

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.01.006

· 基础研究 (专题) ·

dsP21-625通过激活P21基因表达抑制前列腺癌细胞的增殖

王勇^a, 郭永连^a, 陈琳^a, 李国灏^a, 应诚诚^a, 程薇^b (华中科技大学同济医学院 a. 附属武汉中心医院 泌尿外科, 湖北 武汉 430014; b. 附属梨园医院 耳鼻喉科, 湖北 武汉 430077)

[摘要] **目的:** 探讨人工合成小分子双链RNA-625(double-stranded RNA-625, dsP21-625)对前列腺癌细胞P21基因的激活作用及对细胞增殖的影响。**方法:** 将人工合成的dsP21-625(dsP21-625组)和dsCtrl质粒(dsCtrl组)分别转染至前列腺癌细胞株PC-3和DU-145。用实时荧光定量PCR和Western blotting分别检测转染后各组前列腺癌细胞中P21、细胞周期素E(Cyclin E)和细胞周期蛋白依赖性激酶2(CDK2)mRNA及蛋白的表达水平,流式细胞术、MTT实验和克隆形成实验分别检测细胞周期分布、细胞增殖和克隆形成能力。**结果:** 与dsCtrl组比较,dsP21-625组PC-3和DU-145细胞中P21 mRNA水平升高(均 $P<0.01$),Cyclin E和CDK2 mRNA表达水平下调(均 $P<0.01$);dsP21-625组PC-3和DU-145细胞中P21蛋白表达上调(均 $P<0.01$),Cyclin E和CDK2蛋白表达下调(均 $P<0.01$);dsP21-625组细胞S期和G2/M期的细胞比例减少(均 $P<0.05$),G0/G1期的细胞比例增加(均 $P<0.01$);dsP21-625组细胞增殖活力降低(均 $P<0.05$)、克隆形成数减少(均 $P<0.05$)。**结论:** dsP21-625上调前列腺癌细胞中P21 mRNA及蛋白的表达,下调Cyclin E和CDK2 mRNA及蛋白的表达,抑制前列腺癌细胞的增殖能力。

[关键词] 前列腺癌; PC-3细胞; dsP21-625; RNA激活; P21基因; 增殖

[中图分类号] R737.25; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)01-0035-05

dsP21-625 inhibits the proliferation of prostate cancer cells by activating P21 gene expression

WANG Yong^a, GUO Yonglian^a, CHEN Lin^a, LI Guohao^a, YING Chengcheng^a, CHENG Wei^b (a. Department of Urology, the Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430014, Hubei, China; b. Department of Otolaryngology, Liyuan Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430077, Hubei, China)

[Abstract] Objective: To study the effects of synthetic small molecule double-stranded RNA-625(dsP21-625) on the activation of P21 gene in prostate cancer cells and its effect on cell proliferation. **Methods:** dsCtrl (control group) and dsP21-625 (experimental group) were transfected into prostate cancer PC-3 and DU-145 cell lines. qPCR and Western blotting were used to detect the mRNA and protein expressions of P21, Cyclin E and cyclin dependent kinase 2 (CDK2) in prostate cancer cells of each group after transfection. The cell cycle distribution, cell proliferation and clone formation were analyzed by flow cytometry, MTT assay and colony formation assay, respectively. **Results:** Compared with dsCtrl control group, P21 mRNA level was elevated in PC-3 cells and in DU-145 cells (all $P<0.01$) after transfection with dsP21-625; in the meanwhile, the expression of Cyclin E and CDK2 mRNA were down-regulated ($P<0.01$). The expression of P21 protein in PC-3 and DU-145 cells transfected with dsP21-625 was up-regulated (all $P<0.01$) while the expressions of Cyclin E and CDK2 proteins were down-regulated (all $P<0.01$); the proportion of cells in S phase and G2/M phase decreased (all $P<0.05$), and the proportion of cells in G0/G1 phase increased (all $P<0.01$) after dsP21-625 transfection. The cell proliferation ability and colony formation were significantly decreased in dsP21-625 groups (all $P<0.05$). **Conclusion:** dsP21-625 can activate the expression of P21 mRNA and protein in prostate cancer cells, down-regulate the expression of Cyclin E and CDK2 protein, and significantly inhibit the proliferation of prostate cancer cells.

[Key words] prostate cancer; PC-3 cell; dsRNA-625; RNA activation; P21 gene; proliferation

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(1): 35-39. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.01.006]

[基金项目] 湖北省自然科学基金资助项目(No.2017CFB176)。Project supported by the Natural Science Foundation of Hubei Province(No.2017CFB176)

[作者简介] 王勇(1980-),男,硕士,主治医师,主要从事泌尿系肿瘤的临床与基础研究,E-mail: 55805236@qq.com

[通信作者] 郭永连(GUO Yonglian, corresponding author),博士,主任医师,主要从事 miRNA 抑制肿瘤生长的基础研究,E-mail: yuezhao-haixi@sina.com

[优先发表] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20180111.1758.008.html>

前列腺癌是男性最常见的恶性肿瘤之一,其发病率随年龄增长而上升^[1]。寻找可靠、有效的具有分子靶向治疗作用的小分子RNA是近年来前列腺癌防治研究的热点。P21蛋白是一种细胞周期依赖性激酶的抑制蛋白,通过抑制细胞周期相关蛋白的表达,参与细胞周期的调控;P21蛋白的低水平表达与肿瘤的发生发展密切相关^[2-3]。小分子双链RNA P21-625 (double-stranded RNA P21-625, dsP21-625)是新发现的具有激活细胞内P21基因表达的人工合成小分子非编码RNA^[4],然而有关dsP21-625在前列腺癌细胞的研究尚未见报道。本研究旨在观察dsP21-625能否激活前列腺癌PC-3和DU-145细胞中P21基因的表达,并进一步通过流式细胞术、MTT细胞增殖及克隆形成实验观察dsP21-625对前列腺癌细胞的细胞周期、增殖和克隆形成能力的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞系、主要试剂

人前列腺癌细胞系PC-3和DU-145购于中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。RPMI1640培养基、Opti-MEM和胎牛血清购于美国Gibco公司, Lipofectamine™ 3000、免疫印迹显色试剂购于美国Invitrogen公司,人工合成的dsP21-625(正义链:5'-GAAUUAACGGGACUGAAA[dT][dT]-3';反义链:5'-UUUCAGUCCCGUUUAUUUC[dT][dT]-3')和dsCtrl(一组已知的缺少人类基因重要同源性的dsRNA,反义链:5'-UCUACUGUCACUCAGUAGU-3')^[5]购于广州RiboBi公司,实时荧光定量PCR(qPCR)试剂盒、逆转录试剂盒购于日本TaKaRa公司,BCA蛋白浓度测定试剂盒、MTT试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司,一抗 β -Tubulin、P21、细胞周期素E(Cyclin E)和细胞周期蛋白依赖性激酶2(cyclin dependent kinase 2, CDK2)购于美国Cell Signaling Technology公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗购于武汉艾美捷科技有限公司。PCR引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 细胞培养及转染

用含有10%胎牛血清的RPMI 1640培养前列腺癌PC-3和DU-145细胞,在37℃、5%CO₂培养箱内培养。在转染前18 h,取对数生长期的前列腺癌细胞消化离心,接种于一个新的6孔培养板,待前列腺癌细胞汇合度为50%时进行转染,采用Lipofectamine™ 3000作为转染试剂,分别转染dsP21-625(dsP21-625组)和dsCtrl(dsCtrl组)。具体操作如下:采用Opti-MEM分别稀释转染试剂和小分子RNA后将两者混合,室温下静置20 min,完成转染复合物的制备,将其

均匀滴加至6孔培养板,补足新鲜培养基,RNA的终浓度为50 nmol/L。12~24 h后观察细胞状态,更换新鲜培养基。

1.3 qPCR检测转染dsP21-625对PC-3和DU-145细胞P21、Cyclin E和CDK2 mRNA表达的影响

转染后72 h,收集前列腺癌PC-3和DU-145细胞,提取总RNA。按照逆转录试剂盒说明书将RNA逆转录为cDNA。用qPCR试剂盒和特异性引物通过PCR仪将cDNA进行扩增检测。引物序列:P21上游引物为5'-GCCCAGTGGACAGCGAGCAG-3',下游引物为5'-GCCGGCGTTTGGAGTGGTAGA-3';Cyclin E上游引物为5'-GAGGCGTGCCTTTGCTTTTA-3',下游引物为5'-GGTGTCTGGAGGTGGCTGGT-3';CDK2上游引物为5'-CCAGGAGTTACTTCTATGCCTGA-3',下游引物为5'-TTCATCCAGGGGAGG-TACAAC-3';GAPDH上游引物为5'-TCCCATCAC-CATCTTCCA-3',下游引物为5'-CATCACGCCA-CAGTTTCC-3'。反应条件:95℃预变性5 min,40个循环,95℃ 20 s,60℃ 30 s,72℃延伸30 s。以2^{- $\Delta\Delta C_t$} 值表示P21、Cyclin E和CDK2 mRNA相对表达水平。实验重复4次。

1.4 Western blotting检测转染dsP21-625对PC-3和DU-145细胞P21、Cyclin E和CDK2蛋白表达的影响

转染72~96 h后,收集两组PC-3和DU-145细胞,用细胞裂解液(100 μ l/孔)裂解细胞,采用BCA法测定蛋白浓度,制备30 μ g的蛋白样品。行SDS-PAGE,转至PVDF膜,5%脱脂奶粉的TBST在室温下封闭2 h,分别加入与一抗 β -Tubulin(1:1 000)、P21(1:2 000)、Cyclin E(1:1 000) and CDK2(1:2 000)4℃冰箱孵育过夜。次日洗膜后加入HRP标记的二抗(1:5 000)孵育1 h,用ECL化学发光法显影。用Image J软件分析条带灰度值,统计分析蛋白相对表达水平。实验重复4次。

1.5 流式细胞术检测转染dsP21-625对PC-3和DU-145细胞周期的影响

转染72 h后,采用胰酶溶液消化,收集两组前列腺癌细胞,PBS溶液洗3次,于含70%的乙醇溶液的4℃冰箱内孵育过夜。次日PBS洗3次,离心去上清,用100 μ l RNase溶液重悬细胞,37℃水浴锅内孵育约30 min,加入100 μ l PI溶液,于4℃冰箱内避光孵育30 min,最后用流式细胞仪检测波长在488 nm处的光密度(D)值。实验重复4次。

1.6 MTT法检测转染dsP21-625对PC-3和DU-145细胞增殖的影响

转染24 h后,用胰酶溶液消化离心收集两组前列腺癌细胞,细胞按1 \times 10³个/孔接种到96孔细胞培养板,每组设4个复孔,沿孔板边缘加入200 μ l PBS/

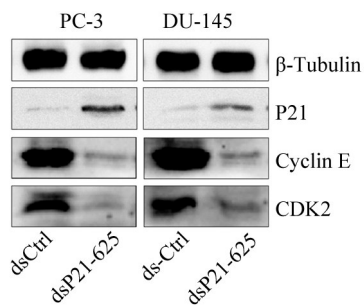
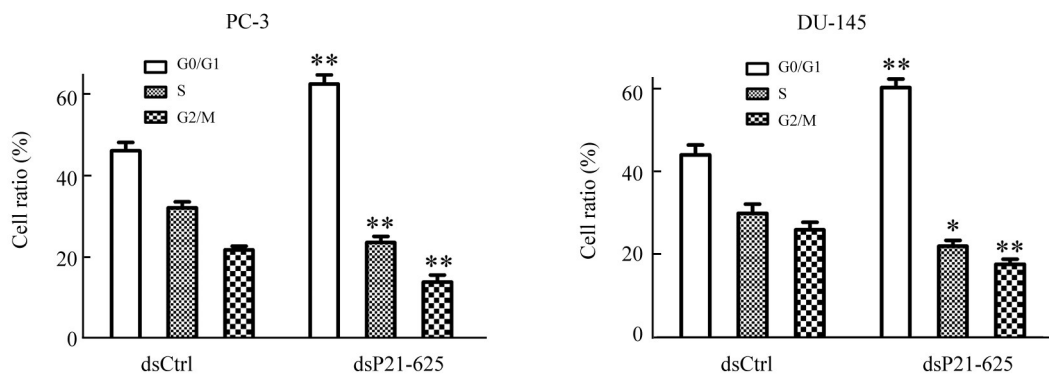


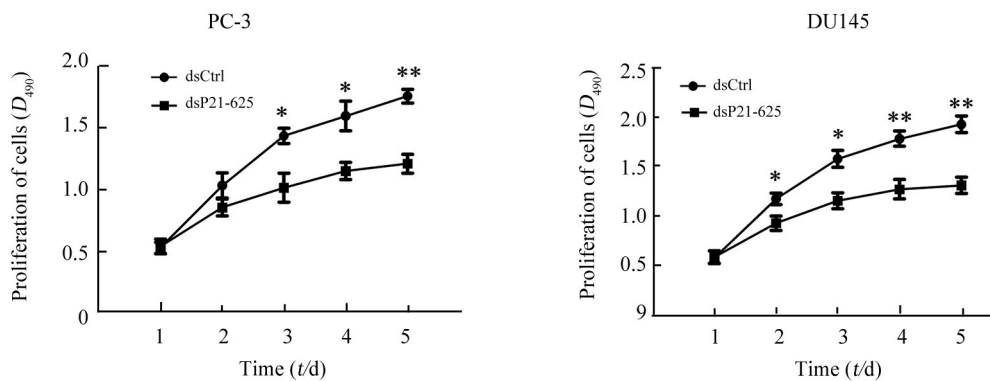
图2 两组前列腺细胞中P21、Cyclin E和CDK2蛋白的表达
Fig. 2 Expressions of P21, Cyclin E and CDK2 proteins in two groups of prostate cancer cells



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

图3 两组前列腺癌细胞的细胞周期的变化

Fig. 3 Changes of the cell cycle distribution in two groups of prostate cancer cells



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

图4 两组前列腺癌细胞的增殖活力的变化

Fig. 4 Changes of the proliferation ability in two groups of prostate cancer cells

2.5 转染 dsP21-625 后前列腺癌细胞集落形成数减少

克隆形成实验结果表明, dsP21-625 组 PC-3 和 DU-145 细胞的克隆形成数目均显著低于 dsCtrl 组细胞 [(125.23 ± 22.85) vs (230.36 ± 35.93) 个, $t=4.94$, $P < 0.01$; (139.09 ± 31.7) vs (220.07 ± 34.97) 个, $t=3.43$, $P < 0.01$]。结果表明, dsP21-625 抑制前列腺癌细胞的克隆形成能力。

3 讨论

RNA 激活 (RNA activation, RNAa) 是指小分子 RNA 能够激活某些低表达或沉默的基因表达的现象^[6]。与传统的 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 相比, RNAa 效应的发生需要有更高转染浓度的小分子 RNA。RNAi 主要发生于细胞质内, RNAa 则发生

于细胞核内。RNAi 作用发生于转录后水平, 即具有干扰作用的内源性 miRNA 或外源性小分子 RNA 通过特异性结合或降解靶基因的 mRNA, 从而抑制靶基因的翻译。RNAa 发生于转录水平, 即内源性 miRNA 或外源性小分子 RNA 通过特异性的作用于靶基因的启动子^[7-8]。此外, RNAa 的起效和作用具有明显的延迟性和持久性, RNAi 一般在转染后数小时起

效,而RNAa则在24~48 h起效;RNAi的效应可持续1周左右,而RNAa效应则能延续至2周甚至更长^[9-10]。

P21蛋白作为一种CDK抑制剂,可与大部分Cyclin-CDK复合物相结合^[2]。Cyclin E-CDK2通过诱导细胞由G1期向S期转变,加速细胞周期的进展^[11]。P21通过抑制多种Cyclin-CDK复合物如Cyclin E-CDK2的形成,对细胞周期进行负向调控,参与细胞增殖、分化、衰老等多种细胞功能的调控,显著抑制肿瘤细胞的增殖^[12]。通过对临床前列腺癌组织标本的研究^[13]表明,前列腺癌组织中P21蛋白的表达水平明显低于癌旁组织,并发现前列腺癌患者的预后好坏与前列腺癌组织中P21蛋白表达水平的高低密切相关。因而通过靶向治疗,特异性激活前列腺癌细胞中P21蛋白的表达,可能会成为治疗前列腺癌的一种新方法。dsP21-625是一种新发现具有明显P21蛋白激活效应的人工合成的小分子非编码RNA^[14],但其对前列腺癌细胞增殖的作用一直未得到验证。本研究结果发现,dsP21-625可激活前列腺癌细胞中P21基因的表达,上调P21蛋白水平,引起P21下游蛋白Cyclin E与CDK2降低,导致前列腺癌细胞的细胞周期被阻滞在G0/G1期,使前列腺癌细胞增殖能力下调。研究结果表明,dsP21-625可以在体外抑制前列腺癌细胞的增殖。本实验的不足之处在于没有进行dsP21-625与前列腺癌细胞的体内实验;而笔者知道RNAa作用与相应小分子RNA的转染浓度密切相关^[15],但是dsP21-625转染浓度与激活效应的关系并未得到验证。下一步将通过动物实验观察dsP21-625在体内对前列腺癌细胞增殖的影响;并在体外设置一系列的dsP21-625转染浓度,观察转染浓度与激活效应之间的关系。

综上所述,人工合成的dsP21-625能激活前列腺癌细胞中P21蛋白的表达,并抑制前列腺癌细胞的增殖,为前列腺癌的治疗提供了一个新的方向。

[参 考 文 献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30. DOI: 10.3322/caac.21332.
- [2] KARIMIAN A, AHMADI Y, YOUSEFI B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage [J/OL]. DNA Repair (Amst), 2016, 42: 63-71[2017-10-30]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568786416300477?via%3Dihub>. DOI: 10.1016/j.dnarep.2016.04.008.
- [3] AL-SARAN N, SUBASH-BABU P, AL-NOURI D M, et al. Zinc enhances CDKN2A, pRb1 expression and regulates functional apoptosis via upregulation of p53 and p21 expression in human breast cancer MCF-7 cell[J/OL]. Environ Toxicol Pharmacol, 2016, 47: 19-27[2017-10-30]. <http://sciencedirect.com/science/journal/13826689>. DOI: 10.1016/j.etap.2016.08.002.
- [4] 龚化,陈忠,盖强强,等.不同启动子相关双链小分子RNA介导激活p21 Waf1/Cip1基因研究[J].中华实验外科杂志,2015,32(12): 2990-2992. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2015.12.024.
- [5] HU J, CHEN Z, XIA D, et al. Promoter-associated small double-stranded RNA interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 to induce transcriptional activation[J]. Biochem J, 2012, 447(3): 407-416. DOI: 10.1042/BJ20120256.
- [6] HUANG V, QIN Y, WANG J, et al. RNAa is conserved in mammalian cells[J/OL]. PLoS One, 2010, 5(1): e8848[2017-10-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2809750/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0008848.
- [7] ZHENG L, WANG L, GAN J, et al. RNA activation: promise as a new weapon against cancer[J]. Cancer Lett, 2014, 355(1): 18-24. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.09.004.
- [8] YANG K, SHEN J, CHEN S W, et al. Upregulation of PAWR by small activating RNAs induces cell apoptosis in human prostate cancer cells[J]. Oncol Rep, 2016, 35(4): 2487-2493. DOI: 10.3892/or.2016.4582.
- [9] GUO D, BARRY L, LIN S S, et al. RNAa in action: from the exception to the norm[J]. RNA Biol, 2014, 11(10): 1221-1225. DOI: 10.4161/15476286.2014.972853.
- [10] PORTNOY V, HUANG V, PLACE R F, et al. Small RNA and transcriptional upregulation[J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2011, 2(5): 748-760. DOI: 10.1002/wrna.90.
- [11] DAI L, LIU Y, LIU J, et al. A novel cyclinE/cyclinA-CDK inhibitor targets p27(Kip1) degradation, cell cycle progression and cell survival: implications in cancer therapy[J]. Cancer Lett, 2013, 333(1): 103-112. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.01.025.
- [12] KREIS N N, LOUWEN F, YUAN J. Less understood issues: p21 (Cip1) in mitosis and its therapeutic potential[J]. Oncogene, 2015, 34(14): 1758-1767. DOI: 10.1038/onc.2014.133.
- [13] ROY S, SINGH R P, AGARWAL C, et al. Downregulation of both p21/Cip1 and p27/Kip1 produces a more aggressive prostate cancer phenotype[J]. Cell Cycle, 2008, 7(12): 1828-1835. DOI: 10.4161/cc.7.12.6024.
- [14] WANG C, GE Q, CHEN Z, et al. A new double stranded RNA suppresses bladder cancer development by upregulating p21 (Waf1/CIP1) expression[J/OL]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 304753[2017-10-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4396018/>. DOI: 10.1155/2015/304753.
- [15] WANG X, WANG J, HUANG V, et al. Induction of NANOG expression by targeting promoter sequence with small activating RNA antagonizes retinoic acid-induced differentiation[J]. Biochem J, 2012, 443(3): 821-828. DOI: 10.1042/BJ20111491.

[收稿日期] 2017-10-28

[修回日期] 2017-11-16

[本文编辑] 党瑞山