

RNA 干扰 A20 基因的表达对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖、凋亡和迁移的影响

余明杰^{1,2} 徐元宏¹ 王 萍²

摘要 目的 利用 RNA 干扰技术靶向沉默 A20 基因,对 MCF-7 细胞株增殖、凋亡和迁移的影响进行研究,探讨 A20 基因作为乳腺癌治疗靶点的潜在价值。方法 人工合成靶向 A20 基因的 siRNA 序列和阴性对照(NC) siRNA 序列,利用脂质体转染技术将 siRNA 导入 MCF-7 细胞株,采用 CCK-8 细胞增殖实验、Annexin V、7-AAD 双染流式细胞术检测凋亡实验和 Transwell 细胞迁移实验研究沉默 A20 基因对 MCF-7 细胞增殖、凋亡和迁移的影响。结果 靶向沉默 A20 基因表达能够有效抑制 MCF-7 细胞的增殖和迁移,促进细胞凋亡的发生。结论 A20 基因在 MCF-7 细胞的增殖、凋亡和迁移过程中起重要作用,A20 基因可能是针对乳腺癌抗肿瘤靶向治疗的潜在靶点。

关键词 A20 基因;人乳腺癌细胞株 MCF-7;RNA 干扰;细胞增殖;细胞凋亡;细胞迁移

中图分类号 R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)09-1215-05

A20 基因,又称肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 3,其表达产物为锌指蛋白 A20,锌指蛋白 A20 最初是在内皮细胞经肿瘤坏死因子(tumor necrosis factors, TNF) 刺激后应答产生,其是一种具有锌指结构的泛素化修饰酶,可在 TNF、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS) 等诱导刺激下高表达^[1]。A20 参与调解多种细胞活动,如基因转录、细胞周期调控、免疫应答、细胞受体功能及肿瘤发生发展等,有重要的生物学意义。早期研究^[2]证实,A20 可以抑制 TNF 介导的细胞凋亡,在一些细胞系中的稳定过表达也证实了该结论,如人乳腺癌细胞 MCF-7、纤维肉瘤细胞 WEHI164、胚胎细胞系 NIH3T3 和内皮细胞等均发现该现象,但作用机制尚未阐明。乳腺癌目前已经成为女性肿瘤的第一位,有发病率高、恶性程度高、易耐药及预后差

的特点。研究^[3-5]表明在乳腺癌耐药细胞株、高侵袭性乳腺癌组织和炎性乳腺癌等细胞和临床标本中存在 A20 的高表达,极有可能作为雌二醇调控基因而存在,有潜在的乳腺癌耐药及炎性乳腺癌的靶点;转染 A20 基因后 MCF-7 细胞对泰素等化疗药物的敏感性大幅降低。该实验借助 RNA 干扰技术对 A20 基因表达进行沉默,研究其表达对乳腺癌细胞株增殖、凋亡和迁移的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 人乳腺癌细胞株 MCF-7(中国科学院典型培养物保藏委员会上海细胞库提供);细胞培养基(美国 Hyclone 公司);胎牛血清(四季青,浙江天杭生物科技有限公司);各种规格培养皿(美国 Corning 公司);Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司);CCK-8 试剂盒(同仁化学,上海东仁化学科技有限公司);细胞蛋白抽提试剂盒和超敏 ECL 化学发光试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);RNAi-Mate(上海吉玛制药技术有限公司);TRIzol(TIANGEN,北京天根生化科技有限公司);cDNA 反转录试剂盒、SYBR Green qPCR Master Mix(Fermentas,立陶宛 MBI 公司),兔抗人 A20 多克隆抗体(美国 Sigma 公司);HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗(美国 BioWorld 公司);A20 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 的序列合成 参考文献^[6]中靶向 A20 基因 siRNA 序列,A20 siRNA: 5'-GAAGCU-CAGAAUCAGAGAUUU-3'(与 A20 mRNA 的 5'端第 2 038 bp ~ 2 058 bp 序列互补)。阴性对照(NC) siRNA: 5'-AACGUACGCGGAAUACUUCGA-3'。所有 siRNA 进行末端 2'-OME 修饰以提高细胞内稳定性,由上海吉玛制药技术有限公司合成。

1.2.2 siRNA 细胞转染 收集生长状态良好 MCF-7 细胞 3×10^4 /ml 细胞密度,提前 1 d 将细胞接种在 24 孔板中,以转染时细胞的融合度在约 50%。转染前,分别取 A20 siRNA 液和 NC siRNA 液适量

2015-05-19 接收

基金项目:安徽省科技创新公共服务平台项目(编号:PT20081011)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院检验科,合肥 230022

²安徽省亳州市人民医院检验科,亳州 236800

作者简介:余明杰,男,硕士研究生;

徐元宏,主任医师,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:

xyhong1964@163.com

稀释至 1 μmol/L。取 1 μmol/L 的 siRNA 溶液 3 μl 加入到 100 μl Opti-MEM 培养基。轻轻混匀,室温放置 5 min。然后取 2 μl siRNA-Mate 加入到准备好的培养基稀释的 siRNA,加入后立即充分混匀,轻微离心后,室温放置 10 min 以形成 siRNA 和 siRNA-Mate 的复合物。同时从细胞培养板中移除原有的培养基。每孔加入 500 μl 的完全培养基。将 siRNA 和 siRNA-Mate 的复合物逐滴滴加到每 1 个包含细胞和培养基的孔中。轻轻地前后摇动培养板混合均匀。在转染后 6 h 改换完全培养基。37 °C、CO₂ 培养箱孵育 48 h 进行 A20 基因表达检测实验。

1.2.3 细胞中 A20 基因表达 细胞转染 siRNA 48 h 后分别收集 MCF-7、A20 siRNA 和 NC siRNA 组细胞,按照操作说明分别提取细胞总 RNA 和蛋白质,紫外分光光度计检测样品纯度和浓度,总 RNA 逆转录合成 cDNA。实时定量 PCR 检测引物序列如下:上游引物 5'-ACTTGCCAGTTTTGTCCTCA-3',下游引物 5'-GTCACCGTTCGTTTTACAGCG-3';内参基因 GAPDH 上游引物 5'-CTCCTCCACCTTTGACGCTG-3',下游引物 5'-TCCTCTTGTGCTCTTGCTGG-3'。反应程序为:预变性 94 °C 10 min、变性 94 °C 30 s、退火 60 °C 30 s、延伸 72 °C 30 s 40 个循环。用 2^{-ΔΔCt} 分析法进行数值分析。提取细胞蛋白进行 Western blot 法检测 A20 基因的蛋白质表达水平,取 20 μl 经 12% SDS-PAGE 电泳进行蛋白分离后,电转移至 PVDF 膜室温封闭 2 h,加入一抗 A20 稀释液(工作浓度为 1:300),置于 4 °C 过夜孵育。一抗洗脱后将 1:2 000 稀释的二抗室温孵育 2 h。采用 ECL 显色法进行条带显色,以 β-actin 蛋白为内参对照。

1.2.4 肿瘤细胞增殖实验 细胞转染 siRNA 12 h 后分别收集 MCF-7、MCF-7/A20 siRNA 和 MCF-7/NC siRNA 细胞,调整细胞密度 1 000 个/孔、200 μl/孔将细胞分别铺板至 96 孔板中,每个实验组设 3 个复孔,同时设立培养基对照组;将细胞培养板置于 37 °C、CO₂ 培养箱中继续培养 48 h。按照 CCK-8 试剂盒操作说明书要求,将 20 μl/孔 CCK-8 试剂加至相应实验孔中,视颜色变化情况和细胞生长情况继续孵育 2 h,然后进行酶标仪检测,检测波长为 450 nm。

1.2.5 肿瘤细胞凋亡实验 细胞转染 siRNA 48 h 后分别收集处于对数生长期的 MCF-7、MCF-7/A20 siRNA 和 MCF-7/NC siRNA 细胞,制备单个细胞悬液,预冷 PBS 洗涤一遍。每管加入 100 μl 1 × Binding Buffer、1 μl Annexin V-PE 抗体和 2 μl 7-AAD 轻

柔混匀,4 °C 避光静置 20 min。流式细胞仪检测,数据由 Flowjo 软件分析处理,计算细胞凋亡率。

1.2.6 肿瘤细胞迁移实验 细胞转染 siRNA 后分别将 MCF-7、MCF-7/A20 siRNA 和 MCF-7/NC siRNA 细胞用无血清培养基培养 12 h,然后配制细胞悬液,调整细胞密度为 2 × 10⁶ 个/ml;于 Transwell 小室的上室(5 μm)中加入不同的细胞悬液 100 μl,每组设计 3 个复孔;Transwell 小室的下室中每孔加入 600 μl 含 20% FBS 的 RPMI-1640 培养基,37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 12 h。取出 Transwell 小室,清洗膜下面的细胞,将下室培养液细胞进行 CCK-8 实验(步骤同细胞增殖实验)。测量各组细胞在 450 nm 波长处的光密度(optical density, OD) 值以分析肿瘤细胞迁移能力。

1.3 统计学处理 用 Graphpad prism 5 (Graphpad, San Diego, CA) 统计分析软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 siRNA 对 MCF-7 细胞中 A20 基因表达的沉默 为了增加 siRNA 在细胞内的稳定性和干扰效率,本实验采用化学修饰 siRNA 进行研究。siRNA 转染 MCF-7 细胞 48 h 后 A20 基因 mRNA 和蛋白质表达情况,转染 NC siRNA 细胞 A20 基因表达水平和未转染基本一致;而转染 A20 siRNA A20 基因表达水平显著低于未转染和转染 NC siRNA (P < 0.001);A20 基因表达抑制率达到 83.5%,提示该 A20 靶向 siRNA 能够有效沉默 MCF-7 细胞中 A20 基因的表达。见图 1。

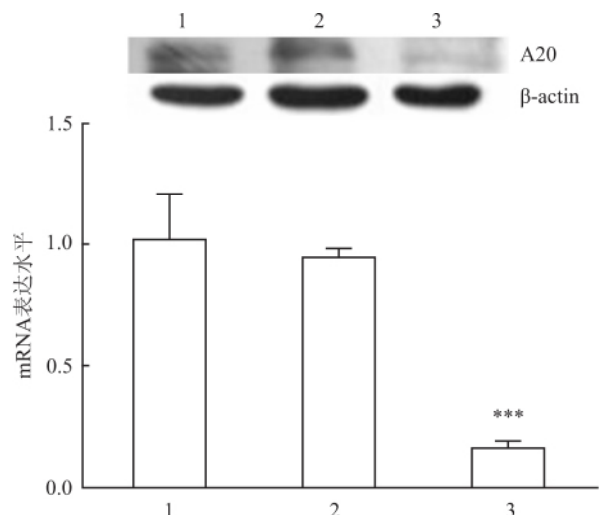


图 1 siRNA 干扰 MCF-7 细胞 A20 基因的表达情况
1: MCF-7; 2: NC siRNA; 3: A20 siRNA; 与 NC siRNA 比较: *** P < 0.001

2.2 siRNA 靶向沉默 A20 基因表达对 MCF-7 细胞增殖的影响 为了研究 A20 基因沉默对 MCF-7 细胞增殖的影响,采用 CCK-8 增殖实验进行研究。MCF-7 细胞转染 A20 siRNA 12 h 后用于增殖实验,实验过程中细胞继续培养 48 h 进行增殖检测;MCF-7 细胞转染 NC siRNA 后,细胞增殖受到轻微影响,这可能是由于转染试剂和小片段 RNA 序列的细胞毒性所致。而 MCF-7 细胞转染靶向 A20 siRNA 后,细胞增殖受到显著抑制($P < 0.001$),提示靶向干扰 A20 基因的表达能够显著抑制 MCF-7 细胞的增殖。见图 2。

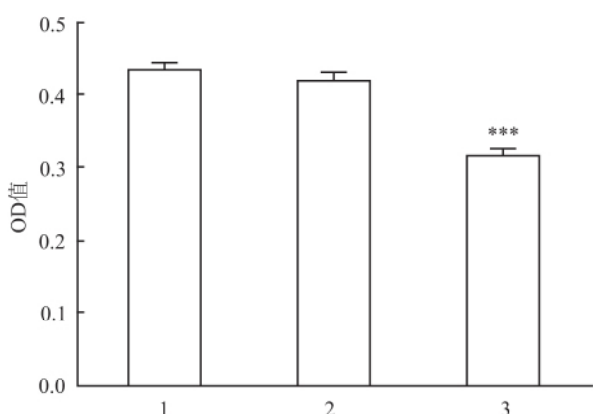


图2 A20 siRNA 对 MCF-7 细胞增殖的影响

1: MCF-7; 2: NC siRNA; 3: A20 siRNA; 与 NC siRNA 比较:

*** $P < 0.001$

2.3 siRNA 靶向沉默 A20 基因表达对 MCF-7 细胞凋亡的影响 为了研究靶向沉默 A20 基因表达抑制 MCF-7 细胞的增殖是否由于促进细胞凋亡而致,采用 Annexin V、7-AAD 双染流式细胞术对细胞凋亡情况进行了分析。Annexin V⁺/7-AAD⁺ 表示晚期凋亡细胞,Annexin V⁺/7-AAD⁻ 表示早期凋亡细

胞;MCF-7 细胞转染靶向 A20 siRNA 后,细胞早期凋亡率从 3.97% 升高至 9.69%,晚期凋亡率从 1.13% 升高至 4.92%;总凋亡率达到 14.61%,显著高于 MCF-7 对照的 3.66% 和 NC siRNA 转染的 5.1%,提示靶向 siRNA 沉默 A20 基因表达能够有效促进 MCF-7 细胞凋亡。见图 3。

2.4 siRNA 靶向沉默 A20 基因表达对 MCF-7 细胞迁移的影响 为了研究靶向沉默 A20 基因表达对 MCF-7 细胞迁移的影响,采用 Transwell 实验进行。MCF-7 细胞转染靶向 A20 siRNA 后,细胞迁移受到显著抑制($P < 0.01$),迁移抑制率为 25.5%,提示靶向干扰 A20 基因的表达能够有效抑制 MCF-7 细胞的迁移。见图 4。

3 讨论

近年来,A20 基因作为细胞凋亡通路的一个关键抑制基因被研究人员重视。A20 作为 NF- κ B 的应答基因,多数研究^[7-8]表明其是 NF- κ B 信号通路活化的抑制因子。同时,A20 是多种肿瘤的易感基因,如 B 细胞淋巴瘤、T 细胞恶性肿瘤、胶质瘤、涎腺腺样囊性癌、乳腺癌等^[9-10]。然而发现在不同的肿瘤中 A20 基因可能具有不同的生物学功能,如在 B 细胞淋巴瘤中出现 A20 基因的失活^[11]。在胰腺癌组织和细胞中 A20 低于正常组织的表达,而在胶质瘤和乳腺癌中却出现相反的情况^[3,12]。另外,有研究^[13]显示恶性肿瘤组织或细胞在药物作用后例如多发性骨髓瘤细胞经二硫化二砷作用后,骨肉瘤细胞经吉西他滨作用后^[14],食管癌鳞癌细胞经 Tauro-lidine 作用后^[15],脂肪肉瘤细胞经表柔比星作用后^[4],都出现 A20 表达增加及细胞凋亡的现象。虽然 A20 基因表达存在多种可能性,但是以上研

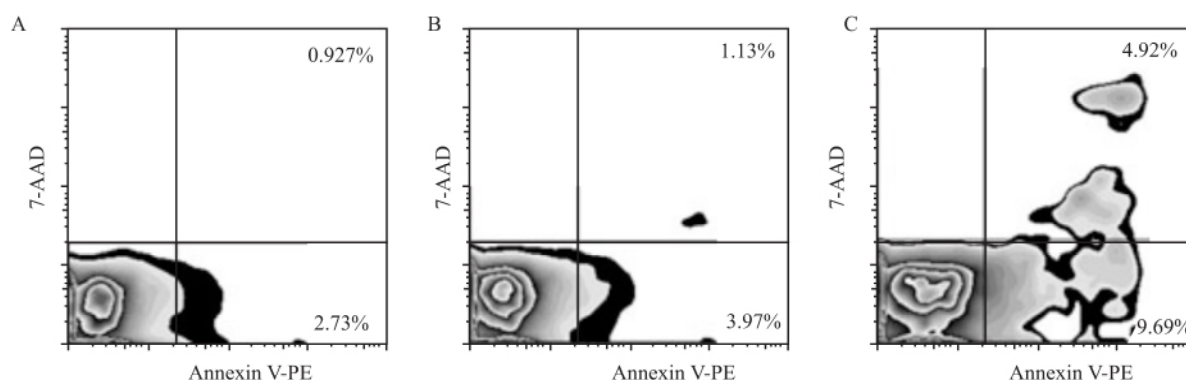


图3 靶向沉默 A20 基因表达对 MCF-7 细胞凋亡的影响

A: MCF-7; B: NC siRNA; C: A20 siRNA

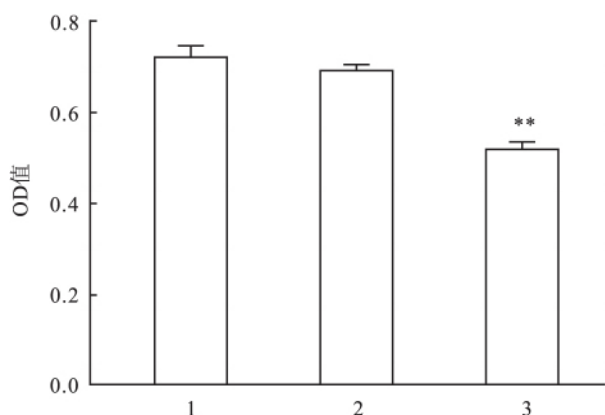


图4 靶向沉默 A20 基因表达对 MCF-7 细胞迁移的影响

1: MCF-7; 2: NC siRNA; 3: A20 siRNA; 与 NC siRNA 比较: ** $P < 0.01$

究^[4, 13-15]暗示 A20 表达的异常可能导致细胞对凋亡的抵抗,降低细胞凋亡水平,从而使肿瘤细胞对药物的敏感性下降,导致肿瘤细胞产生耐药。

本实验中为了证实 A20 基因在乳腺癌 MCF-7 细胞中的生物学作用,采用 RNAi 技术对细胞中 A20 基因进行沉默表达,对细胞增殖、凋亡和迁移进行了一系列研究。结果提示靶向沉默 A20 基因能够显著抑制 MCF-7 细胞的增殖和迁移能力,促进细胞凋亡。这些实验结果阐释了 A20 基因在 MCF-7 细胞中异常表达的生物学作用,为针对该基因的信号通路研究奠定了基础,也为针对乳腺癌抗肿瘤靶向治疗提供潜在的靶点。

参考文献

[1] Dixit V M, Green S, Sarma V, et al. Tumor necrosis factor-alpha induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(5): 2973-8.

[2] 解婧, 王杰军. 锌指蛋白 A20 与恶性肿瘤相关性研究的进展 [J]. *临床肿瘤学杂志* 2010, 15(1): 86-9.

[3] Vendrell J A, Ghayad S, Ben-Larbi S, et al. A20/TNFAIP3, a new estrogen-regulated gene that confers tamoxifen resistance in breast cancer cells [J]. *Oncogene*, 2007, 26(32): 4656-67.

[4] Lerebours F, Vacher S, Andrieu C, et al. NF-kappa B genes have a major role in inflammatory breast cancer [J]. *BMC Cancer*, 2008, 8: 41.

[5] Wikman H, Westphal L, Schmid F, et al. Loss of CADMI expression is associated with poor prognosis and brain metastasis in breast cancer patients [J]. *Oncotarget* 2014, 5(10): 3076-87.

[6] Shao L, Oshima S, Duong B, et al. A20 restricts wnt signaling in intestinal epithelial cells and suppresses colon carcinogenesis [J]. *PLoS One* 2013, 8(5): e62223.

[7] Tewari M, Wolf F W, Seldin M F, et al. Lymphoid expression and regulation of A20, an inhibitor of programmed cell death [J]. *J Immunol*, 1995, 154(4): 1699-706.

[8] Coornaert B, Baens M, Heyninck K, et al. T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF-kappaB inhibitor A20 [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(3): 263-71.

[9] Bredel M, Bredel C, Juric D, et al. Tumor necrosis factor-alpha-induced protein 3 as a putative regulator of nuclear factor-kappaB-mediated resistance to O6-alkylating agents in human glioblastomas [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(2): 274-87.

[10] Zhang B, Guan C C, Chen W T, et al. A20 inhibits human salivary adenoid cystic carcinoma cells invasion via blocking nuclear factor-kappaB activation [J]. *Chin Med J (Engl)* 2007, 120(20): 1830-5.

[11] Compagno M, Lim W K, Grunn A, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Nature*, 2009, 459(7247): 717-21.

[12] Hjelmeland A B, Wu Q, Wickman S, et al. Targeting A20 decreases glioma stem cell survival and tumor growth [J]. *PLoS Biol*, 2010, 8(2): e1000319.

[13] Wang M C, Jiu S X, Liu P B. Gene expression profile of multiple myeloma cell line treated by realgar [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2006, 25(2): 243-9.

[14] Al-Romaih K, Somers G R, Bayani J, et al. Modulation by decitabine of gene expression and growth of osteosarcoma U2OS cells *in vitro* and in xenografts: identification of apoptotic genes as targets for demethylation [J]. *Cancer Cell Int* 2007, 7: 14.

[15] Daigeler A, Chromik A M, Geisler A, et al. Synergistic apoptotic effects of taurididine and TRAIL on squamous carcinoma cells of the esophagus [J]. *Int J Oncol* 2008, 32(6): 1205-20.

The effect of knockdown A20 expression on the proliferation, apoptosis and migration of MCF-7 cells

Yu Mingjie^{1,2}, Xu Yuanhong¹, Wang Ping²

(¹Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Clinical Laboratory, People's Hospital of Bozhou City, Bozhou 236800)

Abstract Objective To study the effect of knockdown A20 expression on the proliferation, apoptosis and migra-

兴奋下丘脑腹外侧视前区对结节乳头体核 c-Fos 表达的影响及其受体途径

丁睿, 王媛, 丁正霞, 吴芳, 许奇, 张瑾, 王烈成

摘要 目的 研究兴奋下丘脑腹外侧视前区(VLPO)对结节乳头体核(TMN) c-Fos 表达的影响及其受体途径。方法 免疫组织化学方法检测 VLPO 代谢型谷氨酸受体 5(mGluR5)和 TMN γ -氨基丁酸 A 受体 $\beta 1$ 亚型($GABA_A R\beta 1$)的表达;采用脑立体定位技术,观察微量注射谷氨酸(L-Glu)兴奋 VLPO 后对 TMN c-Fos 表达变化的影响。结果 mGluR5 于 VLPO 存在阳性表达,同时 $GABA_A R\beta 1$ 于 TMN 存在阳性表达;与对照组相比,VLPO 内微量注射 L-Glu 后,大鼠的 TMN 区域 c-Fos 表达量明显减少,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 存在于 VLPO 和 TMN 的 mGluR 及 $GABA_A R$ 介导 VLPO-TMN 的通路调节,VLPO 可通过 $GABA_A R$ 抑制 TMN 神经元活动。

关键词 下丘脑腹外侧视前区; 结节乳头体核; c-Fos; 免疫组织化学

中图分类号 R 338.2+7; R 33-33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)09-1219-04

脑内的睡眠和觉醒系统分别由众多的神经核团和递质组成,彼此间形成相互作用、相互制约的神经网络。下丘脑腹外侧视前区(ventrolateral preoptic

nucleus, VLPO)与结节乳头体核(tuberomammillary nucleus, TMN)分别是睡眠和觉醒系统的调节中枢^[1]。80%的 VLPO 神经元为 γ -氨基丁酸(γ -aminohutyric acid, GABA)能和甘丙肽能,而 TMN 是脑中组胺能神经元胞体聚集的区域,这两个核团之间相互的纤维联系以及递质释放对睡眠-觉醒节律的产生与维持有何作用是近年来研究的热点。为了进一步探讨这两个脑区在睡眠和觉醒调节中介导的受体,该实验在相关理论的基础上,检测了促睡眠中枢 VLPO 脑区代谢型谷氨酸(mGlu)受体与促觉醒中枢 TMN 脑区 $GABA_A$ 受体的表达以及兴奋 VLPO 核团后检测 TMN 区域 c-Fos 表达量的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康雄性成年 SD 大鼠 30 只,SPF 级 270~300 g,由安徽医科大学实验动物中心提供。首先随机抽取用于免疫组化检测相关受体的大鼠 5 只。将剩下的大鼠随机分为对照组[人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF)组,VLPO 微量注射 ACSF]、实验组[L 型谷氨酸(L-glutamic acid, L-Glu)组,VLPO 微量注射 L-Glu],实验组和对照组各 10 只。所有大鼠手术前后置于温度(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 和相对湿度(55 ± 5)%适宜的通风环境中单独饲养,饮水与食物充足,活动不受限制,光照周期为 12 h 黑暗-12 h 光照。

2015-03-31 接收

基金资助:国家自然科学基金(编号:81071075、81401100);安徽高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2014A116)

作者单位:安徽医科大学基础医学院生理教研室,合肥 230032

作者简介:丁睿,男,硕士研究生;

王烈成,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: wanglic-heng@ahmu.edu.cn

tion of MCF-7 cells and to evaluate the potential value of the A20 gene as the therapeutic target of breast cancer. **Methods** Synthesized siRNA targeted to A20 gene or negative control siRNA were transfected into MCF-7 cells by using lipofectamine 2000. CCK8 assay, Annexin V and 7-AAD double staining cytometry, Transwell assay were performed to investigate the effect of knockdown A20 mRNA expression on the proliferation, apoptosis, migration of MCF-7 cells, respectively. **Results** It can inhibit the proliferation and migration as well as promote the apoptosis in MCF-7 cells by knockdown A20 mRNA expression. **Conclusion** A20 gene plays an important role in the proliferation, apoptosis and migration of MCF-7 cells and it could be a potential therapeutic target of breast cancer.

Key words A20 gene; human breast cancer cell line MCF-7; RNA interference; cell proliferation; cell apoptosis; cell migration.