

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.03.010

siRNA 沉默 *RhoC* 表达诱导人肝癌 BEL7402 细胞凋亡

谢淑丽¹, 王广义¹, 吕国悦¹, 朱明光² (1. 吉林大学第一医院肝胆胰外科, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学白求恩医学院免疫学教研室, 吉林 长春 130041)

[摘要] 目的: 研究 siRNA 沉默 *RhoC* 基因表达对人肝癌细胞 BEL7402 凋亡的影响及其机制, 为肝癌的基因治疗提供实验依据。方法: 构建 *RhoC*-siRNA 真核表达载体 pU6mRFP *RhoC*-siRNA, 转染 BEL7402 细胞, 激光共聚焦显微镜检测转染效率, RT-PCR 和 Western blotting 鉴定 *RhoC* 基因沉默效果; 流式细胞术、琼脂糖凝胶电泳和瑞氏染色检测 BEL7402 细胞凋亡, RT-PCR 检测细胞凋亡相关基因 *Bcl-2* 和 *Bax* 的表达。结果: 成功构建 pU6mRFP *RhoC*-siRNA 重组载体, 转染 BEL7402 细胞的效率为 70%, RT-PCR 和 Western blotting 检测 *RhoC* 基因沉默效率分别为 85% 和 82%。pU6mRFP *RhoC*-siRNA 转染组 BEL7402 细胞凋亡显著高于未转染 BEL7402 细胞和 pU6mRFP Scramble-siRNA 转染组 BEL7402 细胞 [$(21.00 \pm 2.23)\%$ vs $(6.47 \pm 1.64)\%$ ($4.63 \pm 0.47\%$), $P < 0.01$], pU6mRFP *RhoC*-siRNA 转染组 BEL7402 细胞 DNA 呈典型的“梯状”条带, 瑞氏染色见转染组 BEL7402 细胞中有大量凋亡细胞。pU6mRFP *RhoC*-siRNA 转染组 BEL7402 细胞 *Bcl-2* 基因水平显著低于, 而 *Bax* 基因水平显著高于未转染 BEL7402 细胞和 pU6mRFP Scramble-siRNA 转染组 BEL7402 细胞 (0.28 ± 0.15 vs 0.96 ± 0.21 , 1.03 ± 0.24 , $P < 0.05$; 1.09 ± 0.21 vs 0.26 ± 0.10 , 0.25 ± 0.07 , $P < 0.01$)。结论: siRNA 沉默 *RhoC* 基因可诱导人肝癌 BEL7402 细胞凋亡, 其机制与下调 *Bcl-2* 基因、上调 *Bax* 基因表达有关。

[关键词] *RhoC* 基因; siRNA; 肝肿瘤; 凋亡

[中图分类号] R735.7; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)03-0290-06

siRNA silencing *RhoC* expression induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma BEL7402 cells

XIE Shu-li¹, WANG Guang-yi¹, LV Guo-yue¹, ZHU Ming-guang² (1. Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin, China; 2. Department of Immunology, Norman Bethune Medical College of Jilin University, Changchun 130041, Jilin, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of siRNA silencing *RhoC* expression on apoptosis in human hepatocellular carcinoma BEL7402 cells and the related mechanism, so as to provide an experimental evidence for liver cancer gene therapy. **Methods:** *RhoC*-siRNA eukaryotic vector pU6mRFP *RhoC*-siRNA was constructed and transfected into BEL7402 cells, and the transfection efficiency was examined by confocal microscope. RT-PCR and Western blotting analysis were conducted to identify the effect of *RhoC* gene silencing; flow cytometry, agarose gel electrophoresis and Wright staining were applied to detect apoptosis of BEL7402 cells; and the expression levels of apoptosis related genes were determined by RT-PCR. **Results:** The pU6mRFP *RhoC*-siRNA recombinant plasmid was successfully constructed, and its transfection efficiency in BEL7402 cells was 70%. RT-PCR and Western blotting analysis results showed that the silencing rate of *RhoC* were 85% and 82%, respectively. The apoptosis rate of BEL7402 cells in pU6mRFP *RhoC*-siRNA transfected group was significantly higher than those in untransfected and pU6mRFP Scramble-siRNA transfected groups [$(21.00 \pm 2.23)\%$ vs $(6.47 \pm 1.64)\%$, $(4.63 \pm 0.47)\%$, $P < 0.01$]. Typical apoptotic DNA “ladder” appeared in pU6mRFP *RhoC*-siRNA transfected BEL7402 cells in gel electrophoresis analysis, and Wright staining showed a lot of apoptotic BEL7402 cells in pU6mRFP *RhoC*-siRNA group. Compared with untransfected and pU6mRFP Scramble-siRNA transfected BEL7402 cells, *Bcl-2* gene expression in pU6mRFP *RhoC*-siRNA group was significantly decreased and *Bax* gene expression was significantly increased (0.28 ± 0.15 vs $0.96 \pm$

[作者简介] 谢淑丽(1963-),女,博士,副教授,主要从事肿瘤分子病理学方面的研究。E-mail: xieshuli6310@hotmail.com

[通信作者] 朱明光(ZHU Ming-guang, corresponding author), E-mail: zhumingguang@hotmail.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110531.1700.005.html>

0.21, 1.03 ± 0.24 , $P < 0.05$; 1.09 ± 0.21 vs 0.26 ± 0.10 , 0.25 ± 0.07 , $P < 0.01$). **Conclusion:** siRNA silencing *RhoC* gene expression can induce apoptosis in human hepatocellular carcinoma BEL7402 cells, which may be related to the down-regulated expression of *Bcl-2* gene and up-regulated expression of *Bax*.

[**Key words**] *RhoC* gene; siRNA; hepatocellular carcinoma; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(3): 290-295]

RhoC 基因是 Rho GTPase 亚家族中的一个重要成员,与其下游的信号分子相互作用,通过多种信号转导通路参与多种细胞生物学行为^[1]。*RhoC* 主要通过促进肌动蛋白细胞骨架重组及张力纤维和黏附斑形成,调节细胞变形、运动、迁移、吞噬、生长与增殖等过程^[2]。*RhoC* 在多种肿瘤细胞中高表达,尤其在高分转移性肿瘤中表达异常增多,有可能成为一种新的肿瘤标志物^[3]。裸鼠接种结肠癌细胞成瘤后,向瘤体局部注射携带靶向 *RhoA* 和 *RhoC* 的病毒载体沉默 *RhoA* 和 *RhoC* 基因表达,能够显著抑制移植瘤生长^[4]。*RhoC* 活性调节分子对肿瘤表型也有重要影响。P27 释放因子-Rho (P27 releasing factor-Rho, P27RF-Rho) 通过增加 *RhoA* 和 *RhoC* 分子活性使黑素瘤和纤维肉瘤细胞具有更强的侵袭性和转移能力^[5]。鸟苷酸交换因子 (guanine nucleotide exchange factor, GEF) 活化后增强 *RhoA* 和 *RhoC* 活性,促进胰腺癌、乳腺癌等生长、侵袭和转移^[6-8]。但 *RhoC* 高表达与肿瘤细胞凋亡之间的关系还未见报道。本实验以 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 方法沉默肝癌细胞中 *RhoC* 表达,研究 *RhoC* 在肝癌细胞凋亡中的作用,为肝癌基因治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株、载体和宿主菌

人肝癌细胞株 BEL7402 由本室保存;RNAi 真核表达载体 pU6mRFP 由吉林大学免疫学教研室保存,该载体由 pSilencer1.0-U6 和 pDsRed.N1 重组而成,携带红色荧光蛋白报告基因,含有氨苄西林抗性基因用于阳性克隆筛选;宿主菌大肠杆菌 JM109 由本室保存。

1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 DL2000 和 RT-PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司,质粒提取试剂盒和转染试剂盒购自德国 Qiagen 公司,各种抗体购自 Santa 公司,蛋白预染 Marker 购自北京华特生公司,Wright 粉购自美国 HARTMAN-LEDDON 公司 (Wright 染液由 Wright 粉 0.01 g 加甲醇 60 ml 配制)。激光共聚焦显微镜购自日本 Olympus 公司,凝胶成像仪购自美国 Beckman 公司,转膜仪购自美国

Bio-RAD 公司,流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.3 pU6mRFP *RhoC* -siRNA 载体构建

设计合成靶向 *RhoC* 的特异性 siRNA 片段 (上海生工公司合成)。*RhoC*-siRNA 干扰序列:5'-GAC-TATGATCGACTGCGGC-3',采用 BLAST 软件分析,*RhoC*-siRNA 片段仅与目的基因完全同源,排除其非特异性地抑制其他基因的可能;阴性对照序列:5'-GTTACCGTAGTTCGGTTC-3',命名为 Scramble-siRNA。合成的寡核苷酸片段梯度退火,形成双链。pU6mRFP 质粒用 *Apa* I 和 *Eco*R I 双酶切后形成与寡核苷酸双链连接位点,应用 T4 连接酶分别与 *RhoC*-siRNA 和 Scramble-siRNA 双链 DNA 连接。连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,在 Amp⁺ 平板上筛选重组质粒。质粒提取试剂盒提取重组质粒,*Hind* III 和 *Kpn* I 双酶切,酶切产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳鉴定阳性重组质粒,扩增阳性重组质粒细菌送上海生工公司测序鉴定。

1.4 pU6mRFP *RhoC*-siRNA 质粒转染 BEL7402 细胞

将处于对数生长期的 BEL7402 细胞接种于 6 孔培养板,待细胞长至 70% 融合时进行转染。3 μ g 载体 DNA 与 DMEM 培养基在 1.5 ml EP 管中混合,总体积 100 μ l;加 10 μ l 转染试剂,混匀后室温下放置 10 min;弃掉 6 孔板中培养液,PBS 洗涤 3 次,加入含血清和双抗的 DMEM 培养液 1.5 ml;向含转染试剂的 EP 管内加入含血清和双抗的 DMEM 培养液 0.6 ml,混匀后加入 6 孔板中。

1.5 RT-PCR 和 Western blotting 检测 pU6mRFP *RhoC*-siRNA 质粒基因沉默效果

1.5.1 RT-PCR 检测 RNAi 组 BEL7402 细胞转染 pU6mRFP *RhoC*-siRNA 质粒,阴性对照组 BEL7402 细胞转染 pU6mRFP Scramble-siRNA 质粒,未转染 BEL7402 细胞为空白对照组。转染细胞置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育 72 h,激光共聚焦显微镜检测转染效率。TRIzol 裂解各组 BEL7402 细胞抽提总 RNA,RT-PCR 检测 *RhoC* mRNA 的表达。*RhoC* 上游引物为 5'-ATGGCTGCAATCCGAAAGAAG-3',下游引物为 5'-TCAGAGAATGGGACAGCCCT-3';内参照 α -tubulin 上游引物为 5'-CACCCGTCT-TCAGGGCTTCTTGGTTT-3',下游引物为 5'-

CATTCACCATCTGGTTGGCTGGCTC-3'。退火温度均为 57 °C。*RhoC* 扩增 35 个循环, α -tublin 25 个循环。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5.2 Western blotting 检测 蛋白裂解液裂解细胞提取蛋白, Western blotting 检测 *RhoC* 蛋白表达。每组 30 μ g 蛋白上样, 12% SDS-PAGE 后恒流转膜 1.5 ~ 2 h, 5% 脱脂奶粉封闭过夜, 在 PVDF 膜上与 1:200 稀释的羊抗人 *RhoC* 抗体杂交 1 ~ 1.5 h, 加入 1:1 000 稀释的兔抗羊二抗, 42 °C 温浴 45 min, 按 ECL 试剂盒说明书曝光, X 线胶片感光拍照后灰度扫描。设 β -actin 为内参照。

1.6 流式细胞术检测 BEL7402 细胞凋亡

将对数生长期各组 BEL7402 细胞以 4×10^5 /孔接种于 6 孔板, 48 h 后收集 6 孔板中的各组细胞, 70% 乙醇 4 °C 固定过夜。上机检测前 PBS 洗涤 3 次, 加 RNase A 37 °C 作用 30 min, 然后加入 PI 染色 30 min。

1.7 琼脂糖凝胶电泳检测 BEL7402 细胞凋亡

取 1×10^6 个对数生长期的各组 BEL7402 细胞, PBS 洗涤 1 次, $9\ 668 \times g$ 离心 5 s, 弃上清。分别加 100 μ l 含 5 mol/L 异硫氰酸胍、100 mmol/L 2-巯基乙醇的 25 mmol/L 磷酸钠缓冲液和 50 μ l 含 7.5 mol/L 醋酸氨、0.8 mg/ml 糖原的水溶液, 混匀; 加入 300 μ l 100% 乙醇 4 °C 过夜; $9\ 668 \times g$ 离心 30 min, 弃上清, 75% 乙醇洗涤 2 次, 加 20 μ l 含 100 μ g/ml RNA 酶的 TE 缓冲液, 37 °C 30 min。加 10 μ l 甘油和少量溴酚蓝, 直接点样, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳过夜。紫外光下观测结果并拍照。

1.8 瑞氏染色检测 BEL7402 细胞凋亡

收集约 1×10^6 个 BEL7402 细胞, PBS 洗涤 1 次; 用细胞涂片机制成细胞涂片; 甲醇固定 3 ~ 5 min, 瑞氏液染色 2 min, 加入 Wright 磷酸缓冲稀释液(Wright 染色液 10 ml 加磷酸缓冲液 20 ml 配制) 染色 4 ~ 10 min, 用蒸馏水冲洗。直立晾干后, 中性树脂封固, 镜下观察细胞凋亡。

1.9 RT-PCR 法检测细胞凋亡相关基因

用 TRIzol 裂解生长旺盛的各组细胞, 提取细胞总 RNA 后进行 RT-PCR 检测。凋亡相关基因 *Bax* 上游引物为 AGGTCTTTTCCGAGTGGCAGC, 下游引物为 CCCGAGGAAGTCCAATGTCC; 凋亡相关基因 *Bcl-2* 上游引物为 GACTTCGCCGAGATGTCCAG, 下游引物为 GTGCAGGTGCCGTTTCAGG。退火温度均为 55 °C, 扩增循环次数为 30 个循环。 α -tublin 为内参照, 其引物序列、退火温度及循环次数同 *RhoC*。

1.10 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS13.0 软件统计分析, 样本显著性分析组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pU6mRFP *RhoC*-siRNA 重组质粒的鉴定

空载体 pU6mRFP 经 *Hind* III 和 *Kpn* I 双酶切后得到两条电泳带, 其短片段长度在 250 ~ 500 bp 之间, 与预期结果相符。因 *Hind* III 酶切位点在连接过程中被插入失活, 故重组质粒 pU6mRFP *RhoC*-siRNA 和 pU6mRFP siRNA-Scramble 经 *Hind* III 和 *Kpn* I 双酶切后只有一条电泳带, 表明合成的 *RhoC*-siRNA 片段和 Scramble-siRNA 片段退火后, 均与 pU6mRFP 载体连接成功, 构成 pU6mRFP *RhoC*-siRNA 和 pU6mRFP siRNA-Scramble 重组质粒(图 1)。

将含重组质粒的菌液扩增后送上海生工公司测序, 结果证实载体中的插入片段与所设计的寡核苷酸片段序列完全一致, 表明插入载体碱基片段准确无误, 重组质粒构建成功。

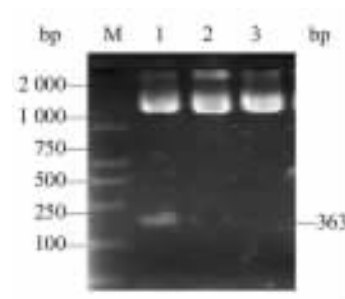


图 1 *Hind* III、*Kpn* I 双酶切鉴定 pU6mRFP *RhoC*-siRNA 质粒

Fig. 1 Identification of pU6mRFP *RhoC*-siRNA plasmid by *Hind* III and *Kpn* I double digestion

M: DNA marker; 1: pU6mRFP; 2: pU6mRFP *RhoC*-siRNA; 3 pU6mRFP Scramble-siRNA

2.2 pU6mRFP *RhoC*-siRNA 质粒转染效果鉴定

激光共聚焦显微镜检测可见, 转染 pU6mRFP *RhoC*-siRNA 和 pU6mRFP Scramble-siRNA 质粒的 BEL7402 细胞出现红色荧光, 系 pU6mRFP 载体中红色荧光蛋白表达。初步估算两组细胞转染效率都在 70% 以上, 说明载体转染效果良好(图 2)。

2.3 pU6mRFP *RhoC*-siRNA 沉默 BEL7402 细胞中 *RhoC* mRNA 的表达

pU6mRFP *RhoC*-siRNA 转染组 BEL7402 细胞中, *RhoC* 基因表达与未转染和 pU6mRFP Scramble-siRNA 对照转染组相比受到显著抑制(0.19 ± 0.08)。

vs $1.31 \pm 0.12, 1.23 \pm 0.14, P < 0.01$), 与对照转染组 BEL7402 细胞相比抑制效率达 85%, 两对照组之间比较无显著差异 ($P > 0.05$, 图 3); 各组内参照基因均表达正常。

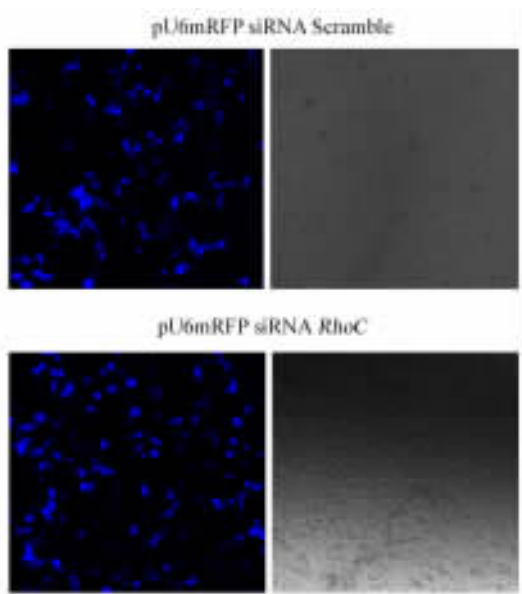


图 2 激光共聚焦显微镜检测质粒转染效率 ($\times 100$)
Fig. 2 Plasmid transfection efficiency detected by laser cofocal microscope ($\times 100$)

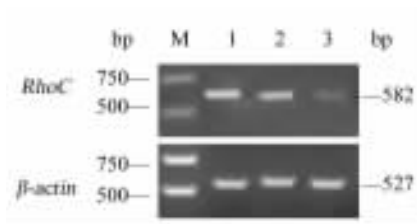


图 3 RT-PCR 检测 pU6mRFP *RhoC*-siRNA 沉默 BEL7402 细胞中 *RhoC* mRNA 的表达 ($n = 3$)
Fig. 3 pU6mRFP *RhoC*-siRNA silenced *RhoC* mRNA expression in BEL7402 cells as detected by RT-PCR ($n = 3$)
M: DNA marker; 1: Untransfected BEL7402 cells;
2: pU6mRFP Scramble-siRNA transfected BEL7402 cells;
3: pU6mRFP *RhoC*-siRNA transfected BEL7402 cells

2.4 pU6mRFP *RhoC*-siRNA 沉默 BEL7402 细胞中 *RhoC* 蛋白的表达

Western blotting 检测结果(图 4)显示:*RhoC* 蛋白在 pU6mRFP *RhoC*-siRNA 组 BEL7402 细胞中表达显著低于未转染 BEL7402 细胞和 pU6mRFP Scramble-siRNA 对照组 BEL7402 细胞 (0.15 ± 0.03 vs $0.84 \pm 0.11, 0.83 \pm 0.10$, 均 $P < 0.01$), 与转染对照组相比抑制率为 82%; 各组内参照蛋白表达均良

好。此结果与 RT-PCR 结果相互印证, 进一步验证所构建的 pU6mRFP *RhoC*-siRNA 载体具有良好的 *RhoC* 基因沉默性能, 可用于后续实验研究。

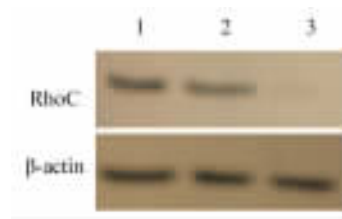


图 4 Western blotting 检测 pU6mRFP *RhoC*-siRNA 转染后 BEL7402 细胞中 *RhoC* 蛋白的表达 ($n = 3$)
Fig. 4 *RhoC* protein expression in BEL7402 cells after pU6mRFP siRNA-*RhoC* transfection as detected by Western blotting analysis ($n = 3$)

1: Untransfected BEL7402 cells; 2: pU6mRFP Scramble-siRNA transfected BEL7402 cells; 3: pU6mRFP *RhoC*-siRNA transfected BEL7402 cells

2.5 pU6mRFP *RhoC*-siRNA 转染诱导 BEL7402 细胞凋亡

FACS 检测 pU6mRFP *RhoC*-siRNA 转染后 BEL7402 细胞的凋亡, 结果显示: pU6mRFP *RhoC*-siRNA 转染组 BEL7402 细胞凋亡率显著高于未转染 BEL7402 细胞和 pU6mRFP Scramble-siRNA 转染对照组 BEL7402 细胞 [$(21.00 \pm 2.23)\%$ vs $(6.47 \pm 1.64)\%$, $(4.63 \pm 0.47)\%$, 均 $P < 0.01$], 两对照组之间无显著差别 ($P > 0.05$)。

pU6mRFP *RhoC*-siRNA 转染组 BEL7402 细胞 DNA 在凝胶电泳中呈典型的“梯状”条带, 说明该组有大量细胞发生凋亡, 凋亡细胞的 DNA 降解为 180 ~ 200 bp 或其多聚体组成的寡核苷酸片段, 呈现“梯状”条带; 未转染 BEL7402 和 pU6mRFP Scramble-siRNA 转染对照组 BEL7402 细胞 DNA 分子基因组条带位于加样孔附近, 未见“梯状”条带出现(图 5)。

图 6 可见, 未转染 BEL7402 细胞和 pU6mRFP Scramble-siRNA 转染对照组 BEL740 细胞瑞氏染色均一; pU6mRFP *RhoC*-siRNA 转染组 BEL7402 细胞瑞氏染色见有大量凋亡细胞, 核固缩、碎裂、染色明显加深, 胞膜皱折、卷曲。表明 *RhoC* 基因沉默导致 BEL7402 细胞凋亡增加。

2.6 pU6mRFP *RhoC*-siRNA 转染诱导细胞凋亡相关基因的变化

图 7 显示了 pU6mRFP *RhoC*-siRNA 转染引起的 BEL7402 细胞凋亡相关基因的变化。pU6mRFP

Scramble-siRNA 转染组 BEL7402 细胞 *Bcl-2* 基因表达水平与未转染 BEL7402 细胞和 pU6mRFP Scramble-siRNA 转染对照组 BEL7402 细胞相比显著下降 (0.28 ± 0.15 vs 0.96 ± 0.21 , 1.03 ± 0.24 , 均 $P < 0.05$); pU6mRFP Scramble-siRNA 转染组的 *Bax* 基因表达显著高于未转染 BEL7402 细胞和 pU6mRFP Scramble-siRNA 转染对照组 BEL7402 细胞 (1.09 ± 0.21 vs 0.26 ± 0.10 , 0.25 ± 0.07 , 均 $P < 0.01$)。未转染 BEL7402 和阴性对照组 BEL7402 细胞中 *Bcl-2* 和 *Bax* 基因表达水平未发现显著性差异 ($P > 0.05$)。各细胞组内参照基因均表达良好。

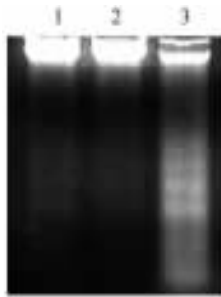


图 5 琼脂糖凝胶电泳检测各组 BEL7402 细胞凋亡的 DNA“梯状”条带

Fig. 5 Apoptotic DNA ladder of BEL7402 cells in different groups detected by agarose electrophoresis

1: Untransfected BEL7402 cells; 2: pU6mRFP Scramble-siRNA transfected BEL7402 cells; 3: pU6mRFP *RhoC*-siRNA transfected BEL7402 cells

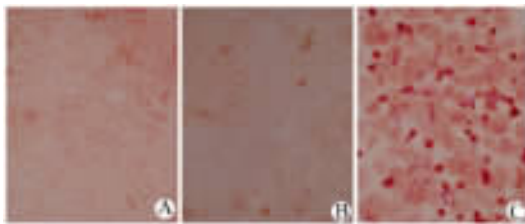


图 6 瑞氏染色检测各组 BEL7402 细胞的凋亡 (×400)

Fig. 6 Apoptosis of BEL7402 cells in different groups as detected by Wright staining (×400)

A: Untransfected; B: pU6mRFP Scramble-siRNA; C: pU6mRFP *RhoC*-siRNA

3 讨论

RNA 干扰是由双链 RNA 介导、特定酶参与的特异性基因沉默现象。它通过人为引入与内源靶基因具有相同序列的双链 RNA, 诱导内源靶基因 mRNA 降解, 使细胞特定基因表型缺失。这种方法目前已经成为基因功能研究的一个重要手段^[9]。肿

瘤的发生是多种基因突变累积以及相互作用的结果, 这些突变基因的差异表达不仅是决定肿瘤恶性表型多样性的分子基础, 还是肿瘤细胞逃避免疫监视和抵抗肿瘤靶向治疗的重要原因^[10]。*RhoC* 是 Ras 超家族小分子量 G 蛋白, 是 Rho/ROCK 信号传导通路中的主要信号分子。诸多研究^[11-14]表明, *RhoC* 在多种肿瘤中高表达, 特别是在恶性程度高、转移性强的肿瘤中表达更高, 是维持肿瘤细胞生物学特性的关键分子之一。凋亡肿瘤的发生与细胞凋亡的调节紊乱有密切关系; 细胞凋亡对癌症的发生起负调控作用^[15]。本实验利用 RNAi 方法沉默人肝癌细胞 BEL7402 细胞中 *RhoC* 基因, 以研究 *RhoC* 在肿瘤细胞凋亡中的作用。

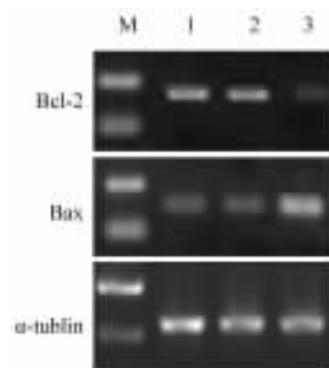


图 7 RT-PCR 检测各组 BEL7402 细胞凋亡相关基因 mRNA 的表达水平 (n=3)

Fig. 7 Expressions of cell apoptosis associated gene in different BEL7402 cell groups as detected by RT-PCR (n=3)

M: DNA marker; 1: Untransfected BEL7402 cells; 2: pU6mRFP Scramble-siRNA transfected BEL7402 cells; 3: pU6mRFP *RhoC*-siRNA transfected BEL7402 cells

实验中构建的 pU6mRFP *RhoC*-siRNA 载体携带红色荧光报告基因, 在共聚焦显微镜下可直观地观测转染效果。RT-PCR 和 Western blotting 检测 *RhoC* 表达均证实, 与转染对照组相比, pU6mRFP *RhoC*-siRNA 转染组 BEL7402 细胞的 *RhoC* 表达受到显著抑制。FACS 检测显示, *RhoC* 沉默导致 BEL7402 细胞凋亡显著增加, 琼脂糖凝胶电泳可见 BEL7402 细胞出现典型的凋亡特征性 DNA ladder 条带, 瑞氏染色在形态学上证实 *RhoC* 沉默导致大量肝癌 BEL7402 细胞凋亡。

RT-PCR 检测细胞凋亡相关基因表达, 揭示 *RhoC* 沉默诱导肝癌细胞凋亡的分子基础。尽管 *RhoC* 在肿瘤中的作用受到高度重视, 但过去的研究多集中在 *RhoC* 调控肿瘤细胞侵袭和转移方面, 而

对 *RhoC* 是否在维持肿瘤细胞永生生化生长中发挥作用知之甚少^[1,3,16]。快速生长是肿瘤细胞的重要特性之一,维持细胞快速生长的因素主要包括两个方面,一是细胞的增殖速度加快,二是细胞凋亡减少。有研究^[17]发现 *RhoC* 高表达是维持胆管癌细胞快速增殖的必要条件,抑制 *RhoC* 基因表达可以显著降低肿瘤细胞增殖速度。也有研究^[18]报道,*RhoA* 和 *RhoC* 转染食道鳞癌细胞可以增强肿瘤细胞增殖及侵袭能力;*RhoA* 高表达对细胞增殖影响较大,*RhoC* 高表达对细胞侵袭及转移有更大影响。本实验从多方面证实 *RhoC* 是维持肝癌细胞生存所必需的基因,提示靶向 *RhoC* 不仅能够抑制肝癌细胞侵袭和转移,还能够促进细胞凋亡。尽管本实验发现 *RhoC* 对 *Bcl-2* 和 *Bax* 等凋亡基因有影响,但关于 *RhoC* 高表达抑制肝癌细胞凋亡的分子机制尚有待深入研究。*RhoC* 与一些信号通路如 Notch、MAPK 及 PI3K/AKT 等有密切联系,这些信号通路都与细胞生长及凋亡关系密切^[19-21]。因此,阐明 *RhoC* 与其他信号通路之间的联系有可能成为 *RhoC* 的未来研究方向。

综上所述,本实验通过构建 pU6mRFP *RhoC*-siRNA 载体沉默肝癌细胞 *RhoC* 基因表达,发现 *RhoC* 沉默可诱导肝癌细胞 BEL7402 大量凋亡,其分子机制涉及凋亡相关基因 *Bcl-2* 表达抑制和 *Bax* 表达增强,提示 *RhoC* 有可能成为肝癌生物治疗的良好分子靶点,为深入研究 *RhoC* 在肝癌中所扮演的角色及未来靶向 *RhoC* 的肝癌生物治疗奠定了必要的实验基础。

[参 考 文 献]

- [1] Tang Y, Olufemi L, Wang MT, et al. Role of Rho GTPases in breast cancer [J]. *Front Biosci*, 2008, 13(2): 759-776.
- [2] Narumiya S, Tanji M, Ishizaki T. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2009, 28(1/2): 65-76.
- [3] Islam M, Lin G, Brenner JC, et al. RhoC expression and head and neck cancer metastasis [J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(11): 1771-1780.
- [4] Wang H, Zhao G, Liu X, et al. Silencing of RhoA and RhoC expression by RNA interference suppresses human colorectal carcinoma growth *in vivo* [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29(1): 1-7.
- [5] Hoshino D, Koshikawa N, Seiki M. A p27(kip1)-binding protein, p27RF-Rho, promotes cancer metastasis via activation of RhoA and RhoC [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(4): 3139-3148.
- [6] Hamel B, Monaghan BE, Rojas RJ, et al. SmgGDS is a guanine nucleotide exchange factor that specifically activates RhoA and RhoC [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(14): 12141-12148.
- [7] Dietrich KA, Schwarz R, Liska M, et al. Specific induction of migration and invasion of pancreatic carcinoma cells by RhoC, which differs from RhoA in its localisation and activity [J]. *Biol Chem*, 2009, 390(10): 1063-1077.
- [8] Wu D, Asiedu M, Wei Q. Myosin-interacting guanine exchange factor (MyoGEF) regulates the invasion activity of MDA-MB-231 breast cancer cells through activation of RhoA and RhoC [J]. *Oncogene*, 2009, 28(22): 2219-2230.
- [9] Ashihara E, Kawata E, Maekawa T. Future prospect of RNA interference for cancer therapies [J]. *Curr Drug Targets*, 2010, 11(3): 345-360.
- [10] Schäfer R, Schramme A, Tchernitsa OI, et al. Oncogenic signaling pathways and deregulated target genes [J]. *Recent Results Cancer Res*, 2007, 176(1): 7-24.
- [11] Boone B, Van Gele M, Lambert J, et al. The role of RhoC in growth and metastatic capacity of melanoma [J]. *J Cutan Pathol*, 2009, 36(6): 629-636.
- [12] Wang W, Wu F, Fang F, et al. Inhibition of invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells via targeting RhoC *in vitro* and *in vivo* [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(21): 6804-6812.
- [13] Iiizumi M, Bandyopadhyay S, Pai SK, et al. RhoC promotes metastasis via activation of the Pyk2 pathway in prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(18): 7613-7620.
- [14] Abe H, Kamai T, Tsujii T, et al. Possible role of the RhoC/ROCK pathway in progression of clear cell renal cell carcinoma [J]. *Biomed Res*, 2008, 29(3): 155-161.
- [15] Ullmannova BV, Guan M, Zhou X, et al. DLCL1 tumor suppressor gene inhibits migration and invasion of multiple myeloma cells through RhoA GTPase pathway [J]. *Leukemia*, 2009, 23(2): 383-390.
- [16] Liu N, Zhang G, Bi F, et al. RhoC is essential for the metastasis of gastric cancer [J]. *J Mol Med*, 2007, 85(10): 1149-1156.
- [17] Shi Z, Chen ML, He QL, et al. Antisense RhoC gene suppresses proliferation and invasion capacity of human QBC939 cholangiocarcinoma cells [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2007, 6(5): 516-520.
- [18] Faried A, Faried LS, Kimura H, et al. RhoA and RhoC proteins promote both cell proliferation and cell invasion of human oesophageal squamous cell carcinoma cell lines *in vitro* and *in vivo* [J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(10): 1455-1465.
- [19] Srivastava S, Ramdass B, Nagarajan S, et al. Notch1 regulates the functional contribution of RhoC to cervical carcinoma progression [J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(1): 196-205.
- [20] van Golen KL, Bao LW, Pan Q, et al. Mitogen activated protein kinase pathway is involved in RhoC GTPase induced motility, invasion and angiogenesis in inflammatory breast cancer [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2002, 19(4): 301-311.
- [21] Ruth MC, Xu Y, Maxwell IH, et al. RhoC promotes human melanoma invasion in a PI3K/Akt-dependent pathway [J]. *J Invest Dermatol*, 2006, 126(4): 862-868.

[收稿日期] 2011 - 03 - 10

[修回日期] 2011 - 04 - 18

[本文编辑] 韩 丹