

干扰 RNA 沉默 *tpd52* 基因对胶质瘤细胞增殖及凋亡的影响

秦浩¹, 高兵兵¹, 孙移坤², 张昊驹¹, 刘晨², 侯江雷², 黄佛宝², 罗丹², 戴宜武¹

摘要 目的 探究沉默 *tpd52* 基因表达后对胶质瘤 U87 细胞增殖、周期及凋亡的影响。方法 将携带着 shRNA-*tpd52* (抑制 *tpd52* 的核苷酸序列)、shRNA-NC (阴性对照的核苷酸序列) 的慢病毒体外转染胶质瘤细胞系 U87。在转染 48 h 后荧光显微镜下观察表达 GFP 细胞数量, 采用荧光定量 PCR、Western blot 分别检测 TPD52 mRNA 及蛋白表达量, MTT 检测细胞增殖能力, 流式细胞术检测细胞周期分布, Annexin V 和 PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡。结果 U87 细胞转染率 > 90%, 与 shRNA-NC 组及空白对照组相比较, shRNA-*tpd52* 组细胞 TPD52 mRNA 及蛋白表达量明显减少 ($P < 0.01$), 而且细胞增殖能力明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 细胞周期被阻滞在 G0/G1 期, 细胞凋亡比例明显增加 ($P < 0.05$)。结论 沉默胶质瘤细胞中 *tpd52* 基因表达后, 可以有效抑制细胞增殖, 阻滞细胞周期, 促进细胞凋亡。

关键词 胶质瘤; *tpd52*; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号 R 730.246

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)04-0514-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.04.011

2016-12-30 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81271391)

作者单位: ¹安徽医科大学附属陆军总医院临床学院神经外科, 北京 100000

²陆军总医院神经外科, 北京 100000

作者简介: 秦浩, 男, 硕士研究生;

戴宜武, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: qinhaoweidong@163.com

脑胶质瘤是发病率最高的颅内恶性肿瘤^[1], 约占中枢神经系统肿瘤的一半, 平均生存期仅为 9 ~ 12 个月^[2]。虽然临床上“手术 + 放疗 + 化疗”^[3] 为主的综合治疗取得很大进步, 但由于胶质瘤的浸润性、放疗的低敏感性、血脑屏障对化疗药物的阻隔性, 患者预后仍未明显改善。近年来随着生物靶向治疗方法的出现, 明确肿瘤发生发展的具体分子调节机制日益重要, 这将是人类治疗肿瘤的新方法。肿瘤蛋白 D52 (TPD52) 家族是近年来发现的一类原癌基因, 包括 *hD52* (*tpd52*)、*hD53* (*tpd52L1*)、*hD54* (*tpd52L2*)、*hD55* (*tpd52L3*), 其位于 8q12 染色体上, 其由 200 余个氨基酸组成。近年显示 TPD52 在多种肿瘤组织中表达升高, 包括前列腺癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、卵巢癌及黑色素瘤, 且与肿瘤分级、预后密切相关, 参与肿瘤发生、扩增、浸润及转移等进程。然而, TPD52 在胶质瘤细胞中的分子机制仍未有报道。该研究通过干扰 RNA 沉默胶质瘤细胞中 *tpd52* 基因表达来研究其对胶质瘤增殖、凋亡及周期的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂 DMEM 培养基、血清、胰蛋白酶、Lipofectamine™ 2000、总 RNA 抽提试剂 TRIzol、TPD52 siRNA 和对照 siRNA 均购自美国 Invitrogen 公司; U87 细胞购自中科院上海生物细胞研究所; MTT 购

edge infrastructure, Wanfang, Weipu, PubMed, Cochrane Library, OvidSP, Wiley Online Library, EBSCO, Elsevier Science Direct, Springer Link databases for the association CTLA-4 gene polymorphism with MG. The association strength were assessed by RevMan 5.3 software. **Results** Ten references were enrolled in total. MG was divided into thymoma-associated MG (TAMG), thymic hyperplasia MG (THMG) and autoimmune MG (AIMG). The Meta analysis showed that carriers of rs231775 allele G have higher risk of MG ($OR = 1.55$, 95% CI : 1.13 ~ 2.12, $P = 0.006$), and higher risk of AIMG ($OR = 1.39$, 95% CI : 1.09 ~ 1.77, $P = 0.007$) by subgroup analysis. Carriers of rs733618 genotype CC ($OR = 3.28$, 95% CI : 1.89 ~ 5.70, $P < 0.001$) and allele C ($OR = 1.76$, 95% CI : 1.30 ~ 2.37, $P < 0.001$) have higher risk of AIMG by subgroup analysis. **Conclusion** The meta analysis reveals that rs231775 allele G, rs733618 genotype CC and allele C of CTLA-4 gene is associated with the susceptibility to MG.

Key words mysathenia gravis; cytotoxic T lymphocyte associated antigen; polymorphism; single nucleotide; Meta-analysis

自美国 Sigma 公司; 逆转录试剂盒购自北京天根生物公司; 荧光定量 PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡试剂盒购自上海七海生物公司; 鼠抗 TPD52 抗体、鼠抗 GAPDH 抗体购自美国 Abcam 公司; TPD52 mRNA 引物购自北京生工生物工程股份有限公司。收集 2013 年 1 月~2015 年 1 月在神经外科行胶质瘤手术患者和脑外伤手术患者标本组织各 12 例, 其中胶质瘤患者 WHO 病理分级均为 III~IV 级。

1.2 细胞培养及转染 细胞培养与慢病毒转染实验分为空白对照组、shRNA-NC 组(携带阴性对照的核苷酸序列)、shRNA-*tpd52* 组(携带抑制 *tpd52* 的核苷酸序列)。采用含 10% PBS 的 DMEM 培养基培养胶质瘤 U87 细胞, 培养条件为含 5% CO₂ 37 °C 的培养箱中。6 孔板种植细胞, 待单层细胞铺满培养皿 80% 以上面积时, 加入慢病毒进行转染。转染 48 h 后在荧光显微镜下观察并计算表达 GFP 阳性细胞百分数。后续实验均在转染 48 h 后进行。

1.3 MTT 细胞增殖实验 细胞转染成功后种入 96 孔板, 设置 5 个复孔, 每孔种 3 000 个 U87 细胞, 待细胞铺满培养板面积 80% 后每孔加入 20 μl MTT (5 mg/ml) 继续培养 4 h, 吸弃培养液, 1 × PBS 轻柔洗 3 遍; 每孔加入 150 μl DMSO, 置摇床上低速震荡 10 min, 使结晶充分溶解; 490 nm 波长检测。

1.4 细胞周期实验 细胞转染后种入 6 孔板, 每孔 1 × 10⁵ 细胞, 过夜后收集细胞, 75% 乙醇 4 °C 固定 12 h, PBS 洗 2 遍。加入 0.5 ml 含 RNase 的碘化丙啶, 轻轻重悬细胞, 避光温浴 30 min, 上流式 488 nm 波长检测。

1.5 细胞凋亡实验 细胞转染后种入 6 孔板, 每孔 1 × 10⁵ 细胞, 过夜后收集细胞, 冷 PBS 洗 2 遍, 加入 400 μl 1 × Binding Buffer 重悬, 加入 5 μl Annexin V-FITC, 混匀后室温避光孵育 15 min, 再加入 10 μl PI 染色液, 混匀后冰浴避光 5 min, 流式仪检测。

1.6 RNA 提取及荧光定量 PCR 细胞转染 48 h 后, 采用 TRIzol 法提取总 RNA, 取 1 μg 总 RNA, 行逆转录得到 cDNA, 将 cDNA 适当稀释后行荧光定量 PCR 扩增评估 TPD52 mRNA 表达水平, 以 β-actin 作为内参基因。反应体系 20 μl, 包括 2 μl cDNA、10.8 μl 2 × SYBR Premix Ex Taq II、0.4 μl 50 × ROX Reference Dye、各 0.8 μl 正反引物、6 μl 无菌离子水。循环参数设置如下: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s; 总共 40 个循环。引物序列如下: TPD52 F: 5'-TTCACAGGCAG-GACAGAAAGA-

3', R: 5'-TTGAAGGTCGCA-GAGTTCCT-3'; β-actin F: 5'-GTGGACATCCGCAAAGAC-3', R: 5'-AAAGG GTGTAACGCAACTA-3'。采用 2^{-ΔΔCt} 法分析结果。

1.7 Western blot 法检测蛋白量 6 cm 培养皿培养细胞转染 48 h 后, 提取蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。8% SDS-PAGE 胶电泳分离含 25 μg 的蛋白样品, 将分离后的蛋白转移到 PVDF 膜, 5% BSA 室温封闭 1 h, 加一抗 TPD52 (1 : 1 000)、GAPDH (1 : 2 000) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗 PVDF 膜 3 遍, 加二抗 (1 : 5 000) 室温孵育 1 h, 再次 TBST 洗 PVDF 膜 3 遍, 显色。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析。多组均数采用方差分析, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 每个实验重复 3 次, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TPD52 mRNA 在胶质瘤组织、正常脑组织及 U87 细胞中的表达水平 TPD52 在胶质瘤中表达水平高于正常脑组织中的表达水平。为了进一步确认, 本研究采用荧光定量 PCR 测定了 III~IV 级胶质瘤组织、正常脑组织及 U87 细胞中 TPD52 mRNA 的表达量, 显示 TPD52 mRNA 在 III~IV 级胶质瘤组织 ($\Delta C_t: 0.73 \pm 0.47$)、U87 细胞 ($\Delta C_t: 0.74 \pm 0.32$) 中的表达水平明显高于正常脑组织 ($\Delta C_t: 1.92 \pm 0.42$) ($P < 0.05$); 而 U87 细胞与 III~IV 级胶质瘤组织中 TPD52 mRNA 表达水平差异无统计学意义。见图 1。

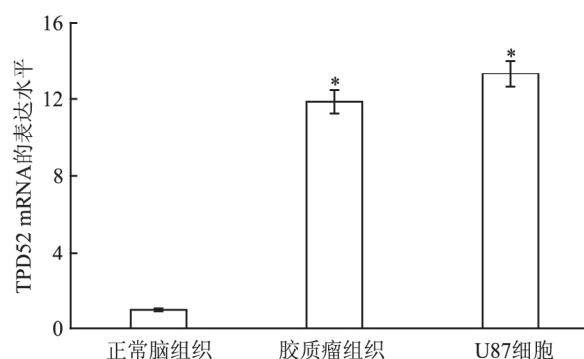


图1 TPD52 mRNA 在正常脑组织、胶质瘤组织及 U87 细胞中的表达水平
与正常脑组织比较: * $P < 0.05$

2.2 U87 细胞慢病毒转染率及 TPD52 mRNA、蛋白表达水平 U87 细胞慢病毒转染率通过携带的 GFP 表达来评估, 通过在荧光显微镜下细胞计数得出细胞转染率 > 90% (图 2)。经荧光定量 PCR 检

测结果提示 TPD52 mRNA 表达量在 shRNA-*tpd52* 组比 shRNA-NC 组、空白对照组中明显下降(图 3) ($F = 14.876, P < 0.01$)。同时,经 Western blot 检测蛋白量结果提示 TPD52 蛋白表达量在 shRNA-*tpd52* 组比 shRNA-NC 组、空白对照组中明显减少,shRNA-*tpd52* 组 Western blot 条带灰度值最低,shRNA-NC 组与空白对照组 Western blot 条带灰度值无明显差异(图 4)。

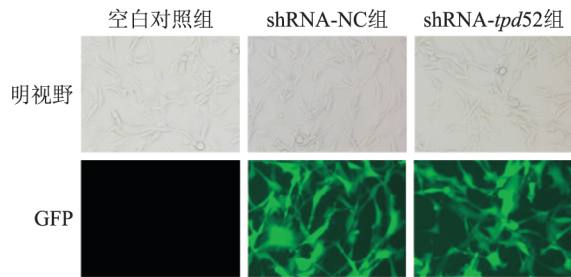


图 2 沉默 *tpd52* 基因表达后 U87 细胞 GFP 的表达水平 ×10

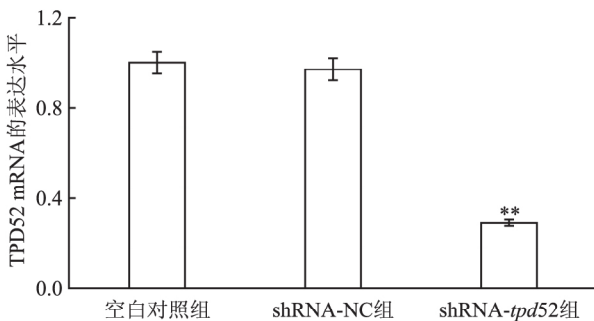


图 3 沉默 *tpd52* 基因表达后 U87 细胞 TPD52 mRNA 的表达水平与空白对照组比较: ** $P < 0.01$

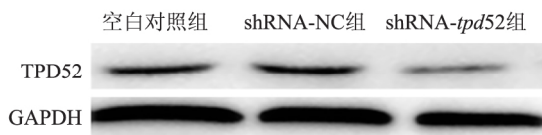


图 4 沉默 *tpd52* 基因表达后 U87 细胞 TPD52 蛋白的表达水平

2.3 *tpd52* 表达沉默后对 U87 细胞增殖的影响

MTT 实验结果提示与 shRNA-NC 组、空白对照组比较,shRNA-*tpd52* 组中 U87 细胞增殖能力明显下降(图 5),转染后第 5 天 shRNA-*tpd52* 组、shRNA-NC 组、空白对照组 OD 值分别为 4.92、6.57、6.65,差异有统计学意义($F = 13.563, P < 0.05$)。

2.4 *tpd52* 表达沉默后对 U87 细胞凋亡的影响

细胞凋亡实验显示,慢病毒感染 48 h 后 U87 细胞的凋亡在 shRNA-*tpd52* 组为 11.5%,shRNA-NC 组、空白对照组 U87 细胞凋亡分别为 3.5%、3.6%(图

6),差异有统计学意义($F = 7.872, P < 0.05$)。

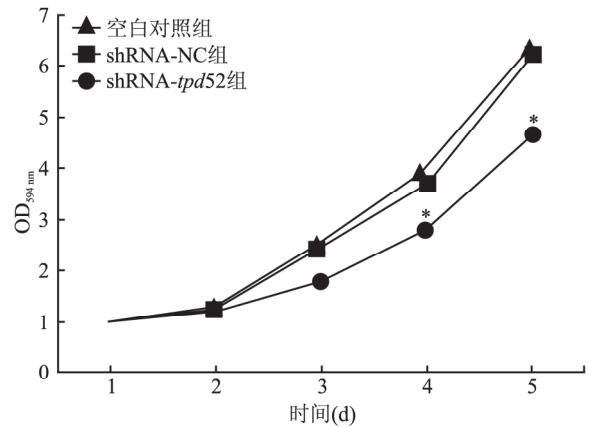


图 5 沉默 *tpd52* 基因表达后对 U87 细胞增殖能力的影响与空白对照组比较: * $P < 0.05$

2.5 *tpd52* 表达沉默后对 U87 细胞周期的影响

经流式仪检测细胞周期,显示 U87 在沉默 *tpd52* 表达 48 h 后,shRNA-*tpd52* 组、shRNA-NC 组、空白对照组中 G0/G1 期细胞比例分别为 67.89%、52.23%、54.98%,而 S 期、G2/M 期细胞比例下降(图 7),差异有统计学意义($F = 11.234, P < 0.05$)。

3 讨论

脑胶质瘤的发生发展是涉及多种基因相互作用的复杂过程,包括一系列突变基因的积累、原癌基因的激活、抑癌基因的失活^[4]。近年来随着生物靶向治疗方法的出现及发展,找出相关原癌在肿瘤中具体的分子调节机制变的日益重要。*tpd52* 是一种原癌基因,由 200 余个氨基酸编码,位于 8q12 染色体上,这段区域在多种肿瘤中频繁扩增,与肿瘤的发生发展密切相关^[5]。

TPD52 被首先报道^[6]在乳腺癌中过度表达,后续多项研究^[7-8]显示 TPD52 在肺癌、前列腺癌、卵巢癌、B 细胞淋巴瘤^[9]、胶质瘤^[4]等恶性肿瘤中表达增高,且是病理分级、患者不良生存期的生物学标志物。在乳腺癌、前列腺癌、肝癌中,多项研究^[10-12]显示沉默 *tpd52* 基因表达可以抑制多种癌细胞的增殖、克隆、促进细胞凋亡、阻滞细胞周期、抑制迁移及侵袭。相反地,外源性 *tpd52* 基因表达增高可以促进细胞增殖、克隆、迁移及侵袭^[8]。这些证据表明 *tpd52* 作为原癌基因具有明显的促进肿瘤发生发展的作用。本研究利用慢病毒转染技术显示沉默 U87 细胞中 *tpd52* 基因表达后,U87 细胞增殖能力受到明显抑制、细胞凋亡显著增加、细胞周期被阻滞在

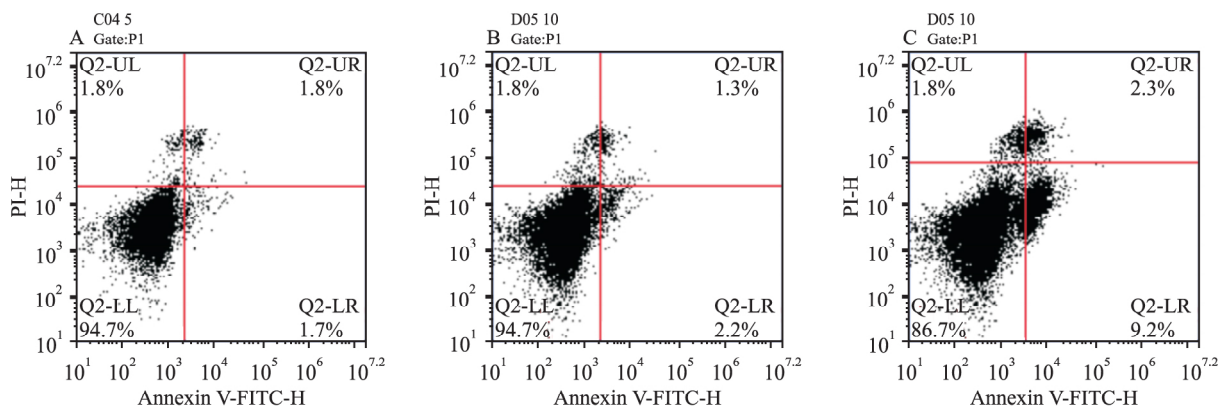


图6 沉默 *tpd52* 基因表达对 U87 细胞凋亡的影响

A: 空白对照组; B: shRNA-NC 组; C: shRNA-*tpd52* 组

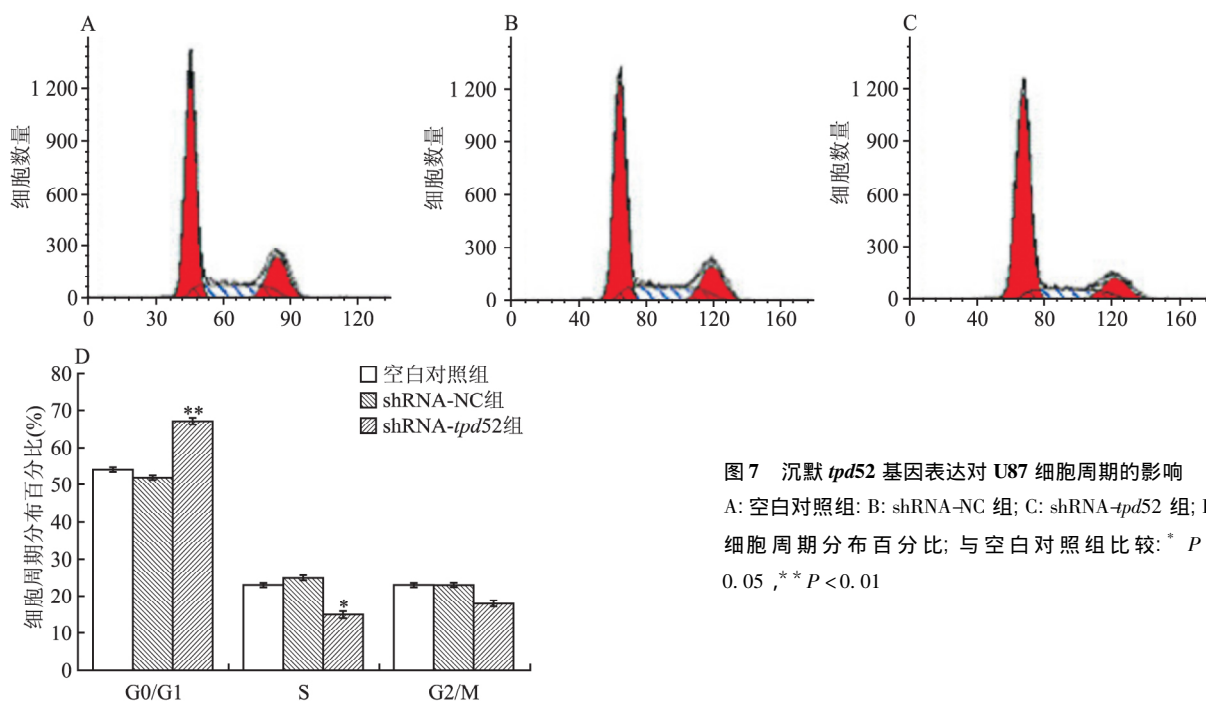


图7 沉默 *tpd52* 基因表达对 U87 细胞周期的影响

A: 空白对照组; B: shRNA-NC 组; C: shRNA-*tpd52* 组; D: 细胞周期分布百分比; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

G0/G1 期, 这说明 TPD52 是胶质瘤发生发展的促进因素。

目前 *tpd52* 在细胞中所涉及的机制方面已有一定的研究。Ummanni et al^[13] 研究显示在前列腺癌细胞中沉默 *tpd52* 基因表达可通过激活细胞凋亡蛋白 3、细胞凋亡蛋白 9, 并且降低线粒体膜电位, 最终促进细胞凋亡。Han et al^[14] 发现 *tpd52* 在前列腺癌中的表达水平可被 miRNA-218 抑制, 使前列腺癌细胞增殖、克隆能力降低, 细胞凋亡增加, 细胞周期被阻滞。Yang et al^[10] 发现沉默乳腺癌细胞中 *tpd52* 基因表达能够促进 GSK3 β 磷酸化作用。研究^[15] 表明在 TPD52 过表达的细胞中多种抑制肿瘤形成及转移的抑癌基因表达下降, 包括小窝蛋白基因、钙黏

连蛋白基因及血小板反应蛋白基因-22。以上机制说明 *tpd52* 参与肿瘤细胞内多条调控通路, 起着调节细胞周期、促进细胞增殖及细胞侵袭迁移的作用。

综上所述, 本研究结果提示 TPD52 在胶质瘤的细胞增殖、周期调节中可能扮演了重要角色, 沉默 *tpd52* 基因表达可抑制胶质瘤细胞的增殖, 同时具有促进细胞凋亡、阻滞细胞周期的作用; *tpd52* 可能是脑胶质瘤生物靶向治疗的一个新的作用靶点, 但是其具体的分子调节机制尚待进一步研究。

参考文献

[1] 朱晋, 张玉琪, 万虹, 等. 组蛋白去乙酰化酶 3 与小儿胶质瘤发病和预后的关系 [J]. 中华神经外科杂志, 2014, 30(11):

- 1145–8.
- [2] 泮长存, 汤 劼, 李德志 等. 儿童弥散内生型脑桥胶质瘤的自然病史及预后因素分析 [J]. 中华神经外科杂志, 2015, 31(2): 115–7.
- [3] Jackson M, Bydder S, Maujean E. Radiotherapy in the management of high-grade gliomas diagnosed in Western Australia: a patterns of care study [J]. *J Med Imaging Radiat Oncol* 2012, 56(1): 109–15.
- [4] Salford L G, Brun A, Niffalk S. Ten-year survival among patients with supratentorial astrocytomas grade III and IV [J]. *J Neurosurg*, 1988, 69(4): 506–9.
- [5] Byrne J A, Mattei M G, Basset P. Definition of the tumor protein D52 (TPD52) gene family through cloning of D52 homologues in human (hD53) and mouse (mD52) [J]. *Genomics*, 1996, 35(3): 523–32.
- [6] Alkatout I, Friemel J, Sitek B, et al. Novel prognostic markers revealed by a proteomic approach separating benign from malignant insulinomas [J]. *Mod Pathol*, 2015, 28(1): 69–79.
- [7] Cheung H C, Baggerly K A, Tsavachidis S, et al. Global analysis of aberrant pre-mRNA splicing in glioblastoma using exon expression arrays [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 216.
- [8] Wang Z, Sun J, Zhao Y, et al. Lentivirus-mediated knockdown of tumor protein D52-like 2 inhibits glioma cell proliferation [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2014, 60(1): 39–44.
- [9] Tennstedt P, Bölch C, Strobel G, et al. Patterns of TPD52 overexpression in multiple human solid tumor types analyzed by quantitative PCR [J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(2): 609–15.
- [10] Yang M, Wang X, Jia J, et al. Tumor protein D52-like 2 contributes to proliferation of breast cancer cells [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2015, 30(1): 1–7.
- [11] Lewis J D, Payton L A, Whitford J G, et al. Induction of tumorigenesis and metastasis by the murine orthologue of tumor protein D52 [J]. *Mol Cancer Res*, 2007, 5(2): 133–44.
- [12] Tiacci E, Orvietani P L, Bigerna B, et al. Tumor protein D52 (TPD52): a novel B-cell/plasma-cell molecule with unique expression pattern and Ca(2+)-dependent association with annexin VI [J]. *Blood*, 2005, 105(7): 2812–20.
- [13] Ummanni R, Teller S, Junker H, et al. Altered expression of tumor protein D52 regulates apoptosis and migration of prostate cancer cells [J]. *FEBS J*, 2008, 275(22): 5703–13.
- [14] Han G, Fan M, Zhang X. microRNA-218 inhibits prostate cancer cell growth and promotes apoptosis by repressing TPD52 expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 456(3): 804–9.
- [15] Pan Z Y, Yang Y, Pan H, et al. Lentivirus-mediated TPD52L2 depletion inhibits the proliferation of liver cancer cells *in vitro* [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(2): 2334–41.

Effect of silencing *tpd52* gene by RNA interference on proliferation and apoptosis of glioma cells

Qin Hao¹, Gao Bingbing¹, Sun Yikun², et al

(¹Dept of Neurosurgery, The General Hospital of Army General Hospital of Anhui Medical University, Beijing 100000;

²Dept of Neurosurgery, General Hospital of Army General Hospital, Beijing 100000)

Abstract *Objective* To explore the effect of silencing tumor protein D52 (*tpd52*) gene by RNA interference on proliferation and apoptosis in glioma cells. *Methods* The lentivirus, expressing shRNA-*tpd52* (the nucleotide sequence of inhibiting *tpd52*) and shRNA-NC (the nucleotide sequence of negative control) were infected into human U87 glioma cells *in vitro*. In 48 h after transfection, the counts of expression GFP cells was measured by fluorescence microscope, and the expression level of TPD52 mRNA and protein were detected by real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot analysis. MTT assay was performed to evaluate cells proliferation. Cell apoptosis and cycle were detected by the flow cytometry with Annexin V and PI. *Results* The transfection rate of U87 cells was more than 90%. In contrast with the shRNA-NC group and the blank control group, the expression of TPD52 mRNA and protein of shRNA-*tpd52* group were decreased significantly ($P < 0.01$), and the ability of U87 cells proliferation was markedly inhibited ($P < 0.05$). It simultaneously inhibited the transition from G0 phase to G1 phase and promoted cell apoptosis of U87 cells ($P < 0.05$). *Conclusion* Silence of TPD52 gene expression might inhibit proliferation and colony formation, arrest cell cycle and enhance apoptosis of glioma cells.

Key words glioma; *tpd52*; cell proliferation; cell apoptosis