

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.15.002

靶向 Cyclin D1 基因 RNA 干扰对肝癌细胞增殖和 Mdm2 等基因表达影响的研究*

张弘英¹, 胡树根², 胡利琳³, 丁浩^{1△}

(1. 南昌大学第二附属医院消化内科, 南昌 330006; 2. 江西省南昌市新建区人民医院 330100; 3. 南昌大学医学院, 南昌 330006)

[摘要] **目的** 探讨 Cyclin D1 表达下调对 Mdm2 等基因表达及人肝癌细胞增殖的影响。**方法** 用脂质体将 Cyclin D1-siRNA 转染人肝癌细胞株 Hep3B 细胞。实验分为空白对照组、阴性对照 siRNA 组、Cyclin D1-siRNA 组。采用 RT-PCR 和 Western blot 检测 Cyclin D1、Mdm2、Mdm4、P53 和 P21 表达, 流式细胞仪检测细胞周期, MTT 检测细胞活力, TUNEL 检测细胞凋亡。**结果** 与空白对照组和阴性对照 siRNA 组相比, Cyclin D1-siRNA 组 P53 和 P21 表达上调 ($P < 0.05$), Cyclin D1、Mdm2 和 Mdm4 表达下调 ($P < 0.01$); 3 组细胞周期 G₁、S 及 G₂ 期均无明显差异 ($P > 0.05$); Cyclin D1-siRNA 组较其他两组细胞活力明显减弱 ($P < 0.01$), 细胞凋亡明显增强 ($P < 0.01$)。**结论** Cyclin D1 表达下调能抑制 Mdm2 和 Mdm4 的表达, 并能上调 P53 和 P21 的表达; Cyclin D1 表达下调能抑制肝癌细胞的增殖并促进其凋亡。

[关键词] 细胞周期蛋白 D1; RNA 干扰; Hep3B 细胞; 细胞增殖; Mdm2**[中图分类号]** R363**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)15-1981-05

Effects of RNA interference of targeting Cyclin D1 gene on hepatoma cell proliferation and Mdm2 gene expression*

ZHANG Hongying¹, HU Shugen², HU Lilin³, DING Hao^{1△}

(1. Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 2. Xinjian District People's Hospital Nanchang, Jiangxi 330100, China; 3. Medical School of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of down-regulating Cyclin D1 expression on Mdm2 gene expression and proliferation of human hepatoma cells. **Methods** Cyclin D1-siRNA was transfected into the human hepatoma cell line Hep3B s with liposome. The experiment was divided into the blank control group, negative control siRNA (NC-siRNA) group and Cyclin D1-siRNA group. RT - PCR and Western blot were used to detect the expressions of Cyclin D1, Mdm2, Mdm4, P53 and P21. The cell cycle was measured by flow cytometer; the cellular activity was tested with MTT; the cell apoptosis was examined by TUNEL. **Results** Compared with the blank control group and NC-siRNA group, the expressions of P53 and P21 in the Cyclin D1-siRNA group were increased ($P < 0.05$), while the expressions of Cyclin D1, Mdm2 and Mdm4 were decreased ($P < 0.01$); there were no significant differences in the G₁, S and G₂ phases among 3 groups ($P > 0.05$); the cell vitality in the in the Cyclin D1-siRNA group was significantly weakened compared with the other two groups ($P < 0.01$), while the cell apoptosis was significantly enhanced ($P < 0.01$). **Conclusion** The down-regulation of Cyclin D1 gene expression could inhibit the expressions of Mdm2 and Mdm4, and up-regulates the expressions of P53 and P21. Down-regulating Cyclin D1 expression can inhibit the proliferation of liver cancer cells and promotes their apoptosis.

[Key words] Cyclin D1; RNA interference; Hep3B cells; cell proliferation; Mdm2

细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 是调控细胞周期 G₁ 期的关键蛋白之一, 已被证明与包括肝癌在内的多种恶性肿瘤的发生、发展相关^[1]。Mdm2 和 Mdm4 在许多肿瘤中都存在着过度表达的现象^[2]。肝细胞

癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 因其恶性程度较高, 预后差, 被称为“癌中之王”^[3], 其在我国发病率和病死率均较高^[4], 然而针对 HCC 的治疗方法均不是很理想。本文研究靶向 Cyclin D1 基因 RNA 干扰对

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81300348); 江西省自然科学基金资助项目 (20151BAB205100)。 作者简介: 张弘英 (1963—), 副主任医师, 本科, 主要从事肝病的研究。 △ 通信作者, E-mail: efydinghao@163.com。

肝癌细胞增殖和 Mdm2、Mdm4、P53 和 P21 基因表达的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料 人肝癌细胞株 Hep3B 由本 研究 组 保 存；培 养 基 MEM 和 胎 牛 血 清 (美 国 Gibco)；Cyclin D1-siRNA 和 NC-siRNA (上海吉凯)，Cyclin D1-siRNA 序 列 的 抑 制 效 果 在 本 研 究 组 以 往 实 验 中 得 到 了 证 实；Trizol 及 脂 质 体 LipofectamineTM (美 国 Invitrogen)；2×Taq PCR MasterMix (北京天根生物)；细胞活力检测试剂 MTT (上海索莱宝生物)；TUNEL 调 亡 原 位 检 测 试 剂 盒 (上 海 生 工 生 物 工 程)；蛋 白 提 取 试 剂 盒 (上 海 碧 云 天 生 物)；逆 转 录 试 剂 盒 (大 连 宝 生 生 物 TaKaRa)；引 物 (上 海 吉 玛)；I 抗 Cyclin D1、Mdm2、Mdm4、P53、P21 及 β -actin (美 国 Santa Cruz)；II 抗 HRP-Goat anti Mouse IgG (北京中杉金桥)。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养和 siRNA 转染 把 Hep3B 细胞放在含有 100 μ g/mL 的链霉素、100 U/mL 的青霉素及 10% 胎牛血清的 MEM 培养基的细胞培养瓶内，并置于饱和空气湿度、温度 37 $^{\circ}$ C 及 5% CO₂ 孵箱里培养。细胞以 1×10⁶ 个/孔的密度平铺在六孔板内。孵育 24 h 后细胞融合率大约为 90%。使用脂质体 LipofectamineTM 2000 将 Cyclin D1-siRNA 和 NC-siRNA 转染细胞。Cyclin D1-siRNA 序列：5' ACAAACA-GATCATCCGCAA3'，NC-siRNA 序列：5'-UUCUC-CGAACGUGUCACGUTT-3'。siRNA 浓度为 100 nmol/L，脂质体每孔 5 μ L 介导转染，转染后 48 h 收获细胞。实验分为空白对照组、阴性对照 siRNA (NC-siRNA) 组、Cyclin D1-siRNA 组。实验每组重复 6 次。

1.2.2 RT-PCR 检测 Cyclin D1、Mdm2、Mdm4、P53、P21 mRNA 的表达 配制 PCR 反应体系：2×Taq PCR MasterMix 12.5 μ L，上游引物 1 μ L，下游引物 1 μ L，cDNA 500 ng，补充三蒸水至终体积 25 μ L。PCR 反应条件：1 个循环预变性，95 $^{\circ}$ C 5 min；36 个循环 PCR 反应，95 $^{\circ}$ C 40 s，55 $^{\circ}$ C 40 s，72 $^{\circ}$ C 60 s；延伸 72 $^{\circ}$ C 8 min。每个基因取同等量的 PCR 产物置于琼脂糖凝胶孔中进行电泳，利用暗箱式紫外透射仪 (上海精科) 观察电泳结果并拍照。最终数据以目的条带/ β -actin 的灰度值表示，结果用 BANDLEAD 3.00 软件分析。基因引物序列及产物大小见表 1。

1.2.3 Western blot 检测 Cyclin D1、Mdm2、Mdm4、P53 和 P21 蛋白的表达 提取总蛋白使用放射免疫沉淀试验法，检测蛋白质浓度使用二喹啉甲酸法。提取 20 μ g 蛋白质进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。蛋白转移至 NC 膜上，然后用 5 g/100 mL 脱脂奶粉液于 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜。NC 膜用相应的 I 抗 (1:200 比例稀释) 于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，继以 II 抗孵育 2 h，

最终用 DAB 显色照相。结果以目的条带/ β -actin 的灰度值表示，用软件 Quantity One 分析。

表 1 各基因引物序列和产物大小

基因	引物序列	产物大小
Cyclin D1	上游:5'-CCCTCGGTGTCCTACTTCAA-3'	726 bp
	下游:5'-GTGTTCAATGAAATCGTGCG-3'	
Mdm2	上游:5'-ACCGAGTCTTGCTCTGTAC-3'	139 bp
	下游:5'-GGTGTGGTGCCAGATGAC-3'	
Mdm4	上游:5'-GATGATACCGATGTAGAGG-3'	332 bp
	下游:5'-TCAGAAGTGTGAGCCAAA-3'	
P53	上游:5'-CTACAAGCAGTCACAGCACATGAC-3'	551 bp
	下游:5'-TCATTCAGCTCTCGGAACATCTCG-3'	
P21	上游:5'-GACTGTGATGCGCTAATGG-3'	413 bp
	下游:5'-TTCCTGTGGGCGGATTAG-3'	
β -actin	上游:5'-CGGAAATCGTGCGTGAC-3'	434 bp
	下游:5'-TGGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'	

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期 获得上述各组细胞，使用流式细胞仪 (美国 Beckman 公司) 分析得出细胞各周期的百分率。

1.2.5 MTT 检测细胞活力 细胞平铺于 96 孔板内，其中空白调零孔只加不含细胞的培养基 MEM。对细胞进行处理后，每孔细胞加入 5 mg/mL MTT 液 20 μ L，接着孵育 4 h，弃上清液后加入 150 μ L 的二甲基亚砷，剧烈混匀 10 min，上酶标仪 (上海 Bio-Rad) 于 492 nm 处检测各孔吸光度 (A) 值。

1.2.6 TUNEL 检测细胞凋亡 用 PBS 洗细胞 3 次×5 min。加入 4% 多聚甲醛溶液室温固定 30 min，PBS 洗 3 次×5 min。加入 0.1% Triton X-100 溶液室温破膜 10 min，PBS 洗 3 次×5 min。实验组每片以 5 μ L 末端脱氧核苷酸转移酶 (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) 及 45 μ L 荧光素标记的 dUTP 液混匀。玻片干后，加 50 μ L TUNEL 反应混合液于标本上，加盖玻片或封口膜在暗湿盒中 37 $^{\circ}$ C 反应 60 min。PBS 洗 3 次×5 min。玻片干后加 50 μ L converter-POD 于标本上，加盖玻片或封口膜在暗湿盒中 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min。PBS 洗 3 次×5 min。在组织处加适量 DAB 底物，显微镜下控制显色。PBS 终止显色。苏木素复染，中性树胶封片。观察，拍照。每张切片于 200 倍镜下随机选择 4 个视野，计算阳性细胞数为凋亡指数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组 Cyclin D1、Mdm2、Mdm4、P53、P21 mRNA

NA 的表达 与空白对照组和 NC-siRNA 组相比,Cyclin D1-siRNA 组 P53 和 P21 mRNA 的表达上调($P < 0.05$),Cyclin D1、Mdm2 和 Mdm4 mRNA 的表达下调($P < 0.01$);而空白对照组与 NC-siRNA 组之间相比,各基因表达差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 1。

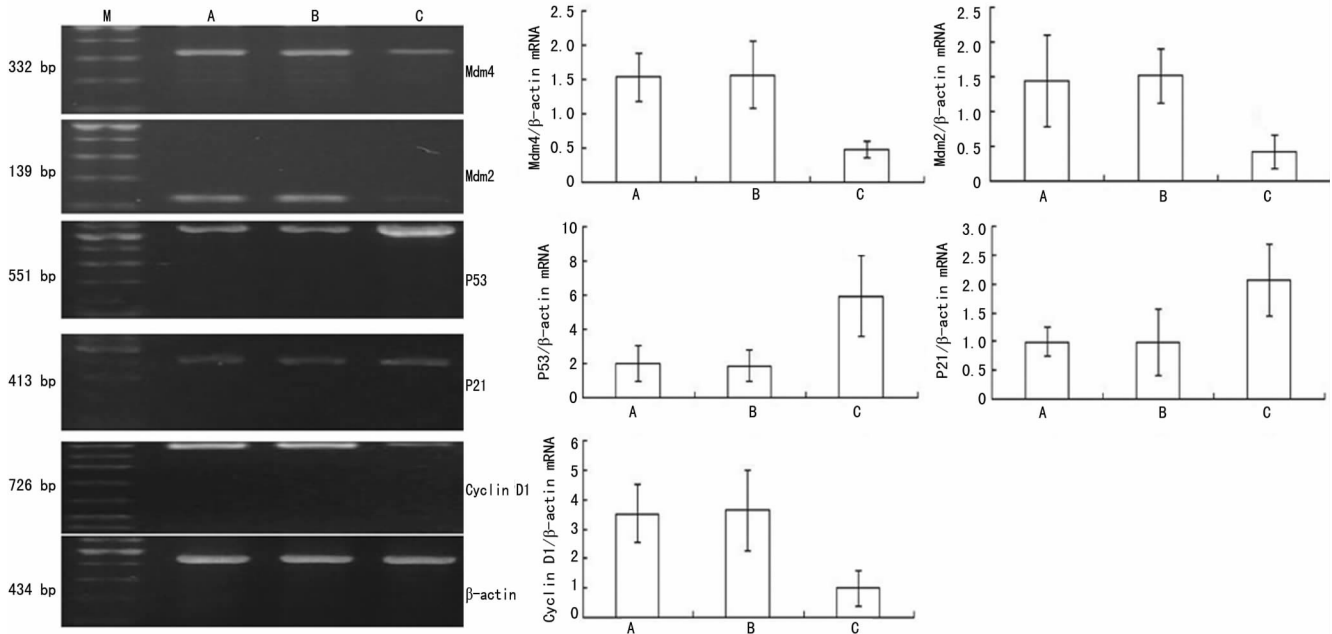
2.2 各组 Cyclin D1、Mdm2、Mdm4、P53、P21 蛋白的表达 与空白对照组和 NC-siRNA 组相比,Cyclin D1-siRNA 组 P53 和 P21 蛋白的表达上调($P < 0.01$),Cyclin D1、Mdm2 和 Mdm4 蛋白的表达下调($P < 0.01$);而空白对照组与 NC-siRNA 组之间相比,各蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 2。

表 2 流式细胞仪检测细胞周期($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	G ₁ 期	S 期	G ₂ 期
空白对照组	37.79±1.34	46.02±2.71	16.19±1.39
NC-siRNA 组	38.66±0.57	46.71±1.35	14.63±1.92
Cyclin D1-siRNA 组	36.60±2.20*	48.75±1.69*	14.54±1.65*

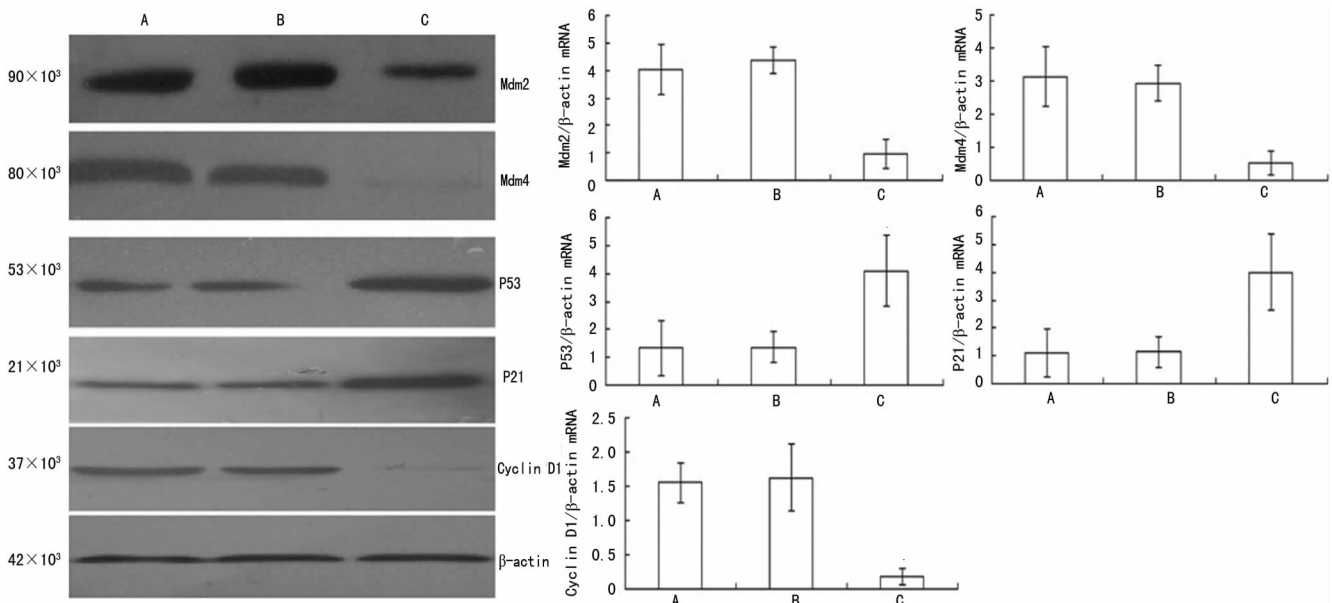
* : $P > 0.05$,与空白对照组和 NC-siRNA 组比较

2.3 各组细胞周期 与空白对照组和 NC-siRNA 组相比,Cyclin D1-siRNA 组细胞 G₁、S 及 G₂ 期均无明显差异($P > 0.05$);空白对照组与 NC-siRNA 组之间比较,各期差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2、图 3。



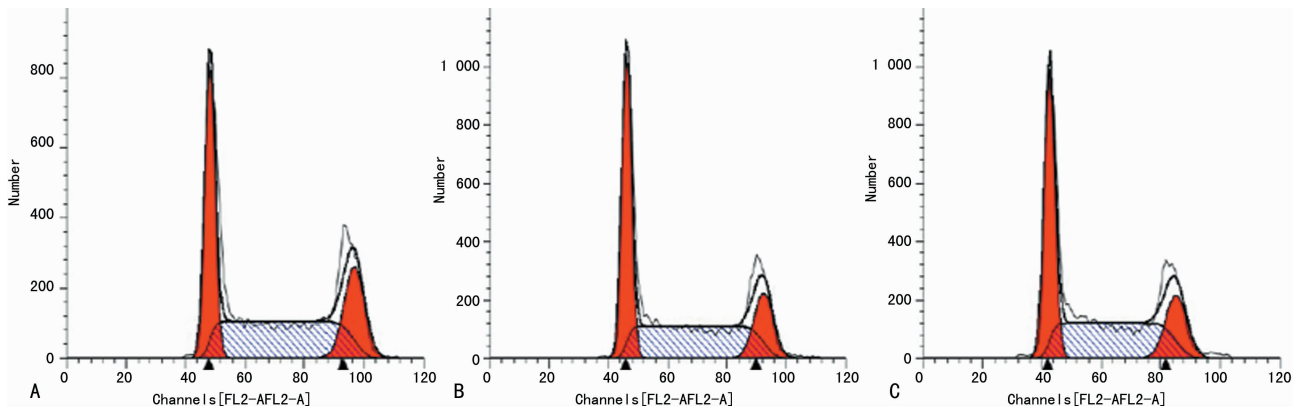
A:空白对照组;B:NC-siRNA 组;C:Cyclin D1-siRNA 组; * : $P < 0.05$,与空白对照组和 NC-siRNA 组比较

图 1 各组 Cyclin D1、Mdm2、Mdm4、P53、P21 mRNA 的表达



A:空白对照组;B:NC-siRNA 组;C:Cyclin D1-siRNA 组; * : $P < 0.01$,与空白对照组和 NC-siRNA 组比较

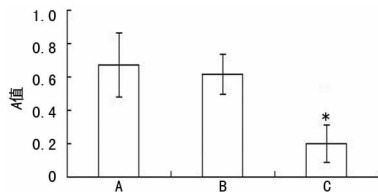
图 2 各组 Cyclin D1、Mdm2、Mdm4、P53、P21 蛋白的表达



A:空白对照组;B:NC-siRNA 组;C:Cyclin D1-siRNA 组

图3 各组细胞周期情况

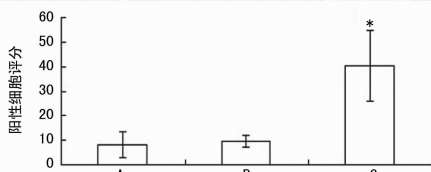
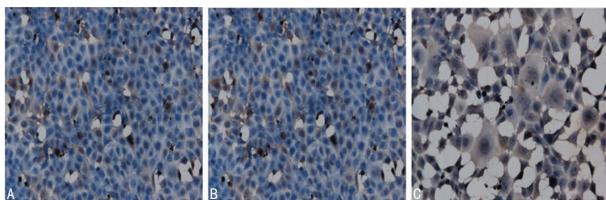
2.4 各组细胞增殖活力 与空白对照组和 NC-siRNA 组相比,Cyclin D1-siRNA 组细胞增殖活力明显减弱($P < 0.01$);空白对照组与 NC-siRNA 组细胞增殖活力差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 4。



A:空白对照组;B: NC-siRNA 组;C:Cyclin D1-siRNA 组; * : $P < 0.01$,与空白对照组和 NC-siRNA 组比较

图4 各组细胞增殖活力

2.5 各组细胞凋亡情况 与空白对照组和 NC-siRNA 组相比,Cyclin D1-siRNA 组细胞凋亡明显增强($P < 0.01$);而空白对照组与 NC-siRNA 组的细胞凋亡差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 5。



A:空白对照组($\times 200$);B:NC-siRNA 组($\times 200$);C:Cyclin D1-siRNA 组($\times 200$); * : $P < 0.01$,与空白对照组和 NC-siRNA 组比较

图5 各组细胞凋亡情况

3 讨论

细胞周期是确保细胞进行生命活动的基本过程,其准确调控对于生命正常生存、繁殖、发育及遗传起到了关键性作用。细胞周期的关键点是 G_1 期的启动,而 Cyclin D1 是调控细胞周期 G_1 期的关键性蛋白^[5]。Cyclin D1 在肿瘤细胞中表现为表达过度,造成了 G_1 期的缩短,过度的细胞增殖^[6]。Cyclin D1 已

经证实了与多种肿瘤的发生、发展有关^[7]。肝癌的发生也与 G/S 期检测点的缺陷相关^[8]。Cyclin D1 表达下调可导致肝癌细胞株 Huh7 细胞的凋亡,使其停滞在 G_1 期^[9]。

HCC 是全世界最普遍的肿瘤之一,而我国由于乙型肝炎的高发使肝癌患者占全世界的大部分^[10]。目前,针对 HCC 的治疗方法均不理想,疗效有限。而基因治疗因其可从根本上治愈疾病,故而会是治疗 HCC 的新选择及新趋势。

本研究结果显示,Cyclin D1 基因表达下调能抑制 Mdm2 和 Mdm4 的表达,并能上调 P53 和 P21 的表达;Cyclin D1 基因表达下调能减弱肝癌细胞的增殖,并能诱导其凋亡。Cyclin D1 表达下调对肝癌的细胞周期没有影响。其可能的原因是,Cyclin D1 表达下调只通过细胞凋亡途径起作用,而对细胞周期通路并不产生影响。

Mdm2 和 Mdm4 参与了多条细胞调控通路,并影响了肿瘤发生与发展的过程^[11]。目前已有的研究表明,很多肿瘤中均有 Mdm2 和 Mdm4 表达过度的现象。Mdm2 和 Mdm4 在肿瘤细胞中的过表达,导致了野生型 P53 的抑癌活性受抑,诱导了肿瘤形成^[12]。本研究组既往的研究亦表明^[13],利用 RNA 干扰技术使得 Mdm2 表达沉默减弱了肝癌细胞增殖,并导致其凋亡;下调 Mdm2 的表达能上调抑癌基因 P21 的表达,而 P21 是 P53 途径最重要的下游基因之一。本研究发现,Cyclin D1 基因表达下调能抑制 Mdm2 和 Mdm4 的表达,并能上调抑癌基因 P53 和 P21 的表达。这些均表明,Cyclin D1 基因表达下调能抑制肝癌的发生和生长。沉默 Cyclin D1 基因的表达能造成肝癌细胞的活力下降,凋亡被诱导。这与预期实验结果一致,即 Cyclin D1 基因表达下调能抑制肝癌细胞的增殖并促进其凋亡。

综上所述,Cyclin D1 基因表达下调能抑制 Mdm2 和 Mdm4 的表达,并能上调抑癌基因 P53 和 P21 的表达;Cyclin D1 基因表达下调能抑制肝癌细胞的增殖并促进其凋亡。这为肝癌的基因治疗提供可

能的分子作用靶点。

参考文献

- [1] LI C F, PENG W C, SONG X, et al. Anticancer effect of icaritin inhibits cell growth of colon cancer through reactive oxygen species, Bcl-2 and cyclin D1/E signaling[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(5):3537-3542.
- [2] WADE M, LI Y C, WAHL G M. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(2):83-96.
- [3] NAKAJI S, HIRATA N. Evaluation of the viability of hepatocellular carcinoma in the caudate lobe using contrast-enhanced endoscopic ultrasonography after transarterial chemoembolization [J]. *Endoscopic Ultrasound*, 2016, 5(6):390-392.
- [4] 冯潜, 石世代, 周勇, 等. KLF4 调控 MMP9 对原发性肝癌的侵袭迁移能力的影响[J]. *重庆医学*, 2015, 44(22):3025-3029.
- [5] DEFORZH E, VARGAS T R, KROPP J, et al. IMP-3 protects the mRNAs of cyclins D1 and D3 from GW182/AGO2-dependent translational repression[J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(6):2578-2588.
- [6] WANG N, WANG X B, TAN H Y, et al. Berberine suppresses cyclin D1 expression through proteasomal degradation in human hepatoma cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(11):1899-1911.

- [7] FUSTÉ N P, FERREZUELO F, GARÍ E. Cyclin D1 promotes tumor cell invasion and metastasis by cytoplasmic mechanisms[J]. *Mol Cell Oncol*, 2016, 3(5):e1203471.
- [8] MOGHADDAM S J, HAGHIGHI E N, SAMIEE S, et al. Immunohistochemical analysis of p53, cyclinD1, RB1, c-fos and N-ras gene expression in hepatocellular carcinoma in Iran[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(4):588-593.
- [9] CHE Y F, YE F, XU R L, et al. Co-Expression of XIAP and cyclin D1 complex correlates with a poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Am J Pathol*, 2012, 180(5):1798-1807.
- [10] 向尹, 杨阳, 周杰. HBV DNA 载量与肝硬化和原发性肝癌的相关性探究[J]. *重庆医学*, 2016, 45(23):3231-3232.
- [11] KRIEGMAIR M C, BALK M, WIRTZ R, et al. Expression of the p53 inhibitors MDM2 and MDM4 as outcome predictor in muscle-invasive bladder cancer[J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(10):5205-5213.
- [12] TEVERONI E, LUCA R, PELLEGRINO M, et al. Peptides and peptidomimetics in the p53/MDM2/MDM4 circuitry - a patent review[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2016, 26(12):1417-1429.
- [13] 丁浩, 张吉翔. 人着色性干皮病基因 D 对 HepG2 细胞 Mdm2 和 Mdm4 表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(1):48-52.

(收稿日期:2017-11-02 修回日期:2018-02-01)

(上接第 1980 页)

- pneumoniae ST11 clone with high prevalence of oqxAB and rmtB in a tertiary hospital in China; results from a 3-year period[J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2016, 15(1):1-8.
- [6] PITOUT J D, NORDMANN P, POIREL L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(10):5873-5884.
- [7] WANG L H, WEI D D, WAN L G, et al. Diversity of the genetic environment of the blaKPC-2 gene among *klebsiella pneumoniae* clinical isolates in a chinese hospital [J]. *Microb Drug Resist*, 2016, 22(1):15-21.
- [8] LOGAN L K, WEINSTEIN R A. The epidemiology of carbapenem-resistant enterobacteriaceae; The impact and evolution of a global menace[J]. *Infect Dis*, 2017, 215(1):S28-36.
- [9] RIBEIRO V B, ANDRADE L N, LINHARES A R, et al. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil[J]. *Med Microbiol*, 2013, 62(23):1721-1727.

- [10] 毛彩萍, 樊瑶, 叶珍, 等. 耐药肺炎克雷伯菌 β -内酰胺酶编码基因及 KPC ISKpn6 连锁检测[J]. *中华医院感染学杂志*, 2014, 24(18):4424-4426.
- [11] 张冀霞, 刘颖梅, 陈宏斌, 等. 我国产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的基因型及流行病学研究[J]. *中华内科杂志*, 2014, 53(2):116-120.
- [12] 豆清娅, 邹明祥, 李春辉, 等. 耐亚胺培南肺炎克雷伯菌的耐药机制研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26(13):2906-2909.
- [13] DAUTZENBERG M J, HAVERKATE M R, BONTEN M J, et al. Epidemic potential of *Escherichia coli* ST131 and *Klebsiella pneumoniae* ST258; a systematic re-view and meta-analysis[J]. *BMJ Open*, 2016, 6(3):e009971.
- [14] DHAR S, MARTIN E T, LEPHART P R, et al. Risk factors and outcomes for C-arbapenem resistant *klebsiella pneumoniae* isolation, stratified by its multilocus sequence typing: ST258 versus Non-ST258[J]. *Open Forum Infect Dis*, 2016, 3(1):213-217.

(收稿日期:2017-11-02 修回日期:2018-02-10)