基础研究 文章编号:0253-3626(2009)10-1313-04

shRNA 干扰介导 PLC ε 基因表达下调对膀胱癌 T24 细胞生长的影响

罗春丽[1],郭永灿[1],赵 懿[1],欧俐苹[1],颜 令[1],朴 军[2],吴小候[2]
(1.重庆医科大学检验系教育部重点实验室,重庆 400016;2.重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 shRNA 干扰沉默 PLC ε 基因对人膀胱癌 T24 细胞生长的影响。方法:体外构建 PLC ε 基因的 shRNA 的重组质粒,Lipofectamine2000 介导法转染 T24 细胞,采用 RT-PCR 方法检测特异性 shRNA 的重组质粒对 PLC ε 基因沉默效果,转染后采用 MTT 法检测 shRNA 的重组质粒对细胞增殖的作用,免疫细胞化学染色法检测 T24 细胞 PCNA 的表达,电镜观察细胞超微结构的改变。结果:shRNA 的重组质粒能有效下调 PLC ε 基因的表达,抑制率为 78.01%,与对照组比较其差异有统计学意义($P<0.01$);细胞增殖活性受到明显抑制,与对照组比较其差异有统计学意义($P<0.01$);细胞内 PCNA 含量明显低于空白对照组和阴性质粒组,其差异有统计学意义($P<0.01$);细胞形态改变产生凋亡小体。结论:PLC ε 基因有望成为应用 RNAi 技术探索治疗膀胱癌潜在的靶基因。

【关键词】膀胱癌; PLC ε 基因; RNA 干扰; 细胞增殖; 增殖细胞核抗原
【中国图书分类法分类号】R737.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-06-11

shRNA-mediated interference of gene expression PLC ε downturn on T24 bladder cancer cells

LUO Chun-li, et al
(*Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate whether PLC ε gene down regulation by RNA interference (RNAi) leads to inhibition of proliferation in human bladder carcinoma T24 cell. *Methods*: The shRNA recombinant plasmids targeting to PLC ε gene was constructed and transfected into bladder carcinoma T24 cell with Lipofectamine 2000. RT-PCR was used to monitor the validity of specific s h R N A in down regulation of PLC ε. Then MTT assay was performed for detecting cell proliferation, the changes of PCNA were analyzed by immunocytochemical method, Electron microscope was used to observe the morphological changes. *Results*: The specific PLC ε shRNA was confirmed to be efficient in silencing PLC ε expression. PLC ε gene down regulation by the shRNA recombinant plasmids inhibition cell proliferation rate about 78.01%, They were significantly different from that of control group ($P<0.01$; After transfected the specific recombinant plasmids, PCNA expression was significantly decreased, They were significantly different from that of control group ($P<0.01$; morphological changes produce apoptotic body. *Conclusion*: PLC ε is likely to be potential molecular target for bladder carcinoma in gene therapy by RNAi.

【Key words】Bladder carcinoma; PLC ε G gene; RNA interference; Cell proliferation; Proliferating cell nuclear antigen

PLCε 是 2001 年由 Song 等[1]发现并鉴定的一种新型人源磷脂酰肌醇磷脂酶 C,与新杆线虫 PLC210 有同源性并不同于所有哺乳动物中已知 PLC 同工酶。PLCε 与其他 PLC 家族(β、γ、δ、ζ)成员的同源性较少,构成了一个新 PLC 家族。研究显示[2]PLCε 基因在膀胱癌组织表达增加,与肿瘤的发生、发展密切相关,但作用机制还不明确。本研究以 PLCε 基因为靶点,设计构建其短发夹状 RNA 的重组质粒并转染膀胱癌 T24 细胞,观察 PLCε 基因对膀胱癌细胞生长的影响并探讨其作用机制,为膀胱癌基因治疗提供实验基础。

作者介绍:罗春丽(1957-),女,教授,
研究方向:泌尿系肿瘤的分子发生机制及防治干预措施。
通讯作者:吴小候,男,教授,E-mail:wuxiaohou80@hotmail.com。
基金项目:重庆市教委科学技术研究项目互助(KJ080306)。

1 材料和方法

1.1 材料

人膀胱癌细胞株 T24 细胞及大肠杆菌 DH5α（本室保存），pGenesil 绿色荧光蛋白质粒（武汉晶赛公司），引物合成、逆转录 PCR 试剂盒（TaKaRa 公司）；转染试剂 Lipofectamine 2000（美国 invitrogen 公司）；鼠抗人 PCNA 单克隆抗体，SP免疫组织化学试剂盒（通用型），DAB 显色试剂盒（北京中杉）。

1.2 方法

1.2.1 pGenesil-PLCε 重组质粒的构建与鉴定 在 GenBank 查阅 PLCε 的基因序列（NM_016341），选择特异性21nt寡核苷酸序列为靶位点，针对靶位点设计 1 对互补的寡核苷酸序列，序列中间为 9 bp 的发卡结构环状部分，末端再分别接上用于 RNA 聚合酶Ⅲ转录终止序列的 6 个 T 和 *BamH* Ⅰ及 *Hind*Ⅲ酶切位点，同时设计 1 对非特异性序列作为阴性对照。设计所有序列经 BLAST 检索，确认序列与人类其它基因无同源性后合成 shRNA 转录模板。靶序列：5'-GATCCGCACATACTGTCAGACGAAGTTTCAAGACGACTTCGTCTGACAGTATGTGCTTTTTTGTCGACA-3'；阴性对照：5'-GATCCACTACCGTTGTTATAGGTGTTCAAGACGCACCTATAACAACCGTAGTTTTTTTGTCGACA-3'。在 T4 DNA 连接酶的作用下目的基因片段分别与 *BamH* Ⅰ和 *Hind*Ⅲ双酶切 pGenesil 质粒连接后转化感受态大肠杆菌 DH5α 及含 Kanar 抗性（终浓度为 30 mg/L）的 LB 平板筛选获得重组质粒，重组质粒经 *Sal* Ⅰ酶切、DNA 测序鉴定证实构建成功。阳性质粒命名为 pGenesil-PLCε，阴性质粒命名为 pGenesil-NP。

1.2.2 细胞培养、转染及分组 常规更换含 10%胎牛血清 RPMI1640 培养液传代，当 T24 细胞均处于状良好的对数生长期采用阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 介导法转染，操作按试剂盒说明书进行，48 h 后收集细胞备用。实验分为 3 组：空白对照组（仅加入无血清培养基和转染试剂）；阴性质粒组（无血清培养基 + 转染试剂 +pGenesil-NP）；重组质粒组（无血清培养基 + 转染试剂 +pGenesil-PLCε），每组设 3 个复孔。重组质粒经 RT-PCR 及 Western blotc 测定证实转染成功。

1.2.3 MTT 法检测 T24 细胞的增殖 取对数生长期细胞，用 0.25%的胰酶将细胞消化成单个细胞悬液，调整细胞浓度为 5×10^4 个 /ml，接种于 96 孔平底培养板，每孔加入 200 μl。试验分 4 组（pGenesil-PLCε，pGenesil-NP，空白、调零），每组设 5 个复孔。转染后分别培养 0、24、48、72 h，弃上清，每孔加入 20 μl MTT（5 g/L）继续培养 4 h 弃上清，每孔加 150 μl DMSO，在酶标仪 570 nm 处读取每孔吸光度（OD 值）。按公式计算抑制率（%）=$[1-(OD_{转染}-OD_{调零})/(OD_{对照}-OD_{调零})]\times100\%$，计算各组抑制率。

1.2.4 免疫细胞化学染色法检测 T24 细胞增殖细胞核抗原（Proliferating cell nuclear antigen，PCNA）的表达 取对数生长期细胞按浓度 5×10^4 个/ml 接种于含有用多聚赖氨酸处理盖玻片的 24 孔平底培养板，每孔 500 μl。实验分 3 组（pGenesil-PLCε，pGenesil-NP，空白），每组设 3 个复孔。18～24 h 转染，48 h 后取出细胞爬片，PBS 洗涤 3 次，4%预冷多聚甲醛固定后，免疫细胞化学染色，方法参照 SP 免疫组化染色说明书。Image Pro Plus 5.1 图像分析软件进行图像分析和结果处理。

1.2.5 细胞超微结构观察 转染 3～5 周后用 0.25%胰酶消化细胞，收集细胞大于 1×10^6 个，将各组细胞悬液分别移入 4 只 EP 管中，4℃ 2 000 r/min 离心 20 min 后弃去上清液，加入 4%戊二醛 4℃固定 2 h，0.1MPBS（pH7.2）冲洗，1%锇酸再固定 1 h 后，丙酮梯度脱水，618 环氧树脂包埋，半薄切片，光镜定位，超半薄切片做成铅铜网，经醋酸铀、枸橼酸铅染色后，用日本 Hitachi-600 透射电镜观察及照相。

1.2.6 统计学处理 所有数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示，用统计学处理软件 SPSS11.5 进行方差分析，组间均数比较采用 SNK 法检验。

2 结 果

2.1 转染重组质粒后 T24 细胞 PLCε 基因 mRNA 的表达

RT-PCR 产物电泳结果显示（图 1），转染 pGenesil-PLCε 后 PLCε mRNA 表达明显低于空白对照组和 pGenesil-NP 组，差异有统计学意义（$P<0.01$）。以空白对照组为参照，重组质粒组细胞内 PLCε 基因表达下降了 76.01%，β-actin 表达量在各组之间无显著差异，表明 pGenesil-PLCε 能抑制 T24 细胞 PLCεmRNA 表达（表 1）。

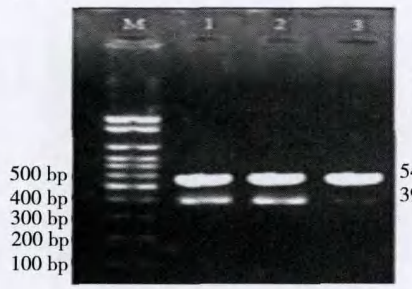
2.2 MTT 法检测 T24 细胞的增殖活性

pGenesil-PLCε 重组质粒转染 T24 细胞后能明显抑制细胞增殖（图 2），pGenesil-PLCε 与空白对照组、pGenesil-NP 比较差异有统计学意义（$P<0.01$）；而 pGenesil-NP 组与空白对照组比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。

2.3 下调 PLCε 后 T24 细胞生长能力的变化

免疫细胞化学法检测发现，仅转染脂质体和 pGenesil-NP 组绝大多数细胞内 PCNA 呈明显阳性，细胞核染成棕黄色（图 3A）；而转染 pGenesil-PLCε 后，PCNA 阳性明显降低，PCNA 阴性比例明显增加，细胞核染成淡蓝色（图 3B）。结果证明：重组质粒组转染细胞内 PCNA 含量明显低于空白对照组和 pGenesil-NP 组，其差异有统计学意义（$P<0.01$）。以空白对照组细胞内 PCNA 表达为参照，pGenesil-PLCε 组细胞内 PCNA 蛋白表达下降了 21.82%（表 2）。

电镜超微结构观察结果显示：转染 pGenesil-NP 组细胞形状不规则，大小不一，有多个核仁呈核分裂象核浆比例增大（图 4A）；转染 pGenesil-PLCε 可见细胞染色质凝固、细胞核碎裂，产生凋亡小体（图 4B）；细胞线粒体肿大呈空泡状排列在细胞核周围，



M. marker(100 bp); 1. control; 2. pGenesil-NP; 3. pGenesil-PLC ε

图 1 RT-PCR 分析各组细胞内 PLCε mRNA 表达

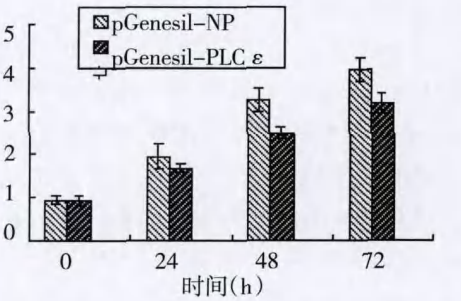
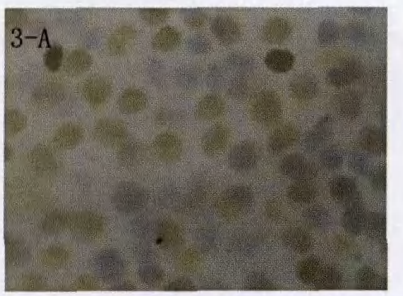


图 2 重组质粒在不同时间对 T24 细胞生长的抑制



A. T24 pGenesil-PLC ε ×400



B. T24 对照 ×400

图 3 免疫细胞化学法检测 T24 细胞 PCNA 表达



A B C

图 4 电镜观察转染 pGenesil-PLCε 后 T24 细胞形态改变

表 1 实验组与对照组 T24 细胞 PLCεmRNA OD 值

分组	OD($\bar{x}\pm s$)		比率	抑制率(%)
	PLC ε	β-actin		
对照	839.0 ± 81.3	1 679.3 ± 110.0	0.499 ± 0.013	/
pGenesil-NP	803.1 ± 78.0	1 671.5 ± 90.8	0.479 ± 0.01	4.28 ± 0.03
pGenesil-PLC ε	201.3 ± 10.8	1 658.2 ± 95.7	0.119 ± 0.02	76.01 ± 0.15

注: control ; pGenesil-PLC ε ($P<0.01$); pGenesil-NP ; pGenesil-PLC ε ($P<0.01$)

表 2 免疫细胞化学染色法分析 T24 细胞内 PCNA 含量变化

分组	OD	IR (%)
对照	0.196 ± 0.012	-
pGenesil-NP	0.187 ± 0.012	4.40 ± 2.54
pGenesil-PLC ε	0.153 ± 0.013	21.82 ± 8.23

即将死亡(图 4C)。

3 讨 论

膀胱移行细胞癌(Transitional cell carcinoma of the bladder, TCCB)是我国最为常见的泌尿系肿瘤, TCCB 细胞的异常增殖与肿瘤的侵袭和转移密相关, 这一病理过程涉及许多基因的参与。PLCε 基因是新发现的癌基因, 为磷脂酶 C(Phospholipase C, PLC)同工酶家族成员之一, 作为磷脂酰肌醇信号转导途

径中的关键酶,其结构、调控机制以及生物学功能引起了广泛关注。1998 年 Shibatohge 等[3]用酵母双杂交实验发现新杆线虫体内有一种能结合 LET60 的蛋白,这个蛋白分子量为 210kD,它不仅具有代表 PLC 典型特征催化结构域(X 和 Y)、C2 结构域同源具有特异性的 RA(Ras association,RA)结构域和氨基端 Ras GEF 结构域,因而命名为 PLC210。2001 年,Kelly、Song、Lopez 等利用 EST 文库新杆线虫 PLC210 序列来克隆哺乳动物正向同源蛋白 PLC210,由于它的蛋白质结构与所发现的哺乳动物 PLC 不同而被命名为 PLCε[4,5]。近年来研究证实 PLCε 为 H-Ras 众多的下游效应蛋白分子之一[6,7]。

H-ras 是膀胱癌最早发现癌基因之一,主要通过突变的蛋白致癌[2,3]。H-ras 突变致瘤机理主要是它编码的细胞膜蛋白(H-Ras)是一个鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(G 蛋白),该蛋白保留了 GTP 结合活性,失去了 GTP 水解活性,使 G 蛋白的持续激活;激活的 G 蛋白可以同多种效应蛋白分子相互作用,激活多条下游信号传递通路,本研究进一步证明:G 蛋白可能是通过激活 PLCε 信号传递通路使有丝分裂信号持续传入,细胞过度增殖而使细胞恶性转变。这与 Bai 等[8]得出的研究结论类似,他们利用转基因技术研究化学诱导剂诱导小鼠皮肤癌形成实验中发现 PLCε-/-小鼠新生皮肤成瘤时间明显延长,证实 PLCε 在促进皮肤癌形成,肿瘤细胞异常增殖过程中起着非常重要作用。

增殖细胞核抗原 PCNA 基因位于第 20 号染色体,全长约 7.0 kb,包含 5 个内含子和 6 个外显子,其编码产物为 36 kD 的蛋白,位于细胞核内,是DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白,为 DNA 合成所必需。PCNA 在核内表达增加预示着该细胞进入 S 期或 G_1 晚期,因此被作为细胞增殖状态的指标[9,10]。国内有人报道[11],膀胱移行细胞癌 PCNA 增殖指数随着膀胱移行细胞癌病理分级增高而增加;浸润肿瘤、复发组明显高于浅表性肿瘤、未复发组,证实在膀胱移行细胞癌组织中 PCNA 增殖指数可作为判断膀胱癌恶性程度、侵袭能力乃至预后指标。

本研究运用免疫细胞化学染色,检测 PLCε 特异性 shRNA 重组质粒转染人膀胱癌细胞株前后细胞内 PCNA 含量来观察细胞增殖状态,结果显示转染特异性重组质粒膀胱癌细胞内 PCNA 含量显著降低,提示进入 S 期或 G_1 晚期细胞减少;另外,电镜观察结果也证明凋亡小体增加,这些结果都表明肿瘤细胞增殖状态受到抑制。

综上所述,PLCε 是 H-ras 下游的效应分子,PLCε 与膀胱癌的发生、发展密切相关,主要是通过激活 PLCε 信号传递通路使有丝分裂信号持续传入,促使细胞过度增殖而使细胞恶性转变。采用靶向转染重组质粒 pGenesil-PLCε 于膀胱癌 T24 细胞后,发现 PLCε 基因表达能阻断它同 H-Ras 之间的信号联系,减少有丝分裂信号的持续传入,细胞内 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白 PCNA 含量减少,阻碍细胞内 DNA 复制,细胞阻滞于 G_0/G_1 期,从而延缓细胞生长、分裂,延长细胞周期,促进细胞凋亡,起到抗增殖的作用。因此采用 shRNA 干扰介导 PLCε 基因表达下调,阻止肿瘤增殖,可能是 TCCB 基因治疗新的有效途径。

参 考 文 献

[1] Song C, Hu C D, Masago M, et al. Regulation of a novel human phospholipase C, PLCepsilon, through membrane targeting by Ras[J]. Biol Chem, 2001, 276(4): 2752-2757.

[2] 郭永灿, 罗春丽, 蔡晓钟, 等. 磷脂酶 C ε 基因在膀胱移行细胞癌中表达及其临床意义 [J].临床检验杂志, 2008, 26(1): 52-54.

[3] Shibatohge M, Kariya K, Liao Y, et al. Identifcation of PLC210, a caenorhabditis elegans phospholipase C, as a putative effector of Ras[J]. Biol Chem, 1998, 273: 6182-6222.

[4] Song C, Hu C D, Masago M, et al. Regulation of a noval human phospholipase C, PLCepsilon, through membrane targeting by Ras[J]. Biol Chem, 2001, 276(4): 2752- 2757.

[5] Lopez I, Mark E C, Ding J R, et al. A noval bifunctional phosphlipase C that is regulated by G α 12 and stimulates the Ras/Mitogen-actives protein kinase pathway[J]. Biol Chem, 2001, 276(4): 2758-2765.

[6] Isabel, Eric, Ding J R, et al. A novel bifunctional phospholipase C that is regulated by G α 12 and stimulates the Ras/Mitogen-actived protein kinase pathway[J]. Biol Chem, 2001, 276(4): 2758-2765.

[7] Song C, Satoh T, Edamatsu H, et al. Differential roles of Ras and Rap1 *in growth factor-dependent activation of phospholipase C-ε*[J]. Oncogene, 2002, 21(53): 8105-8113.

[8] Bai Y F, Hironori E, Sakan M, et al. Crucial role of phospholipase C ε *in chemical carcinogen-induced skin tumor development cancer*[J]. Research, 2005, 64: 8808-8810.

[9] Bravo R, Macdonald Bravo H. Existense of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites[J]. Cell Biol, 1987, 105(4): 1549-1554.

[10] Baserga R. Growth regulation of the PCNA gene[J]. Cell Sci, 1991, 98(4): 433-436.

[11] 陈凌武, 梅 骅. 表浅膀胱移行细胞癌中 PCNA 表达及其与复发的关系[J].中华泌尿外科杂志, 1996, 17(9): 524-526.

(责任编辑:冉明会)