

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.05.010

沉默人肺癌 A549 细胞中期因子基因表达对细胞凋亡的影响

孙常铭, 王丽萍, 刘敏, 赵维川, 朴宗方, 张秀琴[△]

(承德医学院附属医院检验科, 河北承德 067000)

摘要:目的 研究 RNA 干扰(RNAi)人肺癌 A549 细胞中期因子(MK)基因表达及对肿瘤细胞凋亡的影响。方法 构建含 MK siRNA 真核表达载体, 将其转染到人肺癌 A549 细胞株中(实验组), 另有阴性对照组(转染阴性对照质粒)和空白对照组。应用 RT-PCR 的方法检测各组细胞中 MK mRNA 的表达情况; 采用 Western blot 法检测 MK 蛋白的表达情况; 用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。结果 实验组 MK 蛋白和 mRNA 表达都下降, 分别下降了 89.3% 和 83.3%。转染实验组 A549 细胞有自发性凋亡的发生, 早期凋亡比阴性对照组和空白组分别提高了 15.5 倍和 9.34 倍。实验组 caspase-3 活性明显高于阴性对照组和空白对照组($P < 0.05$)。结论 RNAi 下调人肺癌 A549 细胞株 MK 的表达, 可诱导肿瘤细胞的自身凋亡。

关键词: RNA 干扰; 细胞凋亡; A549; 中期因子

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2015)05-0608-02

Effects of silencing lung cancer A549 midkine gene expression on cell apoptosis

Sun Changming, Wang Liping, Liu Min, Zhao Weichuan, Piao Zongfang, Zhang Xiuqin[△]

(Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China)

Abstract: Objective To study the effects of midkine(MK) by RNAi on gene expression and apoptosis in A549 cell. **Methods** Construct MK siRNA expression vector, and then was transfected that into A549 cells(positive group, negative group, blank cell group). Expression of MK was determined by RT-PCR and Western blot in each group; apoptosis was evaluated by flow cytometry. **Results** The expression of MK protein declined 89.3% and expression of mRNA declined 83.3% in positive group(positive group). Spontaneous apoptosis was detected in positive group, early apoptosis increased by 15.5 times and 9.34 times than the negative control group and blank group. Activities of caspase-3 was higher than other two groups($P < 0.05$). **Conclusion** RNAi can inhibit expression of MK and induce apoptosis of A549 cells.

Key words: RNA interference; apoptosis; A549; midkine

中期因子(MK)就是与肿瘤发生和发展有密切关系的基因。MK 能调节细胞生长、存活和分化, 并参与肿瘤发病过程^[1-4]。在许多不同类型的肿瘤中表达增强, 包括食管癌、胃癌、结直肠癌、胰腺癌、胆囊癌、肺癌、甲状腺癌、乳腺癌、膀胱癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌和肝癌、神经细胞瘤、恶性胶质瘤、髓系白血病^[5], 阳性表达率 45%~90%, MK 在正常组织中不表达或低表达^[6]。所以, 血清 MK 水平有望成为一个新的肿瘤标志物^[7]。MK 可以促进肿瘤血管的生成, 增强肿瘤的耐药性, 抑制细胞凋亡。到目前为止, MK 基因在肺癌细胞凋亡抑制中的可能作用尚不清楚。本研究采用转录载体 Pgenesil-2.1 靶向构建 MK 的 siRNA 真核表达载体, 转染人肺癌 A549 细胞。采用 RT-PCR、Western blot、流式细胞术的方法, 观察 MK siRNA 对 A549 细胞 mRNA、蛋白的表达和细胞凋亡的影响。从而为肺癌的治疗提供理论基础, 同时为肿瘤的治疗和预后判断提供新的监测指标。

1 材料与方

1.1 细胞与材料 人肺癌细胞株 A549(承德医学院附属医院中心实验室); RT-PCR 试剂盒、T4DNA Ligase、EcoR I 内切酶、Sac I 内切酶、RNAiso 试剂(大连宝生物公司)。含有新霉素 G418 抗性基因和卡那霉素抗性基因的 Pgenesil-2 RNA 干扰质粒载体, -20℃ 保存(武汉晶赛公司); 晶赛通用阴性对照质粒(Pgenesil-2-HK) 其形成的 siRNA 干扰序列为 5'-GAC TTC ATA AGG CGC ATGC-3', 此序列不与任何人类基因序列同源; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(江苏碧云天公司); caspase-3 酶特异性底物 DEVD-para-Nitroanilide 及特

性抑制剂 DEVD-CHO 试剂盒(瑞士 Bachem 公司)。

1.2 方法

1.2.1 MK siRNA 干扰质粒的构建 (1) siRNA 的设计: 根据 GeneBank MK 基因序列(NM001012333), 结合 MK mRNA 的二级结构, 设计了一条特异性的针对 MK 基因 389~407 bp 的 19nt 的 siRNA, 序列为 5'-GTA CAA GTT TGA GAA CTG G-3'。BLAST 分析排除其同源序列。(2) 合成编码 siRNA 的 DNA 序列: 结构 CACC + Sense + Loop + Antisense + 终止信号 + Sac I, MK-2.1-A; 5'-CAC CGT ACA AGT TTG AGA ACT GGT TCA AGA CGC CAG TTC TCA AAC TTG TAC TTT TTT G-3'; MK-2.1-B; 5'-AGC TCA AAA AAG TACA AGT TTG AGA ACT GGC GTC TTG AAC CAG TTC TCA AAC TTG TAC-3'。均由武汉晶赛公司合成。

1.2.2 细胞培养及转染 A549 细胞株在 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养基, 37℃, 5% CO₂, 饱和湿度的条件下培养。以下实验均取对数生长期细胞。选择对数生长期的细胞在 6 孔板中接种 1.0×10⁶ 个/孔 A549 细胞, 培养 24 h, 待细胞密度为 80%~90% 左右, 用于第 2 天转染。细胞分组, (1) 转染 MK siRNA 的实验组: 10% 胎牛血清 RPMI 1640 中含有 MK siRNA 干扰质粒, 400 μg/mL 的 G418 浓度持续筛选 2~3 周, 其间每 2~3 天换 1 次含 G418 的培养液, 同时转入培养瓶中扩大阳性克隆; (2) 阴性对照组: 转染阴性对照质粒; (3) 空白对照组: 未转染的 A549 细胞。

1.2.3 RT-PCR 检测 MK mRNA 的表达水平 MK 上游引物: 5'-GCT ACA ATG CTC AGT GCC AGG A-3'; MK 下游

引物:5'-AAG GCA CTG GTG GGT CAC ATC-3'。以 GAPDH 基因为参照基因,GAPDH 上游引物:5'-ACCACAGTC-CATGCCATCAC-3';下游引物:5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'。

1.2.4 MK 蛋白表达水平检测 分别收获实验组、阴性对照组和空白对照组细胞,离心收集细胞,PBS 洗涤,弃上清液,重新悬浮细胞,加入 4×蛋白提取液,蛋白定量后,以 β-actin 作为内参,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测。

1.2.5 MK siRNA 转染对 A549 细胞凋亡的影响 流式细胞仪进行细胞凋亡检测(Annexin V-FITC 和 PI 双染法),分别检测 3 组细胞的早期凋亡情况。

1.2.6 caspase-3 检测 在酶标仪上分别测定 405 nm 时各细胞的吸光度(OD),每组细胞重复测定 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS14.0 软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较行单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 3 组细胞中 MK mRNA 的表达水平 结果以 MK 平均光密度值/GAPDH 平均光密度值表示。实验组(0.05±0.03)分别与阴性对照组(0.29±0.01)和空白对照组(0.30±0.01)比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。而阴性对

照组与空白对照组差异无统计学意义($P>0.05$)。实验组 MK 的 mRNA 表达相对于空白对照组下降了 83.3%。

2.2 Western blot 检测 3 组细胞的 MK 蛋白表达水平 空白对照组(0.28±0.01)与阴性对照组(0.27±0.01)MK 蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。实验组(0.03±0.01)分别与阴性对照组和空白对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。实验组 MK 蛋白的表达是空白对照组的 0.107 倍。即实验组的 MK 蛋白表达相对于空白对照组下降了 89.3%。见图 1。

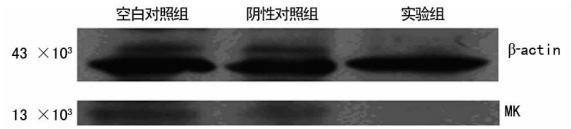


图 1 3 组细胞的蛋白表达结果

2.3 流式细胞仪进行细胞凋亡检测(Annexin V-FITC 和 PI 双染法) 如图 2 显示,在双变量流式细胞仪的散点图上,正常的活细胞位于左下象限,早期凋亡细胞位于右下象限,而坏死细胞和晚期凋亡细胞位于右上象限。实验组 A549 细胞凋亡比阴性细胞早期凋亡高 15.5 倍。比空白组细胞早期凋亡高 9.34 倍。实验组出现了自发凋亡现象,具有较高的早期凋亡率。



A:空白对照组;B:阴性对照组;C:实验组。

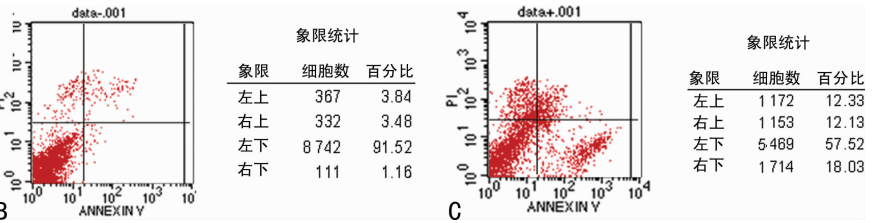


图 2 3 组细胞细胞凋亡水平的变化

2.4 caspase-3 活性检测 实验组(0.308±0.008) caspase-3 活性明显高于阴性对照组(0.054±0.002)和空白对照组(0.055±0.001),而阴性对照组和空白对照组的 caspase-3 活性差异无统计学意义($P=0.196$)。

3 讨论

肺癌细胞的凋亡抑制可以使肿瘤细胞对机体产生较大的影响,使肿瘤在体内大量聚集,引起肿瘤患者出现各类相关临床症状和临床表现。因此从分子水平探讨肺癌细胞的凋亡,对肺癌的治疗有着非常重要的意义。

在肿瘤的各种治疗方法中,以 RNAi 为主要技术手段的基因治疗已经得到广泛的关注。RNAi 是近年来发现的一种调节 mRNA 的生物学技术,能够使基因的 mRNA 被相应的双链 RNA 分子敲除,达到基因沉默的目的,其效果要强于正义和反义 RNA^[8]。RNAi 最主要的功能在于可以调节和关闭基因的表达,进而调控细胞的各种高级生命活动。这种现象属于转录后的基因沉默机制。而 siRNA 是指 RNAi 过程中在细胞内产生的长 21~25 个核苷酸的小双链 RNA 分子,是 RNAi 作用机制的重要中间效应分子。目前已经有人工合成的 siRNA,具有明显的敲除相应基因 mRNA 的效果^[8]。

本研究中构建了 siRNA 真核表达载体,其转录产物可在体内形成一个 9 个碱基组成的茎环分离的具有反向重复序列的发夹样 RNA(shRNA),此 shRNA 被真核细胞内的核酸酶切割成 siRNA,进而降解目的基因 mRNA 的表达。这种方法克服了人工合成的 siRNA 成本高、需要直接操作 RNA 以及

siRNA 在体内作用时间短等缺点^[9]。本研究针对 MK 基因序列,设计合成了 siRNA 通过转染技术,将 MK siRNA 转染入人 A549 细胞中,分别采用了 RT-PCR 和 Western blot 法检测 MK mRNA 和蛋白的表达。发现转染人 MK siRNA 的细胞 MK mRNA 和蛋白表达水平明显下降,说明转染成功。

接着,本研究观察了 MK siRNA 转染对 A549 细胞凋亡的影响。MK 基因的表达与多种肿瘤细胞凋亡呈正相关,MK 表达上升或下降后细胞凋亡随之增强或减弱^[10-11]。通过流式细胞仪检测 3 组细胞的细胞凋亡情况,可以清楚地看出,转染 MK siRNA 的 A549 细胞凋亡率明显增加,提示 MK 基因在 A549 细胞中对细胞凋亡有着重要的作用。实验组细胞 caspase-3 活性明显高于阴性对照组和空白对照组,提示中期因子可能参与抑制细胞 caspase-3 活性来抑制 A549 细胞的凋亡。结果显示:MK 基因表达的下调可以增加 A549 肿瘤细胞的早期凋亡,为肺癌的治疗提供实验基础。

由于 MK 在基因水平和蛋白水平表达的下调,可以预见其在血浆中的水平也会相应降低,所以 MK 可以作为一个新的肿瘤标志物应用于临床诊断和预后判断。

参考文献:

[1] Wilson JF. Liver cancer on the rise[J]. Ann Intern Med, 2009,142:1029-1032.
 [2] 张曙光,张林. Midkine 基因在肿瘤治疗中的研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2011,19(8):1681-1682. (下转第 612 页)

行 SWE 检查,并应用所得到界值对 TI-RADS 4 级结节进行进一步判定,从而探讨整体的结节的弹性成像界值是否可应用于 TI-RADS 4 级结节中。

本研究得到的界值 E_1 为 48.55 kPa,将它应用到诊断 TI-RADS 4 级结节,敏感性、特异性为 75.0%,77.7%,与使用 E_2 界值对 TI-RADS 4 级结节进行判定的敏感性、特异性差异无统计学意义($P>0.05$)。这说明超声表现在一定程度上对甲状腺结节的剪切波弹性成像应用没有影响。且以往的全部甲状腺结节确定的界值亦可适用于 TI-RADS 4 级结节。

但剪切波反应的是组织的硬度信息,存在一定的误诊率^[12]。若良性结节发生钙化、纤维化等,造成硬度升高,可误认为恶性病变^[13];而恶性结节发生囊性变等,造成硬度减低,易误认为是良性病变。故在诊断甲状腺结节良恶性时,尚需联合常规超声对结节进行判定^[14]。

本研究探讨了整体甲状腺结节的 SWE 界值亦可应用于 TI-RADS 4 级结节。且二者 ROC 曲线下面积均较高,说明剪切波诊断甲状腺结节良恶性的优势。说明剪切波可在常规超声的基础上进一步提高对 TI-RADS 4 级的诊断准确率。

参考文献:

- [1] Park AY, Son EJ, Han K, et al. Shear wave elastography of thyroid nodules for the prediction of malignancy in a large scale study[J]. *Eur J Radiol*, 2014, 30(11):912-915.
- [2] Liu B, Liang J, Zheng Y, et al. Two-dimensional shear wave elastography as promising diagnostic tool for predicting malignant thyroid nodules: a prospective single-centre experience[J]. *Eur Radiol*, 2014, 30(9):717-719.
- [3] Szczepanek-Parulska E, Wolinski K, Stangierski A, et al. Comparison of diagnostic value of conventional ultrasonography and shear wave elastography in the prediction of thyroid lesions malignancy[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e81532.
- [4] Magri F, Chytiris S, Capelli V, et al. Shear wave elastography in the diagnosis of thyroid nodules: feasibility in the case of coexistent chronic autoimmune Hashimoto's thyroiditis[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2012, 76(1):137-141.
- [5] Russ G, Royer B, Bigorgne C, et al. Prospective evaluation of thyroid imaging reporting and data system on 4550 nodules with and without elastography[J]. *Eur Endocri-*

nol, 2013, 168(5):649-655.

- [6] Yoon JH, Jung HK, Lee JT, et al. Shear-wave elastography in the diagnosis of solid breast masses: what leads to false-negative or false-positive results [J]. *Eur Radiol*, 2013, 23(9):2432-2440.
- [7] Horvath E, Majlis S, Rossi R, et al. An ultrasonogram reporting system for thyroid nodules stratifying cancer risk for clinical management [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(5):1748-1751.
- [8] Ma BY, Parajuly SS, Ying SX, et al. Application of shear wave elastography in fine needle aspiration biopsy for thyroid nodule [J]. *J Pak Med Assoc*, 2014, 64(8):954-957.
- [9] Wolinski K, Szczepanek-Parulska E, Stangierski A, et al. How to select nodules for fine-needle aspiration biopsy in multinodular goitre. Role of conventional ultrasonography and shear wave elastography—a preliminary study [J]. *Endokrynol Pol*, 2014, 65(2):114-118.
- [10] Moon HJ, Kwak JY, Kim EK, et al. A taller-than-wide shape in thyroid nodules in transverse and longitudinal ultrasonographic planes and the prediction of malignancy [J]. *Thyroid*, 2011, 21(11):1249-1253.
- [11] Kim JK, Baek JH, Lee JH, et al. Ultrasound elastography for thyroid nodules: a reliable study [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2012, 38(9):1508-1513.
- [12] Rago T, Santini F, Scutari M, et al. Elastography: new developments in ultrasound for predicting malignancy in thyroid nodules [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(8):2917-2922.
- [13] 武敬平, 王瑛, 赵玉珍. 甲状腺占位性病变剪切波速度与组织纤维化评分之间的相关性研究 [J]. *中华超声影像学杂志*, 2013, 22(6):492-495.
- [14] Jin ZQ, Lin MY, Hu WH, et al. Gray-scale ultrasonography combined with elastography imaging for the evaluation of papillary thyroid microcarcinoma: as a prognostic clinicopathology factor [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2014, 40(8):1769-1777.

(收稿日期:2014-10-15 修回日期:2014-12-20)

(上接第 609 页)

- [3] Ye C, Qi M, Fan QW, et al. Expression of midkine in the early stage of carcinogenesis in human colorectal cancer [J]. *Br J Cancer*, 1999, 79(1):179-184.
- [4] Koide N, Hada H, Shinji T, et al. Expression of the midkine gene in human hepatocellular carcinomas [J]. *Hepato-gastroenterology*, 2000, 46(30):3189-3196.
- [5] Kato H, Watanabe K, Murari M, et al. Midkine expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease [J]. *Leuk Lymphoma*, 2000, 37(3/4):415-424.
- [6] 栾兆吉, 褚兰艳. 中期因子在肺癌中的研究进展 [J]. *国际呼吸杂志*, 2010, 30(4):229-233.
- [7] 蓝美锐, 陈礼刚, 李涛. 中期因子与肿瘤的联系 [J]. *吉林医学*, 2013, 34(3):533-534.
- [8] Green DW, Roh H, Pippin J, et al. Antisense oligonucle-

otides: an evolving technology for the modulation of gene expression in human disease [J]. *J Am Coll Surg*, 2000, 191(1):93-105.

- [9] Kitabwalla M, Ruprecht RM. RNA interference—a new weapon against HIV and beyond [J]. *N Engl J Med*, 2002, 347(17):1364-1367.
- [10] Tong Y, Mentlein R, Buhl R, et al. Overexpression of midkine contributes to anti-apoptotic effects in human meningiomas [J]. *J Neurochem*, 2007, 100(4):1097-1107.
- [11] Takei Y, Kadomatsu K, Goto T, et al. Combinational anti-tumor effect of siRNA against midkine and paclitaxel on growth of human prostate cancer xenografts [J]. *Cancer*, 2006, 107(4):864-873.

(收稿日期:2014-10-26 修回日期:2014-12-16)