

体外 siRNA-GAS5 干扰肝癌 HepG2 细胞生物学行为改变

黄海锋, 葛勇胜, 刘文斌, 马金良

摘要 目的 探究生长特异性调节转录因子 5 (GAS5) 在肝癌组织表达及 GAS5 小干扰 RNA (siRNA-GAS5) 转染对 HepG2 肝癌细胞的侵袭增殖的影响, 并进一步分析其可能的调控机制。方法 选取手术肝癌切除的癌组织及其癌旁组织 20 例, qRT-PCR 检测肝癌及其癌旁组织长链非编码 RNA GAS5 (GAS5) 表达以及 Western blot 检测周期依赖性蛋白激酶 6 (CDK6) 表达。利用脂质体转染 siRNA-GAS5 干扰 HepG2 细胞株中 GAS5 表达水平, 划痕实验、Transwell 和 CCK-8 检测转染后 HepG2 细胞的迁移、侵袭及增殖能力, 流式细胞仪检测干扰后 HepG2 细胞凋亡周期变化。Western blot、qRT-PCR 验证细胞周期调控蛋白周期素 D1 (Cyclin D1)、CDK6、E2F-1 表达。结果 肝癌组织中 GAS5 表达水平低于对应癌旁组织, CDK6 表达高于癌旁组织。转染 siRNA-GAS5 的 HepG2 细胞迁移侵袭增殖能力明显增强。转染 siRNA-GAS5 的 HepG2 细胞 Cyclin D1、CDK6、E2F-1 蛋白表达下降, 干扰后的 HepG2 细胞周期发生 G1/S 期改变。结论

GAS5 在肝癌组织的表达出现下调; GAS5 可明显抑制肝癌细胞迁移、侵袭及增殖能力; GAS5 调控肝癌细胞周期变化可能是通过 CyclinD1/CDK6/E2F-1 通路。

关键词 非编码 RNA; GAS5; 肝细胞癌; 细胞周期调控蛋白
中图分类号 R 349.62; R 604

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)08-1210-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.08.011

肝癌以病死率高^[1]、生存周期短、复发率高为显著特征, 手术治疗的局限性造成治疗效果较差, 因而手术之外新的治疗方法对提高患者生存率具有重要意义。全基因组测序分析表明多数基因被转录为非编码 RNA (non-coding RNAs, ncRNAs), 主要包括微小 RNA (microRNAs) 和长的非编码 RNA (long non-coding RNAs, lncRNAs)^[2]。lncRNAs 是一类长度大于 200 个核苷酸的非编码单链 RNA, 多数 lncR-

NAs 的转录高度保守, 在细胞内受到严格的调控。lncRNAs 在肿瘤细胞的增殖、侵袭等生物学过程中具有明确的调节作用。lncRNA GAS5 (growth arrest-specific transcript 5, GAS5) 是由 mTOR 通路控制稳定翻译的 5'-TOP RNA, 在人 T 淋巴细胞生长停滞中起重要作用的非编码 RNA^[3], 最先从 nih3t3 型老鼠的纤维母细胞中分离而来^[4]。GAS5 在包括结直肠癌^[5]、乳腺癌^[6]、宫颈癌^[7]、非小细胞肺癌^[8-9]、胰腺癌、前列腺癌^[10-11] 等多种肿瘤细胞中表达, 肿瘤细胞中低表达预示较差的生存周期^[6,9,12], 但不同肿瘤 GAS5 的转录调控机制具有明显差异, 在前列腺癌中通过靶向控制 P27^{Kip1} 作用调控细胞增殖^[13], 在神经母细胞瘤中通过激活 BRCA1 和 p53 来调节细胞周期和凋亡^[14], 在结直肠癌中作为肿瘤抑制因子抑制白介素-10 和血管内皮生长因子表达来影响细胞增殖和迁移^[5]。在肝癌方面, 其表达调控机制研究甚少。该研究通过检测 GAS5 表达水平变化以及在细胞周期调控中具有重要作用的相关蛋白检测, 来分析其对肝癌细胞系增殖、迁移、侵袭作用, 并进一步推测其可能调控的靶点, 为肝癌的靶向治疗寻求新的靶点。

1 材料与方法

1.1 病理标本及主要实验试剂 收集安徽省立医院肝脏外科 2016 年 6 月~12 月肝癌组织及对应远癌旁组织 (距癌组织边缘 > 2 cm) 共 20 例, 术后病理均为肝细胞性肝癌, 病理标本取下直接保存于 -80℃ 的液氮中保存备用。组织研究用途均告知家属并予以签署同意书。TRIzol 试剂购自美国 Life technologies 公司; DNA 标记试剂盒 QuantiNova SyBr Green PCR Kit 购自德国 Qiagen 公司; 反转录试剂盒 RevertAidTM first Strand cDNA Synthesis 购自美国 Thermo Scientific 公司; 细胞周期依赖性蛋白激酶 6 (cell division protein kinase 6, CDK6) 一抗购自美国 Bioss 公司; 细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 一抗及细胞增殖检验 CCK-8 试剂盒 (cell counting Kit-8, CCK-8) 购自美国 bio-teche 公司; 细胞因子 E2F-1 一抗购自上海瑞齐实业科技有限公司; 肝癌 HepG2 细胞株

2018-04-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81272398); 安徽省公益性技术应用研究联动计划项目 (编号: 16040804011)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院普外科, 合肥 230001

作者简介: 黄海锋, 男, 硕士研究生;

葛勇胜, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: sy-gys@139.com

购自上海细胞库。

1.2 实验方法

1.2.1 组织 RNA 提取及 qRT-PCR 组织 RNA 经 TRIzol 试剂溶解提取,经逆转录反应制备成 cDNA,以 β -actin 作为内参,人 β -actin 扩增子的大小为 180 bp,正向引物: 5'-GGGAAATCGTGCCTGACATTA-AGG-3',反向引物: 5'-CAGGAAGGAAGGCTG-GAAGAGTG-3';人 GAS5 扩增子大小为 115 bp,正向引物: 5'-CACAACAAGCAAGCATGCAG-3',反向引物: 5'-GAGGATCACTTGAGCCCAGA-3'。反应条件: 95 °C、2 min 95 °C、5 s 60 °C、10 s,重复 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 比较分析基因表达。

1.2.2 GAS5 质粒转染实验 NCBI 上查找 GAS5 的序列,根据目的基因设计合成一条具有 GAS5 的干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 组 (siRNA-GAS5 组) 及一条对照 siRNA 组 (siRNA-NC 组),同时设置空转染组 (Con 组), siRNA-GAS5 转染前 1 天,将 2×10^5 个/ml 细胞接种于培养板中,每孔中加入约 500 μ l 无抗生素的培养基。取 1 μ l/孔 lipofectamine 2000,用 50 μ l opti-MEM 无血清培养基稀释,并室温孵育 5 min。取 2 μ l siRNA,以 50 μ l opti-MEM 无血清培养基稀释,混匀。两种液体轻轻混匀,室温静置 20 min。加入含有细胞及培养液的孔中,混匀。转染 6 h 后,换为含血清的完全培养基。细胞收集后 PCR 检测确认 GAS5 表达下降后,细胞予以备用。

1.2.3 细胞划痕实验 取对数生长周期细胞,以 2×10^5 个/ml、每孔接种 2 ml 细胞液,过夜,愈合度 100% 时,弃去培养基,开始划线。划线与板底横线交叉点即为固定观察点;划痕后按 0、48 h 时间点拍照。测定各组细胞在 0、48 h 观察点的划痕宽度,计算迁移率 (%) = (0 h 划痕宽度 - 48 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度 $\times 100\%$ 。

1.2.4 Transwell 实验 Matrigel 胶与 DMEM 培养基按 1:9 混匀制成稀释液。小室滤膜均匀涂抹 50 μ l 稀释液,37 °C、5% CO₂ 恒温箱滞留 2 h,取出涂抹 DMEM 培养基 50 μ l 恒温箱滞留 2 h。取 3 组培养 24 h 细胞,0.25% 胰酶消化,1 000 r/min 离心 5 min,DMEM 培养液得下层细胞,计数,细胞密度调为 1×10^6 个/ml。上室加下层细胞液各 200 μ l,下室加 600 μ l 30% FBS 的 DMEM 培养液,每组细胞设 3 个复孔。取出小室,上室培养液吸除,PBS 浸润 2 min,共 3 次,擦净上室表面 Matrigel 胶,95% 酒精固定 30 min,结晶紫染色 15 min,晾干。拍照、计数:

200 倍显微镜下计算出穿膜细胞均数。

1.2.5 CCK-8 检测细胞增殖 待检测细胞计数,并度铺于 96 孔板。确定细胞贴壁后,继续培养 2~4 h 使其贴壁紧密。WST-8 混合液储存液用 PIPES 缓冲液稀释 10 倍到使用浓度。96 孔板每个孔加入 10 μ l CCK-8 溶液,在培养箱中继续孵育 0.5~4 h。显色反应后,加入终止液 10 μ l,终止反应,酶标仪 450 nm 测定吸光度,每个样本做 3 个复孔实验。根据 OD₄₅₀ 值绘制 0、24、48、72、96 h 增殖曲线。

1.2.6 Western blot 检测 组织样品称重 100 mg,加入 RIPA 细胞裂解液 1 ml (内含 1 mmol/L PMSF),提取组织总蛋白。蛋白按照 1:4 加入 5 $\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,沸水浴 10 min 变性,经电泳、转膜、封闭后,一抗、二抗孵育,使用 ECL 超敏发光试剂盒来检测蛋白。细胞实验方案同组织实验。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较使用 t 检验,细胞实验均重复 3 次,3 组间比较使用 One-way ANOVA 分析,组间比较用 q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GAS5、CDK6 在肝癌组织、癌旁组织表达情况

20 对肝癌及对应癌旁组织 qRT-PCR 和 Western blot 实验证实 GAS5 和 CDK6 在肝癌和癌旁组织中均出现表达,qRT-PCR 结果表明 GAS5 在肝癌组织相对表达量 (0.49 ± 0.47) 低于癌旁组织 (1.12 ± 0.53),差异有统计学意义 ($t = 16.22, P < 0.01$),见图 1,CDK6 在 80% (16/20) 的肝癌组织出现高表达,表达明显高于癌旁组织 (图 2)。

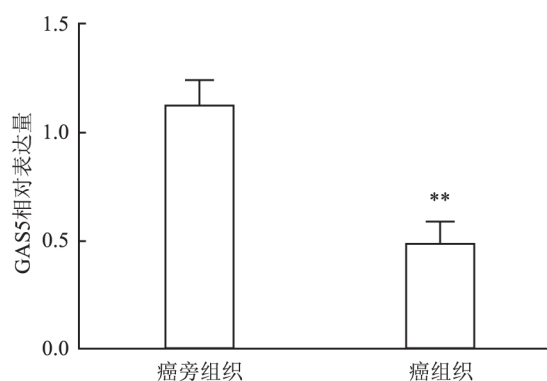


图1 GAS5 在癌组织与癌旁组织相对表达量对比
与癌旁组织比较: ** $P < 0.01$

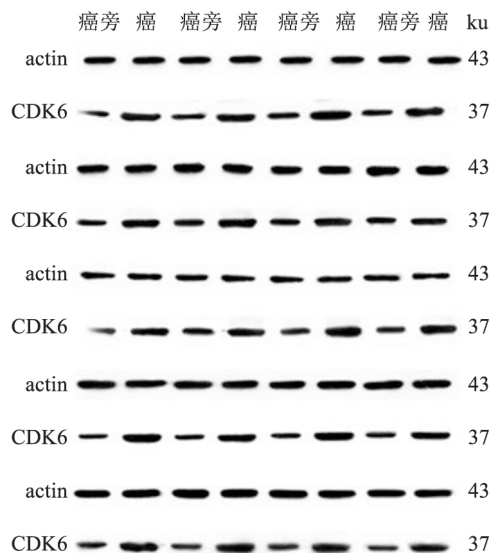


图2 Western blot 检测 20 组肝癌组织与癌旁组织 CDK6 表达情况

2.2 GAS5 对 HepG2 细胞侵袭、迁移、增殖影响

与转染 siRNA-GAS5 组 (60.0 ± 5.00) 比较, siRNA-NC 组 (29.66 ± 5.03) 和 Con 组 (28.33 ± 9.07) 的 HepG2 细胞划痕实验结果表明迁移能力差异有统计学意义 ($F = 21.76, P < 0.01$); Con 组与 siRNA-NC 组差异无统计学意义 (图 3)。Transwell 实验表明, 与 siRNA-NC 组 (38.7 ± 5.69) 和 Con 组 (32.0 ± 10.1) 比较, 转染 siRNA-GAS5 组 (61.57 ± 7.60) HepG2 细胞形态差异大, 穿过 Matrigel 胶细胞数增多, 差异有统计学意义 ($F = 8.80, P < 0.05$), 而 siRNA-NC 组与 Con 组差异无统计学意义 (图 4)。CCK-8 检测干扰后的细胞在 450 nm OD 值表明, 随时间变化均出现吸光度增长趋势, 在 96 h 测量结果显示, 与 siRNA-GAS5 组 (0.76 ± 0.07) 比较, siRNA-NC 组 (0.54 ± 0.02) 和 Con 组 (0.56 ± 0.03) 差异有统计学意义 ($F = 14.21, P < 0.01$), siRNA-NC 组和

Con 组间差异无统计学意义 (图 5)。

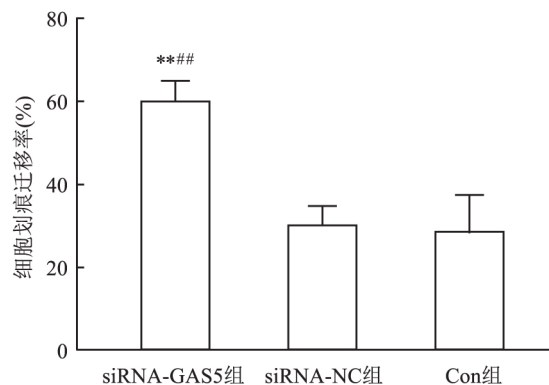
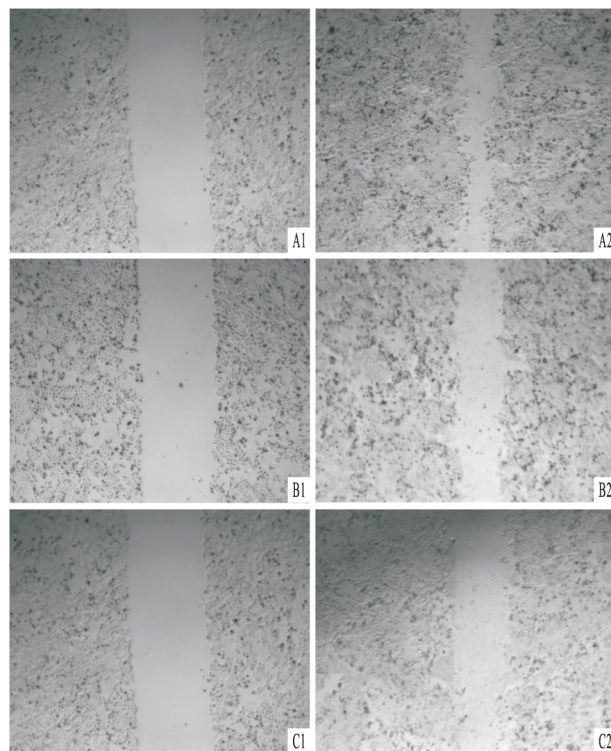


图3 经 siRNA 干扰后 HepG2 细胞迁移率比较

A: siRNA-GAS5 组; B: siRNA-NC 组; C: Con 组; 1:0 h; 2:48 h; 与 siRNA-NC 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Con 组比较: ## $P < 0.01$

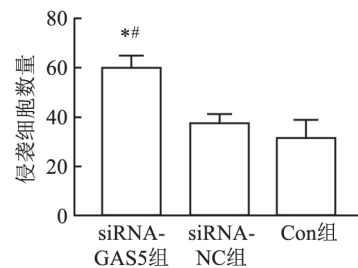
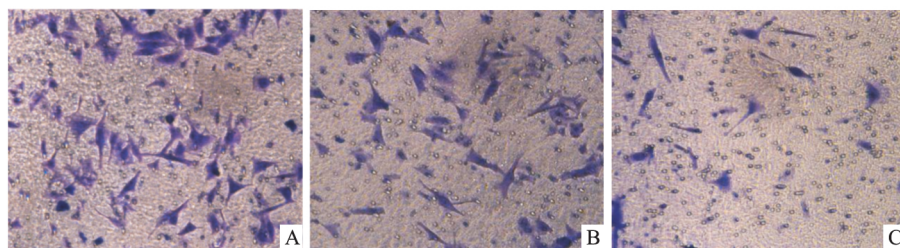


图4 经 siRNA 的 HepG2 细胞侵袭性比较 ×200

A: siRNA-GAS5 组 24 h 侵袭图; B: siRNA-NC 组 24 h 侵袭图; C: Con 组 24 h 侵袭图; 与 siRNA-GAS5 组比较: * $P < 0.05$; 与 Con 组比较: # $P < 0.05$

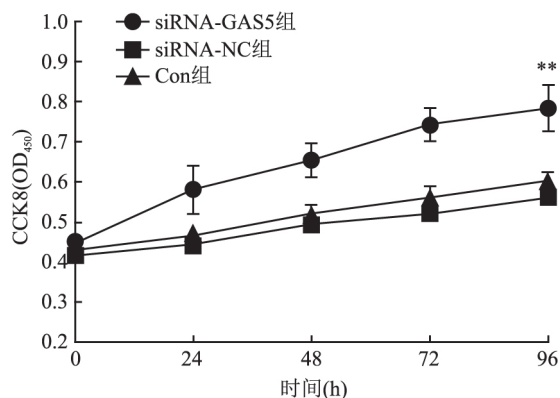


图5 转染 siRNA 后 HepG2 细胞 OD₄₅₀ 值比较
与 siRNA-NC 组比较: ** $P < 0.01$

2.3 经 siRNA-GAS5 转染后的 HepG2 细胞周期相关蛋白表达影响 经 siRNA-GAS5 质粒转染后的 HepG2 细胞内 Cyclin D1、CDK6、E2F-1 mRNA 相对表达量均出现上调,与 siRNA-NC 组和 Con 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1、图 6。

2.4 GAS5 的下调对 HepG2 细胞周期变化影响 经 GAS5-siRNA 干扰 48 h 后的 G1、S、G2 期细胞百分比变化(39.73 ± 3.21 、 43.03 ± 4.72 、 16.25 ± 8.69 vs 50.51 ± 4.98 、 35.40 ± 5.28 、 17.10 ± 4.25)。由各细胞百分比变化可知,与 siRNA-NC 组比较,siRNA-GAS5 组细胞周期在 G1 期出现降低, S 期出现升高, siRNA-GAS5 组与 siRNA-NC 组在 G1 期与 S 期发生明显转变(图 7)。

表 1 转染 siRNA 及空白组相关蛋白 mRNA 表达量($n = 13 \bar{x} \pm s$)

蛋白	siRNA-GAS5 组	siRNA-NC 组	Con 组	F 值	P 值
Cyclin D1	$1.428 \pm 0.097^{***}$	0.634 ± 0.056	0.627 ± 0.084	298.1	< 0.01
CDK6	$1.119 \pm 0.155^{***}$	0.494 ± 0.210	0.488 ± 0.088	312.2	< 0.01
E2F-1	$0.991 \pm 0.094^{***}$	0.498 ± 0.113	0.483 ± 0.204	597.2	< 0.01

与 siRNA-NC 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Con 组比较: ## $P < 0.01$

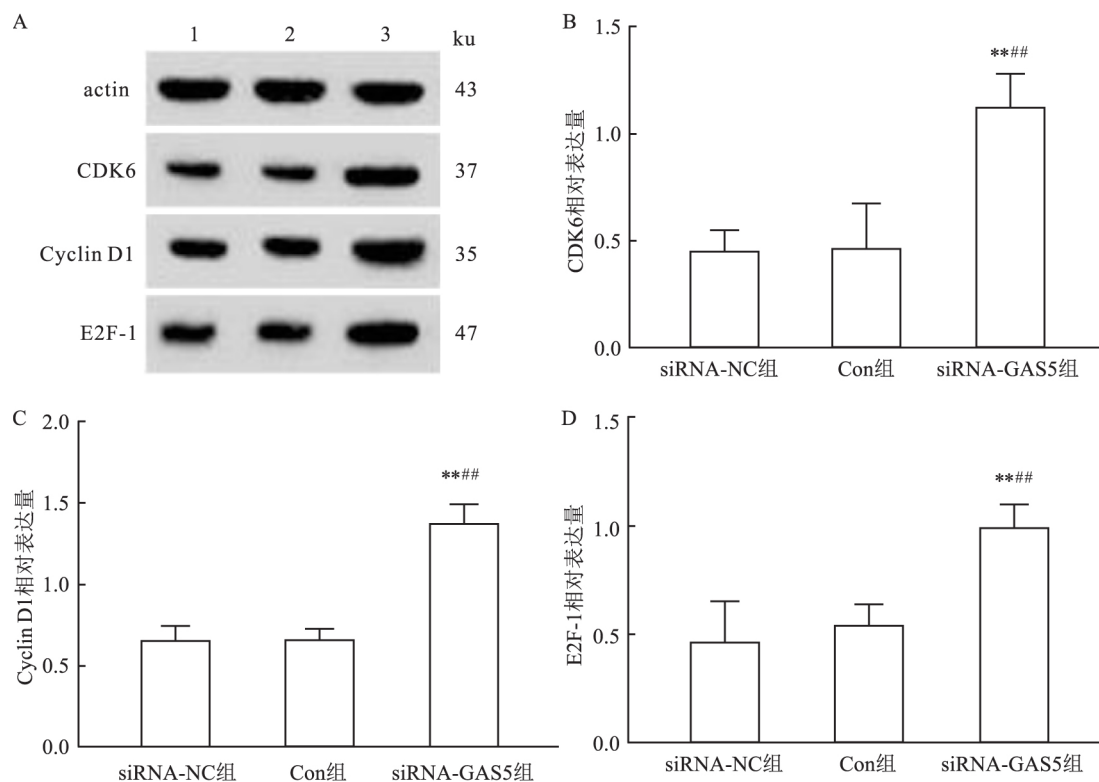


图6 siRNA 干扰后的 HepG2 细胞周期相关蛋白表达及相应 mRNA 相对表达量比较

A: Western blot 检测 CDK6、Cyclin D1、E2F-1 蛋白表达; B: CDK6 mRNA 相对表达量; C: Cyclin D1 mRNA 相对表达量; D: E2F-1 mRNA 相对表达量; 1: siRNA-NC 组; 2: Con 组; 3: siRNA-GAS5 组; 与 siRNA-NC 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Con 组比较: ## $P < 0.01$

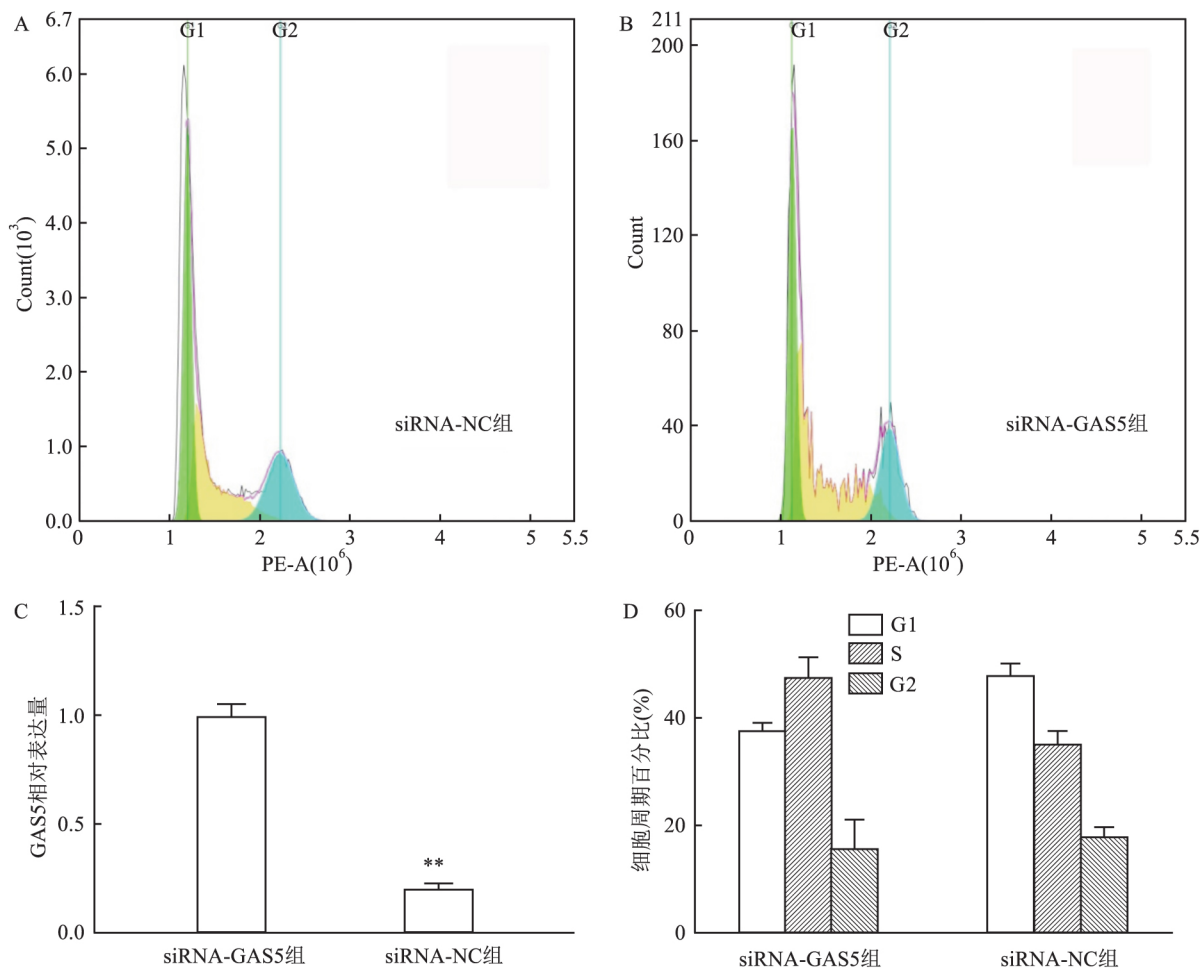


图7 GAS5 参与细胞周期调控

A: 流式细胞仪检测 siRNA-NC 转染的周期计数图; B: 流式细胞仪检测 siRNA-GAS5 转染的周期计数图; C: siRNA-GAS5 和 siRNA-NC 转染后 GAS5 相对表达量; D: 经 siRNA-GAS5 与 siRNA-NC 转染 48 h 各周期细胞百分比; 与 siRNA-GAS5 组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

近年来, 已发现多种 lncRNAs 在细胞功能调节上具有重要作用, 研究^[6]表明 GAS5 具有抑制小胶质细胞 M2 的极化以及加剧了脱髓鞘作用。GAS5 调控 TGF- β 介导的平滑肌细胞分化通过结合 RNA-smad 实现^[11]; GAS5 是一个参与细胞生物调控的 lncRNA, 通过与 E2F1 相互作用和引诱其与 P27^{Kip1} 启动子结合来抑制前列腺癌增殖^[15]。其主要在肿瘤抑制和致癌基因表达调控方面发挥作用, 这些实例充分说明 GAS5 可作为肿瘤进展过程中重要的功能性调控因子, 其异常表达参与肿瘤相关蛋白差异性表达促使肿瘤发生。

多数肿瘤发生发展是因 GAS5 在癌组织中出现下调所致, 例如乳腺癌、胰腺癌、膀胱癌、非小细胞肺癌等。本研究首先对肝癌组织与其对应的癌旁组织 PCR 检测结果显示 GAS5 表达下降, 前期实验选取肝癌表型中常见的 HepG2 细胞, 经 PCR 检测显示其

GAS5 表达量较正常肝细胞明显下调, 为探讨 GAS5 对 HepG2 细胞增殖迁移能力及其对 HepG2 细胞周期影响作用, 本研究对 HepG2 细胞进行 siRNA-GAS5 干扰实验, PCR 检测干扰后 HepG2 出现 GAS5 明显下调的细胞再分别进行细胞划痕迁移实验、Transwell 实验以及 CCK-8 检测干扰后细胞增殖 OD 值, 实验显示经 GAS5-siRNA 干扰的 HepG2 细胞株较 siRNA-NC 组、Con 组的 HepG2 细胞, 其细胞的迁移能力、侵袭能力、增殖能力都出现增强, 对于 siRNA-NC 与未经 siRNA 干扰的 HepG2 相比, 其三者能力为出现明显改变。说明 GAS5 在肝癌细胞生物学特性方面具有重要的抑制肿瘤增殖侵袭作用。GAS5 可作为一个肿瘤抑癌因子抑制肝癌细胞体外侵袭转移。

在细胞周期的调控中 GAS5 同样具有明显的抑制或促进凋亡作用。体外对宫颈癌细胞增殖研究中表明, 上调的 GAS5 抑制细胞增殖、迁移和凋亡是通过降低细胞内 miR-196a 和 miR-205 水平^[10]; 此外

GAS5 的表达同样在前列腺癌中出现低表达, GAS5 的异位表达抑制了细胞增殖和调控细胞周期停留在 G0/G1 期, GAS5-siRNA 干扰下调 GAS5 时又促进 G1-S 相过度。这些研究证实在肿瘤进展期中, GAS5 通过不同的调控通路调控细胞周期来抑制肿瘤细胞进展已十分确切。本研究通过 MTT 实验检测经 GAS5-siRNA 干扰下调 GAS5 的 HepG2 细胞, 相对于未进行转染和 siRNA-NC 转染组的 HepG2 细胞来说, 其细胞周期发生明显改变, 处于 G0/G1 期细胞减少, 而 S 期细胞明显增多, 证实在肝癌细胞内的 GAS5 的水平含量与细胞周期改变相关, 这和宫颈癌、前列腺癌的细胞周期研究得到相似的结果, 但不同细胞内因其细胞分化方向不同, 细胞生物特性有所差异, 其表达的功能性蛋白不同, GAS5 在不同细胞内对细胞周期的调控机制也不尽不同。

研究^[15]表明与细胞周期调控密切相关的 Ras 下游通路的周期蛋白依赖性激酶系统、Cyclin D 蛋白家族与消化系统中的胃癌和胰腺癌有密切的关系。通过 CDK6 和 Cyclin D1 以及其下游调控的 E2F-1 研究, 推断 GAS5 参与细胞周期调控的潜在机制。Western blot 检测肝癌和癌旁组织表明 CDK6 与 GAS5 表达水平呈现负相关关系, 二者间可能存在潜在的直接或间接调控关系, 进一步对经 siRNA-GAS5 转染的 HepG2 细胞 Cyclin D1、CDK6、E2F-1 蛋白进行 Western blot 与 PCR 检测, 低表达 GAS5 的 HepG2 细胞中 Cyclin D1、CDK6、E2F-1 均出现表达水平的上升, 细胞内 Cyclin D1 蛋白出现异常表达, 可能和 GAS5 通过 Ras-MAPK 途径来激活 Cyclin D1 基因的转录有关, E2F-1 蛋白水平上调证实 GAS5 同样参与 HepG2 细胞细胞周期调控, 这与 Shan et al^[15] 研究相符。MTT 结果验证 GAS5 对细胞周期的调控主要在 G1/S 期转变, 这与细胞内 Cyclin D1 通过与 CDK6 形成复合物激活底物 pRb 的磷酸化相关, pRb 的磷酸化使得与 pRb 结合的组蛋白脱乙酰基蛋白(HDAC) 破坏, 生成 E2F-1 明显增加, E2F-1 是细胞周期进展到 S 期所需细胞周期因子。HepG2 细胞周期相关蛋白上调验证其与 GAS5 表达密不可分。

参考文献

[1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2012

- [J]. *CA Cancer J Clin* 2015, 65(2):87-108.
- [2] Guttman M, Amit I, Garber M, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals[J]. *Nature* 2009, 458(7235):223-7.
- [3] Smith C M, Steitz J A. Classification of GAS5 as a multi-small-nucleolar-RNA (snoRNA) host gene and a member of the 5'-terminal oligopyrimidine gene family reveals common features of snoRNA host genes[J]. *Mol Cell Biol* 1998, 18(12):6897-909.
- [4] Pickard M R, Mourtada-Maarabouni M, Williams G T. Long non-coding RNA GAS5 regulates apoptosis in prostate cancer cell lines[J]. *Biochim Biophys Acta* 2013, 1832(10):1613-23.
- [5] Li Y, Li Y, Huang S, et al. Long non-coding RNA growth arrest specific transcript 5 acts as a tumour suppressor in colorectal cancer by inhibiting interleukin-10 and vascular endothelial growth factor expression[J]. *Oncotarget* 2017, 8(8):13690-702.
- [6] Li W, Zhai L, Hui W, et al. Downregulation of lncRNA GAS5 causes trastuzumab resistance in breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(19):27778-86.
- [7] Yang W, Hong L, Xu X, et al. lncRNA GAS5 suppresses the tumorigenesis of cervical cancer by downregulating miR-196a and miR-205[J]. *Tumour Biol* 2017, 39(7):1-10.
- [8] Cao L, Chen J, Ou B, et al. GAS5 knockdown reduces the chemo-sensitivity of non-small cell lung cancer (NSCLC) cell to cisplatin (DDP) through regulating miR-21/Pten axis[J]. *Biomol Pharmacother* 2017, 93:570-9.
- [9] Wu Y, Lyu H, Liu H, et al. Downregulation of the long noncoding RNA GAS5-AS1 contributes to tumor metastasis in non-small cell lung cancer[J]. *Sci Rep* 2016, 6:31093.
- [10] Droop J, Szarvas T, Schulz W A, et al. Diagnostic and prognostic value of long noncoding RNAs as biomarkers in urothelial carcinoma[J]. *PLoS One* 2017, 12(4):e0176287.
- [11] Xue D, Zhou C, Lu H, et al. lncRNA GAS5 inhibits proliferation and progression of prostate cancer by targeting miR-103 through AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Tumour Biol* 2016, 37(12):1-11.
- [12] Pickard M R, Williams G T. The hormone response element mimic sequence of GAS5 lncRNA is sufficient to induce apoptosis in breast cancer cells[J]. *Oncotarget* 2016, 7(9):10104-16.
- [13] Luo G, Liu D, Huang C, et al. lncRNA GAS5 inhibits cellular proliferation by targeting P27^{Kip1}[J]. *Mol Cancer Res* 2017, 15(7):789-99.
- [14] Mazar J, Rosado A, Shelley J, et al. The long non-coding RNA GAS5 differentially regulates cell cycle arrest and apoptosis through activation of BRCA1 and p53 in human neuroblastoma[J]. *Oncotarget* 2017, 8(4):6589-607.
- [15] Shan Y S, Hsu H P, Lai M D, et al. Cyclin D1 overexpression correlates with poor tumor differentiation and prognosis in gastric cancer[J]. *Oncol Lett* 2017, 14(4):4517-26.

siRNA-GAS5 interferes HepG2 cells and changes in biological behavior *in vitro*

Huang Haifeng ,Ge Yongsheng ,Liu Wenbin ,et al

(Dept of General Surgery ,The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230001)

Abstract Objective To study the expression and invasion of long non-coding RNA GAS5 on hepatocellular tissue and HepG2 cells transfected with siRNA-GAS5. Further analysis of its possible regulatory mechanism. **Methods** 20 cases of hepatocellular carcinoma and its adjacent tissues were selected from hepatectomy ,qRT-PCR was used to detect the expression of the GAS5 and Western blot was used to detect the expression of CDK6 protein. The expression levels of GAS5 in HepG2 cells were transfected with siRNA-GAS5 lipidosome. Scratch experiments ,Transwell and CCK-8 were used to detect the migration , invasion and proliferation of HepG2 cells , and flow cytometry was used to detect the cell apoptosis cycle after silence. Western blot and qRT-PCR was used to validate the expression of cell cycle regulation protein Cyclin D1 ,CDK6 and E2F-1. **Results** The expression of GAS5 in hepatocellular carcinoma tissues was significantly lower than that of adjacent tissues ,the expression of CDK6 was higher than that of adjacent tissues. The migration , invasion and proliferation of HepG2 cells transfected with siRNA-GAS5 were significantly enhanced. The expression of Cyclin D1 ,CDK6 and E2F-1 protein was decreased in HepG2 cells after the reduction of GAS5 , the G1/S phase transition occurred after down-regulated HepG2 cells. **Conclusion** The expression of GAS5 is reduced in liver cancer. GAS5 can significantly inhibit hepatocellular carcinoma cells migration , invasion and proliferation. GAS5 regulate liver cancer cell cycle may be through Cyclin D1/CDK6/E2F-1 pathway.

Key words non-coding RNA ; GAS5 ; hepatocellular carcinoma ; cell cycle regulatory protein

(上接第 1209 页)

Effect of Qingqihuatang on expression of TLR4 and MUC5AC in lung tissue of asthmatic mice

Chen Zhu , Peng Yu , Tao Qiong , et al

(Dept of Pediatrics ,The Second Clinical Medical College of Guiyang Traditional Chinese Medicine College ,
The Second Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine ,Guiyang 550001)

Abstract Objective To investigate the effects of Qingqihuatang on the expression of TLR4 , MUC5AC and other cytokines in lung tissue of asthmatic mice. **Methods** The model allergic asthma BALB/c mice were induced by OVA and aluminumhydroxide. Then these mice were treated with Qingqihuatang or dexamethasone and were sacrificed after treatment 5 d or 15 d. Serum , bronchoalveolar lavage fluid and lung tissue were collected for further testing. The contents of TNF- α ,IL-4 ,IL-5 and IL-13 in BALF and serum were detected by ELISA. The mRNA of TLR4 and MUC5AC in lung tissue and expression of protein were examined by qRT-PCR and Western blot. **Results**

In fifth day and fifteen day after treatment , the levels of TNF- α ,IL-4 ,IL-5 and IL-13 in BALF or serum of X1 group or X2 group were lower than those in MOD group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The mRNA of lung tissue TLR4 and protein expression in MOD group were higher than CON group. The mRNA of MUC5AC in lung tissue of MOD group was higher than that in CON group. The expression of TLR4 and MUC5AC were down-regulated in X1 group and X2 group. The regulating effect of Qingqihuatang combination use with dexamethasone was remarkable ($P < 0.01$). **Conclusion** Qingqihuatang can regulate immune response of mice through down-regulating the expression of TLR4 , also relieve airway inflammation through down-regulating the contents and expression of TNF- α , IL-4 , IL-5 and IL-13 and decrease airway mucus secretion through down-regulating the expression of MUC5AC in asthmatic mice. It is more remarkable when treated with Qingqihuatang and dexamethasone.

Key words Qingqihuatang ; asthma ; MUC5AC ; TLR4 ; *in vivo* experiment