

· 基础研究 ·

YB-1 基因沉默抑制前列腺癌细胞的增殖和迁移*

张涛¹, 何平平², 周俊³, 罗志刚¹, 欧阳新平^{4△}

(南华大学: 1. 附属第二医院泌尿外科; 2. 护理学院; 3. 附属第二医院检验科; 4. 医学院生理学教研室, 湖南衡阳 421001)

摘要:目的 探讨 RNA 干扰沉默 Y-盒结合蛋白 1(YB-1)对前列腺癌细胞株 PC-3 细胞增殖和侵袭力的影响。方法 将 YB-1 siRNA(pGenesil-1-YB-1-1, pGenesil-1-YB-1-2 质粒)用脂质体转染 PC-3 细胞(转染组),以逆转录-PCR(RT-PCR)和蛋白质印迹法(Wesretn blotting)分别检测 YB-1 mRNA 和蛋白的表达,3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)比色法和 Transwell 小孔实验检测 PC-3 细胞的增殖和侵袭力。结果 与质粒对照组相比,转染组 YB-1 mRNA 和蛋白的表达水平明显降低($P<0.05$)。重组质粒 pGenesil-1-YB-1-1 和 pGenesil-1-YB-1-2 组 mRNA 的抑制率分别达 36.23% 和 39.42%, YB-1 蛋白的抑制率分别达 41.56% 和 55.33%。与正常对照组相比,转染组细胞增殖明显抑制($P<0.05$),转染处理的穿膜细胞数明显减少($P<0.05$)。结论 RNA 干扰沉默 YB-1 基因表达降低了前列腺癌细胞的增殖和迁移能力。

关键词:前列腺肿瘤; RNA 干扰; Y-盒结合蛋白 1; 基因治疗; PC-3 细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.30.020

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)30-3641-03

The gene silencing of YB-1 by inhibiting the proliferation and migration in prostate cancer cells*

Zhang Tao¹, He Pingping², Zhou Jun³, Luo Zhigang¹, Ouyang Xinping^{4△}

(1. Department of Urology, the Second Affiliated Hospital; 2. School of Nursing; 3. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital; 4. Department of Physiology, Medical College, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of gene silencing of Y-box binding protein-1(YB-1) by RNA interference on the proliferation and migration in prostate cancer cells lines PC-3 cells. **Methods** YB-1 siRNAs(pGenesil-1-YB-1-1 and pGenesil-1-YB-1-2) were synthesized and transfected into cloned into the the PC-3 cells by liposome. The expressions of YB-1 were measure by RT-PCR and Western blotting. The proliferation and migration were respectively detected by MTT and Transwell method. **Results** ThemRNA and protein expressions of YB-1 were significantly decreased by pGenesil-1-YB-1-1 and pGenesil-1-YB-1-2 ($P<0.05$), compared with the control group, the inhibition ratio of mRNA expression was 36.23% and 39.42% respectively and the inhibition ratio of protein expression was 41.56% and 55.33% respectively. The proliferation and migration were significantly decreased by pGenesil-1-YB-1-1 and pGenesil-1-YB-1-2($P<0.05$). **Conclusion** YB-1 gene silencing by RNA interference inhibits the proliferation and migration in prostate cancer cells lines PC-3 cells.

Key words: prostatic neoplasms; RNA interference; Y-box binding protein-1; gene therapy; PC-3 cells

Y-盒结合蛋白 1(Y-box binding protein-1, YB-1) 是 Y 盒蛋白家族的成员之一,广泛分布于原核和真核生物细胞中,参与了多种生物学过程^[1-2]。研究表明 YB-1 与人类恶性肿瘤的关系密切,在多种恶性肿瘤中 YB-1 表达上调,特别在前列腺癌和乳腺癌中^[3-5]。YB-1 的表达水平随肿瘤的恶性程度和病情的恶化而增加^[5]。然而 YB-1 是否影响前列腺癌的迁移与侵袭目前还不清楚。因此本文构建了针对 YB-1 的 siRNA 重组质粒,观察 RNA 干扰沉默 YB-1 表达对前列腺癌株 PC-3 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。

1 材料与方

1.1 材料 前列腺癌 PC-3 细胞株(北京协和细胞资源中心);质粒 pGenesil-1(武汉晶赛)。YB-1 特异性 DNA 片段(上海英骏)。脂质体 LipofectamineTM 2000、Trizol、RNase 抑制剂、逆转录酶 SSRT、Taq 酶、Hind III 和 EcoR I 限制性内切酶(In-vitrogen)。兔抗人 GAPDH 和 YB-1 单克隆抗体以及二抗(Santa Cruz),引物(上海生工)。

1.2 方法

1.2.1 YB-1 siRNA 序列设计和重组质粒的鉴定 根据 Gen-

Bank 中的 YB-1 基因序列,在线分析设计,确定 2 个靶序列,设计 2 个针对 YB-1 的短发夹 RNA (small hair RNA, shRNA)。序列 1: 正义链 5'-GAT CCG GAA GAT GTA TTT GTA CAC TTC AAG AGA GTG TAC AAA TAC ATC TTC CTT TTT TA-3'; 反义链 5'-AGC TTA AAA AAG GAA GAT GTA TTT GTA CAC TCT CTT GAA GTG TAC AAA TAC ATC TTC CG-3'。序列 2: 正义链: 5'-GAT CCG GTT CCC ACC TTA CTA CAT TTC AAG AGA ATG TAG TAA GGT GGG AAC CTT TTT TA-3'; 反义链: 5'-AGC TTA AAA AAG GTT CCC ACC TTA CTA CAT TCT CTT GAA ATG TAG TAA GGT GGG AAC CG-3'。将合成的 DNA 正义链和反义链与 pGenesil-1 质粒连接。转化感受态 DH-5 α 菌种,筛选阳性克隆,摇菌抽提质粒。重组质粒和空载体进行 Hind III 和 EcoR I 双酶切,片段大小预期分别为 400 和 350 bp。产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。2 个重组质粒命名为 pGenesil-1-YB-1-1(质粒 1)和 pGenesil-1-YB-1-2(质粒 2)。

1.2.2 细胞培养和实验分组 PC-3 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,37℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(81300158),湖南省科技厅资助项目(2013FJ3027),衡阳市 2011 年科学技术发展计划基金(2011KJ49),湖南省教育厅科学研究青年项目(13B103)。作者简介:张涛(1978~),硕士,主治医师,主要从事泌尿系统肿瘤防治的研究。△ 通讯作者, Tel:0734-8281389; E-mail:y1655@163.com。

实验分为 4 个组:未转染质粒的 PC-3 细胞为空白对照组,转染空质粒为质粒对照组,转染重组质粒 1 为 pGenesil-1-YB-1-1 组和转染重组质粒 2 为 pGenesil-1-YB-1-2 组。

1.2.3 重组质粒转染 PC-3 细胞 提取重组质粒,测定浓度。将细胞按 2×10^5 /孔接种于 6 孔培养板,细胞融合度至 60%~80%时,用无血清培养基稀释 shRNA 双链体,将 shRNA 和 LipofectamineTM 2000 按 1:2 混合,室温下孵育 20 min,加入 6 孔板中,混匀,37 ℃、5% CO₂ 培养 6 h 后终止转染。

1.2.4 RT-PCR 提取细胞总 RNA。逆转录后 PCR 扩增。PCR 条件:95 ℃ 变性 4 min,94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 35 s,循环 45 次,72 ℃ 延伸 5 min。YB-1 PCR 正向引物:5'-ACA AGA AGG TCA TCG CAA CG-3',反向引物:5'-TAA TGG TTA CGG TCT GCT GC-3',产物长度 283 bp。GAPDH 为内参。琼脂糖凝胶电泳后凝胶图像分析系统进行分析。YB-1 mRNA 表达抑制率计算:抑制率(%)=[1-(RNA 干扰组条带灰度/RNA 干扰组 GAPDH 条带灰度)/(对照组条带灰度/对照组 GAPDH 条带灰度)]×100%。

1.2.5 蛋白质印迹(Western blotting)法 提取细胞总蛋白,BAC 法定量蛋白。100 μL 蛋白样品加入到 2×十二烷基硫酸钠(SDS)凝胶缓冲液中,煮沸。6% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)2 h 分离蛋白。分离的蛋白用半干转膜仪转移至聚偏二氯乙烯(PVDF)膜上。10%脱脂牛奶封闭 2 h,加入兔抗人 YB-1(1:200)和 GAPDH(1:300)抗体,4 ℃ 下过夜。加入二抗,4 ℃ 下孵育 4 h。显影后进行半定量分析并计算蛋白表达抑制率。

1.2.6 3-(4,5-二甲基噻唑)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT) 将 PC-3 细胞以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板,37 ℃、5% CO₂ 培养 24、48、72 和 96 h。处理结束后每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL,培养 4 h。吸去上清液,每孔加入 200 μL DMSO,孵育 10 min,用酶标仪在 490 nm 处测定吸光度 A 值。

1.2.7 划痕实验 将 PC-3 细胞 1×10^5 /L 接种于 6 孔板,37 ℃、5% CO₂ 培养 24 h。细胞在孔板的底面形成单细胞层。在单层细胞表面用 100 μL 移液器枪头垂直划痕,PBS 轻洗 2 次,除去细胞碎片,继续培养 24 h,在倒置显微镜下观察划痕处细胞的迁移情况,并拍照。

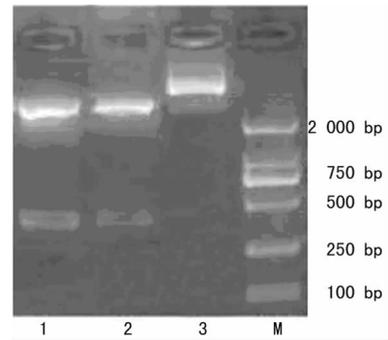
1.2.8 Transwell 实验 将 PC-3 细胞的密度调至 5×10^5 /mL,取 200 μL 加入上室,下室内加入 600 μL 含 100 ng/mL 基质细胞衍生因子-1 的培养液。37 ℃、5% CO₂ 培养 48 h,取出上室,迁移并黏附到下室面的细胞用甲醇固定,苏木素-伊红(HE)染色观察。每个小室在高倍镜(×200)下随机取 6 个视野计数迁移细胞数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件对数据进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析;两两比较采用 SNK-q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

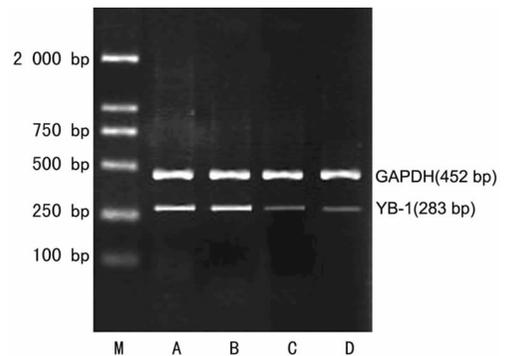
2.1 重组质粒的酶切鉴定 重组质粒经 Hind III 和 EcoR I 双酶切后,琼脂糖凝胶电泳分析可见 1 条约 400 bp 的条带。见图 1。

2.2 RNA 干扰对 PC-3 细胞中 YB-1 mRNA 和蛋白表达的影响 转染 48 h 后,与质粒对照组相比,pGenesil-1-YB-1-1 组和 pGenesil-1-YB-1-2 组转染的 PC-3 细胞的 YB-1 mRNA 和蛋白水平均显著性降低($P < 0.05$)。pGenesil-1-YB-1-1 组和 pGenesil-1-YB-1-2 组 mRNA 表达抑制率分别达 36.23% 和 39.42%,蛋白表达抑制率分别达 41.56% 和 55.33%。质粒对照组与空白对照组相比 YB-1 mRNA 和蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2、3。



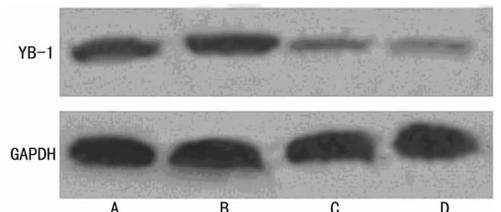
1: pGenesil-1-YB-1-1; 2: pGenesil-1-YB-1-2; 3: 未酶切质粒 pGenesil-1; M: DNA 分子标志物。

图 1 重组质粒酶切鉴定



M: DNA 分子标志物(DL 2 000); A: 空白对照组; B: 质粒对照组; C: pGenesil-1-YB-1-1 组; D: pGenesil-1-YB-1-2 组。

图 2 重组质粒转染后 48 h PC-3 细胞中 YB-1 mRNA 表达



A: 空白对照组; B: 质粒对照组; C: pGenesil-1-YB-1-1 组; D: pGenesil-1-YB-1-2 组。

图 3 重组质粒转染后 48 h PC-3 细胞中 YB-1 蛋白表达

2.3 RNAi 沉默 YB-1 对 PC-3 细胞增殖的影响 转染 48 h 后,与质粒对照组相比, pGenesil-1-YB-1-1 组和 pGenesil-1-YB-1-2 组转染的 PC-3 细胞的增殖能力明显降低($P < 0.05$)。而质粒对照组与空白对照组相比细胞的增殖能力差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 4 组细胞不同时间 A 值($\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
空白对照组	0.24±0.04	0.35±0.05	0.48±0.06	0.64±0.08
质粒对照组	0.25±0.03	0.33±0.05	0.51±0.07	0.62±0.07
pGenesil-1-YB-1-1 组	0.18±0.02	0.24±0.03	0.31±0.05	0.41±0.07
pGenesil-1-YB-1-2 组	0.17±0.02	0.22±0.01	0.27±0.04	0.35±0.06

2.4 RNAi 沉默 YB-1 对 PC-3 细胞迁移力的影响 转染 48 h 后,与质粒对照组比较, pGenesil-1-YB-1-1 组和 pGenesil-1-YB-1-2 组细胞的运动速度均明显减慢, pGenesil-1-YB-1-1 组和 pGenesil-1-YB-1-2 组细胞划痕已经基本长满,而空白对照组和质粒对照组细胞划痕依然明显。见图 4。

Transwell 结果显示:与质粒对照组比较, pGenesil-1-YB-1-1 组和 pGenesil-1-YB-1-2 组穿过滤膜的细胞数显著降低,差

异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。空白对照组、质粒对照组、pGenesil-1-YB-1-1 组和 pGenesil-1-YB-1-2 组穿过滤膜的细胞

数分别为 (123.71 ± 13.25) 、 (135.73 ± 14.18) 、 (67.73 ± 8.82) 和 (51.73 ± 6.75) 个。

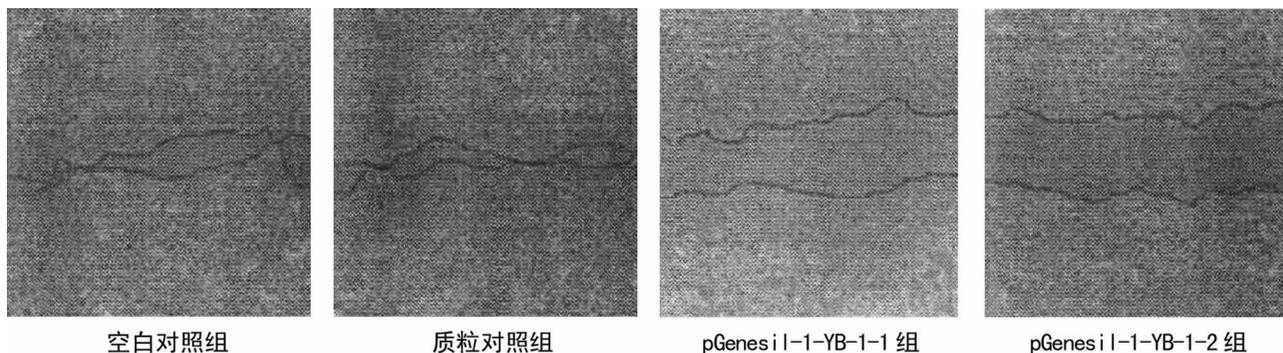


图 4 RNAi 沉默 YB-1 基因表达对前列腺癌细胞迁移运动能力的影响

3 讨论

前列腺癌是中老年男性常见的泌尿系统恶性肿瘤。恶性肿瘤细胞的迁移和侵袭作用是肿瘤转移的细胞学基础。抑制前列腺癌细胞的增殖和迁移,是前列腺癌治疗的重要措施。siRNA 已经成为研究基因功能、病毒和肿瘤等的重要手段^[6]。RNAi 是由双链 RNA 使靶 mRNA 发生降解而导致基因表达沉默^[7]。

YB-1 是最早发现的 Y-盒结合蛋白家族成员,广泛存在于从细菌到人类的许多物种中,特异性结合靶基因启动子和增强子内部的 Y-盒序列而调控靶基因的表达,参与了细胞的基因转录调节、mRNA 选择性剪接、翻译调控、DNA 修复、细胞再生和增殖等过程^[8-9]。YB-1 在恶性肿瘤的发生、发展、转移、肿瘤治疗及预后中都发挥着重要作用^[10]。YB-1 在前列腺癌、肺癌、乳腺癌等肿瘤中高表达,YB-1 表达水平高提示预后不良,被认为是肿瘤诊断的一种新型标志物^[11]。siRNA 可沉默人乳腺癌细胞中 YB-1 基因表达,并降低了细胞侵袭和成球能力^[12]。这表明 siRNA 沉默 YB-1 基因能成为肿瘤治疗的新策略。

在本实验中设计并构建了 2 条针对 YB-1 基因 siRNA 序列,分别转染前列腺癌细胞株 PC-3 细胞,RT-PCR 和 Western blotting 检测发现两条 siRNA 都能够有效的抑制 YB-1 基因的表达。2 条 YB-1 siRNA 序列均显著抑制细胞增殖。这些结果表明 YB-1 siRNA 序列可有效地抑制 PC-3 细胞中 YB-1 基因的表达和细胞增殖,但 pGenesil-1-YB-1-2 序列抑制效果更佳。这可能是由于不同细胞其靶 RNA 的空间构象、位点以及许多其他因素的影响所致。本研究结果表明 2 条 YB-1 siRNA 序列均抑制 PC-3 细胞的体外侵袭力。这些结果表明 YB-1 基因可作为前列腺癌基因治疗的靶点,为 siRNA 介导的前列腺癌基因沉默治疗提供实验依据,但其详细的机制还有待于进一步研究。

总之,本研究表明 siRNA 沉默 YB-1 表达可以抑制前列腺癌细胞增殖和迁移能力。

参考文献:

[1] Eliseeva IA, Kim ER, Guryanov SG, et al. Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2011, 76(13): 1402-1433.
 [2] Inoue I, Matsumoto K, Yu Y, et al. Surmounting chemoresistance by targeting the Y-box binding protein-1 [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2012, 295(2): 215-222.

[3] Yu YN, Yip GW, Tan PH, et al. Y-box binding protein 1 is up-regulated in proliferative breast Cancer and its inhibition deregulates the cell cycle [J]. *Int J Oncol*, 2010, 37(2): 483-492.
 [4] 高江原, 郑祥奇, 杨林. 前列腺特异抗原在 42 例前列腺癌诊治中的应用 [J]. *重庆医学*, 2010, 39(22): 3061-3062.
 [5] Li Y, Wen ZS, Yang HX, et al. High expression of Y-box-binding protein-1 is associated with poor survival in resectable esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2011, 18(12): 3370-3376.
 [6] 高双友, 宋蕊, 李双利, 等. E-cadherin 及 sE-cadherin 在 42 例前列腺癌中的表达及意义 [J]. *重庆医学*, 2010, 39(23): 3240-3241.
 [7] Alcazar RM, Lin R, Fire AZ. Transmission dynamics of heritable silencing induced by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 2008, 180(3): 1275-1288.
 [8] Fujii T, Yokoyama G, Takahashi H, et al. Preclinical and clinical studies of novel breast Cancer drugs targeting molecules involved in protein kinase C signaling, the putative metastasis-suppressor gene Cap43 and the Y-box binding protein-1 [J]. *Curr Med Chem*, 2008, 15(6): 528-537.
 [9] Raffetseder U, Liehn EA, Weber C, et al. Role of cold shock Y-box protein-1 in inflammation, atherosclerosis and organ transplant rejection [J]. *Eur J Cell Biol*, 2012, 91(6-7): 567-575.
 [10] Kolk A, Jubitz N, Mengele K, et al. Expression of Y-box-binding protein YB-1 allows stratification into long- and short-term survivors of head and neck Cancer patients [J]. *Br J Cancer*, 2011, 105(12): 1864-1873.
 [11] Tian B, Liu J, Liu B, et al. p53 suppresses lung resistance-related protein expression through y-box binding protein 1 in the MCF-7 breast tumor cell line [J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(12): 3433-3441.
 [12] 吴晓君, 许文林, 冷加燕, 等. YB-1 对乳腺癌 MCF-7 细胞 CD44 表达和细胞侵袭及成球能力的影响 [J]. *江苏大学学报: 医学版*, 2011, 21(4): 313-318.