



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.05.025
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3899.shtml

· 简要论著 ·

靶向 Hiwi 基因的 RNAi 对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响

胡小辉¹, 黄胜超¹, 吴海滨¹, 陈宝英², 李建文¹

(广东医学院附属医院 1. 血管甲状腺乳腺外科 2. 肿瘤中心, 广东 湛江 524001)

摘要

目的: 研究靶向 Hiwi 基因的 siRNA 对乳腺癌细胞增殖的影响。

方法: 将靶向 Hiwi 基因的 siRNA 导入乳腺癌细胞, 培养并转染 MCF-7 细胞, 运用 qRT-PCR、Western-Blot 进行干扰效果的检测并使用 CCK-8 法检测干扰后 MCF-7 细胞的增殖和凋亡情况。

结果: 干扰后 48 h 和 72 h 的 MCF-7 细胞无明显生长抑制作用 ($P>0.05$), 而干扰后 24 h 的 Hiwi-647 组细胞的生长抑制作用明显高于其他组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

结论: 靶向 Hiwi 基因的 siRNA 干扰乳腺癌细胞 MCF-7 后, MCF-7 细胞增殖受到抑制, 提示 Hiwi 是乳腺癌基因治疗的潜在靶点。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(5):685-688]

关键词

乳腺肿瘤 / 病理学; 基因, Hiwi; siRNA; RNAi

中图分类号: R737.9

乳腺癌的发生是多基因变异的累积及其逐渐演变的结果, 包括抗癌基因的失活和原癌基因的激活^[1]。乳腺癌的研究从单一的外科解剖生物学模式, 发展到至今的多学科诊断和综合治疗模式, 包括放射科的筛检和诊断, 病理科的肿瘤特性个体分析, 外科和放疗科的局部治疗, 肿瘤内科的全身治疗等^[2], 目前的综合治疗方法虽然能够显著延长患者的生存时间, 但术后复发率和转移率仍较高。近年来随着 RNA 干扰技术的出现, 加快了肿瘤基因治疗的发展, RNA 干扰也被称为 RNA 沉默, 是指在进化过程中高度保守的、由双链 RNA 诱发的、同源 mRNA 高效特异性降解的现象^[3]。Hiwi 是干细胞转录因子, 它的过表达可以引起干细胞恶性化发展。最近研究发现 Hiwi 与多种肿瘤相关, 甚至 Hiwi 基因能够直接致癌, 其致癌作用与 Hiwi 相关的 DNA 甲基化和细胞周期蛋白依赖性激酶的沉默有关^[4]。RNA 干扰以其强特异性和高效率性能够

特异地阻断靶基因的表达, 因此将靶向 Hiwi 基因的 siRNA (small interference RNA) 导入乳腺癌细胞, 观察沉默 Hiwi 基因后对乳腺癌细胞活性的影响, 从而为乳腺癌的基因治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选用高表达 Hiwi 基因的人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞株, 由上海交大苏小玲女士惠赠。

1.2 研究方法

1.2.1 RT-PCR 检测干扰后 Hiwi mRNA 表达水平 向每 10 cm² 的贴壁细胞加入 1 mL TRIzol (Takala), 常规提取总 RNA, 采用逆转录试剂盒 (Takala) 获取 cDNA, 荧光定量 PCR 试剂盒 (TaKaRa) 以 β -actin 为内参照进行 Hiwi 基因的 qRT-PCR, 引物序列见下表。PCR 反应体系为 20 μ L, 分别含 cDNA 模板 2 μ L, 引物 (10 μ M) F、R 各 0.4 μ L, SYBR[®]Premix Ex Taq 10 μ L, 双蒸水 7.2 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 共 40 个循环 (表 1)。

1.2.2 Western blot 检测干扰后 Hiwi 蛋白表达水平 转染 48 h 后用蛋白裂解液提取各组乳腺癌细胞蛋白, 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 10 min 取上清,

基金项目: 广东省湛江市科技攻关计划资助项目 (2013B01211)。

收稿日期: 2014-02-17; 修订日期: 2014-04-21。

作者简介: 胡小辉, 广东医学院附属医院住院医师, 主要从事乳腺疾病临床方面的研究。

通信作者: 李建文, Email: xgjrwk@163.com

采用 BCA 法进行蛋白浓度定量。取总蛋白 300 μg 于 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热变性 5 min 后上样, 行恒流 30 mA SDS-PAGE 电泳, 冰浴 100 V 恒压 65 min 电转至 PVDF 膜, 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后, TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min, 加入 Hiwi 一抗 (1:1 000) 室温孵育 2 h 后, 用 TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min, 再加 HRP 标记的二抗 (羊抗兔二抗 1:2 000), 室温孵育 1 h, TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min, HRP 化学发光法显影。

1.2.3 转染和 CCK-8 检测干扰后 MCF-7 细胞增殖活性 按 96 孔板 1.5×10^4 个/孔 (6 孔板 3.0×10^5 /孔) 接种 MCF-7 细胞, 培养箱培养 24 h 后转染, 转染分 6 组进行 (siRNA 序列见表 2), 设定组别为: Hiwi-647 组 (转染的 siRNA 为 Hiwi-647), Hiwi-1488 组 (转染的 siRNA 为 Hiwi-1488), Hiwi-2735 组 (转染的 siRNA 为 Hiwi-2735), GAPDH 组 (转染的 siRNA 为 GAPDH), NC 组 (转染的 siRNA 为无意义链), Blank 组 (无 siRNA)。取 600 μL 无血清 DMEM (6 孔板 1.2 mL) 稀释 300 pmol 的 siRNA (6 孔板 600 pmol), 转染试剂组不加 siRNA (上海吉玛), 轻柔混匀。取 600 μL 无血清 DMEM (6 孔板 1.2 mL) 稀释 15 μL 的 lipo2000 (6 孔板 30 μL), 混匀后静置 5 min。将两者混合均匀, 放置 20 min 后将复合物加入 PBS 清洗后并加有培养基的培养板中。形成 96 孔 -100 μL , 6 孔 -2 mL 终体积的转染体系, 左右摇匀后放入培养箱中。转染 6 h 后换液, 分别于转染 24、48、72 h 后向 96 孔板每孔加入 10 μL CCK-8 溶液 (日本同仁)。并于培养箱中孵育 2.5 h 后用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度。

表 1 引物序列 (大连宝生物工程有限公司设计合成)

基因	序列
β -actin-R	5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3'
β -actin-F	5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3'
Hiwi-R	5'-TCC TAG AAT ATG CAG CGT GAG AAC-3'
Hiwi-F	5'-TGC CCT ACA GAT GAA CTG CAA GA-3'

表 2 转染用 siRNA 序列 (上海吉玛有限公司设计合成)

siRNA	序列
Hiwi-647	5'-GUGGGCCUUAUAUCAGUAUTT-3' 5'-AUACUGAUUAUAAGGCCCACTT-3'
Hiwi-1488	5'-GCCAUUCAUACAAGACUAATT-3' 5'-UUAGUCUUGUAUGAACGGCTT-3'
Hiwi-2735	5'-GCCAGUAAGUGCUUCUACGTT-3' 5'-AGUAGAAGCACUUCUGGCTT-3'
GAPDH	5'-GUAUGACAACAGCCUCAAGTT-3' 5'-CUUGAGGCUGUUGUCAUACTT-3'
NC	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3' 5'-ACGUGACACGUUCGGACAATT-3'

1.3 统计分析

实验数据统一采用 SPSS 17.0 统计学软件分析, 计量资料结果用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 两组间差异比较用 t 检验, 多组间差异的两两比较用方差分析和 q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RNA 干扰后 Hiwi 基因 mRNA 在 MCF-7 细胞中的表达

PCR 结果显示: Hiwi-647 干扰效果比较明显, Hiwi 基因 mRNA 相对表达量明显下降 ($P < 0.05$); Hiwi-2735 和 GAPDH 干扰效果相 ($P > 0.05$); Hiwi-1488 较 GAPDH 干扰效果差, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 1)。

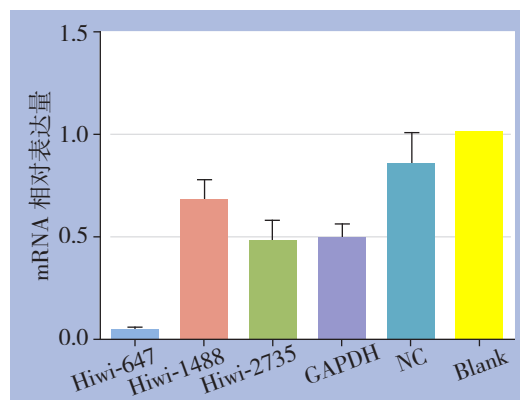


图 1 干扰后各组 MCF-7 细胞 Hiwi mRNA 的表达

2.2 RNA 干扰后 Hiwi 蛋白在 MCF-7 细胞中的表达

Western-Blot 结果显示: 在 Hiwi-647、Hiwi-1488、Hiwi-2735 该 3 条干扰链中, Hiwi-647 干扰效果比较明显 ($P < 0.05$) (表 3)。

表 3 Hiwi 蛋白在不同组别中表达情况的比较 (灰度比值)

组别	灰度比值 ($\bar{x} \pm s$)	F	P
Hiwi-647	0.729 \pm 0.099	17.650	0.000 ¹⁾
Hiwi-1488	1.277 \pm 0.144		0.008 ¹⁾
Hiwi-2735	1.551 \pm 0.151		0.209 ²⁾
GAPDH	1.703 \pm 0.602		0.975 ³⁾
NC	1.709 \pm 0.862		0.985 ³⁾
Blank	1.707 \pm 0.740		—

注: 与 GAPDH 组比较, 1) $P < 0.05$, 2) $P > 0.05$; 与 Blank 组比较, 3) $P > 0.05$

2.3 靶向 Hiwi 基因干扰后对 MCF-7 细胞的生物学影响

RNA 干扰后 CCK-8 结果提示: 干扰后 48 h

和 72 h 的 MCF-7 细胞无明显生长抑制作用(图 2)。而干扰后 24 h 的 Hiwi-647 组细胞的生长抑制作用明显高于其他组,差异具有统计学意义 $P < 0.05$ (表 4)。

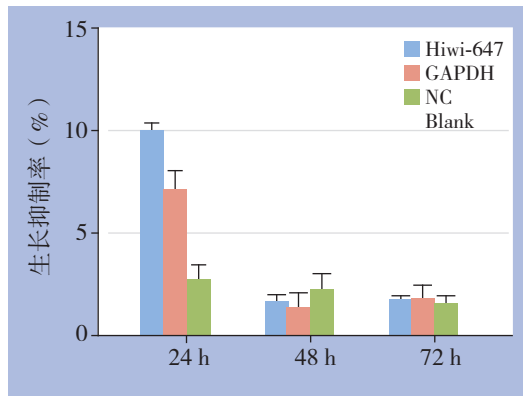


图 2 干扰后各组 MCF-7 细胞的生长抑制率比较 (%)

表 4 干扰后 MCF-7 细胞生长抑制率比较 (%)

组别	生长抑制率 ($\bar{x} \pm s$)	F	P
Hiwi-647	9.836 ± 0.696	54.635	0.009 ¹⁾
GAPDH	6.962 ± 1.636		0.000 ²⁾
NC	2.518 ± 1.243		0.060 ³⁾
Blank	0		

注:与 GAPDH 组比较, 1) $P < 0.05$; 与 Blank 组比较, 2) $P < 0.05$, 3) $P > 0.05$

3 讨论

基因治疗之父 W. French Anderson 博士曾说过:基因治疗是最有可能成为帮助人类攻克那些重大疾病(如癌症)的一种疗法。基因治疗是指将外源性正常基因即治疗基因或其他有治疗作用的基因通过基因转移方式导入到生物体内,从而使外源基因表达具有正常功能的外源产物,以纠正或补偿因基因异常和缺陷引起的疾病达到治疗目的^[5-6]。近年来,因肿瘤基因治疗具有特异性、安全性和有效性而备受关注。RNA 干扰是基因治疗最具潜力的治疗方法之一,随着 RNAi 技术的成熟,利用 RNAi 技术来沉默与乳腺癌发生、发展密切相关的基因和因子,为乳腺癌提供一种新的治疗思路。而且已在乳腺癌的治疗中已有所建树:Wang 等^[7]运用 caveolin 1 蛋白的 siRNA 沉默乳腺癌细胞 BT474,发现 BT474 细胞的增殖、转移、侵袭能力下降,BT474 细胞被阻止在 G₀/G₁ 期并且 S 期细胞减少,并且抑制了细胞周期相关蛋白 cyclin D₁、c-Fos 等的表达。Tezcan 等^[8]在研究多柔比星耐药 MCF-7 细胞株时,发现靶向 VIM 基因

的 siRNA 导入 MCF-7 细胞后,VIM 基因编码的波形蛋白表达下降,而且 MCF-7 细胞的转移、侵袭能力减弱。Kim 等^[9]发现 MET 受体与三阴性乳腺癌关系密切,高度表达 MET 受体的三阴性乳腺癌有较低的生存率,通过 siRNA 沉默 MET 后三阴性乳腺癌细胞的增值和侵袭能力下降,得出 MET 是三阴性乳腺癌治疗的潜在靶点,而且靶向 MET 和 EGFR 的联合治疗能使三阴性乳腺癌患者获益。刘顺芳等^[10]将构建的 DJ-1 shRNA 真核表达载体转染至人乳腺癌耐药细胞株 MCF-7/ADM 后检测细胞对化疗药物的敏感性,结果发现 DJ-1 shRNA 可降低乳腺癌 MCF-7/ADM 细胞的多耐药性,为逆转乳腺癌化疗耐药提供了新的方法。

Hiwi 基因在人类干细胞的自我更新中起重要调控作用,而且与多种肿瘤相关,甚至能够直接致癌。而我们前面的实验结果也证明 Hiwi 在乳腺癌中高表达可能在乳腺癌的发生、发展中起重要作用并且与乳腺癌患者的预后相关。本实验将人工合成的 siRNA 经 Lipo-2000 试剂转入乳腺癌细胞 MCF-7 中,运用 RT-PCR 和 West-Blot 分别检测干扰后 MCF-7 细胞的 Hiwi 蛋白和 mRNA 的表达情况,采用 CCK-8 法检测扰后乳腺癌细胞 MCF-7 增值能力的变化。实验结果显示:Hiwi-647 组的 Hiwi mRNA 和 Hiwi 蛋白的抑制效果明显强于 Hiwi-1488 组、Hiwi-2475 组,而 GAPDH 组、NC 组、空白对照组对 Hiwi mRNA 和 Hiwi 蛋白的抑制效果均不明显。因此在 3 条 siRNA 中 Hiwi-647 干扰效果较理想,为有效干扰链,固选用靶向 Hiwi 基因的 Hiwi-647 siRNA 作为实验组进行 CCK-8 检测。结果显示 24 h 的 Hiwi-647 组 MCF-7 细胞的增值能力下降明显,而 48 h、72 h MCF-7 细胞的增值能力下降不明显。分析原因,考虑为瞬时转染要求细胞密度达到 70% 左右,而转染 48 h 和 72 h 后 96 孔板内各组细胞均已长满,因此比较长时间的干扰效果并不理想。以上结果显示,借助 RNA 干扰技术沉默 Hiwi 基因后,可以抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增值活性,说明 Hiwi 基因可能与乳腺癌发生和发展密切相关,并且可以作为抑制乳腺癌细胞增殖的一个靶点,Hiwi 基因沉默在乳腺癌的基因治疗方面具有潜在的价值。由于技术水平和实验条件的限制,本实验在上调 Hiwi 基因能否促进乳腺癌细胞的恶性化进展方面还有待进一步的探讨。乳腺癌的基因治疗从最初的尝试到现在已有了长足的发展,相信不久的将来,综合治疗联合多基因的 RNAi 基因治疗将为乳腺癌患者带来福音。



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.05.026
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3900.shtml

· 简要论著 ·

ABCB5 和 SphK1 在乳腺癌组织中的表达及意义

熊伟, 吴煌福, 黄光越, 陈华敏, 吴晓明

(海南省农垦总医院 肿瘤外科, 海南海口 430000)

摘要

目的: 探讨 ABCB5 和鞘氨醇激酶 1 (SphK1) 在乳腺癌组织中的表达水平及两者与临床病理特征和预后的关系。

方法: 收集于行手术切除的 92 例乳腺癌组织及 45 例对应癌旁组织, 采用免疫组化 SP 法分别检测癌组织及癌旁组织中的表达情况并根据二级计分法将其分为低表达和高表达部分, 分析两蛋白表达水平与临床病理参数的关系及两者表达的相关性。

结果: 乳腺癌组织 ABCB5 和 SphK1 蛋白的高表达率分别为 69.6% (64/92) 和 58.7% (54/92), 均高于癌旁组织的 35.6% (16/45) 和 40.0% (18/45), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 乳腺癌组织中 ABCB5 蛋白表达与分期、病理类型、月经情况和淋巴结转移有关, 而 SphK1 蛋白表达与分期、肿瘤大小、月经情况、淋巴结转移、ER 及 HER-2 表达有关 ($P < 0.05$); ABCB5 和 SphK1 蛋白表达呈正相关 ($r = 0.453, P = 0.022$)。

结论: ABCB5 和 SphK1 在乳腺癌组织中高表达, 两者可能在乳腺癌的发生发展中有一定作用, 检测 ABCB5 和 SphK1 辅助乳腺癌的诊断和病情评估。 [中国普通外科杂志, 2014, 23(5):688-691]

关键词

乳腺肿瘤 / 病理学; ABCB5; 鞘氨醇激酶; 预后
中图分类号: R737.9

乳腺癌是全球严重威胁女性健康的疾病之一, 发病率居女性恶性肿瘤首位, 近年来日趋年

轻化^[1]。因此探索影响乳腺癌发生发展的相关因素对降低乳腺癌发病率及提高术后生存期有重要意义。乳腺癌是一种异质性较高的恶性肿瘤, 涉及多个过程及基因, 故筛选鉴定与该病密切相关的基因已成为当务之急^[2]。ABC 膜转运家族在多药耐药中起重要作用, 如其可向细胞外排出化疗药物来降低胞内药物浓度^[3]。细胞内鞘脂

收稿日期: 2014-02-04; 修订日期: 2014-04-27。

作者简介: 熊伟, 海南省农垦总医院主治医师, 主要从事胃肠腹腔镜手术及乳腺肿瘤方面的研究。

通信作者: 熊伟, Email: 36725747@qq.com

参考文献

- [1] 牛瑞芳, 杨毅, 刘红, 等. 乳腺癌中癌基因抗癌基因表达分析[J]. 中国肿瘤临床, 2003, 30(3):167-171.
- [2] Alphonse GT, Smith BL, Erban JK. Breast Cancer: A Multidisciplinary Approach to Diagnosis and Management[M]. New York: Demos Medical Publishing, 2009:1-3.
- [3] Zamore PD. Ancient pathways programmed by small RNAs[J]. Science, 2002, 296(5571):1265-1269.
- [4] Siddiqi S, Terry M, Matushansky I. Hiwi mediated tumorigenesis is associated with DNA hypermethylation[J]. PLoS One, 2012, 7(3):e33711.
- [5] York A. Gene therapy: the state of the art[J]. Lancet Oncol, 2005, 6(4):196.
- [6] Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, et al. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2005, 60(2):247-266.
- [7] Wang R, Li Z, Guo H, et al. Caveolin 1 knockdown inhibits the proliferation, migration and invasion of human breast cancer BT474 cells[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(5):1723-1728.
- [8] Tezcan O, Gündüz U. Vimentin silencing effect on invasive and migration characteristics of doxorubicin resistant MCF-7 cells[J]. Biomed Pharmacother, 2014, 68(3):357-364.
- [9] Kim YJ, Choi JS, Seo J, et al. MET is a potential target for use in combination therapy with EGFR inhibition in triple-negative/basal-like breast cancer[J]. Int J Cancer, 2014, 134(10):2424-2436.
- [10] 刘顺芳, 刘谨文, 杨志芳, 等. DJ-1 shRNA 靶向逆转人乳腺癌阿霉素耐药细胞株 MCF-7/ADM 的耐药性[J]. 中国普通外科杂志, 2010, 11(19):1219-1222.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 胡小辉, 黄胜超, 吴海滨, 等. 靶向 Hiwi 基因的 RNAi 对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(5):685-688. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.05.025
Cite this article as: HU XH, HUANG SC, WU HB, et al. The effect of the siRNA targeted Hiwi gene on breast cancer cell proliferation and apoptosis[J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(5):685-688. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.05.025