

· 基础论著 ·

探讨肝再生磷酸酶 3 在脑胶质瘤细胞 SHG-44 中作用

郭兆刚 刘少壮 于垂恭 孙晓雪

【摘要】 目的 研究肝再生磷酸酶 3(PRL-3)在胶质瘤细胞 SHG-44 中作用。方法 采用 siRNA 干涉的方法下调 SHG-44 中 PRL-3 表达水平,通过 Western blot 方法检测干涉效果,绘制细胞生长曲线、流式细胞仪检测细胞周期及凋亡以观察下调 PRL-3 对 SHG-44 细胞的影响。结果 Western blot 提示 siRNA 能够下调 PRL-3 在 SHG-44 细胞中的表达,细胞生长曲线显示下调 PRL-3 能够抑制细胞的增殖,流式细胞仪检测发现下调 PRL-3 的表达可以促进 SHG-44 细胞 G1 期阻滞,S 期减少,凋亡增加。结论 下调 PRL-3 能够明显抑制 SHG-44 细胞的增殖,PRL-3 很可能成为脑胶质瘤基因治疗的新靶点。

【关键词】 神经胶质瘤; RNA,小分子干扰; 基因疗法; 肝再生磷酸酶 3

Analysing the function of phosphatase of regenerating liver-3 in brain glioma cell line-SHG-44 GUO Zhao-gang, LIU Shao-zhuang, YU Chui-gong, SUN Xiao-xue. Department of Neurosurgery, Armed Police Hospital of Liaoning Province, Shenyang 110034, China

Corresponding author: GUO Zhao-gang, Email: wangcong2106@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the inhibition of phosphatase of regenerating liver -3 (PRL-3) in brain glioma cell line-SHG-44. **Methods** PRL-3 siRNA was designed and transfected into SHG-44 cell (the transfection was performed using Lipofectamine™ 2000). The interfering effects were detected by western blot. The affection of the siRNA on cell proliferation was observed through cell growth curve. The variation of cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry. **Results** The results of RT-PCR and western blot indicated that the siRNA could down-regulate the expression of PRL-3 in SHG-44 cell properly. Cell growth curves indicated that down-regulation of PRL-3 could suppress the proliferation of the SHG-44 cells. siRNA-transfected cells showed a increase in G1 phase and a decrease in S phase. PRL-3 siRNA induced apoptosis increasing in comparison with the control. **Conclusion** Down-regulation of PRL-3 could suppress the proliferation of the SHG-44 cells significantly. These results indicated that PRL-3 might become a new target gene for glioma therapy.

【Key words】 Glioma; RNA, small interfering; Gene therapy; Phosphatase of regenerating liver-3

脑胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤,约占全部颅内肿瘤的 40% ~ 50%,其中中低度分化星形细胞瘤和胶质母细胞瘤患者的 1 年存活率较低,由于肿瘤细胞的耐受及血脑屏障的原因,其对放化疗均不敏感,所以基因治疗能否成为治疗脑胶质瘤的有效新方法亟待考证^[1]。有关研究显示肝再生磷酸酶 3(PRL-3)与多种肿瘤的关系非常密切,特别是已经出现转移的恶性肿瘤。本文主要关注其在脑胶质瘤中的作用,考察其作为脑胶质瘤治疗靶点的可能性。

材料与方法

1. 细胞培养:人脑胶质瘤细胞系 SHG-44 提供单位为中国医科大学生化实验室。新生牛血清由灏洋生物技术公司(天津)生产,RPMI-1640 生产自 Gibco 公司。SHG-44 接种在塑料培养瓶中,5% 二氧化碳浓度培养箱中进行培养,温度设定在 37 °C,培养液为含有胎牛血清(10%) RPMI-1640。

2. PRL-3 siRNA 干涉:按照 PRL-3 mRNA (NM_007079.2, NCBI) 序列设计 siRNA 基因两对,正义链 5'-ACAGAGGCCUGCGGUCAAATT-3', 反义链 5'-UUU-GAACCGCAGCCUCUGUTT-3' (目标序列 722 ~ 743 bp)。验证特异性的软件为 BLAST 软件。由奥科生物工程技术有限公司(北京)服务公司合成上述序列。将人脑胶质瘤细胞 SHG-44 在 RPMI-1640 培养液(含有浓度为

10%的热灭活胎牛血清)中进行常规培养,直至培养细胞出现良好的生长状态。细胞计数后将其培养于6孔板中,每孔接种密度为 5×10^5 ,继续进行培养24 h,在光学显微镜下进行观察,当汇合率超过80%同时细胞贴壁良好时进行转染。根据试剂说明书(Lipofectamine™ 2000)进行转染操作。siRNA转染SHG-44。将实验分为阴性对照组、空白对照组及小干扰RNA(siRNA)组三个组别,阴性对照组为脂质体,空白对照组经PBS处理。

3. 蛋白印迹检测(Western blot): SHG-44细胞总蛋白的提取应用TAKARA公司生产的蛋白裂解液,总蛋白定量根据定量试剂盒说明书采用BCA法进行。将蛋白质总量样品(40 μ g)进行SDS-PAGE凝胶电泳(120 g/L),然后转移凝胶至硝酸纤维素膜(NC)上,为观察转移效果进行丽春红染色,对Marker位置进行标记。将脱脂牛奶(50 g/L)在室温条件下封闭1 h,将武汉博士德公司生产的鼠抗人GAPDH多克隆一抗、鼠抗人PRL-3单克隆一抗孵育1 h,在4 $^{\circ}$ C下过夜,将羊抗鼠辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗在室温条件下孵育1 h,增强化学发光(ECL)试剂加入到暗室内,进行X光片定影及显影。

4. 绘制细胞生长曲线(采用噻唑蓝比色法):选取处于对数生长期SHG-44细胞,接种于96孔板,接种密度为每孔3000细胞/200 μ l,培养过夜。siRNA2感染细胞根据脂质体说明书操作,每组设置复孔6个,空白对照组为PBS处理后的A489细胞,阴性对照仅加入脂质体。在培养至12 h、24 h、48 h、60 h、72 h时将新鲜配制的噻唑蓝溶液(5 mg/ml)20 μ l加入到培养孔中,继续在37 $^{\circ}$ C的温度下培养4 h,加入Gibco公司生产的二甲基亚砜150 μ l,振荡10 min,待结晶物溶解充分后在酶标仪上对各孔光吸收值进行测定,波长选择490 nm,计算6个复孔OD平均值。最后绘制细胞的生长曲线,纵轴为感染时间,横轴为OD值。

5. 流式细胞仪检测:将A489细胞接种于6孔板中,密度为 5×10^5 /孔,转染细胞方法同前,同时设置空白对照组,转染72 h后将获得的细胞向离心管中转移,PBS溶液洗涤,75%乙醇固定。应用结合缓冲液50 μ l重悬细胞,将AnnexinV-FITC及碘化丙啶(PI)加入到处理的每组细胞中,在室温下温育15 min,注意避光,上机检测。采用CellQuit Plot分析软件(美国Becton Dickinson公司)对细胞凋亡及细胞周期变化进行分析。

6. 统计学分析:应用SPSS 15.0版本统计学软件,应用单因素方差分析,多样本组间比较应用SNK-q检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

结 果

1. Western blot的结果(图1):与阴性对照组及空白对照组比较,PRL-3蛋白在siRNA干扰组的表达水平降低明显,而各个组间内参照GAPDH变化不明显。因此,本实验中设计的PRL-3 siRNA干扰作用能够正常发挥,下调PRL-3表达。

2. 细胞生长曲线(图2):随着培养时间的推移,三组细胞均呈现出了扩增趋势,但是与空白对照组及阴性对照组比较,siRNA转染组细胞生长自感染后48 h开始受到抑制,随着时间的推移,这种抑制作用更加显著($P < 0.05$),而阴性对照组与空白对照组相比,细胞生长状况未见明显差异($P > 0.05$)。

3. 细胞周期与凋亡(图3,4):siRNA转染组与对照相比较,G1期细胞比例出现增加,S期细胞比例下降,凋亡检测结果显示细胞凋亡比例升高。表明下调PRL-3的表达可促使SGH-44细胞发生G1期阻滞,并促进其凋亡,从而达到抑制其生长的目的。

讨 论

脑胶质瘤是颅内常见的恶性肿瘤,来源于星型细胞或少突胶质细胞,是发生于神经外胚层的肿瘤。无论是低级别胶质瘤还是高级别胶质瘤,其生长方式均为浸润性生长,手术无法彻底清除,需要结合放疗、化疗、生物治疗等综合手段来延长患者生存期^[2]。基因治疗是生物治疗的一种,其中小RNA干扰(RNAi)是其重要组成部分。RNAi是由双链RNA所引发的特异性基因沉默,siRNA是双链小片段RNA(21~23 nt),能够特异性结合互补靶基因mRNA序列,对其讲解产生诱导作用,RNA干扰效应十分强大。siRNA和靶序列间碱基配对十分严格,特异性很强,能够在翻译水平、转录后水平、转录水平、染色质水平参与调节基因表达^[3]。

PRL-3蛋白酪氨酸磷酸酶家族成员。同一家族的3名成员PRL-1,PRL-2,PRL-3在基因序列和氨基酸序列上具有高度的同源性,提示它们在功能上具有类型和功能的互补性。PRL-3在肿瘤中的作用最先从消化道肿瘤开始,研究发现结肠癌的肝转移灶中PRL-3出现高表达,还有在胃癌中也出现了PRL-3的高表达^[4-5]。有文献报道,其PRL-3通过脱磷酸及其COOH末端定位于细胞质膜等一系列的作用,发挥促进肿瘤细胞增殖、侵袭及肿瘤血管生成的作用^[6]。已有研究证实证明脑胶质瘤中PRL-3高表达,它能促进胶质瘤的增值和侵袭,我们通过siRNA干涉的方式下调脑胶质瘤细胞SGH-44中PRL-3表达^[7],同时我们的实验表

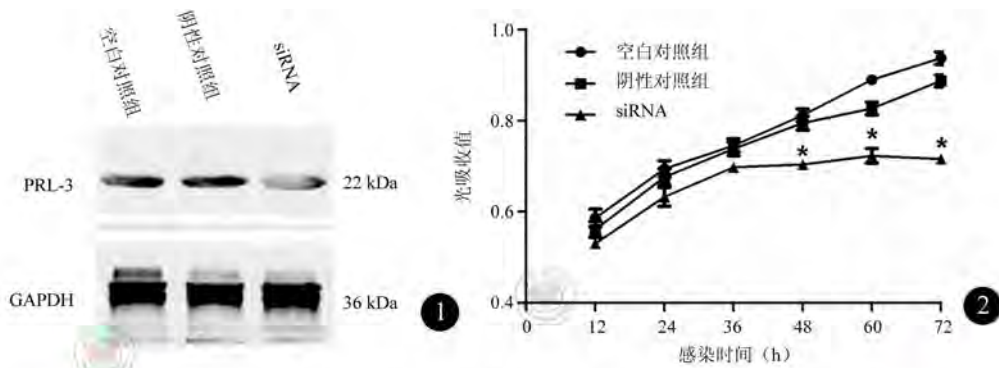


图1 Western blot检测siRNA干涉效果 图2 细胞生长曲线 (MTT法, 同对照组相比, * $P < 0.05$)

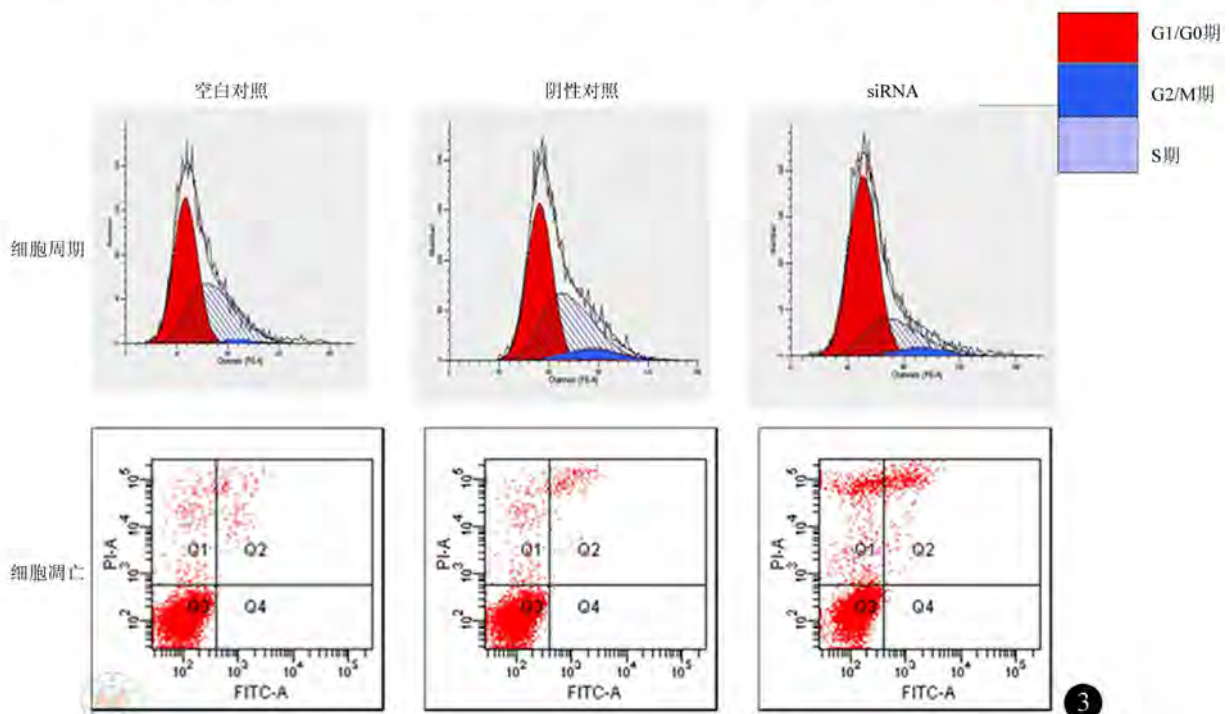


图3 流式细胞仪检测PRL-3 siRNA干涉对SGH-44细胞影响

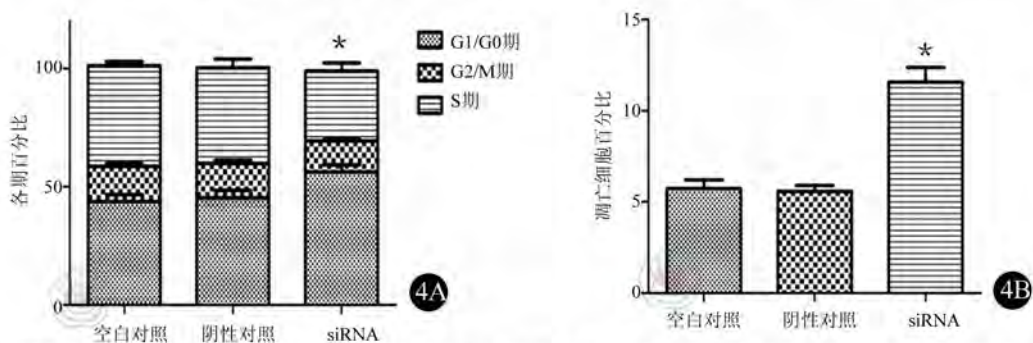


图4 PRL-3 siRNA干涉引起SGH-44细胞G1期阻滞、凋亡增加。4A: 周期各期百分比; 4B: 凋亡细胞百分比。

同对照组相比, * $P < 0.05$

明 PRL-3 表达的下调能够对 SGH-44 细胞增殖产生抑制作用,对其凋亡产生促进作用。PRL-3 在脑胶质瘤中发挥着重要的作用,目前 PRL-3 已经成为肿瘤靶向治疗的重要分子,随着研究的深入,其很可能成为脑胶质瘤治疗的新的靶点,为脑胶质瘤的治疗提供新的选择。

参考文献

- [1] Tu Y, He S, Fu J, et al. Expression of EphrinB2 and EphB4 in glioma tissues correlated to the progression of glioma and the prognosis of glioblastoma patients. Clin Transl Oncol, 2012, 14: 214-220.
- [2] Gao H, Pang Z, Pan S, et al. Anti-glioma effect and safety of docetaxel-loaded nanoemulsion. Arch Pharm Res, 2012, 35: 333-341.
- [3] Zhang Y, Cheng Y, Zhang L, et al. Inhibition of eEF-2 kinase sensi-

zes human glioma cells to TRAIL and down-regulates Bcl-xL expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 414:129-134.

[4] Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, et al. A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science*, 2001, 294:1343-1346.

[5] Ooki A, Yamashita K, Kikuchi S, et al. Phosphatase of regenerating liver-3 as a prognostic biomarker in histologically node-negative gastric cancer. *Oncol Rep*, 2009, 21:1467-1475.

[6] Guo K, Li J, Wang H, et al. PRL-3 initiates tumor angiogenesis by recruiting endothelial cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 2006, 66: 9625-9635.

[7] Kong L, Li Q, Wang L, et al. The value and correlation between PRL-3 expression and matrix metalloproteinase activity and expression in human gliomas. *Neuropathology*, 2007, 27:516-521.

(收稿日期:2013-01-08)

(本文编辑:郝锐)

郭兆刚,刘少壮,于垂恭,等.探讨肝再生磷酸酶3在脑胶质瘤细胞 SHG-44 中作用[J/CD].中华临床医师杂志:电子版,2013,7(11):4907-4910.

