

沉默 Bmi-1 基因表达对人小细胞肺癌细胞 H1963 增殖与侵袭的抑制作用[△]

饶进军^{1*}, 何关生², 毛楠³, 吕琳¹, 腊蕾^{4*} (1. 南方医科大学药学院, 广州 510515; 2. 广州医科大学附属第二医院药学部, 广州 510260; 3. 广州市番禺中心医院药学部, 广州 511400; 4. 南方医科大学附属南方医院药学部, 广州 510515)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)33-3096-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.33.08

摘要 目的: 探讨沉默 Bmi-1 基因对人小细胞肺癌细胞 H1963 增殖与侵袭的抑制作用。方法: 用小分子干扰 RNA (siRNA) 沉默 Bmi-1 基因, 以 100 nmol/L 特异性 Bmi-1 的 siRNA 转染 H1963 细胞为试验组, 以未转染细胞为空白对照组, 以转染阴性序列 Neg-siRNA 细胞为阴性对照组。采用蛋白质印迹法检测 siRNA 对 Bmi-1 的基因沉默效果; 经 MTT 法、流式细胞术、Transwell 侵袭试验分别检测各组细胞的增殖活性、周期分布及侵袭能力, 再用蛋白质印迹法检测各组细胞中抑癌基因 P16、P14 和上皮型钙黏蛋白 (E-cadherin)、神经型钙黏蛋白 (N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin)、基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)、基质金属蛋白酶组织抑制因子 1 (TIMP-1) 的蛋白表达情况。结果: 与空白对照组和阴性对照组比较, 试验组细胞中 Bmi-1 蛋白的表达明显降低 ($P < 0.05$); 与阴性对照组比较, 试验组细胞的增殖抑制率明显升高 ($P < 0.05$), 主要表现为 G₀/G₁ 期细胞比例明显增加, S 和 G₂/M 期细胞比例明显减少 ($P < 0.05$); 侵袭细胞数明显减少 ($P < 0.01$); 细胞中 N-cadherin、Vimentin、MMP-2 蛋白表达明显减弱 ($P < 0.05$), 而 P16、P14、E-cadherin、TIMP-1 蛋白表达明显增强 ($P < 0.05$)。结论: 沉默 Bmi-1 基因可通过阻滞细胞 G₁/S 期转化及影响侵袭相关蛋白的表达来显著抑制 H1963 细胞的增殖和侵袭能力。

关键词 Bmi-1 基因; 小分子干扰 RNA; 人小细胞肺癌细胞 H1963; 侵袭; 增殖

Inhibitory Effect of Silencing Bmi-1 Gene Expression on Proliferation and Invasion of Human Small Cell Lung Cancer H1963 Cell

RAO Jin-jun¹, HE Guan-sheng², MAO Nan³, LYU Lin¹, LA Lei⁴ (1. School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Dept. of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China; 3. Dept. of Pharmacy, Guangzhou Panyu Central Hospital, Guangzhou 511400, China; 4. Dept. of Pharmacy, Nanfang Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the inhibitory effect of silencing Bmi-1 gene on proliferation and invasion of human small cell lung cancer H1963 cell. METHODS: The silencing Bmi-1 gene was prepared by siRNA transfected Bmi-1 gene. The human small cell lung cancer H1963 cells transfected with 100 nmol/L specificity of Bmi-1 siRNA were included in test group. The non-transfected cells were included in blank control group, and transfected negative sequence Neg-siRNA cells were included in negative control group. The effect of siRNA on Bmi-1 gene silencing was detected by Western blot assay. The proliferation ability, cell cycle and invasion ability of H1963 cells were detected by MTT assay, flow cytometry and Transwell assay. The protein expression of P16, P14, E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, MMP-2 and TIMP-1 were verified by Western blotting. RESULTS: Compared with blank control group and negative control group, the protein expression of Bmi-1 was remarkably decreased in test group ($P < 0.05$). Compared with negative control group, the proliferation of H1963 cells in test group was significantly inhibited ($P < 0.05$), the proportion of H1963 cells increased significantly at G₀/G₁ phase while decreased significantly at S and G₂/M phase ($P < 0.05$). The number of invasive cells was decreased significantly ($P < 0.01$); Bmi-1-siRNA could also dramatically down-regulate the expression of N-cadherin, Vimentin, MMP-2 and up-regulate the expression of P16, P14, E-cadherin, TIMP-1 in H1963 cells. CONCLUSIONS: Bmi-1-siRNA could inhibit proliferation and invasion ability of H1963 cells by blocking cell transformation at G₁/S phase and inhibiting related protein expression.

KEYWORDS Bmi-1 gene; siRNA; Human small cell lung cancer H1963 cell; Invasion; Proliferation

[△] 基金项目: 广东省教育部产学研结合项目 (No. 2012B091100465); 广东省自然科学基金项目 (No. S2012010008965)

* 副教授, 博士。研究方向: 肿瘤药理。E-mail: araojinjun@126.com

通信作者: 副主任药师, 博士。研究方向: 肿瘤药理。E-mail: la-lei88@163.com

小细胞肺癌 (Small cell lung cancer, SCLC) 属肺癌的一种未分化型, 发病率约占肺癌的 15%~20%, 具有分裂指数高、倍增时间短、侵袭能力强等特点; 确诊时大多已出现远处转移, 失去手术治疗机会^[1]。铂类联合依托泊苷是当前治疗 SCLC 的一线方案, 但由于对药物的耐受以及肿瘤细胞的高转移率, 临床治疗效果很不满意, 患者的平均生存期仅有 15~20

个月^[1]。Bmi-1属多梳基因(Polycomb group genes, PcG)家族,具有遏制抑癌基因表达(如INK4a/ARF)、诱导细胞恶性转化、维护肿瘤干细胞更新及促进癌细胞侵袭转移等作用,被认为是肿瘤恶性标记之一^[2],是一个潜在的抗肿瘤新靶点,目前已被试用于多种肿瘤^[3-4]。近来研究发现,98.4%的SCLC病例Bmi-1呈现过表达,显示Bmi-1在SCLC细胞的生长繁殖中有重要作用^[5],但对于Bmi-1能否作为治疗SCLC的靶点,目前尚未见报道。本研究拟以人SCLC细胞H1963作为研究对象,通过小分子干扰RNA(siRNA)转染Bmi-1得到沉默Bmi-1基因,研究沉默Bmi-1基因对H1963细胞增殖与侵袭的抑制作用,以期对SCLC的治疗提供新思路和新方法。

1 材料

1.1 仪器

倒置显微镜(日本Nikon公司);5810R型高速离心机(德国Eppendorf公司);M680型酶标仪、蛋白质印迹法(Western Blot)印迹转移电泳仪系统(美国Bio-Rad公司);FACS Calibur型流式细胞仪(美国BD公司)。

1.2 药品与试剂

F12K培养基、胎牛血清(美国Gibco公司);siRNA(广州锐博生物科技有限公司,纯度:99.9%);阳离子脂质体Lipofectamine RNA imax(美国Invitrogen公司);MTT(美国Sigma公司);细胞周期检测试剂盒(武汉碧云天生物技术研究所);Matrigel基质胶(美国BD公司);兔抗人Bmi-1、抑癌基因(P16、P14)和上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)、神经型钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、基质金属蛋白酶2(MMP-2)、基质金属蛋白酶组织抑制因子1(TIMP-1)、 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(IgG-HRP)二抗(美国CST公司);增强化学发光(ECL)试剂盒(美国Mili-pore公司);其余试剂均为国产分析纯。

1.3 细胞

H1963细胞株购自中国科学院上海细胞库。

2 方法

2.1 细胞培养与siRNA干扰

H1963细胞常规培养于含10%胎牛血清的F12K培养基中,取对数生长期细胞经胰酶消化,按每孔 1.5×10^5 个接种于6孔板,每孔 5×10^3 个接种于96孔板。siRNA转染Bmi-1基因序列为5'-GGGAAAGUGUAUGAUAAAUTT-3'、阴性对照序列Neg-siRNA为5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',以《广州锐博生物科技有限公司siRNA产品说明》推荐的siRNA剂量(100 nmol/L),按照lipofectamine RNA imax操作说明书进行转染。

2.2 Western blot法检测siRNA对H1963细胞Bmi-1的基因沉默效果

取“2.1”项接种于6孔板的细胞,随机分组,每组3个复孔,即试验组(100 nmol/L特异性Bmi-1的siRNA转染)、阴性对照组(100 nmol/L Neg-siRNA转染)和空白对照组。细胞转染48 h后分别提取细胞总蛋白,以二喹啉甲酸(BCA)法测定浓度。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离总蛋白后,半干法转印至PVDF膜上,于含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液中室温封闭1 h,以1:1 000稀释比例的一抗4℃孵育过夜。TBST缓冲液洗涤5 min \times 3次后用1:2 000稀释的

IgG-HRP二抗室温孵育1 h, TBST缓冲液洗膜5 min \times 3次, ECL显色后, X光胶片曝光成像。将胶片进行扫描, 蛋白表达强度用目的蛋白条带的灰度和内参 β -actin蛋白条带灰度的比值表示, 蛋白条带灰度采用Gel-Pro analyzer 4.0软件进行分析。

2.3 MTT法检测沉默Bmi-1基因对细胞增殖能力的影响

取“2.1”项接种于96孔板的细胞,随机分组同“2.2”项,每组6个复孔。各组细胞在转染后1、2、3、4、5 d分别每孔加MTT(5 mg/ml)10 μ l, 4 h吸出孔内液体,每孔加入二甲亚砜(DMSO)150 μ l,震荡10 min后检测570 nm波长下的光密度(OD)值,并按公式计算抑制率(%)=(1-给药组平均OD值/空白对照组平均OD值) \times 100%。

2.4 流式细胞仪检测沉默Bmi-1基因对细胞周期分布的影响

取“2.1”项接种于6孔板的细胞,随机分组同“2.2”项,每组3个复孔。各组细胞转染48 h后,收集细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,调整细胞浓度为 2×10^5 L⁻¹后用70%乙醇4℃保存过夜, PBS洗去固定液后,加入500 μ l碘化丙啶染色液,37℃避光30 min,流式细胞仪检测细胞周期分布情况。

2.5 Transwell侵袭试验检测沉默Bmi-1基因对细胞侵袭能力的影响

取“2.1”项接种于6孔板的细胞,随机分组同“2.2”项,每组3个复孔。各组细胞转染48 h后胰酶消化成单个细胞,无血清的F12K培养基洗2次,调整细胞浓度为 3×10^5 ml⁻¹。将Matrigel胶(预先以DMEM培养基按1:8稀释)按每孔50 μ l均匀铺于Transwell小室中,在上室加入100 μ l细胞悬液,在下室加入600 μ l含10%胎牛血清的F12K培养基。培养24 h后,取出上室用棉签将未迁移过去的上室内表面的细胞轻轻拭去,甲醇固定细胞,结晶紫染色,倒置显微镜下取5个视野(\times 200)计数穿膜细胞平均值。

2.6 Western Blot法检测沉默Bmi-1基因对P16、P14、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、MMP-2、TIMP-1蛋白表达的影响

取“2.1”项接种于6孔板的细胞,随机分组同“2.2”项,每组3个复孔。各组细胞转染48 h后提取总蛋白,按“2.2”项下方法检测抑癌基因(P16、P14)和侵袭相关蛋白(E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、MMP-2、TIMP-1)表达。

2.7 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义,试验重复3次。

3 结果

3.1 细胞Bmi-1的基因沉默效果

转染48 h后,与空白对照组和阴性对照组比较,试验组H1963细胞中Bmi-1蛋白表达量下调80%,差异具有统计学意义($P < 0.05$),表明siRNA能有效沉默细胞中的Bmi-1基因表达。各组细胞中Bmi-1蛋白表达的电泳图见图1。

3.2 细胞增殖情况

与阴性对照组比较,试验组细胞在转染3、4、5 d时的增殖抑制率明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中3 d时增殖抑制率最高[增殖抑制率为(63.61 \pm 6.97)%, $P < 0.01$],表明沉默Bmi-1基因可显著抑制H1963细胞的增殖。各组细胞的增殖抑制率比较见图2。

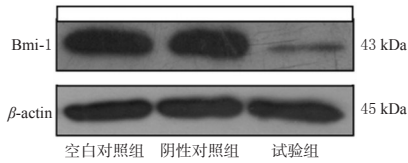


图1 各组细胞中Bmi-1蛋白表达的电泳图

Fig 1 Electrophoretogram of protein expression of Bmi-1 in each group

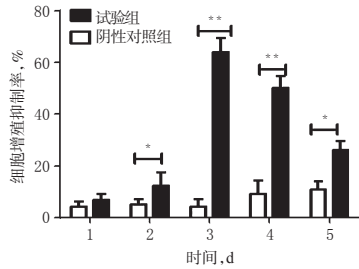


图2 各组细胞的增殖抑制率比较

与阴性对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig 2 Comparison of the inhibitory effect of cell in each group

vs. negative control group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.3 细胞周期分布情况

与空白对照组和阴性对照组比较, 试验组细胞在 G_0/G_1 期的比例明显增加 ($P < 0.05$), S 期、 G_2/M 期的比例明显减少 ($P < 0.05$), 表明沉默 Bmi-1 基因可使 H1963 细胞发生 G_1/S 期阻滞。各组细胞的周期分布见表 1。

表1 各组细胞的周期分布 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Distribution of cell cycle in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	细胞比例, %		
	G_0/G_1	S	G_2/M
空白对照组	48.69 ± 0.83	26.34 ± 0.91	24.97 ± 0.75
阴性对照组	46.77 ± 0.95	27.71 ± 0.84	25.56 ± 1.01
试验组	69.72 ± 1.25*	15.92 ± 0.89*	14.36 ± 1.09*

与空白对照组和阴性对照组比较: * $P < 0.05$

vs. blank control group and negative control group: * $P < 0.05$

3.4 细胞侵袭能力变化

空白对照组、阴性对照组和试验组穿透基底膜的细胞数分别为 (222 ± 51)、(204 ± 44)、(53 ± 17) 个, 试验组侵袭细胞数明显低于空白对照组和阴性对照组 ($P < 0.01$), 表明沉默 Bmi-1 基因可使细胞侵袭能力显著降低。各组细胞穿透基底膜的显微镜图见图 3。

3.5 细胞抑癌基因 P16、P14 的表达情况

与空白对照组和阴性对照组比较, 试验组细胞的 P16、P14 蛋白表达分别升高 180%、320%, 表明沉默 Bmi-1 基因可显著上调抑癌基因 P16、P14 表达。各组细胞中 P16、P14 蛋白表达的电泳图见图 4。

3.6 细胞 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、MMP-2、TIMP-1 蛋白的表达情况

与空白对照组和阴性对照组比较, 试验组细胞的 E-cadherin、TIMP-1 蛋白表达量分别上调 110%、210%, N-cadherin、Vimentin、MMP-2 蛋白表达量分别下调 70%、40%、80%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明沉默 Bmi-1 基因可显著影响细胞侵袭能力的相关蛋白表达, 电泳图见图 5。

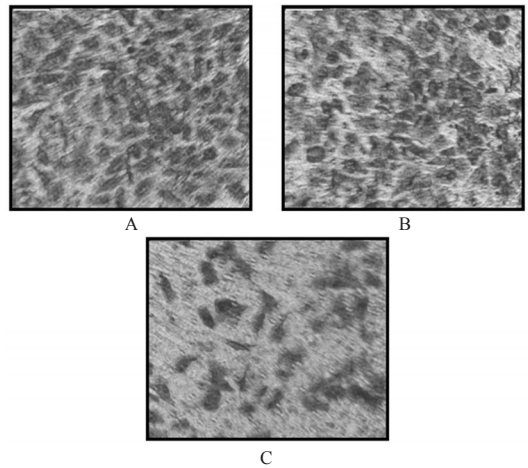


图3 各组细胞穿透基底膜的显微镜图 ($\times 200$)

A. 空白对照组; B. 阴性对照组; C. 试验组

Fig 3 Micrograph of cells penetrating the basement membrane in each group ($\times 200$)

A. blank control group; B. negative control group; C. test group

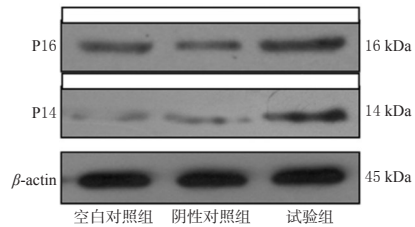


图4 各组细胞中P16、P14蛋白表达的电泳图

Fig 4 Electrophoretogram of protein expression of P16 and P14 in each group

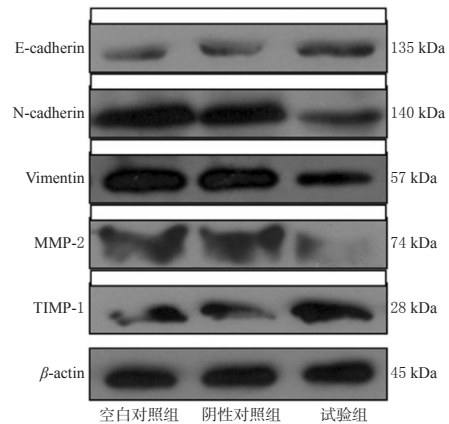


图5 各组细胞中E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、MMP-2、TIMP-1蛋白表达的电泳图

Fig 5 Electrophoretogram of protein expression of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, MMP-2 and TIMP-1 in each group

4 讨论

当前关于肺癌的药学研究大多聚焦于非小细胞肺癌, 而研究 SCLC 的很少。固然 SCLC 发病率远低于非小细胞肺癌, 但由于其增殖快、侵袭力强、致死率极高, 且近年来有逐渐增多的趋势, 因此已成为严重危害人类生命的一类恶性肿瘤。

鉴于现有的治疗方案效果都很不理想,寻找新的作用靶点就成为治疗 SCLC 的关键。

本研究结果显示,沉默 Bmi-1 基因能显著抑制 H1963 细胞的增殖,表明 Bmi-1 有望成为治疗 SCLC 的一个新靶点。Bmi-1 作为 Polycomb 抑制复合物 1 (PRC1) 的核心亚基,与 Ring1B 协同催化组蛋白 H2A-K119 泛素化,使得染色质处于收紧状态,抑制转录因子对 DNA 的作用,同时还抑制转录的延伸过程^[4],最终导致基因表达的抑制。重要的抑癌基因 INK4a/ARF 就是 Bmi-1 主要的靶基因^[6]。INK4a/ARF 基因编码 P16、P14 抑癌蛋白,是维持细胞周期平衡、调节细胞增殖与衰老的关键基因^[7],一旦该基因受抑或缺失会使细胞发生恶性转化^[8]。本研究发现,沉默 Bmi-1 基因可使 P14、P16 表达升高和细胞周期的 G₁/S 期阻滞,说明干扰 Bmi-1 后产生的抑癌作用与其激活 INK4a/ARF、阻滞细胞周期有关,不过是否还通过其他环节产生抑癌作用,则尚待进一步考证。

Bmi-1 不仅参与恶性肿瘤的发生发展,还参与肿瘤的侵袭转移^[9-10]。Bmi-1 对 Snail、Twist、ZEB1 具有稳定、激活和协同作用,并由此诱导细胞发生上皮-间充质转化 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT),增强细胞迁移侵袭能力。

近来研究发现,沉默 Bmi-1 基因能逆转鼻咽癌、头颈鳞状细胞癌的 EMT,减少其侵袭转移^[11-12]。本研究通过 Transwell 小室试验发现沉默 Bmi-1 对 H1963 细胞有明显的抗侵袭转移作用,这一结果更进一步提升了 Bmi-1 抗 SCLC 的应用价值。

根据经典的斯蒂芬·佩吉特“种子-土壤”理论,肿瘤转移过程大体是:具有转移能力的癌细胞(种子)从原病灶脱离——远处迁移——侵袭组织器官(土壤)——生长繁殖、转移瘤块生成等。这过程涉及细胞的黏附、迁移、侵蚀等几个环节,结合试验结果,提示沉默 Bmi-1 基因可从多环节产生抗侵袭转移作用:(1)诱导 E-cadherin 表达,这可使细胞间的黏附增强,抑制细胞的脱落分离;(2)抑制 Vimentin、N-cadherin,这可降低细胞运动能力,抑制细胞迁移运动;(3)MMP-2 表达减弱,TIMP-1 表达增强,这可使细胞侵蚀能力减弱,从而在“土壤”上种植机会减少。由此,沉默 Bmi-1 基因可遏制 SCLC 的转移。

本研究证明了抑制 Bmi-1 的表达可有效抑制 SCLC 的增殖及转移,这为以 Bmi-1 为靶点的新药开发提供了一定的理论与实验依据。

参考文献

[1] Jackman DM, Johnson BE. Small-cell lung cancer[J]. *Lancet*, 2005, 366(9494): 1385.

[2] Cao L, Bombard J, Cintron K, et al. Bmi-1 as a novel target for drug discovery in cancer[J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(10): 2729.

[3] Yao XB, Wang XX, Liu H, et al. Silencing Bmi-1 expression by RNA interference suppresses the growth of laryngeal carcinoma cells[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(5): 1262.

[4] Gao FL, Li WS, Liu CL, et al. Silencing Bmi-1 enhances the senescence and decreases the metastasis of human gastric cancer cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(46): 8764.

[5] Koch LK, Zhou H, Ellinger J, et al. Stem cell marker expression in small cell lung carcinoma and developing lung tissue[J]. *Hum Pathol*, 2008, 39(11): 1597.

[6] Eckert RL, Adhikary G, Rorke EA, et al. Polycomb group proteins are key regulators of keratinocyte function [J]. *Invest Dermatol*, 2011, 131(2): 295.

[7] Wang Y, Guan Y, Wang F, et al. Bmi-1 regulates self-renewal, proliferation and senescence of human fetal neural stem cells in vitro[J]. *Neurosci Lett*, 2010, 476(2): 74.

[8] Sharpless NE. INK4 a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus[J]. *Mutat Res*, 2005, 576(1/2): 22.

[9] Gavrilescu MM, Todosi AM, Anitei MG, et al. Expression of bmi-1 protein in cervical, breast and ovarian cancer [J]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 2012, 116(4): 1112.

[10] Kreso A, van Galen P, Pedley NM, et al. Self-renewal as a therapeutic target in human colorectal cancer[J]. *Nat Med*, 2014, 20(1): 29.

[11] Song LB, Li J, Liao WT, et al. The polycomb group protein bmi-1 represses the tumor suppressor PTEN and induces epithelial-mesenchymal transition in human nasopharyngeal epithelial cells[J]. *Clin Invest*, 2009, 119(12): 3626.

[12] Yu CC, Lo WL, Chen YW, et al. Bmi-1 regulates snail expression and promotes metastasis ability in head and neck squamous cancer-derived ALDH1 positive cells[J]. *J Oncol*, 2011, doi: 10.1155/2011/609259.

(收稿日期:2014-03-28 修回日期:2014-05-16)

国家食品药品监督管理总局提示关注曲美他嗪引起的运动障碍等安全性风险

本刊讯 曲美他嗪于 2000 年在我国上市,目前有片剂 (20 mg) 和缓释片剂 (35 mg) 两种剂型。曲美他嗪属于心血管系统药物,临床用于心绞痛发作的预防性治疗和眩晕、耳鸣的辅助性对症治疗。近期,欧盟药品管理局 (EMA) 发布消息,建议限制曲美他嗪的使用,并警惕其引起的运动功能障碍等安全性风险。

根据国家药品不良反应监测系统数据库信息分析情况及欧盟评估结果,国家食品药品监督管理总局建议内容如下:

(1) 曲美他嗪仅用于对一线抗心绞痛疗法控制不佳或无法耐受的稳定型心绞痛患者的对症治疗,不再用于耳鸣、眩晕的治疗。

(2) 帕金森病、帕金森综合征、震颤、不安腿综合征以及其

他相关的运动障碍禁用和严重肾功能损害 (肌酐清除率 < 30 ml/min) 者禁止使用曲美他嗪。

(3) 使用曲美他嗪治疗,应密切关注曲美他嗪导致的帕金森综合征 (震颤、运动不能、张力亢进)、步态不稳、不安腿综合征,其他相关运动障碍以及粒细胞减少症、血小板减少症、血小板减少性紫癜、肝炎等不良反应。

(4) 中度肾功能损害 (肌酐清除率为 30~60 ml/min) 患者和老年患者,用药剂量需适度调整。

(5) 相关药品生产企业应将用药风险及时告知医务人员和患者,加强药品不良反应监测工作,采取有效措施最大限度地保障患者的用药安全。