

· 基础研究 ·

靶向血小板衍生生长因子-B siRNA 对 喉癌 Hep-2 细胞增殖的影响

高 尚,董 频,李大伟,沈 斌

(上海交通大学附属第一人民医院耳鼻咽喉头颈外科,上海 200080)

摘 要: **目的** 探讨血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF) B 链 mRNA 的 siRNA 质粒转染喉癌细胞株 Hep-2 细胞,沉默 Hep-2 细胞中 PDGF-B mRNA 并检测细胞增殖。**方法** 以脂质体 lip2000 为载体,设计 4 组针对 PDGF-B 的 siRNA 片段瞬时转染喉癌 Hep-2 细胞,实时荧光定量 PCR、Westernblot 分别检测各组 PDGF-B mRNA、PDGF-B 蛋白的表达及干扰效果,噻唑蓝(MTT)法检测各组细胞增殖抑制率,并与阴性对照组和空脂质体组进行比较。**结果** 实时荧光定量 PCR 检测显示:SiRNA2、SiRNA3、SiRNA4 组 PDGF-B mRNA 表达均有明显抑制,其中 SiRNA2 抑制率最高;与 SiRNA1、阴性对照组及空脂质体组进行比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。Westernblot 检测显示:SiRNA-1、SiRNA-2、SiRNA-3 组 PDGF-B mRNA 蛋白表达均有下降,其中 SiRNA-2 下降最明显,而 SiRNA-4、阴性对照组及空脂质体组对 PDGF-B 蛋白表达无明显抑制作用。MTT 法检测显示:SiRNA-1、SiRNA-2、SiRNA-3 均明显抑制 Hep-2 细胞增殖,其中 SiRNA-2 对 Hep-2 细胞的抑制作用最明显;且与 SiRNA-4、阴性对照组及空脂质体组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 成功运用 siRNA 干扰喉癌 Hep-2 细胞 PDGF-B mRNA,靶向沉默 PDGF-B mRNA 能有效抑制细胞增殖。

关 键 词: 血小板衍生生长因子;小干扰 RNA;喉癌细胞株 Hep-2 细胞;细胞增殖

中图分类号:R739.65

文献标识码:A

文章编号:1007-1520(2012)03-0170-05

Effect of targeted PDGF-B siRNA on the proliferation of Hep-2 cells

GAO Shang, DONG Pin, LI Da-wei, et al.

(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, the Affiliated First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China)

Abstract: **Objective** To transfect siRNA into Hep-2 cells for knocking down platelet-derived growth factor (PDGF-B) mRNA, and to detect its effect on the proliferation of Hep-2 cells. **Methods** Four groups of PDGF-B targeted siRNA were transfected into Hep-2 cells with lipofectamine 2000 as vector. The expression of PDGF-B mRNA and PDGF-B protein was detected by real-time PCR and Western Blot respectively. MTT was used for detecting the inhibitory rates of proliferation. **Results** Real-time PCR showed that the expression of PDGF-B mRNAs in siRNA2, siRNA3, and siRNA4 groups was inhibited with the highest inhibitory rate in siRNA2 group. The differences of the expression levels of PDGF-B mRNAs in siRNA2, siRNA3, and siRNA4 groups and those of the siRNA2, the negative control and the empty liposome groups were statistically significant ($P < 0.05$). Western Blot showed that the expression of PDGF-B protein in siRNA1, siRNA2, and siRNA3 groups declined with the lowest expression in siRNA2 group. The expression of PDGF-B protein in siRNA4, the negative control and the empty liposome groups were not inhibited. The MTT assay showed that siRNA1, siRNA2, and siRNA3 could inhibit cell proliferation with the most obvious inhibitory effect on siRNA2. The differences of the inhibitory rates of cell

proliferation in siRNA1 , siRNA2 , and siRNA3 groups and those of the siRNA4 , the negative control and the empty liposome groups were statistically significant ($P < 0. 05$). **Conclusion** siRNAs targeting PDGF-B can down-regulate the expression of PDGF-B gene and the knockdown of PDGF-B mRNA can inhibit the proliferation of Hep2 cells effectually .

Key words : Platelet-derived growth factor ; Small interfering RNA ; Hep-2 cell

实体肿瘤的发生、发展、侵袭、转移及复发需要持续的新生血管,血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)作为重要的血管生长因子,在许多肿瘤中有过表达,且与肿瘤的血管再生及间质形成相关^[1],通常被PDGF活化的间质细胞通过旁分泌的方式持续促进角质化细胞的增殖,从而促使肿瘤发生。本科室的前期研究表明,PDGF在喉鳞状细胞癌中较正常喉部组织有明显表达,阳性表达主要位于肿瘤细胞胞浆,少量位于胞核,且PDGF的高表达与肿瘤T分级及临床分期相关^[2],本研究的预实验亦显示喉癌细胞株Hep-2中PDGF-mRNA有明显表达,但PDGF-B蛋白与喉癌的关系目前尚无深入探讨。通过运用siRNA阻止PDGF-B的合成和分泌,降低PDGF-B蛋白基因表达,拟为进一步探讨PDGF-B蛋白与喉癌的关系提供技术支持。

1 材料与方法

1. 1 实验材料

人喉癌 Hep-2 细胞购自中科院上海细胞所,由上海市第一人民医院中心实验室常规培养于 T25 培养瓶中。RPMI1640 培养基 + 10% FBS 及 Opti-MEM I Reduced serum medium 购自

Gibco 公司(美国),Lipofectamine2000 转染试剂购自 invitrogene 公司(美国),Trizol 购自 invitrogen 公司(美国),RT 试剂 RevertAid™ First strand cDNA Synthesesi Kit 为 Fermentan ,SYBRRPremix Ex Taq™购自 TaKaRa 公司(日本)。PDGF-B 抗体为 Abcam 公司(美国),批号 ab84265 ,二抗购自 PTG 公司。荧光定量 PCR 仪 BIO-RAD 的 IQ5 (美国),凝胶呈像系统天能公司 Tanon 2500。

1. 2 实验方法

1. 2. 1 引物与 SiRNA 的设计与合成 PDGF-B 引物序列:上游引物为:5-TCGAGTGGTCACT-CAGCATC-3,下游引物为 3-GCGCTCTTCCT-GTCTCTCTG-5;GAPDH 引物序列:上游引物为 5-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3;下游引物为 3-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-5。靶向 PDGF-B 的 siRNA 设计与合成根据 PDGF-B 链全基因序列 (GenelD : 4628) 设计 4 组 siRNA 序列(表 1),并在上下游分别加入 Bam HI 和 Hind III 酶切位点,经 BLAST 分析,未发现同源序列。另外合成非同源对照序列作阴性对照,对照序列的碱基构成与 siRNA 基本相同,但排序有 70% 的差异,未发现同源序列。实验所用 siRNA 的设计与合成由上海创翼生物科技有限公司合成。

表 1 4 组 siRNA 及阴性对照组序列

siRNA	Strand	序列
SiRNA-1	Sense	5'-CAACCGCAACGUGCAGUGCtt-3'
	antisense	5'- GCACUGCACGUUGCGGUUGtt-3'
SiRNA-2	Sense	5'-AGAUCGAGAUUGUGCGGAAtt -3'
	antisense	5'-UUCCGCACAAUCUCGAUCUtt -3'
SiRNA-3	Sense	5'-UGAGAAAGAUCGAGAUUGUTT -3'
	antisense	5'-ACAAUCUCGAUCUUUCUCATT -3'
SiRNA-4	sense	GAGCUUGGCUCGUGGAAGATT
	antisense	UCUCCACGAGCCAAGCUCTT
阴性对照	Sense	5'-UUC UCC GAA CGT GTC ACG UdTdT -3'
	antisense	5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA AdTdT-3'

1.2.2 细胞培养及 siRNA 的转染 试验共分 6 组: siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3、siRNA-4、阴性对照组 (Negative control, NC)、空脂质体组。Hep-2 细胞在 10cm 培养皿中培养至 80% ~ 90% 融合时,胰酶消化,制成单细胞悬液,按 8×10^5 细胞/孔的浓度接种 6 孔板,混匀后于 37°C 、5% CO_2 培养 24 h。在 1.5 ml EP 管中加入 250 μl Opti-MEM,再加入 5 μl siRNA,轻轻混匀。在另 1 个 1.5 ml EP 管中加入 125 μl Opti-MEM,再加入 5 μl Lipofectamine™ 2 000 脂质体,轻轻混匀,室温放置 5 min。5 min 后混合上述两管液体,轻轻混匀,室温孵育 20 min。吸去 6 孔板中的培养液,每孔加入 1.5 ml 无血清的 Opti-MEM。将转染混合物逐滴加入 6 孔板中,混匀后在培养箱中温育 4 ~ 6 h。吸弃转染液,加入 500 μl 含 10% FBS 的 RPMI1640 完全培养液, 37°C 、5% CO_2 继续培养 48 h。48 h 后所得细胞用于 RNA 抽提、实时荧光定量 PCR 或 Western Blot 检测及 MTT 检测。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 收集转染后 48 h 细胞,按试剂盒及 Trizol 说明书抽提 RNA 并逆转录成 cDNA 第一链,以 GAPDH 为内参。根据 PDGF-B 设计引物序列,用 Bio-rad 公司 IQ5™ Real-time PCR 仪进行 PCR 扩增,按照 SYBRPremix Ex Taq™ 说明书操作。反应条件为: 94°C 变性 30 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s,共 35 个循环。每个样本做 3 个复孔。用 $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ 法计算分析 PDGF-B 基因的相对表达量,评价 PDGF-B 基因 mRNA 被相应的 siRNA 所沉默的程度。

1.2.4 Western blot 检测 收集上述各实验组细胞,用细胞裂解液处理细胞后,加入适量电泳缓冲液,沸水中加热 10 min,在 12% 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳,然后用半干转移仪转膜 1.5 h 至 PVDF 膜上,以 3% BSA 在 37°C 封闭 2 h,加入一抗, 4°C 过夜,PBST 洗 3 次,每次 10 min,然后加 HRP 标记的羊抗兔二抗, 37°C 孵育 30 min,PBST 洗 3 次,每次 15 min,用 SuperSignal West Pico Chemiluminent Substrates 进行化学发光检测,并对 X 光片曝光。经显影定影处理后,胶片用凝胶成像分析系统拍照,使用 Gel-Pro Analyzer 软件分析处理。计算各转染组 PDGF-B 蛋白相对表达量及抑制率。相对表达量 = 各组的 PDGF-B 蛋白灰度值/tubulin 灰度

值,抑制率 = $1 - (\text{实验组的相对灰度值} / \text{空白组的相对灰度值}) \times 100\%$ 。

1.2.5 噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 法测定细胞增殖抑制率 收集对数生长期细胞,胰蛋白酶消化后制成单细胞悬液,调整细胞浓度,接种至 96 孔培养板,每孔细胞数约为 2×10^3 个/ml,每个样本 3 个复孔,常规培养 24 h 后转染细胞,转染步骤同前,每孔加入 Opti-MEM 100 μl ,lipo 1 μl ,oligos 1 μl ,siRNA 1 μl 。转染 6 h 后,每孔补加新鲜小牛血清 10 μl ,继续培养 48 h,取出培养板,各孔中加入 20 μl MTT,用铝箔包裹培养板,于 37°C 湿润环境中温育 4 h,弃去孔中的培养基和 MTT,在实验孔中各加入 200 μl DMSO,以溶解残留的 MTT-甲瓚结晶,振荡约 10 min 后在 570 nm 处记录吸光值。按照公式计算细胞增殖抑制率,抑制率 = $1 - (\text{实验组平均 A 值} / \text{空脂质体组平均 A 值}) \times 100\%$ 。

1.3 统计学分析

实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 13.0 软件进行方差分析,各组间比较采用 One-Way ANOVA 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞转染图片

携带 FAM (6-羧基荧光素) 的阴性对照组转染 Hep-2 细胞 48 h,可见细胞内散在荧光,提示 Lip 2000 已成功将 siRNA 转染入细胞内,转染率约为 73%,见图 1。

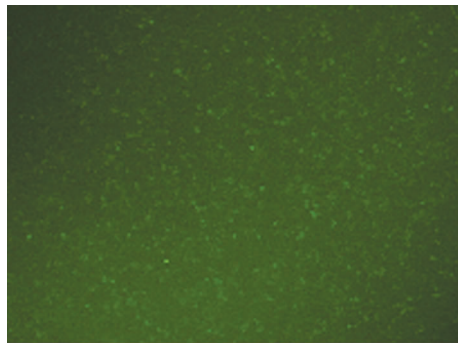


图1 成功转染 Hep-2 细胞的荧光图

2.2 实时荧光定量 PCR 法检测 siRNA 对

PDGF-B mRNA 表达干扰效果

结果表明, siRNA2、siRNA3、siRNA4 组 PDGF-B mRNA 表达均有明显抑制,其中 siRNA2 抑制率最高,达 67. 91%,与 siRNA1、阴性对照组及空脂质体组相比差异具有统计学意义($P < 0. 05$),但 siRNA2、siRNA3 和 siRNA4 三组之间比较差异无统计学意义($P > 0. 05$),见表 2。

2.3 Western blot 检测 siRNA 对 PDGF-B 蛋白

水平表达干扰效果

用 Quantity One 软件分析见图 2,获得内参 tubulin 和目的条带的灰度比值,计算蛋白表达的抑制率。结果如下:空脂质体组、阴性对照组及 siRNA-4 对 PDGF-B 蛋白表达无明显抑制作用, siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3 组 PDGF-B 蛋白表达均有下降,其中 siRNA-2 下降最明显,抑制率为 65. 09%(表 2)。

表 2 不同转染组 PDGF-B mRNA 及 PDGF-B 蛋白相对表达量与抑制率

组别	PDGF-B mRNA		PDGF-B 蛋白	
	相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	抑制率(%)	相对表达量	抑制率(%)
siRNA-1	0.66±0.03	33.57	0.68	52.44
siRNA-2	0.32±0.02	67.91 ^{①②}	0.50	65.09 ^{①③}
siRNA-3	0.45±0.03	55.25 ^①	1.20	15.97 ^①
siRNA-4	0.42±0.02	58.53 ^①	1.48	-3.87
阴性对照组	0.98±0.04	2.05	1.35	5.22
空脂质体组	1.000	0	1.42	0

注: ^①与 siRNA1、阴性对照组及空脂质体组比较 $P < 0. 05$, ^②与 siRNA-3、siRNA-4 组比较 $P > 0. 05$, ^③与 siRNA-1、siRNA-3 比较 $P < 0. 05$

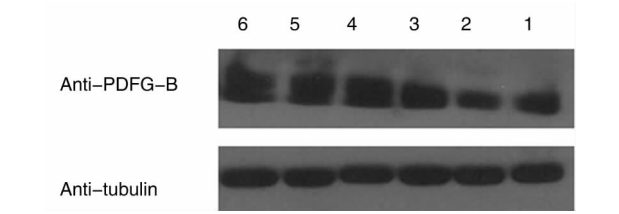


图 2 不同转染组 PDGF-B 蛋白的表达(1. siRNA-1, 2. siRNA-2,3. siRNA-3,4. siRNA-4,5. 阴性对照组, 6. 空脂质体组)

2.4 MTT 法测定喉癌 Hep-2 细胞增殖

si-PDGF-B mRNA 转染喉癌 Hep-2 细胞,转染率约为 73%。由表 3 可知, siRNA-4、阴性对照组及空脂质体组对细胞增殖无明显抑制;而 siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3 干预组均明显抑制细胞增殖,与 siRNA-4、阴性对照组及空脂质体组比较,差异具有统计学意义($P < 0. 05$),其中 siRNA-2 对喉癌 Hep-2 的抑制作用最明显,48 h 时抑制率为 40. 22%,与 siRNA-1 及 siRNA-3 比较差异无统计学意义($P > 0. 05$,表 3)。

表 3 MTT 法检测不同转染组喉癌 Hep-2 细胞增殖及抑制率

组别	siRNA-1	siRNA-2	siRNA-3	siRNA-4	阴性对照组	空脂质体组
A570 值	0.74±0.08	0.55±0.06	0.65±0.03	0.97±0.22	0.92±0.16	0.92±0.03
抑制率(%)	19.57 ^①	40.22 ^{①②}	29.35 ^①	-6.81	-0.61	0

注: ^①与空脂质体组及阴性对照组比较 $P < 0. 05$, ^②与 siRNA-1、siRNA-3 组比较 $P < 0. 05$

3 讨论

PDGF 是一种潜在的促间充质细胞有丝分裂刺激剂,由血小板释放,并由 4 种基因编码的 4 条多肽链组成 5 种二聚体,分别为 PDGF-

AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC 及 PDGF-DD^[3],PDGF 及其受体在许多肿瘤中与肿瘤的病理发生及血管生成有关^[1]。PDGF-BB 与其相应受体 PDGF-RB 结合导致受体内在的酪氨酸激酶激活,这种激活的受体可成为多蛋白聚合物的泊点,从而激活信号级联放大作用。这

些信号旁路包括 Ras-有丝分裂原激活蛋白激酶 (MAPK)、磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K)、Src 家族激酶、Stat 转录因子等。这些信号旁路的激活能够促进肿瘤细胞的增殖,进而通过自分泌和旁分泌的作用刺激肿瘤细胞、肿瘤间质细胞以及血管的生长^[4]。

RNA 干扰是指将外源性或内源性双链 RNA 导入细胞后引起与该段 RNA 同源的 mRNA 产生特异性降解,其相应的基因受到抑制。目前,siRNAs 作为一种转录后基因沉默的强大工具已被广泛用于基因功能的研究^[5,6]。本文通过构建 PDGF-B 链 mRNA 的 siRNAs 试图通过阻止 PDGF-B 的合成和分泌,探讨其对喉癌 Hep-2 细胞增殖的影响。

Real-time PCR 及 Westernblot 的结果表明笔者设计的 4 条 PDGF-B 链的 siRNA 均能靶向抑制 Hep-2 细胞 PDGF-B 链 mRNA 的表达,其中 siRNA-2 同时能明显抑制 PDGF-B 蛋白的表达,siRNA-2 抑制 Hep-2 细胞 PDGF-B 链 mRNA 和 PDGF-B 蛋白表达作用较另外 3 种 siRNA 明显,48 h 时对 PDGF-B 链 mRNA 的抑制率达到 67.91%,蛋白质抑制率达 65.09%,表明在 mRNA 水平上 siRNA-2 组对目标基因有最明显的抑制效率,在蛋白水平上 siRNA-2 组对 PDGF-B 表达也有明显的抑制作用,因此 siRNA2 为能有效地靶向沉默 Hep-2 细胞 PDGF-B 基因表达的 siRNA,被用于后续实验。阴性对照组对喉癌 Hep-2 细胞的影响和空脂质体组无显著性差异。不同 siRNA 对目标片段的抑制效果不尽相同,这可能与片段的序列和作用位点有关^[7-8]。

MTT 法检测结果显示转染成功后的喉癌 Hep-2 细胞增殖受抑制,其中 siRNA-2 组抑制细胞增殖作用最强,为 40.22%,并且与 PDGF-B mRNA 及蛋白抑制水平相一致,推测 PDGF-B 与喉癌 Hep-2 细胞增殖相关。实验结果显示阴性对照组及空脂质体组未出现这种细胞增殖抑制作用,说明 siRNA 的特异性和转染试剂和 siRNA 本身对细胞无明显的毒性作用。

通过实验笔者同时发现,虽然 si-PDGFB-2 对喉癌 Hep-2 细胞增殖的抑制与对照组相比有明显差异,但抑制率似乎并不高,考虑 siRNA-2 对 Hep-2 细胞 PDGF-B 蛋白水平抑制效果可能未达到最高,仍有 PDGF-B 蛋白的相当表达,同时促使细胞增殖的机理复杂,PDGF-B 本身也许并不是促使该细胞增殖的唯一或最重要的原因,还有其他更重要的因子参与了促使 Hep-2 细胞增殖侵袭的过程。

笔者将进一步应用 PDGF-B 的 siRNA 在后续的体外实验中,分析 PDGF-B 基因沉默后的生物学效应及其内在作用机制,为以 PDGF-B 基因为靶点的喉癌治疗提供可能的理论依据。

参考文献:

- [1] Board R, Jayson GC. Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR): a target for anticancer therapeutics [J]. Drug Resistance Updates, 2005, 8 (1 - 2): 75 - 83.
- [2] 朱正华,董频,於子卫,等. VEGF, PDGF 和 MVD 在喉癌中的表达及临床意义 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2003, 9 (4): 227 - 229.
- [3] Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF Family: Four gene products From Five dimeric isoforms [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2004, 15 (4): 197 - 204.
- [4] Campbell M, Trimble ER. Modification of PI3K-and MAPK-dependent chemotaxis in aortic vascular smooth muscle cells by protein kinase CbetaII [J]. Circ Res, 2005, 96 (2): 197 - 206.
- [5] Bantounas I, Phylactou LA, Uney JB. RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems [J]. J Molecular Endocrinol, 2004, 33 (3): 545 - 557.
- [6] Kim D, Rossi J. RNAi mechanisms and applications [J]. Biotechniques, 2008, 44 (5): 613 - 616.
- [7] Gonzalo T, Beljaars L, van de Bovenkamp M, et al. Local inhibition of liver fibrosis by specific delivery of a platelet-derived growth factor kinase inhibitor to hepatic stellate cells [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2007, 321 (3): 856 - 865.
- [8] Gaur A, Jewell DA, Liang Y, et al. Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines [J]. Cancer Res, 2007, 67 (6): 2456 - 2468.

(修回日期:2011-08-16)