

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.11.002

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190428.1131.038.html>(2019-04-30)

siRNA 干扰 TWSG1 表达对 SGC-7901 细胞增殖的影响*

吴佳艳^{1,2},袁静怡¹,曾嘉丽¹,刘玥^{1,3△}

(1. 南方医科大学基础医学院,广州 510515;2. 南京医科大学基础医学院,南京 210000;

3. 广东省单细胞技术与应用重点实验室,广州 510515)

[摘要] **目的** 构建 siRNA 干扰扭转原肠胚形成同系物 1(TWSG1)表达质粒,观察 TWSG1 基因对人胃癌细胞株 SGC-7901 增殖与凋亡的影响。**方法** 设计 TWSG1 基因的 siRNA 转染细胞 SGC-7901,构建稳定细胞株,使用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测稳定细胞株,使用蛋白印迹法检测稳定细胞株,CCK8 检测细胞增殖,进行细胞周期检测。**结果** 成功构建真核表达质粒。成功转染 SGC-7901 细胞株后,使用 siRNA 干扰 TWSG1 表达,siRNA 干扰 TWSG1 表达的 SGC-7901 细胞灰度值显著低于内参。于 24、48、72 h 时 CCK8 检测其 OD 值;siRNA 干扰的 SGC-7901 细胞在 48、72 h 时分别增殖 339%、850%;空白组 SGC-7901 分别增殖 173%、644%。细胞周期检测 siRNA 干扰组中 S 期细胞比例增高。**结论** siRNA 干扰 SGC-7901 细胞中 TWSG1 基因的表达后,能有效促进 SGC-7901 细胞的增殖。

[关键词] 胃肿瘤;TWSG1;SGC-7901;细胞增殖

[中图分类号] R735.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)11-1806-04

Impacts of siRNA interference to TWSG1 expression on proliferation of SGC-7901 cells*

WU Jiayan^{1,2},YUAN Jingyi¹,ZENG Jiali¹,LIU Yue^{1,3△}

(1. Faculty of Basic Medicine, College of Basic Medicine, Southern Medical University,

Guangzhou, Guangdong 510515, China; 2. Faculty of Basic Medicine, Nanjing Medical University,

Nanjing, Jiangsu 210000, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Single Cell

Technique and Application, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

[Abstract] **Objective** To construct siRNA interference TWSG1 expression plasmid, to observe the effect of TWSG1 gene on the cellular proliferation and apoptosis of human gastric cancer cell line SGC-7901. **Methods** The TWSG1 gene siRNA was designed and transfected into SGC-7901 cells for constructing the stable cell line. The stable cell line was detected by RT-PCR and Western blot respectively, and the cell proliferation was detected by CCK8. The cell cycle detection was performed. **Results** The eukaryotic expression plasmid was successfully constructed. After successful transfection of SGC-7901 cell line, siRNA was used to interfere with TWSG1 expression, and the gray value of SGC-7901 cells with siRNA interfering with TWSG1 expression was significantly lower than that of the internal reference. The OD value at 24, 48, 72 h was detected by CCK8; siRNA-interfering SGC-7901 cells at 48, 72 h were proliferated by 339% and 850% respectively; the blank group SGC-7901 was 173% and 644% respectively. The cell cycle detected an increase in the proportion of S phase cells in the siRNA interference group. **Conclusion** siRNA interfering with the expression of TWSG1 gene in SGC-7901 cells effectively promotes the proliferation of SGC-7901 cells.

[Key words] gastric neoplasm; TWSG1; SGC-7901; cell proliferation

胃癌是从胃黏膜上皮肿瘤发展而成的恶性肿瘤,在癌症病死率中位居前五,亚洲发病人数占全世界的 42%^[1]。从 20 世纪 70 年代到 2013 年,我国的胃癌发病率与病死率均总体呈上升趋势^[2]。根据国家癌症

中心 2017 年 2 月发布的数据看,我国胃癌发病率和病死率现状不容乐观,男、女胃癌发病率分别为 19.02% 和 7.85%。因胃毗邻肝、肾等器官,肿瘤易转移;其常见治疗方式为手术,然而 5 年生存率不足

* 基金项目:2015 年度广东省科技计划项目(2015A010107005);2015 年度南方医科大学科研启动计划项目(QD2015N004);2016 年度广东省大学生创新创业训练计划项目(201612121091);2017 年度广东省自然科学基金项目(2017A030310022);2017 年度广东省大学生创新创业训练计划项目(201712121329)。 作者简介:吴佳艳(1997-),本科在读,主要从事基础医学生物化学研究。 △ 通信作者,E-mail:vliuyue@163.com。

10%^[3]。目前对胃癌本质了解尚不深入,治疗手段局限,治疗效果有效率低,因此对胃癌的研究十分必要。

日前,扭转原肠胚形成同系物 1(twisted gastrulation protein homolog1, TWSG1)与骨骼、肾脏、胆管等相关癌症密切相关^[4-5]。现有研究表明,TWSG1 基因直接影响到骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)以及相关信号通路。TWSG1 基因沉默对生物(斑马鱼)的发育有显著影响,TWSG1 基因的激活或者沉默在不同器官中可能有不同的效应^[4]。但目前对 TWSG1 在胃癌中的研究甚少。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)指由 RNA 诱发基因沉默^[6]。RNA 干扰技术因其高特异性、高效性、长效性,在肿瘤的临床治疗中的应用越来越多^[7]。本研究使用 siRNA 干扰人胃癌细胞 SGC-7901 中的 TWSG1 基因,观察其对 SGC-7901 细胞株增殖与凋亡的影响,为探寻新的有效治疗胃癌的方法提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人胃癌细胞株 SGC-7901 由南方医院中心实验室提供,于 DMEM 完全培养基中培养(内含 10% 的胎牛血清,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素,100 U/mL 青霉素)。所有细胞均置于 37 $^{\circ}\text{C}$,含 5% 二氧化碳的培养箱中培养,换液情况视细胞贴壁生长情况而定,待细胞达到合适的密度,用胰酶消化传代。

1.1.2 仪器 离心机(美国 Beckman 公司); Infinite M200 酶标仪(瑞士 Tecan 公司); Nano Drop2000 微量分光光度计(Thermo 公司);小型水平电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);Mini-Protean Tetra 电泳系统(美国 Bio-Rad 公司);Eclipse Ti-s 荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司);7500Real-Time PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);Biorad MJ Mini 梯度 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);HF90 二氧化碳培养箱(中国力康生物医疗科技控股有限公司);流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.1.3 药品与试剂 SGC-7901 细胞(南方医院中心实验室提供),pLVX-shRNA1 质粒(本室保存),DEME 培养基、胎牛血清、PBS、胰蛋白酶、链霉素和青霉素(美国 Gibico 公司),嘌呤霉素(美国 Sigma 公司),Lipofectamine 2000、Trizol(Invitrogen 公司),Prime Script RT reagent Kit、SYBR Premix Ex Taq TM II Kit(Takara 公司),RIPA 细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司),PVDF 膜(Millipore 公司),TWSG1 兔抗人多克隆抗体(Abcam 公司),HRP 标记的羊抗兔 IgG(北京天德悦公司),ECL 发光液(美国 Thermo Scientific Pierce 公司),CCK8(日本 Dojindo 公司),Annexin V-FITC 和 PI(江苏凯基生物技术股份有限公司),引物

和 siRNA(上海生工生物股份有限公司合成)。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 干扰 TWSG1 表达后筛选稳定表达的细胞株 使用 siDirect 针对 TWSG1 基因设计 siRNA 并合成,与载体连接。实验组分为 3 组:空白对照组(SGC-7901 细胞)、阴性对照组(转染空载体,7901-vector)、siRNA 干扰组(转染连接 siRNA 的载体,7901-siRNA1,7901-siRNA2,7901-siRNA3)。转染筛选后采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和 Western blot 分别鉴定 mRNA 和蛋白,鉴定干扰效果显著后进行后续实验。

1.2.2 RT-PCR 检测 TWSG1 mRNA 表达 采用 Trizol 提取收集的各组细胞 RNA。采用 Prime Script RT reagent Kit 制备 cDNA,采用 RT-PCR 以 GAPDH 为内参检测 TWSG1 mRNA 的表达水平。

1.2.3 Western blot 检测 TWSG1 蛋白表达 取对数生长期的细胞用胰酶消化后,RIPA 裂解液提取蛋白。采用 BCA 法测定蛋白浓度。用 10% 丙烯酰胺凝胶进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。低温下用湿转法转膜,免疫印迹后进行曝光,利用凝胶成像系统采集并分析图像。

1.2.4 CCK8 检测细胞增殖 在 96 孔板按照 1 000 个细胞/孔接种 SGC-7901 细胞,分为空白对照组、阴性对照组和 siRNA 干扰组各 3 孔。分别于培养箱培养 24、48 h 以及 72 h 时,加入 CCK8 检测试剂。培养箱继续培养 4 h,测定 450 nm 吸光度(OD 值)值。绘制细胞增殖曲线。

1.2.5 AnnexinV-FITC/PI 染色法进行细胞周期检测 PBS 洗涤转移下的细胞,用染色结合液制成单细胞悬液,再加入染色液,轻柔涡旋混匀,室温避光孵育,最后用流式细胞仪进行检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,实验结果采用 ANOVA 进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 siRNA 干扰 TWSG1 mRNA 表达效率 siRNA 干扰 TWSG1 mRNA 表达高($P < 0.05$),RT-PCR 检测 mRNA 表达结果见图 1。

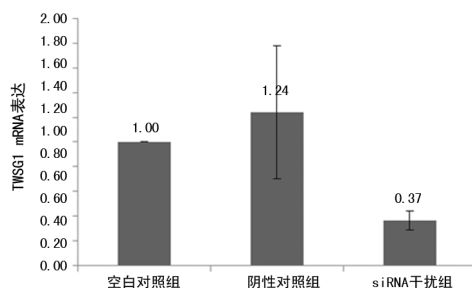


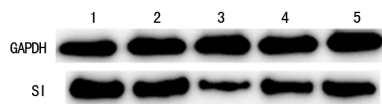
图 1 干扰后各组细胞中 TWSG1 mRNA 的表达

表 1 干扰后各组细胞中 TWSG1 蛋白的相对灰度值($\bar{x} \pm s$)

组别	空白对照组	阴性对照组	siRNA 干扰组		
			7901-siRNA1	7901-siRNA2	7901-siRNA3
GAPDH	119 418.0 \pm 10 363.4	138 388.0 \pm 11 137.8	152 135.0 \pm 11 447.6	138 306.0 \pm 11 248.3	138 273.0 \pm 12 138.6
TWSG1	136 150.0 \pm 10 909.1	142 432.0 \pm 12 544.8	59 131.0 \pm 6 132.4*#	95 135.0 \pm 8 671.2	116 823.0 \pm 10 003.4
TWSG1/GAPDH	1.1401	1.029	0.389	0.688	0.845

*: $P < 0.05$, 与空白对照组比较; #: $P < 0.05$, 与阴性对照组比较

2.2 siRNA 干扰组 TWSG1 的蛋白表达低 各组细胞 Western blot 检测结果显示(图 2, 表 1), siRNA 干扰组中 TWSG1 蛋白表达受到抑制($P < 0.05$), 7901-siRNA1 尤其显著。结合 PCR 结果, 可认为成功构建了 siRNA 干扰 TWSG1 表达模型。



1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: 7901-siRNA1 组; 4: 7901-siRNA2 组; 5: 7901-siRNA3 组

图 2 干扰后各组细胞中 TWSG1 蛋白的表达

2.3 siRNA 干扰 TWSG1 基因表达促进 SGC-7901 细胞增殖 用 CCK8 检测各组增殖情况, 以 24 h 为基础, 在 48、72 h 时, siRNA 干扰组 SGC-7901 细胞分别增殖 339%、850%; 而空白对照组仅增殖 173%、

644%。SiRNA 干扰组 SGC-7901 细胞的增殖与其他两组比较显著增加($P < 0.05$), 见图 3。

2.4 siRNA 干扰组后细胞周期的变化 siRNA 干扰 TWSG1 基因表达促进 SGC-7901 细胞增殖, 更高比例的细胞从 G₁ 期进入 S 期, 见图 4。

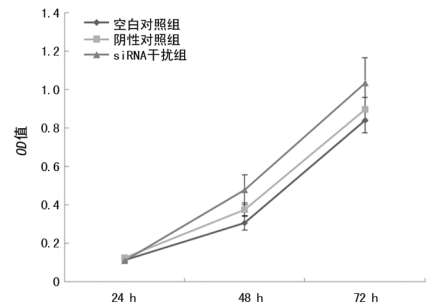
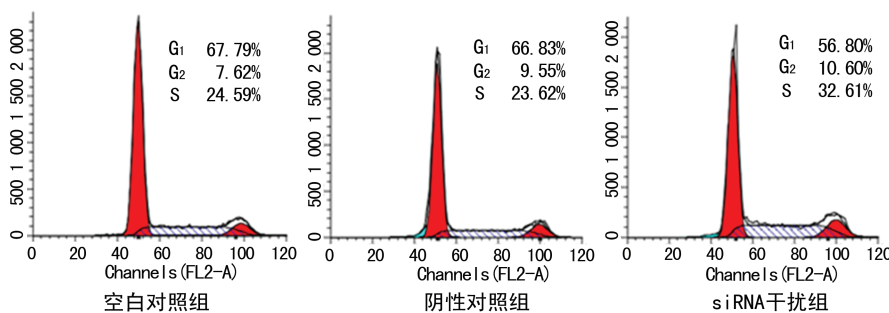
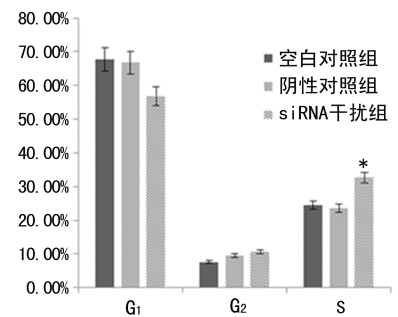


图 3 干扰后各组细胞的生长曲线



*: $P < 0.05$, 与空白对照组、阴性对照组比较

图 4 siRNA 干扰后细胞在不同时期的百分比



3 讨论

研究表明 TWSG1 基因编码保守疏水蛋白, 调控 BMP 信号通路^[4-5]。目前大部分研究是通过 BMP 通路探讨 TWSG1 表达与铁调素表达的关系; 也有研究表明 TWSG1 基因沉默将导致生物发生障碍或缺陷, 小鼠与斑马鱼等试验均证实这一观点^[4-5], 可见 TWSG1 是一个关键基因。现有文献提示 TWSG1 对不同器官的肿瘤具有双向性调控: 在结肠癌中可能是抑癌基因^[8-9]; 在乳腺癌中有促进肿瘤发生的功能^[10]。临床发现家族性结肠癌患者均有 TWSG1 缺失或表达低下^[9], 细胞学实验也显示 TWSG1 对结肠癌有抑制作用。推测 TWSG1 在结肠癌中是抑癌作用, 在信号通路中, TWSG1 是一种富含亮氨酸的分泌蛋白, 与

BMP 结合蛋白作用, 通过 USP53 途径抑制细胞增殖。以 TWSG1 促进乳腺癌发生为例, TWSG1 是 BMP 的结合蛋白, 调节细胞外的 BMP2、BMP4、BMP7 等配体^[11]。青春期时在肌上皮和终末芽体细胞中均可表达 TWSG1, 在导管成熟后, 主要表达限于肌上皮层。TWSG1 的全缺失导致导管伸长延迟, 二级分支减少, 末端芽增大, 这与腔上皮细胞数量的增加和细胞凋亡的减少有关。在胚胎乳腺发育中, 当 BMP 靶基因的表达降低、BMP 信号传导降低的同时, pSMAD1、5、8 水平也对应降低。管腔特异性的 GATA-3 在 TWSG1^{-/-} 胚胎乳腺中减少。TWSG1 对 BMP 信号传导的调节使正常导管伸长, 导管进行分支, 管腔形成和出生后胚胎乳腺中的肌上皮区室化。总之,

TWSG1 启动子区域中 CpG 岛的异常甲基化可能在暴露于不利条件时会促进肿瘤细胞活力或分化,最终导致肿瘤。为何一个基因,在不同组织里却有截然不同的作用呢?这还要从 TWSG1 与 BMP 之间的关系入手。TWSG1 与 BMP 结合蛋白相互作用,TWSG1 可以作为 BMP 拮抗剂^[12]和激动剂^[13]。BMP 对癌症有一定的抑制作用^[14-15],由于 TWSG1 对 BMP 的不同作用,导致了 TWSG1 在不同组织里有促进或抑制癌症的功能。本研究结果提示 TWSG1 极可能是 BMP 激动剂,siRNA 干扰 TWSG1 后其表达下调,与 BMP 作用弱化,使 SGC-7901 细胞株增殖。

本研究重点研究了 TWSG1 表达异常对 SGC-7901 增殖的影响。在培养 48、72 h 时,在 siRNA 诱导低表达 TWSG1 调控下的 SGC-7901 的增殖速度是空白对照组的 1.96、1.32 倍。实验数据表明,siRNA 干扰使 TWSG1 表达下调,低表达的 TWSG1 促进 SGC-7901 的增殖。TWSG1 对 SGC-7901 的增殖能力有显著影响。

总之,本研究的结果表明 siRNA 干扰 TWSG1 基因表达将对人胃癌细胞 SGC-7901 的增殖产生明显影响,有显著促进作用。TWSG1 很可能是一种抑癌基因,提示 TWSG1 基因可能是潜在的胃癌治疗靶点。此外由于胃癌与 TWSG1 的相关研究较少,因此本研究对后续 TWSG1 基因在胃癌中的功能、分子机制的研究具有重大意义,为胃癌发展的机制研究提供了实验基础,为胃癌的个性化治疗以及基因治疗提供了实验依据。通过基因筛查可以预判出胃癌高危人群,在临床治疗上未尝不是一种有效治疗手段。

参考文献

- [1] 邹文斌,李兆申.中国胃癌发病率及病死率研究进展[J].中国实用内科杂志,2014,26(4):408-415.
- [2] DONG R,ZHANG Z,ZHOU Y,et al. Surgical treatment and prognosis of Borrmann type III (gastric cancer involving the whole stomach[J]. Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi,2018,21(2):185-189.
- [3] TROILO H,BARRETT A L,ZUK A V,et al. Structural characterization of twisted gastrulation provides insights into opposing functions on the BMP signalling pathway [J]. Matrix Biol,2016(55):49-62.
- [4] XIA S,JI R,XU Y,et al. Twisted gastrulation bmp signalling modulator 1 regulates papillary thyroid cancer cell motility and proliferation[J]. J Cancer,2017,8(14):2816-2827.
- [5] LI M L,CHEN M Q,ZHANG P,et al. Notch1 gene silenced by RNAi inhibits oncogenicity of myeloma cell line [J]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi,2017,25(6):1685-1689.
- [6] BAIRD T D,HOGG J R. Using tet-off cells and rna knockdown to assay mrna decay[J]. Methods Mol Biol,2018(1720):161-173.
- [7] WALLACE L M,SAAD N Y,PYNE N K,et al. Pre-clinical safety and off-target studies to support translation of aav-mediated RNAi therapy for FSHD [J]. Mol Ther Methods Clin Dev,2018(8):121-130.
- [8] KIM M,KIM N,SEO Y,et al. An Integrated analysis of the genome-wide profiles of dna methylation and mrna expression defining the side population of a human malignant mesothelioma cell line[J]. J Cancer,2016,7(12):1668-1679.
- [9] GYLFE A E,KATAINEN R,KONDELIN J,et al. Eleven candidate susceptibility genes for common familial colorectal cancer[J]. PLoS Genet,2013,9(10):e1003876.
- [10] FORSMAN C L,NG B C,HEINZE R K,et al. BMP-binding protein twisted gastrulation is required in mammary gland epithelium for normal ductal elongation and myoepithelial compartmentalization [J]. Develop Biol,2013,373(1):95-106.
- [11] BILLINGTON C J,FIEBIG J E,FORMAN C L,et al. Glycosylation of twisted gastrulation is required for bmp binding and activity during craniofacial development[J]. Front Physiol,2011(2):59.
- [12] HUNTLEY R,DAVYDOVA J,PETRYK A,et al. The function of twisted gastrulation in regulating osteoclast differentiation is dependent on bmp binding [J]. J Cell Biochem,2015,116(10):2239-2246.
- [13] BILLINGTON C J,SCHMIDT B,MARCUCIO R S,et al. Impact of retinoic acid exposure on mid facial shape variation and manifestation of holoprosencephaly in Twsg1 mutant mice [J]. Dis Model Mech,2015,8(2):139-146.
- [14] ZABKIEWICZ C,RESAUL J,HARGEST R,et al. Bone morphogenetic proteins,breast cancer,and bone metastases:striking the right balance [J]. Endocr Relat Cancer,2017,24(10):349-366.
- [15] AUGERI D J,LANGENFELD E,CASTLE M,et al. Inhibition of BMP and of TGFbeta receptors down regulates expression of XIAP and TAK1 leading to lung cancer cell death [J]. Mol Cancer,2016(15):27.