

# PDE5 基因沉默对肾透明细胞癌 细胞增殖和凋亡的影响

傅 晶 陈尧康 虞利民 何小祥 黄 正 叶华建

**摘要** 目的 探讨 PDE5 基因对肾透明细胞癌细胞株 786-O 细胞增殖和凋亡的影响。方法 设计、合成 PDE5 siRNA 序列,按照 HiPerFect 转染试剂盒操作手册转染 786-O 细胞。采用实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative PCR)和 Western blot 法检测转染后 PDE5 基因的表达,通过 WST-1 法检测细胞增殖情况,caspase-3 活性检测试剂盒检测 caspase-3 活性。**结果** 与空白对照组和阴性对照组相比较,PDE5 siRNA 转染组的 mRNA 及蛋白表达水平显著降低,786-O 细胞增殖能力明显受到抑制,caspase-3 活性明显增加,差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** siRNA 干扰 PDE5 基因表达可抑制肾透明细胞癌细胞株 786-O 细胞的增殖并促进凋亡。

**关键词** 肾透明细胞癌 PDE5 基因 细胞增殖 细胞凋亡

**中图分类号** R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.03.029

**Effects of PDE5 Gene Silence on the Proliferation and Apoptosis of Clear Cell Renal Cell Carcinoma Cells.** Fu Jing, Chen Yaokang, Yu Limin, et al. Department of Urology, Shaoxing Second Hospital, Zhejiang 312000, China

**Abstract Objective** To explore the effect of PDE5 gene on the proliferation and apoptosis of clear cell renal cell carcinoma cell line 786-O. **Methods** The siRNA of PDE5 was constructed and transfected into 786-O cells with HiPerFect transfection reagent. The PDE5 expression levels after transfection were detected by using real-time quantitative PCR and Western blot. The cell proliferation was assessed by WST-1 assay. The caspase-3 activity was detected by kit. **Results** Compared with the control group and blank group, the mRNA and protein levels were significantly reduced and the proliferation of 786-O cells was significantly inhibited in the PDE5 siRNA group ( $P < 0.05$ ), while caspase-3 activity was significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** siRNA interference of PDE5 gene may inhibit cell proliferation and promote cell apoptosis in clear cell renal cell carcinoma cell line 786-O.

**Key words** Clear cell renal cell carcinoma; PDE5 gene; Cell proliferation; Cell apoptosis

近年来研究发现,肾癌特异性抑癌基因 VHL 突变失活和细胞质内  $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)积聚增多是肾透明细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)共同的遗传学和组织学表现<sup>[1,2]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin 经典信号通路通过抑制细胞内信号分子  $\beta$ -catenin 的正常降解,从而使得部分过剩  $\beta$ -catenin 进入细胞核与 TCF/LEF 转录因子家族一起作用促进了特定癌基因的表达,进而形成肿瘤<sup>[3]</sup>。研究发现磷酸二酯酶 5(phosphodiesterase type 5, PDE5)抑制剂对  $\beta$ -catenin 有削减作用<sup>[4]</sup>。笔者通过 RNA 干扰技术沉默 PDE5 基因在肾透明细胞癌细胞株 786-O 中的表达,检测其增殖能力和凋亡水平的变化,探讨 PDE5 基因在肾透明细胞癌形成和发展中所发挥的作用。

## 材料与方法

1. 细胞培养:肾透明细胞癌细胞株 786-O(美国 ATCC 公司)用含 5% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 RPMI1640 培养基(均购自美国 HyClone 公司),置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养。

2. 细胞转染:PDE5 基因 mRNA 序列来自 GenBank,基因编号为 NM\_033437,针对其序列设计的 siRNA 序列和阴性对照序列均购自武汉晶赛生物工程有限公司。PDE5A siRNA 序列为:正义链:5'-GGAAGAAACAAGAGAGCUAdTdT-3';反义链:5'-UAGCUCUCUUGUUUCU UCCdTdT-3'。培养细胞处于增值期时,以  $2.0 \times 10^5$  个/孔的密度接种到 6 孔板培养皿上,当细胞覆盖率达 70%~80% 时开始转染。转染按照 HiPerFect 转染试剂盒(德国 QIAGEN 公司)操作手册进行。

3. 实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative PCR, RTQ-PCR):转染 48h 后收集细胞,按 Tr-

基金项目:绍兴市科技计划项目(2010D10014)

作者单位:312000 浙江大学医学院附属第一医院绍兴分院、绍兴市第二医院泌尿外科

izol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)操作手册提取细胞总 RNA,然后反转录成 cDNA(ReverTra Ace qPCR RT 试剂盒,日本 Toyobo 公司)。采用 SYBR Green Real-time PCR Master Mix - Plus(日本 Toyobo 公司)进行 RTQ-PCR。PDE5 上游引物:5'-CACACCGAATCT-TGCTCTTG-3',下游引物:5'-TCAGAATCCTTGA-CAACA ATGG-3',扩增产物 130bp。内参照  $\beta$ -actin 上游引物:5'-AATCGTGCCTGACATTAAG-3',下游引物:5'-GAAGGAAGGCTGGAAGAG-3',扩增产物 174bp。PCR 反应条件:94℃ 变性 2min;94℃ 变性 30s,62℃ 退火 1min,72℃ 延伸 30s,35 个循环;72℃ 延伸 10min。采用  $\Delta\Delta Ct$  相对定量法比较不同组的基因表达差异,重复 3 次。

4. Western blot 法检测 PDE5 的表达:转染 48h 后收集细胞,磷酸盐缓冲液洗涤,加入预冷的含蛋白酶抑制剂苯甲基黄酰氟(PMSF)的细胞裂解液,在冰上裂解 30min。超声破碎 DNA 2s,置于 4℃ 离心机 13200r/min 离心 5min,取上清液,Bradford 法测蛋白浓度。按每孔 20 $\mu$ g 蛋白加样,用 12% 二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,然后将蛋白转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,与相应抗体(美国 Abcam 公司)进行免疫反应。用增强化学发光法(ECL)显影成像(上海碧云天生物技术有限公司),Quantity One 4.4 软件分析蛋白条带。重复 3 次。

5. WST-1 检测细胞增殖:分别取处于增殖期的空白对照组、阴性对照组和 siRNA 组细胞,调整细胞浓度为  $1.5 \times 10^4$  个/毫升,接种于 96 孔板中,每孔 180 $\mu$ l。置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中,分别培养 24、48、72h 后加入 20 $\mu$ l WST-1 试剂继续培养 4h,然后在酶标仪上测定 450nm 波长各孔的吸光度值( $A_{450}$ ),计算增殖抑制率。增殖抑制率(%) = (1 - 实验组  $A_{450}$ /对照组  $A_{450}$ )  $\times$  100%。每组设 3 个复合孔。

6. 细胞凋亡中 caspase-3 活性的检测:采用 caspase-3 活性检测试剂盒测定 caspase-3 的活性(上海碧云天生物技术有限公司)。转染 24h 后各组细胞经 0.25% 胰酶消化制成细胞悬液,离心收集细胞,测定 caspase-3 的活性,用酶标仪测定 405nm 波长的吸光度值( $A_{405}$ )。caspase-3 活性计算公式 = 实验组  $A_{405}$ /对照组  $A_{405}$   $\times$  100%。重复 3 次。

7. 统计学方法:应用 SPSS 13.0 软件进行数据分析,计量资料采用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两样本间均数比较采用 *t* 检验,多样本间均数比较采用单因

素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

结 果

1. PDE5 siRNA 抑制 PDE5 mRNA 的表达:RTQ-PCR 结果显示,与空白对照组和阴性对照组比较,PDE5 mRNA 在转染 siRNA 序列组的水平明显降低( $P < 0.05$ ,图 1)。

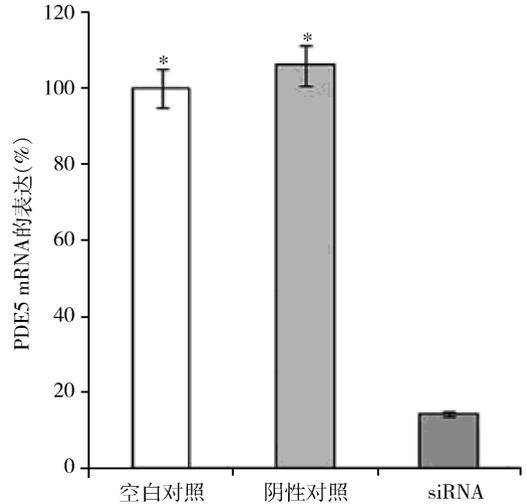


图 1 RTQ-PCR 检测 786-O 细胞中 PDE5 mRNA 的表达百分数  
与 siRNA 比较,\*  $P < 0.05$

2. PDE5 siRNA 抑制 PDE5 蛋白的表达:Western blot 法检测结果显示,与空白对照组和阴性对照组比较,PDE5 蛋白表达在转染 siRNA 序列组的水平明显降低,其灰度值比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 2、图 3)。

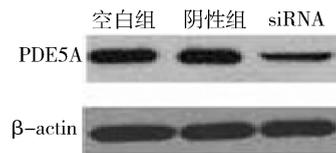


图 2 Western blot 法检测 786-O 细胞中 PDE5 蛋白的表达

3. PDE5 siRNA 抑制细胞增殖:WST-1 检测结果显示,PDE5 siRNA 对 786-O 细胞增殖具有明显的抑制作用,且呈现时间依赖性,干扰 24、48、72h 后细胞增殖抑制率逐渐升高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。空白对照组和阴性对照组对 786-O 细胞没有生长抑制作用(表 1)。

4. PDE5 siRNA 促进细胞凋亡:caspase-3 活性检测结果显示,PDE5 siRNA 对 786-O 细胞凋亡具有明显的促进作用。与对照组相比较,PDE5 siRNA

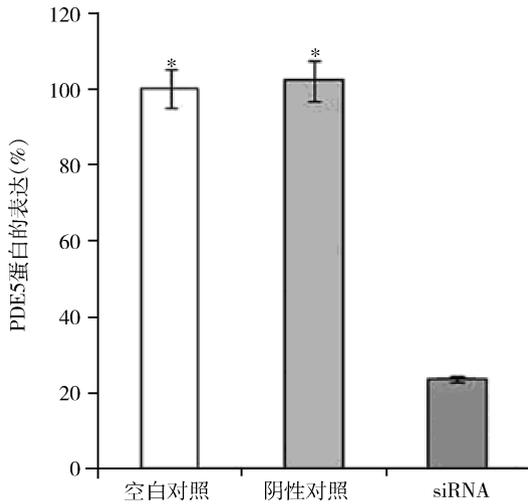


图3 Western blot 法检测 786 - O 细胞中 PDE5 蛋白的表达百分数与 siRNA 比较, \* P < 0.05

表1 细胞增殖抑制率在不同组不同时间点的比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	24h	48h	72h
空白对照组	0 ± 0.25	0.25 ± 0.21	0.40 ± 0.33
阴性对照组	0 ± 0.30	0.25 ± 0.23	0.50 ± 0.45
PDE5 siRNA 转染组	13.10 ± 2.60	44.90 ± 6.20	57.80 ± 7.25

转染组 caspase - 3 活性增加 2 倍以上, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 4)。

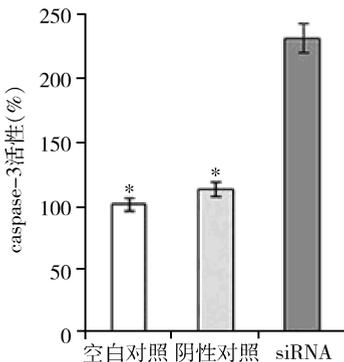


图4 786 - O 细胞中 caspase - 3 活性的表达百分数与 siRNA 比较, \* P < 0.05

### 讨 论

Wnt/ $\beta$  - catenin 经典信号通路在肾癌的发生、发展、转移等方面都具有重要的作用<sup>[5]</sup>。 $\beta$  - catenin 是 Wnt 信号通路的下游元件, 是重要的致癌因素。细胞核内积聚的  $\beta$  - catenin 增加了 HIG - 2、MMP7、c - myc、cyclin D1 和 PPAR 等有利增殖或抗细胞凋亡的细胞因子的转录, 因此  $\beta$  - catenin 在细胞内的含量对肾癌的形成和发展发挥重要的作用<sup>[6]</sup>。研究发现

PDE5 抑制剂对  $\beta$  - catenin 具有削减作用<sup>[4]</sup>。

PDE5 在正常生理情况下是调控 cGMP 特定信号通路的关键酶, 调节平滑肌收缩和松弛。在病理条件下的阴茎海绵体和肺动脉平滑肌中, 低 cGMP 水平可以通过抑制 PDE5 来得到改变, 进而使得 cGMP 提高, 平滑肌松弛。选择性 PDE5 抑制剂如西地那非已成功用于治疗勃起功能障碍和肺动脉高压。近年来研究发现, PDE5 与多种癌的癌细胞增殖和凋亡密切相关<sup>[7,8]</sup>。其理论基础是基于许多癌是 PDE5 高活性表达。PDE5 抑制剂使得细胞内 cGMP 和 cGMP 依赖的蛋白激酶 (PKG) 持续增长, 而活化的 cGMP - PKG 对  $\beta$  - catenin 在细胞内的含量起到了关键作用, 减少了  $\beta$  - catenin 的积聚, 从而引起肿瘤细胞凋亡和细胞周期阻滞<sup>[9]</sup>。与传统的抗肿瘤药物相比, PDE5 抑制剂通过第二信使的改变来达到抗肿瘤, 其毒性不良反应在肝肾、血液发生率大大降低, 可以说是一条新的低毒性不良反应的抗肿瘤途径。国外已经在肺癌、乳腺癌、膀胱癌、前列腺癌、结肠癌和白血病上应用 PDE5 抑制剂进行研究, 但在肾癌方面不是很多, 国内研究更是很少<sup>[4,8,10-14]</sup>。

本研究通过 RNA 干扰技术沉默 PDE5 基因, 结果显示 PDE5 siRNA 转染组细胞 24h 出现明显的生长抑制, 且呈时间依赖性, 48、72h 后细胞增殖抑制率进一步升高。空白对照组和阴性对照组对 786 - O 细胞则没有生长抑制作用。caspase 的级联激活在细胞凋亡过程中发挥着至关重要的作用, caspase - 3 的活化是其关键环节, 在细胞凋亡中起着不可替代的作用。本研究发现在转染 PDE5 siRNA 的 786 - O 细胞中 caspase - 3 活性明显增强, 显著高于空白对照组和阴性对照组, 此结果意味着 PDE5 siRNA 对 786 - O 细胞凋亡具有明显的促进作用。

综上所述, 本研究结果显示 PDE5 基因在肾透明细胞癌中可能起到促癌基因的作用, 为肾癌的治疗提供新的治疗靶点和途径。

### 参 考 文 献

- McRonal FE, Morris MR, Gentle D, et al. CpG methylation profiling in VHL related and VHL unrelated renal cell carcinoma[J]. Mol Cancer, 2009, 8(1): 31 - 41
- Berndt JD, Moon RT, Major MB.  $\beta$  - catenin gets jaded and von Hippel - Lindau is to blame[J]. Trends Biochem Sci, 2009, 34(3): 101 - 104
- Katoh M, Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(14): 4042 - 4045
- Li N, Xi Y, Tinsley HN, et al. Sulindac selectively inhibits colon tumor cell growth by activating the cGMP/PKG pathway to suppress

- Wnt/ $\beta$ -catenin signaling[J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12(9): 1848-1859
- 5 魏铭, 温伟红, 秦卫军. 肾细胞癌相关信号通路的研究进展[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2014, 35(12): 941-944
  - 6 Hirata H, Hinoda Y, Majid S, *et al*. DICKKOPF-4 activates the noncanonical c-Jun-NH2 kinase signaling pathway while inhibiting the Wnt-canonical pathway in human renal cell carcinoma[J]. *Cancer*, 2011, 117(8): 1649-1660
  - 7 Kumazoe M, Sugihara K, Tsukamoto S, *et al*. 67-kDa laminin receptor increases cGMP to induce cancer-selective apoptosis[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(2): 787-799
  - 8 Whitt JD, Li N, Tinsley HN, *et al*. A novel sulindac derivative that potently suppresses colon tumor cell growth by inhibiting cGMP phosphodiesterase and  $\beta$ -catenin transcriptional activity[J]. *Cancer Prev Res*, 2012, 5(6): 822-833
  - 9 Zhu B, Vemavarapu L, Thompson WJ, *et al*. Suppression of cyclic GMP-specific phosphodiesterase 5 promotes apoptosis and inhibits growth in HT29 cells[J]. *J Cell Biochem*, 2005, 94(2): 336-350
  - 10 Li Q, Shu Y. Pharmacological modulation of cytotoxicity and cellular uptake of anti-cancer drugs by PDE5 inhibitors in lung cancer cells[J]. *Pharm Res*, 2014, 31(1): 86-96
  - 11 Tinsley HN, Gary BD, Keeton AB, *et al*. Inhibition of PDE5 by sulindac sulfide selectively induces apoptosis and attenuates oncogenic Wnt/ $\beta$ -catenin-mediated transcription in human breast tumor cells[J]. *Cancer Prev Res*, 2011, 4(8): 1275-1284
  - 12 Piazza GA, Thompson WJ, Pamukcu R, *et al*. Exisulind, a novel proapoptotic drug, inhibits rat urinary bladder tumorigenesis[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(10): 3961-3968
  - 13 Lim JTE, Piazza GA, Pamukcu R, *et al*. Exisulind and related compounds inhibit expression and function of the androgen receptor in human prostate cancer cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(13): 4972-4982
  - 14 Kumazoe M, Kim Y, Bae J, *et al*. Phosphodiesterase 5 inhibitor acts as a potent agent sensitizing acute myeloid leukemia cells to 67-kDa laminin receptor-dependent apoptosis[J]. *FEBS Lett*, 2013, 578(18): 3052-3057

(收稿日期:2015-08-30)

(修回日期:2015-09-18)

## 二烯丙基二硫对口腔鳞癌 CAL-27 细胞增殖及凋亡的研究

刘鲁亮 李国林 顾博宇 迟惠熔 孙金环 郭福林

**摘要** 目的 探讨二烯丙基二硫(diallyl disulfide, DADS)对口腔鳞癌 CAL-27 细胞的增殖抑制及促进凋亡的作用。  
**方法** 体外培养口腔鳞癌 CAL-27 细胞,采用不同浓度二烯丙基二硫对 CAL-27 细胞进行干预,并设立对照组,采用倒置显微镜观察细胞的形态学改变,MTT 法检测细胞的增殖情况,Hoechst33342 染色法检测细胞凋亡,用比色法检测 caspase-3 活性的改变。  
**结果** 倒置相差显微镜下观察对照组的细胞贴壁,形态呈多边形,生长活跃;实验组细胞形态改变,细胞脱壁,变小、变圆,细胞膜皱缩。MTT 结果显示,随着浓度的增加,时间的延长,二烯丙基二硫对 CAL-27 细胞的生长及增殖有显著的抑制作用,并且各实验组相比及实验组与对照组相比,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。荧光显微镜下观察到经 Hoechst33342 染色的凋亡细胞。实验组 caspase-3 活性较正常对照组明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。  
**结论** 二烯丙基二硫体外能抑制 CAL-27 的细胞增殖,呈一定的时间及剂量依赖性,并且诱导细胞凋亡,caspase-3 可能参与了细胞凋亡的调控。

**关键词** 口腔癌 CAL-27 细胞 二烯丙基二硫 细胞增殖 细胞凋亡

**中图分类号** R78

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.03.030

**Research on the Proliferation and Apoptosis of CAL-27 Induced by Diallyl Disulfide.** Liu Luliang, Li Guolin, Gu Boyu, *et al*. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Affiliated Stomatological Hospital, Harbin Medical University, Heilongjiang 150001, China

**Abstract Objective** To investigate the effects on CAL-27 cells proliferation and apoptosis induced by DADS. **Methods** CAL-27 cells were cultured in vitro. The oral squamous cell carcinoma CAL-27 cells cultured in medium were delt with different concentration of DADS at different time (24h, 48h, 72h). Morphological change of cells was observed by light microscope. The influence on the cell proliferation was investigated by MTT method. The cell apoptosis was detected by Hoechst33342 fluorescent staining. Moreover, the chan-

基金项目:哈尔滨医科大学附属第一医院基金资助项目(2012B011)

作者单位:150001 哈尔滨医科大学附属口腔医院口腔颌面外科

通讯作者:郭福林,副教授,电子信箱:flguo1967@126.com