

基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.05.012

下调肝癌衍生生长因子表达水平对胶质瘤 U373 细胞增殖及凋亡的影响

陆 红,王 霞

(新疆医科大学第五附属医院门诊部,乌鲁木齐 830011)

【摘要】目的:研究下调肝癌衍生生长因子(Hepatoma-derived growth factor,HDGF)的表达水平对胶质瘤细胞U373增殖及凋亡能力的影响。**方法:**设计并合成HDGF靶向siRNA,以脂质体为介质瞬时转染入U373细胞,采用RT-PCR及Western blot检测HDGF基因及蛋白表达水平的变化,判断RNA干扰的效果、流式及MTT法检测细胞凋亡及增殖变化。**结果:**用脂质体瞬时转染siRNA至U373细胞中,RT-PCR及Western blot实验结果证实转染48 h后,U373细胞中HDGF基因及蛋白表达水平明显下调。MTT结果显示,NAI下调HDGF后的U373细胞相对于空白和阴性对照组,细胞在体外增殖能力明显减弱($P < 0.01$),U373细胞凋亡率明显上升($P < 0.05$)。**结论:**HDGF蛋白在胶质瘤的发生发展过程中起着促进作用,可能成为一个新的肿瘤分子治疗靶点。

【关键词】肝癌衍生生长因子;胶质瘤;RNA干扰

【中国图书分类法分类号】R730.264

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-12-23

Effects of down-regulating hepatoma derived growth factor of glioma on the proliferation and apoptosis of U373 cells

LU Hong, WANG Xia

(Department of Outpatient, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University)

【Abstract】**Objective:** To evaluate the effects of down-regulating hepatoma derived growth factor (HDGF) of glioma on the proliferation and apoptosis of U373 cells. **Methods:** siRNA targeting human HDGF gene was designed and transfected transiently into U373 cells by lipo-

- 作者介绍: 陆 红(1961-),女,副主任医师,
研究方向: 恶性肿瘤化疗。
- [2] Wang H, Yang G H, Bu H, et al. Systematic analysis of the TGF-beta/Smad signaling pathway in the rhabdomyosarcoma cell line RD[J]. Int J Exp Pathol, 2003, 84(3): 153-163.
- [3] Ye L, Zhang H, Zhang L, et al. Effects of RNAi-mediated Smad4 silencing on growth and apoptosis of human rhabdomyosarcoma cells[J]. Int J Oncol, 2006, 29(5): 1149-1157.
- [4] Wang H, Yang G H, Bu H. The expression of TGF-β1 and TGF-β receptor in human rhabdomyosarcoma[J]. Clin Exp Pathol (Chinese), 2002, 18(1): 61-64.
- [5] Hatchera H, Planalpb R, Cho J, et al. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials[J]. Cell. Mol. Life Sci, 2008, 65 (11): 1631-1652.
- [6] Jiang Z Y, Zou L, Shi S S, et al. Effects of curcumin on TNF-alpha and TGF-beta 1 in serum and lung tissue of SiO₂-induced fibrosis in mice [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2009, 25(5): 399-400.
- [7] Tanaka Y, Kobayashi H, Suzuki M, et al. Transforming growth factor-beta1 dependent urokinase up-regulation and promotion of invasion are involved in Src-MAPK-dependent signaling in human ovarian cancer[J]. J Biol Chem, 2004, 279(10): 8567-8576.
- [8] Maurice D, Pierreux C E, Howell M, et al. Loss of Smad4 function in pancreatic tumors; C-terminal truncation leads to decreased stability[J]. J Biol Chem, 2001, 276(46a): 43175-43181.
- [9] Ye L, Zhang H, Zhang L, et al. Effects of RNAi-mediated Smad4 silencing on growth and apoptosis of human rhabdomyosarcoma cells[J]. Int J Oncol, 2006, 29(5): 1149-1157.
- [10] Saunders J A, Rogers L C, Klomsiri C, et al. Reactive oxygen species mediate lysophosphatidic acid induced signaling in ovarian cancer cells[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 49(12): 2058-2067.
- [11] Bilmen J G, Khan S Z, Javed M H, et al. Inhibition of the SERCA Ca²⁺ pumps by curcumin. Curcumin putatively stabilizes the interaction between the nucleotide-binding and phosphorylation domains in the absence of ATP[J]. Eur J Biochem, 2001, 268(23): 6318-6327.
- [12] Sullivan D E, Perris M, Nguyen H, et al. TNF-alpha induces TGF-beta1 expression in lung fibroblasts at the transcriptional level via AP-1 activation[J]. Cell Mol Med, 2009, 13(8B): 1866-1876.
- [13] Lou J R, Zhang X X, Zheng J, et al. Transient metals enhance cytotoxicity of curcumin: potential involvement of the NF-kappaB and mTOR signaling pathways[J]. Anticancer Res, 2010, 30(9): 3249-3255.
- [14] Li J, Wang Y, Yang C, et al. Polyethylene glycosylated curcumin conjugate inhibits pancreatic cancer cell growth through inactivation of Jab1[J]. Mol Pharmacol, 2009, 76(1): 81-90.
- [15] Wang S L, Yang G H, Bu H, et al. The protein expression of TGF-beta1 signaling pathway in rhabdomyosarcoma[J]. Tumor, 2004, 24(5): 440-443.

(责任编辑:唐秋姗)

fectamine. RT-PCR 和 Western blot 被用来检测 HDGF 基因和蛋白表达的变化, 以评价 RNA 干扰的疗效。流式细胞检测和 MTT 法被用来检测细胞凋亡和增殖。Results: RT-PCR 和 Western blot 结果显示, HDGF 基因和蛋白表达在 U373 细胞中明显下降, 在 48 小时后转染。同时, MTT 结果显示, 在体外增殖明显降低, 而凋亡率显著增加, 相比于空白和阴性对照组, 在下调 HDGF 表达后($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。Conclusion: HDGF 在胶质瘤的形成中起着重要的作用, 可能成为肿瘤诊断和治疗的新分子标记。

【Key words】hepatoma-derived growth factor; glioma; RNA interference

神经胶质瘤是中枢神经系统最常见的肿瘤, 具有高致残率、高死亡率的特点。肝癌衍生生长因子 (Hepatoma-derived growth factor, HDGF) 是自人肝癌细胞株 HuH7 的条件培养基中分离出的一种酸性肝素结合蛋白, 大量研究表明 HDGF 不仅在肿瘤发生、发展中发挥着极为重要的作用, 而且与肿瘤恶性程度及预后高度相关。但目前尚无 HDGF 与胶质瘤之间关系的报道。本研究采用 RNA 干扰技术下调胶质瘤 U373 细胞中 HDGF 的表达, 继而观察其对细胞增殖及凋亡的影响, 为深入研究 HDGF 在胶质瘤发生发展中的作用及其作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

胶质瘤细胞株 U373 来自中科院上海细胞所, 本室保存, HDGF 鼠源性单抗本室自制并保存。siRNA 由本室设计, 上海吉玛生物有限公司合成。DMEM 培养基粉来自美国 Invitrogen 公司, 青链霉素购自美国 Gibco 公司。 β -actin 单克隆抗体、转染试剂盒 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司。CCK-8 试剂盒购自碧云天公司。

1.2 细胞培养

胶质瘤细胞株 U373 培养液为含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青链霉素的 DMEM。于 37 ℃, 5% CO₂ 的饱和湿度条件下的孵育箱内培养, 2~3 d 更换培养液, 常规消化传代。实验均选用对数生长期细胞。

1.3 Western blot 检测

收集状态良好的 U373 细胞加入 RIPA 裂解液 [50 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0), 150 mmol/L NaCl, 0.02% Na₃N₃, 0.1% SDS, 100 μ g/ml PMSF, 1 μ g/ml Aprotinin, 1% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate], 裂解后提取蛋白。2,2'-联喹啉-4,4'-二甲酸二钠盐 (Bicinchoninic acid, BCA) 法定量后每种细胞裂解液各 20 μ g 行 SDS-PAGE 电泳、转膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 再分别结合不同浓度比例的一抗: HDGF 单抗 (1:1 000)、 β -actin 单抗 (1:2 000), 4 ℃ 过夜, 再以 1:2 000 的比例结合相应的 HRP 标记的二抗, 化学发光试剂盒检测蛋白印迹, X 光片曝光、显影、定影。

1.4 siRNA 设计

根据 GeneBank 基因已知序列(基因编号: NW_925683.1), 按 siRNA 序列设计原则进行设计。在 HDGF 的基因中选取了 2 个靶点 siRNA-1: 5'-AACCGGCAGAAGGAGUACAAA-3'; siRNA-2: 5'-AAAUCAACAGCCAACAAAUAC-3'。并设计合成阴性参照 siRNA-NC: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUUTT-3'。

1.5 siRNA 转染

转染前 24 h, 用胰酶消化处于对数生长期的细胞并计数, 调整细胞浓度, 接种于 6 孔板, 最终达到每孔含 1×10^5 个细胞, 分为 4 组: 未作任何处理的空白 (Blank) 组、仅用单纯脂质体转染的阴性参照 (Negative) 组、转染 siRNA-1 组、转染 siRNA-2 组, 按 LipofectamineTM 2000 Reagent 试剂说明书进行转染。具体操作如下: 培养 24 h 后, 用不含抗生素的 OPTI-MEM 培养基将 siRNA 150 pmol, LipofectamineTM 2000 脂质体 5 μ l 分别稀释至 250 μ l。将稀释后的 siRNA 和脂质体等体积混匀并室温放置 20 min 备用。将脂质体-siRNA 复合物 500 μ l 加入含有细胞和培养基的 6 孔细胞培养板中, 来回轻轻摇晃细胞培养板, 使脂质体分布均匀。6 h 后更换为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。

1.6 RT-PCR 检测转染后细胞中 HDGF 表达

按照说明书用 Trizol 液提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA。扩增 HDGF 引物上游引物 5'-GC GGA TCC ATG TCG CGA TCC AACCGG CAG AAG-3', 下游引物 5'-CGGA ATT CGG CAG GCT CTC ATG ATC TCT GATGCC-3', 50 ℃ 2 min, 95 ℃ 10 min, 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 最后 2 步重复 40 个循环。以每例标本的目的片段与带内参片段的循环值 (Ct 值) 的比值作为该标本基因表达的相对数值。

1.7 改良 MTT 法 (WST-8 法) 检测细胞增殖

取对数生长期的 U373 细胞, 分为对照组 (不做任何处理)、阴性参照组 (转染 siRNA-1)、实验组 (转染 siRNA-2)。调整细胞浓度接种到 96 孔板, 每孔 2 000 个细胞, 行转染, 转染后置培养箱培养 72 h, 每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂, 微板震荡混匀, 放入培养箱中继续培养, 1 h 后酶标仪检测各孔吸光度 $A_{450\text{ nm}}$, 每组实验重复 3 次。

1.8 流式细胞术测定细胞凋亡

采用 Annexin V-FITC/PI 双染法, 取对数生长期的 U373 细胞, 同增殖检测分组, 完成转染 72 h 后胰酶消化, 离心收集细胞, PBS 洗涤细胞 2 次, 以染色缓冲液重悬, 分别加入 10 μ l

Annexin V-FITC 和 5 μl 碘化丙啶(PI),轻轻混匀,室温避光反应 15 min。加入 200 μl 染色缓冲液,流式细胞仪检测,分析凋亡细胞的百分率,每个样本分析 10 000 个细胞,每组实验重复 3 次。

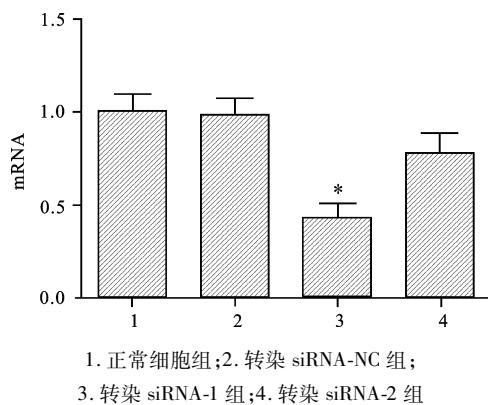
1.9 统计学方法

采用 SPSS11.5 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,对数据进行组间单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 siRNA-1 显著抑制 HDGF 表达

2.1.1 RT-PCR 鉴定 取生长状态良好的 U373 细胞分别转染 siRNA-1、siRNA-2 及 siRNA-NC,以未作任何处理的 U373 细胞为对照。继而采用 RT-PCR 法检测转染后 72 h HDGF 表达水平的变化。可见 siRNA-1 的干扰效率最高。正常组为 1.000 ± 0.010 , 转染 siRNA-1 组为 0.434 ± 0.107 , 转染 siRNA-2 组为 0.743 ± 0.067 , 转染 siRNA-NC 组为 0.993 ± 0.111 , 转染 siRNA-1 组与 siRNA-NC 组相比 $F = 39.043$, $P = 0.003$ (见图 1、表 1)。



1. 正常细胞组;2. 转染 siRNA-NC 组;

3. 转染 siRNA-1 组;4. 转染 siRNA-2 组

可见 siRNA-1 可明显下调 HDGF 的表达

* : 表示 RNA 干扰组与空白组和阴性对照组比较, $P = 0.003$

图 1 RNA 干扰 RT-PCR 鉴定结果

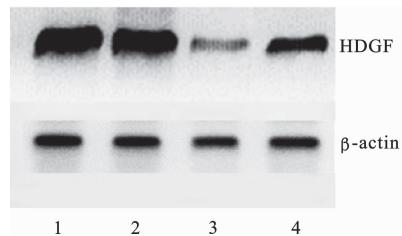
Fig. 1 Results of RNA-interfered RT-PCR

2.1.2 Western blot 鉴定 为了进一步验证所合成的 2 条 siRNA 对 HDGF 干扰效果,又对 U373 细胞进行了蛋白水平的检测。由图 2 可见,与正常组(灰度分析值为 1.000 ± 0.010)、siRNA-NC 组(灰度分析值为 0.954 ± 0.061)比较, siRNA-1 转染的 U373 细胞在干扰 72 h 的 HDGF 蛋白质表达水平和图 1 中 mRNA 表达水平一样出现明显的下调(灰度分析值为 0.178 ± 0.041 , 与 siRNA-NC 组相比 $F = 325.878$, $P < 0.0001$), siRNA-2 虽然也可以下调 HDGF 的表达,但作用明显弱于 siRNA-1(灰度分析值为 0.834 ± 0.036)(表 1)。上述结果表明所设计的 siRNA-1 在转染后 72 h 时表现出了高效抑制胶质瘤 U373 细胞 HDGF 表达的能力。根据这一结果我们选取 siRNA-1 进行后续细胞实验。

2.2 下调 HDGF 表达水平抑制 U373 细胞的体外增殖

瞬时转染 HDGF siRNA 48 h,后于无血清培养条件培养

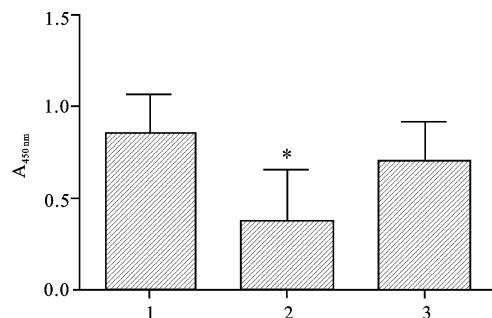
24 h,采用改良 MTT 法研究 U373 细胞体外增殖能力的变化。正常组 A 值为 0.847 ± 0.018 , siRNA-NC 组为 0.669 ± 0.072 , siRNA-1 转染组为 0.361 ± 0.044 (图 3、表 1)。siRNA-1 转染组与 siRNA-NC 组相比 $F = 46.892$, $P = 0.002$, 表明 RNA 干扰后细胞增殖速度明显受到抑制。



1. 正常 U373 细胞;2. 转染 siRNA-NC 组;
3. 转染 siRNA-1 组;4. 转染 siRNA-2 组
可见 siRNA-1 可在蛋白水平明显下调 HDGF 的表达

图 2 RNA 干扰 Western blot 鉴定结果

Fig. 2 Results of RNA-interfered Western blot



1. 未作任何处理的 U373 细胞;2. 转染了 siRNA-1 的 U373 细胞;3. 转染 siRNA-NC 的 U373 细胞

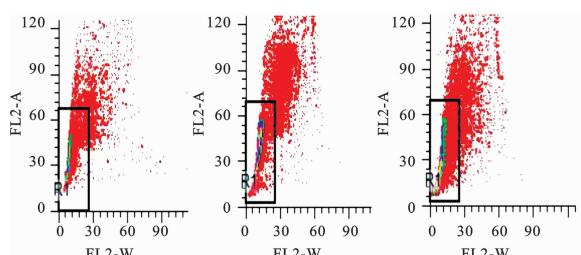
* : 表示 RNA 干扰组与空白组和阴性对照组比较, $P = 0.002$

图 3 转染 HDGF siRNA 对 U373 细胞增殖的影响

Fig. 3 Effect of tranfecting siRNA-HDGF on the proliferation of U373

2.3 RNA 干扰后 U373 细胞的凋亡检测

转染 72 h 后收集细胞行凋亡检测,可见实验组的凋亡细胞数明显增加(图 4),凋亡细胞百分率为 $(14.69 \pm 1.03)\%$ 。对照组凋亡率为 $(0.40 \pm 0.03)\%$, 阴性参照组凋亡细胞百分率为 $(1.21 \pm 0.05)\%$ 。



1. 未作任何处理的为对照组
2. 转染 siRNA-NC 的为阴性参照组
3. 转染 siRNA-1 的为实验组

图 4 干扰后 U373 细胞的凋亡检测结果

Fig. 4 Apoptosis of U373 cells after the interferences

表 1 数据列表
Tab. 1 Data list

检测方法	正常组	siRNA-1	siRNA-2	siRNA-NC	F 及 P (siRNA-1 组/ siRNA-NC 组)
RT-PCR	1.000 ± 0.010	0.434 ± 0.107	0.743 ± 0.067	0.993 ± 0.111	F = 39.043, P = 0.003
Western blot	1.000 ± 0.010	0.954 ± 0.061	0.178 ± 0.041	0.834 ± 0.036	F = 325.878, P < 0.000 1
MTT	0.847 ± 0.018	0.361 ± 0.044	...	0.669 ± 0.072	F = 46.892, P = 0.002

注：“...”表示没有数据

3 讨 论

胶质瘤是神经系统最常见的肿瘤,具有高致残率、高死亡率的特点。胶质瘤具有浸润性生长的特性,难以完全切除,对放疗化疗不甚敏感,易复发,手术难以完全根除或难以手术^[1]。化疗药物和一般抗肿瘤的中药,因血脑屏障等因素的影响,疗效也不理想,因此脑胶质瘤至今仍是全身肿瘤中预后最差的肿瘤之一。

HDGF 最初是从无血清培养人类肝癌细胞株 HuH-7 中纯化得到的高肝素亲和性生长因子,而在 1998 年由 Juan A. Oliver 等从鼠肾间质细胞系 7.1.1 无血清培养基中分离出。具有促成纤维细胞、内皮细胞、血管平滑肌细胞和一些肝癌细胞等多种细胞生长的功能^[2]。研究表明 HDGF 在多种正常组织和肿瘤存在高表达,能够促进细胞增殖、组织分化及血管生成,与多种恶性肿瘤的侵袭、转移、预后相关^[3~7]。但胶质瘤与 HDGF 之间关系的报道国内外尚少见。

RNA 干扰技术作为一种简单有效的代替基因敲除的遗传工程技术,抑制作用高效而稳定,已被应用于生物基因组中特定基因功能的研究、封闭和阻断病原体基因或致癌基因的表达^[8]。我们针对编码 HDGF 蛋白的基因不同区域设计合成了 2 对 siRNA: siRNA-1 和 siRNA-2,以 Lipo 作为转染介质,将其转染至 HDGF 高表达细胞株 U373 中。通过 RT-PCR 及 Western blot 证实 2 条 siRNA 都能下调 U373 细胞的 HDGF 表达水平,但 siRNA-1 的效果更为明显。通过在转染后不同时间点 HDGF 的表达水平对比发现,转染 siRNA-1 对 HDGF 蛋白表达水平抑制作用可持续 1 周,其中以 48~72 h 作用最强,随后逐渐减弱。这一结果不仅确定了后期细胞实验最佳干扰时间,而且也印证了 RNAi 基因表达沉默效果存在一定的时间依赖性。

干扰后的 U373 细胞与对照组及阴参组相比表现出了高凋亡率以及增殖抑制,这与已报道的 HDGF 的生物学特性一致,说明 HDGF 在 U373 细胞中可能也扮演着促进肿瘤细胞增殖、防止细胞凋亡的角色,提示 HDGF 可能在胶质瘤的发生发展过程中起着重要的促进作用,有潜力成为一个新的胶质瘤分子治疗靶点,对肿瘤的预后和临床治疗都具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 邓跃飞,赵义营,雷炳喜,等. pEGFP-ING4 抑制裸鼠皮下人 U87 移植瘤生长及肿瘤血管生成[J]. 中国神经精神疾病杂志,2011,53(6):329~332.
- Deng Y F, Zhao Y Y, Lei B X, et al. Inhibitory effects of pEGFP-ING4 on growth and angiogenesis of human glioma U87 cell xenografts in nude mice [J]. Chinese Journal of Nervous and Mental Diseases, 2011, 53 (6): 329~332.
- [2] Stratmann A, Machein M R, Plate K H. Anti-angiogenic therapy in malignant glioma[J]. Curr Pharm Des, 2007, 13 (35): 3545~3558.
- [3] Everett A D, Narron J V, Stoops T, et al. Hepatoma-derived growth factor is a pulmonary endothelial cell expressed angiogenic factor[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 286 (6): L1194~1201.
- [4] 潘宇亮,曹培国,张隽,等. 肝癌衍生生长因子在乳腺癌中的表达及其临床意义[J]. 肿瘤防治研究,2011(8):926~929.
- Pan Y L, Cao P G, Zhang J, et al. Expression and clinical significance of hepatoma-derived growth factor in patients with breast cancers [J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 2011(8):926~929.
- [5] Uyama H, Tomita Y, Nakamura H, et al. Hepatoma-derived growth factor is a novel prognostic factor for patients with pancreatic cancer[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12 (20 Pt 1): 6043~6048.
- [6] Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, et al. Expression of hepatoma-derived growth factor is correlated with lymph node metastasis and prognosis of gastric carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12 (1): 117~122.
- [7] Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, et al. Expression level of hepatoma-derived growth factor correlates with tumor recurrence of esophageal carcinoma[J]. Ann Surg Oncol, 2007, 14 (7): 2141~2149.
- [8] Sui G, Soohoo C, Affarel B, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad, 2002, 99 (8): 5515~5520.

(责任编辑:冉明会)