论著

文章编号:1000-5404(2009)02-0152-04

短发夹RNA干扰胃癌低氧诱导因子-1α表达及其临床意义

周 炜[1],姜 政[1],张 滨[2],向廷秀[1],黄爱龙[3],王丕龙[1] (重庆医科大学:[1]附属第一医院消化科,[2]公共卫生学院社会医学教研室,[3]病毒性肝炎研究所,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨RNA干扰对胃癌细胞低氧诱导因子-1α(HIF-1α)转录和蛋白表达的作用以及对胃癌细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 构建人HIF-1α基因的短发夹RNA(shRNA)真核表达载体并转染胃癌细胞BGC-823;采用RT-PCR和Western blot法检测HIF-1α mRNA、蛋白表达水平;MTT法检测转染后对胃癌细胞生长的抑制;TUNEL法观察细胞的凋亡情况;流式细胞术分析转染后胃癌细胞的细胞周期和凋亡率。**结果** 成功构建了pshRNA-HIF-1α1和pshRNA-HIF-1α2重组质粒;转染BGC-823后,与空质粒组相比,pshRNA-HIF-1α1可有效抑制BGC-823细胞HIF-1α基因转录和蛋白质表达,抑制率分别可达93.4%和55.7%;MTT法显示转染后细胞生长明显受到抑制;流式细胞术结果表明转染后,其凋亡率明显高于空质粒组($P<0.05$),BGC-823细胞增殖活性显著降低,$G_0 \sim G_1$期细胞比例明显增加,S期与$G_2 \sim M$期细胞比例减少;TUNEL法显示转染后细胞核固缩,核染色质聚集或断裂;体内实验显示,pshRNA-HIF-1α1的抑瘤率为41.75%。**结论** 体内、外初步实验证实pshRNA-HIF-1α1能有效抑制胃癌细胞BGC-823 HIF-1α基因表达,抑制胃癌细胞增殖,诱导其凋亡。

关键词: 胃癌;RNA干扰;低氧诱导因子-1α;重组质粒;细胞凋亡;BGC-823细胞

中图法分类号: R394.3;R730.23;R735.2 **文献标识码:** A

RNA interference targeting hypoxia inducible factor-1α in BGC-823 cells inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis

ZHOU Wei[1], JIANG Zheng[1], ZHANG Bin[2], XIANG Ting-xiu[1], HUANG Ai-long[3], WANG Pi-long[1] ([1]Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, [2]Department of Community Medicine, College of Public Health, [3]Institute of Viral Hepatitis, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the expression of hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α) in BGC-823 cells after RNA interference and the proliferation and apoptosis of BGC-823 cells. **Methods** The recombinant plasmid pshRNA-HIF-1α was constructed and transfected into gastric cancer cells BGC-823 by Lipofectamine™ 2000. Then the expressions of HIF-1α in BGC-823 cells were observed by RT-PCR and Western blotting, the cell proliferation was examined by MTT assay and the cell apoptosis by TUNEL and flow cytometry. The transfected cells were transplanted to nude mice to observe the inhibitory effect of transfection. **Results** The restriction enzyme digestion and sequencing result showed that the recombinant plasmid of pshRNA-HIF-1α had been constructed successfully. After it was transfected into BGC-823 cells, the genetic transcription and protein expression of HIF-1α were inhibited significantly (inhibitory ratio: 93.4% and 55.7%), compared with controls. The inhibitory ratio of cell proliferation in the pshRNA-HIF-1α transfected cells was higher than that of controls, and the cell ratio was increased in G_0/G_1 phase, and decreased in S and G_2/M phases. The apoptotic ratio of the cells transfected with pshRNA-HIF-1α was also higher than that of controls. Karyopycnosis, nuclear chromosomal condensation and segmentation were observed by TUNEL. *In vivo*, pshRNA-HIF-1α1 was proved to be able to inhibit the proliferation and induce the apoptosis of BGC-823 cells by restraining the expressions of HIF-1α, whose tumor inhibition rate was 41.75%. **Conclusion** Our results show that the recombinant plasmid pshRNA-HIF-1α can inhibit the genetic transcription and protein expression of HIF-1α, and suppress the proliferation and induce the apoptosis of gastric cancer cells BGC-823 *in vivo* and *in vitro*.

Key words: gastric carcinoma; RNA interference; hypoxia inducible factor-1α; recombinant plasmid; cell apoptosis; BGC-823 cell

作者简介: 周 炜,女,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事消化道肿瘤方面的研究。电话:(028)83372883,E-mail:cdzzmwxx@126.com

通信作者: 姜 政,电话:(023)68891218,E-mail: jianggooddoctor@mail.china.com

收稿日期: 2008-04-16;**修回日期:** 2008-05-19

当实体肿瘤处在低氧环境时,低氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor 1, HIF-1)活性显著增高,在其作用下,涉及改善低氧条件的基因如血管内皮生长因子、促红细胞生成素、运铁蛋白、酪氨酸羟化酶、糖酵解酶等大量表达,从而促进肿瘤血管再生,细胞能量代谢加强。肿瘤细胞通过自身提高糖酵解速率和多血管体系的形成而适应低氧环境,从而使得肿瘤生长和转移[1-3]。目前 HIF-1 基因在肿瘤细胞中特异性表达和介导肿瘤细胞生长的特性,已成为肿瘤基因治疗的新靶点[4]。HIF-1 不仅是肿瘤细胞对低氧反应的主要调控者,而且与许多肿瘤位点的基因治疗密切有关,对常规药物治疗无效的顽固性恶性肿瘤,可能利用沉寂 HIF-1 mRNA,达到治疗肿瘤的目的。本研究以胃癌细胞为对象,探讨 RNA 干扰技术对 HIF-1α 表达和细胞增殖的作用,为临床应用 HIF-1α 于胃癌的基因治疗奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

人胃癌细胞株 BGC-823、SGC-7901 由重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室提供,内含人 U6 启动子Ⅲ质粒 pTZU6 +1 由美国 University of Michigan Dr. David Engelke 惠赠,鼠抗人 HIF-1α 单克隆抗体购于 Santa Cruz 公司,S-P 9000 试剂盒、二抗兔抗鼠 IgG 购自北京中杉金桥公司,脂质体转染试剂 Lipofectamine™2000 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,质粒提取试剂盒购自 QIAGEN 公司,细胞总 RNA 提取 RNAiso Reagent 试剂盒、RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司,TUNEL 试剂盒购自 Roche 公司。

1.2　方法

1.2.1　筛选高表达 HIF-1α 细胞株　　分别接种胃癌细胞株 BGC-823、SGC-7901 于 24 孔板爬片,次日换培养液后放入一装有混合气体(95% N_2、5% CO_2)、饱和湿度密封袋于 37 ℃恒温箱内进行低氧培养,于 0、6、21、24 h 和 28 h 取出,4% 多聚甲醛固定 30 min 后按 S-P 9000 试剂盒操作步骤进行,DAB 显色,选择 HIF-1α 高表达细胞株进行以下实验。

1.2.2　重组质粒的设计与合成　　根据 shRNA 的设计原则和 GenBank 中的 HIF-1α(AF208487,2 522 bp)基因编码序列,分别在 628 位和 907 位设计 19 个核苷酸的 siRNA 作用链序列,中间分别间隔 TTCG 和 TTAGTACT 形成发夹结构,3′末端加有转录终止信号 TTTT,并在 5′和 3′末端分别引入 *Xho* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ酶切位点,用 BLAST 检索所设计 DNA 序列的特异性,合成寡核苷酸,然后与 pTZU6 +1 质粒连接,酶切和测序鉴定构建的重组质粒 shRNA-HIF-1α1、pshRNA-HIF-1α2。

1.2.3　质粒转染　　收获对数生长期肿瘤细胞,接种于 24 孔板培养,细胞达 70% ~90% 汇片时,按 Lipofectamine™ 2000 试剂盒说明书进行细胞转染,实验得到制备脂粒-脂质体转染复合物的最佳比例为 1∶2.0,将转染复合物均匀地加入各培养孔,置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 5 h 后换为含 10% 胎牛血清的培养液,继续低氧培养 24 ~72 h 后进行下游检测。实验分 5 组:空白细胞组、空质粒组(pTZU6 +1)、阴性对照组(pshRNA-GFP)、shRNA-HIF-1α1 组、pshRNA-HIF-1α2 组。

1.2.4　RT-PCR 检测重组质粒对 HIF-1α mRNA 的沉默　　转染后低氧培养 24 h,提取总 RNA,然后进行 RT-PCR(两步法)扩增。HIF-1α 上游引物 5′-GTGGTATTATTCAGCACGACT-3′,下游引物 5′-ATTAGGCTCAGGTGAACTTTGT-3′,扩增长度为 515 bp;内参 GAPDH 上游引物 5′-GACCACCTGGTGCTCAGTG-3′,下游引物 5′-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3′,扩增长度为 821 bp。逆转录反应条件:42 ℃ 20 min,99 ℃ 5 min, 5 ℃ 5 min,循环 1 次。PCR 反应条件:94 ℃预变性 2 min,94 ℃ 变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃链延伸 1 min,循环 30 次,72 ℃终止链延伸 5 min,扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,Bio-Rad 凝胶成像系统采集图片,Quantity One 软件分析条带光密度值。

1.2.5　Western blot 检测重组质粒对 HIF-1α 蛋白表达的影响　　转染后低氧培养 39 h,胰酶消化收集细胞,4 ℃ PBS 洗 3 次后,加入细胞裂解液,冰上裂解 30 min,4 ℃、12 000 × *g* 离心 15 min,吸取上清即为细胞总蛋白。8% SDS-PAGE 电泳后转膜,PVDF 膜于含 5% 脱脂奶粉的封闭液中 4 ℃过夜;加入 HIF-1α 单克隆抗体(1∶500),37 ℃摇床孵育 1 h;再用兔抗鼠 IgG(1∶750)二抗,37 ℃摇床孵育 1 h,ECL 显影。内参 Tublin 为鼠抗人单克隆抗体(1∶1 000)。

1.2.6　MTT 检测重组质粒对肿瘤细胞生长的抑制　　每组设 5 个复孔,转染后低氧培养 0、24、48 h 和 72 h,加入 MTT 溶液 20 μl,37 ℃孵育 4 h,吸弃孔内上清液,加入 DMSO 150 μl,振荡 10 min,选 570 nm 波长,在酶标仪上检测各孔的吸光度值[*D*(570)],各组取均值。

1.2.7　流式细胞仪检测细胞周期和凋亡率　　取干扰作用最强的 pshRNA-HIF-1α1 组测定,以空白细胞组、空质粒组为对照,转染后低氧培养 24、48 h 和 72 h,胰酶消化、1 000 r/min 离心收集细胞,PBS 洗 1 次,离心去 PBS,加入冰预冷的 70% 乙醇固定过夜,PBS 重悬、过滤、离心,PI 染色液避光室温孵育,上流式细胞仪检测。

1.2.8　TUNEL 法检测细胞凋亡　　分为 pshRNA-HIF-1α1 组、空质粒组、空白细胞组,取对数生长期细胞在 24 孔板内爬片,转染后低氧培养 48 h,按 TUNEL 试剂盒操作说明进行操作。判定标准为:TUNEL 阳性物质位于细胞核,呈黄褐色或黄棕色。光镜下取 6 个视野计算细胞凋亡率,即凋亡细胞数占细胞总数的比值。

1.2.9　裸鼠体内抑瘤实验　　雄性 5 周龄 BALB/c 裸鼠 15 只,体质量 18 ~20 g(由重庆医科大学实验动物中心提供),饲养于 SPF 级无菌饲养室。胰酶消化对数生长期人胃癌细胞 BGC-823,无血清培养液离心洗涤 2 次,调整细胞数,以每 0.2 毫升 PBS 重悬液(含 1×10^7 个细胞)接种于各裸小鼠背部肩胛区皮下。当肿瘤直径 >5 mm 以上,把裸鼠分为 3 组:生理盐水组、空质粒组和 pshRNA-HIF-1α1 组,每只裸鼠每隔 1 d 瘤体内注射质粒 50 μg/次,注射前称裸鼠体质量。共注射 8 次后引颈脱臼法处死裸鼠,剥离肿瘤,测量肿瘤质量,按以下公式计算。

抑瘤率(%) = (空质粒组平均瘤质量 - pshRNA-HIF-1α1 组平均瘤质量)/空质粒组平均瘤质量 × 100%

1.3　统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.5 统计软件进行完全随机方差分析并两两比较。

2 结果

2.1 筛选高表达 HIF-1α 的细胞株

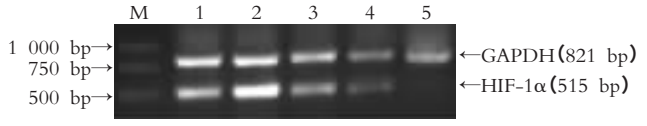
低氧条件下,细胞株 BGC-823、SGC-7901 的 HIF-1α 表达量均随低氧时间的延长而增加,由细胞质表达转变为细胞质、细胞核均有表达;在相同的时间点,细胞株 BGC-823 的 HIF-1α 表达量明显多于 SGC-7901,24 h 时 BGC-823 细胞质、细胞核均有强阳性表达。因此,以下实验均选 BGC-823 为实验细胞株。

2.2 重组质粒的鉴定

根据 shRNA 的设计原则和 GenBank 中的 HIF-1α 基因编码序列,合成寡核苷酸与 pTZU6 +1 质粒连接,转化感受态细胞,挑取阳性克隆扩增后提取质粒,通过酶切鉴定和 DNA 测序分析,其结果与实验设计一致,获得了短发夹 RNA 表达质粒 pshRNA-HIF-1α1 和 pshRNA-HIF-1α2。

2.3 RT-PCR 检测重组质粒对 HIF-1α mRNA 的沉默

BGC-823 转染后低氧培养 24 h, pshRNA-HIF-1α1 和 pshRNA-HIF-1α2 转染组与空质粒组的目的条带与相应的内参条带灰度值的比值相比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。pshRNA-HIF-1α1 组较空质粒组抑制率为 93.4%,pshRNA-HIF-1α2 抑制率为 70.8%(图 1)。



M:DNA 标准(DL 2000);1:空白细胞组;2:空质粒组(pTZU6 +1);3:阴性对照组(pshRNA-GFP);4:pshRNA-HIF-1α2 组;5:pshRNA-HIF-1α1 组

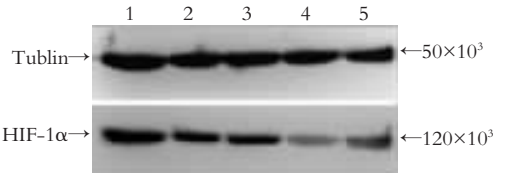
图 1 RT-PCR 检测转染后 HIF-1α mRNA 的表达

2.4 Western blot 检测重组质粒对 HIF-1α 蛋白表达的影响

BGC-823 转染后低氧培养 39 h,与空质粒组相比,pshRNA-HIF-1α1 组蛋白表达抑制率为 55.7%, pshRNA-HIF-1α2 组蛋白表达抑制率为 30.5%(图 2)。

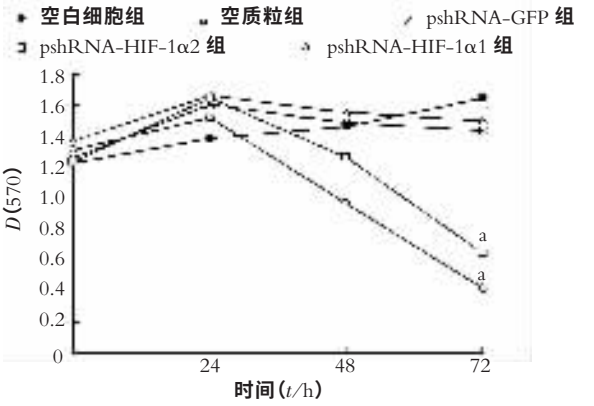
2.5 MTT 检测重组质粒对肿瘤细胞生长的抑制

细胞转染后低氧培养 0、24、48 h 和 72 h,各转染质粒组的吸光度值都有一定程度的降低,但 pshRNA-HIF-1α1、pshRNA-HIF-1α2 组更明显,尤其是 pshRNA-HIF-1α1 组。以时间为横坐标,各组的平均吸光度值[$D(570)$]为纵坐标,绘制生长曲线(图 3)。



1:空白细胞组;2:空质粒组(pTZU6 +1);3:阴性对照组(pshRNA-GFP);4:pshRNA-HIF-1α1 组;5:pshRNA-HIF-1α2 组

图 2 Western blot 检测转染后 HIF-1α 的表达



a:$P < 0.05$,与空质粒组比较

图 3 BGC-823 的生长曲线

2.6 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡率

PI 单染法流式细胞术检测转染后低氧培养 48 h 的细胞周期,结果见表 1。细胞凋亡率空质粒组为 3.37%,pshRNA-HIF-1α1 组为 12.94%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

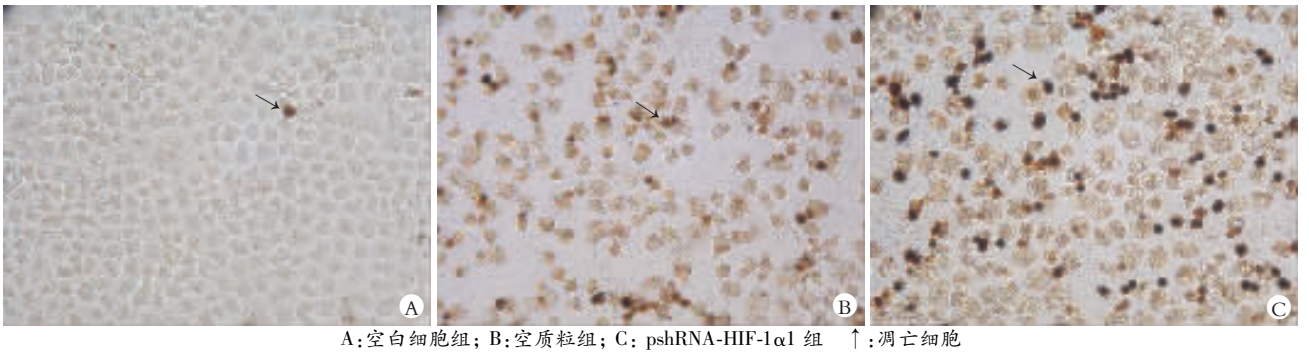
表 1 转染后低氧培养 48 h 的细胞周期分布(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	$G_0 \sim G_1$	$G_2 \sim M$	S
空白细胞组	41.75 ± 0.78	17.96 ± 1.55	40.29 ± 1.40
空质粒组	44.19 ± 2.21	14.19 ± 1.68	41.62 ± 2.32
pshRNA-HIF-1α1 组	66.55 ± 0.19[a]	2.31 ± 1.84[a]	31.14 ± 0.73[a]

a:$P < 0.05$,与空白细胞组、空质粒组比较

2.7 TUNEL 检测结果

转染后低氧培养 24、48、72 h,空白细胞组凋亡细胞极少,空质粒组和 pshRNA-HIF-1α1 组均有较多凋亡细胞,细胞转染后低氧培养 48 h 的凋亡率:空质粒组为 5%、pshRNA-HIF-1α1 组为 37%;空质粒组与 pshRNA-HIF-1α1 组凋亡率的差别有显著的统计学意义($P < 0.01$)。pshRNA-HIF-1α1 组转染后细胞核固缩,核染色质聚集或断裂。转染后低氧培养 48 h 的结果见图 4。



A:空白细胞组;B:空质粒组;C:pshRNA-HIF-1α1 组 ↑:凋亡细胞

图 4 转染后低氧培养 48 h 后的 TUNEL 染色结果 (×200)

2.8　裸鼠体内抑瘤实验

人胃癌细胞 BGC-823 接种于裸鼠肩胛区皮下后 3 d 可见皮下肿瘤结节,肿瘤生长迅速,2 周后肿瘤直径 >5 mm,并开始注射质粒。注射质粒后,pshRNA-HIF-1α1 注射组肿瘤生长速度明显低于注射生理盐水组和空质粒组。16 d 共注射质粒 8 次,第 8 次注射质粒后 4 d 处死裸鼠,剥离肿瘤称质量,生理盐水组、空质粒组、pshRNA-HIF-1α1 组的质量分别为(4.11 ±0.30)、(4.0 ±0.17)、(2.33 ±0.21)g,pshRNA-HIF-1α1 注射组质量与其他两组差别有统计学意义($P<0.05$),pshRNA-HIF-1α1 组的抑瘤率为 41.75%。

3　讨论

HIF-1 是由 HIF-1α 和 HIF-1β 2 个亚单位构成的转录因子,HIF-1α 对氧的依赖性较强,起着主要缺氧调节作用。当实体肿瘤处在低氧环境时,HIF-1α 大量表达,发生核转移,与核内 HIF-1β 异源二聚体化,形成有活性的 HIF-1,激活众多的下游基因表达。肿瘤的生长、侵入和转移依赖于肿瘤新生血管的形成;若没有血管的供应,大多数实体肿瘤直径则不超过 3 mm,它们既保持无侵袭性,也不会转移。这些下游基因的表达促进肿瘤血管再生和细胞能量代谢加强,导致肿瘤细胞的生物学特性变化。这正是肿瘤细胞的一种自我保护、自我完善机制的体现,同时也预示着肿瘤的治疗、预后不甚满意,而且是产生耐药的主要原因之一[5,6]。这些基因在肿瘤的增殖、侵袭、转移、恶性进程中也起着重要的作用[7]。由于 HIF-1 不但是涉及调控肿瘤代谢、血管发生、增殖和凋亡基因的转录因子,同时也是血管生成级联中的一个关键性的调控因子,因此抑制 HIF-1 基因 mRNA 转录和蛋白表达,从而介导肿瘤细胞凋亡,将是肿瘤基因治疗提供新的技术方案和抗肿瘤药研发的分子目标[8,9]。

RNA 干扰技术是人为地引入与内源靶基因具有同源序列的 21 ~ 23 nt 干扰性 RNA 片段,识别同源靶 mRNA,诱导内源靶基因与其同源 mRNA 的降解,抑制其相应基因表达的过程。本研究检测到胃癌的 2 个细胞株 BGC-823、SGC-7901 在低氧环境中随低氧的时间增加 HIF-1α 表达量增加,在相同的低氧时间点低分化腺癌 BGC-823 的 HIF-1α 表达量高于中分化腺癌 SGC-7901。Stoeltzing 等[10]证实当 HIF-1α 的活性被抑制时,胃癌组织附近新生血管生成受到抑制,限制了肿瘤组织的营养,从而抑制胃癌生长,而且 HIF-1α 的表达越多,胃癌的恶性程度越高、预后越差。本研究以含人 U6 启动子Ⅲ的质粒 pTZU6 +1、靶向 HIF-1α 构建的 shRNA 真核表达质粒转染入 BGC-823 后,能从 mRNA 和蛋白质水平上明显抑制 HIF-1α 的表达,而且细胞增殖受到抑制,细胞周期被阻滞在 $G_0 \sim G_1$ 期,促进胃癌细胞凋亡,不仅体外实验证明靶向 HIF-1α 的 shRNA 真核表达质粒可抑制胃癌细胞生长,同时体内实验也证明了其对肿瘤生长的抑制作用。

HIF-1 涉及到肿瘤的发展、侵袭和转移,不仅是细胞对低氧反应的主要调控者,而且与许多肿瘤位点的基因治疗密切有关。我们可利用沉寂 HIF-1α mRNA,阻止肿瘤内新生血管的形成及生长,进而切断肿瘤的营养供应,使血管灌流区的肿瘤组织缺血而坏死,从而达到抑制肿瘤生长、转移的目的。因此 HIF-1α 在抗肿瘤方面具有巨大的潜在优势和广阔的应用前景。上述实验结果说明 shRNA 干扰对 HIF-1α 基因转录和表达具有很强的抑制作用,为进一步探讨 HIF-1α 在临床上的应用奠定了基础。

参考文献:

[1] Dang D T, Chen F, Gardner L B, *et al*. Hypoxia-inducible factor-1 alpha promotes nonhypoxia-mediated proliferation in colon cancer cells and xenografts[J]. Cancer Res, 2006, 66(3): 1684 - 1936.

[2] Amir S, Wang R, Matzkin H, *et al*. MSF-A interacts with hypoxia-inducible factor-1alpha and augments hypoxia-inducible factor transcriptional activation to affect tumorigenicity and angiogenesis[J]. Cancer Res, 2006, 66(2): 856 - 866.

[3] Fischer I, Gagner J P, Law M, *et al*. Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology[J]. Brain Pathol, 2005, 15(4): 297 - 310.

[4] Griffiths E A, Pritchard S A, Welch I M, *et al*. Is the hypoxia-inducible factor pathway important in gastric cancer? [J]. Eur J Cancer, 2005, 41(18): 2792 - 2805.

[5] Park J E, Lee D H, Lee J A, *et al*. Annexin A3 is a potential angiogenic mediator[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 337(4): 1283 - 1287.

[6] Chau N M, Rogers P, Aherne W, *et al*. Identification of novel small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor-1 that differentially block hypoxia-inducible factor-1 activity and hypoxia-inducible factor-1alpha induction in response to hypoxic stress and growth factors[J]. Cancer Res, 2005, 65(11): 4918 - 4928.

[7] Semenza G L. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2000, 35(2): 71 - 103.

[8] Zhang Q, Tang X, Lu Q Y, *et al*. Resveratrol inhibits hypoxia-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha and VEGF expression in human tongue squamous cell carcinoma and hepatoma cells[J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4(10): 1465 - 1474.

[9] 刘凌云, 柴锡庆, 李清君, 等. HIF-1α 基因转染对 β 淀粉样蛋白 25 - 35 诱导原代培养海马神经细胞凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(7): 595 - 598.

[10] Stoeltzing O, McCarty M F, Wey J S, *et al*. Role of hypoxia-inducible factor 1alpha in gastric cancer cell growth, angiogenesis, and vessel maturation[J]. J Natl Cancer Inst, 2004, 96(12): 946 - 956.

(编辑　龙　亮)