

## AEG-1 siRNA 对宫颈癌细胞株增殖和凋亡影响的研究

秦瑞英<sup>1</sup>, 王宏伟<sup>2</sup>, 赵建华<sup>3</sup>, 杨玉新<sup>1</sup>, 刘颖<sup>1</sup>, 任艳芳<sup>1</sup>

(新乡医学院第一附属医院:1. 妇产科;2. 感染疾病科;3. 神经内科, 河南卫辉 453100)

**摘要:**目的 探讨 siRNA 下调星形细胞上调基因 1(AEG-1)表达对宫颈癌细胞增殖和凋亡的影响。方法 用设计合成的 AEG-1 siRNA 转染宫颈癌 SiHa 细胞,采用荧光定量 RT-PCR 技术观察 AEG-1 siRNA 对 AEG-1 基因表达的影响;用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法观察 AEG-1 siRNA 对宫颈癌 SiHa 细胞增殖的抑制作用;用流式细胞术检测 AEG-1 siRNA 对宫颈癌 SiHa 细胞凋亡和细胞周期的影响。结果 AEG-1 siRNA 转染入宫颈癌 SiHa 细胞后能显著下调 AEG-1 基因的表达,与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ );同时 AEG-1 基因表达的下调可以显著抑制宫颈癌 SiHa 细胞的增殖( $P < 0.01$ ),促进宫颈癌 SiHa 细胞凋亡( $P < 0.01$ ),并将细胞周期阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。结论 AEG-1 siRNA 可下调宫颈癌 SiHa 细胞 AEG-1 基因的表达,并抑制宫颈癌 SiHa 细胞的增殖,促进其凋亡。

**关键词:**星形细胞上调基因 1;宫颈肿瘤;小干扰 RNA;细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.17.011

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)17-2139-03

## Study on influence of AEG-1 siRNA on proliferation and apoptosis of cervical carcinoma SiHa cells

Qin Ruiying<sup>1</sup>, Wang Hongwei<sup>2</sup>, Zhao Jianhua<sup>3</sup>, Yang Yuxin<sup>1</sup>, Liu Ying<sup>1</sup>, Ren Yanfang<sup>1</sup>

(1. Department of Obstetrics and Gynecology; 2. Department of Infection Diseases; 3. Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui, Henan 453100, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of siRNA-down-regulating astrocyte elevated gene-1(AEG-1) on the proliferation and apoptosis of cervical carcinoma cells. **Methods** The designed and synthesized AEG-1 siRNA was transfected to the cervical carcinoma SiHa cells. The influence of AEG-1 siRNA on the expression of AEG-1 gene was detected by real-time fluorescent quantitative-polymerase chain reaction (RT-PCR); the inhibiting effect of AEG-1 siRNA on the proliferation of cervical cancer SiHa cells was detected by the MTT method; the influence of AEG-1 siRNA on apoptosis and cell cycle of the cervical cancer SiHa cells was determined by the flow cytometry. **Results** Compared with the control group, AEG-1 siRNA transfecting human cervical cancer SiHa cells could evidently down-regulate the expression of AEG-1 gene with statistical difference ( $P < 0.01$ ); at the same time, the down-regulation of AEG-1 gene expression could significantly inhibit the proliferation of the cervical cancer SiHa cells ( $P < 0.01$ ), promote the apoptosis of SiHa cells ( $P < 0.01$ ) and arrest the cell cycle in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase. **Conclusion** AEG-1 siRNA can down-regulate the expression of AEG-1 gene in the cervical carcinoma SiHa cells, inhibit the proliferation of the cervical carcinoma SiHa cells and promote their apoptosis.

**Key words:** astrocyte elevated gene-1; uterine cervical neoplasms; small interfering RNA; apoptotic

宫颈癌是一种最常见的女性恶性肿瘤,在发展中国家,其发病率和病死率在女性肿瘤中居第 2 位,且发病率以每年 2%~3% 的速度增长,严重威胁着女性的健康<sup>[1]</sup>。手术、放疗、化疗等作为妇科恶性肿瘤治疗的常规方法,对晚期患者疗效不佳,且不良反应多。小分子干扰 RNA(short interfering RNA, siRNA)是 1998 年 Fire 等通过对线虫的研究发现的一种 RNA 干扰技术,是目前医学上用来研究基因功能和基因治疗的最具潜力的工具之一<sup>[2]</sup>。自 2002 年 Su 等克隆出星形细胞上调基因 1(astrocyte elevated gene-1, AEG-1)以来,该基因在肿瘤研究领域日益引起人们的重视。近年研究表明,AEG-1 基因与多种恶性肿瘤的发生、发展及预后密切相关<sup>[3]</sup>。因此本研究在体外通过脂质体将 AEG-1 siRNA 转染宫颈癌细胞,研究 AEG-1 对宫颈癌细胞增殖和凋亡的影响,为以 AEG-1 为靶点的宫颈癌基因治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 宫颈癌细胞株 SiHa 购自中国典型培养物保藏中心。DMEM 培养液、胰酶和胎牛血清均购自美国 Gibco 公司;AEG-1 siRNA 和对照 siRNA 均购自美国 Zymed 公司;总 RNA 提取试剂 Trizol、RT-PCR 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;Annexin V 凋亡检测试剂盒购自美国 Biovision

公司。

**1.2 细胞培养、转染及分组** 宫颈癌细胞株 SiHa 细胞复苏后置于含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养液中培养,当细胞传代到细胞状态稳定后,以  $1 \times 10^6$  cells/well 细胞接种于 6 孔培养板,待细胞长至 90% 融合度时,将 AEG-1 siRNA 和对照 siRNA 采用脂质体介导法转染至 SiHa 细胞(操作严格按照说明书进行)。转染后细胞分为 3 组:空白对照组(不作任何处理)、阴性对照组(对照 siRNA 转染)和 AEG-1 siRNA 组(AEG-1 siRNA 转染)。

**1.3 荧光定量 RT-PCR 检测** 收集转染后 48 h 的 3 组宫颈癌 SiHa 细胞,细胞总 RNA 提取采取 Trizol 一步提取法。逆转录成 cDNA。AEG-1 上游引物:5'-GGC AAT TGG GTA GAC GAA GA-3',下游引物:5'-CCT GTT TTC GAC GGG TTT TA-3'。反应条件:95℃ 3 min,95℃ 30 s,60℃ 30 s,40 个循环。用比较阈值法来测定目的基因的相对表达量。

**1.4 细胞生长曲线检测** 收集转染 48 h 后的 3 组宫颈癌 SiHa 细胞,用含 10% FBS 的 DMEM 培养液配成单细胞悬液,以每孔 2 000 个细胞接种于 96 孔培养板,每孔体积 200  $\mu$ L,培养 1 d 后细胞达到 80% 融合度。不同时间点(4、24、48、72 h)倒出细胞培养液,每孔加入含 MTT 溶液(5 g/L)10  $\mu$ L 的新鲜培养

液 100  $\mu\text{L}$ , 继续孵育 4 h, 终止培养, 加入 100  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜 (DMSO), 轻轻振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。酶联免疫检测仪 (490 nm) 上调定各孔吸光度值, 测定结果。以空白对照组调零, 实验重复 3 次。以时间为横轴, 吸光度值为纵轴绘制细胞生长曲线。

**1.5 流式细胞术检测细胞凋亡** 收集转染 48 h 后的 3 组宫颈癌 SiHa 细胞, 用 4  $^{\circ}\text{C}$  预冷的 PBS 漂洗细胞 2 次, 250  $\mu\text{L}$  1 $\times$  binding buffer 重悬细胞制备成单细胞悬液, 调节浓度为  $1\times 10^6$  cells/L。取 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液于流式管中, 加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin-V-FITC 和 10  $\mu\text{L}$  PI, 混匀后室温避光孵育 15 min, 加入 400  $\mu\text{L}$  PBS, 上机检测 (按照试剂盒说明书进行)。

**1.6 细胞周期分析** 收集转染 48 h 后的 3 组宫颈癌 SiHa 细胞, 每组细胞数为  $1\times 10^6$  个。1 000 r/min 离心 5 min, PBS 漂洗细胞 3 次, 4  $^{\circ}\text{C}$  70% 预冷乙醇固定 30 min, 预冷 PBS 漂洗 3 次, 1 000 r/min 离心 5 min, 重悬细胞于含 1 mL PI 的 PBS 溶液中, 避光孵育 30 min 上机检测, 采用 Modifit 软件分析细胞周期。

**1.7 统计学处理** SPSS17.0 软件进行数据统计与分析, 计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示, 各组样本均数比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。检验水准  $\alpha=0.05$ ,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 宫颈癌 SiHa 细胞 AEG-1 mRNA 表达** 采用荧光定量 RT-PCR 检测宫颈癌 SiHa 细胞 AEG-1 mRNA 表达。结果表明: AEG-1 siRNA 组 AEG-1 mRNA 表达明显低于空白对照组和阴性对照组, 差异有统计学意义 ( $P<0.01$ ); 空白对照组和阴性对照组 AEG-1 mRNA 表达差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 见图 1。

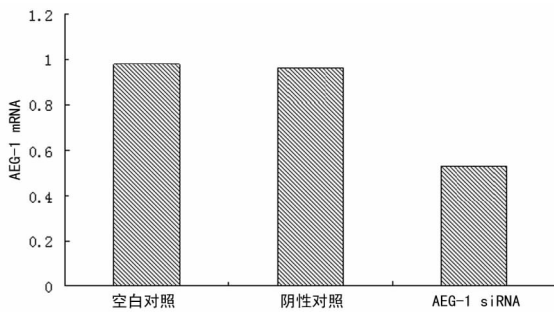


图 1 AEG-1 mRNA 相对表达分析

**2.2 AEG-1 siRNA 对宫颈癌 SiHa 细胞增殖的影响** MTT 法检测细胞生长曲线, 结果显示: AEG-1 siRNA 组 SiHa 细胞增殖较空白对照组和阴性对照组均明显减慢。72 h 时 AEG-1 siRNA 组 SiHa 细胞吸光度值与空白对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。阴性对照组与空白对照组 SiHa 细胞增殖差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 见图 2。

**2.3 AEG-1 siRNA 对宫颈癌 SiHa 细胞凋亡的影响** 流式细胞仪检测宫颈癌 SiHa 细胞凋亡, 结果显示: AEG-1 siRNA 组 SiHa 细胞凋亡率 [(17.4 $\pm$ 4.3)%] 明显高于空白对照组 [(4.5 $\pm$ 1.3)%] 和阴性对照组 [(5.2 $\pm$ 1.8)%], 差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。阴性对照组与空白对照组 SiHa 细胞凋亡率差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 见图 3。

**2.4 AEG-1 siRNA 对宫颈癌 SiHa 细胞周期的影响** 流式细胞术分析 SiHa 细胞周期变化, 结果显示: AEG-1 siRNA 组 SiHa 细胞在 DNA 合成前期 ( $G_0/G_1$  期) 细胞比率 [(59.23 $\pm$ 1.05)%] 明显高于空白对照组 [(42.88 $\pm$ 1.33)%] 和阴性对照组 [(43.13 $\pm$ 0.88)%], 合成期 (S) 细胞比率 [(26.46 $\pm$

0.87)%] 显著低于空白对照组 [(32.59 $\pm$ 1.19)%] 和阴性对照组 [(31.83 $\pm$ 1.11)%], 合成后期 ( $G_2/M$ ) 细胞比率 [(14.30 $\pm$ 0.46)%] 显著低于空白对照组 [(24.53 $\pm$ 0.31)%] 和阴性对照组 [(25.03 $\pm$ 0.68)%], 见图 4。

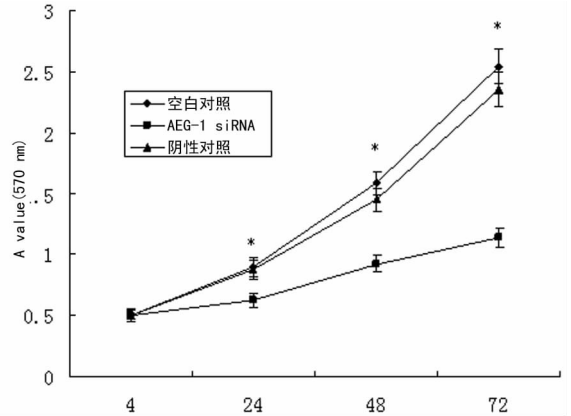


图 2 MTT 法检测 AEG-1 siRNA 对宫颈癌 SiHa 细胞增殖的影响

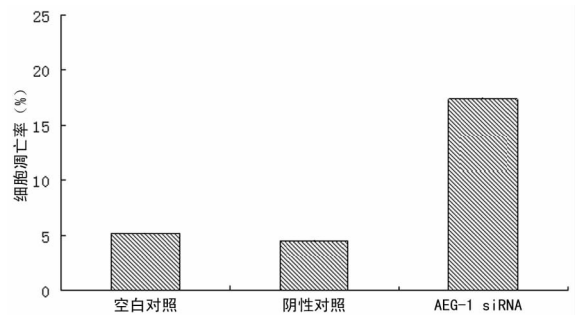


图 3 流式细胞术检测宫颈癌 SiHa 凋亡率

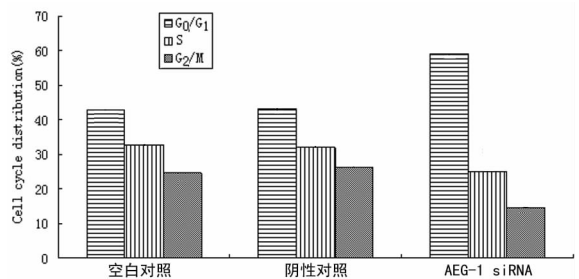


图 4 AEG-1 表达下调对宫颈癌 SiHa 细胞周期的影响

## 3 讨论

宫颈癌是影响女性健康最重要的疾病之一, 在年轻女性中的发病率近年有明显的上升趋势, 日益引起人们的关注和重视。近年来, 通过对癌基因及抑癌基因的深入研究, 宫颈癌的发生、发展及治疗的研究已进入基因水平。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是利用碱基互补原理, 通过导入双链 RNA (double strands RNA, dsRNA) 阻断同源基因的表达促使其 mRNA 降解, 从而诱导该细胞目的基因功能丧失或出现特定基因缺失的表型。RNAi 作为一种新的基因阻断技术, 具有高效、特异、操作简便等优点<sup>[4]</sup>, 是传统基因敲除技术和反义技术所无法比拟的。目前, RNAi 对肿瘤进行基因治疗主要集中在肿瘤发生和肿瘤转移相关基因 (如癌基因、抑癌基因、肿瘤转移相关基因), 以及与肿瘤耐药基因、细胞凋亡、信号转导、有丝分裂有关的基因方面<sup>[5]</sup>。在体外培养细胞及建立的动物模型中, 利用 RNAi 技术治疗肿瘤取得了令人满意的效果。虽然目前 RNAi 技术应用于临床还有一定的距离, 但有理由相信随着对

RNAi 机制的深入研究和 RNAi 技术的不断完善,肿瘤基因治疗的目标终究会实现。

AEG-1 基因最初是在人类免疫缺陷病毒(HIV)-1 感染的人胎儿星形细胞中被鉴定发现的<sup>[6]</sup>。2004~2005 年,多个实验室先后克隆出 AEG-1 cDNA 序列,其全长 3 611 bp,含 11 个内含子和 12 个外显子,位于 8q22,此区域是乳腺癌等多种癌症高度相关地带<sup>[7]</sup>。进一步研究显示,作为肿瘤发生发展过程中的一个关键基因,AEG-1 通过不同的信号转导途径如 PI3K-AKT、NF- $\kappa$ B、MAPK 和 Wnt 等<sup>[8]</sup>,与肿瘤进展的几个关键方面,包括转化、增殖、细胞的存活、逃避细胞凋亡、迁移和侵袭、转移、血管生成及耐药等多种细胞生物学过程密切相关<sup>[9]</sup>。且被证实多种肿瘤组织和体外培养的细胞中过度表达,如舌癌、前列腺癌、神经系统肿瘤、淋巴细胞癌、肝癌、结肠癌、乳腺癌<sup>[10-15]</sup>等。

本实验用 siRNA 下调人宫颈癌细胞株中 AEG-1 基因表达,通过检测 AEG-1 基因下调宫颈癌细胞增殖、凋亡和细胞周期等生物学特性的影响,研究探讨 AEG-1 在宫颈癌发生、发展中的作用。结果显示通过下调 AEG-1 表达,可以显著降低宫颈癌细胞的增殖能力,同时,随着 AEG-1 表达下降,宫颈癌细胞的凋亡率明显增加,说明 AEG-1 在宫颈癌细胞的增殖和凋亡过程中起了重要作用。细胞周期检测结果也提示 AEG-1 表达下调后,更多的细胞阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,处于增殖旺盛期的细胞比例明显减少。研究结果提示 AEG-1 在宫颈癌的发生、发展中可能起了重要作用,而利用 RNA 干扰技术可以下调 AEG-1 的异常高表达,在一定程度上阻滞宫颈癌细胞增殖,促进细胞凋亡,可能为宫颈癌的基因治疗提供新的思路。

#### 参考文献:

[1] Menczer J. Patient-tailored conservative surgical treatment of invasive uterine cervical squamous cell carcinoma [J]. *Minerva Ginecol*, 2013, 65(4): 407-415.

[2] Shibata MA, Shibata E, Morimoto J, et al. Therapy with siRNA for Vegf-c but Not for Vegf-d suppresses wide-spectrum organ metastasis in an immunocompetent xenograft model of metastatic mammary cancer[J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(10): 4237-4247.

[3] Liu B, Wu Y, Peng D. Astrocyte elevated gene-1 regulates osteosarcoma cell invasion and chemoresistance via endothelin-1/endothelin A receptor signaling[J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(2): 505-510.

[4] Amberkar S, Kiani NA, Bartenschlager R, et al. High-throughput RNA interference screens integrative analysis: Towards a comprehensive understanding of the virus-host interplay[J]. *World J Virol*, 2013, 2(2): 18-31.

[5] 田瑞敏, 鄢佳程, 王含彦, 等. RNA 干扰技术在肿瘤基因

治疗中的研究现状[J]. *重庆医学*, 2013, 42(7): 811-814.

[6] Su ZZ, Kang DC, Chen Y, et al. Identification and cloning of human astrocyte genes displaying elevated expression after infection with HIV-1 or exposure to HIV-1 envelope glycoprotein by rapid subtraction hybridization, RaSH [J]. *Oncogene*, 2002, 21(22): 3592-3602.

[7] Dompe N, Rivers CS, Li L, et al. A whole-genome RNAi screen identifies an 8q22 gene cluster that inhibits death receptor-mediated apoptosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(43): E943-951.

[8] Lee SG, Kang DC, DeSalle R, et al. AEG-1/MTDH/LYRIC, the beginning: initial cloning, structure, expression profile, and regulation of expression[J]. *Adv Cancer Res*, 2013(120): 1-38.

[9] Emdad L, Das SK, Dasgupta S, et al. AEG-1/MTDH/LYRIC: signaling pathways, downstream genes, interacting proteins, and regulation of tumor angiogenesis[J]. *Adv Cancer Res*, 2013(120): 75-111.

[10] Ke ZF, He S, Li S, et al. Expression characteristics of astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) in tongue carcinoma and its correlation with poor prognosis[J]. *Cancer Epidemiol*, 2013, 37(2): 179-185.

[11] Erdem H, Yildirim U, Uzunlar AK, et al. Relationship among expression of basic-fibroblast growth factor, MTDH/astrocyte elevated gene-1, adenomatous polyposis coli, matrix metalloproteinase 9, and COX-2 markers with prognostic factors in prostate carcinomas[J]. *Niger J Clin Pract*, 2013, 16(4): 418-423.

[12] Noch EK, Khalili K. The role of AEG-1/MTDH/LYRIC in the pathogenesis of central nervous system disease[J]. *Adv Cancer Res*, 2013(120): 159-192.

[13] Yan J, Zhang M, Chen Q, et al. Expression of AEG-1 in human T-cell lymphoma enhances the risk of progression [J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(6): 2107-2114.

[14] Srivastava J, Siddiq A, Emdad L, et al. Astrocyte elevated gene-1 promotes hepatocarcinogenesis: novel insights from a mouse model[J]. *Hepatology*, 2012, 56(5): 1782-1791.

[15] Zhang F, Yang Q, Meng F, et al. Astrocyte elevated gene-1 interacts with  $\beta$ -catenin and increases migration and invasion of colorectal carcinoma[J]. *Mol Carcinog*, 2013, 52(8): 603-610.

(收稿日期: 2013-11-24 修回日期: 2014-02-22)

(上接第 2138 页)

[7] 石代辉. 联合检测 ADA、CEA、CRP、淀粉酶在鉴别结核性和恶性胸腔积液中的诊断价值[J]. *中国医学创新*, 2013, 10(4): 77-79.

[8] 陈世凤. ADA、LDH 和 CRP 在鉴别诊断恶性胸腔积液中的价值[J]. *中国医药导报*, 2010, 7(25): 20-21.

[9] 廖明凤, 张明霞, 邓群益, 等. 结核病患者血浆和胸水中白介素 6 水平及其临床意义[J]. *临床肺科杂志*, 2010, 15(12): 1117-1118.

[10] 牛俊梅, 张东杰. 结核性脑膜炎脑脊液中白细胞介素-6 水

平及临床意义[J]. *现代预防医学*, 2011, 38(16): 3329-2230.

[11] 侯振江, 侯建章, 周秀艳. ADA、CRP、CEA、CA153 检测对结核性和恶性胸腔积液的鉴别诊断价值[J]. *重庆医学*, 2013, 42(2): 187-189.

[12] 吕鹏, 张良明, 耿冬梅, 等. 联合检测 CEA、IFNOC 及 ADA 在结核性和恶性胸腔积液鉴别诊断中的价值[J]. *滨州医学院学报*, 2011, 34(3): 189-191.

(收稿日期: 2013-10-02 修回日期: 2014-01-27)