

文章编号:1000-5404(2013)10-0961-04

论著

慢病毒介导 shRNA 沉默 HDAC1 表达对 EC109 细胞生长特性的影响

刘洋博¹, 何刚², 章波², 庞学利¹ (400038 重庆, 第三军医大学: 西南医院肿瘤科¹; 基础医学部医学遗传学教研室²)

[摘要] **目的** 应用慢病毒介导的 RNA 干扰技术, 有效沉默食管癌细胞株 EC109 的 HDAC1 表达并观察其对细胞生长的影响。**方法** 以 HDAC1 为靶基因, 合成寡核苷酸, 退火形成双链 DNA, 与经 Age I 和 EcoR I 酶切后的 pGCSIL-PUR 载体连接获得重组慢病毒载体; 将其与病毒复制包装质粒共感染 293T 细胞, 收集并浓缩上清液获得重组病毒, 测定病毒滴度; 病毒颗粒转染 EC109 细胞, 通过荧光显微镜等观察转染效率并经有限稀释法获得单克隆来源的细胞系; 定量 PCR 及 Western blot 检测 HDAC1 的表达; 并观察 EC109 细胞的生长特性。**结果** 成功构建干扰 HDAC1 表达的慢病毒载体 pGCSIL-SiHDAC1, 并在 293T 细胞中包装获得病毒。重组病毒感染 EC109 细胞后, HDAC1 mRNA 和蛋白水平检测显示干扰组细胞的 HDAC1 的表达水平较对照组显著降低 ($P < 0.05$)。HDAC1 下调的 EC109 细胞的增殖能力明显下降 ($P < 0.05$)。**结论** 慢病毒介导的 shRNA 能有效的沉默食管癌细胞 EC109 中的 HDAC1 的表达, 并且能抑制其细胞的增殖。

[关键词] HDAC1; 慢病毒; 食管癌细胞; 细胞生长

[中图分类号] 394.33; R73-362; R735.1

[文献标志码] A

Effects of lentivirus-mediated HDAC1 silencing on cell growth in esophageal cancer cell line EC109

Liu Yangbo¹, He Gang², Zhang Bo², Pang Xueli¹ (¹ Department of Oncology, Southwest Hospital, ² Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To suppress the gene expression of HDAC1 in human esophageal cancer cell line EC109 and to observe its impact on cell growth. **Methods** Synthesized oligonucleotide was cloned into a lentiviral vector pGCSIL-PUR digested with Age I and EcoR I. The recombinant vector was further screened by PCR and verified by sequencing, and was transfected into package cells 293T with helper vectors. Recombinant lentivirus and control were extracted from cell culture and were used to infect EC109 cells. Individual cell clone was picked up and gene expression of HDAC1 was determined by real-time PCR and Western blotting. Cell growth and cell cycle distribution were detected by CCK-8 and FACS, respectively. **Results** Recombinant vector was successfully constructed, and sufficient lentivirus was obtained from package cells. The recombinant lentivirus can efficiently infect EC109 cells, and two clones were picked up from the infected EC109 cells. The results of real-time PCR and Western blotting showed HDAC1 gene expression was efficiently suppressed in EC109 cells, of which cell growth and cell cycle distribution were significantly altered. **Conclusion** The RNAi technology based on lentivirus can efficiently suppress the gene expression of HDAC1 in EC109 cells, and lead to cell growth inhibition.

[Key words] HDAC1; lentivirus; esophageal cancer cell; cell growth

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81050028). Corresponding author: Pang Xueli, E-mail: pangxueli79@gmail.com

肿瘤是危害人类健康的重要疾病之一, 在全球范围内其死亡率仅次于心脑血管疾病。而肿瘤的发生是一个非常复杂的过程, 并且受到多重因素的影响, 包括个体遗传因素、环境因素、物理化学因素、分子生物学

因素等。随着生命科学的迅速发展和有关肿瘤致病机制、发病机制的分子生物学研究的深入开展, 分子生物学因素在肿瘤发生中的突出作用被逐步揭示, 影响细胞生长、增殖的基因和参与细胞生长增殖调控的各种因子的失活成为肿瘤发生的关键诱因^[1-3]。研究^[4]表明组蛋白乙酰化与去乙酰化异常可导致染色质结构改变, 使调控细胞周期、细胞分化、凋亡的基因转录失衡,

[基金项目] 国家自然科学基金(81050028)

[通信作者] 庞学利, E-mail: pangxueli79@gmail.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130321.1057.006.html> (2013-03-21)

从而导致细胞的恶变。近年来,组蛋白乙酰化修饰在肿瘤的发生、发展中的作用逐渐受到关注^[5-6]。在肿瘤细胞中组蛋白大多呈低乙酰化状态,组蛋白乙酰化状态的失衡与肿瘤发生、发展密切相关^[7]。HDAC1是细胞内广泛存在的一类组蛋白去乙酰化酶,在肿瘤细胞中存在异常表达,并最终导致肿瘤的发生与发展。这提示可以该基因为靶点进行抗肿瘤治疗^[8]。

慢病毒(lentivirus)较一般的逆转录病毒载体具有明显的优势:①不仅可以感染分裂细胞还能感染非分裂细胞^[9];②可以稳定整合于宿主细胞的基因组中,并稳定表达^[10];③具有可遗传性,且干扰细胞正常的功能^[4]。在以往的研究^[11]中,我们采用RNAi技术以质粒载体转染EC109细胞,结果显示:HDAC1的表达可以被有效地抑制,组蛋白乙酰化水平明显提高。同时,通过细胞凝胶电泳和H2Ax表达水平检测DNA的辐射损伤,结果显示DNA损伤变得更加严重,提示EC109细胞对射线更加敏感。本研究拟在此基础上构建干扰HDAC1表达的慢病毒载体,建立稳定的细胞系以观察其对食管癌细胞生长的影响。以期为进一步探索其中的分子机制以及治疗方式奠定基础,也为控制肿瘤的发生、发展提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

人食管癌细胞系EC109由第三军医大学基础医学部医学遗传学教研室提供,人胚肾293T细胞由第三军医大学西南医院中心实验室提供,慢病毒载体pGCSIL-PUR购自上海吉凯基因技术公司,限制性内切酶Age I、EcoR I(NEB),DNA ladder, Taq polymerase, T₄ DNA ligase, SanPrep柱式质粒小量抽提试剂盒, SanPrep柱式PCR产物纯化试剂盒均购自上海生工。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒载体的构建 根据Genbank中人HDAC1的序列,靶序列设计与合成均由上海吉凯基因化学技术有限公司完成。HDAC-1引物上游:5'-CcggaGAAGTCCGAGGCATCTGCGCTCGAGGCCAGATGCCTCGGACTTCuTTTTTg-3',下游:5'-aa-ttcaaaaaGAAGTCCGAGGCATCTGGCTCGAGGCCAGATGCCTCGGACTTCt-3'。小写为酶切位点。将其退火形成双链连接到经Age I、EcoR I双酶切的慢病毒pGCSIL-PUR载体中。转化大肠杆菌,PCR筛选重组子,并进行序列测定。

1.2.2 慢病毒包装与病毒浓缩收集 根据Lipofectamine2000使用说明,将含有重组的慢病毒载体pGCSIL-SiHDAC1与病毒包装辅助质粒共感染293T细胞,以空载体为对照。转染4 h后,加入完全培养基继续培养。48 h后收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液,并于4℃、4 000×g离心10 min后,以0.45 μm过滤器过滤。过滤后的上清与4℃、25 000 r/min离心2 h,用DMEM重悬病毒沉淀并于4℃溶解过夜,获得重组慢病毒LV-SiHDAC1和对照慢病毒LV-Con,并用孔稀释法测定病毒滴度。

1.2.3 慢病毒感染EC109细胞 利用所收集获得的病毒感染EC109细胞。根据病毒滴度控制感染复数(MOI=10),将慢病毒LV-SiHDAC1与对照慢病毒LV-Con分别感染EC109细胞,感染至1 d后在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光。感染2 d后,采用有限稀释法将细胞种植于96孔板,1细胞/孔,继续培养10~14 d,获得单克隆来源的细胞系,扩大培养。

1.2.4 稳定表达细胞系中的HDAC1的表达检测 选取感染后Si-HDAC1-1和Si-HDAC1-2组,Real-time PCR检测病毒感染后EC109中HDAC1 mRNA水平的改变。分别提取对照病毒感染组(NC)、重组慢病毒感染组细胞总RNA,将1.0 μg RNA逆转后的cDNA为模板,每个组设立3个复孔进行定量PCR检测。反应条件为:95℃ 2 min;95℃ 10 s,62℃ 10 s,72℃ 30 s(40个循环)。以GAPDH基因为参照,根据各组的Ct值,采用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各组之间HDAC1基因的mRNA表达水平的差异。

Western blot检测EC109细胞中的HDAC1表达。各组细胞的总蛋白样品经10% SDS-PAGE分离后转印至PVDF膜上;封闭后一抗4℃孵育过夜,洗膜后室温孵育二抗1 h,洗膜,ECL法进行,行胶片曝光。

1.2.5 细胞周期的测定 将处于对数生长期的对照病毒感染组(NC)和重组慢病毒感染组细胞进行血清饥饿16 h,然后加入含血清的完全培养基继续培养24 h。收集细胞,70%乙醇固定后进行碘化丙啶(PI)染色,最后进行流式检测。

1.2.6 细胞增殖测定 将处于对数生长期的对照病毒感染组(NC)和重组慢病毒感染组细胞经过胰酶消化计算,种植于96孔板,5×10⁴个细胞/孔。分别于1、5 d后采用MTT法测定各孔波长450 nm处的光密度值[D(450)]。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0统计学分析软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2组均数的比较用t检验。

2 结果

2.1 慢病毒载体的构建

本研究使用的慢病毒载体为pGCSIL-PUR, Age I、EcoR I双酶切后待用。将合成的片段退火后形成双链,与酶切后载体连接。转化大肠杆菌E. coli XL-blue后获得大量转化子。经PCR筛选鉴定出重组克隆,并最终经测序鉴定获得重组质粒。经重组质粒的序列测定证实载体构建成功,命名为pGCSIL-SiHDAC1。

2.2 慢病毒包装及转染EC109细胞

重组慢病毒载体pGCSIL-SiHDAC1与病毒包装辅助质粒(pHelper2.0和pHelper1.0)共转染293T细胞,以空载体为对照。细胞转染48 h后,荧光显微镜下可见绿色荧光,提示转染成功。从转染后的293T细胞中分离并浓缩获得慢病毒LV-SiHDAC1和对照慢病毒LV-Con。浓缩后的病毒滴度测定分别为3×10⁷和10⁸,可用于靶细胞的感染。

将获得的慢病毒SiHDAC1感染EC109细胞(MOI=10),1 d后可见EC109细胞发出绿色荧光感染效率可达90%以上(图1A)。为获得单克隆来源的EC109细胞,采用有限稀释法将细胞种植于96孔板,从中获得单一来源的、发绿色荧光的细

胞克隆(图1B)。将其放大培养,分别提取总蛋白和RNA备用。

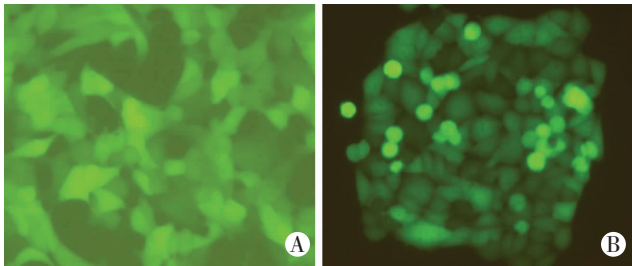


图1 荧光显微镜观察慢病毒 LV-SiHDAC1 感染的 EC109 细胞及筛选后的细胞克隆

2.3 HDAC1 基因的表达检测

为检测慢病毒 LV-SiHDAC1 在 EC109 细胞中的干扰效果,首先经 Real-time PCR 检测 mRNA 水平的改变。如图 2A 所示,在感染 LV-SiHDAC1 病毒组的 2 个单克隆细胞中, Si-HDAC1、2 组细胞中的 HDAC1 基因表达明显低于对照病毒感染组(NC),说明在该细胞系中 LV-SiHDAC1 病毒有明显的抑制 HDAC1 基因表达的效果。

为了进一步说明 LV-SiHDAC1 的干扰效果,Western blot 检测细胞总蛋白。与对照组相比,在慢病毒 LV-SiHDAC1 感染后的 Si-HDAC1-2 组细胞系中其 HDAC1 蛋白表达的明显降低 ($P < 0.05$, 图 2B),这和 mRNA 水平的改变一致。

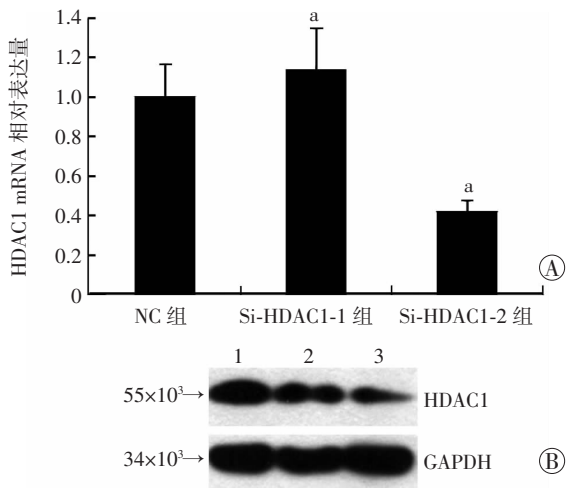


图2 慢病毒 LV-SiHDAC1 对 EC109 细胞 HDAC1 表达的抑制作用
A: Real-time PCR 检测各组 HDAC1 mRNA 表达 a: $P < 0.05$, 与 NC 组比较; B: Western blot 检测各组细胞 HDAC1 蛋白表达 1: NC 组; 2: Si-HDAC1-1 组; 3: Si-HDAC1-2 组

2.4 干扰 HDAC1 基因对细胞生长特性的改变

为了比较干扰 HDAC1 基因表达对细胞生长特性的影响,选择 Si-HDAC1-2 组细胞和 NC 组细胞进行深入检测。首先采用流式细胞术比较了细胞周期分布。结果显示:在 HDAC1 受到抑制的细胞中,其 S 期减少, G_1 期增加。提示 HDAC1 基因表达抑制可影响到细胞周期分布(图 3)。随后测定了细胞增殖速率(图 4),结果显示: HDAC1 基因表达抑制后,细胞的增殖活

性降低,与 NC 组比较差异显著 ($P < 0.01$)。这些结果说明干扰 HDAC1 基因的表达可引起 EC109 细胞生长特性的改变。

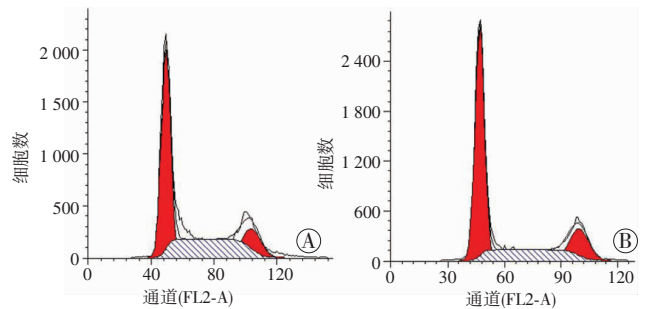


图3 流式细胞仪检测病毒感染的对照组(A)与慢病毒组(B)感染后细胞周期变化

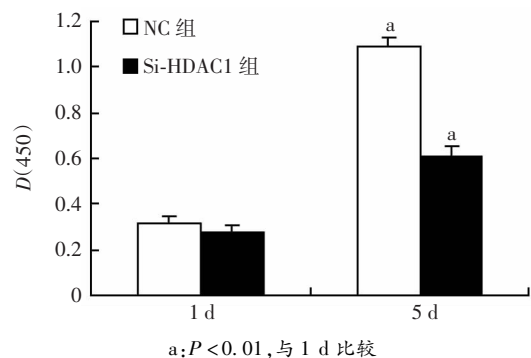


图4 MTT 法检测不同时间各组 EC109 细胞增殖
a: $P < 0.01$, 与 1 d 比较

3 讨论

食管癌为我国多发的常见消化道恶性肿瘤,其发病率呈逐年增加趋势。近年来随着表观遗传学的兴起和发展,研究肿瘤的发生、发展进入了一个新阶段。组蛋白的乙酰化状态由组蛋白乙酰化酶(HATs)和组蛋白去乙酰化酶(HDACs)协调控制,在正常组织中,二者处于平衡状态。组蛋白乙酰化酶家族与去乙酰化酶家族参与了 DNA 的损伤修复、染色体异位、转录调控、基因沉默、细胞周期、细胞分化与增殖、细胞凋亡等多种过程。组蛋白乙酰化与去乙酰化异常可以导致肿瘤的发生。就基因的表达与调控而言,肿瘤的特征之一是其基因的转录处于一种错误调节之中。大量研究^[12-14]表明:肿瘤中 HATs 和 HDACs 活性发生了改变,导致组蛋白的异常修饰,引起“组蛋白密码”的改变。目前发现在哺乳动物中,HDAC 家族至少有 HDAC7 种,他们之间具有高度的同源性,其中 HDAC1 与肿瘤的关系最具代表性^[15]。由于肿瘤中显示出异常的组蛋白乙酰化,所以以此为作用靶点是一种全新的肿瘤治疗途径。研究^[16-20]表明 HDAC 可以通过诱导细胞凋亡和分化、促进细胞周期阻滞而抑制肿瘤细胞的增殖。

本研究采用慢病毒为工具介导 HDAC1 基因的干

扰。慢病毒能使目的基因整合至宿主基因组,实现稳定转染,并同时感染分裂期和非分裂期细胞,且不易诱发宿主免疫反应,转染效率高,是近年稳定转染最常用的工具^[21]。我们利用RNA技术下调组蛋白去乙酰化酶表达来探讨其对细胞增殖的影响。本实验设计出HDAC1基因RNA干扰的有效靶序列,成功构建表达shRNA慢病毒载体;并通过病毒包装,收集和浓缩,得到了可用于后续实验的高滴度慢病毒载体。在感染293T细胞后,于荧光显微镜下观察到有90%的细胞发出绿色荧光;用Western blot鉴定证实所构建的慢病毒载体能够有效地抑制HDAC1蛋白的表达,通过Real-time PCR检测EC109细胞中HDAC1基因mRNA的表达水平,显示出明显的抑制作用。通过Western blot检测重组慢病毒对EC109细胞HDAC1蛋白表达的变化,结果显示,与对照相比,转染组HDAC1蛋白的表达量明显下降,并且能明显改变细胞周期的变化,抑制细胞生长。由于慢病毒可将外源的DNA整合到宿主细胞基因组中,而具体的整合位置对外源DNA的表达有一定影响。本实验结果显示,重组的慢病毒感染后所获得的2个细胞系,其HDAC1基因表达状态有一定差异。这与外源DNA整合的位置有一定关系。

我们通过慢病毒沉默HDAC1作用与食管癌细胞EC109,初步发现HDAC1沉默可以阻滞食管癌细胞EC109于细胞周期G₀/G₁期,诱导细胞凋亡发生,从而抑制细胞的增殖,进一步说明HDAC1的基因沉默可以通过细胞凋亡产生抗肿瘤活性。本研究采用慢病毒介导的RNAi技术来抑制HDAC1活性其作用将会更加直接、特异,为进一步研究HDAC1沉默后对放疗增敏奠定了基础,为控制肿瘤发生、发展提供了新的靶点和思路。

参考文献:

- [1] 谢爱华, 廖晨钟, 李伯玉, 等. 以组蛋白去乙酰化酶为靶标的抗癌药物研发进展[J]. 中国新药杂志, 2005, 14(1): 10-14.
- [2] Barba M, Felsani A, Rinaldi M, *et al.* Reducing the risk of overdiagnosis in lung cancer: a support from molecular biology[J]. J Cell Physiol, 2011, 226(9): 2213-2214.
- [3] Cho W C. Molecular diagnostics for monitoring and predicting therapeutic effect in cancer[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2011, 11(1): 9-12.
- [4] Liu T, Xu F, Du X, *et al.* Establishment and characterization of multi-drug resistant, prostate carcinoma-initiating stem-like cells from human prostate cancer cell lines 22RV1[J]. Mol Cell Biochem, 2010, 340(1/2): 265-273.
- [5] Wu Y, Song S W, Sun J, *et al.* Hsp45 inhibits cell migration through inhibition of HDAC6[J]. J Biol Chem, 2010, 285(6): 3554-3560.
- [6] Mishra A, Liu S, Sams G H, *et al.* Aberrant overexpression of IL-15 initiates large granular lymphocyte leukemia through chromosomal instability and DNA hypermethylation[J]. Cancer Cell, 2012, 22(5): 645-655.
- [7] Hayashi A, Horiuchi A, Kikuchi N, *et al.* Type-specific roles of histone deacetylase (HDAC) overexpression in ovarian carcinoma: HDAC1 enhances cell proliferation and HDAC3 stimulates cell migration with downregulation of E-cadherin[J]. Int J Cancer, 2010, 127(6): 1332-1346.
- [8] Guo S W, Che H M, Li W Z. Anti-tumor effect of lentivirus-mediated gene transfer of alphastatin on human glioma[J]. Cancer Sci, 2011, 102(5): 1038-1044.
- [9] Husser L, Alves M P, Ruggli N, *et al.* Identification of the role of RIG-I, MDA-5 and TLR3 in sensing RNA viruses in porcine epithelial cells using lentivirus-driven RNA interference[J]. Virus Res, 2011, 159(1): 9-16.
- [10] Rubinson D A, Dillon C P, Kwiatkowski A V, *et al.* A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference[J]. Nat Genet, 2003, 33(3): 401-406.
- [11] Zhang B, Wang Y, Pang X. Enhanced radiosensitivity of EC109 cells by inhibition of HDAC1 expression[J]. Med Oncol, 2012, 29(1): 340-348.
- [12] 夏昕晖, 何莉, 戴福宏, 等. 调控组蛋白乙酰化水平抑制膀胱癌细胞周期的研究[J]. 现代肿瘤医学, 2009, 17(4): 613-617.
- [13] Jones P A, Martienssen R. A blueprint for a Human Epigenome Project: the AACR Human Epigenome Workshop[J]. Cancer Res, 2005, 65(24): 11241-11246.
- [14] Pazin M J, Kadonaga J T. What's up and down with histone deacetylation and transcription? [J]. Cell, 1997, 89(3): 325-328.
- [15] Laherty C D, Yang W M, Sun J M, *et al.* Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression[J]. Cell, 1997, 89(3): 349-356.
- [16] Archer S Y, Meng S, Shei A, *et al.* p21 (WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(12): 6791-6796.
- [17] Shi Y, Mello C. A CBP/p300 homolog specifies multiple differentiation pathways in Caenorhabditis elegans [J]. Genes Dev, 1998, 12(7): 943-955.
- [18] Takai N, Narahara H. Human endometrial and ovarian cancer cells: histone deacetylase inhibitors exhibit antiproliferative activity, potently induce cell cycle arrest, and stimulate apoptosis [J]. Curr Med Chem, 2007, 14(24): 2548-2553.
- [19] 王淑艳, 张恩. 慢病毒载体的设计及应用进展[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(11): 70-75.
- [20] Joshi A, Garg H, Ablan S, *et al.* Targeting the HIV entry, assembly and release pathways for anti-HIV gene therapy[J]. Virology, 2011, 415(2): 95-106.
- [21] Hu B, Tai A, Wang P. Immunization delivered by lentiviral vectors for cancer and infectious diseases [J]. Immunol Rev, 2011, 239(1): 45-61.

(收稿:2012-12-18;修回:2013-03-04)

(编辑 汪勤俭)