文章编号:1000-5404(2007)22-2135-04

论著

细胞周期素E的干扰RNA对HeLa细胞增殖的抑制作用

陈 济,潘巍巍,成海恩,魏丽丽,袁成福,石 华,易发平,马永平,宋方洲 (重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆市生物化学与分子药理学重点实验室,重庆 400016)

提 要:目的 利用RNAi技术下调宫颈癌HeLa细胞中cyclin E mRNA水平,研究对HeLa细胞增殖及周期的影响。**方法** 构建针对cyclin E基因的RNAi真核表达载体,脂质体转染HeLa细胞下调细胞中cyclin E mRNA含量。RT-PCR检测抑制效果;MTT检测细胞生长情况;流式细胞仪分析HeLa细胞周期变化。**结果** 成功构建针对cyclin E基因的RNAi真核表达载体,可以特异下调cyclin E mRNA含量,并抑制细胞恶性增殖。细胞周期分析显示干扰使细胞停留在$G_0 \sim G_1$期,S期细胞明显减少。**结论** RNAi能特异地下调HeLa细胞中cyclin E mRNA含量,抑制宫颈癌细胞恶性增殖,提示cyclin E可能成为宫颈癌基因治疗中的一个新的靶点。

关键词: RNA干扰;细胞周期素E;宫颈癌;HeLa细胞;细胞周期

中图法分类号: R394-33;R73-362;R737.33 **文献标识码:** A

Inhibition of HeLa cell proliferation by cyclinE RNA interference

CHEN Ji, PAN Wei-wei, CHENG Hai-en, WEI Li-li, YUAN Cheng-fu, SHI Hua, YI Fa-ping, MA Yong-ping, SONG Fang-zhou (Department of Biochemical and Molecular Biology, Faculty of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the effect of RNAi targeting cyclin E on the proliferation and cell cycle of cervical cancer cell line HeLa. **Methods** The eukaryotic expression vector of cyclin E RNAi was constructed and transfected into HeLa cell. The mRNA level of cyclinE was detected by RT-PCR. Cell proliferation was analyzed by MTT; Cell cycle was analyzed by flow cytometry. **Results** The vector of cyclinE RNAi was successfully constructed, and specially knocked down the mRNA level of cyclin E gene after transfection. MTT showed the cell proliferation was inhibited. Cells stopped at G_0-G_1 phase and cell number in S phase was sharply decreased after RNAi. **Conclusion** The mRNA level of cyclinE gene in HeLa cell can be specially knocked down by RNAi, and the malignant proliferation of cervical cancer cells is inhibited too.

Key word: RNA interference; cyclin E; cervical cancer; HeLa cell; cell cycle

宫颈癌是妇科常见恶性肿瘤之一,其发病率近年来呈上升趋势。目前宫颈癌常规手术、放疗、化疗治疗方法对提高患者生存率及改善预后效果不佳,因此探索宫颈癌的基因治疗方案已成为目前研究的热点[1]。细胞周期素E(cyclin E)属于细胞周期素家族成员,与细胞周期素依赖蛋白激酶2(CDK2)特异结合,在细胞G_1/S期转换中起重要作用。研究证实cyclin E在多种肿瘤中的表达明显高于正常组织。宫颈癌的病因研究也提示其与cyclin E的过表达密切相关[2]。最近出现的RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术可特异性敲减靶基因的表达,已在肿瘤治疗方面显示出巨大的应用潜力。本研究拟构建针对cyclin E的RNAi真核表达载体来特异敲减宫颈癌细胞中cyclin E的表达,观察抑制该基因对宫颈癌细胞增殖及其周期的影响,以期为宫颈癌的治疗提供新的靶点和策略。

1 材料与方法

1.1 材料

人宫颈癌细胞株HeLa细胞株、大肠埃希菌DH5α均为本教研室保存,pGenSil-1质粒载体由重庆医科大学附属第二医院

基金项目:国家自然科学基金(30371479)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30371479)
作者简介:陈 济(1981-),女,四川省广汉市人,硕士,主要从事肿瘤基因治疗方面的研究。电话:(023)68485991, E-mail: chenji-158@163.com
通讯作者:宋方洲,电话:(023)68485958, E-mail: fzsongcq@163.com
收稿日期:2007-01-15;修回日期:2007-05-21

传染科唐琳博士惠赠，脂质体转染试剂盒购自 Invitrogen 公司，限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ、*Hind*Ⅲ、*Sal* Ⅰ及 T_4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司，去内毒素质粒抽提试剂盒及 RNA 抽提试剂 Trizol 均购自 QIAGEN 公司，RT-PCR 试剂盒购自 TOYOBO 公司，小牛血清和 RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司。siRNA 序列及 cyclin E、内参引物均由 TaKaRa 公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 siRNA 的设计、合成及干扰表达载体的构建[3] 在 Pubmed 上查找 cyclin E 基因的序列(编号为 GI: 33879911)，根据 Tuschl 提出的设计原则，利用 TaKaRa 公司网上设计软件，设计 2 对阳性 siRNA 干扰序列(靶点分别为 612～634 nt、797～819 nt)和 1 对阴性对照 siRNA 序列，并用 Blast 查询，以确保引物不与其他基因同源，并在序列两端添加 *Bam*H Ⅰ和 *Hind*Ⅲ的酶切位点，设计了中间 9 个碱基为发夹序列，设计好的 siRNA 交 TaKaRa 公司合成。siRNA 设计结果如下：612～634 nt 正义链：5′-GATCCTGCGAGCAATTCTTCTGGATTCAAGACGTCCAGAAGAATTGCTCGCATTTTTTA-3′，反义链：5′-AGCTTAAAAAATGCGAGCAATTCTTCTGGACGTCTTGAATCCAGAAGAATTGCTCGCAG-3′；797～819 nt 正义链：5′-GATCCAGTTGCACCAGTTTGCGTATGTTCAAGACGCATACGCAAACTGGTGCAACTTTTTTTA-3′，反义链：5′-AGCTTAAAAAAAGTTGCACCAGTTTGCGTATGCGTCTTGAACATACGCAAACTGGTGCAACTG-3′；阴性对照正义链：5′-GATCCGACTTCATAAGGCGCATGCTTCAAGACGGCATGCGCCTTATGAAGTCTTTTTTA-3′，反义链：5′-AGCTTAAAAAAGACTTCATAAGGCGCATGCCCGTCTTGAAGCATGCGCCTTATGAAGTCG-3′。合成好的序列退火形成双链，分别用 *Bam*H Ⅰ和 *Hind*Ⅲ酶切载体后连接插入，转化大肠埃希菌 DH5α，抗生素抗性筛选，所获重组质粒用 *Sal* Ⅰ酶切进行初步鉴定。初步确认后送公司测序，构建好的载体分别命名为 pGenSil-clyE1、pGenSil-clyE2 和 pGenSil-HK。

1.2.2 细胞培养及质粒转染 HeLa 细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养(加抗生素)，培养条件为 37 ℃、5% CO_2。当 100 ml 培养瓶中 HeLa 细胞融合率达到 70%～80% 时，用 Lipofectamine™2000 脂质体转染。实验分 4 组：pGenSil-clyE1、pGenSil-clyE2、pGenSil-HK、空白对照组。反复实验得到最佳转染条件为质粒：脂质体质量体积比为1 μg:2.5 μl。按照脂质体转染说明书的操作步骤，分别将各组质粒转入 HeLa 细胞。继续培养 48 h 后用荧光显微镜观察绿色荧光蛋白报告基因表达检测转染效率。

1.2.3 RT-PCR 半定量检测细胞 cyclin E mRNA 的表达 细胞培养 48 h 后，用 Trizol 提取细胞总 RNA。采用 25 μl 逆转录体系合成 cDNA，所得 cDNA 用特异引物扩增内参和目的条带，并进行干扰前后的对比。PCR 引物共两对，cyclin E 基因引物上游：5′-ACCAGTTTGCGTATGTGAC-3′；下游：5′-AGAGGAGAAGCCCTATTTT-3′；扩增片段长 535 bp。内参 β-actin 基因引物上游：5′-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3′；下游：5′-CCATCCACAGTCTTCTGGGT-3′；扩增片段长 250 bp。采用 50 μl PCR 扩增体系，PCR 产物经凝胶成像分析系统对 DNA 条带进行扫描，利用 Quantity One 软件分析条带的光密度值。

1.2.4 MTT 分析干扰对细胞生长的影响 取对数生长期 HeLa 细胞，接种于 96 孔板，每孔 200 μl (含细胞数 5×10^3 个)，待细胞融合率达到 70%～80% 时，用脂质体转染，实验设 4 组：空白对照组、脂质体对照组、pGenSil-HK 组、pGenSil-clyE2 组。每组 12 孔，每个时间点取 4 孔，在每孔中各加入 20 μl 5 mg/ml MTT 液，培养 4 h，弃上清，再加入 DMSO 200 μl，充分振荡 10 min。分别检测转染后第 24、48、72 小时 570 nm 波长处的吸光度值[D(570)]。实验重复 2 次，记录结果，绘制细胞增殖曲线，并进行统计分析。

1.2.5 流式细胞仪检测干扰对细胞周期的影响 空白对照组、pGenSil-HK 组及 pGenSil-clyE2 组转染后 48 h，分别消化、离心收集细胞，所获细胞用 PBS 洗涤 2 次，70% 乙醇固定过夜。PBS 洗涤细胞后，加 PI 至终浓度为 50 mg/L(含 RNase 100 mg/L)，闭光室温放置 30 min，用流式细胞仪检测，各组细胞重复 2 次，将结果进行统计分析。

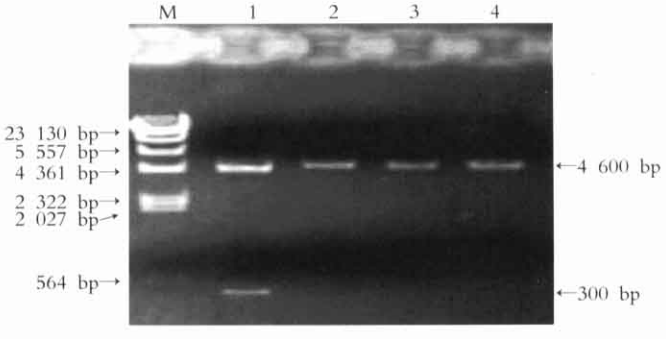
1.3 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 重组质粒酶切及测序鉴定结果

空载体含两个 *Sal* Ⅰ酶切位点，用 *Sal* Ⅰ酶切可得到 300 bp 的小片段和 4 600 bp 的大片段。插入序列后，MCS(多克隆位点)中的 *Sal* Ⅰ酶切位点被破坏，不能得到小片段，酶切片段经凝胶电泳成像分析，初步确认后送 TaKaRa 公司测序。酶切和测序的结果均证明 3 种重组质粒均构建成功(图 1)。



M：λ*Hind*Ⅲ酶切标准；1：*Sal* Ⅰ单酶切 pGenSil-1 质粒；2－4：分别为 *Sal* Ⅰ单酶切重组质粒 pGenSil-clyE1、pGenSil-clyE2、pGenSil-HK

图 1 重组 siRNA 表达质粒的单酶切鉴定

2.2 细胞转染效率观察

经 Lipofectamine™2000 脂质体转染法转染 48 h 后用倒置荧光显微镜观察绿色荧光蛋白报告基因检测转染效率，pGenSil-clyE1、pGenSil-clyE2、pGenSil-HK 质粒组均有较高的转染效率(60%～70%)，提示重组 siRNA 表达质粒成功转入 HeLa 细胞(图 2)。

2.3 半定量 RT-PCR 结果

提取细胞总 RNA 后用紫外分光光度计进行定量分析(0.1 μg/μl)，$D(260)/D(280)=1.83$，经 1% 琼脂糖凝胶电泳后显示清晰的 28S、18S、5S 3 条带，说明 RNA 提取成功。RT-PCR 的

结果显示，与空白对照组及 pGenSil-HK 组相比，pGenSil-clyE1 及 pGenSil-clyE2 转染组在转染 48 h 后 HeLa 细胞内 cyclin E mRNA 水平均下调，密度扫描半定量分析表明 pGenSil-clyE1 及 pGenSil-clyE2 对 cyclin E 表达抑制率为分别为 32% 和 59%（图 3）。由于 pGenSil-clyE1 对 cyclin E 抑制效果不佳（抑制率仅为 32%），故在后续的实验中仅使用 pGenSil-clyE2 载体进行实验。

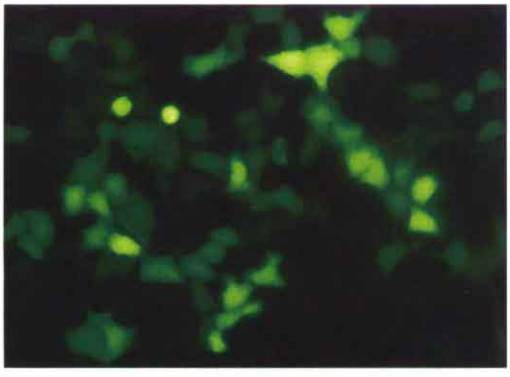
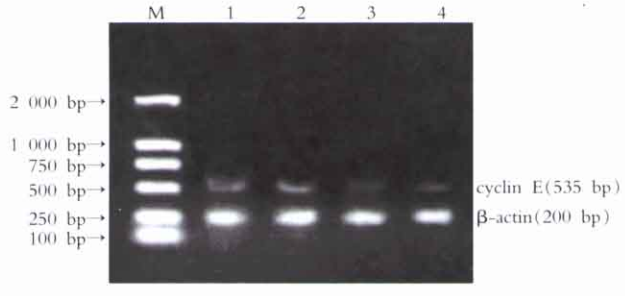


图 2　pGenSil-HK 质粒转染 HeLa 细胞　（荧光显微镜 ×200）



M：DNA标准（DL 2000）；1：空白对照；2：pGenSil-HK；3：pGenSil-clyE2；4：pGenSil-clyE1

图 3　RNA 干扰后 HeLa 细胞 cyclin E mRNA 的表达变化

2.4　MTT 分析结果

对不同实验组连续 3 d MTT 法比色测定，绘制出细胞生长曲线，并对数据进行统计分析。结果显示转染 pGenSil-clyE2 组与空白对照组、脂质体对照组及 pGenSil-HK 组相比，HeLa 细胞的生长明显受到抑制，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。见图 4。

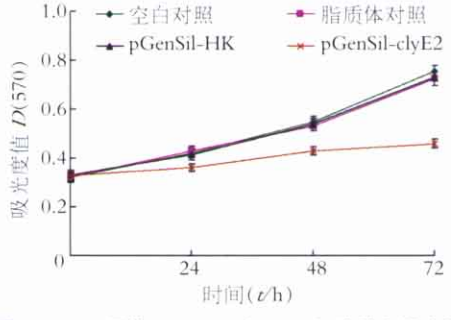


图 4　RNAi 干扰 cyclin E 后 HeLa 细胞的生长曲线

2.5　流式细胞仪分析 RNA 干扰对细胞周期影响结果

流式细胞仪分析细胞周期结果显示，与空白对照组、pGenSil-HK 组相比，pGenSil-clyE2 组 HeLa 细胞 $G_0 \sim G_1$ 期数量增加（$P<0.05$），S 期数量减少（$P<0.05$），细胞被阻滞在 G_1 期（表 1）。

表 1　RNAi 干扰 cyclin E 对 HeLa 细胞周期的影响（$n=2$，%，$\bar{x} \pm s$）

组别	$G_0 \sim G_1$	$G_2 \sim M$	S
空白对照	51.9 ± 3.9[a]	5.5 ± 2.0	42.6 ± 5.9[a]
pGenSil-HK	50.3 ± 5.1[a]	8.9 ± 5.7	40.9 ± 1.0[a]
pGenSil-clyE2	71.7 ± 4.6	6.8 ± 1.7	21.6 ± 3.2

a：$P<0.05$，与 pGenSil-clyE2 比较

3　讨论

肿瘤的发生与细胞周期调节失控密切相关，细胞周期调控主要由细胞周期素-激酶复合物及细胞周期依赖性蛋白激酶抑制物（CKIs）形成的调控网络来完成。cyclin E 是细胞周期素之一，其基因定位于人 19q12-13，它与 CDK2 结合形成细胞周期素-激酶复合物，是控制细胞周期 G_1/S 时相转换的关键性激酶，促进细胞周期 G_1/S 期进程。cyclin E 过表达使细胞 G_1 期进程缩短，提前进入 S 期，干扰 DNA、中心体复制和分裂，导致基因组不稳定是引起肿瘤发生的重要原因。现已证实在多种肿瘤中均存在 cyclin E 的过度表达[4-6]，提示 cyclin E 是肿瘤发生中的一个重要癌基因。针对 cyclin E 进行基因治疗的研究已成为一个热点[7,8]。宫颈癌的发生、发展也与 cyclin E 的过度表达密切相关。有研究表明，正常宫颈组织中无 cyclin E 表达，而在宫颈癌组织中 cyclin E 表达率随宫颈癌病理分级的增加而逐渐升高；宫颈癌的分化程度越低，cyclin E 的表达越高[9]。另外，cyclin E 的高表达还是 HPV 感染致宫颈癌的重要机制：HPV 感染人体后，病毒癌基因 E6、E7 表达并作用于下游 p53 基因，使其对 $p21^{Cip1}$ 的调节失控，而导致 cyclin E 的过表达，细胞越过 G_1/S 期检测点进入无限增殖状态[10]。此外病毒基因还通过整合，在癌基因 c-myc 附近引起其高表达，c-myc 的表达诱导 cyclin E-CDK2 活性，使正常细胞转化为肿瘤细胞。故通过抑制 cyclin E 的过表达来进行宫颈癌的基因治疗方案将为该疾病的治疗开辟一条新的途径。

目前 RNAi 技术已在肿瘤的基因治疗方面显示出其强大的优越性[11,12]，它通过 21 ~ 23 nt 的双链 RNA（dsRNA）或短发夹状 RNA（shRNAs）与特异性 mRNA 的结合导致靶基因的降解，起到特异性的基因敲减作用。与反义核酸、核酶技术等基因治疗方法相比具有特异性强、效率高的特点。目前用于 RNAi 的 siRNA 可以通过体外合成、PCR 转录扩增及 shRNA 真核表达载体在细胞内转录 3 种方法获得。前两种方法仅能用于短期干扰效果研究，而 shRNA 真核表达载体将含茎环结构的干扰序列插入带 U6 或 H1 真核启动子下，可持续表达 siRNA，具有干扰效果持久的特点，有利于建立稳定的干扰细胞系对干扰引起的效应进行长期研

究[13]。

本实验在 cycun E 基因序列中选取了 612 ~ 634 nt、797 ~ 819 nt 两处作为干扰靶点，成功构建了针对 cyclin E 基因的 shRNA 长效真核表达载体。该载体可持续表达 siRNA，转染 HeLa 细胞后通过 RT-PCR 分析证实其中针对 797 ~ 819 nt 靶点的 shRNA 载体干扰效果较好，干扰组细胞中 cyclin E mRNA 水平较非干扰组及阴性对照组细胞明显下降（抑制率为 59%），与文献[7,8]报道的 cyclin E 基因有效干扰靶点抑制效率相近，说明该 shRNA 真核表达载体能特异地降低宫颈癌 HeLa 细胞中 cyclin E mRNA 水平，起到转录后基因沉默作用。MTT 方法分析干扰后 HeLa 细胞生长增殖情况，结果显示干扰载体转染细胞比非干扰因素处理组细胞的增殖能力随时间推移明显降低（$P < 0.05$），提示干扰 cyclin E 基因后可抑制 HeLa 细胞的恶性增殖。流式细胞仪分析 HeLa 细胞周期变化，显示干扰组的细胞中 $G_0 \sim G_1$ 期细胞明显增加，而 S 期细胞明显减少（$P < 0.05$），实验结果证实了 cyclin E 在细胞周期 G_1/S 时相转换的关键作用。干扰 cyclin E 基因表达可使 HeLa 细胞停滞在 $G_0 \sim G_1$ 期，一定程度地扭转其恶性程度。本实验初步证明了 RNAi 技术能有效下调 HeLa 细胞中 cyclin E 基因的表达，抑制宫颈癌细胞恶性增殖，为宫颈癌的基因治疗开辟了新的思路。

参考文献：

[1] Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene E6 and E7 expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells using small interfering RNAs[J]. Mothods Mol Biol, 2005, 292: 401 - 420.

[2] Kim Y T, Zhao M. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma [J]. Yonsei Med J, 2005, 46(5): 597 - 613.

[3] Boutla A, Delidakis C, Livadaras I, *et al*. Variations of the 3' protruding ends in synthetic short interfering RNA(siRNA) tested by microinjection in Drosophila embryos[J]. Oligonucleotides, 2003, 13(5): 295 - 301.

[4] Bales E, Mills L, Milam N, *et al*. The low molecular weight cyclin E isoforms augment angiogenesis and metastasis of human melanoma cells *in vivo*[J]. Cancer Res, 2005, 65(3): 692 - 697.

[5] 王 梅，刘丽娜，吕 申. 细胞周期素 E 蛋白在胃癌组织的表达及意义[J]. 肿瘤研究与临床，2006，18(4)：231 - 232.

[6] Farley J, Smith L M, Darcy K M, *et al*. Cyclin E expression is a significant predictor of survival in advanced, suboptimally debulked ovarian epithelial cancers: a Gynecologic Oncology Group Study[J]. Cancer Res, 2003, 63(6): 1235 - 1241.

[7] Li K, Lin S Y, Brunicardi F C, *et al*. Use of RNA interference to target cyclin E-overexpressing hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Res, 2003, 63(13): 3593 - 3597.

[8] 宋海星，马文丽，宋艳斌，等. cyclin E 基因 siRNA 抑制 K562 细胞生长的研究[J]. 第一军医大学学报，2005，25(4)：361 - 365.

[9] 李长民，庄如锦，李佩玲，等. p27 和 cyclinE 在宫颈癌中的表达及其临床意义[J]. 中国现代医学杂志，2005，15(11)：1651 - 1654.

[10] Cho N H, Kim Y T, Kim J W. Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with human papillomavirus: cyclin-dependent kinase inhibitors [J]. Yonsei Med J, 2002, 43(6): 722 - 728.

[11] 吕 伟，张 超，郝 佳，等. shRNA 沉默 VEGF 基因表达对大肠癌细胞生物学特性的影响[J]. 第三军医大学学报，2006，28(5)：447 - 450.

[12] Gesarone G, Garofalo C, Abrams M T, *et al*. RNAi-mediated silencing of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) enhances tamoxifen-induced cell death in MCF-7 breast cancer cells [J]. J Cell Biochem, 2006, 98(2): 440 - 450.

[13] Castanotto D, Li H, Rossi J J. Functional siRNA expression from transfected PCR products[J]. RNA, 2002, 8(11): 1454 - 1460.

（编辑 龙 亮）

参考文献类型及标识

根据 GB 3469 规定，以单字母方式标识以下各种参考文献类型：

参考文献类型	专著	论文集	报纸文章	期刊文章	学位论文	报告	标准	专利
文献类型标识	M	C	N	J	D	R	S	P

对于专著、论文集中的析出文献，其文献类型标识建议采用单字母“A”；对于其他未说明的文献类型，建议采用单字母“Z”。

对于数据库(database)、计算机程序(computer program)及电子公告(electronic bulletin board)等电子文献类型的参考文献，建议以下列双字母作为标识：

电子参考文献类型	数据库	计算机程序	电子公告
电子文献类型标识	DB	CP	EB

本刊编辑部