

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.01.013

· 基础研究 ·

靶向 *GRP78* 的 miRNA 表达载体对人食管癌 EC109 细胞增殖的抑制作用

李洪标¹, 郭益添¹, 黄官友², 冯家琳³, 蒲泽锦¹, 吴灵飞¹(1. 汕头大学医学院附属第二医院 消化内科, 广东 汕头 515041; 2. 汕头大学医学院附属第二医院 妇产科, 广东 汕头 515041; 3. 汕头大学医学院附属第二医院 信息科, 广东 汕头 515041)

[摘要] **目的:** 探讨靶向葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78, *GRP78*) 基因的 miRNA 真核表达质粒, 对人食管癌 EC109 细胞增殖的影响。**方法:** 设计合成 4 对针对 *GRP78* 的特异性 miRNA 干扰序列和 1 对阴性对照序列, 定向克隆至 pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR 真核表达载体上, 构建靶向 *GRP78* 的 miRNA 重组质粒: pcDNATM6.2-miR78-1、pcDNATM6.2-miR78-2、pcDNATM6.2-miR78-3、pcDNATM6.2-miR78-4, 并通过脂质体法转染至 HEK293 细胞; 杀稻瘟菌素筛选 2 周形成稳定转染细胞系; 荧光显微镜检测转染效率。将筛选出的最佳干扰质粒转染至 EC109 细胞, 采用 RT-PCR 法检测 *GRP78* mRNA 的表达, CCK8 法检测其对 EC109 细胞增殖的影响。**结果:** 测序结果表明成功构建 4 种靶向 *GRP78* 的 miRNA 重组质粒, 经转染和筛选, 所有转染后 HEK293 细胞均有 GFP 的表达; 与未转染组及阴性对照组 (pcDNATM6.2-Ctrl) 相比, 4 种干扰质粒组 HEK293 细胞中 *GRP78* mRNA 的表达均下降 ($P < 0.05$); 干扰效率以转染 pcDNATM6.2-miR78-1 为最高。pcDNATM6.2-miR78-1 转染 EC109 细胞, 与未转染组、pcDNATM6.2-Ctrl 组相比, EC109 细胞中 *GRP78* mRNA 的表达明显下降 [(0.38 ± 0.02) vs (1.03 ± 0.04) 、 (1.00 ± 0.03)], 均 $P < 0.05$ 。CCK8 法检测结果显示, 转染 pcDNATM6.2-miR78-1 干扰质粒 12、24、48、72 h 后, EC109 细胞的增殖被显著抑制 [(0.028 ± 0.001) vs (0.086 ± 0.010) 、 (0.035 ± 0.003) vs (0.155 ± 0.011) 、 (0.112 ± 0.009) vs (0.389 ± 0.008) 、 (0.169 ± 0.013) vs (0.433 ± 0.009)]; 均 $P < 0.05$ 。**结论:** 4 对靶向 *GRP78* 的 miRNA 表达载体构建成功, 其中 pcDNATM6.2-miR78-1 干扰质粒沉默效果最佳, 能有效抑制 EC109 细胞的增殖。

[关键词] 食管癌; EC109 细胞; 葡萄糖调节蛋白 78 (*GRP78*); miRNA; RNA 干扰; HEK293 细胞

[中图分类号] R735.1; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)01-0075-07

Inhibitory effect of miRNA expression vector targeting *GRP78* on proliferation of human esophageal carcinoma EC109 cells

Li Hongbiao¹, Guo Yitian¹, Huang Guanyou², Feng Jialin³, Pu Zejin¹, Wu Lingfei¹(1. Department of Gastroenterology, Affiliated Second Hospital, Medical College of Shantou University, Shantou 515041, Guangdong, China; 2. Department of Gynaecology and Obstetrics, Affiliated Second Hospital, Medical College of Shantou University, Shantou 515041, Guangdong, China; 3. Department of Information, Affiliated Second Hospital, Medical College of Shantou University, Shantou 515041, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of miRNA eukaryotic expression vector targeting glucose regulated protein 78 (*GRP78*) gene on proliferation of human esophageal carcinoma EC109 cells. **Methods:** Four pairs of specific miRNA interference sequences targeting *GRP78* gene and one pair of negative control sequence were designed and synthesized. The recombinant plasmids of miRNA targeting *GRP78*, pcDNATM6.2-miR78-1, pcDNATM6.2-miR78-2, pcDNATM6.2-miR78-3 and pcDNATM6.2-miR78-4, were constructed using pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR eukaryotic expression vector, and were transfected into HEK293 cells by lipofectamine. After the treatment with blasticidin for two weeks, the stably transfected HEK293 cells were obtained. The transfection efficiency was observed by fluorescence microscopy. The best interference plasmid was then selected and transfected into EC109 cells. The expression of *GRP78* mRNA and the proliferation of EC109 cells were detected by RT-PCR and CCK-8 assay, respectively. **Results:** Sequencing results indicated that

[基金项目] 国家自然科学基金资助 (No. 30972925)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30972925)

[作者简介] 李洪标 (1985 -), 男, 硕士, 主要从事消化系统肿瘤方面的研究。E-mail: hongbiaoli@126.com

[通信作者] 吴灵飞 (Wu Lingfei, corresponding author), E-mail: lingfeiwu@21cn.com

four recombinant plasmids of miRNA targeting *GRP78* were successfully constructed. After transfection and screening, the expression of GFP was observed in all transfected HEK293 cells. The expression of *GRP78* mRNA in HEK293 cells transfected with all the four interference plasmids was decreased ($P < 0.05$), comparing with the untransfected or negative control group (pcDNATM6.2-Ctrl), in which the highest interference efficiency was observed in pcDNATM6.2-miR78-1 group. After pcDNATM6.2-miR78-1 transfection, the expression of *GRP78* mRNA in EC109 cells was significantly decreased compared with the untransfected group and the pcDNATM6.2-Ctrl group ($[0.38 \pm 0.02]$ vs $[1.03 \pm 0.04]$, $[1.00 \pm 0.03]$, $P < 0.05$), respectively. CCK8 assay showed that EC109 cell proliferation was significantly suppressed after pcDNATM6.2-miR78-1 transfection in 12, 24, 48, 72 h ($[0.028 \pm 0.001]$ vs $[0.086 \pm 0.010]$, $[0.035 \pm 0.003]$ vs $[0.155 \pm 0.011]$, $[0.112 \pm 0.009]$ vs $[0.389 \pm 0.008]$, $[0.169 \pm 0.013]$ vs $[0.433 \pm 0.009]$; $P < 0.05$).

Conclusion: Four pairs of miRNA expression vectors targeting *GRP78* gene are successfully constructed, in which pcDNATM6.2-miR78-1 shows the best gene silencing efficiency and efficiently inhibits the proliferation of EC109 cells.

[**Key words**] esophageal carcinoma; EC109 cell; *GRP78*; miRNA; RNA interference; HEK293 cell

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(1): 75-81]

葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78, *GRP78*), 又称免疫球蛋白重链结合蛋白 (immunoglobulin heavy chain binding protein, *Bip*), 在内质网中蛋白质合成的质量控制、 Ca^{2+} 稳态的调节中扮演着极其重要的角色^[1]。研究^[2]表明, 当机体出现缺氧、氨基酸剥夺、蛋白质错误折叠、 Ca^{2+} 稳态失调、胆固醇合成受限等多种异常情况时, 细胞将启动内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, *ERS*) 反应, 以应对异常的生存环境, 而 *GRP78* 在 *ERS* 通路中扮演重要角色。同时, *GRP78* 高表达于多种肿瘤细胞中, 对于肿瘤细胞逃离内质网应激和承受高负荷的生存环境和蛋白质合成的压力有着重要的作用^[1]。既往研究^[2-3]表明, 腺苷 (adenosine) 为一种重要的细胞代谢产物, 对多种肿瘤细胞起着诱导凋亡的作用。本课题组前期研究^[4-5]证实, 腺苷可以诱导人类肝癌 HepG2 细胞凋亡, 并与内质网通路相关, *GRP78* 参与此信号过程。然而, 在上述凋亡通路中 *GRP78* 的具体功能, 目前尚知之甚少。

RNA 干扰 (RNA interference, *RNAi*) 基因沉默为下调目的基因表达的有效方法^[6]。微小 RNA (microRNA, *miRNA*) 是一种更为有效的 *RNAi* 手段^[7]。因此, 本实验借助于 *RNAi* 技术, 针对 *GRP78* 目的基因, 设计并构建干扰载体, 探讨其对食管癌 EC109 细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

HEK293 细胞、EC109 细胞、DMEM、LipofectamineTM-2000、OPTI-MEM 培养基购自美国 Invitrogen 公司, 胎牛血清购自美国 Clark Bio 公司, 杀稻瘟菌素

(Blasticidin S HCl) 购自德国 AppliChem 公司, LB 培养基、琼脂糖购自上海生工生物公司, 壮观霉素 (spectinomycin) 购自 Sigma 公司。载体构建试剂盒 BLOCK-iTTM Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP 购自美国 Invitrogen 公司。无内毒素质粒抽提试剂盒购自美国 Omega 公司; 总 RNA 提取试剂盒购自北京天根公司; 逆转录试剂盒 (Easy-Script First-Strand cDNA Synthesis SuperMix)、PCR 试剂盒 (2 × EasyTaq PCR SuperMix) 购自北京全式金公司, CCK8 试剂盒购自上海碧云天公司。PCR 引物均由上海基康生物公司合成。

1.2 靶向 *GRP78* 的表达载体的构建及鉴定

根据靶基因人 *GRP78* mRNA 序列 (GeneID: 3309), 设计并合成 4 对 *miRNA* 寡核苷酸 (oligonucleotide, oligo) 片段, 同时设计并合成 1 对阴性对照 oligo 序列 (表 1), 以上核苷酸分子由上海 Invitrogen 公司合成。载体构建方法如下: (1) Oligo 退火形成双链: 将 oligo 溶解成 100 $\mu\text{mol/L}$, 互补单链各取 5 μl 混合, 混合物在 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min, 放置室温自然冷却 20 min, 形成双链 oligo; (2) 使用载体构建试剂盒进行重组克隆: 将 4 对双链的 *miRNA* oligo 和 1 对阴性 *miRNA* oligo 分别插入到 *miRNA* 表达载体 pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR; 连接后转化感受态细胞 DH5 α , 接种至 LB 琼脂培养基中, 摇菌提取质粒进行测序。将已鉴定正确的 pcDNATM6.2-miR78-1、pcDNATM6.2-miR78-2、pcDNATM6.2-miR78-3、pcDNATM6.2-miR78-4 及 pcDNATM6.2-Ctrl 共 5 个 *miRNA* 干扰质粒在 DH5 α 中扩增, 用无内毒素质粒抽提试剂盒抽提质粒, 待转染到 HEK293 细胞。

表 1 RT-PCR 检测用 *GRP78* 引物
Tab. 1 Primers used to detect *GRP78* by RT-PCR

Primer	Sequence
miR78-1	
forward	5'-TGCTGACCAGTTGCTGAATCTTTGGAGTTTTGGCCACTGACTGACTCCAAAAGACAGCAACTGGT-3'
reverse	5'-CCTGACCAGTTGCTGTCTTTGGAGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTCCAAAGATTCAGCAACTGGTC-3'
miR78-2	
forward	5'-TGCTGATCAAATGTACCCAGAAGATGGTTTTGGCCACTGACTGACCATCTTCTGTACATTTGAT-3'
reverse	5'-CCTGATCAAATGTACAGAAGATGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCATCTTCTGGGTACATTTGATC-3'
miR78-3	
forward	5'-TGCTGTCTCAAAGGTGACTTCAATCTGTTTTGGCCACTGACTGACAGATTGAACACCTTTGAGA-3'
reverse	5'-CCTGTCTCAAAGGTGTTCAATCTGTCAAGTCAGTGGCCAAAACAGATTGAAGTCACCTTTGAGAC-3'
miR78-4	
forward	5'-TGCTGAGAAGAGACACATCGAAGGTTGTTTTGGCCACTGACTGACAACTTCGGTGTCTCTTCT-3'
reverse	5'-CCTGAGAAGAGACACCGAAGGTTGTCAGTCAGTGGCCAAAACAACCTTCGATGTGTCTCTTCTC-3'
18S	
forward	5'-TGCTGAAATGTACTGCGGTGGAGACGTTTTGGCCACTGACTGACGTCTCCACGCAGTACATTT-3'
reverse	5'-CCTGAAATGTACTGCGGTGGAGACGTCAGTCAGTGGCCAAAACGTCTCCACGCAGTACATTTTC-3'

1.3 HEK293 的细胞培养与质粒转染

HEK293 细胞于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 37 °C、95% 湿度和 5% CO₂ 常规培养, 0.05% 胰蛋白酶、0.02% EDTA 消化细胞, 每 2~3 d 传代一次。细胞转染质粒用 Lipofectamine™ 2000 试剂盒。转染前 1 d 换液, 取对数生长期的 HEK293 细胞按 5 × 10⁵/孔接种于 6 孔板。待细胞长满约 80% 时开始转染, 按 Lipofectamine™ 2000 试剂盒说明书进行。PBS 洗涤 6 孔板, 取 500 μl Opti-MEM 减血清培养基 (reduced serum medium modification of MEM) 混匀, 10 μl Lipofectamine™ 2000 孵育 5 min, 取 500 μl Opti-MEM 溶解 4 μg 干扰质粒, 将两种混合液混匀, 室温下孵育 30 min, 加入到 6 孔板中继续培养 6 h 后, 更换成 DMEM 培养基, 24 h 后消化转入 25 cm² 的培养瓶扩大培养, 48 h 后使用 6 μg/ml 杀稻瘟菌素作为药物稳定筛选, 每 2~3d 换液, 在荧光显微镜下观察 GFP 表达情况。

1.4 RT-PCR 检测 *GRP78* mRNA 的表达

分别转染干扰质粒 pcDNA™ 6.2-miR78-1、pcDNA™ 6.2-miR78-2、pcDNA™ 6.2-miR78-3、pcDNA™ 6.2-miR78-4 以及阴性对照质粒的 HEK293 细胞的 5 组稳定细胞系形成后, 以未转染的 HEK293 细胞作为空白对照, 分别取 5 × 10⁵ 个细胞

接种于 6 孔板上, 贴壁生长后提取总 RNA, 操作步骤按天根公司总 RNA 提取试剂盒说明书进行。取 1 μg 总 RNA 作模板逆转录合成 cDNA。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 25 个循环, 72 °C 终末延伸 5 min。取 PCR 产物 5 μl, 电泳结果采用凝胶成像系统拍照并保存, 并分析各电泳条带相对灰度值, 计算不同干扰组 *GRP78* mRNA 的表达水平, 以评价并筛选最具干扰效应的干扰质粒。

1.5 CCK8 法检测最佳干扰载体瞬时转染对 EC109 细胞增殖的影响

EC109 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 37 °C、95% 湿度和 5% CO₂, 0.25% 胰蛋白酶、0.02% EDTA 消化细胞, 每 2~3 d 传代。转染前 1 d 换液, 取对数生长期的 EC109 细胞按 5 × 10⁵/孔接种于 6 孔板。待细胞长满约 80% 时开始转染, 按 Lipofectamine™ 2000 试剂盒说明书进行, PBS 洗涤 6 孔板, 取 500 μl Opti-MEM 混匀 10 μl Lipofectamine™ 2000 孵育 5 min, 取 500 μl Opti-MEM 溶解 4 μg 干扰质粒, 将两种混合液混匀, 室温下孵育 30 min, 加入到 6 孔板中继续培养 6 h 后, 更换成 DMEM 培养基。CCK8 法检测细胞增殖: 细胞按 5 × 10³/孔接种至 96 孔板, 分为只含培养基的空白

对照组, 未转染细胞组, 转染干扰质粒细胞组, 每组设 5 个复孔。培养 12 h 后, 按试剂盒说明书进行操作。分别选择转染后 0、12、24、48、72 h 时间点, 每孔加 CCK8 溶液 10 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后终止。酶联免疫检测仪上检测 D_{450} 值。

1.6 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件, 各组数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间均数比较采用 t 检验或单因素方差分析 (One-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建靶向 *GRP78* 基因的 miRNA 表达载体

使用构建好的 miRNA 干扰载体 pcDNATM6.2-miR78-1、pcDNATM6.2-miR78-2、pcDNATM6.2-miR78-3、pcDNATM6.2-miR78-4 转化感受态细胞 DH5 α , 摇菌提取质粒进行测序, 测序结果表明重组质粒序列与所设计的基因序列完全相符, 无突变、缺失、插入等异常存在。实验结果表明: 针对人 *GRP78* 基因的 miRNA 质粒已成功构建, 所有干扰质粒依次命名为: pcDNATM6.2-miR78-1、pcDNATM6.2-miR78-2、pcDNATM6.2-miR78-3、pcDNATM6.2-miR78-4。

2.2 各干扰质粒成功转染 HEK293 细胞

HEK293 细胞分为 6 组(图 1)分别为: 未转染组、阴性对照组、转染 pcDNATM6.2-miR78-1 组、转染 pcDNATM6.2-miR78-2 组、转染 pcDNATM6.2-miR78-3 组及转染 pcDNATM6.2-miR78-4 组。转染干扰质粒后, 荧光显微镜下观察稳定细胞系, 除未转染组外, 均可见 GFP 蛋白的大量表达(图 1), 表明已成功转染干扰质粒并完成筛选。

2.3 pcDNATM6.2-miR78-1 干扰质粒下调 *GRP78* mRNA 表达的效果最佳

各转染组 HEK293 细胞系接种于 6 孔板, 采用 RT-PCR 法检测不同干扰质粒 pcDNATM6.2-miR78-1、pcDNATM6.2-miR78-2、pcDNATM6.2-miR78-3、pcDNATM6.2-miR78-4 转染后 *GRP78* mRNA 的表达。琼脂糖凝胶电泳(图 2)显示, 所获得 *GRP78* 和 18S 扩增片段与预计片段大小一致。与未转染组相比, pcDNATM6.2-miR78-1、pcDNATM6.2-miR78-2、pcDNATM6.2-miR78-3、pcDNATM6.2-miR78-4 组 HEK293 细胞中 *GRP78* mRNA 的表达明显下调 [(0.18 \pm 0.09)、(0.32 \pm 0.02)、(0.48 \pm 0.08)、(0.56 \pm 0.07) vs (0.84 \pm 0.01), $P < 0.05$], 并且以 pcDNATM6.2-miR78-1 质粒组的下调效果最为明显。未转染组与转染 pcDNATM6.2-Ctrl 质粒组则无显著

性差异 ($P > 0.05$)。以上结果充分表明, 成功构建的 pcDNATM6.2-miR78-1 干扰质粒具有最佳的下调 *GRP78* mRNA 表达的效果。

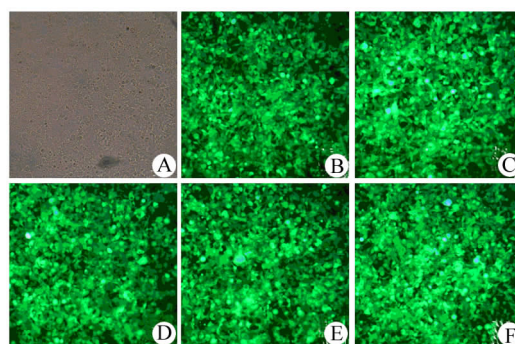


图 1 *GRP78* miRNA 载体转染 HEK293 细胞后绿色荧光蛋白的表达 ($\times 200$)

Fig. 1 Expression of green fluorescent protein in HEK293 cells after transfection with *GRP78* miRNA plasmids ($\times 200$)

A: Untransfected; B: pcDNATM6.2-Ctrl; C: pcDNATM6.2-miR78-1; D: pcDNATM6.2-miR78-2; E: pcDNATM6.2-miR78-3; F: pcDNATM6.2-miR78-4

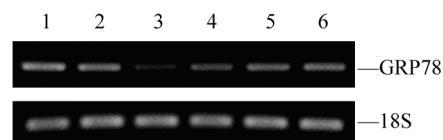


图 2 RT-PCR 检测 HEK293 细胞转染 *GRP78* miRNA 载体后 *GRP78* mRNA 的表达

Fig. 2 Expression of *GRP78* mRNA in HEK293 after transfection with *GRP78* miRNA plasmids detected by RT-PCR

1: Untransfected; 2: pcDNATM6.2-Ctrl; 3: pcDNATM6.2-miR78-1; 4: pcDNATM6.2-miR78-2; 5: pcDNATM6.2-miR78-3; 6: pcDNATM6.2-miR78-4

2.4 pcDNATM6.2-miR78-1 高效转染 EC109 细胞

pcDNATM6.2-miR78-1 干扰质粒瞬时转染 EC109 细胞, 荧光显微镜下观察转染 24 h 后 EGFR 蛋白表达情况, 转染效率高于 60%(图 3)。结果说明, pcDNATM6.2-miR78-1 干扰质粒转染效率较高。

2.5 pcDNATM6.2-miR78-1 质粒瞬时转染 EC109 细胞后下调 *GRP78* mRNA 的表达

采用 RT-PCR 分析 pcDNATM6.2-miR78-1 干扰质粒转染 EC109 细胞后对 *GRP78* mRNA 表达水平的影响。pcDNATM6.2-miR78-1 转染 24 h 后(图 4), *GRP78* mRNA/18S 的表达较未转染组、

pcDNATM6.2-Ctrl 组明显下降[(0.38 ± 0.02) vs (1.03 ± 0.04)、(1.00 ± 0.03), 均 $P < 0.05$], 而 *GRP78* mRNA 在未转染组与 pcDNATM6.2-Ctrl 组中表达无明显差异 ($P > 0.05$)。结果表明, pcDNATM6.2-miR78-1 可成功地下调食管癌 EC109 细胞中 *GRP78* mRNA 的表达。

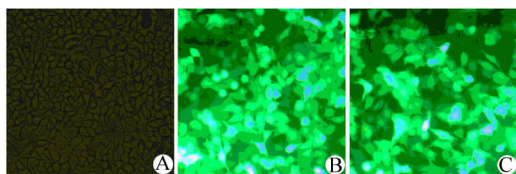


图3 pcDNATM6.2-miR78-1 转染 EC109 细胞 24 h 后绿色荧光蛋白的表达 (×200)

Fig. 3 Expression of green fluorescent protein in EC109 cells 24 h after pcDNATM6.2-miR78-1 transfection (×200)

A: Untransfected; B: pcDNATM6.2-Ctrl;
C: pcDNATM6.2-miR78-1

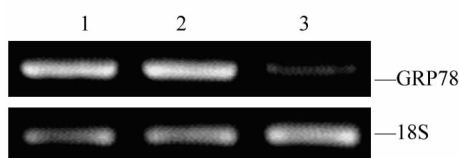


图4 pcDNATM6.2-miR78-1 转染 EC109 细胞 24 h 后 *GRP78* mRNA 的表达

Fig. 4 Expression of *GRP78* mRNA in EC109 cells 24 h after pcDNATM6.2-miR78-1 transfection

1: Untransfected; 2: pcDNATM6.2-Ctrl;
3: pcDNATM6.2-miR78-1

2.6 转染 pcDNATM6.2-miR78-1 抑制 EC109 细胞的增殖

未转染组、pcDNATM6.2-miR78-1 干扰组细胞在转染后 0、12、24、48、72 h, 采用 CCK8 检测细胞的增殖, 结果(图5)显示, 转染 pcDNATM6.2-miR78-1 后 12、24、48、72 h EC109 细胞的 D_{450} 值为: (0.028 ± 0.001)、(0.035 ± 0.003)、(0.112 ± 0.009)、(0.169 ± 0.013), 而未转染组细胞 D_{450} 值为 (0.086 ± 0.010)、(0.155 ± 0.011)、(0.389 ± 0.008)、(0.433 ± 0.009), 前者比较后者增殖明显减慢。结果表明, 转染 pcDNATM6.2-miR78-1 后下调 *GRP78* 表达对食管癌 EC109 细胞存在明显的增殖抑制效应。

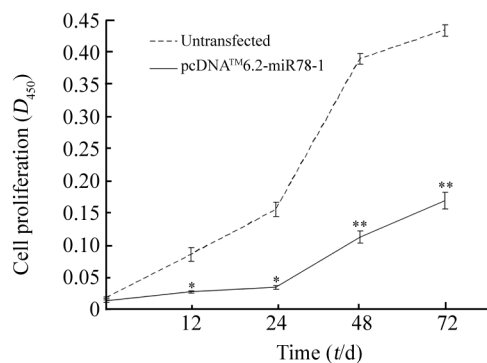


图5 CCK8 法检测 pcDNATM6.2-miR78-1 转染后 EC109 细胞的增殖

Fig. 5 Proliferation of EC109 cells after pcDNATM6.2-miR78-1 transfection detected by CCK8 assay

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs untransfected group

3 讨论

食管癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率在逐年上升。我国是食管癌高发病率的 国家之一, 其死亡率居消化道恶性肿瘤的第二位。目前肿瘤的靶向基因治疗成为研究的热点。基因治疗可以通过抑制某个重要基因的表达来提高药物的作用效率和降低肿瘤的耐药性、减缓肿瘤细胞的增殖, 降低其侵袭和转移能力, 直接或间接诱导肿瘤细胞的凋亡等^[8]。抑制基因表达的方法有多种, 其中 RNA 干扰是一种新的基因沉默技术, 特异性高、效率高, 优于反义寡核苷酸等基因阻断技术^[9]。目前, RNA 干扰主要有 3 种类型: siRNA、miRNA 和 piRNA(piwi-interacting RNA)^[10]。miRNA, 相比于 siRNA, 是一种更有效而重要的转录后表观遗传学调控 RNA 干扰, 在正常生命活动的各个阶段, 以及不同疾病状态, 均发挥极其重要的功能^[11]。

GRP78 是内质网内重要的分子伴侣, 参与新合成蛋白的折叠和组装, 并能纠正错误折叠的蛋白, 使其再折叠、重新组装或促进其降解, 调节内质网应激时内环境的稳定。既往研究^[12]表明, 当机体出现缺氧、氨基酸剥夺、蛋白质错误折叠、 Ca^{2+} 稳态失调、胆固醇合成受限等多种异常因素时, 细胞将启动 ERS 反应, 以应对异常的生存环境, 而 *GRP78* 在 ERS 通路中扮演重要角色。*GRP78* 与 *Erdj3* 分子一起形成 *ERdj3-GRP78-ATP* 复合物循环, 参与蛋白质的调控^[13]。在生理情况下, 内质网内 *GRP78* 主要与内质网膜上 *PERK*、*IRE1*、*ATF6* 形成异源二聚体。当蛋白质合成障碍, 或出现异常折叠时, 内质网将启动非蛋白折叠反应(unfolded protein response, UPR),

也即是内质网应激的早期阶段。发生 UPR 时, GRP78 从二聚体中分离出来, 结合到异常构象的蛋白质, 再次帮助其正常折叠。与此同时, 与 GRP78 分离后的 PERK、IRE1、ATF6 三种分子, 将各自启动下游的信号通路, 以应对此类应激事件^[14]。当 UPR 持续过强时, 机体将启动内质网应激相关死亡(ER-associated death, ERAD), 诱导细胞凋亡^[15]。另外, GRP78 也通过调控钙离子的平衡, 参与某些蛋白质的折叠和组装^[16-17]。当然, GRP78 在 ERAD、Ca²⁺ 稳态、ERS 中的重要调节作用, 也参与多种生理或病理过程^[1, 18]。

本研究构建了靶向 GRP78 的 miRNA 表达载体, 将最佳干扰效果的干扰质粒 pcDNATM6.2-miR78-1 瞬时转染食管癌 EC109 细胞, 结果显示, 转染干扰质粒能降低细胞中 GRP78 mRNA 的表达, 转染组中 GRP78 mRNA 的表达水平为未转染组的 41% 左右; CCK8 检测转染后细胞的增殖情况, 结果显示 pcDNATM6.2-miR78-1 转染后的 EC109 细胞的增殖速度减慢, 尤其是在 12 ~ 24 h 之间的增殖速度最慢。其增殖速度减慢可能与抑制了细胞中 GRP78 的表达, 引起蛋白质的合成速度减慢相关; 也可能是引起了 UPR, 或 Ca²⁺ 的失衡, 导致蛋白合成速度与质量下降, 最终影响了细胞的增殖; 另一种可能为转染的细胞中 GRP78 的表达下降, 细胞耐受 ERS 的能力减低, 这时通过过强的 UPR, 或 Ca²⁺ 稳态的严重失调, 甚至引起与 GRP78 在内质网表面形成复合物的 caspase-12 发生解离, 游离的 caspase-12 直接激活 caspase-9, 后者活化了 caspase-3 等引起下游的级联反应, 最终诱导细胞凋亡^[12, 19-22], 使增殖速度减慢。

本课题组近期研究^[4]已证实, 腺苷可诱导人肝癌 HepG2 细胞及 EC109 细胞凋亡, 其机制可能与内质网应激途径有关^[23]。内质网应激时细胞中 GRP78 大量表达, 以调节应激时内环境的稳定。Du 等^[24]证实在中国的食管鳞状细胞癌患者中肿瘤内的 GRP78 的表达增多, 且与较差预后相关。另外有研究^[25]表明, GRP78 在所有的食管腺癌都有表达, 且在肿瘤的早期阶段及高分化的肿瘤中 GRP78 的表达明显增多, 可能与肿瘤早期 GRP78 控制肿瘤的局部生长有关; 而在低分化与进展期的食管腺癌中 GRP78 与 GRP94 的表达均升高, 这提示可以根据这些蛋白的表达情况来监测肿瘤的进展阶段及生物学行为。

蛋白质是生命活动的主要承载者和功能体现者, 而内质网在蛋白质代谢过程中有着不可替代的作用, 这决定了 ER 及内质网的分子伴侣, 将在多种生命现象发挥重要作用, 而 GRP78 是 ER 的重要分

子伴侣之一。GRP78 参与多种生命现象, 包括多种疾病, 有神经变质性疾病、糖尿病、肝病、自身免疫性疾病、肿瘤等, 这已被多种研究^[26-29]所证实。体外实验结果^[30-31]表明, 减弱 GRP78 的表达, 有利于提高抗肿瘤治疗的敏感性, 加速肿瘤细胞的凋亡进程, 这也使得 GRP78 成为潜在的生物治疗靶点之一而受到重视。

本实验中利用构建的 pcDNATM6.2-miR78-1 干扰质粒, 成功转染人食管癌 EC109 细胞, 转染后细胞中 GRP78 mRNA 的表达水平下降, 且细胞的增殖减慢, 提示 GRP78 可以作为食管癌基因治疗的靶点, 同时为研究内质网应激在腺苷诱导食管癌细胞凋亡的作用与机制提供了极其重要的方法, 为进一步研究 GRP78 的功能及开发以 GRP78 为靶点的基因治疗提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Zhang LH, Zhang X. Roles of GRP78 in physiology and cancer [J]. J Cell Biochem, 2010, 110(6): 1299-1305.
- [2] Tanaka Y, Yoshihara K, Tsuyuki M, et al. Apoptosis induced by adenosine in human leukemia HL-60 cells [J]. Exp Cell Res, 1994, 213(1): 242-252.
- [3] Di Iorio P, Kleywegt S, Ciccarelli R, et al. Mechanisms of apoptosis induced by purine nucleosides in astrocytes [J]. Glia, 2002, 38(3): 179-190.
- [4] Wu LF, Li GP, Feng JL, et al. Molecular mechanisms of adenosine-induced apoptosis in human HepG2 cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 2006, 27(4): 477-484.
- [5] Wu LF, Ye YQ, Huang GY, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in adenosine-induced human hepatoma HepG2 cell apoptosis [J]. Oncol Rep, 2011, 26(1): 73-79.
- [6] Stanislawski J, Olszewski WL. RNA interference—significance and applications [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2005, 53(1): 39-46.
- [7] Liu J. Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs [J]. Curr Opin Cell Biol, 2008, 20(2): 214-221.
- [8] Gunji Y, Ochiai T, Shimada H, et al. Gene therapy for cancer [J]. Surg Today, 2000, 30(11): 967-973.
- [9] Hannon GJ. RNA interference [J]. Nature, 2002, 418(6894): 244-251.
- [10] Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: An expanding universe [J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(2): 94-108.
- [11] Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, et al. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs [J]. Genes Dev, 2006, 20(5): 515-524.
- [12] Rao RV, Peel A, Logvinova A, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: Role of the ER chaperone GRP78 [J]. FEBS Lett, 2002, 514(2/3): 122-128.
- [13] Shen Y, Hendershot LM. ERdj3, a stress-inducible endoplasmic reticulum DnaJ homologue, serves as a cofactor for BiP's interactions with unfolded substrates [J]. Mol Biol Cell, 2005, 16(1):

- 40-50.
- [14] Kim R, Emi M, Tanabe K, et al. Role of the unfolded protein response in cell death [J]. *Apoptosis*, 2006, 11(1): 5-13.
- [15] Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress [J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11(4): 381-389.
- [16] Lievreumont JP, Rizzuto R, Hendershot L, et al. BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca^{2+} [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(49): 30873-30879.
- [17] Van PN, Peter F, Soling HD. Four intracisternal calcium-binding glycoproteins from rat liver microsomes with high affinity for calcium. No indication for calsequestrin-like proteins in inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium sequestering rat liver vesicles [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(29): 17494-17501.
- [18] Luo S, Mao C, Lee B, et al. GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(15): 5688-5697.
- [19] Wang M, Ye R, Barron E, et al. Essential role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in protection from neuronal apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17(3): 488-498.
- [20] de Ridder G, Ray R, Misra UK, et al. Modulation of the unfolded protein response by GRP78 in prostate cancer [J]. *Methods Enzymol*, 2011, 489: 245-257.
- [21] Ouyang YB, Xu LJ, Emery JF, et al. Overexpressing GRP78 influences Ca^{2+} handling and function of mitochondria in astrocytes after ischemia-like stress [J]. *Mitochondrion*, 2011, 11(2): 279-286.
- [22] Walker T, Mitchell C, Park MA, et al. 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin and MEK1/2 inhibitors kill GI tumor cells *via* Ca^{2+} -dependent suppression of GRP78/BiP and induction of ceramide and reactive oxygen species [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(5): 1378-1395.
- [23] 叶艳清, 李国平, 蒲泽锦, 等. 腺苷通过内质网应激途径诱导 HepG2 细胞凋亡的研究 [J]. *中国药理学通报*, 2010, (5): 596-601.
- [24] Du XL, Hu H, Lin DC, et al. Proteomic profiling of proteins dysregulated in Chinese esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Mol Med*, 2007, 85(8): 863-875.
- [25] Langer R, Feith M, Siewert JR, et al. Expression and clinical significance of glucose regulated proteins GRP78 (BiP) and GRP94 (GP96) in human adenocarcinomas of the esophagus [J]. *BMC Cancer*, 2008, 8: 70-78.
- [26] Hoozemans JJ, Veerhuis R, Van Haastert ES, et al. The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease [J]. *Acta Neuropathol*, 2005, 110(2): 165-172.
- [27] Thomas SE, Dalton LE, Daly ML, et al. Diabetes as a disease of endoplasmic reticulum stress [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2010, 26(8): 611-621.
- [28] Naidoo N. The endoplasmic reticulum stress response and aging [J]. *Rev Neurosci*, 2009, 20(1): 23-37.
- [29] Yoshida H. ER stress and diseases [J]. *FEBS J*, 2007, 274(3): 630-658.
- [30] Lee E, Nichols P, Spicer D, et al. GRP78 as a novel predictor of responsiveness to chemotherapy in breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(16): 7849-7853.
- [31] Martin S, Hill DS, Paton JC, et al. Targeting GRP78 to enhance melanoma cell death [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2010, 23(5): 675-682.
- [收稿日期] 2012-09-18 [修回日期] 2012-11-26
[本文编辑] 周玲琳

· 读者 · 作者 · 编者 ·

化学元素和核素符号规范书写的要求

化学符号虽然是化学专业的学术交流语言,但在生物医学领域也有很广泛的使用。化学符号的书写有其特殊的规律和要求,生物医学论文中必须重视化学符号书写的规范化。根据 GB3102.8-93《物理化学和分子物理学的量和单位》的规定,把化学元素和核素符号书写的规范要求介绍如下:

- (1) 元素或核素的单字母符号均用正体大写,双字母符号首字母正体大写,第二个字母用正体小写。
- (2) 核素的核子数(质子数)应标注在元素符号的左上角,例如: ^{60}Co , ^{32}P , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{125}I 等;过去习惯把核子数标注在元素符号右上角的写法是错误的,例如: N^{14} , Co^{60} 等。
- (3) 离子价态的字符应标注在元素符号的右上角,例如: H^+ , Cl^- , O^{2-} , Mg^{2+} , Al^{3+} , PO_4^{3-} 等,不应写成 O^{-2} , $\text{O}^{- -}$, Mg^{+2} , Mg^{++} , Al^{+++} , PO_4^{-3} 等。
- (4) 激发态的字符(电子激发态用* ; 核子激发态用正体 m,也可用*)标注在元素或核素符号的右上角,例如: $^{110}\text{Ag}^{\text{m}}$, $^{110}\text{Ag}^*$, He^* , NO^* 等。
- (5) 分子中核素的原子数标注在核素符号右下角,例如: H_2 , FeSO_4 等。
- (6) 质子数(原子序数)标注在元素符号左下角,例如: $_{82}\text{Pb}$, $_{26}\text{Fe}$ 等。
- (7) 对于形状相似的元素符号、化合物的化学式符号,书写时应注意区分,如:Co(钴)—CO(一氧化碳),No(锘)—NO(一氧化氮),Ba(钡)—Ra(镭),Ni(镍)—Nd(钕)—Np(镎),HF(氟化氢)—Hf(铪)等。

(本刊编辑部)