

# siRNA 靶向沉默 ZFX 基因对肝内胆管癌细胞生物学功能的影响

张雪, 刘国东, 林群, 方强, 谢坤, 赵义军, 刘付宝

**摘要** 目的 探讨 siRNA 沉默 X 染色体连锁的锌指蛋白(ZFX) 基因的表达后对肝内胆管癌细胞(HCCC-9810) 的增殖、克隆、迁移及侵袭能力的影响。方法 通过脂质体 lipofectamine 3000 介导转染肝内胆管癌细胞株 HCCC-9810, 抑制 ZFX 基因在肝内胆管癌细胞系中的表达, RT-PCR 检测 ZFX 基因的 mRNA 表达水平的变化, Western blot 检测 ZFX 基因的蛋白表达水平的变化。ZFX 基因下调后分别用软琼脂克隆形成实验检测克隆形成能力, CCK-8 增殖实验检测细胞增殖情况, Transwell 检测细胞的迁移、转移情况。结果 RT-PCR 及 Western blot 结果表明与 Cell 组、NC-siRNA 组相比, ZFX-siRNA 组有效降低了 HCCC-9810 细胞系 ZFX 的 mRNA 水平及蛋白水平的表达。克隆形成实验显示: ZFX 基因沉默后, 该细胞系克隆形成能力明显减弱。CCK-8 增殖实验证明实验组细胞增殖能力明显降低。Transwell 实验显示, Cell 组、NC-siRNA 组细胞迁移、转移能力明显高于 ZFX-siRNA 组细胞。各组实验中 Cell 组、NC-siRNA 组之间均未见明显差异。结论 本实验 siRNA 成功降低肝内胆管癌细胞系 HCCC-9810 中 ZFX 基因的表达并证明 ZFX 的表达降低后与肝内胆管癌细胞的克隆形成、增殖、迁移、转移能力相关。推测 ZFX 在肝内胆管癌的发生发展中发挥重要的作用, 可作为该基因治疗的新靶点。

**关键词** ZFX 基因; 肝内胆管细胞癌; 细胞生物学

**中图分类号** Q 953; R 735. 8; R 329. 28

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2018)11-1667-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.11.003

肝内胆管细胞癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC) 是一种起源于胆管上皮细胞的致命恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。该肿瘤在美国每年的发病人数在 1 300 ~ 3 000 例之间<sup>[2]</sup>。慢性炎症性病症被认为是肝内胆管癌的诱因因素<sup>[3]</sup>。由于早期无明显的症状、体检尚未普及等原因致 ICC 明确诊断通常较晚, 手术是

目前最好的治疗方式, 术后 5 年生存率约 20% ~ 50%<sup>[4]</sup>。X 染色体耦联的锌指蛋白(X-linked zinc finger protein, ZFX) 位于 X 染色体, 编码 krueppel C2H2 型锌指蛋白家族成员<sup>[5]</sup>。在胚胎细胞和成人造血干细胞具有重要的转录调解作用<sup>[6]</sup>。研究<sup>[7]</sup>证明 ZFX 的过表达与胆囊癌等多种肿瘤的发生发展均有密不可分的关系。ZFX 在肝内胆管癌中的作用尚不明确, 目前国内外未见相关文献报道。该实验运用 siRNA 沉默肝内胆管癌细胞的 ZFX 的表达, 观察其对细胞生物学性质的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞株与 siRNA 核苷酸片段的合成** 选取人胆管细胞型肝癌细胞株(cholangiocarcinoma cells, HCCC-9810) 作为实验对象, 由上海交通大学新华医院馈赠; siRNA 由上海汉恒生物科技有限公司合成; siRNA 序列: 5'-GTCCGAAATTGATCCTTGTA-3'; Scr-siRNA 序列: 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。使用前按说明书用 DEPC 水稀释至需要浓度。

**1.1.2 主要试剂** RPMI 1640 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司; lipofectamine 3000 试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司; TRIzol 裂解液购自美国 Invitrogen 公司; PCR 反转录试剂盒购自上海 Promega 公司; 兔抗人多克隆抗体、辣根过氧化物酶人抗兔 IgG 二抗购自美国 Genetex 公司; CCK-8 增殖试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; Transwell 小室购自美国 Corning 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** HCCC-9810 细胞用含 15% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素链霉素抗生素的 RPMI 1640 培养基于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中培养。

**1.2.2 细胞转染** 转染前 1 d 调整细胞浓度至覆盖率约 60%, 并用不含抗生素的新鲜培养基培养, 实验分组分别为 Cell 组(未转染 siRNA 的 HCCC-9810 细胞组)、NC-siRNA 组(转入 negative control 的细胞组)、ZFX-siRNA 组(转入 ZFX 的细胞组)。

2018-06-20 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金面上项目(编号: 1308085MH133)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院普外肝胆胰外科, 合肥 230022

作者简介: 张雪, 男, 硕士研究生;

刘付宝, 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: liufubao88@163.com

转染方法严格按照 lipofectamine 3000 的操作说明进行 5 h 后更换为 RPMI-1640 普通培养基。

1.2.3 RT-PCR 检测各组转染后 ZFX 的 mRNA 表达水平 转染 48 h 后收集细胞,使用 TRIzol(Invitrogen 公司) 试剂提取 RNA,严格按照操作说明进行检测各组 RNA 总量,然后按照说明书使用反转录酶、Oligo dT( Promega) 反转录为 cDNA,进行 RT-PCR 反应,GAPDH 作为内参,GAPDH 引物序列为:正义链: 5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3'; 反义链: 5'-CACCTGTGCTGTAGCCAAA-3'; ZFX 引物序列为: 正义链 5'-GGCAGTCCACAGCAAGAAC-3'; 反义链: 5'-TTGGTATCCGAGAAAGTCAGAAG-3',以 2<sup>-ΔΔ</sup> 计算各组 ZFX 基因 mRNA 的表达量,每组各实验 3 次。

1.2.4 Western blot 检测 将转染后的各组细胞离心后,PBS 洗涤 3 次,离心弃上清液,加入 RIPA 裂解液 30 min 后 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min 收集上清液。SDS-PAGE 凝胶电泳转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭过夜,孵育兔抗人多克隆抗体(1 : 1 000) 摇床慢摇 2 h,TBST 慢摇清洗 3 次,每次 5 min,二抗室温孵育 2 h,于暗室滴加 ECL,覆盖 X 线片曝光,显影,拍照,保存。

1.2.5 克隆形成实验 24 孔板内培养 HCCC-9810 细胞,覆盖率达 70% 后 siRNA 转染,每组设置 3 个复孔,3 d 后收集各组转染成功的细胞,各组对应六孔板内铺约 400 个细胞,充分摇匀并显微镜下观察至无细胞聚集,每 2 d 更换细胞培养基,培养至 2 周后 4% 多聚甲醛固定 15 min,Giemsa 染色 20 min,显微镜下随机抽取 5 个视野,分别统计每孔内 > 50 及 < 50 个细胞的克隆细胞集落数并分析结果。

1.2.6 CCK-8 法检测细胞增殖实验 持续增殖能力是癌细胞最基本的能力。设置实验组、空白对照组及阴性对照组,每组 3 个复孔,取对数生长期的细胞,分别接种于 96 孔板内,每孔加入 2 × 10<sup>4</sup> / 100 μl 培养基,转染后每间隔 24 h 加入 10 μl CCK-8 溶液,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4 h 后,酶标仪测定 595 nm 处各孔的吸收值。

1.2.7 Transwell 迁徙、转移实验 24 孔板 transwell chamber(0.8 μm,美国 Corning 公司),收集各组 siRNA 转染后的细胞,上室内加入 200 μl 不含血清的细胞培养液,下室内加入 600 μl 含 15% FBS 的培养基,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中自然迁移条件下培养 24 h 后甲醛固定 10 min,结晶紫染色 10 min,棉签拭去上室内细胞,显微镜下随机选取 5 个视野观察转

移至下室内的细胞并拍照、计数。转移实验需每室内加入 37 °C 培养基 200 μl 水化胶,培养 48 h 后固定染色,其他同迁徙实验。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行分析,各组实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组均数比较采用单因素方差分析,两两比较用 *q* 检验,*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 siRNA 对 HCCC-9810 细胞 ZFX mRNA 表达水平的影响 转染 48 h 后,RT-PCR 结果显示: Cell 组与 NC-siRNA 组之间 mRNA 表达水平未见明显差异,ZFX-siRNA 组 mRNA 表达水平与 Cell 组、siRNA-NC 组相比下降明显(*P* < 0.01),见图 1。

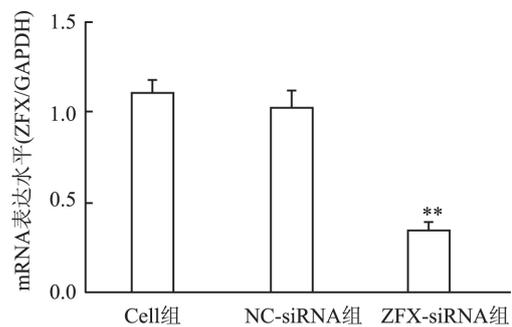


图 1 沉默 ZFX 基因对 HCCC-9810 细胞 ZFX mRNA 表达水平的影响 与 NC-siRNA 组比较: \*\* *P* < 0.01

2.2 siRNA 转染 HCCC-9810 细胞后 ZFX 蛋白的表达 Western blot 检测结果与 RT-PCR 结果相一致,Cell 组与 NC-siRNA 组之间比较,ZFX 基因表达水平未见明显改变,ZFX-siRNA 组蛋白表达水平与 Cell 组、NC-siRNA 组相比下降明显,RT-PCR 和 Western blot 均证实 ZFX-siRNA 使 HCCC-9810 细胞的 ZFX 基因表达下调明显。见图 2。

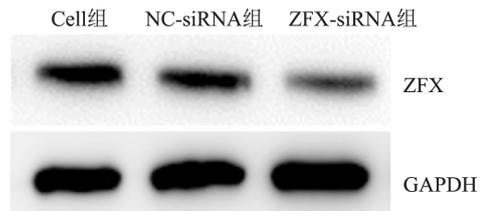


图 2 siRNA 转染 HCCC-9810 细胞后蛋白印迹图

2.3 沉默 ZFX 对胆管癌细胞克隆形成的影响 结果显示 siRNA-ZFX 实验组的小克隆(< 50) 细胞集落明显多于 Cell 组及 NC-siRNA 组。显微镜下观察

结果: Cell 组、NC-siRNA 组之间形成克隆数、克隆形成率未见明显差异(图 3B), ZFX-siRNA 组与 NC-siRNA 组相比每个克隆所包含的细胞数目明显减少( $t = 3.188, P = 0.0333$ ), 各组重复 3 次, 有轻度差异, 但无统计学意义。该实验结果表明敲低 ZFX 对于肝内胆管癌细胞的克隆形成能力具有重要的影响。见图 3。

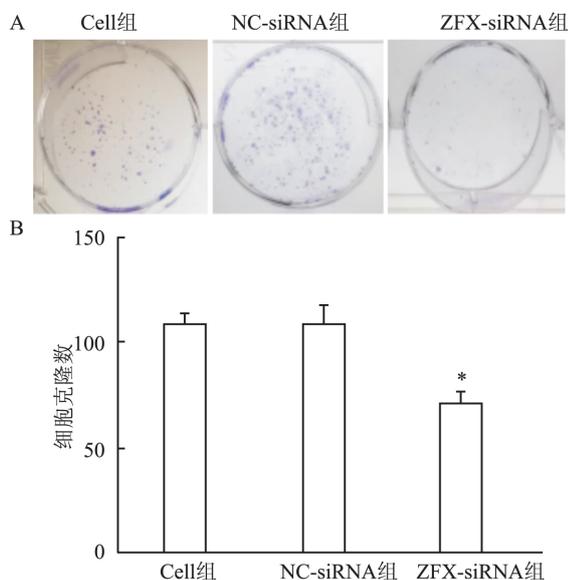


图 3 沉默 ZFX 对胆管癌细胞克隆形成的影响

A: 每个孔内的克隆图片; B: 每个孔内的克隆数统计结果; 与 NC-siRNA 组比较: \*  $P < 0.05$

**2.4 CCK-8 检测结果** ZFX-siRNA 组细胞增殖能力明显弱于 NC-siRNA 组( $F = 150.3, P < 0.01$ )及 Cell 组( $F = 151.5, P < 0.01$ ), 且随着时间推移差异逐渐变大(图 4), Cell 组与 siRNA-NC 组之间及各组组内之间差异无统计学意义。结果表明敲低 ZFX 表达对肝内胆管癌细胞的增殖能力具有重要的影响。

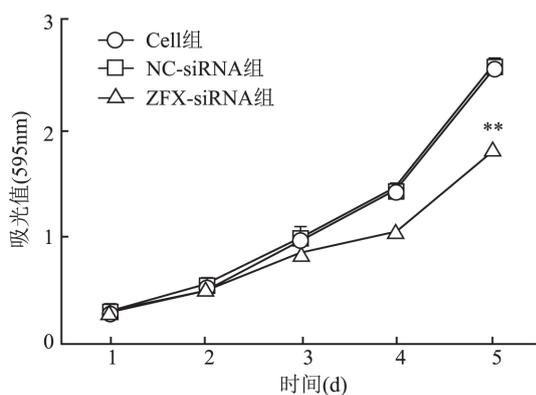


图 4 沉默 ZFX 基因对 HCC9810 细胞增殖能力的影响  
与 NC-siRNA 组比较: \*\*  $P < 0.01$

**2.5 沉默 ZFX 对肝内胆管癌细胞迁徙、侵袭的影响** 通过 siRNA 下调 HCCC-9810 细胞中 ZFX 基因后, 能够显著抑制细胞的迁移及侵袭能力(图 5), siRNA-ZFX 组与 siRNA-NC( $t = 8.505, P = 0.001$ )组相比可见转移到下室的细胞数明显减少, 而 Cell 组与 siRNA-NC 组之间差异无统计学意义。图 6 显示, siRNA-ZFX 组与 siRNA-NC( $t = 8.311, P = 0.002$ )组相比可见转移到下室的细胞数明显减少, 而 Cell 组及 siRNA-NC 组之间差异无统计学意义。

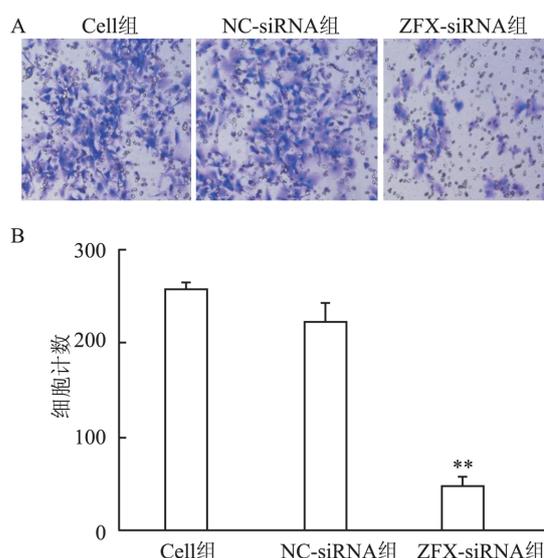


图 5 沉默 ZFX 基因对 HCC9810 细胞迁移的影响 结晶紫染色  $\times 40$   
与 NC-siRNA 组比较: \*\*  $P < 0.01$

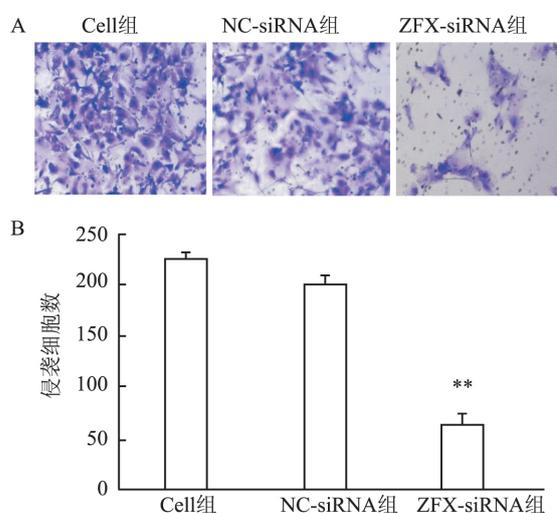


图 6 沉默 ZFX 基因对 HCC9810 细胞转移的影响  $\times 40$  结晶紫染色  
与 NC-siRNA 组比较: \*\*  $P < 0.01$

### 3 讨论

近年来 恶性肿瘤成为威胁人类健康的重要原因之一 ,ICC 是当今人类危害最大的恶性肿瘤之一 ,我国 ICC 发病率增值迅速 ,多数学者把研究重点放在该肿瘤的治疗上 ,对于该肿瘤的发生、发展的机制及重要影响的关注力度明显不够 ,不能从根本上解决 ICC 的治疗问题。原发性肝癌分为肝细胞性肝癌、胆管细胞性肝癌和混合型肝癌 ,在原发性肝癌中 ,胆管细胞性肝癌的发生率仅次于肝细胞性肝癌<sup>[8]</sup> ,目前有早期症状不明显、早期诊断困难、恶性程度较高等特点 ,致胆管细胞癌明确诊断时常属于晚期 ,且该肿瘤容易向周围血管及组织浸润 ,致外科手术切除困难 ,胆管细胞癌放疗、化疗敏感性较低<sup>[9]</sup> ,因此对胆管细胞癌的发生、发展的机制研究成为目前目标之一。深入研究 ICC 发生的分子机制 ,寻求新的诊断及治疗方法是提高 ICC 整体疗效的关键。锌指蛋白是指含有稳定的短的能与 Zn<sup>2+</sup> 结合的自我折叠形成手指结构的一类蛋白质 ,锌指蛋白可以特异的与靶结构结合从而发生特定的影响。近期 ,国内外相关研究<sup>[10-12]</sup> 表明 ZFX 在鼻咽癌、神经胶质瘤等恶性肿瘤中高表达 ,并与肿瘤的发生、发展及预后具有密不可分的关系 ,同时 ,参与多种肿瘤细胞的增殖、转移、凋亡等多个过程<sup>[13-15]</sup> ,而国内外尚未见该蛋白在 ICC 中的生物学作用的报道。本文旨在探讨 ZFX 在 ICC 细胞中的生物学功能。

恶性肿瘤的恶性程度与肿瘤细胞的增殖、转移、克隆等能力具有密不可分的关系 ,而 ICC 具有很强的早期转移力、侵袭力强及预后差等特点 ,因此对于与肝内胆管癌细胞的增殖、迁移、侵袭及克隆能力等有影响的基因的研究成为早期诊断及靶向治疗的研究方向。siRNA 干扰技术是将与目的基因同源的双链 RNA 转入细胞中 ,使与其对应的 mRNA 降解 ,从而实现目的基因序列沉默<sup>[16]</sup>。本实验通过对 ZFX 基因特异靶点的 siRNA 及一条阴性对照 siRNA 通过 lipofectamine 3000 分别转入相对应的实验组 HCCC-9810 细胞系中 ,并通过 RT-PCR、Western blot 从 mRNA、蛋白水平检测 ZFX 基因的表达水平 ,并为后续实验提供基础。本研究通过 CCK-8 增殖实验、Transwell 迁移、侵袭及克隆形成实验证明 ZFX 基因表达的敲低导致肝内胆管癌细胞的增殖、转移、侵袭及克隆能力明显下调 ,表明 ZFX 在 HCCC-9810 细胞系的生长、转移等过程中扮演着促进的角色。

尽管研究证明 ZFX 沉默对肝内胆管癌细胞的生物学功能具有重要影响 ,但具体机制尚不清楚 ,相关研究<sup>[17]</sup> 表明在非小细胞肺癌中 ,miR-144 过表达与 ZFX 的沉默能够显著抑制细胞的增殖且能诱导细胞凋亡 ,进一步研究表明 ZFX 的表达水平可通过 miR-144 调节 ,同时 ZFX 的异常表达显著降低 miR-144 对肿瘤发生发展的抑制作用 ,表明干扰 miR-144-ZFX 通路或许对多种肿瘤的发生、发展具有重要影响。Akt、ERK1/2 作为 ZFX 调节细胞功能的重要通路 ,NSCLC<sup>[18]</sup>、LSCC<sup>[19]</sup>、乳腺癌<sup>[20]</sup> 和胃癌<sup>[13]</sup> 中均会降低 Akt、ERK1/2 磷酸化作用。目前 ,国内外尚未见关于 ZFX 基因在 ICC 患者细胞中表达水平的检测、与肿瘤恶性程度及预后的关系及 miR-144、Akt、ERK1/2 在 ZFX 调节 ICC 的通路中扮演的角色的报道 ,为深入探索 ZFX 在临床上的功能的作用及具体机制的研究进一步证明 ZFX 在 ICC 的发生、发展中的作用提供理论方向。

综上 ,降低 ZFX 在 ICC 细胞中的表达抑制细胞的增殖、克隆形成、迁移及转移能力 ,持续对于 ZFX 在肝内胆管癌中的具体分子机制的研究将有助于进一步了解 ICC 的发生、发展 ,为胆管细胞癌的早期诊断及分子靶向治疗提供依据。

### 参考文献

- [1] Khan S A , Thomas H C , Davidson B R , et al. Cholangiocarcinoma[J]. Lancet Oct 2005 , 366( 9493) : 1303 - 14.
- [2] Serafini F M , Radvinsky D. The pathways of genetic transformation in cholangiocarcinogenesis [J]. Cancer Genet , 2016 , 209 ( 12) : 554 - 8.
- [3] 范毓东 , 李开宗. CBI-2 与胆管细胞癌[J]. 国外医学外科学分册 , 1999 26( 3) : 159 - 61.
- [4] 王健东 , 全志伟. 胆管癌基础研究现状[J]. 中华实用外科杂志 2008 28( 4) : 297 - 300.
- [5] Chiang N J , Shan Y S , Hung W C , et al. Epigenetic regulation in the carcinogenesis of cholangiocarcinoma [J]. Int J Biochem Cell Biol , 2015 67: 110 - 4.
- [6] Galan-Caridad J M , Harel S , Arenzana T L , et al. ZFX controls the self-renewal of embryonic and hematopoietic stem cells [J]. Cell , 2007 , 129( 2) : 345 - 57.
- [7] Tan Z , Zhang S , Li M , et al. Regulation of cell proliferation and migration in gallbladder cancer by Zinc finger X-chromosomal protein [J]. Gene , 2013 528( 2) : 261 - 6.
- [8] Poultsides G A , Zhu A X , Choti M A , et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. Surg Clin North Am , 2010 90( 4) : 817 - 37.
- [9] Baek S , Lee Y W , Yoon S , et al. CDH3/P-Cadherin regulates migration of HuCCT1 cholangiocarcinoma cells [J]. Anat Cell Biol , 2010 43( 2) : 110 - 7.
- [10] Yin L , Yan X , Yan L , et al. High expression of Zinc-finger pro-

- tein X-linked is associated with reduced E-cadherin expression and unfavorable prognosis in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol* ,2015 8(4) : 3919 – 27.
- [11] Zhu Z , Li K , Xu D , et al. ZFX regulates glioma cell proliferation and survival *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Neurooncol* 2013 ,112( 1) : 17 – 25.
- [12] Yan X , Shan Z , Yan L , et al. High expression of Zinc-finger protein X-linked promotes tumor growth and predicts a poor outcome for stage II/III colorectal cancer patients [J]. *Oncotarget* ,2016 7 ( 15) : 19680 – 92.
- [13] Wu S , Lao X Y , Sun T T , et al. Knockdown of ZFX inhibits gastric cancer cell growth *in vitro* and *in vivo* via downregulating the ERK-MAPK pathway [J]. *Cancer Lett* , 2013 ,337( 2) : 293 – 300.
- [14] Tan Z , Zhang S , Li M , et al. Regulation of cell proliferation and migration in gallbladder cancer by Zinc finger X-chromosomal protein [J]. *Gene* ,2013 528( 2) : 261 – 6.
- [15] Ma H , Yang F , Lian M , et al. Dysregulation of zinc finger protein , X-linked ( ZFX) impairs cell proliferation and induces apoptosis in human oral squamous cell carcinoma [J]. *Tumor Biol* , 2015 36( 8) : 6103 – 12.
- [16] Fakhr E , Zare F , Teimoori-Toolabi L. Precise and efficient siRNA design: a key point in competent gene silencing [J]. *Cancer Gene Ther* ,2016 23( 4) : 73 – 82.
- [17] Zha W , Liu C , Ying S , et al. Roles of mir-144-ZFX pathway in growth regulation of non-small-cell lung cancer [J]. *PLoS One* , 2013 8( 9) : e74175.
- [18] Li K , Zhu Z C , Liu Y J , et al. ZFX knockdown inhibits growth and migration of non-small cell lung carcinoma cell line H1299 [J]. *Int J Clin Exp Pathol* ,2013 6( 11) : 2460 – 7.
- [19] Fang J , Yu Z , Lian M , et al. Knockdown of Zinc finger protein , X-linked ( ZFX) inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Mol Cell Biochem* 2012 360( 1-2) : 301 – 7.
- [20] Yang H , Lu Y , Zheng Y , et al. shRNA-mediated silencing of ZFX attenuated the proliferation of breast cancer cells [J]. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014 ,73( 3) : 569 – 76.

## Effect of targeted siRNA silencing ZFX gene on biological function of intrahepatic cholangiocarcinoma cells

Zhang Xue , Liu Guodong , Lin Qun , et al

( Dept of General Hepatobiliary and Pancreatic Surgery , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022)

**Abstract Objective** To explore the effect of siRNA silencing ZFX gene on proliferation , migration and cycle of intrahepatic cholangiocarcinoma cells ( HCCC-9810) . **Methods** Lipofectamine 3000 was used to transfect the intrahepatic cholangiocarcinoma cell line HCCC-9810 to inhibit the expression of ZFX gene in intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines. The mRNA expression level of ZFX gene was detected by RT-PCR , and the protein expression level of ZFX gene was detected by Western blot. After the down-regulation of ZFX gene , the ability of colony formation was detected by the soft lipid agarose formation assay. CCK-8 proliferation assay was used to detect cell proliferation , and Transwell was used to detect cell migration and metastasis. **Results** RT-PCR results showed that ZFX-siRNA effectively reduced the expression of ZFX mRNA in HCCC-9810 cell line compared to Cell , NC-siRNA group. Clone formation experiments showed that the clonogenic capacity of this cell line was significantly weakened after ZFX silencing. CCK-8 proliferation assay showed that the experimental group cell proliferation decreased significantly. Transwell experiments showed that Cell , NC-siRNA group cell migration and metastasis was significantly higher than ZFX-siRNA cells. **Conclusion** The siRNA of this experiment successfully reduced the expression of ZFX gene in intrahepatic cholangiocarcinoma cell line HCCC-9810 and demonstrated that the decreased expression of ZFX is related to the ability of intrahepatic cholangiocarcinoma cell clone formation , proliferation , migration and metastasis. It is speculated that ZFX plays an important role in the occurrence and development of intrahepatic cholangiocarcinoma and can be used as a new target for this gene therapy.

**Key words** ZFX gene; intrahepatic cholangiocarcinoma; cell biology