

RNA 干扰抑制 p62 基因表达对宫颈癌 HeLa 细胞增殖的影响

陈 推¹,袁运水¹,陈惠祯²

[摘要]目的:研究 shRNA 降低 p62 基因表达对人宫颈腺癌 HeLa 细胞增殖的影响。方法:构建具有沉默 p62 表达的慢病毒载体短发夹 RNA(shRNA)序列,采用 Polybrene 将其转染入宫颈腺癌 HeLa 细胞中(shRNA 组),设立 shNC 作为阴性对照组,另设未加慢病毒转染载体的空白对照组。采用实时荧光定量 qRT-PCR 技术检测各组相对空白对照组的 p62 基因相对表达量;采用 CCK-8 实验检测 3 组细胞的增殖情况,采用集落克隆形成实验检测 3 组细胞的克隆形成率。结果:沉默 p62 基因表达的宫颈癌 HeLa 细胞成功构建;shRNA 组 p62mRNA 相对空白对照组的相对表达量为 (0.18 ± 0.08) ,而 shNC 组的 p62mRNA 相对空白对照组的相对表达量为 (1.01 ± 0.12) ($t=9.97, P<0.01$);shRNA 的干扰效率为 81.00%;shRNA 组较阴性对照组和空白对照组细胞增殖速度变慢($P<0.05$),克隆形成率减少($P<0.01$)。结论:p62 基因沉默后,宫颈癌 HeLa 细胞的增殖速度变慢。p62 基因在宫颈癌 HeLa 细胞的增殖中起着重要的作用。

[关键词] 宫颈肿瘤;短发夹 RNA;p62 基因;宫颈癌 HeLa 细胞;增殖

[中图分类号] R 737.33 **[文献标志码]** A **DOI:**10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.01.004

Effect of the silencing p62 gene expression by RNA interference on proliferation of cervical cancer HeLa cells

CHEN Tui¹, YUAN Yun-shui¹, CHEN Hui-zhen²

(1. Department of Gynecological and Obstetrics, Tongcheng People's Hospital of Hubei, Tongcheng Hubei

437400; 2. Department of Gynecology Oncology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan Hubei 430071, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of downregulating the expression of p62 gene by shNA transfection on proliferation of cervical cancer HeLa cells. **Methods:** The lentiviral vector containing shRNA sequence of silencing p62 gene was constructed, and transfected into the cervical HeLa cells (shRNA group). The negative control group (shNC group) was set, and the non-lentiviral vector was set as blank control group. The expression levels of p62 mRNA, cell proliferation and cell colony formation rate in 3 groups were detected using qRT-PCR, CCK-8 assay and colony formation assay, respectively. **Results:** The lentiviral vector containing shRNA sequence of silencing p62 gene was successfully constructed. The expression of p62-mRNA in shRNA group and shNC group relative to the blank control group were (0.18 ± 0.08) and (1.01 ± 0.12) , respectively. The interfere rate of shRNA was 81.00%. Compared with the negative control group and blank control group, the cell proliferation and colony formation rates in shRNA group were slow and little ($P<0.05$ and $P<0.01$), respectively. **Conclusions:** Silencing the expression of p62 gene can reduce the proliferation of cervical cancer HeLa cells. The p62 gene may play an important role in the proliferation of cervical cancer HeLa cells.

[Key words] cervical neoplasms; short hairpin RNA; p62 gene; cervical cancer HeLa cell; proliferation

目前宫颈癌在中国女性最常见的恶性肿瘤发病中排名第三^[1]。尽管随着宫颈癌筛查的普遍开展,宫颈癌的检出率不断上升,死亡率在不断下降。然而,转移性宫颈癌病人的预后仍不乐观。p62 蛋白又称自噬标记蛋白,是一种支架蛋白,与泛素化蛋白结合,并将其运送至自噬小体内降解^[2]。当细胞内 p62 积累时,细胞自噬活性减弱,从而引起肿瘤的转移。国内有研究^[3]发现 p62 蛋白在宫颈鳞癌中的表达明显高于正常宫颈及宫颈上皮内瘤变(CIN)组

织,且其与淋巴结的转移相关,表明其可能与宫颈癌的进展和转移相关。本研究从体外实验的角度探讨 p62 基因在宫颈癌 HeLa 细胞中的作用,进一步研究其与宫颈癌 HeLa 细胞生物学特性的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 宫颈癌 HeLa 细胞(中南医院妇科实验室保存),沉默 p62 表达的短发夹 RNA (shRNA)慢病毒载体(上海吉玛制药技术有限公司)。我们通过文献^[4]报道的 p62 的 siRNA 靶序列为 GCA CAA ATT TGG TAA GTC A,正义链为 5'-GCA CAA AUU UGG UAA GUC A dTdT -3';反义链 3'-dTdT CGU GUU UAA ACC AUU CAG U -5',以此来设计构建本论文中运用的 p62-shRNA 慢病毒载

[收稿日期] 2016-05-10 [修回日期] 2016-06-25

[作者单位] 1. 湖北省通城县人民医院 妇产科,437400; 2. 武汉大学中南医院 妇瘤科,湖北 武汉 430071

[作者简介] 陈 推(1979-),女,硕士,主治医师。

体。高糖 DMEM 培养基 (Gibco)、4% 多聚甲醛 (武汉博士德生物工程有限公司)、胎牛血清 (Gibco)、0.25% 胰蛋白酶 (Gibco)、CCK8 试剂 (Sigma)、DMSO 试剂 (AMRESCO)、结晶紫 (Sigma) 及荧光显微镜 (日本 Olympus) 等。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 宫颈腺癌 HeLa 细胞在含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中, 37 °C、5% CO₂ 条件下传代培养。取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 shRNA 慢病毒载体的转染 转染前 1 d, 将 HeLa 细胞按 5×10^4 个/孔接种至 24 孔板中, 加入 0.5 mL 含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养细胞至 40% ~ 50% 融合; 弃去培养基, 加入 0.4 mL 新鲜培养基。实验分为 3 组, shRNA 观察组加入干扰 p62 的 shRNA 慢病毒载体病毒液, 阴性对照组加入 shNC 慢病毒病毒液, 空白对照组加入培养基, 体积均为 50 μ L, 病毒滴度均为 1×10^8 TU/mL; 3 组细胞中分别加入 0.5 μ L Polybrene (质量浓度为 0.5 mg/mL), 24 h 后更换新鲜培养基, 继续培养; 72 h 后荧光显微镜下观察转染情况, 转染成功者细胞中绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 表达阳性。

1.2.3 qRT-PCR 实验 用 Trizol 法提取 shRNA 组、阴性对照组 HeLa 细胞总 RNA, 以 0.5 ~ 1.0 μ g 总 RNA 为模板 RT 合成 cDNA, 反应条件: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。实时定量 PCR 技术检测按试剂盒说明书进行, PCR 反应条件: 95 °C 10 s 预变性; 95 °C 5 s, 56 °C 15 s, 72 °C 31 s, 共 40 个循环。计算 p62 的 mRNA 的表达水平, 其中 ct 值为循环阈值并计算 shRNA 慢病毒载体转染后对 shRNA 组 HeLa 细胞的干扰效率。

1.2.4 CCK-8 实验检测细胞生长情况 取处于对数生长期的 p62-shRNA 细胞及 shNC 细胞, 吸弃旧培养基, PBS 冲洗一遍, 各加入 1 mL 胰酶。消化好后加入培养基终止消化。1 000 r/min 离心 5 min, 倒掉上清液。加 2 mL 新鲜培养基重悬。显微镜下计数。以每孔 5 000 个/200 微升细胞悬液加入 96 孔板中, 边缘孔用无菌 PBS 200 μ L 填充, 每组设 5 个复孔。置 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。检测时, 吸弃旧培养基, 加入新鲜的 CCK-8 溶液每孔 110 μ L, 设 1 个调零孔。37 °C、5% CO₂ 条件下避光孵育 2 h。于 450 nm 波长下检测各孔的吸光度值 (A 值)。每组细胞共检测 6 d。以时间为横坐标, A 值为纵坐标, 取 A 平均值绘制细胞生长曲线。

1.2.5 平板克隆形成实验^[5] 取转染 36 h 后的 2 组宫颈癌 HeLa 细胞, 消化, 计数, 稀释, 每孔 1 000 个细胞接种于 6 孔培养板, 常规培养。每隔 48 h 换液, 10 d 后终止培养。0.4% 多聚甲醛固定 15 min, 0.1% 结晶紫染色 20 min。在低倍显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆数。克隆形成率 (%) = 克隆数/实际接种细胞数 \times 100%。每个处理组设 2 个复孔, 重复 3 次。

1.3 统计学方法 采用 *t* 检验和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 转染结果 p62-shRNA 以及 shNC 均成功转染入宫颈癌 HeLa 细胞中, 转染效率 98%。

2.2 2 组转染后细胞 p62 的 mRNA 平均表达量 shRNA 组 p62mRNA 相对空白对照组的相对表达量为 (0.18 \pm 0.08), 而 shNC 组的 p62mRNA 相对空白对照组的相对表达量为 (1.01 \pm 0.12) ($t = 9.97, P < 0.01$)。

2.3 干扰效率 干扰效率 (%) = [(阴性对照组 p62mRNA 表达水平 - 观察组 p62mRNA 表达水平)] / 阴性对照组 p62mRNA 表达水平 \times 100%, 本实验结果干扰效率为 81.00%。

2.4 各组的细胞生长情况 shRNA 组细胞的生长速度在 4 个时间点均明显慢于 shNC 组细胞 ($P < 0.05$) (见表 1)。

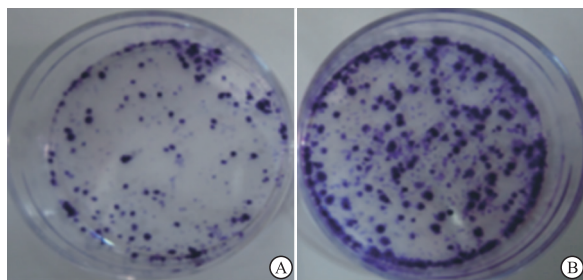
表 1 shRNA 组及 shNC 组细胞在不同时间点的平均 A 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	第 1 天	第 2 天	第 4 天	第 6 天
shRNA 组	0.185 \pm 0.023	0.475 \pm 0.033	0.737 \pm 0.019	0.818 \pm 0.031
shNC 组	0.224 \pm 0.021	0.561 \pm 0.027	0.852 \pm 0.023	0.941 \pm 0.041
<i>t</i>	4.22	2.87	2.98	3.07
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.5 2 组细胞的克隆形成率 空白对照组的平均克隆数为 224 个, shRNA 组以及阴性对照组的平均克隆数为 52 和 220 个。shRNA 组以及阴性对照组的平均克隆形成率与空白对照组相比分别为 23.2%、98.2%。结果见图 1。shRNA 组与阴性对照组比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 215.06, P < 0.01$)。

3 讨论

宫颈癌是女性最常见的恶性生殖道肿瘤之一。



A:shRNA组;B:阴性对照组

图1 克隆形成图

晚期及复发转移性宫颈癌的 5 年生存率较低,究其原因目前尚不清楚。有研究^[6-7]发现其他基因或因子与宫颈癌增殖相关,但详细机制不清。有研究^[8]发现 p62 与细胞多种功能有关联,包括细胞生长、有丝分裂、氧化应激、自噬等。细胞的自噬可以通过清除受损的细胞器、氧自由基,维持细胞内基因组的稳定性以及内环境稳态,从而抑制多种肿瘤的发生、发展。另外有研究^[9]报道 p62 基因的消除可以抑制多种肿瘤的发生。此外,还有研究^[10]发现,在离体的前列腺癌细胞株中沉默 p62 的表达可以抑制前列腺癌细胞的增殖和转化,同时可以抑制其在裸鼠体内形成肿瘤。最近的临床研究^[3]显示 p62 蛋白与宫颈癌的进展和转移相关,认为 p62 在宫颈病变的发生发展中有一定的相关性。尽管如此,目前尚未见从细胞水平上研究 p62 与体外宫颈癌细胞之间关系的相关报道。

本研究采用特异性沉默 p62 基因表达的慢病毒 shRNA 序列成功地转染了宫颈癌 HeLa 细胞,其转染率较高,获得了沉默 p62 的宫颈癌 HeLa 细胞。我们的 CCK-8 实验研究发现 p62-shRNA 组细胞的生长速度较阴性对照组 HeLa 细胞减慢。此外,我们的克隆形成实验显示 p62-shRNA 干扰组细胞的克隆形成率较阴性对照组明显减少($P < 0.01$)。之前, MOSCAT 等^[8]的研究显示 p62 蛋白的聚集可以促进肿瘤的发生,而 p62 的消除则可以抑制肿瘤的发生。同时他们的研究发现自噬可以防止细胞基因组的不稳定性,从而抑制肿瘤的发生,然而在自噬活性缺陷的肿瘤细胞中, p62 蛋白的聚集可以促进细胞内质网分子伴侣的增加、线粒体的损伤以及活性氧的释放增加,从而导致肿瘤细胞的发生及生长。

与上述研究的报道相一致,本实验研究显示,沉默宫颈癌 HeLa 细胞 p62 基因的表达后,宫颈癌 HeLa 细胞的生长速度明显减慢,同时克隆形成实验显示沉默后的宫颈癌 HeLa 细胞生长增殖能力明显减弱。因而我们认为 p62 基因表达下调后,宫颈癌 HeLa 细胞的增殖及克隆能力下降。这一结果表明 p62 基因与宫颈癌 HeLa 细胞的生长增殖存在一定的相关性,至于其具体的作用机制目前尚不明确,有待进一步研究。

结合上述实验,本研究认为采用 shRNA 沉默宫颈癌细胞的 p62 表达效果好,同时沉默宫颈癌 HeLa 细胞 p62 基因的表达后,宫颈癌 HeLa 细胞的生长速度变慢,其自我繁殖复制能力下降。p62 可能可以作为宫颈癌生物治疗的靶点之一,为临床宫颈癌病人的治疗提供一定的参考。

[参 考 文 献]

- [1] SHI JF, CANFELL K, LEW JB, *et al.* The burden of cervical cancer in China: synthesis of the evidence [J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(3):641.
- [2] 刘丹,关秀茹. 多功能蛋白 p62 调节细胞自噬及相关疾病的研究进展 [J]. *国际免疫学杂志*, 2014, 37(6):498.
- [3] 李晓妍,赵卫东,周颖,等. 子宫鳞状细胞癌中自噬标记蛋白 p62 的表达及临床意义 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2014, 30(1):38.
- [4] 罗小洋,邬柏林,胡桂梅,等. siRNA 沉默 p62 基因对人肝癌细胞 Hep3B 的生物学影响 [J]. *天津医药*, 2010, 38(6):449.
- [5] 尹青,周丽,陈惠祯. 干扰 P62 表达的 siRNA 转染内膜癌 RL952 细胞及其对生物学特性的影响 [J]. *广东医学*, 2013, 34(15):2306.
- [6] 唐雅娟,韩萍,吴维光,等. STAT3 基因反义寡核苷酸对宫颈癌 HeLa 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2013, 38(3):264.
- [7] 童旭辉,董淑英,陶亮. 黄芩素对子宫宫颈癌 HeLa 细胞生长的抑制作用 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2009, 34(6):468.
- [8] MOSCAT J, DIAZ-MECO MT. p62: a versatile multitasker takes on cancer [J]. *Trends Biochem Sci*, 2012, 37(6):230.
- [9] MATHEW R, KARP CM, BEAUDOIN B, *et al.* Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62 [J]. *Cell*, 2009, 137(6):1062.
- [10] DURAN A, LINARES JF, GALVEZ AS, *et al.* The signaling adaptor p62 is an important NF- κ B mediator in tumorigenesis [J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(4):343.

(本文编辑 刘璐)