论著

文章编号:1000-5404(2012)15-1572-04

# 鼻咽癌畸胎瘤细胞源性生长因子表达及 siRNA 对 HNE-1 细胞株增殖的抑制

梁 佳,林 力,寿 铸,李景丽,陈鸿雁 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科)

[摘要] **目的** 探讨畸胎瘤细胞源性生长因子(PC cell-derived growth factor,PCDGF)在人鼻咽癌中的表达,研究小干扰 RNA(small interfering RNA,siRNA)对鼻咽癌 HNE-1 细胞增殖的影响。**方法** 采用免疫组织化学的方法检测 34 例鼻咽癌、20 例鼻咽慢性炎症组织中 PCDGF 蛋白的表达情况。根据 PCDGF 基因设计合成 2 条 siRNA,利用 Lipofectamine™ 2000 转染鼻咽癌 HNE-1 细胞。通过 PT-PCR、Western blot、荧光免疫细胞化学法检测转染后细胞 PCDGF mRNA 和蛋白表达,采用 MTT 检测转染后细胞的生长增殖情况,FCM 法检测细胞周期分布。**结果** 34 例鼻咽癌组织中 PCDGF 阳性表达率为 85.3%(29/34),20 例鼻咽部慢性炎症组织中阳性率为 15.0%(3/20),2 组间差异有统计学意义($P<0.01$)。2 条重组质粒均能特异性的抑制 PCDGF mRNA 和蛋白的表达,其中 siRNA-1 的沉默效率最高。转染 48 h 后,HNE-1 细胞中 PCDGF mRNA 和蛋白表达水平分别下调 64.7% 和 69.8%,细胞增殖抑制率为(37.07±12.4)%,siRNA-1 组 $G_0/G_1$ 期细胞增多,S 期细胞数量明显减少($P<0.05$),细胞周期被阻滞于 $G_1$ 期。**结论** 特异性 siRNA 能够有效沉默 PCDGF 基因表达,并显著抑制鼻咽癌 HNE-1 细胞增殖。

[关键词] 鼻咽肿瘤;畸胎瘤细胞源性生长因子;RNA 干扰
[中图法分类号] R394.2; R73-362; R739.6 [文献标志码] A

# Expression of PCDGF in nasopharyngeal carcinoma and its silencing in cell proliferation

Liang Jia, Lin Li, Shou Zhu, Li Jingli, Chen Hongyan (Department of Otorhinolaryngology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression of PC cell-derived growth factor (PCDGF) in nasopharyngeal carcinoma tissues and determine the effect of small interfering RNA (siRNA) against PCDGF gene on the proliferation in nasopharyngeal carcinoma HNE-1 cell line. **Methods** Immunohistochemical staining was used to examine the expression of PCDGF protein in 34 tissue samples of nasopharyngeal carcinoma and 20 samples of chronic nasopharyngeal inflammation. Two siRNA expression plasmids targeting PCDGF mRNA were constructed based on the nucleotide sequence of PCDGF and were respectively transferred into human nasopharyngeal carcinoma HNE-1 cells *via* Lipofectamine™2000. The expression of PCDGF at mRNA and protein levels were analyzed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), Western blotting and immunofluorescence assay, respectively. The cell proliferation was determined by MTT assay. The distribution of cell cycle was assessed by flow cytometry. **Results** The positive expression rate was 85.3% (29/34) in nasopharyngeal carcinoma, while only 15.0% (3/20) in chronic nasopharyngeal inflammation, with significant difference between each other($P<0.01$). The 2 recombinant plasmids inhibited the expressions of PCDGF, and the siRNA-1 was demonstrated to have the strongest silencing effect on PCDGF expression in HNE-1 cells at 48 h after transfection. The expression of PCDGF were reduced by 64.7% and 69.8%, respectively at mRNA and protein levels. PCDGF silence resulted in the proliferation inhibitory ratio of (37.07±12.4)% and more cells arrested at $G_0/G_1$ phase in HNE-1 cells. **Conclusion** Specific siRNA of PCDGF effectively inhibits the gene expression and observably suppresses cell proliferation in nasopharyngeal carcinoma HNE-1 cells.

[**Key words**] nasopharyngeal neoplasms; PC cell-derived growth factor; RNA interference

Corresponding author: Chen Hongyan, Tel: 86-23-89012758, E-mail: cchhyy787@sohu.com

畸胎瘤细胞源性生长因子(PC cell-derived growth factor,PCDGF)又称上皮素-颗粒素前体(granulin-epithelin precursor,GEP),是从鼠畸胎瘤 PC 细胞系条件培养基中纯化获得并鉴定的一种 $88\times10^3$ 的糖蛋白,它以自分泌形式促进此细胞生长。研究表明 PCDGF 可促进缺乏胰岛素样生长因子受体-Ⅰ(IGF-IR)的鼠胚成纤维细胞生长[1]。鼻咽癌(nasopharyngeal carci-

[通信作者] 陈鸿雁,电话:(023)89012758,E-mail:cchhyy787@sohu.com

noma,NPC)是中国南方常见的一种头颈部恶性肿瘤,其恶性程度高,具有强大的侵袭转移能力,且发病部位隐蔽,早期诊断难,因此探索鼻咽癌病因及其癌变的分子机制具有重要意义[2]。研究表明 PCDGF 在多种肿瘤中高表达,如皮肤鳞状细胞癌[3]、乳腺癌[4]、卵巢癌[5]、食管鳞状细胞癌[6]、肺癌[7]、喉鳞状细胞癌[8]等,与肿瘤增殖、浸润、转移相关,在肿瘤的发生、发展中起重要的作用。因此沉默肿瘤细胞中 PCDGF 表达有助于防治肿瘤的增殖转移。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种抑制特定基因产物表达的有效方法,是由双链 RNA(dsRNA)介导的特异性降解相应序列的 mRNA,导致靶基因的沉默。RNAi 能够特异性沉默相关基因在细胞中的表达,并有效抑制细胞增殖[10]。本研究采用 RNAi 技术,沉默 PCDGF 表达,探讨其对鼻咽癌细胞株 HNE-1 生物学行为的影响,以期为鼻咽癌的早期诊断与治疗奠定基础。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

收集2009年9月至2010年5月重庆医科大学附属第一医院耳鼻喉外科病房收治的34例鼻咽癌及20例鼻咽慢性炎症组织,所有标本均经10%福尔马林固定,并在3 d内进行石蜡包埋;人鼻咽癌细胞株由重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心惠赠。

### 1.2 主要试剂

山养抗人 PCDGF 多克隆抗体购自美国 R&D Systems 公司;通用型 S-P 免疫组化染色试剂盒、兔抗山羊 IgG-FITC 二抗均购于北京博奥森生物技术有限公司;S-P 染色试剂盒、DAB 显色剂购于北京中杉金桥生物技术有限公司;RPMI1640、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司;RT-PCR 试剂盒购于宝生物工程大连有限公司;Lipofectamine™2000 购于 Invitrogen 公司;蛋白裂解液、MTT 试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;引物由上海生工生物工程有限公司合成。

### 1.3 方法

1.3.1 免疫组化染色 将石蜡包埋的组织标本制成4 μm厚度切片,按S-P染色试剂盒操作步骤:常规脱蜡水化,抗原修复,3% $H_2O_2$消除内源性过氧化物酶,血清封闭,一抗 PCDGF(稀释浓度1∶100)4 ℃过夜,二抗37 ℃孵育15 min,DAB显色,苏木精复染,光学显微镜观察。用已知阳性片作阳性对照,PBS代替一抗作阴性对照。

结果判定:PCDGF以细胞质中出现黄色或棕黄色颗粒计为阳性细胞。具体参照 Serrero 等[9]的评判标准,综合染色强度和分布范围进行综合评定。400倍镜下计算每张切片阳性细胞百分率,小于5%为阴性片,大于等于5%为阳性片。阳性强度以局部分布的淡黄色为弱阳性(+),以局部或弥散分布的棕黄色为中度阳性(++),以弥散分布的棕褐色为强阳性(+++)。

1.3.2 siRNA 的设计与构建 设计针对 PCDGF mRNA(GenBank NM_002087)的2个靶序列。siRNA-1:5′-GCTTCCAAAGATCAGGTAACA-3′; siRNA-2: 5′-GCAGAAGGGTACCTGTGAACA-3′。进行同源性分析以保证序列作用的特异性。

1.3.3 细胞培养与转染 细胞常规培养计数,转染前1 d,HNE-1细胞以$4\times10^5$/ml接种于6孔板中,常规培养至60%~80%融合,将质粒脂质体复合物转染至细胞。实验分组:转染组(siRNA-1、siRNA-2),空白对照组(空脂质体转染组)。转染后48 h,荧光显微镜下观察细胞转染情况,计算转染率。

转染率=荧光细胞数/全部细胞数×100%。

1.3.4 RT-PCR 反应 转染48 h后,用 Trizol 分别提取各组细胞总 RNA。反转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR。PCDGF 的上游引物:5′-CTATACCTGCTGCCGTCTACAGT-3′,下游引物:5′-ATCACAGGGGACATCTCTCTTC-3′,扩增片段大小222 bp;以β-actin为内参,上游引物:5′-GTCCACCGCAAATGCTTCTA-3′,下游引物:5′-TGCTGTCACCTTCACCGTTC-3′,扩增片段大小为190 bp。扩增条件:94 ℃ 变性30 s,58 ℃ 退火30 s,72 ℃ 延伸30 s,循环30次。

1.3.5 Western blot 检测 PCDGF 蛋白表达 转染48 h后分别提取细胞总蛋白,常规电泳、转膜、封闭,加入山羊抗人 PCDGF 多克隆抗体(1∶1 000)和 GAPDH 抗体(1∶500),4 ℃孵育过夜。次日 TBST 洗膜,加辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记二抗(1∶1 000),室温孵育1 h,显影、定影后用 UVP 凝胶图像处理系统 Labworks 4.6 软件分析。

1.3.6 荧光免疫细胞化学检测 PCDGF 在 HNE-1 中的表达 将 HNE-1 细胞于6孔板进行细胞爬片,培养至60%~80%融合,将质粒脂质体复合物转染至细胞,同时设立空白对照组,常规固定封闭后滴加一抗,4 ℃过夜。次日 IgG-FITC 二抗室温孵育30 min。荧光显微镜观察荧光强度及着色部位。荧光亮度的判定标准:(-)无或可见微弱自发荧光,(+)明确可见荧光,(++)明亮荧光,(+++)耀眼荧光。

1.3.7 MTT 法检测细胞的增殖情况 收集转染48 h后的空白对照组和实验组细胞细胞,以$5\times10^3$/100 μl接种于96孔板中,并设置3个复孔。继续培养细胞0、12、24、48、72 h和96 h后,采用MTT法测定细胞生长活性[以570 nm波长处的光密度值 $D(570)$表示],并计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率=[1-转染组 $D(570)$/空白对照组 $D(570)$]×100%。

1.3.8 FCM 法检测细胞周期的分布 用不含 EDTA 的0.25%胰酶消化转染48 h后的各组细胞,用 PBS 洗涤细胞3次,加入1 ml 70%乙醇溶液,4 ℃固定过夜。次日重悬细胞于500 μl PBS,加入2 mg/ml 碘化丙啶(PI)后,避光染色30 min,然后使用流式细胞仪计数各细胞周期的细胞数。

### 1.4 统计学方法

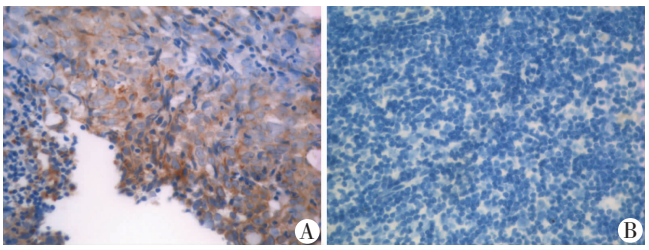
采用 SPSS 19.0 软件进行分析。计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,每组实验重复3次,组间差异比较采用单因素方差分析,等级资料采用 Wilcoxon Mann Whitney 检测方法。

## 2 结果

### 2.1 鼻咽癌及鼻咽部慢性炎症组织中 PCDGF 蛋白的表达

PCDGF 在鼻咽癌组织中的表达主要定位于细胞质,少数有包核着色。34例鼻咽癌组织中阳性率为85.3%(29/34),而在20例对照组中,阳性率为15.0%(3/20)。与鼻咽部慢性炎症相比,PCDGF 在鼻咽癌组织中呈现高表达,差异有统计学意义

($P<0.01$,图1)。

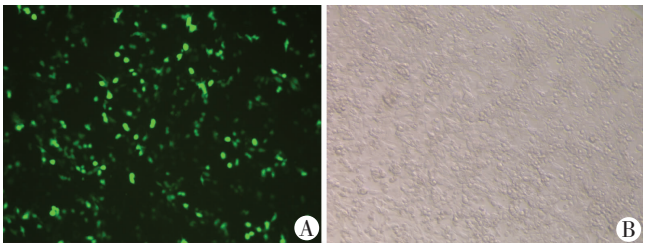


A:鼻咽癌组织呈强阳性表达(弥散分布的棕褐色颗粒);B:鼻咽慢性炎症组织中呈阴性表达

**图1 PCDGF在鼻咽部组织中的免疫组化染色观察** (S-P ×400)

## 2.2 转染率的测定

转染24~72 h,于倒置荧光显微镜下可观察到绿色荧光蛋白的表达(图2),48 h时荧光表达最强,按质粒(50 ng/μl)与脂质体(Lipofectamine™2000)之比为2:5时,转染效率最高,可达58%。

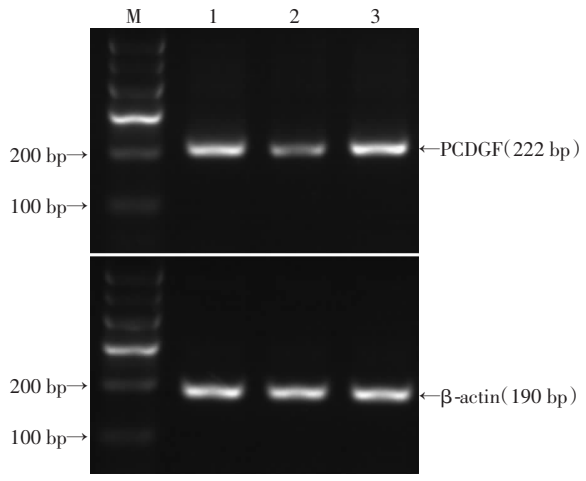


A:荧光显微镜;B:普通光镜

**图2 siRNA质粒表达载体转染HNE-1细胞48 h绿色荧光蛋白的表达** (×200)

## 2.3 PT-PCR检测PCDGF mRNA表达

转染后48 h,琼脂糖凝胶电泳结果显示各组可见灰度一致的190 bp的GAPDH内参条带,并且均有222 bp的PCDGF条带表达,PCDGF条带与GAPDH条带的灰度值之比反映目的基因mRNA表达量:siRNA-1组为(0.353±0.026),siRNA-2组为(0.602±0.066),空白对照组为(0.909±0.044)。siRNA组PCDGF mRNA表达水平均较空白对照组明显下调($P<0.05$),siRNA-1、siRNA-2组PCDGF mRNA表达分别下降64.7%、39.8%(图3)。

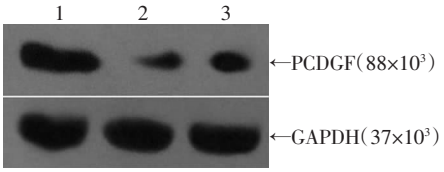



M:DNA标准;1:空白对照组;2:siRNA-1组;3:siRNA-2组

**图3 RT-PCR检测各组细胞中PCDGF mRNA表达**

## 2.4 Western blot检测PCDGF蛋白水平的表达

转染后48 h,siRNA-1、siRNA-2组、空白对照组PCDGF与内参GAPDH灰度值之比为目的基因蛋白表达量分别为(0.915±0.017)、(0.302±0.027)、(0.400±0.017)。siRNA组PCDGF mRNA表达水平均较空白对照组明显下调($P<0.05$),siRNA-1、siRNA-2组PCDGF mRNA表达分别下降69.8%、60.0%(图4)。因此,后续实验选择siRNA-1进行转染。

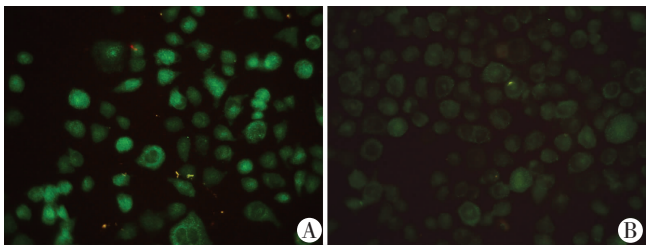



1:空白对照组;2:siRNA-1组;3:siRNA-2组

**图4 Western blot检测各组细胞中PCDGF蛋白表达**

## 2.5 荧光免疫细胞化学检测PCDGF蛋白的表达变化

空白对照组细胞质、细胞膜明显荧光表达,提示细胞内PCDGF大量表达,siRNA组细胞内荧光表达明显减弱,提示PCDGF蛋白表达受到抑制。见图5。

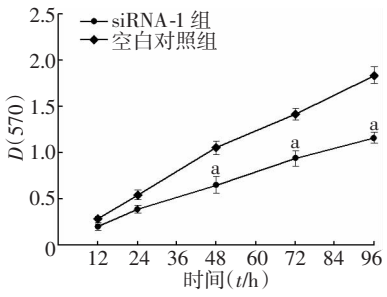


A:空白对照组;B:siRNA组

**图5 荧光免疫细胞化学检测各组细胞中PCDGF蛋白表达** (免疫荧光 ×200)

## 2.6 siRNA对鼻咽癌细胞HNE-1增殖的影响

选择沉默效率最高的PCDGF-siRNA-1进行转染后,通过MTT法检测PCDGF基因对HNE-1细胞增殖的影响,绘制生长曲线(图6)。MTT法检测结果显示:种板48 h后,PCDGF-siRNA-1组HNE-1细胞增殖开始受到明显抑制,在48、72、96 h这3个时间点的细胞增殖抑制率分别为(37.07±12.40)%、(33.03±6.20)%和(36.83±4.30)%,与空白对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。



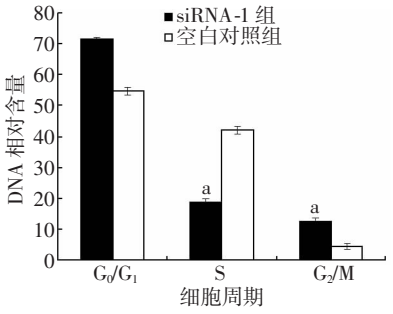

a:$P<0.05$,与空白对照组比较

**图6 MTT检测PCDGF-siRNA转染对HNE-1细胞生长的影响**

## 2.7 siRNA对鼻咽癌细胞HNE-1周期分布的影响

细胞48 h后,FCM法检测细胞周期结果显示,与空白对照组相比,siRNA-1转染组$G_1$期细胞比例明显增多,而S期细胞

减少,表明细胞增殖减慢。即沉默 PCDGF 基因表达后,鼻咽癌 HNE-1 细胞的增殖收到明显抑制。siRNA-1 转染组与空白对照组周期分布差异有统计学意义($P<0.05$),提示 siRNA-1 转染能将鼻咽癌 HNE-1 细胞阻滞于 $G_1$期(图 7)。




a:$P<0.05$,与空白对照组比较

**图 7 流式细胞仪检测 PCDGF-siRNA 转染对 HNE-1 细胞周期的影响**

## 3 讨论

Kong 等[8]研究发现,采用 RNA 干扰技术特异性沉默 PCDGF 基因在喉癌细胞株 hpe-2 中的表达,可导致细胞周期停滞,从而抑制癌细胞的异常增殖。本研究应用免疫组化技术检测了 PCDGF 蛋白在鼻咽癌及鼻咽部慢性炎症组织中的表达,发现鼻咽癌组织中 PCDGF 的表达呈强阳性或阳性表达,在鼻咽部慢性炎症组织 PCDGF 的表达是阴性或呈弱表达,两者之间差异具有显著性($P<0.01$)。表明了 PCDGF 参与了鼻咽癌的发生。RNAi 具有高效率长时间沉默靶基因的特点,在最优化的长度和剂量下,siRNA 能避免发生非特异性和毒性。siRNA 不需要进一步的化学修饰,它在血清中非常稳定,在培养哺乳细胞中也能保持高度活性,因此 RNAi 是研究基因功能和发展治疗的有力的工具[10]。本研究运用 RNAi 技术转染沉默鼻咽癌 HNE-1 细胞株中 PCDGF 基因的表达,观察其对鼻咽癌细胞增殖的影响。结果显示:转染组与未转染组相比,转染各组均有荧光的表达,表明成功将质粒转染入细胞中,转染率达 58%。利用 RT-PCR、Western blot 以及免疫荧光检测 siRNA 在 mRNA 和蛋白水平上的沉默效率,发现其均能有效下调 PCDGF 的表达,以 siRNA-1 抑制率最为明显。进一步研究发现,沉默 PCDGF 基因表达后,HNE-1 细胞的增殖能力减弱。实验结果提示 PCDGF 基因的沉默可能影响 HNE-1 细胞内 DNA 的复制和合成,抑制细胞的正常分裂,使细胞周期被阻滞于 $G_1$期。

有研究[11-13]表明 PCDGF 通过激活有丝分裂原激活的蛋白激酶(MAPK)途径、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)途径和局部黏附激酶(FAK)途径来调控细胞的增殖和凋亡。因此,沉默 PCDGF 基因可能通过抑制上述途径调控细胞增殖及细胞周期相关基因的表达等多种因素,影响鼻咽癌 HNE-1 细胞的体外增殖。当然,PCDGF 抑制鼻咽癌 HNE-1 细胞增殖的更多机制还有待进一步的研究。

综上所述,PCDGF 基因的异常表达在鼻咽癌的发生、发展中发挥重要作用,RNAi 技术能够特异性沉默 PCDGF 基因在鼻咽癌 HNE-1 细胞中的表达,并有效抑制 HNE-1 细胞增殖,提示 PCDGF 可作为预测鼻咽癌细胞增殖的一个新指标,有望成为鼻咽癌基因治疗的一个新靶点。

## 参考文献:

[1] Pizarro G O, Zhou X C, Koch A, *et al*. Prosurvival function of the granulin-epithelin precursor is important in tumor progression and chemoresponse[J]. Int J Cancer, 2007, 120(11): 2339-2343.
[2] 陈丽, 刘求真, 邱际华, 等. 人 Snail 基因 RNAi 慢病毒载体对鼻咽癌 5-8F 细胞增殖和侵袭的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(12): 1151-1154.
[3] 黄琨, 黄闯, 单葵, 等. PCDGF 和 VEGF 蛋白在皮肤鳞状细胞癌、基底细胞癌中的表达及临床意义[J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(3): 306-309.
[4] Kim W E, Serrero G. PC cell-derived growth factor stimulates proliferation and confers Trastuzumab resistance to Her-2-overexpressing breast cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(14 Pt 1): 4192-4199.
[5] 刘玉兰, 王燕, 郎雁, 等. 畸胎瘤细胞源性生长因子反义核酸载体对高度恶性人卵巢癌细胞增殖和侵袭的抑制效应及相关机制[J]. 中华肿瘤杂志, 2009, 31(2): 90-94.
[6] Chen X Y, Li J S, Liang Q P, *et al*. Expression of PC cell-derived growth factor and vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma and their clinicopathologic significance [J]. Chin Med J (Engl), 2008, 121(10): 881-886.
[7] Stewart D J. Tumor and host factors that may limit efficacy of chemotherapy in non-small cell and small cell lung cancer [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2010, 75(3): 173-234.
[8] Kong W J, Zhang S L, Chen X, *et al*. PC cell-derived growth factor overexpression promotes proliferation and survival of laryngeal carcinoma[J]. Anticancer Drugs, 2007, 18(1): 29-40.
[9] Serrero G, Ioffe O B. Expression of PC-cell-derived growth factor in benign and malignant human breast epithelium [J]. Hum Pathol, 2003, 34(11): 1148-1154.
[10] Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. Science, 2002, 296(5567): 550-553.
[11] Xu D, Suenaga N, Edelmann M J, *et al*. Novel MMP-9 substrates in cancer cells revealed by a label-free quantitative proteomics approach [J]. Mol Cell Proteomics, 2008, 7(11): 2215-2228.
[12] Liu Y, Xi L, Liao G, *et al*. Inhibition of PC cell-derived growth factor (PCDGF)/granulin-epithelin precursor (GEP) decreased cell proliferation and invasion through downregulation of cyclin D and CDK4 and inactivation of MMP-2 [J]. BMC Cancer, 2007, 7: 22.
[13] O'Grady A, Dunne C, O'Kelly P, *et al*. Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in non-melanonl skin cancer: implications for tumour progression[J]. Histopathology, 2007, 51(6): 793-804.

(**收稿**:2012-01-19;**修回**:2012-03-01)
(编辑 张 维)