论著

文章编号:1000-5404(2010)04-0342-04

HSP70 siRNA 对宫颈癌 HeLa 细胞 HSP70 表达及细胞增殖与凋亡的影响

韩建红[1],赖国旗[1,2],陈 妮[1],易发平[3],黄爱龙[2] (400016 重庆,重庆医科大学:实验动物中心[1];感染性疾病分子生物学教育部重点实验室[2];分子生物学教研室[3])

[摘要] **目的** 通过体外实验观察 HSP70 的小分子干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)对宫颈癌 HeLa 细胞株增殖及凋亡的影响,探讨 HSP70 在 HeLa 细胞增殖和凋亡中的功能。**方法** 针对 HSP70 基因设计 siRNA 序列,克隆到空载体 pTZU6 +1 中,转化 DH5α 菌株,提取质粒,进行酶切鉴定和测序分析。在脂质体 2000 的介导下转染 HeLa 细胞,同时转染空载体为阴性对照及不加任何试剂的空白对照。转染 48 h 后,应用半定量 RT-PCR,Western blot 检测 HeLa 细胞 HSP70 mRNA 及蛋白的表达情况;MTT 法检测 HeLa 细胞的生长抑制率;AO/EB 染色法观察 HeLa 细胞形态学变化;流式细胞术检测 HeLa 细胞的凋亡率和细胞周期分布情况。**结果** 与对照组相比,转染 pHSP70-siRNA 组 HSP70 的 mRNA 及蛋白表达均明显下降($P<0.01$),表明 Phsp70-siRNA 质粒转染能有效降低 HSP70 的表达;细胞生长抑制率明显增高($P<0.05$),且在 48 h 时细胞抑制率达到最大;在荧光显微镜下观察到 HeLa 细胞出现凋亡形态;流式细胞术结果显示 pHSP70-siRNA 组细胞凋亡率显著高于对照组,且 G_0/G_1 期细胞减少,G_2/M 和 S 期细胞增多。**结论** HSP70 siRNA 可以有效抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖,促进 HeLa 细胞凋亡;HSP70 可能成为宫颈癌基因治疗的一个新靶点。

[关键词] HSP70 热休克蛋白质类;RNA 小分子干扰;HeLa 细胞;细胞凋亡

[中图法分类号] R394.2;R73-36;R737.33 **[文献标志码]** A

Effect of HSP70 siRNA on expression of heat shock protein 70 in human cervical cancer Hela cells and their proliferation and apoptosis

Han Jianhong[1], Lai Guoqi[1,2], Chen Ni[1], YI Faping[2], Huang Ailong[2] ([1]Center of Experimental Animals, [2]Key Laboratory of Infectious Disease Molecular Biology of Ministry of Education, [3]Department of Molecular Biology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective** To study the function of heat shock protein 70 (HSP70) on proliferation and apoptosis of HeLa cells by observing the effect of its small interfering RNA (siRNA) on them *in vitro*. **Methods** siRNA targeting HSP70 gene was designed and cloned into the vector pTZU6 +1 (pHSP70-siRNA) and transformed into DH5a followed by extraction of plasmid DNA. pHSP70-siRNA was identified by restriction enzyme digestion and sequencing for analysis and transfected into HeLa cells with Lipofectamine™ 2000. The transfected pTZU6 +1 was used as a negative control and the non-transfected pTZU6 +1 served as a blank control. After 48 hours of transfection, the expression levels of HSP70 mRNA and protein were measured by semi-quantity RT-PCR and Western blotting, respectively. The growth inhibition ratio of HeLa cells was determined by MTT. AO/EB staining was used for observation of morphologic changes in HeLa cells. The apoptosis rate and cell cycle were detected by flow cytometry. **Results** The expression levels of HSP70 mRNA and protein were significantly lower while the cell growth inhibition rate was significantly higher in HeLa cells than in negative controls ($P<0.01$, 0.05). Apoptotic morphology was observed in HeLa cells under a fluorescence microscope. Flow cytometry showed that the apoptosis rate was significantly higher in pHSP70-siRNA than in controls with the cells arrested mainly in G2/M phase. **Conclusion** HSP70-siRNA can effectively inhibit the proliferation and promote the apoptosis of HeLa cells, and may thus become a new target of gene therapy for cervical cancer.

[Key words] HSP70 heat-shock proteins; RNA, small interfering; HeLa cells; apoptosis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30800945) and the Natural Scionce Foundation of Chongqing (CSTC2008BB5235). Corresponding author: Lai Guoqi, Tel: 86-23-68486187, E-mail: a68895078@21cn.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30800945);重庆市自然科学基金(CSTC2008BB5235)

[通信作者] 赖国旗,电话:(023)68486187,E-mail:a68895078@21cn.com

宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤,是仅次于乳腺癌而引起妇女癌症相关死亡的重要原因。宫颈癌的发病机制目前尚不清楚,已有很多研究证明,99%的宫颈癌组织中可检出人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV),一致认为HPV是引起宫颈癌的主要原因,尤其是HPV16型和HPV18型的E6和E7基因[1-4]。同时,又有大量研究表明,热休克蛋白70(heat shock protein 70, HSP70)在宫颈癌和宫颈原位癌组织中的表达比其在癌旁组织及正常组织中的表达有显著性增多[5-7]。通过HSP70单克隆抗体结合、封闭细胞内HSP70,不仅使宫颈癌细胞的生长受到抑制并且可诱导其发生凋亡,提示HSP70在宫颈癌的发生和发展中作为一种重要的基因蛋白产物对控制肿瘤的增生和凋亡起重要的作用[8]。本研究采用RNAi方法,制备HSP70基因的特异性siRNA序列,研究其对宫颈癌HeLa细胞的HSP70表达及其对HeLa细胞的增殖和凋亡的影响。通过对HSP70的靶向性干预,进一步了解HSP70在宫颈癌发生、发展过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

宫颈癌HeLa细胞株为本实验室冻存,pHSP70-siRNA质粒[9]由重庆医科大学附属第一医院实验研究中心向廷秀副研究员惠赠。Lipofectamine™ 2000 Reagent转染试剂盒购于Invitrogen公司,AO/EB染色剂购于凯基生物公司,Trizol试剂购于TaKaRa公司,RT试剂盒购于TOYOBO公司,PCR聚合酶购于天根公司,兔抗HSP70多克隆抗体购于博士德公司,Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购于碧云天公司,HSP70引物和内参GAPDH引物由上海生工生物工程技术服务有限服务公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及瞬时转染 HeLa细胞培养于含10%新生牛血清、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素的RPMI1640培养基中,置于37 ℃、5% CO_2孵箱中培养。胰酶消化、传代。转染前24 h将处于对数生长期的细胞以合适的密度传代,使转染时细胞融合度约到70% ~90%,用含10%新生牛血清不含抗生素的RPMI1640培养液、37 ℃、5% CO_2培养。按Lipofectamine™ 2000试剂说明书进行转染。转染实验分为3组:分别为实验组(转染pHSP70-siRNA目的质粒)、阴性对照组(转染pTZU6+1空载体质粒)、空白对照组(不经任何处理)。在转染后4~6 h后换全培养基,继续培养48 h后收获细胞进行检测分析。

1.2.2 半定量RT-PCR检测HSP70 mRNA表达的变化 采用Trizol法提取转染48h后细胞总RNA,电泳鉴定其完整性后进行逆转录合成cDNA,反应条件为30 ℃ 10 min,42 ℃ 20 min,99 ℃ 5 min,4 ℃ 5 min。PCR反应条件为94 ℃预变性3 min,然后94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,循环30次,最后,延伸72 ℃ 5 min。以GAPDH为内参,HSP70引物序列:上游引物5′-ATGGCCAAAGCCGCGGCAGTCG-3′,下游引物5′-CATCCCCGATGAGCCGCTCG-3′,扩增产物为160 bp;GAPDH引物序列:上游引物为5′-GGAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3′,下游引物为5′-GACCACCTGGTGCTCAGTGT-3′,扩增产物为821 bp。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳,置Bio-Rad图像分析仪上观察,用凝胶分析软件分析条带光密度值。

1.2.3 Western blot检测HSP70蛋白表达的变化 分别收集转染48 h后的各组细胞,用预冷的PBS洗涤,加入蛋白裂解液,提取总蛋白,用Bradford法测定蛋白质浓度。分别取50 μg蛋白,变性后经5% SDS-PAGE浓缩胶和10% SDS-PAGE分离胶电泳,电泳完后取出凝胶转膜,将凝胶置于转移缓冲液中平衡20 min,再15 V 30 min半干转印蛋白到PVDF膜上,脱脂奶粉室温震荡封闭90 min,孵一抗,4 ℃过夜。加辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗,37 ℃室温孵育1 h。取等量ECL显色试剂A、B液混匀后孵育PVDF膜,显色拍照。以β-actin为内参。

1.2.4 MTT法检测细胞生长抑制率 将对数生长期的HeLa细胞制备成单细胞悬液,以3×10^3细胞接种于96孔培养板内,加入培养液200 μl,37 ℃、5% CO_2孵箱中培养,次日进行瞬时转染。分别转染24、48、72 h后,每孔加入5 mg/ml MTT溶液20 μl,37 ℃、5% CO_2孵箱中继续培养4 h,弃去孔内培养液,每孔加入200 μl DMSO,振荡10 min,酶标仪下570 nm波长测定光密度值[D(570)]。每组3孔,重复3次,计算细胞生长抑制率。

抑制率=[空白组D(570)值-处理组D(570)值]/空白组D(570)值×100%

1.2.5 AO/EB双重染色法观察细胞形态 收集转染后48 h的细胞,用PBS洗涤2次,稀释至10^6/ml,取25 μl细胞悬液与1 μl AO/EB荧光染液混合,在荧光显微镜下观察细胞形态。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡率及细胞周期 收集转染48 h后各组细胞,预冷PBS洗涤2次,用预冷的1×结合缓冲液重悬细胞,调整细胞数为5×10^5 ~5×10^6/ml,将试管置于冰上,加5 μl Annexin V-FITC溶液和2.5 μl碘化丙啶(PI)至100 μl的细胞悬液中,避光孵育10 min后,加入400 μl冰预冷的1×结合缓冲液,30 min内流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.7 统计学处理 实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0软件进行单因素方差分析。

2 结果

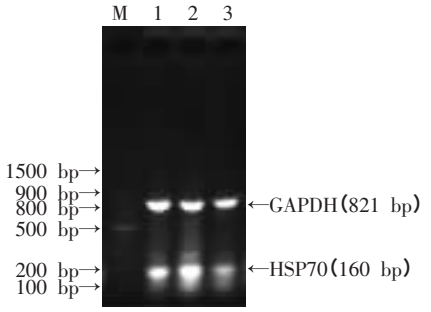
2.1 半定量RT-PCR检测HSP70 mRNA表达

通过RT-PCR可获得160 bp(HSP70)及821 bp(GAPDH)2个条带(图1),经凝胶分析系统鉴定电泳结果后,得出空白对照组、阴性对照组、pHSP70-siRNA组HSP70/GAPDH灰度比值分别为(0.66±0.07)、(0.76±0.05)、(0.35±0.03)。统计学分析显示:pHSP70-siRNA组mRNA的表达与阴性对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$),而空白对照组和阴性对照组相比差异没有统计学意义($P>0.05$)。表明pHSP70-siRNA可诱导HSP70 mRNA特异性降解。

2.2 Western blot检测HSP70蛋白表达

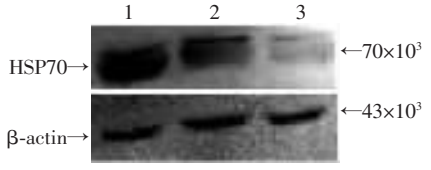
Western blot实验结果显示空白对照组、阴性对照组、pHSP70-siRNA组的HSP70/β-actin灰度比值分别为(4.57±0.22)、(4.68±0.32)、(2.46±0.39)。统计学分析结果表明:

pHSP70-siRNA 组的蛋白表达与阴性对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$),而空白对照组和阴性对照组相比差异没有统计学意义($P>0.05$)。Western blot 实验结果表明转染 pHSP70-siRNA 后的 HeLa 细胞 HSP70 蛋白表达明显减弱(图2)。



M:标准;1:空白对照组;2:阴性对照组;3:pHSP70-siRNA 组

图1 RT-PCR 检测 pHSP70-siRNA 对宫颈癌 HeLa 细胞 HSP70 mRNA 表达的影响



1:空白对照组;2:阴性对照组;3:pHSP70-siRNA 组

图2 Western blot 检测 pHSP70-siRNA 对宫颈癌 HeLa 细胞 HSP70 蛋白表达的影响

2.3 MTT 法比较细胞增殖活性

pHSP70-siRNA 转染 HeLa 细胞后 24、48、72 h,抑制率明显高于阴性对照组($P<0.01$),且在 48 h 时细胞抑制率最高,而空白对照组和阴性对照组之间差异无显著性($P>0.05$)。MTT 实验结果表明 pHSP70-siRNA 质粒对 HeLa 细胞有明显抑制作用。见表1。

表1 MTT 法检测各组细胞生长的抑制率($\%, \bar{x}\pm s$)

组别	n	24 h	48 h	72 h
空白对照组	3	3.58±0.31[a]	3.56±0.23[a]	3.63±0.33[a]
阴性对照组	3	4.11±0.16[a]	4.00±0.19[a]	3.97±0.16[a]
pHSP70-siRNA 组	3	10.35±0.42[b]	17.99±0.44[b]	15.97±0.61[b]

a:$P<0.01$,与 pHSP70-siRNA 组比较;b:$P<0.01$,同一组间不同时间两两比较

2.4 转染 pHSP70-siRNA 对宫颈癌 HeLa 细胞形态的影响

经过 AO/EB 荧光双染色后,在荧光显微镜下观察,可见空白对照组和空载体转染组绝大数细胞形态饱满,细胞质呈绿色,核染色为亮绿色,为正常细胞。而转染 pHSP70-siRNA 目的质粒组可见部分细胞核质体染成绿色,形状不规则,呈新月形,即为早期凋亡细胞;还有很多细胞核质体被染成橙色,染色质浓缩,细胞核碎裂成点状,大小不一,可见胞质芽状突起,即为晚期凋亡细胞,显示该细胞的生物学性状已发生明显改变(图3)。

2.5 流式细胞术检测细胞凋亡指数

流式细胞术检测凋亡率和细胞周期,结果显示,pHSP70-siRNA 转染组与阴性对照组相比凋亡率明显增高($P<0.01$),阴性对照组和空白对照组凋亡细胞无明显差别($P>0.05$)。细胞周期分布结果显示 G_0/G_1 期细胞减少,G_2/M 和 S 期细胞增多(表2)。

表2 pHSP70-siRNA 转染对 HeLa 细胞周期变化和凋亡的影响($\%, \bar{x}\pm s$)

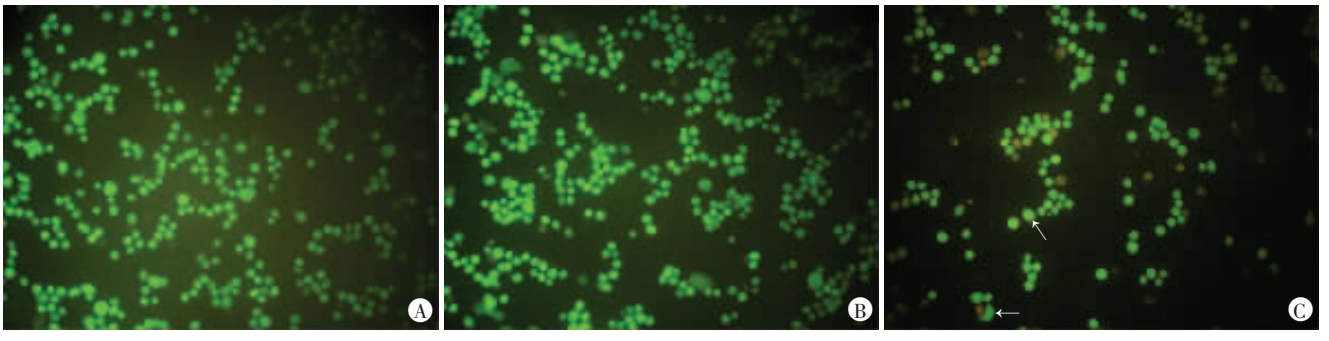
组别	G_0/G_1	S	G_2/M	凋亡率
空白对照组	60.70±0.35	37.44±0.65	1.85±0.30	3.04±0.07
阴性对照组	61.18±0.29	36.76±0.21	2.06±0.09	3.06±0.09
pHSP70-siRNA 组	51.76±0.80[a]	42.16±0.64[a]	6.09±0.16[a]	37.07±0.75[a]

a:$P<0.01$,与阴性对照组比较

3 讨论

宫颈癌既是女性最常见恶性肿瘤之一,同时又是 HSP70 高表达的肿瘤。HSP70 能与癌基因、抑癌基因及其产物互相作用结合形成 HSP70-癌蛋白复合体,介导癌蛋白构象成熟及转运,维持癌蛋白的结构与功能完整。HSP70 可以选择性地和突变型 P53 形成复合物,在调控 P53 功能方面起着重要的作用,肿瘤中常有 HSP70 与 P53 的共同表达。

早在 1995 年,Ralhan 等采用 ELISA 法和免疫组织化学方法,在子宫颈鳞状上皮细胞癌、恶化前的和正



A:空白对照组;B:阴性对照组;C:pHSP70-siRNA 组 ↑:早期凋亡细胞

图3 各组细胞经 AO/EB 染色后的细胞形态学观察 (荧光显微镜 ×200)

常的宫颈细胞中测定 HSP70 的表达,第一次证实了 HSP70 的表达量与肿瘤的恶性程度成正比[10]。随后,国内有文献报道宫颈癌组织中 HPV16/18 感染组中 HSP70 阳性表达率明显增高,提示 HPV 感染可诱发 HSP70 的表达[9,11]。Liao 等[12]通过稳定转染 pLXSN16E6/E7 质粒到原代角质化细胞,观察 HSP70 的表达与 HPV16 E6/E7 的关系,表明 HSP70 的表达是受 HPV16 E6/E7 蛋白的调节,这可能涉及到 HPV16 E6/E7 诱导永生化。

目前,对于宫颈癌的治疗,临床上采用手术、放疗和化疗等方法创伤大,副反应重,而且可能剥夺年轻患者的生育功能,寻求一种新的微创、副反应小、可以根治宫颈癌的方法势在必行。基因治疗肿瘤是目前研究的热点,而 RNA 干扰(RNAi)是基因治疗中可能更安全、更高效的方法。

RNA 干扰(RNAi)是由 RNA 介导、在转录后 mRNA 水平关闭相应基因的表达。通过 RNase III 内切酶 Dicer 的作用产生有活性的小的 21 ~ 23 nt 干扰性 RNA(short interference RNA,siRNA),介导其互补同源 mRNA 序列的特异性降解,沉寂目的基因的表达。因此,RNAi 具有高度特异性,治疗针对性强,同时它还具有高效率和高稳定性。siRNA 是 RNAi 发生作用的重要中间效应分子。本实验以 HPV18 阳性的 HeLa 细胞为模型,将 HSP70-siRNA 质粒瞬时转染 HeLa 细胞,在基因水平及蛋白质表达水平验证对 HSP70 的靶向作用。RT-PCR 及 Western blot 结果表明,实验组细胞中 HSP70 mRNA 及蛋白表达量较对照组均明显降低,提示 pHSP70-siRNA 构建成功,并能在一定程度上抑制宫颈癌 HeLa 细胞中 HSP70 的表达。

将 HSP70-siRNA 质粒瞬时转染 HeLa 细胞的流式细胞术结果显示:实验组细胞的 G_2 期细胞显著大于阴性细胞组及对照组细胞,同时,凋亡细胞明显增多。表明,HeLa 细胞 R 分裂被阻滞在 G_2 期,从而抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖,诱导其凋亡,这与 Pocaly 等[13]采用 RNAi 方法沉默 K562 细胞中的 HSP70,发现肿瘤细胞的活力下降了的结果是一致的。

HSP70 的 siRNA 真核表达载体瞬时转染宫颈癌 HeLa 细胞后能抑制癌细胞的增殖、促进癌细胞的凋亡,其可能的机制是 HSP70 作为"分子伴侣"能与癌基因、抑癌基因及其产物互相作用结合形成 HSP70-癌蛋白复合体,介导癌蛋白构象成熟及转运,维持癌蛋白的结构与功能完整[14]。HSP70 可以选择性地和突变型 P53 形成复合物,在调控 P53 功能方面起着重要的作用,这些均有待进一步实验证明。

本研究证实了 RNAi 技术抑制 HSP70 表达的可行性,研究结果为应用 siRNA 进行宫颈癌基因治疗的进一步研究奠定了实验依据,同时,为进一步利用 HSP70 为靶点进行肿瘤的基因治疗和药物开发打下基础。

参考文献:

[1] Munger K, Baldwin A, Edwards K M, *et al*. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis[J]. J Virol, 2004, 78(21): 11451 - 11460.

[2] Chan KW, Lee KH, Tam YH, *et al*. Minimal invasive surgery in pediatric solid tumors[J]. J Laparoendosc Adv Surg Tech A, 2007, 17(6): 817 - 820.

[3] Cribbs R K, Wulkan M L, Heiss K F, *et al*. Minimally invasive surgery and childhood cancer[J]. Surg Oncol, 2007, 16(3): 221 - 228.

[4] 成海恩, 张溢, 张翠莉, 等. 沉默 HPV16 E6 基因对人宫颈癌裸鼠移植瘤的抑制作用[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(6): 486 - 489.

[5] 孙选, 李旭日, 戴淑真. HSP70、p53 和 c-myc 在宫颈鳞癌中的表达及与 HPV16/18 感染的关系[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2007, 14(2): 103 - 106.

[6] 陈兰英, 赵桢, 王晓涛, 等. HSP70 基因在人胃癌、食道癌及宫颈癌中高表达和癌变关系的研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2005, 17(4): 211 - 212.

[7] 郭云鸿, 田晓予, 米建强, 等. 热休克蛋白 70 和热休克蛋白 27 在宫颈鳞癌中的表达及其意义[J]. 中原医刊, 2006, 33(24): 4 - 6.

[8] 刘哲, 姚晓颖, 张峰. HSP70 单克隆抗体诱导宫颈癌细胞凋亡的实验研究[J]. 黑龙江医药, 2007, 20(2): 117 - 118.

[9] Xiang T X, Li Y, Jiang Z, *et al*. RNA interference-mediated silencing of the Hsp70 gene inhibits human gastric cancer cell growth and induces apoptosis *in vitro* and *in vivo*[J]. Tumori, 2008, 94(4): 539 - 550.

[10] Ralhan R, Kaur J. Differential expression of Mr 70, 000 heat shock protein in normal, premalignant, and malignant human uterine cervix[J]. Clin Cancer Res, 1995, 1(10): 1217 - 1222.

[11] 徐廷香, 李西启, 赵秀娥, 等. 宫颈癌和宫颈上皮内瘤变组织中热休克蛋白 70 表达与人乳头瘤病毒感染的关系[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2002, 9(5): 54 - 55.

[12] Liao W J, Fan P S, Fu M, *et al*. Increased expression of 70 kD heat shock protein in cultured primary human keratinocytes induced by human papillomavirus 16 E6/E7 gene[J]. Chin Med J (Engl), 2005, 118(24): 2058 - 2062.

[13] Pocaly M, Lagarde V, Etienne G, *et al*. Overexpression of the heat-shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia[J]. Leukemia, 2007, 21(1): 93 - 101.

[14] D Walerych, MB Olszewski, *et al*. Hsp70 molecular chaperones are required to support p53 tumor suppressor activity under stress conditions[J]. Oncogene, 2009, 1 - 11.

(**收稿**:2009-08-06;**修回**:2009-09-09)

(编辑 张 维)