白 (GFP) 的报告基因。同时构建不针对任何靶基因的非特异性序列质粒为对照。RPMI 1640 培养液购自美国 Gibco 公司, 标准胎牛血清购自杭州四季青公司, 转染试剂 Lipofectamine™ 2000 为美国 Invitrogen 公司产品。二甲亚砜 (DMSO)、噻唑蓝 (MTT) 为美国 Sigma 公司产品。鼠抗人 HO-1 单克隆抗体、即用型 SABC 免疫组织化学染色试剂盒及 DAB 显色试剂盒均购自武汉博士德公司。DNA 细胞周期检测试剂 (DNA-Prep Reagent Kit) 为美国 Coulter 公司产品。Trizol、cDNA 合成试剂盒 (Fermentas #k1622) 购自上海生工生物公司, 聚

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2009.02.023

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (Y2007C127)

作者单位: 250021 济南, 山东大学附属省立医院胃肠外科 (陈洪元、张黎、程力、刘立青、苗瑞政), 中心实验室 (崔彬)

合酶链反应(PCR)扩增试剂盒为日本 TaKaRa 公司产品。PCR 各引物均由上海生工生物公司合成。

2. 细胞培养:人胃癌细胞株 SGC-7901,以含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,在 37℃,5% CO₂,相对湿度为 90%的培养箱中培养。2~3 d 换液 1 次,0.25%胰蛋白酶常规消化传代,取对数生长期细胞实验。

3. 细胞转染:将对数生长期细胞系 SGC-7901 接种于细胞培养板(6、24、96 孔),当细胞融合大约 60% 时进行转染:实验分 3 组,实验组(shRNA-HO-1)、对照质粒组(shRNA-control)、未转染组(normal),将各组质粒和阳离子脂质体按照 1 μg 质粒加入 3 μl 脂质体的比例混合于无血清培养基中,室温静置;用无血清培养基将各孔细胞洗 2 次,待混合物静置 20 min 后,均匀滴加入培养板,4 h 后更换含血清培养基。48 h 后荧光显微镜下观察转染情况。

4. 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测各组细胞 HO-1 mRNA 的表达:转染后 48 h 收集细胞,Trizol 提取各组细胞的总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 纯度及浓度,按试剂盒(Fermentas #k1622)操作说明合成第 1 链 cDNA。最后以 cDNA 为模板进行 PCR。HO-1 正义序列:5-GCTCTT TGAGGAGTTGCAGG-3;反义序列:5-GTGTAAAGACCCATCGGAGA-3,产物长度 185 bp;β-肌动蛋白(β-actin)为内参,其正义序列:5-GCT-TACATGTCTCGATCCCACTTAA-3,反义序列:5-CTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGG-3,产物长度 333 bp。PCR 反应条件为:94℃预变性 5 min,94℃变性 45 s,55℃退火 45 s,72℃延伸 45 s,共扩增 35 个循环,最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳观察,并用 AlphaImager 2200 凝胶成像系统进行扫描分析,结果以 HO-1 与 β-actin 吸光度的比值表示相对表达强度。

5. 细胞免疫化学检测各组细胞 HO-1 表达:处理好的盖玻片置于 24 孔板,对数生长期细胞系 SGC-7901 接种于 24 孔板,转染后 72 h 后取出长满细胞的盖玻片,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 2 次,置于 4%多聚甲醛溶液固定。接下来按即用型 SABC 免疫组织化学染色试剂盒使用说明书进行操作,依次经 0.5% TritonX-100 透化,5% BSA 封闭,滴加鼠抗人 HO-1 单克隆抗体 4℃过夜,第 2 天依次加抗小鼠二抗和 SABC, DAB 显色,苏木素复染,树胶封片。显微镜下观察并摄片。

6. 噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞增殖:调整对数生长期细胞密度为 1×10⁵ 个/ml,以每孔细胞数为 5×10³ 个接种于 96 孔培养板。置于在 37℃,5% CO₂,相

对湿度为 90%的培养箱中培养。分别于转染后 0、24、48、72 h 每孔加 MTT (5 g/L)20 μl,继续孵育 4 h,终止培养,吸弃上清液,每孔加入 150 μl DMSO,震荡 10 min,酶标仪在 570 nm 测定各孔 A 值。以时间为横轴,A 值为纵轴绘制生长曲线。

7. 流式细胞仪检测细胞周期:转染 72 h 后胰酶消化各组细胞,制成单细胞悬液,调整密度至 1×10⁶ 个/ml,PBS 洗涤 2 次,按 DNA-Prep Reagent Kit 操作说明加相应试剂,避光放置 30 min,流式细胞仪检测各组细胞周期。

8. 统计学方法:各计数资料均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SAS 9.13 统计软件分析,组间比较采用 *t* 检验;构成比差异采用 χ^2 检验。

结 果

1. 细胞转染:质粒载体含编码绿色荧光蛋白(GFP)的基因,所以转染细胞在荧光显微镜下可激发绿色荧光。相同视野,不同光线下分别计数细胞数,转染率为 60%。

2. shRNA 转染对各组细胞 HO-1 mRNA 的表达影响:PCR 产物 1%琼脂糖凝胶电泳结果显示,细胞经 shRNA 作用 48 h 后,HO-1 shRNA 组细胞 HO-1 mRNA 表达较对照两组明显下调($P < 0.01$),对照质粒组与未转染组细胞 HO-1 mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。

表 1 shRNA 作用 48 h 后人胃癌细胞 SGC-7901 HO-1 mRNA 表达($\bar{x} \pm s$)

组别	β-肌动蛋白 (β-actin)	HO-1	比值 (HO-1/β-actin)
未转染组	494.500 ± 8.109	189.167 ± 10.108	0.382 ± 0.020
对照质粒组	542.667 ± 9.832	205.333 ± 6.408	0.378 ± 0.016
实验组	460.833 ± 11.771	70.500 ± 5.244	0.153 ± 0.008

3. shRNA 转染对各组细胞 HO-1 蛋白表达的影响:HO-1 蛋白染色呈棕黄色,主要见于胞质和胞膜。排除边缘细胞,在 10×10 倍镜下随机选取 10 个视野,各视野 10×20 倍镜下分别计数 50 个细胞,计算阳性细胞率。结果显示,shRNA-HO-1 组细胞阳性率较其他两组明显减少($P < 0.01$),对照质粒组与未转染组阳性细胞率差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4. shRNA 转染后对细胞生长的抑制:结果显示转染 shRNA-HO-1 沉默 HO-1 表达后对 SGC-7901 有抑制作用,72 h 抑制效果较明显。shRNA-HO-1 组生长曲线较其他两组趋于平缓,对照质粒组与未转染组曲线差异无统计学意义($P > 0.05$)。

5. shRNA 转染后对细胞周期的影响:流式细胞仪

分析 shRNA 干扰 HO-1 基因 72 h 后对细胞周期的影响, shRNA- HO-1 组 G₀/G₁ 期细胞百分比其他两组明显降低 ($P < 0.05$)。对照质粒组与未转染组各期细胞百分比差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 2)。

表 2 shRNA 转染 72 h 后人胃癌细胞 SGC-7901 细胞周期分布变化 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	G ₀ /G ₁ 期 细胞百分比	S 期 细胞百分比	G ₂ /M 期 细胞百分比
未转染组	69.425 ± 3.639	28.250 ± 2.685	2.300 ± 1.003
对照质粒组	67.525 ± 1.938	29.750 ± 1.636	2.725 ± 0.670
实验组	52.025 ± 1.638	40.100 ± 0.987	7.875 ± 1.357

讨 论

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 并呈逐年增加之势, 传统的外科手术与化疗均有各自的局限性, 导致胃癌临床治疗效果不满意, 所以研究胃癌发生、发展的分子机制及寻求临床治疗的分子靶点成为当前人们普遍关注和迫切需要解决的问题^[4]。RNA 干扰现象的发现及其功能的研究为胃癌的基因治疗带来了新的希望^[5]。

HO 是血红素分解代谢的限速酶, 将其分解为一氧化碳 (CO)、自由铁 (Fe²⁺) 和胆绿素, 胆绿素随后又被胆红素还原酶转化为胆红素^[6]。HO-1 为其诱生型, 又称热休克蛋白 32 (HSP32), 被认为是细胞应激的最敏感指标之一, 在细胞损伤时保持氧化与抗氧化平衡中起关键作用。细胞氧化应激触发凋亡是正常器官或组织保持生理功能的保护行为, HO-1 已被许多实验证实具有抗氧化、抗凋亡作用, 而这些作用也在许多肿瘤细胞得到证实, 如结肠癌、甲状腺癌等, 并在一定程度上促进了肿瘤的进展^[7,8]。

本研究构建靶向 HO-1 的短发卡双链 RNA (shRNA) 的表达质粒, 转染人胃癌细胞系 SGC-7901, 转染效率为 60%, RT-PCR、细胞免疫化学结果显示在 mRNA 和蛋白水平有效抑制了 SGC-7901 细胞中 HO-1 的表达 (抑制率分别为 62.4%、67.6%)。细胞周期显示, 转染 shRNA- HO-1 组 G₀/G₁ 期细胞百分比明显降低, 文献报道高表达 HO-1 可使胃癌细胞阻滞于 G₀/G₁ 期, 增强对凋亡的抵抗力^[9]。因此可认为 HO-1 表达受抑制后减弱对凋亡的抵抗力, 从而促进了胃癌细胞凋亡。MTT 结果也显示转染 shRNA- HO-1 后 SGC-

7901 生长较对照组受抑制, 证实上述推断。抑制 HO-1 表达促进胃癌细胞凋亡具体机制尚不甚明确。但有关乳腺癌的研究证实抑制 HO-1 表达通过降低 STAT-3 和抗凋亡基因 bcl-XL 蛋白表达, 从而增加凋亡蛋白酶 CAS-3 的表达, 并可能因此增加了肿瘤细胞凋亡的发生^[10]。急性髓性白血病细胞的实验也证实诱导 HO-1 表达可减少肿瘤坏死因子 (TNF) 引起的细胞死亡^[11]。

诱导肿瘤细胞凋亡也成为现代肿瘤非手术治疗的基础之一, HO-1 抗肿瘤细胞凋亡事实使其成为肿瘤治疗的潜在靶点, 其效果已经在一些动物模型中得到证实, 如静脉注射聚乙二醇锌原卟啉 (PEG-ZnPP), 一种水溶性 HO-1 抑制剂, 可诱导小鼠结肠癌细胞凋亡, 抑制肿瘤生长, 而且没有任何表观副作用^[12]。

本研究表明, 靶向 HO-1 的 shRNA 表达载体可有效抑制细胞 SGC-7901 中 HO-1 的表达, 抑制 HO-1 的表达通过促进细胞凋亡抑制肿瘤细胞生长。

参 考 文 献

- [1] 车艳, 张强, 李大勇, 等. 血红素氧合酶-1 在早期腹主动脉瘤中的动态表达. 中华实验外科杂志, 2005, 22: 674-675.
- [2] Berberat PO, Dambrauskas Z. Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of pancreatic cancer cells to anticancer treatment. Clin Cancer Res, 2005, 11: 3790-3798.
- [3] 周章明, 袁先厚, 涂汉军, 等. RNAi 沉默 pyk2 基因对鼠脑胶质瘤细胞增殖、侵袭能力的影响. 中华实验外科杂志, 2008, 25: 619-621.
- [4] 郁宝铭. 胃肠道肿瘤分子生物学研究的发展方向. 中华实验外科杂志, 2005, 22: 1162-1163.
- [5] 张峰, 刘晔, 刘三光, 等. RNA 干预研究及其在肿瘤基因治疗中的作用. 中华实验外科杂志, 2006, 23: 381-382.
- [6] Maines MD. Hemeoxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical application. FASEB J, 1988, 2: 2557-2568.
- [7] Busserolles J, Megias J, Terencio MC, et al. Heme oxygenase-1 inhibits apoptosis in Caco-2 cells via activation of Akt pathway. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38: 1510-1517.
- [8] Chen GC, Liu ZM, Vlantis AC, et al. Heme oxygenase-1 protects against apoptosis by tumor necrosis factor-alpha and cycloheximide in papillary thyroid carcinoma cells. J Cell Biochem, 2004, 92: 1246-1256.
- [9] Liu ZM, Chen GC, Ng EK, et al. Upregulation of heme oxygenase-1 and p21 confers resistance to apoptosis in human gastric cancer cells. Oncogene, 2004, 23: 503-513.
- [10] 刘胜春, 姚榛祥, 孙正魁. 锌原卟啉对种植性乳腺癌细胞凋亡的影响. 中华实验外科杂志, 2006, 23: 525-527.
- [11] Rushworth SA, MacEwan DJ. HO-1 underlies resistance of AML cells to TNF-induced apoptosis. Blood, 2008, 111: 3793-3801.
- [12] Fang J, Sawa T, Akaike T, et al. In vivo antitumor activity of pegylated zinc protoporphyrin: targeted inhibition of heme oxygenase in solid tumor. Cancer Res, 2003, 63: 3567-3574.

(收稿日期: 2008-10-07)