

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.36.007

靶向 Plac1 基因小分子干扰 RNA 的筛选及对肝癌细胞功能的影响*

吴 媛,王 欣,赵汉宁
(广东医科大学微生物学与免疫学教研室,广东湛江 524023)

[摘要] **目的** 筛选有效沉默胎盘特异基因 1(Plac1)的小分子干扰 RNA(siRNA)序列,并研究其对肝癌细胞增殖和迁移的影响。**方法** 实时定量 PCR(qPCR)及蛋白质印迹法(Western blot)检测不同肝癌细胞及正常肝细胞 Plac1 mRNA 及蛋白的表达;设计针对 Plac1 基因的 3 条干扰序列(Plac1-siRNA1,Plac1-siRNA2 及 Plac1-siRNA3)及 1 条阴性对照(NC-siRNA),转染肝癌细胞 HepG2,同时进一步采用 qPCR 和 Western blot 分别检测转染后细胞 Plac1 mRNA 及蛋白的表达,采用 CCK-8 法检测肝癌细胞的增殖能力,Transwell 实验检测细胞的迁移能力。**结果** 与正常肝细胞相比,Plac1 在肝癌细胞中高表达,其中 HepG2 的 Plac1 表达水平最高($P<0.05$),以此细胞作为实验模型。3 条 Plac1-siRNA 转染 HepG2 细胞后,结果显示 Plac1-siRNA1 的沉默效果最好,能有效下调 HepG2 细胞 Plac1 mRNA 及蛋白的表达($P<0.05$);并且转染后与 NC-siRNA 组比较,Plac1-siRNA1 组的 HepG2 细胞增殖及迁移能力均明显降低。**结论** 成功设计及筛选能有效沉默肝癌细胞 Plac1 表达的 siRNA 序列,并且此序列有效抑制了 Plac1 的功能。

[关键词] 癌,肝细胞;胎盘特异基因;RNA 干扰
[中图法分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)36-4588-04

Screening of siRNA targeted Plac1 gene and its effect on function of hepatocellular carcinoma cells*
WU Yuan ,WANG Xin ,ZHAO Hanning
(Department of Microbiology and Immunology,Guangdong Medical University,
Zhanjiang,Guangdong 524023,China)

[Abstract] **Objective** To screen the siRNA sequence effectively silencing placental specific gene 1 (Plac1),and to explore its effect on the proliferation and migration of hepatocellular carcinoma (HCC) cells.
Methods The expression of Plac1 mRNA and protein in different HCC cells and normal liver cells were detected by qPCR and Western blot. The three siRNA sequences (Plac1-siRNA1,Plac1-siRNA2 and Plac1-siRNA3) aiming at Plac1 gene,and a negative control sequence (NC-siRNA) were designed and transfected into HepG2 cells. Subsequently the expression of Plac1 mRNA and protein in transfected cells was respectively detected by adopting qPCR and Western blot. The proliferation ability of HepG2 cells was detected by adopting the CCK-8 assay,and the cellular migration ability was measured by the Transwell experiment. **Results** Compared with the normal liver cells,Plac1 was highly expressed in HCC cells,in which the Plac1 expression level was the highest in HepG2 cells ($P<0.05$). HepG2 cells were employed as the experimental model. After 3 Plac1-siRNA sequences transfected into HepG2 cells,Plac1-siRNA1 showed the best silencing effect,could effectively down-regulate the Plac1 mRNA and protein expression in HepG2 cells ($P<0.05$);moreover compared with the NC-siRNA group after transfection,the cellular proliferation and migration ability of HepG2 in the Plac1-siRNA1 group were significantly decreased. **Conclusion** The siRNA sequence effectively silencing HCC cell Plac1 expression is successfully designed and screened out,which effectively inhibits the function of Plac1.

[Key words] carcinoma,hepatocellular;placenta-specific genes;RNA interference

原发性肝癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一。尽管肝癌的诊断和治疗获得了很大的提高,但预后仍欠佳,侵袭转移是肝癌术后复发、疗效差的主要原因^[1-2]。因此,探讨肝癌侵袭转移的机制,寻找肝癌复发转移预测标记及干预治疗靶点,显得尤为重要。胎盘特异基因 1(placenta-specific 1,Plac1)最初被认为是胎盘特异表达的新基因,人 Plac1 基因定位在 Xq26.3,全长 92 641 bp,含 3 个外显子,第 3 外显子为编码区,共编码 212 个氨基酸,在正常组织中的表达主要局限于胎盘,参与调控胎盘的生物学功能^[3-4]。

* 基金项目:广东省科技计划项目(2012B031800427);湛江市科技计划项目(2013A01012)。 作者简介:吴媛(1975—),副教授,硕士,主要从事肿瘤免疫方面的研究。

但目前越来越多的研究表明,Plac1 在肿瘤的发生、发展中发挥重要的作用。有实验证实,Plac1 在乳腺癌、前列腺癌、胃癌等多种肿瘤组织高表达,并且与肿瘤的侵袭转移存在一定关系^[5-7]。也有研究者发现,Plac1 在肝癌细胞及肝癌组织中的表达水平也上调^[8],但其在肝癌中具体的作用机制未明确。本实验应用 RNA 干扰技术,设计构建 3 条 Plac1 基因的小分子干扰 RNA(siRNA)序列,旨在筛选出最为有效的序列,为进一步研究 Plac1 在肝癌的作用机制提供可行的工具,为后续实验研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 细胞 L02、HepG2、Bel-7402、SMMC-7721 及 Huh7 购自中国科学院上海细胞所,HLE 细胞株由北京大学医学部尹艳慧教授惠赠。

1.1.2 实验试剂与引物 DMEM 培养基及胎牛血清购自美国 Hyclone 公司,Lipofectamine 2000 脂质体及 RNA 提取试剂 Trizol 购自美国 Invitrogen 公司,反转录试剂购自美国 Promega 公司,定量 PCR 所用 SYBR Green qPCR SuperMix 购自美国 Invitrogen 公司,Plac1 抗体购自美国 Abcam 公司,CCK-8 试剂盒购自碧云天公司。由美国 Sigma 公司设计及合成针对 Plac1 的基因序列,3 条 Plac1-siRNA 和 1 条阴性对照(NC-siRNA)序列见表 1。

表 1 Plac1-siRNA 及 NC-siRNA 序列		
引物名称	方向	序列
Plac1-siRNA-1	正向	5'-GUGUUCAGCUUGUCACAGU-3'
	反向	5'-ACUGUGACAAGCUGAACAC-3'
Plac1-siRNA-2	正向	5'-CGGUUCAGGACAAAGUCCA-3'
	反向	5'-UGGACUUUGUCCUGAACCG-3'
Plac1-siRNA-3	正向	5'-GAUAUGAUUGGGUCCAUGU-3'
	反向	5'-ACAUGGACCCAAUCAUAUC-3'
NC-siRNA	正向	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3'
	反向	5'-ACGUGACACGUUCGGAGAA-3'

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与转染 L02、HepG2、Bel-7402、HLE、SMMC-7721 及 Huh7 均采用 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清),37℃ 5% CO₂ 培养。待 HepG2 细胞处于对数生长期进行转染,转染前 1 d 按 5×10⁴ 个/孔将细胞接种于 24 孔板中,贴壁细胞融合率达 40%时进行转染。取 20 μmol/L siRNA 10 μL 溶于 500 μL opti-MEM 中,混匀,静置(A 管)。将 5 μL Lipofectamine 2000 加入 500 μL opti-MEM 中,轻轻混匀,静置不超过 5 min(B 管),将 A 管和 B 管混合,混匀,静置 20 min;然后分别加入各孔中,混匀后放入细胞培养箱,4~6 h 后,吸去转染培养基,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗两遍,每孔加入 2 mL 完全培养基,转染

24 h 后用定量 PCR 检测 siRNA 的基因干扰效率。实验分为 3 组:实验组、阴性对照组、空白对照组,其中实验组为转染 Plac1-siRNA 组,阴性对照组为转染 NC-siRNA 组,空白对照组为仅加入转染混合液。

1.2.2 实时定量 PCR(qPCR)检测 Plac1 mRNA 的表达 按照 Trizol 试剂盒提取细胞总 RNA,然后检测总 RNA 纯度和完整性,反转录成 cDNA,应用以下引物进行 qPCR 检测。PLAC1-F1: 5'-TAA GGG CAC GCC ATC TAA GT-3', PLAC1-R1: 5'-GGA CTG TGA CAA GCT GAA CAC-3';18srRNA-F: 5'-CCT GGA TAC CGC AGC TAG GA-3', 18srRNA-R: 5'-GCG GCG CAA TAC GAA TGC CCC-3'。反应条件: 50℃ 2 min,95℃ 2 min,95℃ 15 s,60℃ 32 s,读板,40 个循环,每个样品重复 3 次。

1.2.3 蛋白质印迹法(Western blot)检测 Plac1 蛋白的表达 收集细胞后提取总蛋白并测定水平,将待测蛋白样品与上样缓冲液充分混匀后煮沸 10 min,定量上样并进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),于 4℃ 进行印迹电转移,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入一抗,4℃ 过夜,洗涤后加入二抗,室温避光孵育 2 h。洗涤后将化学荧光发光底物均匀地加到膜的表面,并使反应持续 5 min。用滤纸吸去膜表面多余的底物溶液,放至暗盒,显影,扫描及分析。Plac1 的灰度值与 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)灰度值计算相对比值。

1.2.4 细胞增殖及迁移能力的检测 采用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖能力,消化细胞后吹打散细胞,计数,调整细胞浓度为 1×10⁵ 个/毫升,分到 96 孔板,每孔 100 μL,即每孔细胞为 1×10⁴ 个。待细胞贴壁后,再收集各个时间点的细胞(0、24、48、72 h)加入 CCK-8 溶液,比例为 1:10,即 100 μL 培养液加入 10 μL 检测液。孵育 4 h 后,酶标仪测定各孔 450 nm 处吸光度(A₄₅₀)值,每孔复测 3 次,取结果的平均值。

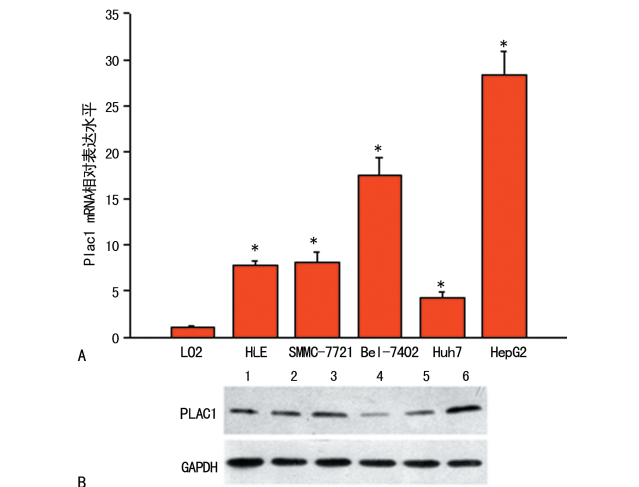
1.2.5 细胞迁移能力的检测 采用美国 BD 公司 Transwell 小室,取对数生长期细胞,计数 1×10⁵ 个/毫升,用 100 μL 无血清培养基重悬,加入 Transwell 细胞培养板的小室上室,在下室加入 600 μL 完全培养基。在 37℃ 5% CO₂ 孵育 48 h 后,取出小室,用棉签擦去上室的细胞,4%多聚甲醛固定 20 min,PBS 洗涤 1 次,结晶紫染色 10 min,PBS 洗涤 1 次,显微镜下观察并拍照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用方差分析或 t 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Plac1 在多种肝癌细胞中的表达 qPCR 结果显示,Plac1 mRNA 在正常肝细胞 L02 的表达水平较低,而在 HLE、SMMC-7721、Huh7、Bel-7402 及 HepG2 等肝癌细胞的表达水平均明显高于正常肝细胞 L02(P<

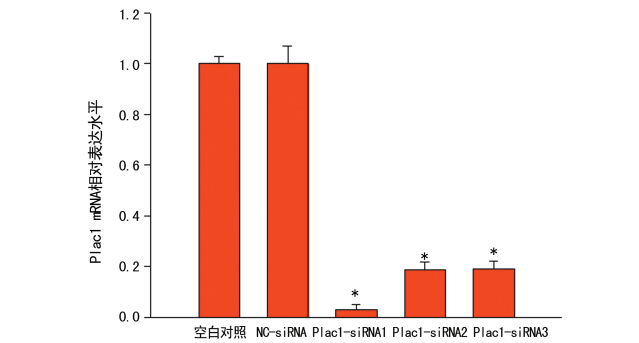
0.05),见图 1;Western blot 结果显示,Plac1 蛋白在肝癌细胞中高表达。在上述 5 种肝癌细胞中,HepG2 细胞的 Plac1 mRNA 及蛋白表达水平最高,故选取 HepG2 细胞作为目的细胞进行 siRNA 干扰沉默 Plac1 基因,开展后续的实验。



A:Plac1 mRNA 在肝癌细胞与正常肝细胞的表达;B:Plac1 蛋白在肝癌细胞与正常肝细胞的表达;1:HLE;2:SMMC-7721;3:Bel-7402;4:L02;5:Huh7;6:HepG2;* : $P<0.05$,与 L02 比较

图 1 Plac1 在肝癌细胞与正常肝细胞的表达

2.2 筛选沉默 Plac1 基因的 siRNA 为了有效沉默 Plac1 基因,针对 Plac1 基因序列设计了 3 条 siRNA,应用 qPCR 筛选最佳序列,结果显示:3 条 siRNA 序列转染 HepG2 细胞后,Plac1-siRNA1、Plac1-siRNA2 及 Plac1-siRNA3 组的 Plac1 mRNA 表达水平均下调,与 NC-siRNA 组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);而空白对照组与 NC-siRNA 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2。3 条序列中以 Plac1-siRNA1 的抑制作用最强,其抑制率达到 96%,故选取 siRNA-1 用于后续实验。

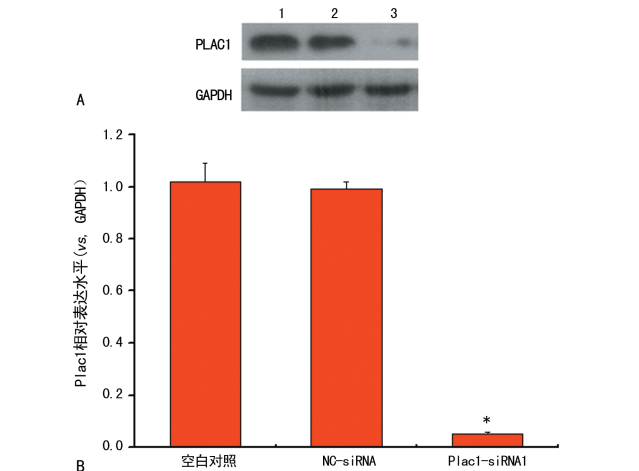


* : $P<0.05$,与 NC-siRNA 组比较

图 2 Plac1 mRNA 在肝癌细胞 HepG2 的表达

2.3 siRNA-1 抑制肝癌细胞 Plac1 蛋白的表达 Western blot 结果显示,Plac1 在 HepG2 细胞的空白对照组与 NC-siRNA 组的表达较高,而在 Plac1-siRNA1 组的表达明显下调(图 3A)。对 Western blot 蛋白条带进行灰度扫描后分析,结果显示 HepG2 细胞 Plac1-siRNA1 组的 Plac1/GAPDH 比值明显低于

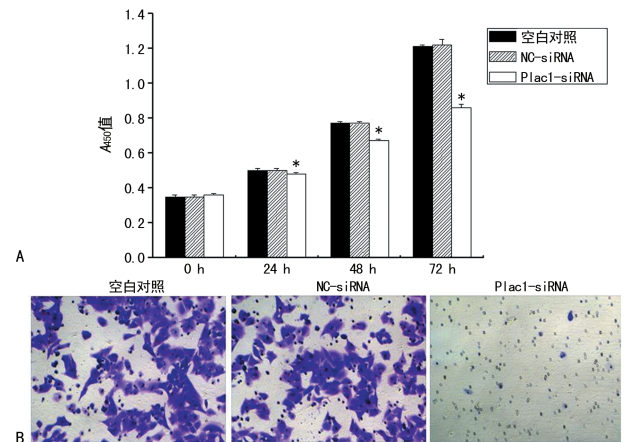
NC-siRNA 组,差异有统计学意义($P<0.05$),其比值下调 95%;NC-siRNA 组与空白对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 3B。此结果与 q-PCR 的结果相吻合,进一步验证了 siRNA1 确实可有效沉默 Plac1 基因。



A:Western blot 检测 Plac1 在 HepG2 细胞的表达;B:HepG2 细胞 Plac1 蛋白的相对表达水平;1:空白对照组;2:NC-siRNA 组;3:Plac1-siRNA1 组;* : $P<0.05$,与 NC-siRNA 组比较

图 3 Plac1 蛋白在 HepG2 细胞的表达

2.4 siRNA1 沉默 Plac1 后对肝癌细胞增殖及迁移能力的影响 Plac1-siRNA1 转染 HepG2 细胞后,CCK-8 法检测其对细胞增殖的影响,结果显示培养 24、48 及 72 h 后,Plac1-siRNA1 组的细胞增殖活性均下调,与 NC-siRNA 组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);而空白对照组与 NC-siRNA 组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),其中以转染 72 h 的抑制效果最为显著,见图 4A。Transwell 实验结果显示,与空白对照组及 NC-siRNA 组比较,siRNA1 沉默 Plac1 后可以明显抑制 HepG2 细胞的迁移能力(图 4B)。



A:细胞增殖;B:细胞迁移($\times 200$);* : $P<0.05$,与 NC-siRNA 组比较

图 4 Plac1 影响肝癌细胞增殖及迁移能力

3 讨 论

随着深入的研究,Plac1 在肿瘤的作用被不断证

实,研究显示其属于癌-睾丸(cancer-testis,CT)抗原,在多种肿瘤细胞株(如宫颈癌、结肠癌、肝癌、前列腺癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、绒毛膜癌和神经母细胞瘤等)呈高水平表达^[9],并且在肝癌、胃癌、乳腺癌、肺癌及前列腺癌等多种肿瘤组织的表达水平也高于正常组织^[5-8,10]。有研究显示,Plac1 的表达水平与胃癌及胰腺癌的生存期呈负相关^[7,10],与前列腺癌 Gleason 评分呈正相关^[6],Plac1 可能成为判断肿瘤预后的标志物之一。另有不少的研究表明,Plac1 具有免疫原性,可以诱导免疫应答,从而起到抗肿瘤的作用,因此可作为肿瘤免疫治疗的靶点^[7-8,11]。本研究结果显示,5 种肝癌细胞 HepG2、Bel-7402、HLE、SMMC-7721 及 Huh7 的 Plac1 表达水平均明显高于正常肝细胞,预示 Plac1 的异常表达可能参与肝癌的发生、发展,但其具体作用机制仍未明确。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是目前较为有效的基因表达沉默技术,已经成为研究基因功能和疾病基因治疗的重要工具,其利用 siRNA 对同源序列 mRNA 进行识别并降解,从而导致特定基因减效表达或不表达^[12]。为研究 Plac1 在肝癌发生、发展中的作用,本研究针对 Plac1 基因设计 3 条 siRNA 序列,成功筛选了有效沉默 Plac1 的 siRNA1 序列,从而为进一步探讨 Plac1 在调控肿瘤形成、复发、转移中的作用提供了研究工具。有文献报道沉默 Plac1 基因后,乳腺癌细胞的增殖降低,细胞生长停滞在 G₁/S 期,进一步研究发现 Plac1 基因沉默所致的细胞周期失调与周期蛋白 D1(Cyclin D1)及磷脂酰肌醇-3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶(PI3K/Akt)信号通路有关,而且沉默 Plac1 基因可显著降低乳腺癌细胞的趋化迁移和侵袭能力^[5]。为探究沉默 Plac1 能否影响肝癌细胞的生物学功能,本研究初步的体外细胞生物学功能研究发现,siRNA1 沉默 Plac1 后,肝癌细胞 HepG2 的增殖能力及迁移能力均显著低于空白对照组。由此可见,Plac1 很有可能通过调控肝癌细胞的生物学行为促进肿瘤的发生、发展,其具体机制有待进一步的深入研究。

综上所述,本研究针对 Plac1 基因序列,筛选出具有特异性沉默 Plac1 表达的干扰序列,并且此序列有效抑制了 Plac1 的功能,为进一步研究 Plac1 基因功能及细胞生物学行为奠定了基础。

参考文献

[1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer

statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65 (2): 87-108.

[2] MALUCCIO M, COVEY A. Recent progress in understanding, diagnosing, and treating hepatocellular carcinoma[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(6): 394-399.

[3] FANT M, WEISOLY D L, COCCHIA M, et al. PLAC1, a trophoblast-specific gene, is expressed throughout pregnancy in the human placenta and modulated by keratinocyte growth factor[J]. Mol Reprod Dev, 2002, 63 (4): 430-436.

[4] CHANG W L, YANG Q, ZHANG H, et al. Role of placenta-specific protein 1 in trophoblast invasion and migration[J]. Reproduction, 2014, 148(4): 343-352.

[5] KOSLOWSKI M, SAHIN U, MITNACHT-KRAUS R, et al. A placenta-specific gene ectopically activated in many human cancers is essentially involved in malignant cell processes[J]. Cancer Res, 2007, 67(19): 9528-9534.

[6] GHODS R, GHAHREMANI M H, MADJD Z, et al. High placenta-specific 1/low prostate-specific antigen expression pattern in high-grade prostate adenocarcinoma[J]. Cancer Immunol Immunother, 2014, 63(12): 1319-1327.

[7] LIU F, SHEN D, KAMG X, et al. New tumour antigen PLAC1/CP1, a potentially useful prognostic marker and immunotherapy target for gastric adenocarcinoma[J]. J Clin Pathol, 2015, 68(11): 913-916.

[8] DONG X Y, PENG J R, YE Y J, et al. Plac1 is a tumor-specific antigen capable of eliciting spontaneous antibody responses in human cancer patients[J]. Int J Cancer, 2008, 122(9): 2038-2043.

[9] SILVA W A Jr, GNJATIC S, RITTER E, et al. PLAC1, a trophoblast-specific cell surface protein, is expressed in a range of human tumors and elicits spontaneous antibody responses[J]. Cancer Immun, 2007, 7: 18.

[10] YANG L, ZHA T Q, HE X, et al. Placenta-specific protein 1 promotes cell proliferation and invasion in non-small cell lung cancer[J]. Oncol Rep, 2018, 39(1): 53-60.

[11] NEJADMOGHADDAM M R, ZARNANI A H, GHAHREMANZADEH R, et al. Placenta-specific1 (PLAC1) is a potential target for antibody-drug conjugate-based prostate cancer immunotherapy[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 13373.

[12] 刘建军, 张茂雷, 朱芳芳. 实时荧光定量 PCR 筛选有效 RNA 干扰方法的建立[J]. 检验医学与临床, 2010, 7 (10): 903-905.

(收稿日期: 2018-05-29 修回日期: 2018-08-26)