

RNA 干扰研究波形蛋白在肝癌细胞增殖中的作用及不同中医治法的调节

胡卫¹, 方肇勤^{2*}, 梁超², 管冬元², 吴中华²

(1. 三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002; 2. 上海中医药大学基础医学院, 上海 201203)

[摘要] 目的: 观察不同中医治法对大鼠肝癌波形蛋白(vimentin, VIM)表达的调控差异, 以及 VIM 在人肝癌细胞增殖中的作用。方法: 将 84 只雄性 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组以及实验组, 除正常组外均采用二乙基亚硝胺(DEN)诱发大鼠肝癌, 实验组分别经中药健脾益气、清热解毒、活血化痰等治疗, 检测各组大鼠肝癌组织(正常组取肝组织)VIM 表达的差异; 根据人 VIM 基因编码区设计 2 个 siRNA 靶点, 并将构建好的重组质粒转染 SMMC-7721 人肝癌细胞株, Realtime-PCR 检测转染前后该基因的表达差异, MTT 法检测转染前后细胞生长增殖情况。结果: 芯片结果显示, VIM 基因在大鼠肝癌形成后表达显著增加(模型组芯片读数为正常组 10 倍以上), 健脾和活血治法明显下调其表达; 采用 MTT 法筛选到一个 VIM 基因 RNA 干扰有效靶序列, 脂质体转染 144 h 后细胞的生长增殖得到了明显的抑制; 实时荧光定量 PCR 检测表明, 转染 72 h 后该基因的表达量明显降低(转染效率为 50%)。结论: 肝癌细胞恶性增殖有赖于 VIM 基因的高表达, 健脾和活血方药能显著下调该基因表达。

[关键词] 肝癌; 波形蛋白; 基因芯片; RNA 干扰; 治则治法

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0149-05

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110823.1116.003 **[网络出版时间]** 2011-08-23 11:16

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110823.1116.003.html>

Role of Vimentin in Hepatocarcinoma Cells Proliferation Investigated by RNA Interference and Regulations by Traditional Chinese Medicine

HU Wei¹, FANG Zhao-qin^{2*}, LIANG Chao², GUAN Dong-yuan², WU Zhong-hua²

(1. Medical school of Three Gorges University, Yichang 443002, China;

2. Basic Medical School; Shanghai University of Traditional Chinese Medicine(TCM), Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the different effects of several traditional Chinese medicine (TCM) formula therapies on vimentin(VIM) expression in liver cancer rats and in humane hepatocarcinoma cells. **Method:** Rat hepatocellular carcinoma(HCC) model was induced by diethylnitrosamine(DEN). These rats were treated by different therapeutical methods including Nourishing spleen and enriching Qi, Clearing away heat and toxic material, Activating blood circulation. Gene chips were used to measure the different expression of VIM gene. Two siRNA targets toward VIM gene were designed; and recombinant plasmid was transfected to hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. Gene expression of VIM was determined using real-time quantitative PCR, and the cell viability was determined by MTT assay. **Result:** According to the gene chip results, VIM expression increased significantly after formation of hepatocellular carcinoma in rats. Such TCM therapeutical methods as Nourishing

[收稿日期] 20110404(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30672574;30271576)

[第一作者] 胡卫, 讲师, 博士, 从事中医药抗肿瘤的基础研究, Tel:13972540162, E-mail: huwei.pearl@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 方肇勤, 教授/博导, Tel:021-51322115, E-mail: zqfang@sh163d.sta.net.cn

spleen and enriching qi and Activating blood circulation could down-regulate VIM expression obviously. An effective siRNA target sequence in VIM was obtained by MTT assay. Hepatocarcinoma cells proliferation were inhibited obviously after 144 hours of interferenced target transfection. VIM gene expression was decreased greatly. **Conclusion:** Malignant proliferation of hepatocarcinoma cells might be related with high expression of VIM gene.

[Key words] hepatocellular carcinoma; vimentin; gene chip; RNA interference; therapeutical principles and methods

肝细胞性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC, 以下简称“肝癌”) 为全球最常见的恶性肿瘤的第 5 位, 是我国癌症死因中第 2 位的肿瘤。每年全世界大约有 50 万 ~ 100 万新发病例, 中国的肝癌发病人数占全球总数的一半以上^[1]。肝癌的发生、发展、复发与转移是一个多基因、多途径相互作用的过程, 其中, 有些基因与肝癌的关系已做了大量深入的研究工作, 但相当一部分表达失调的基因与肝癌的关系尚待进一步的研究。在肝癌的防治中, 中医药辨证论治发挥了重要的作用。目前中医治疗肝癌的治法主要有健脾益气、清热解毒、活血化瘀等几个方面^[2]。我们的研究发现, 与模型组和西药对照组相比, 这些治法均能不同程度地延长二乙基亚硝胺 (DEN) 诱发肝癌大鼠生存期, 在对肝癌的抑制作用、生存期延长等方面作用不尽相同^[3]。

为进一步探索其作用机制, 我们采用 Affymetrix Rat 230A Gene Chip, 发现在二乙基亚硝胺 (DEN) 诱导大鼠肝癌发生与发展过程中存在着大量的基因表达异常^[4-5]。其中, 大多基因与肝癌的关系尚不明确, 其中包括波形蛋白 (vimentin, VIM)。为探讨 VIM 在肝癌细胞中表达升高的病理意义, 我们采用 RNAi 技术令该基因在肝癌细胞中表达后沉默, 观察其表达沉默后肝癌细胞增殖的变化, 初步探讨其生物学功能。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 Wistar 大鼠, 体重 100 ~ 120 g, 84 只, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 许可证号 SCSK (沪) 2003-2003。

1.2 转染细胞与试剂 转染细胞为 SMMC-7721 肝癌细胞株 (中国科学院上海细胞所), 转染载体为 pSilencerT^m2.1-U6 neo 质粒 (Ambion 公司), 脂质体 lipo2000 (Invitrogen 公司); BamH I 与 Hind III 限制性内切酶 (Ambion 公司), 质粒纯化试剂盒 PureYieldTM Plasmid Midiprep System (Promega 公司); 实时荧光定量 PCR 试剂盒 (TAKARA, SYBR

Premix Ex Taq; Perfect Real Time)。

1.3 药品 中药饮片购自上海市徐汇中药饮片厂; FT-207 购自上海华联制药有限公司。

1.4 RNA 干扰检测的仪器和试剂 Rotor-Gene 3000 实时荧光定量 PCR 仪 (GENE 公司), ELX800 酶标仪 (BIO-TEK 公司)。

2 方法

2.1 大鼠肝癌模型的制备及分组与治疗 雄性 Wistar 大鼠, 体重 100 ~ 120 g, 84 只, 随机分为 7 组, 除正常组外, 各造模大鼠自由饮用含 80×10^{-6} DEN (购自中国科学院南京土壤研究所) 水溶液, 至 20 周末动物处死; 各治疗组, 于造模 14 周后开始给药至实验结束, 中药浸膏和西药水溶液拌入颗粒饲料, 摄入量中药约为成人公斤体重的 10 倍、西药约为 5 倍。分组和处方^[6]见表 1。

表 1 动物分组及治疗情况 (n = 12)

组别	治疗方法
正常	-
模型	-
西药	喃氟啶 (FT207)
清热	由半枝莲、白花蛇舌草、蒲公英 3 味中药组成
活血	由丹参、赤芍、桃仁等 7 味中药组成
健脾	由白术、黄芪、茯苓等 7 味中药组成
合方	由上述 3 种治法的药物组成

2.2 芯片检测 所有大鼠处死时取正常组肝组织、模型组及各药物干预组的肝癌组织, 用 Trizol 试剂盒提取组织总 RNA, 经质量检测与浓度测定后, 将同组 RNA 的样本分别取 10 μ g 混合, 标注为正常组、模型组、西药组、清热组、活血组、健脾组、合方组 (共 7 份检测样本)。RNA 经反转录后, 进行 Affymetrix rat 230A GeneChip 检测 (共 7 张芯片)。

2.3 RNA 干扰检测的材料与方法

2.3.1 VIM 基因的 RNAi 靶序列 VIM 基因的 RNAi 靶序列 ① CACCCTGCAATCTTTCAGA; ② GTTTGCTGACCTCTCTGACT; VIM 基因干扰效率检

测的实时荧光定量 RT-PCR 上下游引物分别为: GAGAAGTTTGCCGTTGAAGC, TCCAGCAGCTTCCTG TAGGT 扩增产物长度为 144 bp; GAPDH 内参基因的实时荧光定量 RT-PCR 检测的上下游引物分别为: GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT, TTG ATT TTG GAG GGA TCT CG, 扩增产物长度为 238 bp。

2.3.2 RNA 干扰检测的方法 ①通过 BLAST 工具比大鼠与人的 VIM 基因,相似性为 91.8%。②从 GenBank 数据库中搜索到人 VIM 基因的 mRNA 序列(登录号为 NM_003380),确认 cds 区。③针对 VIM 基因的 mRNA 序列的 cds 区,应用 Ambion 公司在线的 siRNA 设计软件(http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)设计 RNA 干扰序列(长度为 21 bp),并进行 BLAST 比对,以确定干扰序列的特异性。同时,每个靶序列通过该软件可自动生成 2 条克隆入质粒的序列(含正、反向 RNA 干扰序列与 BamH I 与 Hind III 限制性内切酶切位点,长度为 64 bp),该序列由 Invitrogen 公司合成。④将合成后的同一干扰位点上的两条单链,退火结合成双链后,重组到经 BamH I 与 Hind III 双酶切的 pSilencerTm2.1-U6 neo 质粒中,并转染到大肠杆菌 DH5 α 中。⑤重组后质粒经大肠杆菌大量扩增后,由质粒纯化试剂盒得到待转染的含 RNA 干扰序列的重组质粒,经 DNA 测序验证后,稀释成 0.1 g·L⁻¹。⑥用脂质体 lipo2000 将重组质粒转入 SMMC-7721 肝癌细胞株中,6 孔板每孔含 210 μ L 1640 加 40 μ L 质粒(0.1 g·L⁻¹),96 孔板每孔含 23 μ L 1640 加 2 μ L 质粒(0.1 g·L⁻¹),同时设立空白对照组(质粒用去离子水代替)与阴性对照组(采用相同浓度的自身环化的质粒)以及脂质体对照组。转染后细胞培养 24,48,72 h 观察转染效率和细胞生长情况。⑦MTT 检测:96 孔板转染后 24,72,144 h 常规 MTT 检测(波长为 490 nm),每个样本平行做 4 个复孔。⑧实时荧光定量 RT-PCR 检测:转染 72 h 后收集细胞,用 Trizol 液提取其总 RNA 并检测所得 RNA 的 OD260 和 OD280,各实验组取 2 μ g 总 RNA 进行反转录,再以反转录产物为模板,用 TAKARA 公司的 SYBR Premix Ex Taq(Perfect Real Time)试剂盒进行标准曲线的绘制,并以 GAPDH 为内参做相对表达量分析。扩增反应体系(共计 25 μ L)为:消毒双蒸水 9.5 μ L,SYBR Premix Ex Taq(2 \times)12.5 μ L,上、下游引物(各 5 μ mol·L⁻¹)2 μ L,RT 产物 1 μ L。扩

增反应条件:95 $^{\circ}$ C \times 30 s;95 $^{\circ}$ C \times 5 s,60 $^{\circ}$ C \times 30 s,40 个循环。结果以采用 $\Delta\Delta CT$ 法加以分析。⑨琼脂糖凝胶电泳:取电转染组 PCR 产物 20 μ L 与上样缓冲液 4 μ L 混匀后取 20 μ L 上样于 1.4% 的琼脂糖凝胶中,80 V 电压,电泳 1 h。紫外灯下查看,并拍照。

2.4 数据分析 基因芯片数据的分析详细步骤和灵敏度问题以及定量的方法参考 Affymetrix Gene Chip 网站的技术手册;所有计量资料均采用 SSPS 12.0 软件包的方差分析。

3 结果

3.1 VIM 在 DEN 大鼠肝癌中表达升高,活血化痰法明显下调其表达 芯片检测结果表明,VIM 基因在正常肝脏中表达量很小,芯片读数计算值不足仅为 481,而肝脏所有 15 710 个基因的平均计算值为 890。肝癌形成后,该基因表达明显增加,芯片读数达到 5 655,为正常肝脏表达的 10 倍以上,中医各治法方药和西药均有一定的下调作用,健脾、活血方药和全方下调最明显。见图 1。

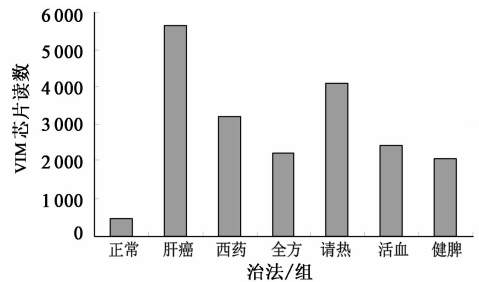


图 1 不同治法对大鼠肝癌 VIM 的作用

3.2 人肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖有赖于 VIM 基因的表达 MTT 法检测空白对照组、阴性对照组、RNA 干扰组 SMMC-7721 肝癌细胞的生长增殖情况。转染 VIM 基因的 RNAi 表达载体后,MTT 检测显示,转染后 144 h 肝癌细胞增殖受到明显影响。见图 2。

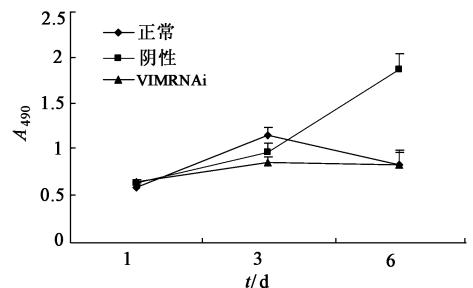
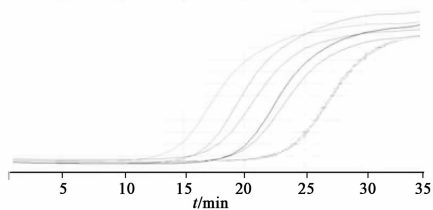


图 2 VIM RNAi 后不同时间对肝癌细胞增殖的作用

3.3 实时荧光定量 RT-PCR 对 RNAi 现象的验证

实时荧光定量 RT-PCR 检测表明,转染后 72 h, VIM 的 RNAi 现象显著,该基因相对表达量显著下降,不到阴性载体的一半(以空白对照组为参照, GAPDH 基因为内参,进行 $\Delta\Delta CT$ 法分析),见图 4,提示 RNAi 现象显著,该基因出现表达后沉默;RT-PCR 的扩增曲线见图 3。



从左至右分别是空白对照组 GAPDH, 阴性对照组 GAPDH, 干扰序列转染后 GAPDH, 空白对照组 VIM, 阴性对照组 VIM, 干扰序列转染后 VIM。

图 3 实时荧光定量 RT-PCR 的扩增曲线

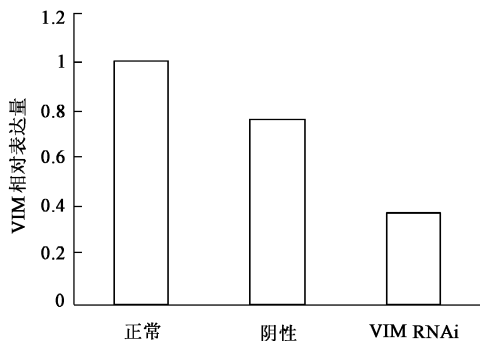
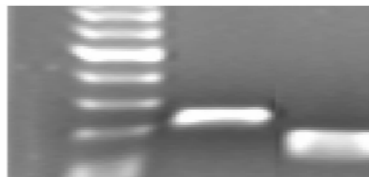


图 4 RNAi 后各组细胞 VIM 表达量

实时荧光定量 RT-PCR 结果电泳结果见图 5, PCR 产物为单一条带,相对分子质量与预期的一致。



第 1 泳道为 Marker;第 2 泳道为 GAPDH(238 bp);
第 3 泳道为 VIM(144 bp)

图 5 RT-PCR 产物电泳

4 讨论

VIM(vimentin)基因定位人染色体 10p13,核酸长度 2 151 kb,该基因编码产物波形蛋白是间质细胞中最主要的中间纤维,它存在于中胚层起源的细胞中,如成纤维细胞、内皮细胞和白细胞等^[7],并与微管、微丝共同形成了一个细胞支架网络而维持细胞完整性。

近年来研究表明,波形蛋白作为一种重要的骨

架蛋白通过不同途径调控着细胞的多种功能,在胚胎发育和细胞分化、细胞的黏附和移动、细胞凋亡、炎症和免疫反应中发挥重要的生物学功能^[8-11]。

本项目研究表明,在 DEN 诱发的大鼠肝癌模型中,VIM 基因的表达较正常组明显升高,并且该基因在大鼠肝癌诱发过程中呈不断上升的趋势,我们推测该基因的高表达可能与肝癌的发生发展有着密切的联系。经检索,未查到采用 RNAi 研究该基因在肝癌中作用的报道。为了进一步研究其在人肝癌发生和发展中的作用,我们采用了 RNAi 技术。为了便于该研究在临床上推广,我们检索了该基因人类的表达序列,构建了含人 VIM-siRNA 的质粒,并将其转染人肝癌细胞 SMMC-7721。结果显示转染 144 h 后肿瘤细胞生长受到明显抑制,证明该基因在 SMMC-7721 细胞生长增殖方面起重要作用。通过实时荧光定量 PCR 检测转染后 VIM 基因 mRNA 的表达水平,结果显示转染 72 h 后,VIM 基因 mRNA 表达明显降低, RNAi 作用显著。其中以靶序列 CACCCTGCAATCTTTCAGA 的效果最好。

本研究表明,不论在 DEN 诱发的大鼠肝癌中,还是在人肝癌细胞 SMMC-7721 中,VIM 均扮演着重要的角色,与肝癌细胞的增殖有着密切的关系,鉴于文献表明该基因与肿瘤侵袭转移密切相关,可选用侵袭性强的细胞和动物模型进一步研究其在肝癌发生发展中的作用。

[参考文献]

- [1] Lai E C, Lau W Y. The continuing challenge of hepatic cancer in Asia [J]. Surgeon, 2005, 3: 210.
- [2] 管冬元,方肇勤.原发性肝癌的中医药证治研究概况[J].南京中医药大学学报,1999,15(2):127.
- [3] 方肇勤,管冬元,梁尚华,等.不同中医治法对 DEN 诱发大鼠肝癌作用的比较研究[J].中医杂志,2002,43(7):542.
- [4] 盛学仕,方肇勤,管冬元,等. DEN 诱发大鼠肝癌过程中肝组织基因表达谱的演变[J].中国中医基础医学杂志,2005,11(10):737.
- [5] 阚卫兵,方肇勤,管冬元,等.二乙基亚硝胺所诱导大鼠肝癌表达上调的基因[J].世界华人消化杂志,2005,13(20):2420.
- [6] 范敏,方肇勤,管冬元,等.中医不同治法对成纤维细胞生长因子在大鼠肝癌中表达的影响[J].河南中医,2007,27(4):27.
- [7] Coulombe P A, Wong P. Cytoskeletal intermediate

疏肝活血方促进缺血组织 HIF-1 α , HGF, VEGF mRNA 的表达研究

刘艳玲*, 郑巧楠, 袁明殿

(辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

[摘要] 目的:探讨疏肝活血方对肢体缺血组织中低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α),肝细胞生长因子(HGF),血管内皮生长因子(VEGF) mRNA 表达的调节作用。方法:BALB/c 裸鼠 64 只,随机分为疏肝活血方组、模型组和正常组,股动脉结扎法建立裸鼠肢体缺血模型,分别于术后 1,2,3,4 周观察各组裸鼠肢体缺血状态的改变,应用苏木素-伊红(HE)染色和 CD34 免疫组化染色观察肌肉组织一般形态学及微血管数的改变,应用反转录多聚酶链反应(RT-PCR)检测 HIF-1 α ,HGF,VEGF 基因在缺血肌肉中表达的动态变化。结果:疏肝活血方能明显改善裸鼠肢体的缺血状态;术后 2~4 周,疏肝活血方组裸鼠缺血肢体肌肉中的微血管数(MVC)明显高于模型组($P < 0.01$);疏肝活血方组裸鼠缺血肢体肌肉中 HIF-1 α ,HGF 和 VEGF 的 mRNA 表达明显强于模型组。结论:疏肝活血方具有明显的促血管生成作用,能够明显上调血管新生相关基因 HIF-1 α ,HGF,VEGF 的 mRNA 表达水平。

[关键词] 疏肝活血方;缺血;mRNA 表达

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0153-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110823.1118.011 **[网络出版时间]** 2011-08-23 11:18

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110823.1118.011.html>

Promotion of HIF-1 α , HGF, VEGF mRNA Expression in Ischemia Limb Muscle by Shugan Huoxue Recipe

LIU Yan-ling*, ZHENG Qiao-nan, YUAN Ming-dian

(Affiliated Hospital of Liaoning Traditional Chinese Medical University, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the regulation of Shugan Huoxue recipe on hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α), hepatocyte growth factor (HGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in muscle after limb ischemia. **Method:** Forty-eight BALB/c nude mice, were randomly divided into Shugan Huoxue

[收稿日期] 20110304(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30600843)

[通讯作者] *刘艳玲,学士,副主任药师,从事临床中药学研究, Tel:024-86291337, E-mail: sylidy@yahoo.com.cn

filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds [J]. Nat Cell Biol, 2004, 6 (8): 699.

[8] Zhao Yan, Yan Quanmei, Long Xing, et al. Vimentin affects the mobility and invasiveness of prostate cancer cells [J]. Cell Bio-chem Funct, 2008, 26 (5): 571.

[9] Singh S, Sadacharan S, Su S, et al. Overexpression of vimentin role in the invasive phenotype in an androgen 2 independent model of prostate cancer [J]. Cancer Res, 2003, 63(9):2306.

[10] Tolstonog G V, Belichenko2 Weitzmann I V, Lu J P, et al. Spontaneously immortalized mouse embryo fibroblasts: growth behavior of wild-type and vimentin deficient cells in relation to mitochondrial structure and activity [J]. DNA Cell Biol, 2005, 24 (11): 680.

[11] Byun Y, Chen F, Chang R, et al. Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis [J]. Cell Death Differ, 2001, 8 (5):443

[责任编辑 聂淑琴]