

• 基础研究 •

shRNA 靶向干扰 PRDXⅢ 对人胶质瘤细胞株 U251 的影响

焦庆芳¹, 李 松¹, 刘 展¹, 游 潮^{2△}, 王春婷³

(1. 河南省郑州人民医院神经外科 450003; 2. 四川大学华西医院神经外科, 成都 610041;

3. 四川大学生物治疗国家重点实验室, 成都 610041)

摘要:目的 探讨 Peroxiredoxins Ⅲ (PRDXⅢ) 基因对人胶质瘤细胞株 U251 体外增殖和凋亡的影响。方法 将 U251 细胞分为空白对照组、空载体转染组、无关序列转染组和干扰组。利用脂质体将 PRDXⅢ 干扰片段转染胶质瘤细胞株 U251, RT-PCR 及 Western blot 检测转染后 PRDXⅢ mRNA 及蛋白的表达水平, 流式细胞仪 (FCM)、DNA ladder、PI 染色检测转染后细胞的凋亡状况, 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 检测转染后 U251 细胞的生长抑制率。结果 转染后干扰组 PRDXⅢ mRNA 及蛋白的表达水平明显降低, 抑制率分别为 76.0% 和 63.9%。DNA ladder 显示干扰组出现明显梯形电泳条带。PI 染色结果显示干扰组细胞核的染色质高度浓染色, 部分细胞核裂解为碎块。空白对照组、空载体转染组、无关序列转染组和干扰组细胞凋亡率分别为 (2.26±0.64)%、(2.68±0.74)%、(3.54±0.62)% 和 (35.90±4.85)%, 干扰组细胞凋亡率明显高于其他各组 ($P=0.00$)。干扰组 U251 细胞生长抑制率为 44.40%。结论 PRDXⅢ 靶向干扰能够显著抑制 U251 细胞株增殖, 增加其凋亡。

关键词: 神经胶质瘤; RNA, 小分子干扰; 细胞凋亡; 过氧化物酶; 转染

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.35.027

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)35-3594-03

Effects of shRNA interference targeting PRDXⅢ on U251 human glioma cells

Jiao Qingfang¹, Li Song¹, Liu Zhan¹, You Chao^{2△}, Wang Chunting³

(1. Department of Neurosurgery, People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou, Henan 450003, China; 2. Department of

Neurosurgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China;

3. State Key Laboratory of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of Peroxiredoxins Ⅲ (PRDX Ⅲ) gene on proliferation and apoptosis of U251 human glioma cells *in vitro*. **Methods** U251 cells were divided into blank control group, empty vector transfection group, unrelated sequence transfection group and interference group. PRDX Ⅲ interference fragment was transfected into U251 glioma cells via liposome. RT-PCR and Western blot were employed to detect the mRNA and protein expression of PRDX Ⅲ in transfected cells, respectively. Flow cytometry (FCM), DNA ladder and propidium iodide (PI) staining were used to determine the apoptosis of transfected U251 cells. MTT was adopted to measure the rate of growth inhibition of transfected U251 cells. **Results** In interference group, the mRNA and protein expression of PRDX Ⅲ of cells were reduced significantly after transfection, with inhibitory rates of 76.0% and 63.9%, respectively, DNA ladder showed obvious ladder-shaped electrophoretic bands, and PI staining revealed nuclear chromatin with high staining and some nuclear fragments. Apoptotic rates of cells in blank control group, empty vector transfection group, unrelated sequence transfection group and interference group were (2.26±0.64)%, (2.68±0.74)%, (3.54±0.62)% and (35.90±4.85)%, respectively. Apoptotic rate of cells in interference group was markedly higher than that in other groups ($P=0.00$). Growth inhibitory rate of U251 cells in interference group was 44.40%. **Conclusion** PRDX Ⅲ targeted interference can significantly inhibits proliferation and increases apoptosis of U251 cells.

Key words: glioma; RNA, small interfering; apoptosis; peroxiredoxin; transfection

研究发现, Peroxiredoxins Ⅲ (PRDXⅢ) 可促进肝癌、间皮瘤、乳腺癌、宫颈癌等肿瘤的发生^[1-5]。但是其在肿瘤生成中的具体调控机制和对肿瘤细胞的生物学特性的确切影响仍不清楚。本研究通过 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 的方法使人胶质瘤细胞株 U251 中 PRDXⅢ 表达下降, 探讨 PRDXⅢ 基因在胶质瘤发生、发展中的作用, 为胶质瘤的治疗寻找新的策略。

1 材料与方法

1.1 材料 RPMI-1640 培养基购自 GIBCO BRL 公司, RT-PCR 二步法试剂盒购自 MBI 公司, TRIzol 总 RNA 提取液、转染试剂阳离子脂质体 Lipofectamine™ 2000、Opti-MEM I Reduced Serum Medium 购自 Invitrogen 公司, 凋亡检测试剂盒购自晶美公司, DNA Ladder 试剂盒、PI 染色试剂盒购自碧云天生物技术研究所, Axiovert 200 倒置荧光显微镜购自蔡司光学

仪器公司, Beckman Coulter FC500 流式细胞仪 (FCM) 购自 Beckman Coulter 公司, 人脑胶质瘤细胞株 U251 为四川大学生物治疗国家重点实验室传代保存。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和 siRNA 质粒转染 人脑胶质瘤细胞株 U251 在含 10% 小牛血清、青霉素和链霉素 100 U/mL 的培养液中 37℃、5% CO₂ 条件下培养。按 Lipofectamine™ 2000 的说明书进行转染。实验分空白对照组、空载体转染组、无关序列转染组和干扰组。

1.2.2 RT-PCR 测定基因沉默效果 转染后 24 h 收集细胞, 按 TRIzol 法提取细胞总 RNA, 按试剂盒说明进行反转录和 PCR 反应扩增检测基因的表达情况, 以 GAPDH 作内参。引物序列为 PRDXⅢ: 上游 5'-CTT AAG AAG ATG GCG GCT GCT GCT GTA GGA C-3', 下游 5'-CTC GAG CAT GGG

TGA TCT ACT GAT TTA CCT T-3';GAPDH 引物:上游 5'-ACC ACA TGC CCA GAG GGT CC-3',下游 5'-AGG AGG CTG GGC TGT CTG TA-3'。PRDXⅢ 33 个循环,GRADH 35 个循环。产物经 1.15%琼脂糖凝胶电泳,紫外线下检测并拍照,比较各组灰度变化。

1.2.3 Western blot 检测胶质瘤细胞中 PRDXⅢ蛋白的表达
转染后 48 h 收集各组细胞,裂解后,SDS-PAGE 电泳,电转移至硝酸纤维素膜上,用抗 PRDXⅢ抗体杂交后,漂洗,加入辣根过氧化酶标记的二抗,漂洗,加入 DAB 显色液,显色 5 min。以 β -actin 为内参。在凝胶成像系统上分析处理蛋白条带,拍照。以 PRDXⅢ蛋白条带 OD 值与内参照 OD 值的比值表示蛋白表达的量。

1.2.4 DNA ladder 法检测细胞凋亡
转染后 48 h 收集各组细胞,裂解,Tris 平衡苯酚抽提样品,-20℃冻存 1 h,以充分沉淀小片断 DNA。离心后 70%乙醇洗涤 DNA 沉淀 1 次。TE 溶解 DNA。取部分抽提得到的基因组 DNA,琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.5 PI 染色法检测细胞凋亡
转染后 48 h PI 染色观察各组细胞凋亡。荧光显微镜下观察红色荧光。

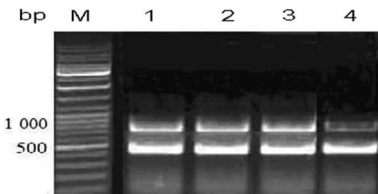
1.2.6 FCM 检测细胞凋亡
转染后 48 h 收集各组细胞,70%乙醇固定;PBS 重悬细胞,400 目的筛网过滤 1 次;用 1 mL PI 染液染色,4℃避光 30 min;FCM 检测。

1.2.7 四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium,MTT)比色实验分析转染后细胞增殖活性改变
将细胞接种到 96 孔板,每孔 2×10^3 个细胞,待细胞达 80%融合度后,选择基因特异干扰序列 3 由脂质体包裹进行转染。48 h 后,每孔加入 15 μ L MTT(5 mg/mL),5%CO₂ 培养箱中孵育 4 h,将孔内液体全部吸去,每孔加入 100 mL 二甲基亚砷(DMSO),10 min 后用酶标仪在 490 nm 波长处读取吸收值。计算干扰后对细胞的生存抑制率。以空白对照组、空载体转染组和无关序列转染组作对照,每组设 3 个复孔。

1.3 统计学处理
采用 SPSS11.5 统计软件对实验数据进行统计分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RT-PCR 分析转染后 PRDXⅢ mRNA 水平变化
RT-PCR 产物电泳显示,空载体转染组和无关序列转染组 PRDXⅢ 的表达未受抑制,两组差异无统计学意义($P>0.05$);而干扰组 PRDXⅢ mRNA 的表达明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),说明 RNA 干扰有效,能够有效地从 mRNA 水平抑制目的基因表达。见图 1。



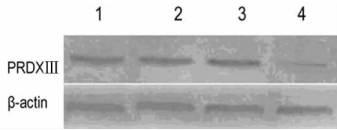
M: 标记物;1:空白对照组;2:空载体转染组;3:无关序列转染组;4:干扰组。

图 1 PRDXⅢ基因有效特异干扰序列筛选图

2.2 Western blot 分析转染后 PRDXⅢ蛋白表达变化
West-en blot 检测不同组 PRDXⅢ蛋白的表达差异,干扰组 PRDXⅢ蛋白的表达显著下降($P<0.05$)。见图 2。

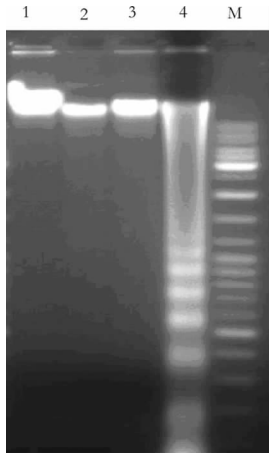
2.3 DNA ladder 检测细胞凋亡
干扰组出现明显梯形电泳条带,说明有较明显的细胞凋亡,而空白对照组、空载体转染组

和无关序列转染组未见梯形电泳条带。见图 3。
2.4 PI 染色检测细胞凋亡
空白对照组、空载体转染组和无关序列转染组细胞未见明显凋亡,而干扰组细胞染色质出现浓缩状态,细胞核的染色质高度凝聚、边缘化,部分细胞核裂解为碎块,产生凋亡小体,符合凋亡的形态学改变。见封 3 图 4。



1:空白对照组;2:空载体转染组;3:无关序列转染组;4:干扰组。

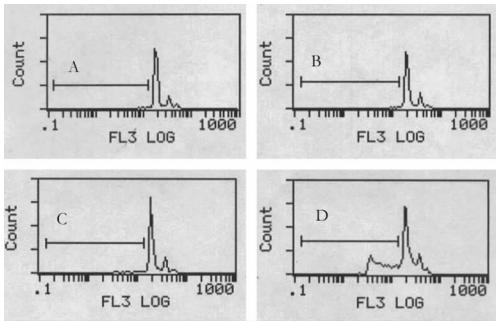
图 2 Western blot 检测干扰后 PRDXⅢ蛋白表达



M:DNA 标记物;1:空白对照组;2:空载体转染组;3:无关序列转染组;4:干扰组。

图 3 DNA ladder 检测细胞凋亡

2.5 FCM 检测细胞凋亡率
转染 48 h 后 FCM 检测显示空白对照组、空载体转染组、无关序列转染组和干扰组细胞凋亡率分别为(2.26 $\pm$ 0.64)%、(2.68 $\pm$ 0.74)%、(3.54 $\pm$ 0.62)%和(35.90 $\pm$ 4.85)%,经单因素方差分析发现,干扰组细胞凋亡率明显高于其他 3 组($F=219.76,P=0.00$),而空白对照、空载体转染组和无关序列转染组之间凋亡率的差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 5。



A:空白对照组;B:空载体转染组;C:无关序列转染组;D:干扰组。

图 5 FCM 检测细胞凋亡

表 1 转染 48 h 各组吸光度值比较

组别	光吸收值($\bar{x}\pm s$)	抑制率(%)	F	P
空白对照组	1.26 $\pm$ 0.06*	0.00	49.90	0.00
空载体转染组	1.22 $\pm$ 0.09*	3.10		
无关序列转染组	1.19 $\pm$ 0.02*	5.60		
干扰组	0.70 $\pm$ 0.07	44.40		

* : $P<0.05$,与干扰组比较。

2.6 MTT 检测干扰后细胞生长活性
MTT 比色实验结果

显示干扰组光吸收值明显低于空白对照组、空载体转染组和无关序列转染组,而空白对照组、空载体转染组组和无关序列转染组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。干扰组对 U251 细胞生长的抑制率为 44.40%,明显减慢了细胞生长。见表 1。

3 讨 论

PRDXⅢ蛋白由核基因编码,具有靶向线粒体的特殊氨基酸序列,在内质网合成后转送到线粒体发挥作用。PRDXⅢ是 PRDX 家族的重要成员,其主要作用是抗氧化,保持细胞内活性氧(ROS)稳态。有研究证明,细胞的氧化还原状态与肿瘤的形成密切相关。因此作为调节细胞内 ROS 水平同时对细胞凋亡有重要影响的基因,PRDXⅢ有可能与肿瘤的形成有一定的关联^[6-7]。另外,PRDXⅢ还是 c-myc 癌基因的靶基因^[8]。在 c-myc 癌基因产生的促进细胞增殖和转化的过程中必需 PRDXⅢ的参与。有文献应用免疫组化法研究了 PRDX 基因在胶质瘤中高表达^[9-10],但该基因在胶质瘤中作用的研究尚未见报道。

RNAi 是双链 RNA(dsRNA)介导的特异性基因表达沉默现象^[11]。RNAi 具有很大的优越性:(1)抑制目标基因表达的效能非常高。RNAi 有级联放大效应,效率高,用量低,微量的 dsRNA 就能显著地抑制基因的表达。(2)特异性好。siRNA 是严格按照碱基配对的法则与目标 mRNA 结合,对互补序列特异性的要求相当高,甚至可以实现单个突变基因的表达抑制。很多研究都证实与互补 mRNA 相差一个碱基序列的 siRNA 抑制目标基因表达的效能大大下降,而相差两三个碱基序列的 siRNA 的作用则完全丧失。因此,其用于疾病的基因治疗针对性强,安全性高,不良反应小。

由于 RNAi 具有普遍、高效、特异、安全的特点,因此被越来越多地应用于“关闭”特定基因表达,而成为研究基因功能的有效手段^[12-15]。由于该技术可对靶基因的表达实现高效抑制且操作较基因敲除更为简便、快速,因此目前 RNAi 已成功用于功能基因组学、药物靶筛选和细胞信号传导通路等多方面的研究。该技术也迅速被应用于脑胶质瘤治疗的研究中。RNAi 可以高效、特异地关闭或抑制抗凋亡基因的表达,从而诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤生长。

PRDXⅢ与细胞凋亡有关,PRDXⅢ过表达可以抑制药物诱导的凋亡,而降低 PRDXⅢ表达使得细胞对凋亡更加敏感^[16-17]。本研究利用 RNAi 成功地抑制了 U251 细胞中 PRDXⅢ基因和蛋白的表达,转染后 48 h FCM 检测,干扰组细胞凋亡率明显高于对照组,差异有统计学意义;DNA ladder 显示干扰组有凋亡典型的梯形条带,而各对照组未见此现象;PI 染色显示干扰组细胞染色质出现浓缩状态,细胞核的染色质高度浓染,部分细胞核裂解为碎块,符合凋亡的形态学改变;干扰组对 U251 细胞生长的抑制率为 44.4%,明显减慢了细胞生长,而无关序列转染组、空载体转染组和空白对照组之间细胞生长无明显差异。结果表明,PRDXⅢ基因在胶质瘤中高表达可以抑制肿瘤细胞凋亡,从而使其增殖加快,而抑制 PRDXⅢ基因表达能够诱导胶质瘤凋亡,减缓肿瘤生长,因此,PRDXⅢ基因有可能成为胶质瘤基因治疗的靶基因,为胶质瘤治疗提供了一个新的选择。但其诱导凋亡的机制还需进一步研究。

参考文献:

[1] Chae HZ,Robison K,Poole LB,et al. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes[J]. Proc

Natl Acad Sci USA,1994,91(15):7017-7021.
[2] Schroder E, Littlechild JA, Lebedev AA, et al. Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution[J]. Structure,2000,8(6):605-615.
[3] Forman HJ, Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling[J]. Am J Respir Crit Care Med,2002,166(12 Pt 2):4-8.
[4] Kim K, Yu M, Han S, et al. Expression of human peroxiredoxin isoforms in response to cervical carcinogenesis[J]. Oncol Rep,2009,21(6):1391-1396.
[5] Chua PJ, Lee EH, Yu Y, et al. Silencing the Peroxiredoxin III gene inhibits cell proliferation in breast cancer[J]. Int J Oncol,2010,36(2):359-364.
[6] Cox AG, Peskin AV, Paton LN, et al. Redox potential and peroxide reactivity of human peroxiredoxin 3[J]. Biochemistry,2009,48(27):6495-6501.
[7] Park HJ, Carr JR, Wang Z, et al. FoxM1, a critical regulator of oxidative stress during oncogenesis[J]. EMBO J, 2009,28(19):2908-2918.
[8] Haggerty TJ, Zeller KI, Osthus RC, et al. A strategy for identifying transcription factor binding sites reveals two classes of genomic c-myc target sites[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2003,100(9):5313-5318.
[9] Järvelä S, Rantala I, Rodriguez A, et al. Specific expression profile and prognostic significance of peroxiredoxins in grade II – IV astrocytic brain tumors[J]. BMC Cancer, 2010(10):104.
[10] Nordfors K, Haapasalo J, Helén P, et al. Peroxiredoxins and antioxidant enzymes in pilocytic astrocytomas[J]. Clin Neuropathol,2007,26(5):210-218.
[11] Hannon GJ. RNA interference[J]. Nature, 2002, 418(6894):244-251.
[12] Lewis DL, Hagstrom JE, Loomis AG, et al. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in post-natal mice[J]. Nat Genet,2002,32(1):107-108.
[13] DiTullio RA Jr, Mochan TA, Venere M, et al. 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer[J]. Nat Cell Biol,2002,4(12):998-1002.
[14] 黄环,吴永忠. RNA 干扰技术及其在肿瘤研究中的进展[J]. 重庆医学,2008,37(2):198-200.
[15] 王萍玲,胡丽娜. RNA 干扰技术及其在肿瘤研究中的进展[J]. 重庆医学,2005,34(8):1246-1249.
[16] Nonn L, Berggren M, Powis G. Increased expression of mitochondrial peroxiredoxin-3 (thioredoxin peroxidase-2) protects cancer cells against hypoxia and drug-induced hydrogen peroxide-dependent apoptosis[J]. Mol Cancer Res,2003,1(9):682-689.
[17] Chang TS, Cho CS, Park S, et al. Peroxiredoxin III, a mitochondrion-specific peroxidase, regulates apoptotic signaling by mitochondria[J]. J Biol Chem, 2004, 279(40): 41975-41984.