

抑制IGF2基因的siRNA表达载体对肝癌Huh-7细胞增殖的抑制作用[△]

胡卫^{1*}, 吴胜兰², 王旷靖², 张良鹏², 潘兹书³, 汤绍辉^{2#}(1.武汉大学医院内科, 武汉 430072; 2.暨南大学附属第一医院消化内科, 广州 510632; 3.武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

中图分类号 R965;R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)22-3059-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.22.11

摘要 目的:研究抑制人胰岛素样生长因子2(IGF2)基因的siRNA表达载体对肝癌Huh-7细胞增殖的抑制作用。方法:将重组人甲胎蛋白(hAFP)和人端粒酶逆转录酶(hTERT)双启动子调控抑制IGF2基因的siRNA表达载体pGL3-hAFP-hTERT-siRNA3(简称siRNA3)转染Huh-7细胞和正常肝L-02细胞,另设阴性对照(载体pGL3-hAFP-hTERT)组和空白对照组。采用实时荧光定量聚合酶链反应法检测各组细胞转染48 h后IGF2 mRNA表达;酶标仪检测转染0、24、48、72 h后的细胞活性;流式细胞仪检测转染48 h后细胞周期、细胞凋亡;Western blot法检测细胞IGF2、增殖细胞核抗原(PCNA)、细胞周期蛋白(Cyclin)E2、Cyclin D2、Cdc2、Bcl-2蛋白表达水平。结果:与阴性对照组和空白对照组比较,转染siRNA3的Huh-7细胞中IGF2 mRNA表达明显减弱,转染48、72 h后Huh-7细胞活性明显降低,G₁期Huh-7细胞明显增加,S期Huh-7细胞明显减少;Huh-7细胞早期、晚期及总凋亡百分比均明显增加,IGF2、PCNA、Cyclin E2、Cyclin D2、Cdc2和Bcl-2蛋白表达均明显减弱,以上差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。转染siRNA3表达载体的L-02细胞上述指标均无明显变化($P > 0.05$)。结论:重组hAFP和hTERT双启动子调控针对IGF2基因的siRNA可特异性抑制Huh-7细胞IGF2表达及细胞增殖,其可能与下调IGF2 mRNA及蛋白表达,进而引起细胞增殖相关基因PCNA、细胞周期调控相关基因Cyclin E2、Cyclin D2、Cdc2及细胞凋亡调控相关基因Bcl-2蛋白表达下调有关。

关键词 重组hAFP/hTERT双启动子;RNA干扰;人胰岛素样生长因子2基因;肝癌Huh-7细胞

Inhibitory Effect of siRNA Expression Vector Inhibiting IGF2 Gene on the Proliferation of Hepatoma Cell Line Huh-7

HU Wei¹, WU Sheng-lan², WANG Kuang-jing², ZHANG Liang-peng², PAN Zi-shu³, TANG Shao-hui²(1.Dept. of Internal Medicine, the Hospital of Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2.Dept. of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3.College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the inhibitory effect of siRNA expression vector inhibiting human insulin-like growth factor 2 (IGF2) gene on the proliferation of hepatoma cell line Huh-7. METHODS: siRNA expression vector pGL3-hAFP-hTERT-siRNA3 ("siRNA3") which inhibited IGF2 gene by dual promoter regulation of recombinant human alpha-foetoprotein (hAFP) and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) was transfected into the Huh-7 cell and normal hepatocyte L-02, and then a negative control group (vector pGL3-hAFP-hTERT) and a blank control group were set up. IGF2 mRNA expression was detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction 48 h after transfection into the cells in all groups; the activity of the cells by the microplate reader 0, 24, 48 and 72 h thereafter; and the cell cycle and apoptosis by the flow cytometer 48 h thereafter, and the changes in the protein levels of IGF2, PCNA, Cyclin E2, Cyclin D2, Cdc2 and Bcl-2 in the cell were detected by Western blot. RESULTS: Compared with the negative control group and blank control group, IGF2 mRNA expression in the Huh-7 cell transfected with siRNA3 was obviously weaker; at 48 and 72 h after transfection, the activity of Huh-7 cell significantly reduced, Huh-7 cells at G₁ phase obviously increased and those at S phase markedly decreased; the occurrence of early, late and total apoptosis in Huh-7 cells apparently increased, and the protein expression of IGF2, PCNA, Cyclin E2, Cyclin D2, Cdc2 and Bcl-2 in cells significantly weakened, with statistically significance ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). No obvious change in the above-mentioned indexes could be found in L-02 cells transfected with siRNA3 expression vector ($P > 0.05$). CONCLUSIONS: siRNA which inhibited IGF2 gene by dual promoter regulation of recombinant hAFP and hTERT can specially inhibit IGF2 gene expression and the proliferation of Huh-7 cells, which may be involved with down-regulated protein expression of cell proliferation-associated gene PCNA, cell cycle control-associated genes Cyclin E2, Cyclin D2 and Cdc2 and apoptosis regulation-associated gene Bcl-2 as a result of down-regulated IGF2 mRNA expression and protein expres-

△基金项目:湖北省自然科学基金资助项目(No.2013CFC076)
*主任医师。研究方向:胃肠及肝胆疾病的诊治。电话:027-68764427。E-mail:wiwine@sina.com
#通信作者:主任医师,博士。研究方向:肝病学。电话:020-38688039。E-mail:tangshaohui205@163.com

sion.

KEYWORDS Recombinant hAFP/hTERT dual promoter; RNA interference; Human insulin-like growth factor 2 gene; Hepatoma cell line Huh-7

人胰岛素样生长因子2 (Insulin-like growth factor 2, IGF2)是一种重要的胎儿生长因子及有丝分裂原,其基因含9个外显子和4个启动子(P1~P4)。在胎儿及新生儿期,由于P2~P4启动子激活而导致IGF2大量表达,参与肝脏、肺脏、小肠等组织器官的生长发育;出生2个月后,肝脏IGF2表达量显著降低^[1-2]。近年来研究表明,由于P3和P4启动子再激活而导致的IGF2过表达与肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)的发生密切相关^[3-6]。那么,抑制IGF2的过表达是否能成为有效治疗HCC的基因治疗靶点?目前尚未见相关的研究报道。

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是指与靶基因序列同源的双链RNA(Double-stranded RNA, dsRNA)所诱导的一种特异性基因沉默现象。本研究团队构建了重组人甲胎蛋白(hAFP)和人端粒酶逆转录酶(hTERT)双启动子调控抑制IGF2基因的小干扰RNA(siRNA)表达载体pGL3-hAFP-hTERT-siRNA3(简称siRNA3)^[7]。本文研究其对肝癌Huh-7细胞增殖的抑制作用,以期为肝癌的基因治疗药物的开发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Light Cycler480型荧光定量聚合酶链式(PCR)反应仪(美国Roche公司);ELX-808IU型酶标仪(美国Bio-Tek公司);BD Accuri C6型流式细胞仪(美国BD公司)。

1.2 药品与试剂

siRNA3及其阴性对照载体pGL3-hAFP-hTERT(暨南大学附属第一医院消化内科研究团队构建^[7],该载体包含pGL3-basic质粒基本骨架、hAFP及hTERT基因启动子核心片段及表达siRNA3的序列,其中siRNA3为高效沉默IGF2基因的干扰序列);Lipofectamine™ 2000转染试剂(美国Invitrogen公司);Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒(荷兰Keygene公司);总RNA抽提(Trizol)试剂盒及细胞增殖检测试剂盒(美国Promega公司);抗IGF2、抗增殖细胞核抗原(PCNA)、抗细胞周期蛋白(Cyclin)E2、抗Cyclin D2、抗Cdc2、抗Bcl-2及抗GAPDH抗体(英国Abcam公司)。

1.3 细胞株

肝癌细胞株Huh-7、正常肝细胞株L-02购于武汉大学中国典型培养物保藏中心。

2 方法

2.1 细胞中IGF2 mRNA 表达的检测

采用Lipofectamine™ 2000转染试剂将siRNA3(siRNA3组)及其阴性对照载体pGL3-hAFP-hTERT(阴性对照组)分别转染Huh-7细胞及L-02细胞(转染质粒的质量浓度为0.5 μg/μl);另设置空白对照组。转染48 h后收集细胞,按Trizol试剂盒说明抽提细胞总RNA,逆转录合成cDNA并进行荧光定量PCR分析。IGF2 mRNA上游引物为5'-CTGGAGACGTACTGTGCTA-3',下游引物为5'-GACTGCTTCCAGGTGTCAT-3',片段长度为128 bp;以18s rRNA为内参照。采用相对定量法表示目的基因表达量。试验过程中,每个共转染试验同时做3个复孔,并连续进行2次试验。

2.2 细胞增殖活性的检测

取“2.1”项下3组转染细胞,计数,调整细胞密度为 1×10^5 ml⁻¹,分到96孔板,每孔100 μl,收集转染0、24、48、72 h的细胞,加入MTS试剂,孵育4 h后,酶标仪测定490 nm波长处的

光密度(OD)。

2.3 细胞周期的检测

取“2.1”项下3组转染48 h的细胞,调整细胞密度为 1×10^6 ml⁻¹,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗2次,加入预冷的70%乙醇,于4℃固定过夜。1 000×g离心5 min收集细胞,用PBS再洗1次,加入含50 μg/ml溴化丙锭、100 μg/ml核糖核酸酶(RNase)A的PBS,4℃避光孵育30 min,流式细胞仪检测各组细胞的荧光强度。

2.4 细胞凋亡检测

取“2.1”项下3组转染48 h的细胞,调整细胞密度为 1×10^6 ml⁻¹。取0.5 ml细胞悬液,加入1.25 μl Annexin V-FITC,置于室温避光反应时间为15 min。1 000×g离心5 min收集细胞,用0.5 ml预冷的1×结合缓冲液轻轻重悬,加入10 μl碘化丙锭,置于冰上避光保存,用流式细胞仪检测各组细胞荧光强度。

2.5 细胞中IGF2、PCNA、Cyclin E2、Cyclin D2、Cdc2、Bcl-2 蛋白表达的检测

采用Western blot法,取“2.1”项下3组转染48 h的细胞,转染细胞总蛋白,测定蛋白浓度后,行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转硝酸纤维素膜,用脱脂奶粉封闭。加入稀释的(1:400~1:1 000)一抗(抗IGF2、抗PCNA、抗Cyclin E2、抗Cyclin D2、抗Cdc2、抗Bcl-2及抗GAPDH抗体)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,增强化学发光显影,凝胶成像系统摄像及分析各蛋白的表达情况。

2.6 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料的比较采用ANOVA或独立样本t检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 IGF2 mRNA 表达结果

在Huh-7肝癌细胞中,与阴性对照组和空白对照组比较,siRNA3组细胞中IGF2 mRNA表达减弱,差异有统计学意义($P < 0.01$);而在L-02正常肝细胞中,各组细胞中IGF2 mRNA表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组细胞中IGF-2 mRNA表达情况见图1。

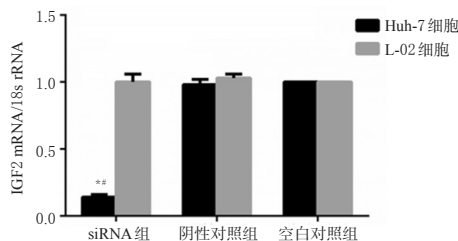


图1 各组细胞中IGF-2 mRNA表达情况

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.01$;与空白对照组比较,** $P < 0.01$

Fig 1 IGF-2 mRNA expression in the cells in all groups

Note: vs. negative control group, * $P < 0.01$; vs. blank control group, ** $P < 0.01$

3.2 细胞增殖活性结果

在Huh-7肝癌细胞中,与阴性对照组和空白对照组比较,siRNA3组细胞转染48、72 h后细胞增殖活性降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);而在L-02正常肝细胞中,各组细胞增殖活性差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组细胞的增殖活性变化情况见图2。

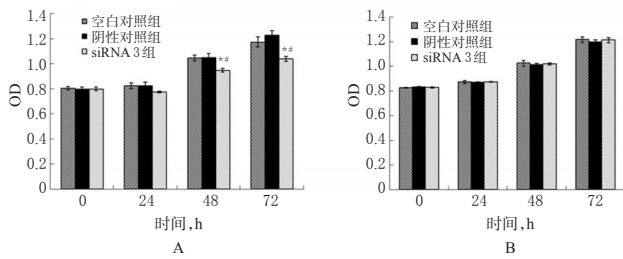


图2 各组细胞的增殖活性变化情况

A. Huh-7 细胞; B. L-02 细胞

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

Fig 2 The changes in the proliferation and activity of the cells in all groups

A. Huh-7 cells; B. L-02 cells

Note: vs. negative control group, * $P < 0.05$; vs. blank control group, # $P < 0.05$

3.3 细胞周期结果

在 Huh-7 肝癌细胞中, 与阴性对照组及空白对照组比较, siRNA3 组细胞 G₁ 期比例增加, S 期细胞比例减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 而在 L-02 正常肝细胞中, 各组细胞各细胞周期比例差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组细胞的细胞周期情况见图 3。

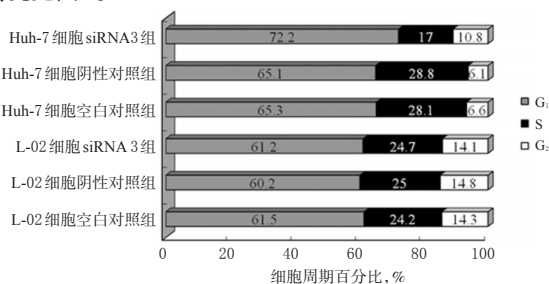


图3 各组细胞的细胞周期情况

Fig 3 The cell cycle of the cells in all groups

3.4 细胞凋亡结果

在 Huh-7 肝癌细胞中, 与阴性对照组及空白对照组比较, siRNA3 组细胞早期、晚期及总凋亡均增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 而在 L-02 正常肝细胞中, 各组细胞在各周期细胞凋亡差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组细胞的细胞凋亡情况见图 4。

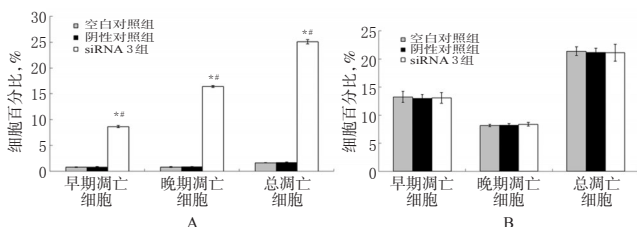


图4 各组细胞凋亡情况

A. Huh-7 细胞; B. L-02 细胞

注: 与阴性对照组比较, * $P < 0.01$; 与空白对照组比较, # $P < 0.01$

Fig 4 Apoptosis for the cells in all groups

A. Huh-7 cells; B. L-02 cells

Note: vs. negative control group, * $P < 0.01$; vs. blank control group, # $P < 0.01$

3.5 细胞蛋白表达结果

在 Huh-7 肝癌细胞中, 与阴性对照组及空白对照组比较, siRNA3 组细胞中 IGF2、PCNA、Cyclin D2、Cyclin E2、Cdc2、Bcl-2 蛋白表达降低, 尤其是 Cyclin E2 蛋白表达水平极低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 而在 L-02 正常肝细胞中, 各组细胞上述蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组细胞中 IGF2、PCNA、Cyclin E2、Cyclin D2、Cdc2 和 Bcl-2 蛋白表达的电泳图见图 5, 表达水平见图 6。

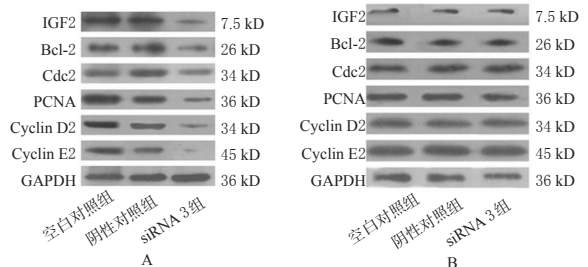


图5 各组细胞中 IGF2、PCNA、Cyclin E2、Cyclin D2、Cdc2 和 Bcl-2 蛋白表达的电泳图

A. Huh-7 细胞; B. L-02 细胞

Fig 5 Electrophoretogram of protein expression of IGF2, PCNA, Cyclin E2, Cyclin D2, Cdc2 and Bcl-2 in the cells in all groups

A. Huh-7 cells; B. L-02 cells

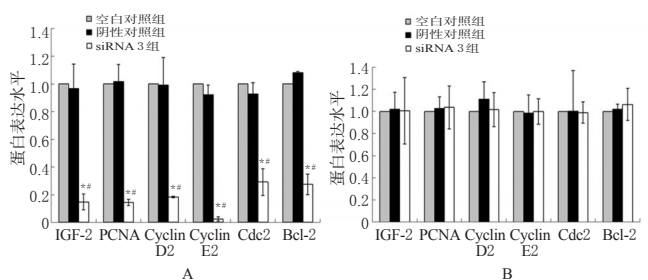


图6 各组细胞中 IGF2、PCNA、Cyclin E2、Cyclin D2、Cdc2 和 Bcl-2 蛋白表达水平

A. Huh-7 细胞; B. L-02 细胞

注: 与阴性对照组比较, * $P < 0.01$; 与空白对照组比较, # $P < 0.01$

Fig 6 Protein expression of IGF2, PCNA, Cyclin E2, Cyclin D2, Cdc2 and Bcl-2 in the cells in all groups

A. Huh-7 cells; B. L-02 cells

Note: vs. negative control group, * $P < 0.01$; vs. blank control group, # $P < 0.01$

4 讨论

siRNA 是 RNAi 过程中的关键中间产物, 目前制备 siRNA 的方法主要分为两类: 体外制备法与表达载体法。前者制备的 siRNA 由于易降解、干扰作用短暂, 实际应用范围较为局限; 后者是通过构建表达 siRNA 的质粒或病毒载体, 然后导入细胞内转录产生 siRNA, 则能克服前者不足, 可实现较长时间的稳定干扰^[6]。构建 siRNA 表达载体是通过将 siRNA 对应的 DNA 双链序列克隆到驱动小发夹 RNA 表达所用的启动子下游而实现的。驱动这些启动子转录的酶有 RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II, Pol II) 和 RNA 聚合酶 III (Pol III), 这些启动子分别被称为 Pol II 和 Pol III 启动子, 前者包括 hTERT 及 hAFP 启动子等, 后者包括 H1、U6、tRNA 启动子等^[7]。

Pol III 启动子的优点是能够在精确的位置启动与终止转录, 表达的 siRNA 可以在体内实现高效而稳定的基因沉默; 但

其不足是无组织特异性,在肿瘤基因治疗时可能导致人体正常组织损伤^[8]。Pol II 启动子的优点是具有组织特异性,可使靶基因在特定的肿瘤组织中沉默,但其不足是转录活性较低^[9]。有研究显示,串联两个启动子的核心序列可以增强其转录活性^[10-11]。hAFP 是目前特异性最强的 HCC 肿瘤标记物, HCC 中 hAFP 的阳性率约为 70%~90%。hTERT 在 85%~90% 的恶性肿瘤及 86% HCC 中高表达,而在正常细胞中则低表达或几乎不表达^[12]。因此,将 hAFP 及 hTERT 启动子二者串联构建双启动子来调控 siRNA 表达,理论上可能只对表达 hAFP 和(或)hTERT 的肝癌细胞靶基因产生特异性沉默作用,而对正常肝细胞几乎不产生影响。

有研究发现,IGF2 过表达与 HCC 的发生发展密切相关^[13-14]。Dong ZZ 等^[13]报道, HCC 的癌灶、癌旁和远离癌灶的非癌组织中 IGF2 mRNA 的表达率分别为 100%、53.3% 和 0,提示 IGF2 较特异表达于癌变肝细胞及部分不典型增生的癌前肝细胞,正常肝细胞则无表达。杨冬华等^[14]将反义 IGF2 导入 HepG2 肝癌细胞后,发现其增殖率下降,凋亡率增加,且显著抑制肝癌细胞的恶性表型。上述结果提示,IGF2 过表达对 HCC 的发生发展具有重要影响,抑制 IGF2 过表达可能成为 HCC 治疗的新靶点。

笔者将构建好的 siRNA3 分别转染 Huh-7 肝癌细胞(表达 IGF2、hAFP 及 hTERT)及 L-02 正常肝细胞(表达 IGF2,不表达 hAFP 及 hTERT),结果显示,Huh-7 肝癌细胞 IGF2 mRNA 表达量显著下调,细胞活性明显降低,细胞周期阻滞于 G₁ 期,细胞凋亡显著增加,提示肝癌细胞生长受到明显抑制;而 L-02 正常肝细胞 IGF2 mRNA 表达量及增殖活性、细胞周期、凋亡等生物学特征无明显均改变。这些结果表明,hAFP/hTERT 双启动子调控的 siRNA 可特异性抑制肝癌细胞 IGF2 表达及细胞活性,对正常肝细胞无明显影响。进一步基因表达检测结果显示,Huh-7 肝癌细胞 IGF2 基因、细胞增殖相关基因(PCNA)、细胞周期调控相关基因(Cyclin D2、Cyclin E2、Cdc2)以及细胞凋亡调控相关基因(Bcl-2)的蛋白表达水平显著降低,而 L-02 正常肝细胞上述指标均无明显变化。此结果提示:(1)PCNA、Cyclin D2、Cyclin E2、Cdc2 及 Bcl-2 基因可能是 IGF2 基因的下游调控靶基因,一般情况下 IGF2 基因对其调控可能是正向调控;(2)肝癌细胞中 IGF2 基因的特异性表达抑制可导致上述与细胞增殖、细胞周期及凋亡调控相关基因表达水平显著降低,进而引起 Huh-7 细胞生长繁殖明显抑制,而正常肝细胞生长特性不受影响;(3)采用 RNA 干扰技术抑制 IGF2 基因表达可能成为 HCC 基因治疗的一个新靶点。本结果与 Chen L 等^[10]的研究报道相似,他们发现 hAFP/hTERT 双启动子介导的 MicroRNA-26a 表达质粒可特异性抑制肝癌细胞的生长增殖,并且发现串联的双启动子转录活性较单个启动子活性高,同时其抑制肝癌细胞生长效果更为显著。

参考文献

[1] Livingstone C. IGF2 and cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2013, 20(6):321.
 [2] Dong ZZ, Yao DF, Wu W, et al. Correlation between epigenetic alterations in the insulin growth factor- II gene and hepatocellular carcinoma[J]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2012, 20(8):593.

[3] Couvert P, Carrié A, Tezenas du Montcel S, et al. Insulin-like growth factor 2 gene methylation in peripheral blood mononuclear cells of patients with hepatitis C related cirrhosis or hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2012, 36(4):345.
 [4] Tang SH, Hu W, Hu JJ, et al. Hepatitis B virus X protein promotes P3 transcript expression of the insulin-like growth factor 2 (IGF2) gene via inducing hypomethylation of P3 promoter in hepatocellular carcinoma[J]. *Liver Int*, 2014, doi:10.1111/liv.12469.
 [5] 汤绍辉,吴胜兰,王旷靖,等. hAFP 及 hTERT 双启动子调控的针对人 IGF-II 基因的 siRNA 特异性抑制人肝癌细胞生长[J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(8):1 422.
 [6] Giering JC, Grimm D, Storm TA, et al. Expression of shRNA from a tissue-specific pol II promoter is an effective and safe RNAi therapeutic [J]. *Mol Ther*, 2008, 16(9):1 630.
 [7] Heng TL, Chang WT. Construction of simple and efficient DNA vector-based short hairpin RNA expression systems for specific gene silencing in mammalian cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 408(3):223.
 [8] Ren GL, Fang Y, Ma HH, et al. The short hairpin RNA driven by polymerase II suppresses both wild-type and lamivudine-resistant hepatitis B virus strains[J]. *Antivir Ther*, 2007, 12(6):865.
 [9] Tomizawa M, Saisho H. Insulin-like growth factor (IGF)-II regulates CCAAT/enhancer binding protein α expression via phosphatidylinositol 3 kinase in human hepatoblastoma cell lines[J]. *Cell Biochem*, 2007, 102(1):161.
 [10] Chen L, Zheng J, Zhang Y, et al. Tumor-specific expression of MicroRNA-26a suppresses human hepatocellular carcinoma growth via cyclin-dependent and -independent pathways[J]. *Mol Ther*, 2011, 19(8):1 521.
 [11] Hu YR, Shen YY, Ji BF, et al. Combinational RNAi gene therapy of hepatocellular carcinoma by targeting human EGFR and TERT[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 42(4):387.
 [12] Qiu LW, Yao DF, Zong L. Abnormal expression of insulin-like growth factor- II and its dynamic quantitative analysis at different stages of hepatocellular carcinoma development[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2008, 7(4):406.
 [13] Dong ZZ, Yao M, Qian J, et al. Abnormal expression of insulin-like growth factor- II and intervening of its Mrna transcription in the promotion of HepG2 cell apoptosis[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2013, 11(30):4 655.
 [14] 杨冬华,张鸣青,杜江,等.人胰岛素样生长因子 II 反义 RNA 对肝癌细胞恶性表型的抑制作用[J]. *中华肝脏病杂志*, 1999, 7(1):39.

(收稿日期:2014-12-10 修回日期:2015-03-16)

(编辑:邹丽娟)