

# 外源性小分子双链 RNA 激活肾癌细胞野生型 P53 蛋白表达作用的研究

黄 耿 桂定文 姜卫东 叶志华

**摘 要** **目的** 通过转染外源性低分子双链 RNA(dsRNA)dsP53-285 至人肾癌细胞系 ACHN 和 786-O,观察其激活肾癌细胞中抑癌蛋白野生型 P53 的表达作用。**方法** 根据对肾癌细胞的不同处理分为 3 组,即空白对照(mock)组、阴性对照(转染 dsControl)组和实验(dsP53-285)组。荧光实时定量聚合酶链反应(QPCR)和免疫印迹法(Western blot)分别检测 P53 mRNA、P21 mRNA 和相应蛋白的表达水平。MTT 法和集落形成实验检测各组细胞活力及增殖能力。**结果** QPCR 检测显示 dsP53-285 能明显促进两种肾癌细胞中 P53 mRNA 和 P21 mRNA 水平的升高;与阴性对照组 dsControl 组相比,dsP53-285 分别上调 ACHN 和 786-O 细胞中 P53 mRNA 的表达 2.84 倍( $P<0.01$ )和 3.20 倍( $P<0.01$ ),dsP53-285 分别上调 ACHN 和 786-O 细胞中 P21 mRNA 的表达 2.33 倍( $P<0.01$ )和 2.59 倍( $P<0.01$ );mock 组与 dsControl 组相比,两种细胞系中 P53 mRNA 和 P21 mRNA 的表达差异均没有统计学意义( $P>0.05$ )。Western blot 法检测显示在两种细胞系中,P53 蛋白、P21 蛋白表达水平的上调与相应的 P53 mRNA、P21 mRNA 水平的上调一致。MTT 检测结果显示,与 dsControl 组相比,转染 dsP53-285 后,ACHN 和 786-O 细胞活力显著降低( $P<0.01$ ),mock 组与 dsControl 组无明显差异( $P>0.05$ )。集落形成实验显示,dsP53-285 组的集落数数量显著较少( $P<0.05$ ),mock 组与 dsControl 组无明显差异( $P>0.05$ )。**结论** 外源性 dsP53-285 能显著激活肾癌细胞中 P53 基因的表达,激活的 P53 蛋白为野生型而非突变型,并可以显著抑制肾癌细胞的生长。

**关键词** dsRNA P53 P21 肾癌

**中图分类号** R737.11

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.05.044

**Study on Exogenous Small Double-stranded RNA's Activating Effects on Wild-type P53 Protein Expression in Renal Cell Carcinoma.**

Huang Geng, Gui Dingwen, Jiang Weidong, et al. Huangshi Central Hospital of Edong Healthcare Group, Hubei Polytechnic University, Hubei 435000, China

**Abstract Objective** To investigate the activating effects of dsP53-285 on wild-type P53 expression in human renal carcinoma cells, dsP53-285 was transfected into human renal carcinoma cell lines ACHN and 786-O. **Methods** According to the different treatment, renal carcinoma cells were randomly divided into blank control group (mock), negative control group (transfected with dsControl) and experimental group (dsP53-285). The expression of P53 mRNA, P21 mRNA and corresponding protein were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (QPCR) and Western blot. MTT assay and colony formation assay were used to detect the viability and proliferation ability of each group. **Results** dsP53-285 significantly enhanced the expression of P53 mRNA and P21 mRNA in the two renal cell lines. Compared with the negative control group, dsP53-285 increased the expression of P53 mRNA to 2.84-fold ( $P<0.01$ ) in ACHN and 3.20-fold ( $P<0.01$ ) in 786-O cells, dsP53-285 up-regulated the expression of P21 mRNA to 2.33-fold ( $P<0.01$ ) in ACHN and 2.59-fold ( $P<0.01$ ) in 786-O cells. Compared with mock, there was no significant difference in the expression of P53 mRNA and P21 mRNA in both cell lines transfected with dsControl ( $P>0.05$ ). Western blot analysis showed that the up-regulation of P53 protein and P21 protein expression was consistent with the increase of P53 mRNA and P21 mRNA in the two cell lines. MTT assay showed that the viability of ACHN and 786-O decreased significantly ( $P<0.01$ ) compared with dsControl group, and there was no significant difference between mock group and dsControl group ( $P>0.05$ ). Colony formation experiments showed that the number of colonies in the dsP53-285 group was significantly lower ( $P<0.05$ ), and there was no significant difference between the mock group and the dsControl group ( $P>0.05$ ). **Conclusion** Exogenous dsP53-285 can significantly activate the expression of P53 gene in renal cell carcinoma. The activated P53 protein is wild type rather than mutant, and can significantly inhibit the growth of renal cell carcinoma.

**Key words** dsRNA; P53; P21; Renal cell carcinoma

作者单位:435000 鄂东医疗集团黄石市中心医院(湖北理工学院附属医院)泌尿外科、肾脏疾病发生与干预湖北省重点实验室

通讯作者:叶志华,电子邮箱:dryezhihua@163.com

肾癌是泌尿系常见的恶性肿瘤之一,2015 年美国有 61560 例新诊断的病例和 14080 例死亡病例<sup>[1]</sup>。危险因素如遗传物质的改变、化学或环境暴露以及慢性刺激都可能会导致肾癌的发生<sup>[2]</sup>。野生型 P53 蛋白是众所周知的肿瘤抑制蛋白,其通过诱导 DNA 修复、引起细胞周期衰老、诱导细胞凋亡等抑制肿瘤的发生和发展<sup>[3,4]</sup>。有研究表明,低分子双链 RNA (dsRNA) dsP53 - 285 能够明显激活黑猩猩皮肤成纤维细胞中 P53 蛋白的表达<sup>[5]</sup>。那么 dsP53 - 285 是否同样能够激活人类细胞中 P53 蛋白的表达。本研究旨在研究 dsP53 - 285 对人肾癌细胞中 P53 蛋白的激活作用,并通过检测 P53 蛋白下游靶基因 P21 的表达进一步明确所激活表达的 P53 蛋白的类型。

### 材料与方法

1. 材料:人肾癌细胞系 ACHN 和 786 - O 购于中国科学院生物化学与细胞生物学研究所;DMEM 培养基、RPMI1640 培养基、Trizol Reagent 购于美国 HyClone 公司;胎牛血清购于美国 Gibco 公司;dsControl 和 dsP53 - 285 购于广州锐博生物科技有限公司;Lipofectamine 2000、Opti - MEM 和 SuperScript reverse transcriptase 购于美国 Invitrogen 公司;荧光定量 PCR 试剂盒购于日本 TaKaRa 公司;PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成;StepOne Plus™ Real - Time PCR System 购于美国 ABI 公司;BCA protein assay kit 购于美国 Pierce 公司;一抗 P53、P21 和  $\beta$  - Actin 购于美国 Cell Signaling Technology 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗购于美国 Santa Cruz 公司;超敏 ECL 发光试剂盒购于美国 Thermo 公司;MTT 试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。

2. 方法:(1) dsRNA 的设计与合成:人工合成 dsP53 - 285,长度为 19 个核苷酸碱基对,上游引物:5' - UUACGGAAAGCCUUCUUA - 3',下游引物:5' - UUAGGAAGCCUUCUGUAA - 3'(图 1)<sup>[5]</sup>。dsControl 是目前已知的缺少人类基因重要同源性的低分子双链 RNA,上游引物:5' - ACUACUGAGUGA - CAGUAGA - 3',下游引物:5' - UCUACUGUCACU - CAGUAGU - 3'<sup>[6]</sup>。(2) 细胞培养和 dsRNA 转染:人肾癌细胞系 ACHN 常规培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,786 - O 常规培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱。取对数生长期的细胞接种于 6 孔的细胞培养板,种板 18h 后,进行转染实验。Lipofectamine 2000 作为转染试剂,mock 组只加转染试剂,dsControl

组加入转染试剂和 dsControl,dsP53 - 285 组加入转染试剂和 dsP53 - 285。12h 后观察细胞状态并更换培养基。(3) 总 RNA 的提取和 QPCR 检测:转染后 72h 收集肾癌细胞用于 P53mRNA 和 P21mRNA 表达水平的检测。总 RNA 的提取使用 Trizol Reagent。使用 SuperScript reverse transcriptase 将 RNA 反转录为 cDNA。以 GAPDH 为内参,合成的 cDNA 利用荧光定量 PCR 试剂盒通过 PCR 仪进行扩增检测。扩增条件:95℃ 预变性 3min;95℃ 15s,60℃ 30s,72℃ 30s;72℃ 总延伸 10min,40 个循环。结果采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法分析基因相对定量表达。GAPDH 引物序列:上游引物:5' - TCCCATCACCATCTTCCA - 3',下游引物:5' - CATCACGCCACAGTTTCC - 3';P53 引物序列:上游引物:5' - CAGCACATGACGGAGGTTGT - 3',下游引物:5' - TCATCCAAATACTCCACACGC - 3';p21 引物序列:上游引物:5' - GCCCAGTGGACAGCGAG - CAG - 3',下游引物:5' - GCCGGCGTTTGGAGTGG - TAGA - 3'。(4) 总蛋白的提取和 Western blot 法检测:转染后 72h 收集肾癌细胞提取总蛋白,用于 P53 蛋白和 P21 蛋白表达的分析。BCA protein assay kit 测定不同样本的蛋白浓度,每个样本上样 40 $\mu$ g 蛋白至 SDS - PAGE 胶进行电泳,然后转至 PVDF 膜,室温下用含 5% 牛血清白蛋白的 TBST 溶液封闭 1h 后,与特异性一抗 P53(1:1000 稀释)、P21(1:1000 稀释)、 $\beta$  - actin(1:2000 稀释)4℃ 孵育过夜。24h 后采用二抗(1:1000 稀释)孵育 2h,使用 ECL 曝光显影。(5) MTT 法:转染后 24h,收集细胞,将细胞以 1000 个/孔接种 96 孔板。于接种后第 1、2、3、4、5 天分别采用 MTT 试剂盒检测细胞活力。(6) 集落形成实验:消化收集细胞,按 1000 个/孔接种于 6 孔培养板,连续培养 10 天;PBS 溶液洗 3 次;甲醇固定 15min;0.1% 结晶紫溶液固定 15min;洗去残余结晶紫染液,统计集落数差异。

3. 统计学方法:所有实验均重复 4 次,所有数据采用 SPSS 19.0 统计学软件对数据进行统计分析处理。所有检测结果均以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析检验各组间的差异,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1. dsP53 - 285 的靶基因作用位点:dsP23 - 285 完全互补配对结合于黑猩猩 P53 基因启动子靶序列位于转录起始点上游 - 285/-267bp,且黑猩猩的 P53 基因启动子转录起始点上游的 - 285/-267bp 处

的序列与人完全相同,dsP53 - 285 可以与人 P53 基因启动子转录起始点上游的 -285/-267bp 处的序列特异性结合(图 1)。

人类P53基因启动子 5'-taTTACGGAAAGCCTTCCTAAa- 3'  
黑猩猩P53基因启动子 5'-taTTACGGAAAGCCTTCCTAAa- 3'  
dsP53-285反义链 3'-AAUGCCUUUCGGAAGGAUU- 5'

图 1 dsP53 - 285 序列及特异性结合的人类和黑猩猩 P53 基因启动子转录起始点上游序列

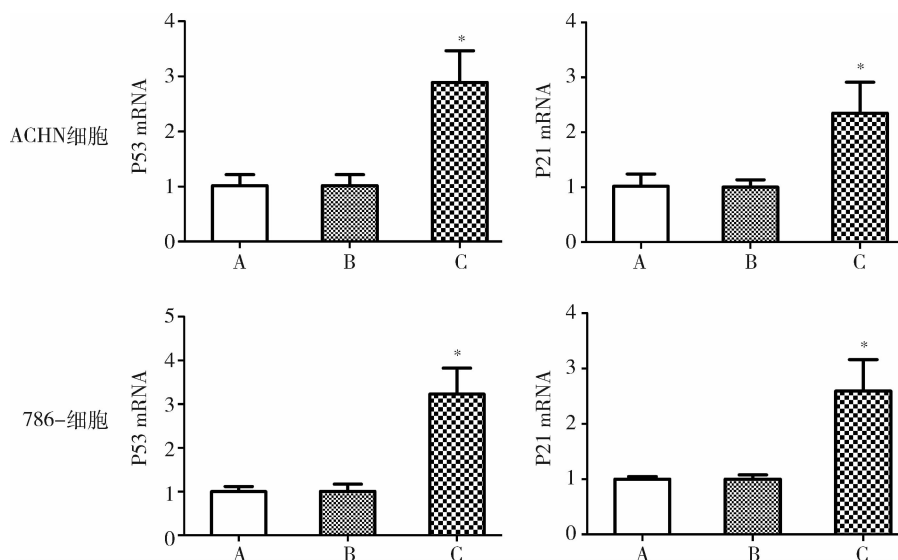


图 2 QPCR 检测 p53 mRNA 和 p21 mRNA 的相对表达

A. mock 组 (空白对照组); B. dsControl 组 (阴性对照组); C. dsP53 - 285 组 (实验组); 与 dsControl 组比较, \*  $P < 0.01$

3. Western blot 法分别检测 P53 蛋白和 P21 蛋白的相对表达:与 dsControl 相比,dsP53 - 285 可明显激活 ACHN 和 786 - O 细胞中 P53 蛋白的表达,且在 dsP53 - 285 组中,可见 ACHN 和 786 - O 细胞中 P21 蛋白的表达均明显上调(图 3)。灰度值检测结果显示,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 4)。

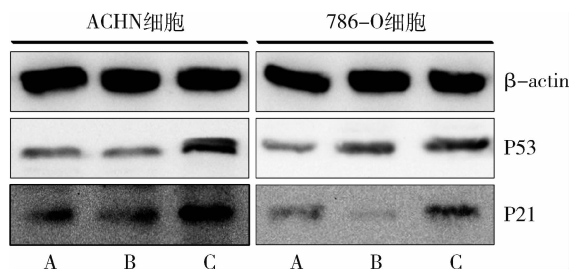


图 3 Western blot 法检测 P53 蛋白和 P21 蛋白表达变化

A. mock 组 (空白对照组); B. dsControl 组 (阴性对照组);  
C. dsP53 - 285 组 (实验组)

4. MTT 法检测肾癌细胞活力:MTT 检测结果显示,转染 dsP53 - 285 后细胞较 dsControl 组活力明显下降( $P < 0.05$ ),dsControl 组与 mock 组细胞活力差

2. QPCR 定量检测 P53 mRNA 和 P21 mRNA 的表达:与 dsControl 组相比,dsP53 - 285 分别上调 ACHN 和 786 - O 细胞中 P53 mRNA 的表达 2.84 倍( $P < 0.01$ )和 3.20 倍( $P < 0.01$ ),且 dsP53 - 285 分别上调 ACHN 和 786 - O 细胞中 P21 mRNA 的表达 2.33 倍( $P < 0.01$ )和 2.59 倍( $P < 0.01$ );mock 组与 dsControl 组比较,两种细胞系中 P53 mRNA 和 P21 mRNA 的表达差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ,图 2)。

异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图 5)。

5. 集落形成实验检测肾癌细胞增殖能力:dsP53 - 285 组形成的集落数较 dsControl 组明显减少( $P < 0.05$ ),而 dsControl 组与 mock 组细胞活力差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),dsP53 - 285 组细胞增殖能力明显降低(图 6)。

## 讨 论

RNA 激活是指低分子双链 RNA 通过特异性作用于靶基因启动子转录起始点上游的序列,激活特定基因表达的现象<sup>[7,8]</sup>。与传统的 RNA 干扰不同, RNA 激活主要发生在转录水平<sup>[9,10]</sup>。肿瘤抑制基因 P53 是最重要的肿瘤抑癌基因,广泛参与 DNA 损伤修复、细胞周期调控、细胞分化、衰老和凋亡等多种细胞功能的调节<sup>[11]</sup>。有研究发现 dsP53 - 285 可明显激活黑猩猩细胞中 P53 蛋白的表达,人类与黑猩猩的遗传物质具有高速同源性,且黑猩猩的 P53 基因启动子转录起始点上游的 -285/-267bp 处的序列与人完全相同<sup>[5]</sup>。因此,dsP53 - 285 很可能同样能够激活人细胞中 P53 蛋白的表达。

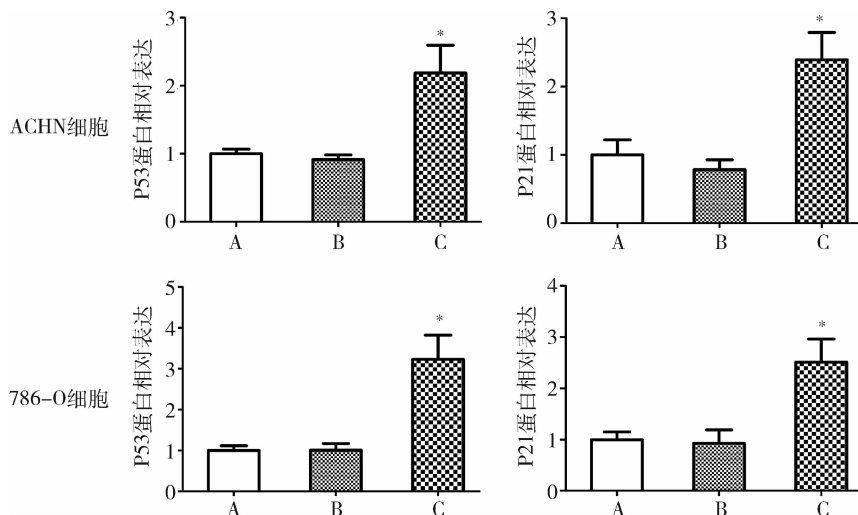


图4 Western blot 法灰度值分析

A. mock 组(空白对照组); B. dsControl 组(阴性对照组); C. dsP53-285 组(实验组); 与 dsControl 组比较, \*  $P < 0.05$

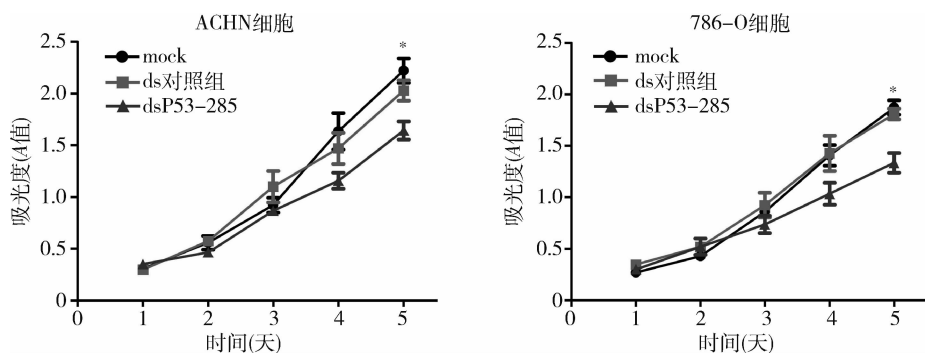


图5 MTT 实验检测各组肾癌细胞活力

与 dsControl 组比较, \*  $P < 0.05$

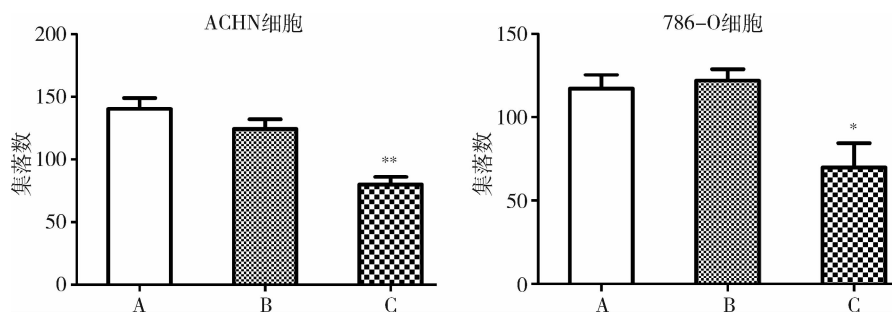


图6 集落形成实验检测细胞增殖能力

A. mock 组(空白对照组); B. dsControl 组(阴性对照组); C. dsP53-285 组(实验组); 与 dsControl 组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

肿瘤细胞中的 P53 蛋白分为两种类型:野生型 P53 和突变型 P53 蛋白<sup>[12]</sup>。在人类所有肿瘤细胞中, P53 基因发生突变的频率非常高,突变型 P53 蛋白通常通过干扰野生型 P53 蛋白的序列特异性 DNA 结合能力而表现出促癌作用<sup>[13, 14]</sup>。因此,笔者必须确认由 dsP53-285 激活的 P53 蛋白的类型。P21 蛋白是

目前已知的具有最广泛细胞周期依赖性激酶抑制活性的蛋白,能够明显抑制肿瘤的发生、发展,且 P21 蛋白的表达由野生型 P53 蛋白正向调节<sup>[15, 16]</sup>。然而,突变型 P53 蛋白可明显抑制野生型 P53 蛋白靶向促进 P21 表达的作用。因此,通过检测 P53 下游基因 P21 的表达,验证所激活的 P53 蛋白的类型。本研究

中,笔者证明 dsP53 - 285 可明显激活人肾癌细胞系 ACHN 和 786 - O 中 P53 蛋白的表达,且 P21 蛋白的表达水平也明显升高。因此,笔者认为由 dsP53 - 285 激活的 P53 蛋白是野生型而不是突变型。笔者通过 MTT 法检测和集落形成实验证明 dsP53 - 285 对肾癌的生长具有抑制作用,进一步表明 dsP53 - 285 激活的 P53 蛋白是野生型而非突变型。本研究的不足之处在于,未明确 dsP53 - 285 是否具有其他靶基因位点。下一步将通过靶基因预测筛选 dsP53 - 285 可能存在的所有靶基因位点,并通过体内外实验进一步研究 dsP53 - 285 对肾癌细胞发生、发展的抑制作用。

综上所述,本研究证明 dsP53 - 285 可明显激活人肾癌细胞中 P53 蛋白的表达,且所激活的 P53 蛋白为野生型而非突变型。因此,dsP53 - 285 可能成为新的肾癌靶基因治疗位点。

#### 参考文献

- 1 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(1): 5 - 29
- 2 Calvo E, Schmidinger M, Heng DY, *et al.* Improvement in survival end points of patients with metastatic renal cell carcinoma through sequential targeted therapy [J]. *Cancer Treat Rev*, 2016, 50: 109 - 117
- 3 Araki K, Ebata T, Guo AK, *et al.* p53 regulates cytoskeleton remodeling to suppress tumor progression [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(21): 4077 - 4094
- 4 Murata A, Itoh Y, Mano E, *et al.* One - dimensional search dynamics of tumor suppressor p53 regulated by a disordered C - terminal domain [J]. *Biophys J*, 2017, 112(11): 2301 - 2314
- 5 Huang V, Qin Y, Wang J, *et al.* RNAa is conserved in mammalian cells [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8848

(上接第 163 页)

- 9 Faust JS, Weingart SD. The past, present, and future of the centers for medicare and medicaid services quality measure SEP - 1: the early management bundle for severe sepsis/septic shock [J]. *Emerg Med Clin North Am*, 2017, 35(1): 219 - 231
- 10 罗成,余皓月,封明霞,等. 外周血 CD64 指数对脓毒症急性肺损伤的早期诊断价值 [J]. *医学研究杂志*, 2016, 45(9): 98 - 101
- 11 Olivry T, Mayhew D, Paps JS, *et al.* Early activation of Th2/Th22 inflammatory and pruritogenic pathways in acute canine atopic dermatitis skin lesions [J]. *J Invest Dermatol*, 2016, 136(10): 1961 - 1969
- 12 Cui D, Zhong F, Lin J, *et al.* Changes of circulating Th22 cells in children with hand, foot, and mouth disease caused by enterovirus 71 infection [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(17): 29370 - 29382
- 13 许秀华,向晓星,马莉,等. 原发性肝癌患者外周血 Th22 细胞水平的变化及意义 [J]. *中国免疫学杂志*, 2014, 30(9): 1245 - 1248, 1252
- 14 栾樱译,秦庆华,吕奔,等. 调节性 T 细胞对脓毒症中 T 淋巴细胞凋亡的影响 [J]. *临床急诊杂志*, 2016, 17(8): 585 - 589
- 15 Tang MS, Bowcutt R, Leung JM, *et al.* Integrated analysis of biopsies

- 6 Wang C, Ge Q, Chen Z, *et al.* A new double stranded RNA suppresses bladder cancer development by upregulating p21 (Waf1/CIP1) expression [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 304753
- 7 Kang MR, Park KH, Yang JO, *et al.* miR - 6734 up - regulates p21 gene expression and induces cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e160961
- 8 Fimiani C, Goia E, Su Q, *et al.* RNA activation of haploinsufficient Foxg1 gene in murine neocortex [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 39311
- 9 Li S, Wang C, Yu X, *et al.* miR - 3619 - 5p inhibits prostate cancer cell growth by activating CDKN1A expression [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(1): 241 - 248
- 10 Zhu W, Qian J, Ma L, *et al.* MiR - 346 suppresses cell proliferation through SMYD3 dependent approach in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(39): 65218 - 65229
- 11 Kasim V, Xie YD, Wang HM, *et al.* Transcription factor Yin Yang 2 is a novel regulator of the p53/p21 axis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(33): 54694 - 54707
- 12 Molchadsky A, Rotter V. p53 and its mutants on the slippery road from stemness to carcinogenesis [J]. *Carcinogenesis*, 2017, 38(4): 347 - 358
- 13 Floter J, Kaymak I, Schulze A. Regulation of metabolic activity by p53 [J]. *Metabolites*, 2017, 7(2): 21
- 14 Ferraiuolo M, Verduci L, Blandino G, *et al.* Mutant p53 protein and the hippo transducers YAP and TAZ: a critical oncogenic node in human cancers [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5): 961
- 15 Georgakilas AG, Martin OA, Bonner WM. p21: A two - faced genome guardian [J]. *Trends Mol Med*, 2017, 23(4): 310 - 319
- 16 Fischer M, Uxa S, Stanko C, *et al.* Human papilloma virus E7 oncoprotein abrogates the p53 - p21 - DREAM pathway [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2603

(收稿日期: 2017 - 06 - 08)

(修回日期: 2017 - 06 - 13)

- from inflammatory bowel disease patients identifies SAA1 as a link between mucosal microbes with TH17 and TH22 cells [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2017, 23(9): 1544 - 1554
- 16 Fard NA, Azizi G, Mirshafiey A. The potential role of T helper cell 22 and IL - 22 in immunopathogenesis of multiple sclerosis [J]. *Innov Clin Neurosci*, 2016, 13(7 - 8): 30 - 36
- 17 Lu T, Liu Y, Yu S, *et al.* Increased frequency of circulating Th22 cells in patients with B - cell non - Hodgkin's lymphoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(35): 56574 - 56583
- 18 Polat G, Ugan RA, Cadirci E, *et al.* Sepsis and septic shock: current treatment strategies and new approaches [J]. *Eurasian J Med*, 2017, 49(1): 53 - 58
- 19 Niccolai E, Taddei A, Ricci F, *et al.* Intra - tumoral IFN -  $\gamma$  - producing Th22 cells correlate with TNM staging and the worst outcomes in pancreatic cancer [J]. *Clin Sci: Lond*, 2016, 130(4): 247 - 258
- 20 Wang M, Chen P, Jia Y, *et al.* Elevated Th22 as well as Th17 cells associated with therapeutic outcome and clinical stage are potential targets in patients with multiple myeloma [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(20): 17958 - 17967

(收稿日期: 2017 - 08 - 22)

(修回日期: 2017 - 09 - 12)