

eIF4E 基因下调对人乳腺癌 Bcap37 细胞凋亡的影响

林 宇 许惠玉 邹 宇 崔红霞 刘吉成

摘 要 **目的** 应用化学合成的 siRNA 干扰乳腺癌 Bcap37 细胞真核细胞翻译起始因子 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E, eIF4E) 的表达,探讨其对乳腺癌细胞凋亡和生长周期的影响。**方法** 化学合成 eIF4E 基因的 siRNA,转染人乳腺癌 Bcap37 细胞,采用 Western blotting 法及 RT-PCR 法检测转染前后 Bcap37 细胞中 eIF4E 蛋白和 mRNA 表达;应用流式细胞技术检测转染前后细胞周期的变化;AO/EB 双染色法检测细胞凋亡;酶标仪检测 caspase-3 活性。**结果** RT-PCR 与 Western blotting 法检测结果显示,转染 eIF4E-siRNA-3# 组细胞 eIF4E 基因的 mRNA 和蛋白表达均明显下降 ($P < 0.01$);eIF4E-siRNA 转染组 G_1 期细胞比例显著增加,S 期细胞比例相对减少,差异显著 ($P < 0.05$);转染 eIF4E-siRNA 可诱导细胞凋亡,caspase-3 活性亦增强。**结论** eIF4E-siRNA 可下调 eIF4E 基因在乳腺癌 Bcap37 细胞中的表达水平,诱导细胞凋亡。

关键词 真核细胞翻译起始因子 细胞凋亡 Bcap37

Effects of eIF4E Gene Down-regulation on Apoptosis of Human Breast Cancer Cell Line Bcap37. Lin Yu, Xu Huiyu, Zou Yu, Cui Hongxia, Liu Jicheng. Qiqihar Medical College, Heilongjiang 161006, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of down-regulation of eIF4E on the apoptosis and cell cycle of human breast cancer Bcap37 cells. **Methods** The siRNA of eIF4E by chemical synthesis was transfected into breast cancer Bcap37 cells. The expressions of eIF4E mRNA and protein were examined by RT-PCR and Western blotting. AO/EB doubly staining and microplate spectrophotometer were used to detect the apoptosis and activity of caspase-3. **Results** The expression of eIF4E mRNA and protein were all decreased markedly after transfection with eIF4E-siRNA-3#. The results of cell cycle detection showed that the percentage of Bcap37 cells in the G_1 phase obviously increased, while the percentage of Bcap37 cells in the S phase significantly reduced ($P < 0.05$). It also can induce apoptosis of cells and increase the activity of caspase-3. **Conclusion** Transfection with eIF4E-siRNA-3# can down-regulate eIF4E gene expression in human breast cancer Bcap37 cells and induce apoptosis of cells.

Key words eIF4E; Apoptosis; Bcap37

真核细胞翻译起始因子 (eukaryotic translation initiation factor 4E, eIF4E) 能够与真核细胞 mRNA 5' 端帽子结构特异结合,是蛋白质翻译起始的限速因子。其异常表达可使相关基因产物随之上调,改变细胞表型,诱导细胞转化而发生癌变^[1,2]。在人类多种肿瘤组织 (如头颈鳞癌、白血病、胃癌、结肠癌、乳腺癌) 中都发现 eIF4E 的高表达,并且与疾病进展相关,表明其过度表达能促进细胞恶性转化^[3~5]。本实验采用化学合成 eIF4E 的特异 siRNA,转染人乳腺癌 Bcap37 细胞,观察其对细胞凋亡的影响及可能机制。

材料与方法

1. 实验材料:人乳腺癌 Bcap37 细胞株购自上海中科院细胞库,ATCC 细胞;RPMI1640 培养基为美国 Gibco 公司产品;

吖啶橙 (AO)、溴乙锭 (EB)、Ac-DEVD-pNA 为 sigma 公司产品;细胞周期检测试剂盒购自南京凯基生物;RT-PCR 试剂盒购于大连宝生物;Lipofectamine 2000 美国 Invitrogen 公司产品;兔抗人 eIF4E 单克隆抗体、鼠抗人 GAPDH 多克隆抗体购于 Cell Signaling;eIF4E-siRNA 由上海吉凯公司设计合成,其他试剂均为国产分析纯。

2. siRNA 的转染与筛选:人乳腺癌细胞 Bcap37 用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,37℃、5% CO₂ 培养箱中常规培养,取对数生长期细胞以 4×10^5 密度接种于 6 孔板,细胞融合达 50% 时进行转染。实验分为未转染组、阴性对照组 (正义链:5' - UUCUCCGAACGUGUCACGUtt - 3', 反义链:5' - ACGUGACACGUUCGGAGAAtt - 3')、eIF4E-siRNA-1# (正义链:5' - GGAUGGUAUUGAG CCUAUGtt - 3', 反义链:5' - CAUAGGCUCAAUACCAUCCtt - 3')、eIF4E-siRNA-2# (正义链:5' - GGACGAUG GCUAAUUACAUtt - 3', 反义链:5' - AUGUAAUUAGCCAUCGUCCtt - 3')、eIF4E-siRNA-3# (正义链:5' - CCUGAUCUCCAAGUUUGAUtt - 3', 反义链:5' - AUCAAACUU GGAGAUCAUtt - 3')。转染步骤按照脂质体试剂说明书进行,转染 siRNA 浓度均为 50nmol/L。转染 48h 后,

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (30973902)

作者单位:161006 齐齐哈尔医学院 (林宇、许惠玉、崔红霞、刘吉成);150040 哈尔滨,黑龙江中医药大学 (邹宇)

通讯作者:刘吉成,电子信箱:qyblu@126.com

收获细胞。

3. RT-PCR 法检测细胞 eIF4E mRNA 的表达:收集转染 48h 的细胞,Trizol 试剂提取细胞总 RNA,根据反转录试剂盒说明书的方法反转录成 cDNA,以 cDNA 为模板,引物 5'-ACG GAA TCT AAT CAG GAG GT-3'(上游),5'-TTC CCA CAT AGG CTC AAT A-3'(下游),用以检测 eIF4E 基因 mRNA 的表达,扩增产物长度 246bp。同时设置 GAPDH 为内参照,其上游引物为 5'-GCG CCT GGT CAC CAG GGC TGC TT-3',下游引物为 5'-TGC CGA AGT GGT CGT GGA TGA CCT-3',扩增片段长度为 506bp。反应条件为 94℃ 3min,94℃ 20s,56℃ 30s,72℃ 20s,循环 34 次,末端延伸 72℃ 10min。PCR 产物上样于 2% 琼脂糖凝胶进行电泳,UV 照相和密度扫描。

4. Western blotting 法检测 eIF4E 蛋白表达:收集转染后细胞,于冰上加入 100μl 细胞裂解液,孵育 20min 后 4℃,12000g 离心 20min,收集上清为细胞总蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白浓度。40μg 总蛋白经 12% SDS-PAGE 电泳分离后转移到硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 2h,加入兔抗人 eIF4E 单克隆抗体(1:1000 稀释)、鼠抗人 GAPDH 多克隆抗体(1:3000 稀释)4℃ 过夜,TBST 洗膜后加入二抗(山羊抗兔和山羊抗鼠均为 1:2000 稀释)室温孵育 2h,TBST 洗膜后,ECL 发光试剂显色,X 线片曝光成像。

5. 流式细胞仪检测细胞周期变化:按照试剂盒说明书严格操作,收集转染与未转染 siRNA48h 的细胞,2000r/min 离心 5min,收集并调整细胞浓度为 10^6 ,加入 70% 乙醇,4℃ 固定 4h 以上,染色前 PBS 洗去固定液,加入 100μl RNaseA 37℃ 水浴 30min,400μl PI 4℃ 避光染色 30min 后上机检测,激发波长 488nm。

6. AO/EB 染色法检测细胞凋亡:细胞接种于 24 孔板,待细胞 50% 融合时,转染 si-eIF4E 50nmol/L,48h 后吸除培养基,每孔加入 PBS 稀释的 AO(100μg/ml)和 EB(100μg/ml)等体积混合的荧光染液 200μl。37℃ 避光染色 15min 后,PBS 洗 1 次,盖片封片后荧光显微镜观察照相。

7. caspase-3 活性检测:收集转染与未转染的细胞,按照上述方法提取细胞总蛋白,将样品蛋白浓度定量为 4μg/μl,反应体系含 40μl 样品,10μl Ac-DEVD-pNA (20μmol/L)、50μl 2 倍反应缓冲液(100mmol/L HEPES, 2% 甘油,5mmol/L DTT,0.5mmol/L EDTA),37℃ 避光孵育 2h 以上,酶标仪检测 405nm 出吸光值,吸光值直接反应 caspase-3 活性。

8. 统计学方法:实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件 One-Way ANOVA 进行处理分析,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD-t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 筛选 eIF4E-siRNA 有效干扰序列:采用 RT-PCR 法检测转染不同的 3 条 eIF4E-siRNA 对 Bcap37 细胞 eIF4E 基因 mRNA 表达水平的影响。如图 1 所示,eIF4E-siRNA-3# 的抑制作用最明显,抑制率达 70.6%。

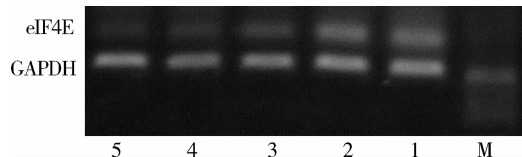


图 1 siRNA 片段抑制 Bcap37 细胞

eIF4E 的 mRNA 水平表达

M. DNA 分子质量标准;1. 空白对照;2. 阴性对照;3. eIF4E-siRNA-1#;4. eIF4E-siRNA-2#;5. eIF4E-siRNA-3#

Western blotting 法检测 eIF4E-siRNA 对 Bcap37 细胞 eIF4E 蛋白表达的影响。结果与对 mRNA 水平表达的作用相符,eIF4E-siRNA-3# 的基因沉默效应最强,可达 85% (图 2)。因此我们选择 eIF4E-siRNA-3# 作为 eIF4E 功能研究的有效干扰片段,进行后续试验研究。

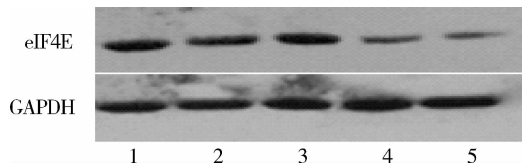


图 2 siRNA 片段抑制 Bcap37 细胞

eIF4E 的蛋白表达

1. 空白对照;2. 阴性对照 siRNA;3. eIF4E-siRNA-1#;4. eIF4E-siRNA-2#;5. eIF4E-siRNA-3#

2. eIF4E-siRNA 对 Bcap37 细胞周期和细胞凋亡的影响:细胞周期可反映细胞的增殖状态,所以我们采用流式细胞术检测了转染 50nmol/L eIF4E-siRNA48h 的 Bcap37 细胞和未转染的 Bcap37 细胞的细胞周期情况,结果发现,转染 eIF4E-siRNA 的细胞 G₁ 期比例由 55.3% 增加到 66%,S 期细胞比例减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示细胞被阻滞在 G₁ 期。

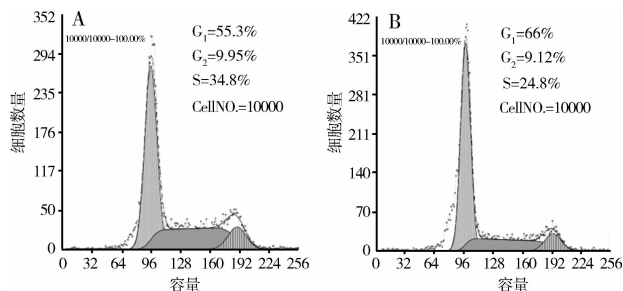


图 3 si-eIF4E 对 Bcap37 细胞周期的影响

A. 未转染的 Bcap37 细胞;B. 转染 50nmol/L si-eIF4E 48h 的 Bcap37 细胞

吖啶橙(AO)能透过胞膜完整的细胞,嵌入细胞核 DNA,使之发出明亮的绿色荧光。溴乙锭(EB)能透过胞膜受损的细胞,嵌入核 DNA,发橘红色荧光。

凋亡的细胞呈现为染色增强,荧光更为明亮,均匀一致的圆状或固缩状、团块状结构。在荧光显微镜下观察,正常活细胞,核染色质着绿色并呈正常结构(图 4A)。转染 50nmol/Lsi - eIF4E 48h 的 Bcap37 细胞核染色质着绿色及橘红色,呈固缩状或圆珠状。表明细胞出现明显凋亡。

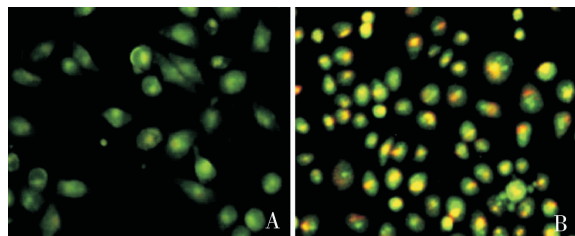


图 4 si - eIF4E 对 Bcap37 细胞的诱导凋亡作用 (×200)

A. 未转染的 Bcap37 细胞;B. 转染 50nmol/Lsi - eIF4E 48h 的 Bcap37 细胞

3. eIF4E - siRNA 对 caspase - 3 活性的影响: caspase - 3 是细胞凋亡过程中的一个关键酶。caspase - 3 活性检测是基于 caspase - 3 可以催化底物 Ac - DEVD - pNA 产生黄色的 pNA (p - nitroaniline), pNA 在 405nm 附近有强吸收,因此可以通过测定吸光度来检测 caspase - 3 的活性。实验通过转染不同浓度的 eIF4E - siRNA,发现分别转染 20、50、100nmol/L 的 si - eIF4E, caspase - 3 活性增强为 9.43 ± 2.10 、 11.3 ± 2.32 、 19.7 ± 1.45 ,与对照组 5.12 ± 1.22 相比差异显著 ($P < 0.05$),见图 5。

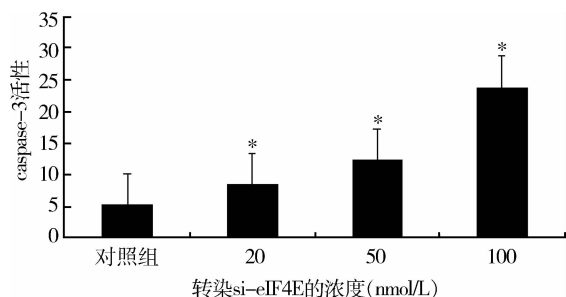


图 5 si - eIF4E Bcap37 转染 si - eIF4E 的浓度 (nmol/L)

细胞 caspase - 3 活性的影响

与对照组相比, * $P < 0.05$

讨 论

真核细胞翻译起始因子 eIF4E 与肿瘤发生发展的关系日益受到重视,其高表达于多种肿瘤细胞,通过调控肿瘤相关基因 mRNA 的翻译参与肿瘤发生发展。eIF4E 的过度表达会导致正常情况下不被翻译的含有长 5' - UTR 的 mRNA 基因产物如血管内皮生长因子、细胞周期调节蛋白等原癌基因蛋白产物上调,导致细胞恶性转化和分裂,引起肿瘤发生^[6~8]。

研究发现在人乳腺癌组织中有 eIF4E 的高表达,乳房良性组织中未见其过度表达。降低乳腺癌细胞中原癌基因 eIF4E 的表达,癌细胞的生长受到明显抑制。因此,设想 eIF4E 基因可成为肿瘤治疗的新靶点。

本实验针对 eIF4E 靶基因设计合成了 3 条 siRNA 干扰序列,通过 RT - PCR 和 Western blotting 法检测 eIF4E 基因的干扰效果,筛选出干扰效果最强的一条序列 eIF4E - siRNA - 3#,用于后续试验研究。通过流式细胞仪与 AO/EB 染色法分析了转染后细胞周期与凋亡的变化,结果显示 eIF4E 基因干扰后,细胞生长抑制,细胞周期阻滞在 G₁ 期,并诱导细胞凋亡。从形态学上证实了干扰 eIF4E 基因对 Bcap37 凋亡的作用后,我们进一步检测了干扰 eIF4E 基因后细胞内的 caspase - 3 活性。caspase - 3 是 caspase 蛋白酶家族最重要成员之一,是细胞凋亡的执行因子,凋亡早期的检测指标。本实验通过转染 eIF4E 基因的干扰 siRNA,发现细胞的 caspase - 3 活性随着 eIF4E 基因的干扰强度增大有增加的趋势。说明 eIF4E 基因与细胞凋亡的关系与线粒体信号途径有关,但是具体作用机制还有待深入研究。综上所述,eIF4E - siRNA 可有效抑制 eIF4E 原癌基因的表达,eIF4E 分子有望成为乳腺癌基因治疗的新靶点。

参考文献

- Dong K, Wang R, Wang X, *et al.* Tumor specific RNAi targeting eIF4E suppresses tumor growth, induces apoptosis and enhances cisplatin cytotoxicity in human breast carcinoma cells [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 113 (3): 443 - 456
- Fan SQ, *et al.* Phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 4 (eIF4E) is elevated in human cancer tissues [J]. *Cancer Biol Ther*. 2009, 8 (15): 1463 - 1469
- De Benedetti A, Graff JR. eIF4E expression and its role in malignancies and metastases [J]. *Oncogene*, 2004, 23 (18): 3189 - 3199
- Zhou S, Wang GP, Liu C, *et al.* Eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) and angiogenesis: prognostic markers for breast cancer [J]. *BMC Cancer*, 2006, 30 (6): 231
- Thumma SC, Kratzke RA. Translational control: a target for cancer therapy [J]. *Cancer Lett*, 2007, 258 (1): 1 - 8
- Hagner PR, Schneider A, Gartenhaus RB. Targeting the translational machinery as a novel treatment strategy for hematologic malignancies [J]. *Blood*, 2010, 115 (11): 2127 - 2135
- Li Y, Yue P, Deng X, *et al.* Protein phosphatase 2A negatively regulates eukaryotic initiation factor 4E phosphorylation and eIF4E assembly through direct dephosphorylation of Mnk and eIF4E [J]. *Neoplasia*, 2010, 12 (10): 848 - 855
- Culjkovic B, Topisirovic I, Borden KL. Controlling gene expression through RNA regulons: the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E [J]. *Cell Cycle*, 2007, 6 (1): 65 - 69

(收稿:2011 - 09 - 06)

(修回:2011 - 09 - 15)