

网络出版时间: 2020-2-19 12:58 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200217.1528.017.html>

RNAi 技术敲减乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 SIRT2 基因的研究

张舟¹, 邓小冲², 章骏¹, 夏振华¹, 房林²

摘要 目的 研究去乙酰化蛋白 2 (SIRT2) 对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移能力的影响。方法 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测 SIRT2 在乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中 mRNA 的表达情况。使用小 RNA 干扰技术 (siRNA) 处理 MDA-MB-231 细胞, 实验组转染靶向 SIRT2 的 siRNA, 对照组转染阴性对照序列, 分别使用 MTT 比色法和平板细胞克隆形成实验检测 MDA-MB-231 细胞的增殖情况, 使用细胞划痕实验检测 MDA-MB-231 细胞的迁移能力。结果 转染 SIRT2-siRNA 的 MDA-MB-231 细胞 SIRT2 mRNA 表达低于阴性对照组 ($P < 0.01$); 转染 SIRT2-siRNA 后, MDA-MB-231 细胞的增殖能力、克隆形成能力以及迁移能力均减低 ($P < 0.05$)。结论 敲减 SIRT2 后乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖与迁移能力受到抑制, SIRT2 在三阴性乳腺癌中起着促癌基因的作用。

关键词 SIRT2; 乳腺癌; MDA-MB-231 细胞; 增殖; 迁移
中图分类号 R 737.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)02-0245-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.017

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤, 对女性健康构成了巨大威胁^[1]。根据激素受体的表达情况, 可将乳腺癌分为 Luminal A 型、Luminal B 型、人表皮生长因子受体 2 过表达型以及三阴性乳腺癌。三阴性乳腺癌是侵袭性强的一种乳腺癌亚型, 雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 和人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor, HER2) 的表达均为阴性, 目前尚缺乏明确有效的治疗靶点^[2]。临床上针对三阴性乳腺癌的治疗以化疗为主, 但有效率偏低, 治疗后复发风险高^[3], 因此研究三阴性乳腺癌可能的分子标记物及治疗靶点显得尤为重要。沉默信息

调节因子 (silence information regulator, sirtuin) 是一个高度保守的基因亚家族, 能编码烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖的组蛋白去乙酰化酶, 在细胞衰老、代谢、凋亡、基因转录、炎症发生等过程中起着重要作用^[4-7]。该基因家族中的 SIRT2 的异常表达与肿瘤发生发展的关系比较复杂, 以 SIRT2 为靶点的抗肿瘤治疗一直是一个有争议的话题。SIRT2 在乳腺癌的发生发展过程中究竟起着抑癌作用还是促癌作用, 不同的研究结论并不完全一致^[8]。有研究者^[9-10]开发了一种 SIRT2 特异性抑制剂, 在乳腺癌小鼠模型中显示出了抗癌作用, 而另一项研究^[11]则表明缺乏 SIRT2 的雌性小鼠发生乳腺肿瘤的可能性明显增加。

鉴于目前出现的矛盾的研究结果, 现通过小 RNA 干扰技术 (siRNA) 敲减三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的 SIRT2 基因, 探究下调 SIRT2 的表达对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖和迁移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂 三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 细胞购自中国科学院细胞库; 总 RNA 提取试剂、胎牛血清 (FBS) 和 DMEM 培养基购自美国 ThermoFisher 公司; Hieff TransTM Liposomal Transfection Reagent, RT-PCR 试剂盒 Hieff[®] qPCR SYBR Green Master Mix (High Rox Plus) 购自上海翊圣生物科技有限公司; 逆转录试剂 HiScript[®] III RT Super-Mix for qPCR (+ gDNA wiper) 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; SIRT2 引物序列由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成; SIRT2-siRNA 和 siRNA 阴性对照序列由艾博思生物科技有限公司 (上海) 合成; MTT 试剂盒从碧云天生物技术有限公司 (上海) 购买。

1.2 方法

1.2.1 细胞复苏与培养 MDA-MB-231 细胞冻存于液氮中, 取出后迅速在 37 °C 条件下复苏、离心、重悬细胞, 用含 10% FBS 和 1% PS (链霉素、青霉素) 的新鲜 DMEM 培养基于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培

2019-12-30 接收

基金项目: 上海市卫生和计划生育委员会科研课题基金 (编号: 20164Y0276)

作者单位: ¹ 上海市杨浦区市东医院外科, 上海 200438

² 同济大学附属第十人民医院甲状腺乳腺外科, 上海 200072

作者简介: 张舟, 男, 副主任医师;

房林, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: fanglin2017@126.com

养。

1.2.2 铺板与转染 细胞生长处于对数期时进行铺板;胰酶消化细胞,贴壁的MDA-MB-231细胞快分散成单个细胞时加入足量的完全培养基终止消化;800 r/min离心5 min,弃上清液,培养基重悬细胞,然后用全自动细胞计数仪计数,以 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度铺板。铺板20~24 h后使用阳离子脂质体法进行转染,根据Hieff TransTM Liposomal Transfection Reagent操作说明进行转染。阴性对照(negative control, NC)组转染SIRT2-siRNA NC序列;实验组转染SIRT2-siRNA序列(检测转染效率时两条干扰序列分开转染,做功能实验时将SIRT2-siRNA 1序列与SIRT2-siRNA 2序列混合转染);设置3重复。转染后于5% CO₂、37℃培养箱中培养6 h后换液。

1.2.3 转染效率检测 培养48 h后采用RT-PCR法(实时荧光定量PCR法)检测转染效率。根据TRIzol试剂使用说明提取细胞总RNA,提取RNA后使用逆转录试剂盒HiScript[®] III RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)逆转录得到cDNA,使用SIRT2引物进行RT-PCR,以ACTIN为内参,根据PCR结果,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算转染效率。

1.2.4 细胞增殖能力检测 将NC组和实验组MDA-MB-231细胞分别以2 000个/孔的密度接种至96孔板,设置6个复孔,根据MTT试剂盒说明,分别于0、24、48、和72 h检测吸光度(optical density, OD)(490 nm)根据吸光度的结果绘制生长曲线。

1.2.5 克隆形成能力检测 将NC组与实验组MDA-MB-231细胞分别以100个/孔的密度接种至12孔板,设置3重复,充分摇晃使细胞分散均匀,置于5% CO₂、37℃培养箱中培养,观察到有明显的细胞克隆形成时,弃去培养基,无水乙醇固定0.1%结晶紫染色,统计每孔形成的克隆数,计算两组MDA-MB-231细胞的克隆形成率。克隆形成率=(形成的克隆数/100)×100%。

1.2.6 迁移能力检测 预先在6孔板底部沿长轴画2条标记线,遵循转染的步骤进行转染,设置2个复孔,细胞密度达95%时用200 μl型号的枪头垂直于标记线在细胞上划痕,PBS洗3次,每孔加入2 ml含2% FBS的DMEM培养基,于5% CO₂、37℃培养箱中培养。按照0、24、48 h时间点选取同一视野进行拍照。使用Image J图像处理软件分析划痕结果,计算迁移率。迁移率=0 h伤痕面积/24 h伤痕面积。

1.3 统计学处理 采用GraphPad Prism 7.0进行统计学分析。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间比较采用非配对 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染效率检测 实验组MDA-MB-231细胞SIRT2 mRNA表达水平低于NC组($P < 0.01$)。见表1、图1。

表1 转染SIRT2-siRNA后
SIRT2 mRNA的相对表达情况($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	$2^{-\Delta\Delta CT}$	P 值	F 值
NC	1.00 ± 0.0242		
SIRT2-siRNA1	0.317 ± 0.009	$< 0.000 1$	7.01
SIRT2-siRNA2	0.434 ± 0.0308	$0.000 1$	1.63

与NC组比较: * $P < 0.01$

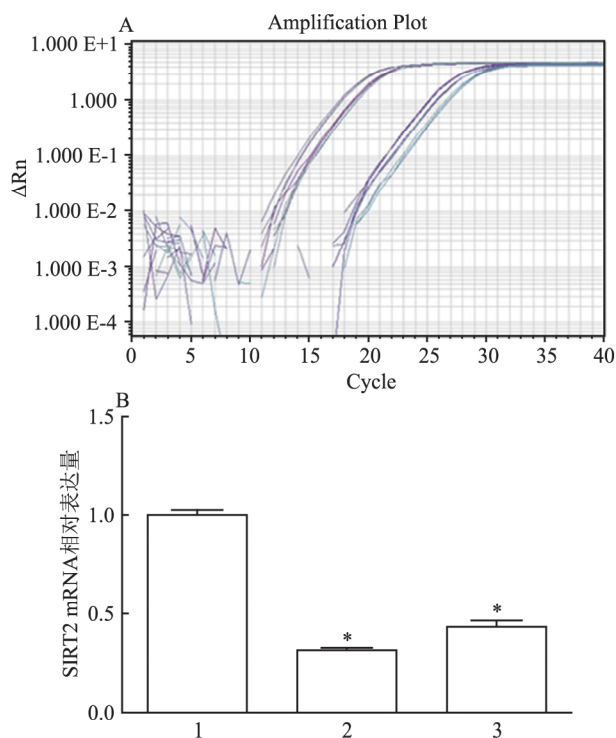


图1 转染SIRT2-siRNA对
MDA-MB-231细胞SIRT2 mRNA表达的影响

A: qRT-PCR扩增曲线; B: MDA-MB-231细胞转染SIRT2-siRNA后SIRT2 mRNA的表达; 1: NC组; 2: SIRT2-siRNA1组; 3: SIRT2-siRNA2组; 与NC组比较: * $P < 0.05$

2.2 敲减SIRT2抑制MDA-MB-231细胞的增殖 实验组MDA-MB-231细胞增殖能力低于NC组($P < 0.05$)。见表2、图2。

2.3 敲减SIRT2抑制MDA-MB-231细胞克隆形

成 实验组 MDA-MB-231 细胞克隆形成率低于 NC 组($P < 0.01$)。见表 3、图 3。

表 2 MTT 法检测 MDA-MB-231 细胞的 OD 值($n=6 \bar{x} \pm s$)

时间点(d)	NC 组	实验组	P 值	F 值
0	0.104 ± 0.000 730	0.099 5 ± 0.001 06		
1	0.185 ± 0.008 81	0.159 ± 0.006 90	0.039 4	1.63
2	0.399 ± 0.013 1	0.331 ± 0.007 64	0.001 3	2.93
3	0.725 ± 0.026 5	0.586 ± 0.013 60	0.000 9	3.79

P 值表示与 NC 组比较

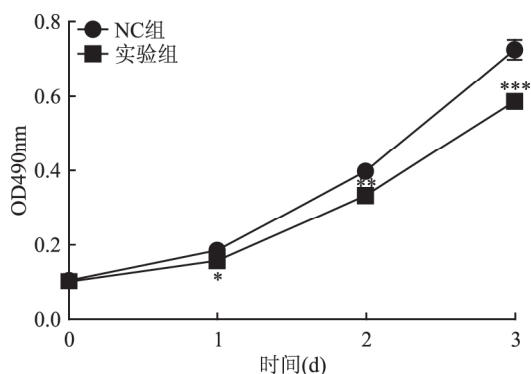


图 2 敲减 SIRT2 对 MDA-MB-231 细胞增殖能力的影响与 NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

表 3 敲减 SIRT2 对 MDA-MB-231 细胞克隆形成的影响($n=3 \bar{x} \pm s$)

组别	克隆形成率	P 值	F 值
NC	0.397 ± 0.017 6		
实验	0.247 ± 0.018 6	0.004 2	1.11

2.4 敲减 SIRT2 抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移
实验组 MDA-MB-231 细胞迁移能力低于 NC 组($P < 0.05$)。见表 4、图 4。

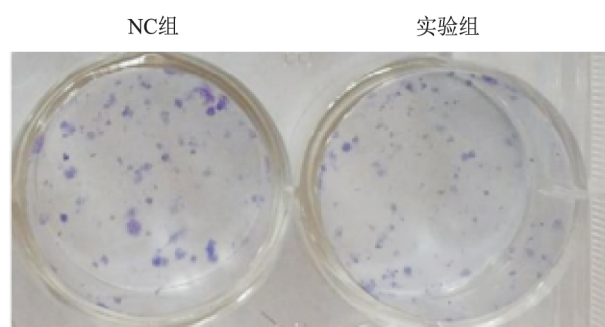


图 3 敲减 SIRT2 对 MDA-MB-231 细胞克隆形成的影响

表 4 敲减 SIRT2 对 MDA-MB-231 细胞迁移能力的影响($n=2 \bar{x} \pm s$)

组别	迁移率	P 值	F 值
NC	1.57 ± 0.045 0		
实验	1.19 ± 0.035 0	0.021 8	1.65

3 讨论

乳腺癌是女性较为常见的恶性肿瘤,影响着广大女性群体的身心健康。与发达国家相比,我国乳腺癌的发病率总体上处于较低的水平,但近年来乳腺癌的发病率逐年升高^[12]。临床上根据 ER、PR、HER2 和 Ki67 的表达的情况,将乳腺癌分为 4 种不同的亚型,针对不同的亚型,在手术之外分别辅以内分泌治

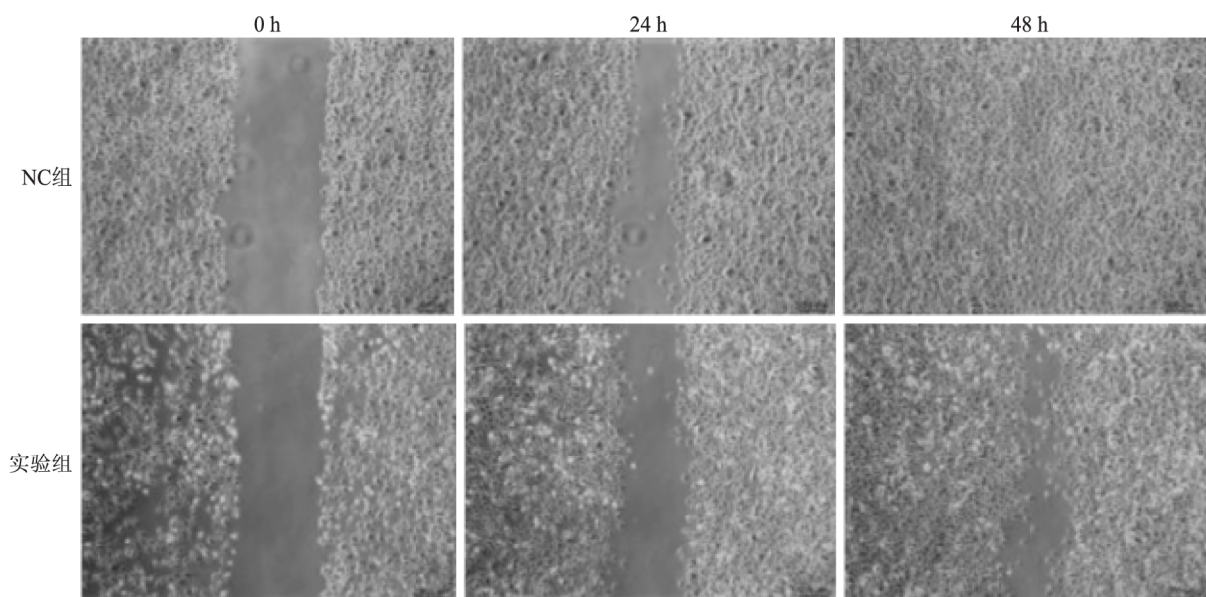


图 4 敲减 SIRT2 对 MDA-MB-231 细胞迁移能力的影响 × 100

疗、靶向治疗和化疗。三阴性乳腺癌是侵袭性较强的恶性肿瘤,化疗有效率低,化疗后复发风险高,目前三阴性乳腺癌尚缺乏特异的分子标志物可以作为治疗靶点^[3],所以研究三阴性乳腺癌潜在的分子标志物尤为重要。MDA-MB-231 是较为常用的三阴性乳腺癌细胞系,其 ER、PR、HER2 的表达均为阴性,具有很强的侵袭能力。本研究通过 RNAi 技术敲减感兴趣的基因,通过 MTT 实验、平板克隆形成实验以及划痕实验来探究目的基因敲减后对细胞增殖能力、克隆形成能力和迁移能力的影响,从而验证目的基因在肿瘤发生发展过程中的作用。

SIRT2 是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖的组蛋白去乙酰化酶,与肿瘤的发生发展有一定相关性。一项回顾性研究^[13]分析了 296 例原发性乳腺癌手术切除患者的临床资料,采用免疫组化检测肿瘤及癌旁组织中 SIRT2 的表达,发现肿瘤组织中 SIRT2 的表达较邻近组织低,肿瘤组织中 SIRT2 的高表达与乳腺癌患者 T 期降低、N 期减少、TNM 期减少、OS 期延长有关。同样,Fiskus et al^[14]研究认为 SIRT2 能够限制过氧化物氧化还原蛋白 1 的抗氧化活性,从而使乳腺癌细胞对活性氧诱导的 DNA 损伤和细胞毒性敏感从而发挥抑癌作用。与此相反,另一项研究^[15]的结果则表明 SIRT2 在基底样乳腺癌中经常被扩增和高表达,就具体作用机制而言,SIRT2 在赖氨酸残基 K116 处去乙酰化 Slug 蛋白,防止了 Slug 蛋白的降解。而 Slug 蛋白的过表达是基底样乳腺癌侵袭性的一个重要决定因素,Slug 的累积促进了乳腺癌的发生发展。另外,Jing et al^[9]开发了一种有效的 SIRT2 特异性抑制剂,在乳腺癌小鼠模型中表现出了抗癌作用。这些矛盾的研究结论表明 SIRT2 在乳腺癌中存在着的复杂作用,同时也表明乳腺癌是一类异质性较为明显的恶性肿瘤。

本研究通过 RNAi 技术,初步探讨了 SIRT2 在三阴性乳腺癌中作用。在三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 细胞中转染 SIRT2-siRNA 后,通过 MTT 比色法检测 MDA-MB-231 的增殖情况,显示与阴性对照组相比,转染 SIRT2-siRNA 后 MDA-MB-231 细胞的增殖能力明显受到抑制;平板克隆形成实验的结果也表明敲减 SIRT2 的表达后细胞的克隆形成能力受到抑制。除了研究 SIRT2 对 MDA-MB-231 细胞增殖能力的影响,课题组也研究了 SIRT2 对 MDA-MB-231 细胞迁移能力的影响,细胞划痕实验的结果表明 SIRT2 受抑制后,MDA-MB-231 细胞

迁移能力也下降了。综上所述,本研究初步表明 SIRT2 在 MDA-MB-231 细胞中表现出了促癌作用,后续需要进一步的研究探讨 SIRT2 具体的分子生物学机制。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin* 2018, 68 (6): 394–424.
- [2] Nedeljkovic M, Damjanovic A. Mechanisms of chemotherapy resistance in triple-negative breast cancer-how we can rise to the challenge [J]. *Cells* 2019, 8(9): E957.
- [3] 刘子梅, 沈 赞. 三阴性乳腺癌靶向治疗最新进展 [J]. *中国癌症杂志* 2017, 27(1): 36–40.
- [4] 张 舟, 杨庭松, 陈 希, 等. SIRT2 在胃癌组织中的表达与临床预后的关系 [J]. *实用临床医药杂志* 2015, 19(9): 69–72.
- [5] 牛 虹, 杨 峰, 唐静雯, 等. SIRT2 沉默对胃癌 SGC-7901 细胞增殖、迁移和侵袭的影响 [J]. *中国医药生物技术* 2018, 13 (6): 526–31.
- [6] 韩可琪, 阮 昕, 贺 明. SIRT2 在肝癌发生发展中的作用 [J]. *上海交通大学学报(医学版)* 2018, 38(10): 1247–51.
- [7] 饶先亮, 常 俊, 方 晓, 等. 沉默信息调节因子 2 在人骨关节炎软骨组织及细胞中的表达 [J]. *安徽医科大学学报* 2017, 52 (8): 1104–8.
- [8] McGlynn L M, Zino S, MacDonald A I, et al. SIRT2: tumour suppressor or tumour promoter in operable breast cancer [J]. *Eur J Cancer* 2014, 50(2): 290–301.
- [9] Jing H, Hu J, He B, et al. A SIRT2-selective inhibitor promotes c-Myc oncoprotein degradation and exhibits broad anticancer activity [J]. *Cancer cell* 2016, 29(3): 297–310.
- [10] Shah A A, Ito A, Nakata A, et al. Identification of a selective SIRT2 inhibitor and its anti-breast cancer activity [J]. *Biol Pharm Bull* 2016, 39(10): 1739–42.
- [11] Kim H S, Vassilopoulos A, Wang R H, et al. SIRT2 maintains genome integrity and suppresses tumorigenesis through regulating APC/C activity [J]. *Cancer cell* 2011, 20(4): 487–99.
- [12] 陈万青, 郑荣寿. 中国女性乳腺癌发病死亡和生存状况 [J]. *中国肿瘤临床* 2015, 42(13): 668–74.
- [13] Shi P, Zhou M, Yang Y. Upregulated tumor sirtuin 2 expression correlates with reduced TNM stage and better overall survival in surgical breast cancer patients [J]. *Ir J Med Sci* 2019: 10.1007/s11845-019-02071-y.
- [14] Fiskus W, Coothankandaswamy V, Chen J, et al. SIRT2 deacetylates and inhibits the peroxidase activity of peroxiredoxin-1 to sensitize breast cancer cells to oxidant stress-inducing agents [J]. *Cancer Res* 2016, 76(18): 5467–78.
- [15] Zhou W, Ni T K, Wronski A, et al. The SIRT2 deacetylase stabilizes slug to control malignancy of basal-like breast cancer [J]. *Cell Rep* 2016, 17(5): 1302–17.

网络出版时间: 2020-2-19 12:58 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200217.1528.018.html>

利拉鲁肽对非酒精性脂肪肝大鼠 ERp46 蛋白和脂联素及氧化应激的影响

王爱芳, 钟兴, 潘天荣

摘要 目的 研究利拉鲁肽对非酒精性脂肪肝大鼠肝组织 ERp46 蛋白和脂联素及氧化应激的影响,探讨利拉鲁肽改善脂肪肝的可能机制。方法 雄性 SD 大鼠 32 只,随机分成高脂组 20 只与正常对照组 12 只,高脂饮食 12 周建立非酒精性脂肪肝模型,再随机分为利拉鲁肽组和安慰剂组,分别予以利拉鲁肽 [0.6 mg/(kg·d)] 和等体积的生理盐水皮下注射;28 周末处死大鼠,称得体重、肝脏质量,检测生化指标及炎症因子水平,肝组织行苏木精-伊红染色;应用实时 PCR 和 Western blot 方法检测肝组织 ERp46 mRNA 和蛋白的表达。结果 与安慰剂组比较,利拉鲁肽组大鼠肝组织 ERp46 和脂联素表达水平升高,体重、肝指数、谷丙转氨酶、空腹胰岛素、胰岛素抵抗指数、胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白及肝匀浆甘油三酯、胆固醇、游离脂肪酸、肿瘤坏死因子

α、丙二醛下降,肝匀浆超氧化物歧化酶升高,肝脏脂肪变性程度减轻($P < 0.05$)。结论 利拉鲁肽改善非酒精性脂肪肝的机制可能与利拉鲁肽上调肝组织 ERp46 蛋白表达和脂联素水平,抑制内质网应激和减轻肝组织氧化应激有关。

关键词 利拉鲁肽;非酒精性脂肪肝;ERp46;脂联素;超氧化物歧化酶;丙二醛;肿瘤坏死因子-α

中图分类号 R 589.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)02-0249-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.018

非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是目前常见的肝脏慢性疾病,如今在饮食、环境等因素的影响下,其发病年龄呈年轻化趋势,可发展成为肝纤维化、肝硬化甚至肝癌等疾病。ERp46 为内质网蛋白之一,ERp46 mRNA 和蛋白在肝组织中高度表达,与蛋白质二硫键异构酶(protein disulphide isomerase, PDI)有关,在细胞内可能起到分子伴侣的作用,可促进蛋白折叠和二硫键形成^[1]。目前推测它可能具有多种生物学功能。胰

2019-11-06 接收

基金项目: 2015 年公益性技术应用研究联动计划项目(编号: 15011d04042)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院内分泌科,合肥 230601

作者简介: 王爱芳,女,硕士研究生;

潘天荣,男,副教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: ptr1968@163.com

Studies on SIRT2 gene knockdown in breast cancer MDA-MB-231 cells by RNAi technique

Zhang Zhou¹, Deng Xiaochong², Zhang Jun¹, et al

(¹Dept of Surgery, Shidong Hospital, Yangpu District, Shanghai 200438;

²Dept of General Surgery, Tenth People's Hospital of Tongji University, Shanghai 200072)

Abstract Objective To study the effect of sirtuin-2(SIRT2) on proliferation and migration of human breast cancer MDA-MB-231 cells. **Methods** Real-time fluorescence quantitative PCR(qRT-PCR) was applied to detect SIRT2 mRNA expression in breast cancer MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were transfected with small interference RNA(siRNA), targeting SIRT2 in the experimental group, and also with negative control sequence in the control group. The proliferation ability of MDA-MB-231 cells was detected by MTT assay and cell colony formation assay, and the migration ability of MDA-MB-231 cells was assessed through wound healing assay. **Results** The expression of SIRT2 mRNA in MDA-MB-231 cells transfected with SIRT2-siRNA was lower than that in the negative control group($P < 0.01$). After transfection with SIRT2-siRNA, cell proliferation, clonality and migration of MDA-MB-231 cells decreased($P < 0.05$). **Conclusion** The proliferation and migration of breast cancer MDA-MB-231 cells were inhibited after SIRT2 knockdown, which suggested that SIRT2 might function as an oncogene in triple negative breast cancer cells.

Key words SIRT2; breast cancer; MDA-MB-231 cells; proliferation; migration