

SHP-2shRNA 联合苦参碱对宫颈癌细胞增殖的影响

魏林珍¹, 奉容花², 王海琳^{1,2}

摘要 目的 应用 RNA 干扰技术构建 SHP-2 基因重组慢病毒载体, 研究 SHP-2shRNA 联合苦参碱对宫颈癌 HeLa 细胞生长增殖的影响。方法 靶向构建 SHP-2 的 shRNA 序列慢病毒载体, 将其转染至人宫颈癌 HeLa 细胞以沉默 SHP-2 基因, 用 Real-time PCR (RT-PCR) 测定 HeLa 细胞 SHP-2 mRNA, 应用 Western blot 法测定 SHP-2 蛋白表达, CCK8 法测定 SHP-2 基因沉默联合苦参碱对 HeLa 细胞增殖的影响。结果

设计并成功构建 3 组 SHP-2 基因的干扰序列 (SHP-2 shRNA1、SHP-2 shRNA2 和 SHP-2 shRNA3) 以及对照序列 (NS), RT-PCR 检测结果表明 SHP-2 shRNA2 慢病毒载体干扰效率最佳。筛选稳定细胞后荧光显微镜观察感染效率较高, Western blot 结果显示细胞中 SHP-2 蛋白表达明显被抑制。CCK8 提示细胞的生长增殖能力明显受限, 且随着时间延长, 联合组 (SHP-2 shRNA2 + 苦参碱) 增殖最慢, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 成功构建出 SHP-2 基因的 shRNA 慢病毒干扰系统, SHP-2 基因沉默联合苦参碱可影响宫颈癌细胞增殖。

关键词 SHP-2; 慢病毒载体; 宫颈癌细胞; 增殖

中图分类号 R 737.33

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)02-0190-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.007

SHP-2 是蛋白酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphatase, PTPase) 家族中的一员, 与细胞的生长、增殖、分化及蛋白的磷酸化与去磷酸化的平衡等活动密切相关^[1-2]。当机体因某些因素导致体内蛋白的磷酸化与去磷酸化不平衡时, 会导致肿瘤恶性的发生。目前, 已有研究^[3]表明 SHP-2 与宫颈癌发生密切相关; Tao et al^[4]研究证实 HPV 感染的宫颈癌患者组织中 SHP-2 高表达。故 SHP-2 作为肿瘤学靶标已引起了学者对抑制剂作为癌症潜在治疗剂的兴趣。RNA 干扰 (RNA interference) 利用小发夹 RNA 切割形成的 shRNA, 其通过慢病毒载体来诱导序列特异的目的基因稳定持久的沉默而发挥效

应^[5]。苦参是由豆科植物苦参的干燥根中所提取的中药成分, 近年来研究中, 苦参碱抑制增殖抗肿瘤机制受到极大关注^[6]。该研究探讨 SHP-2 的慢病毒 shRNA 表达载体与苦参碱联合抗宫颈癌细胞增殖的作用, 为后续的研究宫颈癌 SHP-2 靶向基因与苦参碱联合治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 载体 pHBLV-U6-Scramble-ZsGreen-Puro (上海汉恒生物, Hanbio); T4 连接酶 (加拿大, Fermentas); 凝胶回收试剂盒 (美国, Axygen); 大肠杆菌菌株 DH5 α (美国, Invitrogen); 限制性内切酶 EcoRI 和 BamHI (Fermentas); 琼脂糖、DNA ladder (加拿大, Fermentas); 琼脂粉 (上海生工); 包装细胞 293T 细胞株 (美国, The Global Bioresource Center); 胎牛血清、胰蛋白酶、DMEM (美国, Invitrogen); 质粒 DNA 大抽提取试剂盒 (德国, Qiagen); LipofiterTM (上海汉恒生物, Hanbio); 0.45 μ m 滤器 (美国, Millipore 公司); 苦参碱 [宝鸡市方晟生物开发有限公司 (纯度 98%)]。

1.2 方法

1.2.1 靶向 SHP-2 基因的寡核苷酸设计 SHP-2 基因靶向 shRNA 干扰序列设计与合成根据 GenBank 中 SHP-2 的基因序列 (Accession Number: NM129844.5) 和 shRNA 序列表达载体 pHBLV-U6-Scramble-ZsGreen-Puro 的要求设计 3 段 RNA 干扰序列和 1 段阴性对照序列, 依次命名为 SHP-2 shRNA1、SHP-2 shRNA2、SHP-2 shRNA3 和 NS。而后依据以上 4 段序列分别设计合成 4 对寡核苷酸序列 (表 1)。4 对寡核苷酸序列经退火后均可在 5' 端含 EcoRI 酶切位点, 3' 端含 BamHI 酶切位点。

1.2.2 慢病毒表达载体 pHBLV-U6-Scramble-ZsGreen-Puro 的构建、扩增和鉴定 将 pHBLV-U6-Scramble-ZsGreen-Puro 载体用 EcoRI 和 BamHI 进行双酶切, 酶切产物回收后与合成的寡核苷酸退火产物按照比例混合, 然后依照 T4 DNA 连接酶试剂盒说明书 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接产物加入 DH5 α 感受态细菌中转化, Amp 筛选培养, 挑取单菌落扩大培

2019-11-27 接收

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (编号: 81260387)

作者单位: ¹ 甘肃省人民医院妇科, 兰州 730000

² 兰州大学第一临床医学院, 兰州 730000

作者简介: 魏林珍, 女, 主治医师;

王海琳, 女, 主任医师, 责任作者, E-mail: wanghailinyx@

163.com

养,提取质粒 DNA 后进行 DNA 测序。测序正确后分别命名为 pHBLV-SHP-2 shRNA1、pHBLV-SHP-2 shRNA2、pHBLV-SHP-2 shRNA3、阴性对照。

表 1 针对 SHP-2 基因的 3 个靶向 shRNA 序列

序列号	shRNA 序列(5'-3')
SHP-2 shRNA1	GCAGTTAAATTGTGCGCTGTA
SHP-2shRNA2	AGATGTCATTGAGCTTAAATA
SHP-2shRNA3	CCAGAGTTATCATAGTCCCTAGGTT
NS	TTCTCCGAACGTGTCACGTAA

1.2.3 慢病毒的包装 将慢病毒重组质粒和包装质粒按照 Lipofiter™ 转染试剂说明书转染细胞,简述如下:制备慢病毒穿梭质粒及其辅助包装原件载体质粒,进行无内毒素高纯度抽提后转染 293T 细胞,转染 6 h 后更换培养基,培养 48 h 和 72 h 后,收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液过滤病毒上清液,浓缩之后得到高滴度的慢病毒浓缩液。

1.2.4 重组慢病毒的滴度测定 应用稀释计数法测定各组病毒的滴度。第 1 天,将对数期生长状态好的 293T 细胞进行消化,稀释计数后至 500×10^4 /ml,加入 96 孔板,并保持 100 μ l/孔,每个孔有 6 个复孔。放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养。第 2 天,在 EP 管中做 3 倍梯度稀释,连续 6 个稀释度。用荧光显微镜观察实验结果,在含 10% ~ 30% 孔的荧光细胞计算病毒滴度。滴度(TU/ml) = 细胞数 $\times$ 百分比 $\times$ MOI(1) $\times$ 病毒稀释倍数 $\times 10^3$ 。

1.2.5 细胞培养 人宫颈癌 Hela 细胞由兰州大学基础医学研究院提供。复苏冻存的 Hela 细胞,培养于 DMEM 培养基(含 10% FBS),加入 1% 青霉素和 1% 链霉素。放入 25 cm^2 培养瓶,37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养。每 1 ~ 2 d 换液 1 次,待细胞 85% ~ 90% 融合成单层后以 0.25% 胰酶消化传代。

1.2.6 感染 Hela 细胞检测重组慢病毒干扰效率 取对数生长期的 Hela 细胞按 1×10^5 /ml 接种于 6 孔板中,次日待 Hela 生长至 90% 左右融合时,加入浓缩的慢病毒 10 μ l 的同时加入 polybrene(终浓度为 7 μ g/ml)以提高病毒感染效率。24 h 后更换为含 puromycin 1 μ g/ml 的完全培养基以筛选细胞,同时以正常细胞株作为对照,puromycin 处理 48 h,观察细胞的死亡情况,选取能够杀死全部细胞的最低浓度。本实验中能够杀死 Hela 空细胞的最低 puromycin 浓度为 1 μ g/ml。待传代后的细胞在大皿中生长至 60%,以摸索到的 puromycin 浓度处理 48 h,48 h 后 Hela 细胞的融合率不到 80% ~ 90%,换新鲜的 puromycin 的培养基继续处理。筛完 2 次 puromycin

的细胞长满后按 1 : 3 的比例传代,待传代后的细胞长满,用于收样做后续检验。

1.2.7 RT-PCR 测定 SHP-2 mRNA 有效干扰慢病毒载体 TRIzol 法提取慢病毒感染的 Hela 细胞总 RNA,逆转录试剂盒逆转录 cDNA,实时荧光定量 PCR 检测 Hela 细胞内 SHP-2 mRNA 表达水平,内参为 GAPDH。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min,95 $^{\circ}$ C、5 s,64 $^{\circ}$ C 退火 30 s,40 个循环。引物序列由上海生工生物公司合成;SHP-2 上游引物:5'-CCGGACAGG-GACGTTTCATT-3';下游引物:5'-TGCTTCTGTCTG-GACCATCC-3';hGADPH 上游引物:5'-CGCTCTCT-GCTCCTCCTGTT-3';下游引物:5'-CCATGGTGTCT-GAGCGATGT-3'。

1.2.8 CCK8 法检测感染后细胞生长活性 实验分组如下:空白对照组、苦参碱(1 mg/ml)组、SHP-2 shRNA 组、SHP-2 shRNA + 苦参碱(1 mg/ml)组。取后对数生长的感染的宫颈癌细胞,用胰酶消化,以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板,每个时间点设 5 个复孔,生长 24 h 后吸净培养孔内原培养液,各组分别加入试剂,继续孵育 24、48、96 h。弃去培养基,加入 100 μ l 新鲜培养基冲洗后,再加入 10 μ l CCK8 试剂,避光孵育 2 h,计算每孔细胞的 OD 值,连续检测 96 h,绘制细胞生长曲线。

1.2.9 Western blot 法检测 SHP-2 蛋白的表达 分别提取各组细胞总蛋白,经 95 $^{\circ}$ C、10 min 变性处理的样品进行 SDS-PAGE 电泳,采用半干法进行转膜;5% (W/V) 的脱脂奶粉溶液封闭,分别加入 SHP-2 小鼠单克隆抗体(1 : 2 000),GAPDH 小鼠单克隆抗体(1 : 1 000)4 $^{\circ}$ C 过夜;次日加入 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG,用 37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 2 h;ECL 化学底物发光法显影,Image Lab 4.0 软件进行图像灰度分析,计算 SHP-2 蛋白相对表达量用其与 GAPDH 的灰度比值表示。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间的比较采用 t 检验。检验水准: $\alpha = 0.05$, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒表达载体慢病毒表达载体 pHBLV-U6-Scramble-ZsGreen-Puro 载体酶切后重组合成的 pHBLV-SHP-2 shRNA 的 DNA 测序结果将重组阳性克隆菌液送上海铂尚生物技术有限公司测序,测序结果显示所构建的慢病毒表达载体均含有所设计的

目的片段,其序列与设计的靶向 SHP-2 寡核苷酸序列与阴性对照序列完全一致,表明目的片段已正确插入 pHBLV 慢病毒载体,重组慢病毒载体构建成功。见图 1。

2.2 重组慢病毒的包装 三质粒慢病毒共同转染 293T 细胞后,细胞出现了融合现象,用荧光显微镜下观察,重组质粒细胞出现较强的绿色荧光(图 2),并计算病毒原液滴度:病毒滴度(TU/ml) = 荧光细胞个数 $\times$ 1 000 / 每病毒原液量(μ l)。转染效率高,病毒包装成功。

2.3 慢病毒载体转染 HeLa 细胞及 qRT-PCR 干扰效率筛选 病毒感染细胞后经 puromycin 筛选后,细胞生长状态良好,形态学无明显变化,且能稳

定表达绿色荧光(图 3)。各组慢病毒感染 HeLa 细胞 48 h 后,细胞生长状态良好,转染效率较高。Real-time PCR 检测结果显示:hGAPDH 和 SHP2 溶解曲线较好,证明 RNA 抽提和 QPCR 过程无问题。两组 shRNA 干扰后,SH2 在 HeLa 细胞中的表达量较空白载体组显著降低(图 4),SH2 shRNA2 的沉默效果最佳(下调效率约达到 94%),因此选其干扰效果较好的载体行后续实验。

2.4 慢病毒载体转染后 HeLa 生长率 SHP-2 shRNA2 稳定转入 HeLa 细胞,培养 24、48 和 72 h 后,CCK8 法检测 96 孔板各孔的光密度值,计算细胞的增殖抑制率分别: $(6.13 \pm 1.12)\%$ 、 $(15.16 \pm 1.44)\%$ 和 $(19.16 \pm 1.98)\%$;与对照组相比,在处

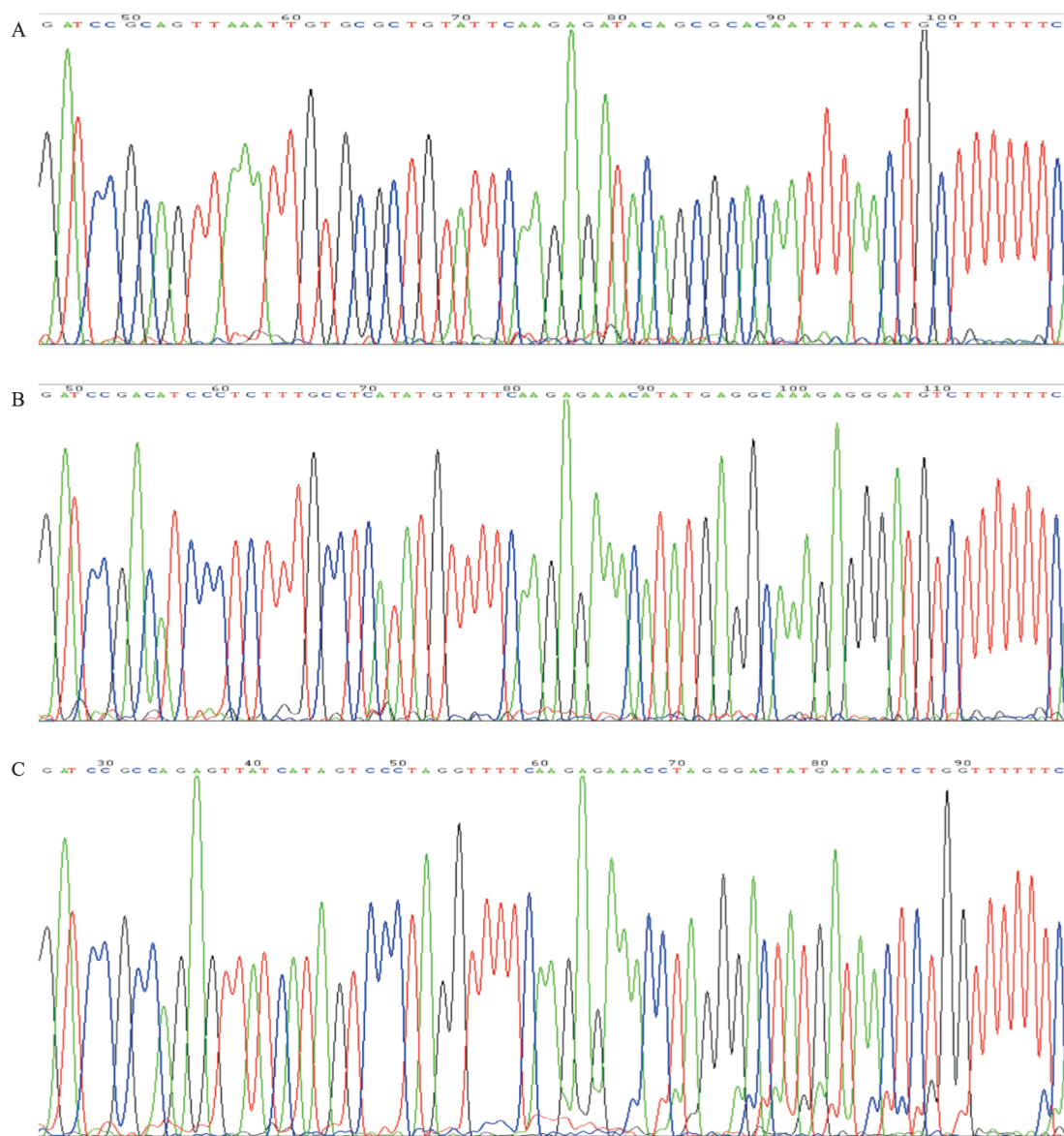


图 1 重组载体 pHBLV-SHP2 测序图谱

A: pHBLV-SHP2 shRNA1; B: pHBLV-SHP2 shRNA2; C: pHBLV-SHP2 shRNA1

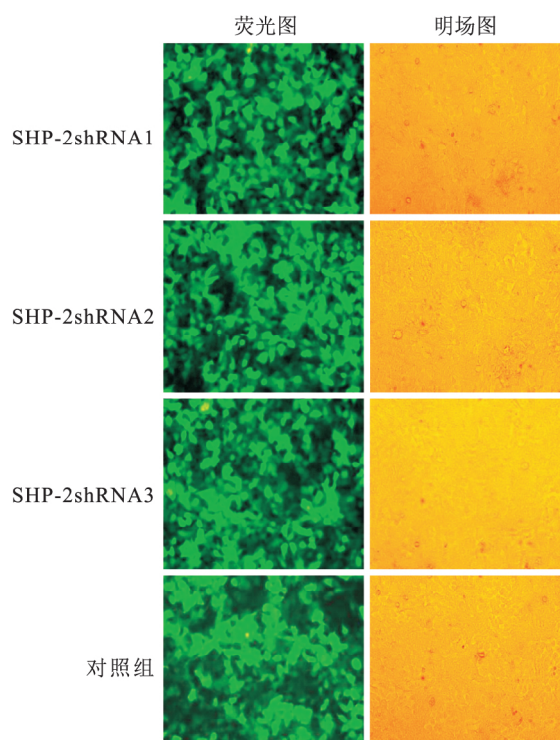


图2 包装有重组慢病毒 SHP-2shRNA 的 293T 细胞 ×100

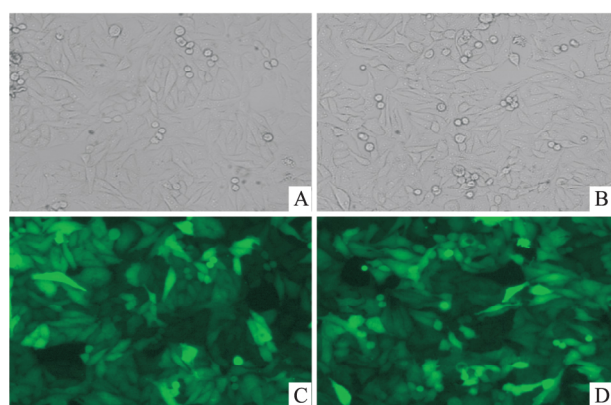
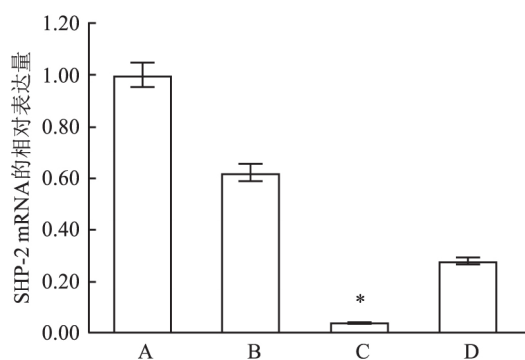
图3 重组病毒以 MOI=10 感染 HeLa 细胞后的感染效果 ×100
A、B: 光学显微镜; C、D: 荧光显微镜; A、C: 对照组; B、D: SHP-2 shRNA

图4 转染慢病毒后各组细胞 SHP-2 mRNA 水平

A: 对照组; B: SHP-2shRNA1; C: SHP-2shRNA2; D: SHP-2shRNA3; 与对照组比较: * $P < 0.05$

理后的第 48 h 开始出现差异 ($P < 0.05$)。实验同时显示苦参碱对人宫颈癌细胞株 HeLa 的生长抑制呈时间依赖模式。

进一步采用 shRNA 质粒使宫颈癌 HeLa 细胞 SHP-2 基因沉默,同时加入苦参碱 (0.5 mg/ml),检查两者联合对宫颈癌细胞的增殖。结果表明联合用药后增殖抑制率均明显低于单药应用组(表 2)。推测可能沉默 SHP2 基因的表达联合苦参碱可能会协同抑制 HeLa 细胞的增殖。

表2 不同浓度苦参碱对 HeLa 细胞增殖抑制率的影响(% $n=3 \bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h
对照	0.10 ± 0.09	0.21 ± 0.14	0.31 ± 0.18
SHP-2 shRNA2	6.13 ± 1.12	15.16 ± 1.44	19.16 ± 1.98
苦参碱	7.43 ± 0.87*	19.37 ± 1.63*	22.96 ± 2.35*
苦参碱+SHp-2 shRNA2	10.22 ± 1.68*	21.25 ± 1.96*	38.25 ± 3.16*

与对照组比较: * $P < 0.05$

2.5 SHP2 shRNA2 稳转 HeLa 细胞内 SHP2 蛋白水平表达 结果显示: SHP2 蛋白水平表达较空载质粒对照组显著降低,表达水平分别为对照组 (1.15 ± 0.435), SHP2 沉默组 (0.58 ± 0.132) ($P < 0.05$)。见图 5。

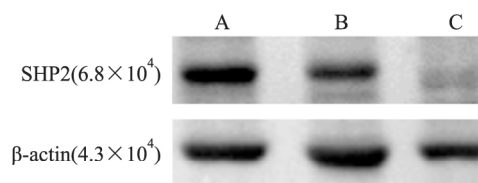


图5 Western blot 检测各组中 SHP-2 蛋白的表达

A: HeLa 细胞; B: 空载质粒对照组; C: HeLa -SHP2-shRNA 2 稳转细胞

3 讨论

当前研究^[7]表明,肿瘤细胞依赖于肿瘤微环境。肿瘤微环境能促进肿瘤细胞生长,破坏免疫监视。肿瘤细胞与肿瘤微环境中的支持细胞通过多种信号通路进行交流。这些信号通路不仅涉及蛋白激酶的调节,而且涉及蛋白磷酸酶的失调。由蛋白酪氨酸激酶和蛋白酪氨酸磷酸酶相互协调维持的酪氨酸磷酸化的稳定,对于广泛的细胞过程至关重要。异常的酪氨酸磷酸化与许多人类疾病(包括癌症)的发病机制相关^[8],这表明蛋白酪氨酸磷酸酶可能是癌症治疗的创新分子靶标。

SHP-2 属于蛋白酪氨酸磷酸酶家族成员之一,其与多种疾病包括肿瘤的发生和发展密切相关^[9]。其 N 末端含有两个 Src 同源结构域 2 (Src homology 2, SH2), C 末端含有其催化结构域。其遍及于各种

细胞的细胞质中,处于非活性状态,而当与细胞膜上的底物结合后活化而发挥生物学作用。尽管现阶段 SHP-2 在信号通路中的精确作用和下游靶点还不是很清楚,但它对细胞运动既可起到正反馈调节作用也可以起到负反馈调节作用。虽然 SHP-2 与多种肿瘤的发生有密切相关^[10-12],但是 SHP-2 在宫颈癌的致病、转移、耐药等多个环节的具体作用机制不尽相同,有待深入研究。

病毒载体是一种以 HIV 为基础发展而来的复制缺陷型逆转录病毒载体^[13],与质粒介导的 RNAi 相比,它具有转染效率高、转移基因片段容量较大等优势,最大的优点是能够将遗传物质整合到宿主的基因组,并使其长时间在宿主细胞稳定表达,是携带干扰 RNA 的理想载体^[14]。

近年来研究表明苦参碱对多种肿瘤细胞都具有抑制增殖和诱导凋亡的作用^[15],本课题前期研究结果显示苦参碱作用后宫颈癌 HeLa 细胞后,随着 HeLa 凋亡增加 SHP-2 表达增加,提示 SHP-2 与宫颈癌 HeLa 细胞增殖凋亡有一定的相关性。本课题组利用前期研究工作,设计了 3 个 SHP-2 基因的干扰靶点,分别将其连接在表达 puromycin 和 Amp 的慢病毒载体 pHBLV-U6-Scramble-ZsGreen-Puro 上,进一步包装病毒从而得到 SHP-2 shRNA 慢病毒载体。用 Real-time PCR 结果筛选出慢病毒感染 HeLa 细胞后干扰效率较高的病毒载体,采用 Western blot 验证细胞内 SHP-2 的表达水平显著降低。本研究通过 SHP-2 沉默后苦参碱对细胞凋亡明显增加,提示 SHP-2 基因沉默与苦参碱对宫颈癌的生长凋亡有一定的影响。SHP-2 基因对宫颈癌生长凋亡、转移的具体机制及模型动物的基因治疗需要在后续研究工作中进一步探讨和研究。

参考文献

- [1] Neel B G, Gu H, Pao L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling[J]. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28(6): 284-93.
- [2] Dempke W C M, Uciechowski P, Fenchel K, et al. Targeting

- SHP-1, 2 and SHIP pathways: A novel strategy for cancer treatment[J]. *Oncology*, 2018, 95(5): 1-13.
- [3] An H, Zhao W, Hou J, et al. SHP-2 phosphatase negatively regulates the TRIF adaptor protein-dependent type I interferon and proinflammatory cytokine production[J]. *Immunity*, 2006, 25(6): 919-28.
- [4] Tao X H, Shen J G, Pan W L, et al. Significance of SHP-1 and SHP-2 expression in human papillomavirus infected Condyloma acuminatum and cervical cancer[J]. *Pathol Oncol Res*, 2008, 14(4): 365-71.
- [5] Shen T, Liu K, Miao D, et al. Lentivirus-mediated RNA interference against Japanese encephalitis virus infection *in vitro* and *in vivo*[J]. *Antiviral Res*, 2014, 108: 56-64.
- [6] Liu Y, Xu Y, Ji W, et al. Anti-tumor activities of matrine and oxymatrine: literature review[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(6): 5111-9.
- [7] Herst P M, Dawson R H, Berridge M V. Intercellular communication in tumor biology: A role for mitochondrial transfer[J]. *Front Oncol*, 2018, 8: 344.
- [8] Ruvo P P. Role of protein phosphatases in the cancer microenvironment[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019, 1866(1): 144-52.
- [9] Matozaki T, Murata Y, Saito Y, et al. Protein tyrosine phosphatase SHP-2: a proto-oncogene product that promotes Ras activation[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(10): 1786-93.
- [10] Vazhappilly C G, Saleh E, Ramadan W, et al. Inhibition of SHP2 by new compounds induces differential effects on RAS/RAF/ERK and PI3K/AKT pathways in different cancer cell types[J]. *Invest New Drugs*, 2019, 37(2): 252-61.
- [11] Tao X H, Shen J G, Pan W L, et al. Significance of SHP-1 and SHP-2 expression in human papillomavirus infected Condyloma acuminatum and cervical cancer[J]. *Pathol Oncol Res*, 2008, 14(4): 365-71.
- [12] 胡中倩,汪心怡,李菲菲,等. SHP-2 酪氨酸磷酸酶野生、突变型真核表达载体构建及其表达产物磷酸酶活性检测[J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(7): 767-71.
- [13] 王一茹,姚斌伟,张艳,等. FoxM1 shRNA 慢病毒载体构建及感染人前列腺癌细胞的稳定细胞株筛选[J]. *南方医科大学学报*, 2015, 35(9): 1227-33.
- [14] Picanco-Castro V, de Sousa Russo-Carbolante E M, Tadeu Covas D. Advances in lentiviral vectors: a patent review[J]. *Recent Pat DNA Gene Seq*, 2012, 6(2): 82-90.
- [15] 曹建,魏润杰,邓茹芸,等. 苦参碱及氧化苦参碱抑制肿瘤作用机制研究进展及展望[J]. *中草药*, 2019, 50(3): 753-760.

Effect of SHP-2 shRNA combined with matrine on proliferation of cervical cancer cells

Wei Linzhen¹, Feng Ronghua², Wang Hailin^{1,2}

(¹Dept of Obstetrics and Gynecology, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000;

²The First Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000)

Abstract Objective To investigate the effect of SHP-2 shRNA combined with matrine on proliferation of HeLa by

网络出版时间: 2020-2-19 12:57 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200217.1527.008.html>

马钱子碱诱导人脐静脉内皮细胞凋亡过程中 血管内皮生长因子和上皮细胞激酶 A2 的表达变化

徐 萌¹ 李 平²

摘要 目的 探讨马钱子碱诱导人脐静脉内皮细胞(HU-VECs)凋亡过程中血管内皮生长因子(VEGF)和上皮细胞激酶 A2(EphA2)的表达变化。方法 常规培养 HUVECs,分为对照组、马钱子碱低(10 $\mu\text{mol/L}$)、中(20 $\mu\text{mol/L}$)、高(40 $\mu\text{mol/L}$)剂量处理组,CCK-8 法检测 HUVECs 细胞活力,划痕实验检测 HUVECs 的迁移改变,Hoechst 33258 细胞免疫荧光、流式细胞术 Annexin V/PI 双染法检测马钱子碱对 HUVECs 细胞凋亡变化,Western blot 分别检测马钱子碱对 HUVECs 细胞 VEGF 和 EphA2 蛋白表达变化。结果 马钱子碱可以浓度依赖性的抑制 HUVECs 增殖,划痕实验表明马钱子碱可抑制 HUVECs 的迁移;Hoechst 33258 细胞免疫荧光和流式细胞术均表明马钱子碱呈浓度依赖性促进 HUVECs 凋亡,Western blot 结果表明马钱子碱呈浓度依赖性的方式下调 HUVECs 中 VEGF 和 EphA2 的蛋白表达。结论 马钱子碱可以抑制 HUVECs 的增殖和迁移,引起细胞凋亡,机制可能与下调 VEGF 和 EphA2 表达有关。

关键词 马钱子碱;人脐静脉内皮细胞;细胞凋亡;血管内皮生长因子;上皮细胞激酶 A2

中图分类号 R 737.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)02-0195-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.008

马钱子又称番木鳖、苦实等,入药为干燥成熟的种子。始载于《本草纲目》中,临床上用于跌打损伤、痹症风湿、疮毒痈肿等。马钱子主要活性生物碱单体成分马钱子碱(brucine),又称番木鳖碱。近年来有文献报道,马钱子碱有一定的抗感染、抗肿瘤功效^[1]。在肿瘤发生过程中,血管生成是基础^[2]。人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)是常用的进行血管内皮细胞功能实验的细胞模型^[3]。马钱子碱抗肿瘤作用中有无抑制肿瘤血管生成目前已见文献报道,该实验通过探索马钱子碱诱导 HUVECs 增殖活性和细胞凋亡的影响,并探讨血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和上皮细胞激酶 A2(epithelial cell kinase A2, EphA2)的表达变化,从而为临床使用马钱子碱抗肿瘤作用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料 马钱子碱(成都普菲德生物技术

2019-11-22 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81673908)

作者单位: ¹安徽中医药大学中医临床学院, 合肥 230038

²安徽医科大学第一附属医院中西医结合肿瘤科、中西医结合肿瘤中心, 合肥 230022

作者简介: 徐 萌,女,硕士研究生;

李 平,男,教授,博士生导师,主任医师,责任作者, E-mail: 1964liping@sina.com

constructing the lentiviral RNA interference vector of SHP-2 gene with interference technology. **Methods** The lentiviral vector of shRNA sequence targeting SHP-2 was constructed and transfected into human cervical cancer Hela cells to silence SHP-2 gene. The expression of SHP-2 mRNA and protein in transfected Hela cells was detected by Real-time PCR and Western blot respectively, and the effect of SHP-2 gene silencing associated with matrine on cell proliferation was detected by CCK8. **Results** The interference sequences of three groups of SHP-2 genes (SHP-2 shRNA1, SHP-2 shRNA2 and SHP-2 shRNA3) and the control sequence (NS) were designed and successfully constructed, and RT-PCR showed that the one with best interference effect was the SHP-2 shRNA2 sequence. After screening stable cells, fluorescence microscopy showed that the infection efficiency was high. Western blot demonstrated that the expression of SHP-2 in interference group was lower than that in control group. CCK-8 assay showed that the proliferation of Hela cells in the combined group was slower than that in the control group with time longer ($P < 0.05$). **Conclusion** A cervical cancer cell model with stable SHP-2 down-regulation was successfully established, and SHP-2 gene silencing combined with matrine can affect cervical cancer cells proliferation.

Key words SHP-2; lentiviral vector; cervical cancer cell; proliferation