论著

文章编号:1000-5404(2009)13-1250-04

RNAi 沉默 Smad4 基因表达对人前列腺癌细胞增殖的影响

吴开杰[1],张 栋[1],曾 津[1],薛 艳[2],薛玉泉[1],王 蓉[3],王新阳[1],贺大林[1] (西安交通大学医学院第一附属医院:[1]泌尿外科,[2]肿瘤中心,[3]影像中心,西安 710061)

摘 要:目的 观察 RNA 干扰技术沉默 Smad4 基因表达对人前列腺癌细胞增殖能力的影响,探讨 Smad4 在前列腺癌恶性进展中的作用。**方法** 用半定量 RT-PCR 和 Western blot 方法检测 LNCaP、PC-3、DU145 以及 ARCaP 亚细胞系 IF11、IA8 等多种不同前列腺癌细胞 Smad4 mRNA 及蛋白表达的情况,筛选出 Smad4 基因阳性表达的细胞;针对 Smad4 基因不同部位设计并化学合成 3 对不同的靶向小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA),脂质体介导瞬时转染阳性表达 Smad4 的细胞,转染后 48 h 分别用 RT-PCR 和 Western blot 检测 Smad4 mRNA 及蛋白表达水平的变化,用 MTT 法检测沉默 Smad4 表达对细胞增殖的影响。**结果** 检测的 5 种前列腺癌细胞中仅 LNCaP、PC-3、DU145 3 种细胞表达 Smad4 mRNA 及蛋白;选择 PC-3 细胞做 siRNA 转染,与阴性对照序列组(siRNA-NC)相比,转染 48 h 后,转染 SiRNA1、SiRNA2、SiRNA3 的 3 组 PC-3 细胞的 Smad4 mRNA 表达水平均显著下降,但仅有 siRNA3 组 Smad4 蛋白表达水平显著降低。转染 SiRNA3 沉默 Smad4 基因表达后 PC-3 细胞的体外增殖能力显著增强($P<0.05$)。**结论** 不同前列腺癌细胞 Smad4 基因的表达存在差异,靶向 siRNA 下调 Smad4 的表达可增强前列腺癌细胞的增殖能力。

关键词: 前列腺癌;肿瘤进展;RNA 干扰;Smad4
中图法分类号: R394.2; R737.25;R730.231 **文献标识码**: A

Effects of Smad4 gene silencing by small interfering RNA on the proliferation of prostate cancer cells *in vitro*

WU Kai-jie[1], ZHANG Dong[1], ZENG Jin[1], XUE Yan[2], XUE Yu-quan[1], WANG Rong[3], WANG Xin-yang[1], HE Da-lin[1] ([1]Department of Urology, [2]Center of Oncology, [3]Center of Radiology, First Affiliated Hospital, Medical School of Xi′an Jiaotong University, Xi′an 710061, Shaanxi Province, China)

Abstract: Objective To explore the effects of Smad4 gene silencing by small interfering RNA (siRNA) on the proliferation of prostate cancer cells *in vitro*. Methods Expression of Smad4 gene in several prostate cancer cell lines (LNCaP, PC-3, DU145, IF11, and IA8) was detected by semi-quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR) and Western blotting for the screening of the positive cells. Three siRNA targeting three different domains of Smad4 gene were designed, synthesized, and transfected into Smad4-positive cells by Lipofectamine™2000. After transfection for 48 h, expression of Smad4 gene in Smad4-positive cells was detected by RT-PCR and Western blotting again, and the proliferative potency was also analyzed by MTT assay at the same time. Results There was a remarkable difference in the expressions of Smad4 mRNA and protein between these cells. Smad4 was highly expressed in LNCaP, PC-3, and DU145 cells, but not in IF11 and IA8 cells. Compared with the negative control (siRNA-NC) groups, transfection of three targeting siRNA in PC-3 cells knocked down the expression of Smad4 mRNA significantly, but only siRNA3 silenced the expression of Smad4 protein. Smad4 gene silencing enhanced the proliferative capacity of PC-3 cells after transfection. Conclusion There is difference in the expression of Smad4 gene in prostate cancer cell lines. The chemically synthesized specific siRNA targeting Smad4 could effectively reduce the expression of Smad4 gene, and enhance the proliferative capacity of PC-3 cells *in vitro*.

Key words: prostate cancer; tumor progression; RNA interference; Smad4

作者简介:吴开杰,男,江苏省宜兴市人,博士研究生,主要从事泌尿系统肿瘤基础与临床方面的研究,发表论文 7 篇。E-mail: yidaiwujin@126.com
通信作者:贺大林,电话:(029)85323661,E-mail: hedl@mail.xjtu.edu.cn
收稿日期:2009-02-12;**修回日期**:2009-03-13

抑癌基因 Smad4 作为 TGF-β/Smads 信号通路发挥作用的关键转录因子,其突变或表达缺失与前列腺癌的发生、发展、预后密切相关,可能是晚期前列腺癌细胞对 TGF-β 失去反应而逃避 TGF-β 信号传导途径生长抑制作用的重要原因之一[1-3]。但就 Smad4 表达缺失是否与前列腺癌细胞获得高增殖潜能存在直接关联尚不清楚。本研究利用最新的 RNA 干扰技术,通过设计特异性的靶向 siRNA,转染筛选出的 Smad4 阳性表达的前列腺癌细胞,直接观察 Smad4 基因表达下调对细胞体外增殖能力的影响,探讨 Smad4 基因在前列腺癌细胞获得高增殖潜能中扮演的重要角色。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞株　　人前列腺癌细胞株 LNCaP、PC-3、DU145 以及 ARCaP 亚细胞系 IF11、IA8 均由美国 Emory 大学 Leland WK Chung 教授馈赠,西安交通大学泌尿外科研究所保种。

1.1.2　主要试剂　　RPMI1640、DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清 FBS 购自杭州四季青公司;Lipofectamine™2000 转染试剂盒和 Trizol 试剂均购自美国 Invitrogen 公司;RT-PCR 试剂盒购自立陶宛 Fermentas 公司;兔抗人 Smad4 多克隆抗体购自美国 Cell signal 公司;MTT 购自美国 Sigma 公司。

1.2　方法

1.2.1　SiRNA 的设计及合成　　根据 GenBank 提供的人 Smad4 基因序列(序列号:NM_005359),按照 siRNA 设计原则,利用 Ambion 公司网站上的在线设计软件设计了 3 对 siRNA 序列:siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3 以及阴性对照序列 siRNA-NC。经 BLAST 对比确定其特异性后由上海吉玛制药技术有限公司化学合成,HPLC 纯化。同时合成 1OD siRNA-NC 5′端标记荧光素 FAM,即 siRNA-NC-FAM 评价 siRNA 转染的效率(序列见表 1)。

表 1　设计的 Smad4 siRNA 序列

基因		序列(5′-3′)
Smad4 siRNA-1	正义	CGAAUACACCAACAAGUAATT
	反义	UUACUUGUUGGUGUAUUCGTA
Smad4 siRNA-2	正义	CGGUCUUUGUACAGAGUUATT
	反义	UAACUCUGUACAAAGACCGCG
Smad4 siRNA-3	正义	GUACUUCAUACCAUGCCGATT
	反义	UCGGCAUGGUAUGAAGUACTT
Smad4 siRNA-NC	正义	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	反义	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

1.2.2　引物设计及合成　　设计了 1 对 Smad4 的引物,序列:上游:5′-CCTGAACTGTTTGTACCTCTGGGCCATATTGC-3′,下游:5′-CAAATTTCTGAAGAGTAGGTGATCCGGGTGGAG-3′,扩增片断长度 243 bp;同时设计了 1 对管家基因 β-actin 的引物作为内参照,序列:上游:5′-ATCATGTTTGAGACCT-TCAACA-3′,下游:5′-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3′,扩增片断长度 318 bp。分别由北京三博远志生物技术有限责任公司和北京鼎国生物技术有限责任公司合成。

1.2.3　细胞培养　　LNCaP、DU145、IF11、IA8 细胞均用含 10% 胎牛血清的 PRMI1640 培养液,PC-3 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,在 37 ℃、5% CO_2 的孵箱内培养,用 1.25 g/L 胰酶和 0.2 g/L EDTA 的混合液消化传代。

1.2.4　半定量 RT-PCR 检测细胞中 Smad4 mRNA 的表达水平　　取处于对数生长期且状态良好的上述细胞,按照 Trizol 试剂盒操作说明书提取总 RNA 行 RT-PCR,检测细胞中 Smad4 mRNA 的表达情况。所提 RNA 溶于 50 μl 无酶水中,各取 2 μl 用紫外分光光度计(NanoDrop Technologies, USA)测定 RNA 浓度和纯度,取 5 μl 进行凝胶电泳以观察 RNA 完整性。将 1 μg 总 RNA 行 20 μl 体系逆转录反应,取 2 μl cDNA 后续 25 μl 体系 PCR 反应。PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,33 个循环后,72 ℃ 最终延伸 10 min。PCR 产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外分析仪下观察结果并照相。

1.2.5　Western blot 检测细胞中 Smad4 蛋白的表达水平　　取状态良好的对数生长期细胞,用 RIPA 细胞裂解液裂解细胞制备总蛋白,Bradford 比色法定量。按每孔 20 μg 蛋白上样,10% 聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)120 V 电压下分离,30 V 电压将凝胶上的蛋白湿转至硝酸纤维素膜上。5% 脱脂奶粉将膜封闭 2 h 后,加入稀释度为 1∶200 的兔抗人 Smad4 一抗 4 ℃ 孵育过夜,TBST 充分漂洗后加入辣根过氧化物酶标记的稀释度为 1∶5 000 的羊抗兔 IgG 孵育 1 h,最后经 TBST 充分漂洗后用 ECL 试剂盒显色,曝光洗片后扫描结果保存。内参对照使用小鼠抗人 GAPDH(稀释度为 1∶10 000),以保证上样量一致。

1.2.6　siRNA 的转染及转染前后 Smad4 mRNA 和蛋白表达的检测　　常规培养上述筛选出的 Smad4 阳性表达细胞,转染前 1 d 将处于对数生长期的细胞按 2×10^5/孔细胞密度接种于 6 孔培养板中,当细胞融合率达 60% ~ 70% 时按照 Lipofectamine™2000 转染试剂盒说明书进行转染。首先用荧光标记的 siRNA-NC-FAM 优化转染条件,设 0、25、50、100、200、400 nmol/L 终浓度组,将 siRNA-Lipofectamine 复合物加到培养板孔内,转染体积为 500 μl,培养箱内常规培养 4 h 后,荧光倒置纤维镜下观察转染效率,筛选出最佳的 SiRNA 转染浓度,实验重复 3 次。之后设 siRNA-1 组、siRNA-2 组、siRNA-3 组、siRNA-NC 组,用筛选出的最佳 SiRNA 转染浓度转染,转染后 4 h 弃去转染复合物,加含 10% 胎牛血清的培养液继续培养。48 h 后同上步方法提取总 RNA 和蛋白,用 RT-PCR 和 Western blot 检测转染前后 Smad4 mRNA 和蛋白表达的变化情况,确定 Smad4 基因的 mRNA 和蛋白被 3 对靶向 siRNA 沉默的程度。PCR 反应条件调整为:95 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,28 个循环后,72 ℃ 最终延伸 10 min。

1.2.7　MTT 实验检测细胞增殖能力的改变　　将上述取得最佳沉默效果的 siRNA 序列、siRNA-NC 转染 4 h 后的细胞、未转染的细胞分别消化、收集,按 5×10^3/孔浓度接种于 96 孔板,每组设复孔 3 个,用含 10% 胎牛血清的培养液在 37 ℃、5% CO_2 的孵箱内培养。培养 24、48、72 h 后分别加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20 μl,孵育 4 h 后吸尽孔内培养液。每孔加入二甲基亚砜(DMSO)150 μl,振荡 10 min,使噻唑蓝晶体充分溶解。590 nm 波长下,用酶标仪检测各孔吸光值。以时间为横轴,每个时间点转染靶向 siRNA 序列、siRNA-NC 序列孔与未转染孔的吸光

值比率为纵轴绘制细胞生长曲线。

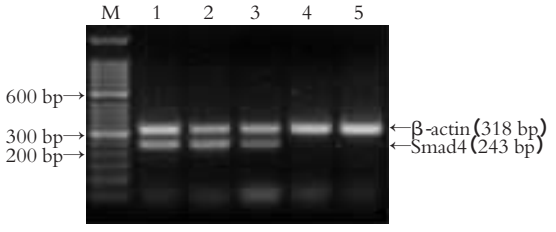
1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 SPSS 10.0 单因素方差分析,并运用 LSD 法对均数进行多重分析。

2 结果

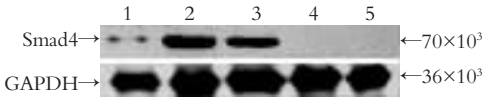
2.1 多种人前列腺癌细胞 Smad4 mRNA 及蛋白的差异表达

半定量 RT-PCR 结果显示,Smad4 mRNA 在 IF11、IA8 细胞中表达缺失,但在 LNCaP、PC-3、DU145 细胞中表达较高(图1)。Western blot 也有同样的发现,LNCaP、PC-3、DU145 细胞表达 Smad4 蛋白,但 IF11、IA8 细胞不表达(图2)。



M:标准;1-5:分别为前列腺癌 LNCaP、PC-3、DU145、IF-11、IA-8 细胞

图1 半定量 RT-PCR 检测多种人前列腺癌细胞中 Smad4 mRNA 的表达



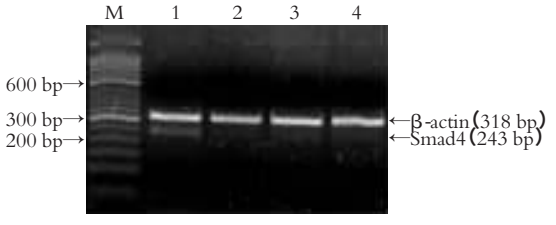
1-5:分别为前列腺癌 LNCaP、PC-3、DU145、IF-11、IA-8 细胞

图2 Western blot 检测多种人前列腺癌细胞中 Smad4 蛋白的表达

2.2 siRNA 对 PC-3 细胞 Smad4 mRNA 及蛋白表达的影响

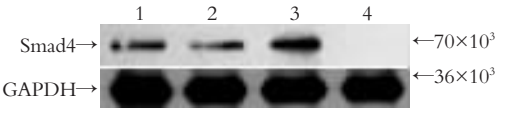
实验选择 Smad4 mRNA 及蛋白均高表达的 PC-3 细胞进行转染。转染 siRNA-NC-FAM 4 h 后荧光倒置显微镜观察,发现 siRNA 终浓度为 200 nmol/L 时,转染效率最佳,随机选取 3 个视野计数 100 个细胞,带有荧光的细胞占 90% 以上。

以 200 nmol/L 浓度转染 PC-3 细胞 48 h 后,与 siRNA-NC 组相比,siRNA1 组、siRNA2 组、siRNA3 组的 Smad4 mRNA 表达水平均明显降低(图3)。但蛋白水平仅发现 siRNA3 组的 Smad4 蛋白表达水平明显下降(图4)。



M:标准;1:转染 siRNA-NC 组;2-4:分别为转染 Smad4-siRNA1、Smad4-siRNA2、Smad4-siRNA3 组

图3 RT-PCR 检测转染 siRNA 前后 PC-3 细胞 Smad4 mRNA 的表达

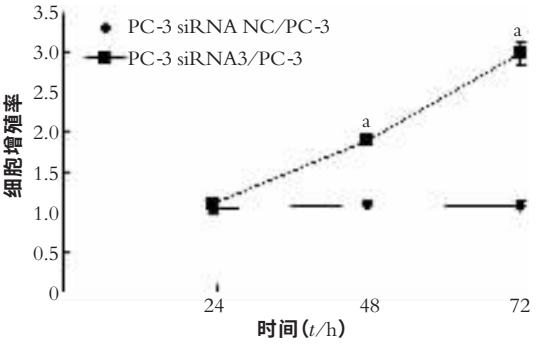


1:转染 siRNA-NC 组;2-4:分别为转染 Smad4-siRNA1、Smad4-siRNA2、Smad4-siRNA3 组

图4 Western blot 检测转染 siRNA 前后 PC-3 细胞 Smad4 mRNA 的表达

2.3 沉默 Smad4 基因对 PC-3 细胞增殖能力的影响

转染 siRNA3 序列靶向敲低 Smad4 表达后细胞的体外增殖能力明显增强(图5)。均以未转染的 PC-3 细胞为对照,转染 siRNA3 后 24、48、72 h 细胞增殖率是对照组的 1.10、1.90、2.99 倍,其中 48、72 h 组差异有统计学意义($P<0.05$);而转染 siRNA NC 的细胞增殖率仅为对照组的 1.04、1.09、1.08 倍,差异均无统计学意义($P>0.05$)。



PC-3 siRNA NC/PC-3:为转染 Smad4 siRNA-NC 孔与未转染孔吸光值的比值;PC-3 siRNA3/PC-3:为转染 Smad4 siRNA3 孔与未转染孔吸光值的比值 a:$P<0.05$,与未转染的 PC-3 细胞相比

图5 Smad4 基因沉默前后 PC-3 细胞的生长曲线

3 讨论

Smad4 又称胰腺癌缺失基因 4(Deleted in Pancreatic Cancer 4, DPC4),最早作为抑癌基因在胰腺癌研究中被发现,是位于人 18 号染色体长臂上,编码一种 552 个氨基酸的蛋白[4]。研究证实,Smad4 的表达水平与一些恶性肿瘤的发生、发展、生物学行为及其预后有着密切的关系[5]。尤其是在胃肠道肿瘤如胰腺癌、结直肠癌中,Smad4 表达与肿瘤分级、分期、预后的关系是当前研究的热点之一[6,7]。Smad4 阳性表达者肿瘤多分化好、生长速度慢,侵袭和转移能力弱,而随着肿瘤分级、分期的升高,Smad4 多发生基因突变或表达缺失[8]。

近年来,开始有研究提示,Smad4 表达的缺失或突变还可能参与前列腺癌的恶性进展过程。Perttu 等[9]用免疫组化对比研究 49 例前列腺癌、10 例良性前列腺增生、3 例正常前列腺标本中 p-Smad2、Smad4、Smad7 的表达,发现在前列腺癌组织胞核内 p-Smad2、Smad4 表达显著下降,在高分级的癌组织中尤为明显。

Horvath 等[10]用类似方法研究 BMP 通路在前列腺癌中的作用时发现,与正常前列腺组织相比,前列腺癌组织中 Smad4 表达显著降低,且胞核内 Smad4 的表达随着 Gleason 评分的升高而减少。而李泽良[11]、顾润国等[12]应用免疫组化分析国内前列腺癌患者组织标本中 Smad4 蛋白的表达,也同样发现,Smad4 在低分化、高分期中表达减少可能与 PCa 的发生、发展和预后有关。

目前认为,Smad4 作为将 TGF-β/Smads 信号从胞浆转入胞核内的唯一转录因子,在 TGF-β 信号转导中扮演着核心的角色。Smad4 可通过基因突变或表达缺失对 TGF-β 失去反应而逃避 TGF-β 信号传导途径的生长抑制作用[1]。研究表明,TGF-β 在前列腺癌的发生、发展中具有双重作用。早期 TGF-β 可通过诱导凋亡等抑制癌细胞增殖,而晚期则可通过多种途径促进肿瘤进展,Smad4 发生基因突变或表达缺失可能是重要原因之一[3]。但就 Smad4 表达缺失是否与前列腺癌细胞在肿瘤晚期获得高增殖潜能存在直接的关联尚未明了,本研究旨在利用 RNA 干扰技术(RNA interference, RNAi),通过沉默 Smad4 基因直接观察 Smad4 表达缺失对前列腺癌细胞体外增殖的影响,为进一步揭示前列腺癌晚期 TGF-β/Smads 通路促进肿瘤进展的机制提供理论依据。

与基因剔除、DNA 酶及反义 RNA 等传统基因沉默的方法不同,RNAi 技术是通过外源性或内源性的双链 RNA 引起与其同源的靶 mRNA 的特异性降解,从而抑制其相应基因表达的过程,具有高特异性、高效性的特点,已被广泛应用于基因功能研究、信号转导通路研究、基因治疗等领域[13]。吴鹏等[14]构建 Smad4 shRNA 表达载体转染 Hela 细胞,发现 Smad4 基因表达下调可促进宫颈癌细胞的生长。本研究首先利用 RT-PCR、Western 蛋白印记技术从多种不同人前列腺癌细胞系中筛选出 Smad4 基因阳性表达的细胞,发现 LNCaP、PC-3、DU145 细胞均不同程度地表达 Smad4 mRNA 及蛋白。Park 等[15]已证实 TGFβ1 可抑制 PC-3、DU145 细胞增殖,但对 LNCaP 细胞无影响,认为可能是由于 LNCaP 细胞不表达 TGFβ1 受体。因此本研究选择 PC-3 细胞作为模型,来进一步研究沉默 Smad4 表达对前列腺癌细胞体外增殖的影响。

筛选出高效率的 siRNA 是进行 RNAi 更深层次应用研究的前提,本研究设计了 3 对不同的靶向干扰序列和 1 对阴性对照序列,发现在 mRNA 水平,3 对靶向序列均可显著抑制 Smad4 的表达;但蛋白水平,仅 siRNA3 可获得较高的 Smad4 抑制效果。因此,选择 siRNA3 作为靶向序列来做抑制 Smad4 蛋白表达对前列腺癌体外增殖影响的功能研究。MTT 实验结果发现,与未转染细胞或转染阴性对照细胞相比,转染 siRNA3 可显著促进 PC-3 细胞的生长,研究结果与袁晟光等[16]报道的 Smad4 可抑制肿瘤细胞增殖的功能相一致。总之,本研究通过 RNAi 直接研究 Smad4 表达下调对前列腺癌细胞增殖的影响,为解释临床上 Smad4 表达缺失与前列腺癌分级、分期、预后呈负相关提供了一定的实验依据。

参考文献:

[1] Derynck R, Zhang Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling[J]. Nature, 2003, 425(6958): 577 - 584.

[2] 吴开杰, 祝广峰, 贺大林. TGF-β/Smads 信号通路与前列腺癌侵袭转移[J]. 现代泌尿外科杂志, 2008, 13(5): 406 - 408.

[3] Bello-DeOcampo D, Tindall D J. TGF-betal/Smad signaling in prostate cancer[J]. Curr Drug Targets, 2003, 4(3): 197 - 207.

[4] Hahn S A, Schutt M, Hoque A T, *et al*. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1[J]. Science, 1996, 271(5247): 350 - 353.

[5] Miyaki M, Kuroki T. Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 306(4): 799 - 804.

[6] 熊开琴,张秀辉. 抑癌基因 DPC4 与胰腺癌的研究进展[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2005, 12(4): 422 - 424.

[7] 李　毅,程　勇. Smads 蛋白家族在大肠癌中的作用和意义研究进展[J]. 临床外科杂志, 2007, 15(8): 567 - 569.

[8] Schutte M, Hruban R H, Hedrick L. DPC4 gene in various tumor types[J]. Cancer Res, 1996, 56(11): 2527 - 2530.

[9] Perttu M C, Martikainen P M, Huhtala H S, *et al*. Altered levels of Smad2 and Smad4 are associated with human prostate carcinogenesis [J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2006, 9(2):185 - 189.

[10] Horvath L G, Henshall S M, Kench J G, *et al*. Loss of BMP2, Smad8, and Smad4 expression in prostate cancer progression[J]. Prostate, 2004, 59(3): 234 - 242.

[11] 李泽良,宫大鑫, 孔垂泽, 等. $Smad_4$蛋白和 $Smad_3$蛋白在前列腺癌组织中的表达及意义[J]. 中国男科学杂志, 2005, 19(5): 16 - 19.

[12] 顾润国,乜新普,周春文,等. Smad2/3 和 Smad4 在前列腺癌组织中的表达[J]. 临床泌尿外科杂志, 2004, 19(10): 621 - 622.

[13] Hannon G J. RNA interference[J]. Nature, 2002, 418(6894): 244 - 251.

[14] 吴　鹏,田　媛,桂伶俐,等. RNA 干扰技术抑制 smad4 基因表达对宫颈癌细胞增殖的影响[J]. 肿瘤, 2007, 27(3): 167 - 171.

[15] Park B J, Park J I, Byun DS, *et al*. Mitogenic conversion of transforming growth factor-beta1 effect by oncogenic Ha-Ras-induced activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human prostate cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60(11): 3031 - 3038.

[16] 袁晟光,冯燮林,田　聆,等. Smad4 对人胰腺癌细胞 HS766T 生长抑制的研究[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(9): 795 - 798.

(编辑　王　红)