

[文章编号] 1007-385X(2005)01-0065-02

抑制 AFP 基因表达能直接抑制肝癌细胞系 SMMC-7721 增殖

亓同钢¹, 汪运山², 刘相东³, 孟月生¹, 张伟¹, 关广聚¹(1. 山东大学第二医院, 济南 250033; 2. 济南市中心医院, 济南 250013; 3. 山东省立医院, 济南 250000)

甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)是哺乳动物胚胎时期由肝脏和软黄囊产生的一个主要的血清蛋白。在正常成人外周血中常常检测不到 AFP 的存在,而在肝癌患者外周血中,AFP 常显著升高,是诊断原发性肝癌的一个重要的肿瘤标志物。

近来有研究发现,应用反义核酸技术抑制 AFP 的表达后能明显的抑制肝癌细胞的增殖,并能诱导肝癌细胞凋亡^[1]。动物实验结果也表明,在裸鼠体内应用反义核酸抑制 AFP 表达后能直接抑制肝癌细胞的生长。由此可见,阻断 AFP 基因表达有可能是一个治疗分泌 AFP 性肝癌的一个新策略。

RNA 干涉^[2]是一项近几年才发展起来的生物学技术,该技术能高效的抑制基因的表达,现已广泛的应用于基因功能研究及基因治疗研究。本研究采用该技术,构建了能在哺乳动物细胞中表达小发夹状干涉性 RNA 分子(siRNAs)的表达质粒 pSilencer3.0-H1-afp,特异性地沉默 AFP 基因的表达,以研究其对肝癌细胞生物学行为的影响。

1 材料与方法

1.1 质粒载体的构建

pSilencer3.0-H1-afp 的构建参见文献[3],该质粒针对 AFP 基因(GenBank accession no. NM_005030)编码区序列 5'-AACTCAGTGAGGACAACTAT-3'(该序列位于相对于起始密码 1387~1407 之间)。另外本研究所用阳性对照质粒及阴性对照质粒均由试剂盒提供,阳性对照质粒针对 GAPDH 基因。

1.2 肿瘤细胞培养及质粒的脂质体转染

人肝癌细胞系 SMMC-7721 细胞培养在含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 中,置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中。质粒转染采用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)。转染前一天,将肿瘤细胞接种 24 孔培养板,每孔 7 × 10⁴ 细胞,使每孔细胞饱和度在转染前达到 80% 以上。转染前,将 1 μg 质粒和 2 μl Lipofectamine 2000 分别用 50 μl 无血清 Opti-MEM I (Invitrogen) 稀释,孵育 5 min 后,将稀释的质粒 DNA 与稀释的 Lipofectamine 2000 混匀,室温孵育 20 min,然后将 100 μl 混合物加入到细胞

培养基中,轻轻混匀,于 37℃ 培养 4 h 后,将其中的培养基吸出,加入新鲜的培养基,继续孵育不同的时间(12 h,24 h,48 h,72 h,等)。

1.3 质粒 DNA 与 Lipofectamine 2000 最佳比例的测定

将阳性对照质粒 pSilencer 3.0-H1-gapdh 与 Lipofectamine 2000 (μg/μl) 以 1:1,1:2,1:3,2:1,2:2,2:3 的比例混合,按照 1.2 所述方法转染肝癌细胞,然后提取总 RNA,以 Actin-β 为内参照,以 Real-Time RT-PCR 检测 GAPDH 基因表达水平的变化,以抑制率最大时的比例为最佳比例。

1.4 在 mRNA 及蛋白水平检测 AFP 基因表达水平的变化

AFP 基因 mRNA 表达量的变化应用实时荧光定量 RT-PCR 法进行检测。总 RNA 提取采用 TRIZOL(上海生工),cDNA 的合成及 PCR 均采用 ABI 公司的反转录试剂盒及 Sybr Green Mastermix(Applied Biosystems)进行,所用仪器为 GeneAmp 5700 SDS。RT 反应体系为 100 μl;其中包括 10 μl 10 × TaqMan RT Buffer,22 μl 25 mmol/L MgCl₂,20 μl deoxyNTPs(2.5 mmol/L)混合物,Oligo d(T)₁₆(50 μmol/L)5 μl,RNase Inhibitor(20 U/μl)2 μl,MultiScribe™ Reverse Transcriptase(50 U/μl)2.5 μl,0.1~2 μg 总 RNA,加水至 100 μl。按 25℃ 10 min,48℃ 30 min,95℃ 5 min 的步骤合成 cDNA。PCR 反应体积为 25 μl,反应条件为 95℃ 10 min,95℃ 30 s,60℃ 1 min 共循环 50 个周期。本研究采用相对荧光定量 PCR 法检测 AFP 基因表达水平的变化,标准曲线由不经任何处理的数量大致相当的肝癌细胞经相同方法处理并合成 cDNA,然后十倍稀释,在相同条件下扩增而得,标本中基因的拷贝数可由标准曲线得出。各种引物(表 1)均设计在两个外显子相接处,以排除基因组 DNA 的污染。每一对引物均经过引物优化实验决定最佳引物浓度,PCR 扩增产物均经 3% 琼脂糖凝胶电泳检测确定无非特异性扩增。Actin-β 的上游引物为 5'-CGT ACC ACT GGC ATC GTG AT-3',下游引

[基金项目] 山东省自然科学基金项目(No. Z2003C01)

[通讯作者] 汪运山,E-mail: sdjnwys@163.com

物为: 5'-GTG TTG GCG TAC AGG TCT TTG-3';GAPDH 上游引为: 5'-CTT CAC CAC CAT GGA GAA GGC-3', 下游引物为:5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'; AFP 上游引物为: 5'-AAA TAC ATC CAG GAG AGC CA-3',下游引物为:5'-CTG AGC TTG GCA CAG ATC CT-3'。阴性对照组和实验组均取复孔。为了进一步在蛋白水平验证 AFP 基因表达水平的变化,在转染后 48 h, 应用 AXSYM(美国雅培)及配套的 AFP 定量检测试剂盒检测上清液中 AFP 蛋白表达的变化。阴性对照组及实验组均取 2 孔,取平均值。

1.5 MTT 实验

在转染后 8 h,胰酶消化收集细胞,调整细胞浓度为 1×10^5 /ml,于 96 孔板中每孔加入 100 μ l(即 1×10^4 个细胞),分别培养 0,24,48 和 72 h 后每孔加入 20 μ l MTT 液(5 mg/ml),继续培养 4 h 后,吸去上清液,加入 100 μ l DMSO 液,稍震荡待兰色溶解后,在全自动酶标仪上测定各孔 A₄₉₂。每个时间点测定 3 孔求平均值,以时间为横轴,以 A 值为纵轴绘制生长曲线。

1.6 流式细胞仪检测肿瘤细胞凋亡

在转染 12 h,24 h,48 h 及 72 h 后,应用 Annexin V-FITC 和 PI 双染色法检测肿瘤细胞凋亡。经胰酶消化收集细胞,用冷 PBS 洗 2 遍,然后用 $1 \times$ 结合缓冲液重悬细胞,调整细胞浓度为 1×10^6 细胞/ml,吸取 100 μ l(即 1×10^5 个细胞)加入一个新管中,分别加入 5 μ l PI 及 5 μ l Annexin V-FITC,轻轻混匀,置暗处 25 $^{\circ}$ C 孵育 15 min,然后加入 400 μ l 结合缓冲液,在 1 h 内以流式细胞仪分析肿瘤细胞凋亡。

2 结果与讨论

经荧光定量 RT-PCR 检测,当阳性对照质粒 pSilencer3.0-H1-gapdh 与 Lipofectamine2000 的比例为 1:2 时的抑制作用最为明显,其最高抑制率可达 60% 左右。按照该比例将 pSilencer 3.0 - H1-afp 与 Lipofectamine2000 混合,转染肝癌细胞。经荧光定量 RT-PCR 检测,实验组与对照组相比 AFP 基因表达水平下降了 34%,与阳性对照相比略低。在转染后 48 h,吸取实验组和对照组上清液,经检测,实验组与对照组相比 AFP 浓度明显减少,约 40% 左右,与 mRNA 的减少量大致相符。以上实验结果表明我们所构建质粒能明显的抑制 AFP 基因的表达。

MTT 实验表明质粒 pSilencer 3.0-H1-afp 与阴性对照质粒相比明显的抑制了肿瘤细胞的生长,并且在 32 h 时的抑制作用最为明显(图 1)。另外,我们在转染质

粒后 12 h,24 h,48 h 及 72 h,分别收集细胞检测肝癌细胞凋亡的比率,发现实验组与对照组相比均未见有明显的诱导凋亡现象。

图 1 MTT 法测定转染不同质粒后肝癌细胞的增殖曲线

综上所述,本研究通过构建发夹状 siRNAs 表达质粒,在肝癌细胞中明显的抑制了 AFP 基因的表达,并且发现抑制 AFP 基因表达后能明显的抑制肝癌细胞系 SMMC-7721 的增殖。但是本研究未发现抑制 AFP 基因表达能诱导肝癌细胞凋亡。这一点与应用反义核酸抑制 AFP 基因表达的实验结果不同^[1]。因本研究的转染效率仅为 30% 左右,并不能完全阻断培养皿中所有肿瘤细胞中 AFP 基因的表达,因此,上清液中存在的 AFP 蛋白可通过与肿瘤细胞表面的 AFP 受体相结合而抑制肿瘤细胞的凋亡。因此还需要通过进一步提高转染效率,对 AFP 基因的功能作进一步研究。

[关键词] RNA 干涉; AFP; 肿瘤; SMMC-7721; siRNA

[中图分类号] R730.2 [文献标识码] A

[参考文献]

[1] Wang XW, Yuan JH, Zhang RG, et al. Antihepatoma effect of alpha fetoprotein antisense phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides *in vitro* and in mice[J]. World J Gastroenterol, 2001, 7(3): 345-351.

[2] Sui G, Soohoo C, Affar el B, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(8): 5515-5520.

[3] 亓同钢,汪运山,王 芳,等. AFP 基因 siRNA 表达质粒的构建及鉴定[J]. 山东大学学报(医学版), 2004, 42(3): 353-354.

[收稿日期] 2004 - 04 - 05 [修回日期] 2004 - 08 - 18

[本文编辑] 王 莹,韩 丹