

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.04.009

RNA 沉默 HMG5 基因对肺癌 A549 细胞增殖的影响及意义

林 韬¹, 王 红², 李利坤³, 刘爱军², 赵永生⁴, 刘 悦⁵, 王志强¹, 李兴海⁶

(1. 唐山市人民医院胸外科, 河北唐山 063001; 2. 唐山市中心血站外采科, 河北唐山 063000;

3. 唐山市协和医院病理科, 河北唐山 063009; 4. 唐山市人民医院儿科, 河北唐山 063001;

5. 开滦总医院心内科, 河北唐山 063000; 6. 唐山市人民医院普外科, 河北唐山 063000)

[摘要] **目的** 通过 RNA 干扰技术(RNAi)沉默 HMG5 基因,探讨其对肺癌 A549 细胞增殖的影响。**方法** 培养人肺癌 A549 细胞株, HMG5 基因合成慢病毒载体感染 A549 细胞, RT-PCR 和 Western blot 检测 A549 细胞中 HMG5 沉默率; 设阴性对照组及 RNA 干扰组, MTT 法检测 A549 细胞的增殖能力; Brdu 法检测沉默 HMG5 的表达; 流式细胞仪检测其细胞周期。**结果** 与对照组比较, RNA 干扰组 HMG5 基因的 mRNA 及蛋白表达均降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); A549 细胞的增殖能力明显下降, 两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 细胞增殖率为 29.70%, 较对照组降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); G₁ 期细胞为 53.50±0.30, 高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 采用 RNAi 能够沉默 HMG5 基因, 人肺癌 A549 细胞增殖能力显著降低, HMG5 基因可能参与肺癌的发生、发展、增殖过程。

[关键词] RNA; HMG5; A549 细胞**[中图分类号]** R392.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)04-0457-03**Impact of RNA silencing HMG5 gene on proliferation of lung cancer A549 cells and its significance**Lin Tao¹, Wang Hong², Li Likun³, Liu Aijun², Zhao Yongsheng⁴, Liu Yue⁵, Wang Zhiqiang¹, Li Xinghai⁶

(1. Department of Thoracic Surgery, Tangshan Municipal People's Hospital, Tangshan, Hebei 063001, China;

2. Department of Outside Collection, Tangshan Municipal Blood Center, Tangshan, Hebei 063000, China;

3. Department of Pathology, Tangshan Union Medical College Hospital, Tangshan, Hebei 063009, China;

4. Department of Pediatrics, Tangshan Municipal People's Hospital, Tangshan, Hebei 063001, China;

5. Department of Cardiology, Kailuan General Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China;

6. Department of General Surgery, Tangshan Municipal People's Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China)

[Abstract] **Objective** To study the impact of silencing HMG5 gene by RNA interference on the proliferation of lung cancer A549 cells. **Methods** Human lung cancer cell line A549 was cultured. The lentiviral vector was synthesized by HMG5 gene for infecting A549 cells. Real-time PCR and Western blot were adopted to detect the HMG5 silence rate in human lung cancer A549 cells; the negative control group and the RNA interference group were set, the proliferation ability of A549 cells was detected by the MTT method; the cell cycle was detected by the flow cytometry. **Results** Compared with the control group, mRNA and protein expression of HMG5 gene in the RNA interference group was reduced, the differences were statistically significant ($P < 0.05$); the MTT assay found that the proliferation ability of A549 cells in the RNA interference group was significantly decreased, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); the cell proliferation rate in the RNA interference group was 29.70%, which was decreased compared with the control group, the difference between the two groups was statistically significant ($P < 0.05$); the G₁ phase cell percentage in the RNA interference group was 53.50±0.30, which was significantly higher than that in the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Adopting the RNA interference technology can silence HMG5 gene, which significantly decreases the proliferation ability of human lung cancer A549 cells, HMG5 gene may be involved in the development, progress and proliferation process of lung cancer.

[Key words] RNA; HMG5; A549 cells

肺癌是当今世界最常见的恶性肿瘤,是因癌症死亡的主要原因之一,探索新的治疗成为新的挑战,基因干扰技术是目前可积极研究的全新领域。HMG5 能够结合 DNA 和蛋白质,最早发现于骨髓间充质干细胞,属于高迁移率蛋白家族(high mobility group)^[1]。现已发现, HMG5 基因与肺癌、脂肪瘤等多种类型的肿瘤发生、发展有一定的相关性^[2]。本试验通过创建 HMG5 基因病毒载体,感染人肺癌 A549 细胞,利用 RNA 干扰技术(RNAi)沉默 HMG5 基因,探讨 HMG5 基因对 A549 细胞增殖的影响。

1 材料与方

1.1 材料 人肺癌 A549 细胞株; 购自上海细胞研究所; DMEM、胎牛血清、限制性内切酶、DNA 连接酶、质粒 DNA 试剂盒、PCR 试剂盒, 购自大连绿竹生物科技公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 DMEM 培养基中加入胎牛血清, 保持温度 37℃, 含有 95% 的空气及 5% 的 CO₂, 培养人肺癌 A549 细胞株。

1.2.2 慢病毒感染人肺癌 A549 细胞株 将培养好的人肺癌

A549 细胞株加入 96 孔板中,置于温度 37 °C、含有 95% 的空气及 5% 的 CO₂ 的培养箱中孵育 24 h 后,置于无血清培养基中培养 24 h。HMGN5 基因与慢病毒质粒连接,重组载体与慢病毒质粒包装,感染孵育好的 A549 细胞。72 h 后,显微镜明视野及荧光视野下观察、计数、拍照,计算荧光蛋白表达率。

1.2.3 RT-PCR 及 Western blot 检测 HMGN5 表达 将试验分为 3 组,单纯 A549 细胞组(对照组)、转染空载体细胞组(空载体组)、转染 HMGN5 干扰 RNA 组(RNA 干扰组),提取 RNA 用 RT-PCR 检测 HMGN5 mRNA 表达,提取蛋白用 Western blot 检测 HMGN5 蛋白表达。沉默效率(%)=(1-HMGN5 相对表达量)×100%^[3]。

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖活性 将细胞株进行常规培养后,缓慢加入 96 孔板中,在第 1~5 天,分别向细胞中加入 MTT 溶液,每孔 10 μL,设置温度为 37 °C,无菌状态下培养 4 h 后,吸出液体,加二甲亚砜,检测吸光度(OD),波长为 490 nm,并绘制生长曲线。

1.2.5 BrdU 细胞增殖实验 培养 RNA 干扰组的 A549 细胞,分为 24、48 h,用 BrdU 细胞增殖试剂盒检测细胞增殖率,细胞增值率=(A48 h-A24 h)/A24 h。

1.2.6 流式细胞术检测 A549 细胞周期 对 RNA 干扰组的 A549 细胞进行消化,变为单个细胞,经过洗涤、离心,用流式细胞仪检测细胞周期。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒载体感染人肺癌 A549 细胞株 HMGN5 基因与慢病毒质粒形成重组载体并包装后感染人肺癌 A549 细胞,48 h 后进行检测,发现慢病毒载体在人肺癌 A549 细胞中感染率达 90% 以上,见图 1。

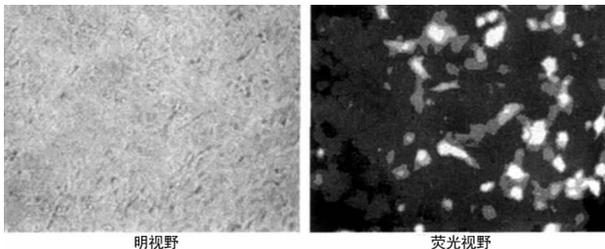


图 1 慢病毒感染人肺癌 A549 细胞(×100)

2.2 RT-PCR 和 West blot 法检测 HMGN5 基因表达 RNA 干扰组 HMGN5 基因的 mRNA 表达量为 0.35 ± 0.10 ,沉默效率为 42.70%;对照组 HMGN5 基因的 mRNA 表达量为 1.13 ± 0.20 ,沉默效率为 68.70%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Western blot 检测发现,RNA 干扰组 HMGN5 蛋白的表达明显降低,见图 2、表 1。

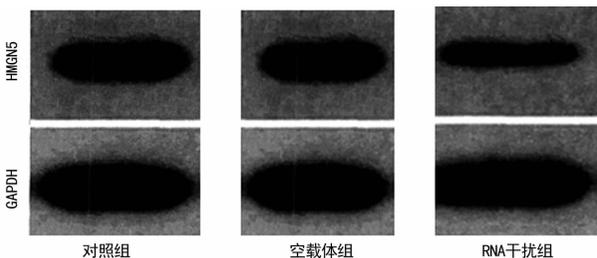


图 2 Western blot 检测 HMGN5 基因沉默

2.3 MTT 法检测人肺癌 A549 细胞增殖 利用 RNA 干扰技术沉默 HMGN5 基因后,采用 MTT 法进行检测发现,RNA 干扰组的人肺癌 A549 细胞在第 3、4、5 天增殖能力明显下降,与空载体组及对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。

表 1 Real-time PCR 检测 HMGN5 基因表达

组别	HMGN5 mRNA($\bar{x} \pm s$)	沉默效率(%)
对照组	1.13±0.20	68.70
空载体组	1.08±0.10	65.90
RNA 干扰组	0.35±0.10	42.70

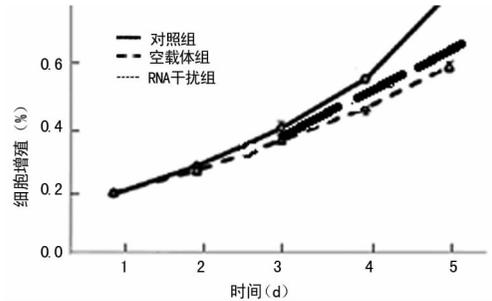


图 3 MTT 法检测人肺癌 A549 细胞增殖

2.4 BrdU 细胞增殖实验 RNA 沉默 HMGN5 基因后,A549 细胞的增殖能力明显下降。采用 RNA 干扰技术沉默 HMGN5 基因,RNA 干扰组的细胞增殖率为 29.70%,明显下降,与空载体组及对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 流式细胞术检测人肺癌 A549 细胞周期 RNA 干扰技术沉默 HMGN5 基因, RNA 干扰组 G₁ 期为 53.50 ± 0.30 ,S 期为 18.10 ± 0.20 ,G₂/M 期为 27.50 ± 0.40 ,与空载体组及对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 4。

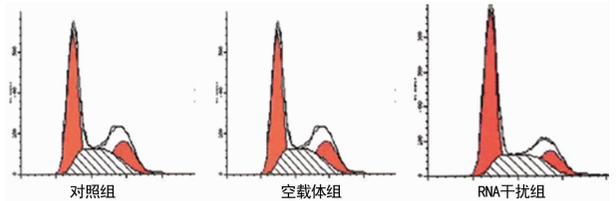


图 4 流式细胞术检测人肺癌 A549 细胞周期

3 讨论

目前,肺癌的发病率逐年上升,成为世界上最常见的恶性肿瘤,非小细胞肺癌所占比例高达 80% 以上,但其 5 年生存率却很低,仅为 15%,原有的临床治疗方式并不能更大程度的提高生存率,寻求全新的治疗方式成为新的挑战^[4-5]。

RNA 干扰技术,是近年来发现的一种古老的在生物体内普遍存在的生物学现象,是将与 mRNA 序列相对应的 RNA 组成的双链 RNA 导入到靶细胞内,降解细胞内特异性 mRNA,导致基因沉默^[6]。RNAi 已广泛应用于基因功能、肿瘤治疗、信号转导等多个领域^[7]。由于其具有高效、简单的特点,能够选择性抑制靶基因的表达,国内外研究者进行了多项研究,包括选择性抑制肺癌相关的癌基因、抑癌基因等,达到基因治疗肺癌的目的,此技术已经成为分子生物学策略的常用技术之一,前景十分广阔^[8-9]。

慢病毒是反转录病毒的总称,慢病毒载体属于重组反转录病毒载体,生物安全性高,外源基因表达效率高。慢病毒载体介导 RNAi,能结合慢病毒载体整合与 RNAi 抑制基因表达的特性。本试验中针对 HMGN5 基因构建了的 shRNA 表达载

体,获得了沉默 HMG5 基因有效的 siRNA 序列。

真核生物的基因表达调控能够在特定的细胞、特定的时间、激活特定的基因,实现分化发育过程,行使不同的功能。转录起始水平的调控与染色质/DNA 水平为基因表达的最为复杂和重要的环节,HMG 蛋白在此过程中起着非常重要的作用。HMG 蛋白因结合染色质从而促进打开染色质的高级结构,进而增加了基因的转录功能,参与肿瘤的转移和扩散。

HMG5 是核小体结合蛋白基因,于 2002 年被发现,与 NSBP1 高度同源。HMG5 在机体内广泛表达,但在组织和细胞中表达水平差异显著,研究表明,HMG5 蛋白在小鼠脑下垂体和小鼠 AIT120 细胞株中表达较高^[10]。研究表明,HMG5 在胎儿大脑及肺中没有表达,而在成人肾、肝、小梁骨成纤维母细胞、胰腺、骨髓基质细胞中均有表达,但表达水平有显著差异^[11-12]。HMG5 蛋白在胚胎发育过程,其表达会发生变化,在成年组织中表达较高,与核小体结合会改变染色体的结构。HMG5 介导染色体的机制可能是通过其长链末端组蛋白 H1 连接,直接展开染色体。HMG5 较其他的 HMG 蛋白更有优势,更有效展开染色体高度有序结构,更好地调节染色体的纤维结构。HMG5 能够维持细胞内染色质纤维的完整性,但导致其表达出现异常会对细胞产生损害,这表明 HMG5 可能与肿瘤的发生、发展有一定的相关性^[13-14]。

目前,有研究表明 HMG5 在肺癌等恶性肿瘤的发生、发展过程中具有重要的作用^[15-16]。本试验研究通过 siRNA-HMG5 慢病毒载体对人肺癌 A549 细胞增殖的影响,研究发现 RNA 干扰组在第 3、4、5 天肺癌 A549 细胞的增殖能力明显下降,细胞增殖率显著降低,这表明沉默 HMG5 基因能够导致人肺癌 A549 细胞的增殖降低,其对肺癌细胞的增殖有一定的影响。采用流式细胞术检测人肺癌 A549 细胞周期,结果表明,沉默 HMG5 基因能够将人肺癌 A549 细胞阻滞于 G₀/G₁ 期,细胞分裂明显减缓。在已有的研究报道中,不少研究者发现了与本试验相近的结果。周利群等通过实验发现,抑制 HMG5 基因后,能够抑制肺癌 LRNAI(-)aP 细胞系生长,降低其细胞活性,减少 G₂/M+S 期细胞数量。刘全等^[17]用半定量 RT-PCR 法发现,HMG5 基因在正常肺组织、肺癌细胞、组织中均表达,正常肺组织中的表达明显低于肺癌组织,提示 HMG5 基因可能参与了肺癌的发生、发展过程。陈鹏等^[18]用 mRNA 差异显示技术对正常肺组织及肺癌组织中 HMG5 进行检测,获得二者的差异片段,发现在两种组织间基因表达存在明显差异。

本研究通过采用 RNAi,沉默 HMG5 基因,发现人肺癌 A549 细胞增殖能力及增殖率显著降低,细胞阻滞于 G₀/G₁ 期,细胞分裂明显减缓,这提示,HMG5 基因可能参与肺癌的发生、发展、增殖、转移过程,针对 HMG5 基因制定新的治疗方法,可能为肺癌的基因靶向治疗提供新的理论依据。

参考文献

[1] King LM, Francomano CA. Characterization of a human gene encoding nucleosomal binding protein NSBP1 [J]. *Genomics*, 2011, 71(2): 163-173.

[2] 姚鲲, 周利群, 李学松, 等. 核小体结合蛋白 1 在膀胱癌中的表达和意义[J/OL]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2010, 4(1): 43-46.

[3] 陈鹏, 马忠森, 王秀丽, 等. 人 HMG5 基因 shRNA 慢病

毒载体构建与 RNAi 效率的鉴定[J]. *中国实验诊断学*, 2011, 15(1): 7-10.

- [4] 许小琴. 生活方式因素、NOD2 免疫炎症通路相关基因多态性及相应 miRNA 与肺癌关系的流行病学研究[D]. 福州: 福建医科大学, 2013.
- [5] 杜兴华. ALX4 基因甲基化及其在肺癌发生中的作用研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2013.
- [6] Lim JY, Yoon SO, Seol SY, et al. Overexpression of miR-196b and HOXA10 characterize a poor-prognosis gastric cancer subtype[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(41): 7078-7088.
- [7] Tong Q. Degradable PRGD/PDLLA/ β -TCP/NGF composites promote differentiation and regulate gene expression in rat pheochromocytoma cells[J]. *Chin Sci Bull*, 2013 (24): 2979-2983.
- [8] 王燕. 抑癌蛋白 Vitamin D3 up-regulated protein 1 在肺癌中的表达及其意义[D]. 广州: 南方医科大学, 2011.
- [9] 周永春. 转录因子 Sox4 在云南宣威女性肺癌中的表达及作用机制研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2013.
- [10] Singh A, Hodgson N, Yan M, et al. Screening Helicobacter pylori genes induced during infection of mouse stomachs[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(32): 4323-4334.
- [11] Wu Z, Ni D, Yan Y, et al. Expression of angiotensin II receptors in aldosterone-producing adenoma of the adrenal gland and their clinical significance[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2010, 30(4): 486-489.
- [12] Zhou C, Wang Q, Zeng M, et al. The expressions of P53, MDM2 in trophoblasts of spontaneous abortion mouse model and the relevant researches[J]. *Engineering*, 2013, 5(10B): 371-375.
- [13] Kivela AJ, Parkkila S, Saarnio J, et al. Expression of von Hippel-Lindau tumor suppressor and tumor-associated carbonic anhydrases IX and XIII in normal and neoplastic colorectal mucosa[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(17): 2616-2625.
- [14] Fu DK, Zhang Y, Yu ZN. Cloning and expression analysis of a ubiquitin gene Ub(L40) in the haemocytes of *Crasostrea hongkongensis* under bacterial challenge[J]. *Chin J Oceanol Limnol*, 2011, 29(1): 80-86.
- [15] Lee MW, Kim DS, Min NY, et al. Akt1 inhibition by RNA interference sensitizes human non-small cell lung cancer cells to cisplatin[J]. *Int J Cancer*, 2008, 122(10): 2380-2384.
- [16] Chetty C, Lakka SS, Bhoopathi P, et al. MMP-2 alters VEGF expression via α V β 3 integrin-mediated PI3K/AKT signaling in A549 lung cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(5): 1081-1095.
- [17] 刘全, 王建军, 潘永成, 等. 自噬相关基因 Beclin1 和 MAPLC3 在肺癌组织中的表达及其意义[J]. *癌症*, 2008, 27(1): 25-29.
- [18] 陈鹏. 肺癌组织中 HMG5 基因的表达及其在肺癌发病中作用机制的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2011.