

网络出版时间: 2016-5-9 15:43:10 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160509.1543.010.html>

siRNA 抑制 HMGA1 基因表达 对甲状腺乳头状癌 K1 细胞增殖的影响

周大新^{1,2}, 周锐¹, 李德群¹, 董慧明¹, 张晖¹, 朱金海¹, 马小开¹, 陈春春¹, 马桂凯¹, 陈海龙¹, 王志军¹

摘要 目的 研究 HMGA1-siRNA 基因对甲状腺乳头状癌 K1 细胞增殖的影响。方法 HMGA1-siRNA 组转染 HMGA1 的小干扰 RNA (siRNA); 阴性对照组转染 HMGA1 的无关序列, 并转染甲状腺乳头状癌 K1 细胞。采用 CCK-8 法检测转染 HMGA1-siRNA 基因后对 K1 细胞增殖的影响; RT-PCR 法检测正常组、HMGA1-siRNA 组和阴性对照组的 HMGA1-mRNA 表达; Western blot 法检测三组的 HMGA1 蛋白表达; Transwell 侵袭实验检测三组 HMGA1-siRNA 基因转染后 K1 细胞的侵袭能力。结果 HMGA1-siRNA 基因对 K1 细胞的抑制增殖作用明显, 呈现时间-剂量依赖关系; HMGA1-siRNA 基因在 K1 细胞中 mRNA 和蛋白的表达显著低于正常组和阴性对照组; HMGA1-siRNA 组 K1 细胞侵袭能力显著低于正常组和阴性对照组。结论 siRNA 可以沉默 HMGA1 基因, 减缓甲状腺乳头状癌 K1 细胞增殖。

关键词 HMGA1-siRNA 基因; 甲状腺乳头状癌; K1 细胞; 干扰技术 RNA

中图分类号 R 739.91

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)06-0783-04

高迁移率族蛋白 A1 (high mobility group A1, HMGA1) 是一组非组蛋白染色质相关蛋白, 属于高迁移率族蛋白 (HMG) 的成员, 可作为真核生物转录因子的辅助因子参与转录过程。在正常情况下, HMGA1 主要存在于胚胎发育阶段, 而迅速增殖的细胞内和分化成熟的组织内几乎没有表达, 已有国内外文献^[1-3]报道 HMGA1 基因参与了不同胚胎起源的肿瘤相关基因的转录调控。目前, 在甲状腺癌组织中 HMGA1 基因及其具体作用机制仍知之甚少, 在 K1 细胞内运用 HMGA1-siRNA 研究 HMGA1

基因功能的应用尚未见报道。该研究构建 HMGA1-siRNA 基因并转染甲状腺乳头状癌 K1 细胞株, 研究其对 K1 细胞抑制及侵袭力的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 试剂及来源 兔抗人 HMGA1 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 生物公司; 胎牛血清 (FBS) 购自杭州四季青公司; DMEM/F12 培养液购自美国 Gibco 公司; CCK-8 细胞计数试剂盒购自美国 Sigma 公司; RT-PCR AMV 试剂盒购自立陶宛 Fermentas 公司。

1.1.2 细胞株来源 人甲状腺乳头状癌 K1 细胞株购自上海美轩公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 HMGA1-siRNA 基因的转染 本实验共分为 3 组: HMGA1-siRNA 组; 不加任何干预设为正常组; siRNA 阴性对照进行干预设为阴性对照组。各组引物序列由上海美轩公司设计并合成, 序列如下, HMGA1-siRNA 上游引物: 5'-GCCGGGGCAGGCCGCG-CAATT-3'; 下游引物: 5'-UUGCGCGCCUGCCCCG-GCTT-3'; 阴性对照上游引物: 5'-UUCACUCCAAGU-CUCUUCCTT-3'; 下游引物: 5'-GGAAGAGACUUG-GAGUGAATT-3', 根据 LipofectaminTM2000 说明书进行转染。

1.2.2 细胞培养 采用 DMEM/F12 培养基分组培养人甲状腺乳头状癌 K1 细胞至对数生长期, 各组用 0.25% 胰蛋白酶消化, 制成单细胞悬液, 稀释至 5×10^3 细胞悬液, 逐步分别接种于新的培养瓶继续传代培养, 建立人甲状腺乳头状癌 K1 细胞株。

1.2.3 测定细胞生长曲线 细胞悬液接种到细胞板, 该板为 96 孔板, 每孔置入 1 000 个细胞数, 每组设 3 个复孔, 每天定时加入 10 μ l 的 CCK-8 试剂, 连续 3 d, 待细胞贴壁后, 培养板置入 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 4 h 后, 测定各孔在 450 nm 处的吸光度 (optical density, OD) 值。并计算 KI 细胞抑制率。细胞抑制率 (%) = (1 - 实验组平均 OD 值 / 对照组平均 OD 值)

2016-04-13 接收

基金项目: 安徽省高等学校自然科学基金 (编号: KJ2015B106by)

作者单位: ¹ 蚌埠医学院第一附属医院肿瘤外科, 蚌埠 233004

² 安徽医科大学淮北临床学院、淮北市人民医院普外科, 淮北 235100

作者简介: 周大新, 男, 硕士研究生;

周锐, 男, 主治医师, 硕士, 责任作者, E-mail: zhourui19810120@126.com;

李德群, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: lidequn8888@163.com

×100%。

1.2.4 RT-PCR 定量分析 细胞培养建立人甲状腺乳头状癌 K1 细胞株。引物由上海生物工程公司合成, 序列如下, HMGA1 上游引物: 5'-GAAGGT-GAAGGTCGGAGTC-3'; 下游引物: 5'-GAAGATGGT-GATGGGATTTTC-3'; GAPDH 上游引物: 5'-GGCACT-GAGAAGCGGGGCCG-3'; 下游引物: 5'-CCCTT-GTTTTTGTCTCCCTT-3'。总 RNA 的提取和反转录严格按照说明书进行操作; PCR 反应体系为 20 μl, 反应条件: 预变性 4 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环。在琼脂糖凝胶中观察 PCR 产物。并计算 mRNA 表达抑制率。mRNA 表达抑制率: 抑制率(%) = (1 - 对照组平均相对灰度值/正常组平均相对灰度值) × 100%。

1.2.5 Western blot 法检测 同上, 建立人甲状腺乳头状癌 K1 细胞株。测定各样品蛋白浓度使用 BCA 法, 将漂洗后的凝胶转移到 NC 膜上(4 °C、1 h)。将膜置于 5% 的脱脂奶粉封闭液, 设置 37 °C 恒温封闭 2 h, β-actin 抗体(1:1 000)/HMGA1 抗体(1:400)加入, 4 °C 摇床上一抗孵育过夜, 加入 5% 脱脂奶粉稀释的辣根过氧化物酶标记的第二抗体(1:4 000), 设置 37 °C 恒温摇床上温育 1.5 h 二抗孵育。将膜置于 ECL 显色液中 1~5 min 曝光, 显影, 清洗后放入定影液中定影, 最后用凝胶成像系统分析结果。根据以下公式计算蛋白表达抑制率: 抑制率(%) = (1 - 实验组平均相对灰度值/对照组平均相对灰度值) × 100%。

1.2.6 Transwell 侵袭实验 实验同上, 建立人甲状腺乳头状癌 K1 细胞株。Transwell 小室底部为 8 μm 孔径乙烯滤膜, 预先铺上 Matrigel 凝胶(1 mg/ml) 100 μl。细胞转染 24 h 后, 常规收集细胞, 5 组均以无血清 DMEM/F12 制成 1 × 10⁵/ml 细胞液, 各取 100 μl 移入小室, 小室外加入各 200 μl 的条件培养和完全培养液。置 37 °C 的培养箱内孵育 48 h 后取出。侵袭并黏附至下室面的细胞以 10% 甲醛固定、HE 染色。在 400 倍高倍镜下细胞计数。细胞侵袭力抑制率(%) = (1 - 实验组细胞数/对照组细胞数) × 100%。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间比较用单因素方差分析法, 数据间的两两比较采用 LSD 检验。

2 结果

2.1 HMGA1-siRNA 基因对 K1 细胞增殖的影响

各组细胞在处于对数生长期时细胞分裂增殖旺盛, 形态正常, 生长状态良好, 均出现增殖, 在干预后 24 h 开始出现差异, 且作用时间增长, 转染后 K1 细胞增殖的抑制率越明显, 呈现时间-剂量依赖关系(72 h 作用最明显), 在各时间点 HMGA1-siRNA 组与阴性对照组比较差异均有统计学意义($F = 168.23, P < 0.05$); 正常组与阴性对照组比较差异均无统计学意义。见图 1。

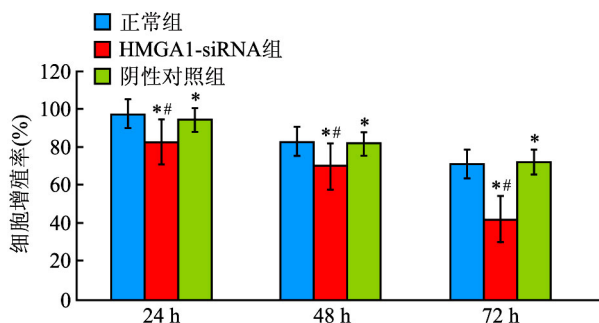


图1 转染后 HMGA1 基因对 K1 细胞增殖的影响
与正常组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

2.2 HMGA1-siRNA 基因在 K1 细胞中 mRNA 的表达 HMGA1-siRNA 处理 72 h 后, HMGA1-siRNA 组 mRNA 表达水平、阴性对照组分别与正常组比较, 均明显降低(正常组: 1.000 ± 0.00 ; HMGA1-siRNA 组: 0.247 ± 0.02 ; 阴性对照组: 0.931 ± 0.05) ($F = 388.72, P < 0.05$), 抑制率分别为 75.28%、6.90%。HMGA1 基因的 mRNA 表达水平在正常组、阴性对照组之间差异无统计学意义。

2.3 HMGA1-siRNA 基因在 K1 细胞中蛋白的表达 Western blot 检测转染 72 h 后, 与正常组比较, HMGA1-siRNA 组和阴性对照组 K1 细胞的抑制率分别为 41.68% 和 2.1%, 见图 2。正常组和阴性对照组之间差异无统计学意义。

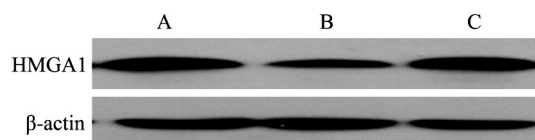


图2 转染后 HMGA1 基因在 K1 细胞中蛋白的表达
A: 正常组; B: HMGA1-siRNA 组; C: 阴性对照组

2.4 Transwell 侵袭实验 通过检测转染 72 h 后, HMGA1 组的 K1 细胞, 穿膜细胞数低于正常组、阴性对照组的细胞, 侵袭力抑制率分别为 36.32%、1.23%, 差异有统计学意义($F = 263.85, P < 0.05$)。

见图3。正常组与阴性对照组比较,细胞侵袭数的差异无统计学意义。

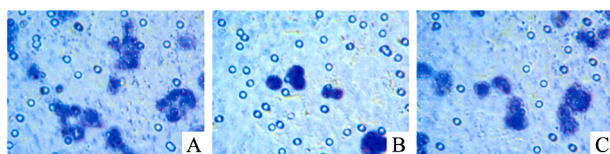


图3 Transwell 侵袭实验 $\times 300$

A: 正常组; B: HMGA1-siRNA 组; C: 阴性对照组

3 讨论

目前,基因沉默主要通过干扰 RNA(siRNA)、反义寡脱氧核苷酸和核酶等技术手段来实现^[4]。研究^[5-8]表明,由于 siRNA 失去了抑制基因表达的活性,其诱导的特定基因阻断技术具有高度的序列特异性。siRNA 抑制基因表达的效率,且具备高度的序列特异性,可以特异性抑制 mRNA 序列,达到阻断目的蛋白的表达作用,同时又具备防止长链 dsRNA 引发的非特异性基因降解和细胞死亡的功能。故 siRNA 已成为 RNAi 施展重要作用的中间效应分子。

临床研究^[9]证明, HMGA1 与肿瘤的侵袭转移能力密切相关, HMGA1 基因在甲状腺癌、肺癌、宫颈癌、前列腺癌、大肠癌、乳腺癌等许多肿瘤中呈高水平表达,而癌旁正常组织不表达或微弱表达,推测其可能与肿瘤的发生、发展密切相关。正常细胞若转染 HMGA1 基因可导致正常细胞的恶化,肿瘤细胞转 HMGA1 基因,可导致细胞恶性程度的增加。研究^[10]表明,不管在转基因动物身上的恶性肿瘤或应用致癌诱导剂导致的正常细胞恶变都可以检测到细胞内 HMGA1 水平迅速升高;可以设想,若抑制 HMGA1 的高表达,是否可以阻止细胞的恶化, HMGA1 有望成为肿瘤治疗的新靶点。

本研究表明人甲状腺乳头状癌组织中有 HMGA1 蛋白异常表达,但还有许多关键性问题没有搞清楚,本课题通过设计并合成 HMGA1 siRNA,然后转染甲状腺乳头状癌 K1 细胞,对照组以等量阴性对照 siRNA 转染 K1 细胞,实时荧光定量 RT-PCR 技术检测转染后 K1 细胞中 HMGA1 mRNA 的表达, HMGA1 mRNA 的表达以 PCR 循环数阈值(Ct 值)表示; Western blot 法测定 K1 细胞中 HMGA1 蛋白

的表达;显微镜观察并计数转染后存活的 K1 细胞数,筛选出有效的 siRNA。用有效的 siRNA 重新转染 K1 细胞,选取稳定转染 HMGA1 siRNA 的甲状腺乳头状癌 K1 细胞,实时荧光定量 PCR、Western blot 法检测稳定转染 HMGA1 siRNA 的甲状腺乳头状癌 K1 细胞株中 HMGA1 mRNA 和蛋白的表达; CCK8、Transwell 法分别检测转染后细胞的增殖、凋亡及迁移力。观察稳定转染 HMGA1 siRNA 对甲状腺乳头状癌细胞的生物学行为的影响,从而进一步了解 HMGA1 基因在甲状腺乳头状癌发生、发展中的作用,以期对甲状腺乳头状癌的治疗开辟新的途径。

本研究利用 RNA 干扰技术,制备 HMGA1-siRNA 基因,并植入甲状腺乳头状癌 K1 细胞,观察 siRNA 对 HMGA1 基因表达的影响。研究显示 siRNA 可以沉默 HMGA1 基因,减缓甲状腺乳头状癌 K1 细胞增殖。该研究结果对甲状腺乳头状癌的诊治、治疗具有一定的启示意义,有待进一步研究。

参考文献

- [1] Fusco A M, Fedele M. Roles of HMGA proteins in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(12): 899 - 910.
- [2] Chang Z G, Yang L Y, Wang W, et al. Determination of high mobility group A1 HMGA1 expression in hepatocellular carcinoma a potential prognostic marker [J]. Dig Dis Sci, 2005, 50(10): 1764 - 70.
- [3] Flohr A M, Rogalla P, Bonk U, et al. High mobility group protein HMGA1 expression in breast cancer reveals a positive correlation with tumour grade [J]. Histol Histopathol, 2003, 18(4): 999 - 1004.
- [4] Matsui K, Sasaki Y, Komatsu T, et al. RNAi gene silencing using cerasome as a viral-size siRNA-carrier free from fusion and cross-linking [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2007, 17(14): 3935 - 8.
- [5] 寻庆英, 王玲玲, 周怀君. siRNA 抑制 RRM2 表达对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞增殖影响的研究 [J]. 东南大学学报(医学版), 2015, 34(6): 890 - 6.
- [6] 卢燕军, 付陆军, 杨家进, 等. siRNA 介导 BMP7 基因沉默对人肝癌 HepG2 细胞增殖和迁移的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2016, 24(1): 10 - 8.
- [7] 农晰婷, 杨光, 张昱. siRNA 靶向抑制 MACC1 对结直肠癌细胞增殖和侵袭能力的影响 [J]. 陕西医学杂志, 2016, 45(1): 9 - 11.
- [8] 张英芝, 劳佩维, 白延青. HMGA1 在卵巢上皮性癌组织中的表达及临床意义 [J]. 肿瘤学杂志, 2014, 20(1): 51 - 4.
- [9] 江振洲, 刘晓昕, 周旺, 等. 我国疾病靶点研究最新进展 [J]. 前沿与进展, 2015, 39(5): 335 - 50.

网络出版时间: 2016-5-9 15:43:10 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160509.1543.012.html>

牙龈卟啉单胞菌对牙周膜成纤维细胞活性、 炎性因子与骨代谢基因表达的影响研究

杨 洋¹, 徐 燕¹, 孟明理¹, 汪 晨¹, 王 敬¹, 王晓静¹, 周永敏¹, 沈继龙²

摘要 目的 探讨牙龈卟啉单胞菌(*P. gingivalis*)活菌感染牙周膜成纤维细胞(PDLF)后对细胞活性、炎性因子和骨代谢相关基因表达的影响。方法 *P. gingivalis*活菌分别以 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 CFU/ml浓度感染PDLF 6 h,检测细胞活性和白细胞介素-6(IL-6)、IL-8、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、RANKL、骨保护素(OPG)的基因表达。结果 *P.*

*gingivalis*攻击PDLF 6 h后,细胞活性差异无统计学意义。与对照组比较,*P. gingivalis*浓度分别达到 10^8 CFU/ml和 10^7 CFU/ml时,IL-6和IL-8基因表达上升,差异有统计学意义($P < 0.01$),*P. gingivalis*浓度达到 10^9 CFU/ml时,IL-1 β 、TNF- α 基因表达上升,差异有统计学意义($P < 0.01$)。各实验组OPG基因表达均下降,差异有统计学意义($P < 0.01$),RANKL基因表达差异无统计学意义。结论 *P. gingivalis*活菌感染PDLF后,可产生一系列的细胞因子,参与牙周组织的破坏与改建。

关键词 牙龈卟啉单胞菌;牙周膜成纤维细胞;细胞因子;破骨细胞

中图分类号 R 780.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)06-0786-05

2016-04-01 接收

基金项目 安徽省自然科学基金(编号:1408085MKL28)

作者单位 ¹安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究中心实验室,合肥 230032

²安徽医科大学人兽共患病安徽省重点实验室,合肥 230032

作者简介 杨 洋,女,硕士研究生;

徐 燕,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: 173236344@qq.com

牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*)是慢性牙周炎的主要致病菌,含有一系列

Impact on proliferation of K1 cells in papillary thyroid carcinoma under the inhibition of siRNA on HMGA1 gene

Zhou Daxin^{1,2}, Zhou Rui¹, Li Dequn¹, et al

(¹Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Hefei 233004; ²Huaibei Clinical Institute of Anhui Medical University, Dept of General Surgery, Huaibei People's Hospital, Huaibei 235100)

Abstract Objective To study the effect of HMGA1-siRNA gene on proliferation of K1 cells in papillary thyroid carcinoma. **Methods** Experimental group was transfected with HMGA1 by small interfering RNA (siRNA); the negative contrast group was transfected with HMGA1 nonrelevant sequence, and transfected with K1 cells of thyroid papillary carcinoma. The impact on the proliferation of K1 cells after the transfection of HMGA1-siRNA was tested by CCK-8. The HMGA1-mRNA expression in the normal group was tested by RT-PCR. The HMGA1 protein expression in the three groups was tested by Western blot. The invasion of K1 cells transfected with HMGA1-siRNA gene was detected by Transwell invasion assay in three groups. **Results** The effect of HMGA1-siRNA gene on the proliferation of K1 cells was obvious, which was relevant to time and dosage. The expression of mRNA and protein in K1 cells was significantly lower than that in normal in HMGA1-siRNA cells. The expression of mRNA and protein in K1 cells was significantly lower than that in the normal group and the negative control group. The invasion ability of K1 cells in HMGA1-siRNA group was significantly lower than that in the normal group and the negative control group. **Conclusion** siRNA can silence HMGA1 gene, and slow down the proliferation of papillary thyroid carcinoma K1 cells.

Key words HMGA1-siRNA gene; papillary thyroid carcinoma; K1 cell; RNA interference technology