

· 论 著 ·

MTA1 靶向 RNA 干扰对人肝癌 HepG2 细胞生物学行为影响的研究

程建国, 霞 明, 文 峰

(解放军第一六一医院消化内科, 武汉 430010)

摘要:目的 观察转移相关基因 1(MTA1)特异性 siRNA 对肝癌细胞株 HepG2 细胞生物学行为的影响。方法 体外构建 2 个 MTA1 特异性 siRNA 表达载体(pRNAi-1、pRNAi-2), 实验分为脂质体对照、空质粒转染对照及 MTA1 siRNA 重组质粒转染组, 转染肝癌细胞株 HepG2 细胞, 定量 RT-PCR 检测 MTA1 mRNA 表达情况, 检验其对细胞的 RNA 干扰效果; 采用 MTT 法分析其对细胞增殖的影响, 流式细胞仪检测其对细胞周期的影响。结果 测序表明 MTA1 干扰序列完全正确; pRNAi-1 与 pRNAi-2 表达质粒有效抑制肝癌细胞株 HepG2 细胞中 MTA1 的表达, MTT 法检测结果显示转染重组质粒组细胞体外生长的抑制率高于脂质体对照组和空质粒对照组($P < 0.01$); 流式细胞术检测的转染重组质粒组细胞凋亡率高于脂质体对照组和空质粒对照组($P < 0.01$)。结论 成功构建了 MTA1 干扰真核表达载体, 重组 MTA1 特异性 siRNA 质粒可抑制肝癌细胞中 MTA1 的表达, 并抑制肝癌细胞生长, 促进其凋亡。

关键词: RNA 干扰; MTA1; HepG2 肝癌细胞; 凋亡

中图分类号: R979.1; Q279

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)14-1824-03

Effect of MTA1 RNA interference on biological behaviour of HepG2 liver cancer cells

CHENG Jian-guo, XIA Ming, WEN Feng

(Department of Gastroenterology, 161 Hospital of PLA, Wuhan 430010, China)

Abstract: Objective To study the effect of MTA1 siRNA on proliferation and apoptosis of liver cancer cell line HepG2. **Methods** Two recombinant plasmids(pRNAi-1, pRNAi-2) were constructed. The HepG2 liver cancer cells were divided into three groups: liposome treated control group, empty plasmid transfected control group and MTA1 siRNA transfected group. The expression of MTA1 mRNA and protein was detected by quantitative RT-PCR, respectively. MTT assay was applied to determine the cell growth status. Apoptotic rates were evaluated by flow cytometry. **Results** The sequence of specific siRNA was correct by sequence analysis. The MTT assay results showed that the inhibitory rate of cell proliferation in MTA1 siRNA transfected groups were higher than those in liposome treated control group and empty plasmid transfected control group ($P < 0.01$); The FCM results showed that the apoptotic rates in MTA1 siRNA transfected groups were higher than those in liposome treated control group and empty plasmid transfected control group ($P < 0.01$). **Conclusion** The siRNA eukaryotic expression vector of MTA1 gene have been constructed successfully which could not only suppress the expression of MTA1 in liver cancer cell line and proliferation of HepG2 cells, but also induce apoptosis of HepG2 cells.

Key words: RNAi; MTA1; HepG2 cells; apoptosis

侵袭和转移是造成各种恶性肿瘤患者死亡的主要原因。近年来, 已相继克隆出许多与肿瘤转移直接相关的基因, 其中转移相关基因 1 (metastasis associated gene 1, MTA1) 是近年来新发现的一个与肿瘤浸润、转移关系密切的基因^[1-2]。它通过促进组蛋白脱乙酰基, 影响基因的转录和复制, 与多种肿瘤组织, 尤其是与上皮源性恶性肿瘤组织的侵袭转移能力密切相关^[3]。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术是近年来新兴的一种可以快速、高效地促使体内特定基因 mRNA 降解, 实现基因转录后沉默的方法^[4-5]。本研究采用短发夹 RNA 介导的 RNA 干扰技术, 研究靶向抑制 MTA1 基因对肝癌细胞株 HepG2 细胞增殖和细胞周期的影响, 为肝癌的基因治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株与试剂 人肝癌细胞株 HepG2 细胞株购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。干扰质粒载体 pGenSil-1 购于武汉晶赛公司, lipofectamine™ 2000 购于 Invitrogen 公司, 质粒提取试剂盒购于北京博大泰克公司, 总 RNA 提取试剂、Real-time PCR 试剂盒、T4DNA 连接酶购自大连宝生物公司, 琼脂糖 DNA 回收试剂盒购自德国 Qiagen

公司。

1.1.2 模板 DNA 根据 MTA1 基因序列 (GeneBank NM_004689) siRNA 设计规则通过 www.genscript.com 网站在线 siRNA 设计工具设计两对 siRNA, 设计基因靶点分别于 MTA1 基因的第 680、1 102 位点, 靶序列分别为 MTA1 I AAG GAG AGA TTC GAG TAG GAA; MTA1 II AAG GAT TTC ACG GAC ATT CAG; 由上海生物工程技术有限公司合成。模板链两端分别设计 BamHI 和 HindIII 酶切位点。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 合成和真核表达载体的构建 将对应的 2 段寡核苷酸分别以去离子水溶解 (浓度为 $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), 2 条寡核苷酸片段各 $2 \mu\text{L}$ ($1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), $1 \times$ 退火 buffer $46 \mu\text{L}$ 。退火反应, 95°C 5 min, 70°C 10 min, 缓慢降至 30°C , 维持 30 min, 缓慢降至 4°C 后, -20°C 保存。pGenSil-1 双酶切, $10 \times$ Buffer $4 \mu\text{L}$, BamHI 和 HindIII 酶各 $2 \mu\text{L}$, pGenSil-1 质粒 $32 \mu\text{L}$, 37°C 酶切 1 h, 70°C 灭活 5 min, 然后胶回收纯化。2 \times 连接反应缓冲液 $5 \mu\text{L}$, 退火产物 $3 \mu\text{L}$, T4 连接酶 $1 \mu\text{L}$, 粘末端线性 pGenSil-1 载体 $1 \mu\text{L}$, 4°C 过夜。连接产物分别命名为: pRNAi-1、pRNAi-2。各取 $5 \mu\text{L}$ 过夜连接产物转化感受态细胞 DH5 α 。将菌液分别涂布于含氨苄抗性的 LB 平板上, 37°C 恒温箱培养

过夜。然后各挑取 2 个单克隆菌落接种于 3 mL 含氨苄抗性的 LB 培养液中,37 °C 恒温摇床培养过夜。用质粒小提试剂盒提取质粒,并做测序鉴定。

1.2.2 细胞培养与转染 转染前 1 d,用 0.25% 胰蛋白酶消化对数生长期的细胞,调整细胞密度,按每孔 3×10^5 个细胞等量加入 6 孔培养板中培养。待细胞贴壁后按试剂盒说明书进行转染。G418 筛选 2 周后分别挑取单发绿色荧光的细胞,在 G418 药物压力下培养,得到稳定转染细胞克隆。

1.2.3 荧光定量 PCR 检测 MTA1 基因表达水平 提取细胞总 RNA 行荧光定量 PCR 检测,按 Trizol 的操作说明提取总 RNA,并用紫外分光光度计测量 RNA 的浓度。各取 1 μ g,按反转录试剂盒操作方法获得单链 cDNA,采用嵌合荧光检测法,根据 Real time PCR 试剂盒 (Takara 公司) 与扩增仪 (ABI5700 型) 说明,采用 50 μ L 反应体系 (2 \times SYBR Premix Ex Taq™ 25 μ L, 上游引物 1 μ L, 下游引物 1 μ L, 50 \times ROX Reference Dye 1 μ L, cDNA 溶液 4 μ L, DEPC H₂O 18 μ L) 95 °C 预变性 180 s; 95 °C 20 s, 60 °C 60 s, 40 个循环。用 pGEM-MTA1 质粒和 pGEM-GAPDH 质粒,系列稀释同时扩增,制作标准曲线。记录各管扩增 CT 值,换算出基因拷贝数。以 MTA1 基因拷贝数与 GAPDH 基因拷贝数的比值作为其相对表达水平^[6]。各基因的引物序列见表 1。

表 1 各基因的引物序列

基因	引物	序列
GAPDH	sense	TGGCAAATTCATGGCACCG
	antisense	CAGAGGGGCAGAGATGATG
MTA1	sense	AGCGTCACCTGCTCAACGAGACCG
	antisense	GGTTGGCCTCTGATGCAGACCACTC

1.2.4 MTT 法检测细胞生长曲线 将脂质体对照、空质粒转染对照及 MTA1 siRNA 重组质粒转染组细胞分别接种于 6 块 96 孔板,接种密度为 1×10^4 /孔,每天取一板进行 MTT 反应,测定 490 nm 吸光度值,取平均值。连续测定 6 d,绘制细胞生长曲线。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡 将脂质体对照、空质粒转染对照及 MTA1 siRNA 重组质粒转染组细胞接种于 6 孔板中,转染 48 h 后,收集细胞,并用冰 PBS 液洗 2 遍,再用 70% 的冷乙醇 4 °C 固定过夜,固定后的细胞用 PBS 液洗涤,并重悬于含 0.1 mg/mL,用流式细胞仪分析。

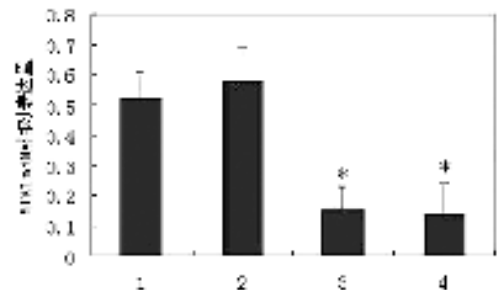
1.3 统计学方法 应用 SPSS10.0 统计软件包对数据进行分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTA1 siRNA 表达载体的构建和鉴定 通过大连宝生物测序结果表明,所获得的重组干扰质粒目的片段与预期完全相符,说明重组载体构建成功。表达质粒转染肝癌细胞株 HepG2 细胞后,细胞胞浆中出现绿色荧光(见封 3 图 1),说明表达质粒正确表达。

2.2 荧光定量 PCR 检测结果 脂质体对照和空质粒转染对照细胞 MTA1 mRNA 表达水平,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),MTA1 siRNA 重组质粒转染组细胞 pRNAi-1 组与 pRNAi-2 组的 MTA1 mRNA 表达均显著降低,与脂质体对照和空质粒转染对比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),说明构建的 siRNA 载体可有效沉默 MTA1 mRNA 表达(图 2)。

2.3 细胞生长曲线的检测 以时间(d)为横轴,OD 值(波长为 490 nm,代表活细胞的数量)为纵轴,分别绘制脂质体对照、空质粒转染对照及 MTA1 siRNA 重组质粒转染组细胞的生长曲线。与脂质体对照、空质粒转染对照细胞比较,MTA1 siRNA 重组质粒转染组细胞生长速度减缓(图 3)。



1:脂质体对照;2:空质粒转染对照;3:pRNAi-1;4:pRNAi-2。与脂质体对照组和空质粒转染对照组比较,* : $P < 0.05$ 。

图 2 荧光定量 PCR 检测结果

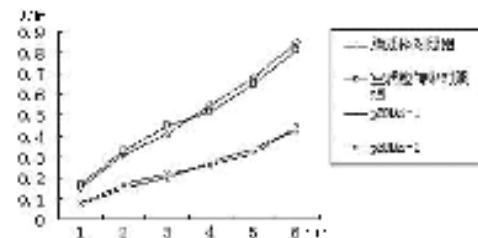


图 3 MTA1 RNAi 对 HepG2 细胞增殖的影响

2.4 MTA1 siRNA 对细胞周期和凋亡的影响 与脂质体对照、空质粒转染对照细胞比较,pRNAi-1 组与 pRNAi-2 出现 G₀/G₁ 期阻滞,在 S 期和 G₂/M 期细胞数下降,并在转染 48 h 后,MTA1 siRNA 组亚二倍体凋亡峰显著升高,具体检测结果见表 2,转染 MTA1 siRNA 组凋亡率明显高于脂质体对照、空质粒转染对照细胞 ($P < 0.01$)。

表 2 MTA1 RNAi 对 HepG2 细胞周期的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞周期			凋亡率
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
脂质体对照	40.54 ± 4.01	44.21 ± 3.09	15.20 ± 1.08	0.88 ± 0.53
空质粒转染对照	38.20 ± 3.45	46.81 ± 1.49	15.45 ± 3.44	1.05 ± 0.46
pRNAi-1	85.33 ± 5.22	14.01 ± 8.12	0.44 ± 1.10	13.55 ± 0.37
pRNAi-2	87.02 ± 5.44	11.45 ± 3.42	1.60 ± 5.40	14.12 ± 0.812

3 讨 论

转移是恶性肿瘤的主要特征之一,其间涉及多种机制,研究表明某些蛋白在肿瘤的转移过程中起着重要的作用,其中 MTA1 基因是近年来发现的与肿瘤发生、发展及转移有密切关系的蛋白之一。MTA1 基因是 Toh 等^[1]应用差异 cDNA 杂交技术,从 13 762 NF 大鼠乳腺癌转移系统筛选克隆出,继后在人类高转移乳腺癌细胞株中发现其对应的人类同源物 MTA1。因该基因的表达与乳腺肿瘤转移能力成正相关,故被命名为转移相关基因 1。人的 MTA1 基因位于染色体 14q 32.3,编码一个含 715 个氨基酸残基的蛋白,分子量为 82 kD。MTA1 蛋白具有明显的亲水性,不具有跨膜或膜相关的区域,表明它并非细胞表面蛋白或分泌蛋白。Xue 等^[7]研究发现染

色质重建和核小体共价修饰共同存在于同一蛋白复合物 NuRD 中,而 MTA1 是 NuRD 的一个亚单位之一,与组蛋白的去乙酰化呈正相关,因此是转录过程中的一个辅助抑制因子。因此,MTA1 可通过此种功能直接或者间接作用于某些抑制肿瘤浸润转移的基因,下调其转录。

MTA1 在肿瘤的侵袭转移中扮演了重要角色。Toh 等^[2]发现具有高转移能力乳腺癌细胞株 MTA1 表达水平是无转移能力细胞株的 4 倍。Sasaki 等^[8]研究表明,MTA1 mRNA 表达水平与非小细胞肺癌的临床分期密切相关,伴有淋巴结转移的非小细胞肺癌组织明显高于无淋巴结转移的癌组织,其差异有统计学意义。Toh 等^[9]运用 RT-PCR 技术检测人胃癌和大肠癌标本中 MTA1 基因 mRNA 的表达水平,并结合临床病理特征分析其与 MTA1 基因表达水平的关系,结果现,MTA1 基因过表达的大肠癌,其肠壁浸润的深度更深,淋巴结转移率更高,并多处于 Duke's 分期的晚期,常伴淋巴细胞包绕。这说明 MTA1 基因过表达与胃肠癌的浸润和转移有关,MTA1 mRNA 的高表达可作为估计胃癌和大肠癌恶性潜能的潜在指标。Iguchi 等^[10]研究发现,MTA1 基因可能与胰腺癌的侵袭,尤其是淋巴结转移有关。王会河等^[11]研究了 MTA1 基因与鼻咽癌浸润转移的关系,他们应用逆转录聚合酶链反应技术,检测了 43 例鼻咽癌组织和 20 例正常鼻咽部组织 MTA1 mRNA 的表达。MTA1 基因在鼻咽癌组织中的表达明显高于正常组织,其高表达与鼻咽癌浸润转移关系密切。刘海等^[12]采用荧光定量 PCR 及 Western 印迹技术,分别在 mRNA 和蛋白水平检测 42 例手术切除的人胃癌组织及癌旁组织中 MTA1 的表达,并结合胃癌的临床生物学特征分析 MTA1 表达与胃癌病理类型、淋巴结转移的关系,发现伴有淋巴结转移的胃癌组织中 MTA1 mRNA 的相对量表达明显高于不伴有淋巴结转移的胃癌组织。

本研究设计、合成了针对 MTA1 基因的特异性 RNA 干扰片段,构建了其 siRNA 真核表达质粒(pRNAi-1, pRNAi-2),然后转染高表达 MTA1 的大肝癌 HepG2 细胞株,并使其在细胞中稳定表达。转染 MTA1 siRNA 后,通过荧光定量 PCR 检测了各组细胞中 MTA1 基因的表达,发现与脂质体对照和空质粒转染对照比较,pRNAi-1 组与 pRNAi-2 组的 MTA1 mRNA 表达均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明构建的 siRNA 载体可有效沉默 MTA1 mRNA 表达。同时应用 MTT 和流式细胞技术分析细胞的生长曲线和周期分布,发现 MTA1 siRNA 能够使细胞增殖速度减慢,并诱导细胞凋亡。

总之,本研究通过使用靶向 MTA1 的 siRNA,不仅有效抑制了 MTA1 基因在肝癌中的表达,还能在体外特异性抑制肝癌细胞的分裂增殖及诱导细胞的凋亡。

参考文献:

- [1] Toh Y, Pencil SD, Nicolson GL. A novel candidate metastasis-associated gene, mta1, differentially expressed in high metastatic mammary adenocarcinoma cell lines[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(37): 22958.
- [2] Toh Y, Pencil SD, Nicolson GL. Analysis of the complete sequence of the novel candidate metastasis-associated gene, mta1, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma and breast cancer cell lines[J]. *Gene*, 1995, 159(1): 97.
- [3] Nicolson GL, Nawa A, Toh Y, et al. Tumor metastasis-associated human MTA1 gene and its MTA1 protein product: role in epithelial cancer cell invasion, proliferation and nuclear regulation[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2003, 20(1): 19.
- [4] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. *Nature*, 2001, 411: 494.
- [5] 黄环, 吴永忠. RNA 干扰技术及其在肿瘤研究中的进展[J]. *重庆医学*, 2008, 37(2): 198.
- [6] 杨松华, 赵国强, 郑红. RNAi 干扰食管癌 EC9706 细胞 MTA1 基因表达对侵袭和迁移的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2008, 30(6): 503.
- [7] Xue Y, Wong J, Moreno GT, et al. NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities[J]. *Mol Cell*, 1998, 2(6): 851.
- [8] Sasaki H, Moriyama S, Nakashima Y, et al. Expression of the MTA1 mRNA in advanced lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2002, 35(2): 149.
- [9] Toh Y, Oki E, Oda S, et al. Over expression of the MTA1 gene in gastrointestinal carcinomas: correlation with invasion and metastasis[J]. *Int J Cancer*, 1997, 74(4): 459.
- [10] Iguchi H, Imura G, Toh Y, et al. Expression of MTA1, a metastasis-associated gene with histone deacetylase activity in pancreatic cancer[J]. *Int J Oncol*, 2000, 16(6): 1211.
- [11] 王会河, 黄光武, 莫立根, 等. MTA1 表达与鼻咽癌浸润转移的关系[J]. *广西医科大学学报*, 2006, 23(4): 546.
- [12] 刘海, 胡俊波, 王志强, 等. MTA1 基因表达与人胃癌的浸润和转移[J]. *世界华人消化杂志*, 2006, 14(34): 3317.

(收稿日期: 2009-11-25 修回日期: 2010-03-09)

(上接第 1823 页)

国微循环, 2004, 8(3): 154.

- [7] Ramana KV, Chandra D, Srivastava S, et al. Aldose reductase mediates mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(35): 32063.

- [8] 王芙蓉, 高聆, 于建中, 等. 西洛他唑对糖尿病大鼠主动脉 VCAM-1、NF- κ B 及 PPARs 的影响[J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(2): 197.

(收稿日期: 2009-10-14 修回日期: 2009-12-20)