

siRNA 沉默 Skp2 基因对肝癌 HepG₂ 细胞生物学行为影响及机制

郭云霞 秦宝山 冯军安 韩 莉 王志凌 王郁杰

摘 要 **目的** 观察 Skp2 在肝癌组织及细胞中表达,及其对 HepG₂ 细胞增殖、凋亡及侵袭的影响。**方法** 利用 siRNA 沉默 HepG₂ 中 Skp2 的表达。采用 qRT-PCR 检测肝癌组织及细胞中 Skp2 mRNA 的表达, CCK-8、流式细胞术和 Transwell 小室测定干扰 Skp2 表达后对细胞的增殖、凋亡和侵袭力的影响, ELISA 法测定 MMP2 和 MMP9 水平, Western blot 法检测 caspase-3、P27 的表达。**结果** 肝癌组织中 Skp2 的表达水平高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。与 NC-Skp2 组比较, siRNA-Skp2 组 Skp2 mRNA 水平显著降低, 细胞的增殖能力受抑制, 凋亡能力增强, 细胞侵袭力下调 ($P < 0.05$)。此外, 与 NC-Skp2 组比较, siRNA-Skp2 组 HepG₂ 细胞分泌 MMP2 和 MMP9 能力明显降低, caspase-3、P27 蛋白水平明显增加 ($P < 0.05$)。**结论** Skp2 的表达与细胞 HepG₂ 的增殖、凋亡和侵袭密切相关, siRNA 可以降低 HepG₂ 细胞的增殖和侵袭, 诱导细胞凋亡。

关键词 Skp2 肝癌 增殖 凋亡 侵袭

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.02.034

Effects of RNAi-silenced Skp2 Gene on the Biological Behavior of Hepatocellular Carcinoma HepG₂ Cells and Its Mechanism. Guo Yunxia, Qin Baoshan, Feng Junan, et al. Department of Gastroenterology, Zhengzhou People's Hospital, Henan 450003, China

Abstract Objective To observe Skp2 expression levels in hepatocellular carcinoma patients, and its effect on cell proliferation, apoptosis and invasiveness of HepG₂ cells. **Methods** Skp2 expression was silenced by small interfering RNA (siRNA) in HepG₂ cells. The relative expression of Skp2 mRNA in hepatocarcinoma tissues and HepG₂ cells were detected by real-time PCR. Cell proliferation was determined by CCK-8 method. Cell apoptosis was tested by flow cytometry. Invasiveness was tested by transwell assay. MMP2 and MMP9 levels were measured by ELISA, and the protein expression of caspase-3 and P27 was detected by Western blot analysis. **Results** Compared with the adjacent tumor tissue, Skp2 mRNA levels were significantly higher in hepatocellular carcinoma ($P < 0.05$). Compared with the NC-Skp2 group, Skp2 mRNA levels was significantly decreased in the siRNA-Skp2 group, the proliferation ability and invasiveness of the cells was inhibited, and the apoptosis was enhanced ($P < 0.05$). In addition, compared with NC-Skp2 group, the levels of MMP2 and MMP9 were significantly decreased in siRNA-Skp2 group, and levels of caspase-3 and P27 protein were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** This study suggested that The Skp2 expression is closely related to cell proliferation, apoptosis and invasiveness of HepG₂ cells. siRNA can decrease the proliferation and invasion of HepG₂ cells and induce apoptosis.

Key words Skp2; Hepatocellular Carcinoma; Proliferation; Apoptosis; Invasion

肝癌在我国发生率较高,而浸润和转移是该病恶化和死亡的重要原因^[1,2]。研究表明,肝癌的发生与部分基因异常表达有关^[3]。Skp2 基因位于 5p13,与多种恶性肿瘤发生、发展相关^[4,5],其中 Skp2 蛋白能特异性识别泛素连接酶复合物的底物,并将其磷酸化促进泛素化降解及细胞周期从 G₁ 期向 S 期过渡,导致细胞过度增殖^[6]。已有研究表明,Skp2 高水平者其预后差,多变量分析显示,Skp2 mRNA 表达水平可以作为肝癌患者独立的预后指标^[7,8]。然而目前

Skp2 基因沉默后调节肝癌细胞生物学行为中的分子机制仍然未知。本研究采用 siRNA 方法沉默 Skp2 的表达,研究其对肝癌细胞增殖和侵袭能力的影响。

材料与方法

1. 实验材料:人肝癌 HepG₂ 细胞(齐氏生物科技有限公司)。Skp2 Human siRNA(美国 Origene 公司)。BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X)(上海碧云天生物技术有限公司)。Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。MMP2、MMP9 ELISA 试剂盒(武汉博士德公司);Lipofectamine TM2000(美国 Invitrogen 公司)。

作者单位:450003 郑州人民医院消化内科

通讯作者:王郁杰,电子邮箱:wyjie66@163.com

兔抗人 caspase-3、P27 蛋白抗体、羊抗兔 HRP 标记的二抗(碧云天生物技术研究)。

2. 实验方法: (1) 组织标本的采集: 选取 2010 年 1 月~2017 年 1 月笔者医院病理科明确诊断的 16 例肝癌组织标本。取同期配对且病理分析为正常组织的癌旁组织 16 例作为对照组。所有患者年龄在 38~87 岁, 平均年龄为 69.43 ± 7.25 岁。标本采集均告知患者并签署知情同意书, 并经笔者医院伦理学委员会批准。(2) 细胞培养和转染: HepG₂ 细胞于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 0.25% 的胰蛋白酶-EDTA 消化、传代。将 1×10^4 个/ml 细胞接种于 6 孔板培养, 当细胞汇合度达 80% 以上时, 将培养基换成无血清无双抗的培养基, 并根据 Lipofectamine TM2000 使用说明进行转染细胞操作。37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 6h 后, PBS 洗去转染试剂, 改换含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基继续培养。实验分 3 组: 对照组(仅有空载体)、NC-Skp2 组(仅含有 SKP2 阴性序列)、siRNA-Skp2 组(含有 Skp2 基因干扰序列), 每个实验重复 3 次。(3) qRT-PCR: Trizol 裂解人肝癌组织、癌旁组织或细胞系, 4℃、12000g 离心 10min, 吸取水相层, 按每毫升最初的 Trizol 加入 0.5ml 异丙醇, 4℃、12000g 离心 10min, 弃上清, 所得沉淀即为 RNA, 并测定纯度。按照反转录试剂盒说明书反转录生成 cDNA。反应体系为 20μl, 其中 BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2×) 10μl, 上游(3μmol/L)和下游(3μmol/L) 2μl, cDNA 2μl, PCR 级高纯水 6μl。采用 light cycle[®]96 实时荧光定量 PCR 仪, 反应条件: 预变性 95℃ 2min; 95℃ 变性 15s, 60℃ 退火 25s, 60℃ 延伸 30s, 共 40 个循环。引物序列由上海英骏公司提供。Skp2 上游序列: 5'-GCTGAACATTTTCAGTACTCTCGC-3', 下游序列: 5'-GTCTCTGACACATGCGCAAC-3', 产物大小 194p; 内参 GAPDH 上游引物: 5'-CCACTAGGCGCTCACTGTT-3', 下游引物: 5'-TGGAATTTGCCATGGGTGGA-3', 长度 228bp。SKP2 相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct} \times 100\%$, $\Delta Ct = Ct(\text{待测基因}) - Ct(\text{GAPDH})$ 。(4) CCK-8 测定细胞活力: 取对数生长期细胞, 调整密度为 1×10^4 个/ml 细胞接种于 96 孔板, 每组设置 3 个复孔, 培养 24、48、72、96h, 每孔加入 CCK-8 10μl, 培养 2h 各孔细胞在 450nm 测定吸光度 A 值, 另设空白对照组调零, 计算抑制率。实验重复 3 次。(5) 流式细胞仪检测细胞凋亡: 对数期 HepG₂ 细胞转染 72h 后, 胰酶消化, 1000 × g 离心

5min, 收集细胞, PBS 重悬计数, 5×10^4 重悬细胞, 1000 × g 离心 5min, 加入结合液 500μl 重悬细胞, 加入 Annexin V-FITC 5μl, 然后加入 PI 5μl, 混匀, 室温孵育 10min, 随即行流式细胞仪检测。(6) Transwell 小室检测细胞的侵袭力: Transwell 上室膜面铺上 Matrigel。将分组干预 72h 的细胞采用胰酶消化, 调整, 每孔上室加入细胞密度为 4×10^4 的无血清培养基 100μl, 每孔下室加入 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基 500μl, 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24h, 棉签刮净滤膜上层细胞, 100% 多聚甲醛固定 10min, 染色, 拍照计数。(7) ELISA 法测定检测 MMP2 和 MMP9 水平: 对数期 HepG₂ 细胞转染 72h 后, 收集细胞上清。等比稀释标准品绘制标准曲线, 每孔加入样品和标准品 100μl, 置 37℃ 孵育 1.5h。每孔添加生物素标记抗体 100μl, 置 37℃ 孵育 1h。然后 0.01mol/L TBS 洗涤 3 次。每孔加过氧化物酶孵育 1h, TMB 37℃ 避光反应 0.5h, 加入 TMB 终止液, 在 ELISA 检测仪上, 于 450nm 波长处, 测各孔吸光度(A)值。(8) Western blot 法检测 caspase-3、P27 的表达: 常规方法提蛋白质, 调整各样本蛋白总量, 参照说明书进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 参照规程分别孵育一抗和二抗, Bio-Rad 凝胶成像系统成像拍照, 以 β-actin 为内参分析待测蛋白相对表达值。

3. 统计学方法: 采用 SPSS 15.0 统计学软件对数数据进行统计分析, 数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 不同时间段不同组间比较采用重复测量方差分析, 同一时间段不同组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. Skp2 mRNA 在肝癌组织中的表达: 利用 qRT-PCR 技术检测肝组织中 Skp2 mRNA 表达水平, 检测结果显示肝癌组织中 Skp2 mRNA 的相对表达量为 3.68 ± 1.47 , 癌旁组织为 1.10 ± 0.47 , 其中肝癌组织中 Skp2 mRNA 水平明显高于癌旁组织($P < 0.05$)。

2. siRNA-Skp2 沉默 HepG₂ 细胞中 Skp2 的 mRNA 的表达: qRT-PCR 结果显示, 空白对照组 Skp2 mRNA 的相对表达量为 2.42 ± 0.06 , NC-Skp2 组为 2.40 ± 0.05 。siRNA-Skp2 组为 1.07 ± 0.05 。与 NC-Skp2 组和空白对照组比较, 转染 siRNA-Skp2 后, siRNA-Skp2 组的 Skp2 的 mRNA 表达明显下调($P < 0.05$, 图 1)。

3. 转染 siRNA-Skp2 对 HepG₂ 细胞增殖的影响

响: CCK-8 实验结果显示, 与空白对照组和 NC-Skp2 组比较, 转染 siRNA-Skp2 后, siRNA-Skp2 组的增殖率明显下调 ($P < 0.05$), 而空白对照组和 NC-Skp2 组间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 1)。

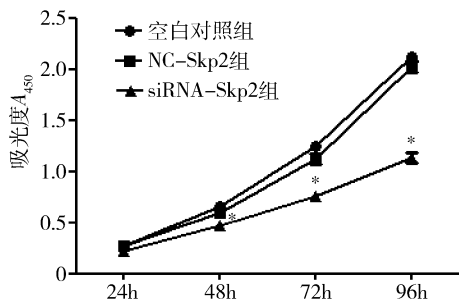


图 1 转染 siRNA-Skp2 对 HepG₂ 细胞活力的影响

与 NC-Skp2 组比较, * $P < 0.05$

4. 转染 siRNA-Skp2 对 HepG₂ 细胞凋亡的影响: 采用流式细胞仪检测细胞凋亡, 在转染 72h 后, 空白对照组、NC-Skp2 组和 siRNA-Skp2 组的细胞凋亡率分别为 $3.12\% \pm 0.74\%$ 、 $3.83\% \pm 1.14\%$ 、 $20.42\% \pm 1.24\%$ 。与空白对照组和 NC-Skp2 组比较, siRNA-Skp2 组的细胞凋亡率明显上调 ($P < 0.05$, 图 2)。

5. 转染 siRNA-Skp2 对细胞的侵袭力的影响: 采用 Transwell 小室检测细胞侵袭力, 结果显示, 在转染 72h 后, 空白对照组穿膜细胞数为 31.52 ± 3.12 ; NC-Skp2 组细胞数为 30.27 ± 1.42 ; siRNA-Skp2 组细胞数为 8.23 ± 2.47 。与空白对照组和 NC-Skp2 组比较, siRNA-Skp2 组的细胞侵袭力明显下调 ($P < 0.05$, 图 3)。

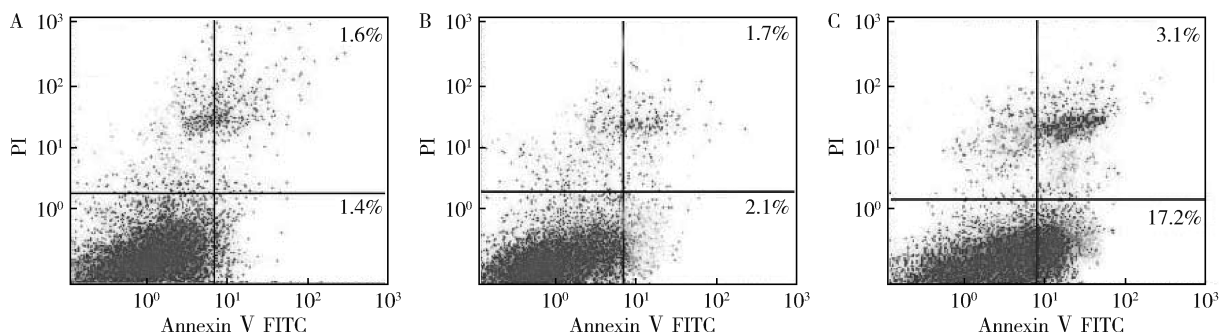


图 2 Skp2 对 HepG₂ 细胞凋亡的影响

A. 空白对照组; B. NC-Skp2 组; C. siRNA-Skp2 组

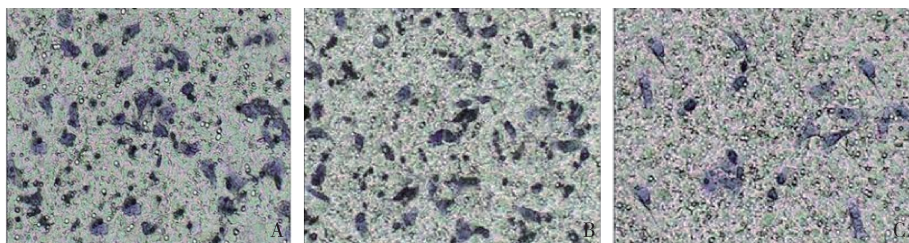


图 3 Skp2 对 HepG₂ 细胞侵袭力的影响

A. 空白对照组; B. NC-Skp2 组; C. siRNA-Skp2 组

6. 转染 siRNA-Skp2 对 HepG₂ 细胞侵袭蛋白的影响: 采用 ELISA 法检测 MMP2 和 MMP9 水平, 在转染 72h 后, 与空白对照组和 NC-Skp2 组比较, siRNA-Skp2 组的细胞分泌 MMP2 和 MMP9 能力明显下调 ($P < 0.05$, 图 4)。

7. 转染 siRNA-Skp2 对 HepG₂ 细胞中 caspase-3、P27 的表达影响: 采用 Western blot 法检测 caspase-3、P27 蛋白水平, 在转染 72h 后, 与空白对照组和 NC-Skp2 组比较, siRNA-Skp2 组的 caspase-3、

P27 的表达水平明显上调 ($P < 0.05$, 图 5, 图 6)。

讨 论

Skp2 为 F-box 家族的成员, 对细胞 G₁~S 期具有特异性的调控作用, 并已被广泛应用于实验研究^[9,10]。李胜等^[11]采用 Skp2 RNA 干扰表达载体降低 Skp2 蛋白在肺癌细胞中的表达。结果表明, 干预组细胞的肺癌细胞生长较阴性对照组明显降低, 而凋亡率较阴性对照组明显增加。在喉癌组织中也观察到相似的结果^[12]。Xu 等^[13]通过沉默 Skp2 基因表

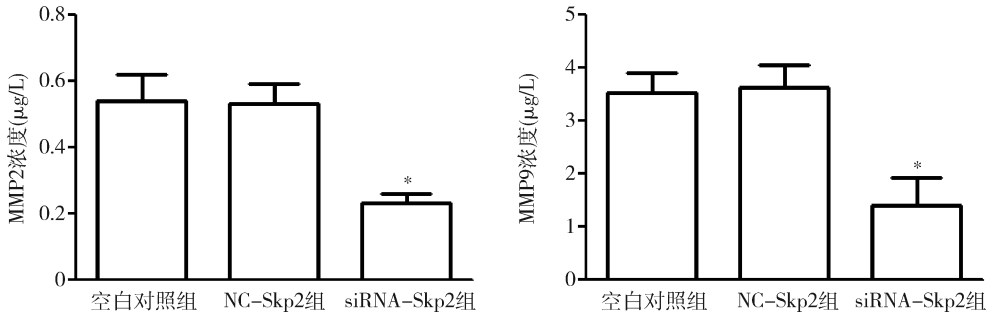


图 4 转染 siRNA-Skp2 对 HepG₂ 细胞侵袭蛋白的影响
与 NC-Skp2 组比较, *P<0.05

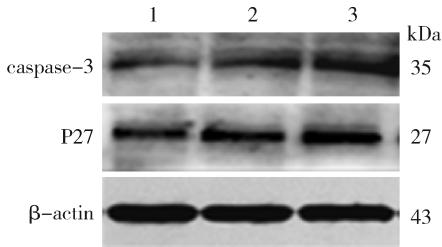


图 5 转染 siRNA-Skp2 对 caspase-3、P27 蛋白表达的影响

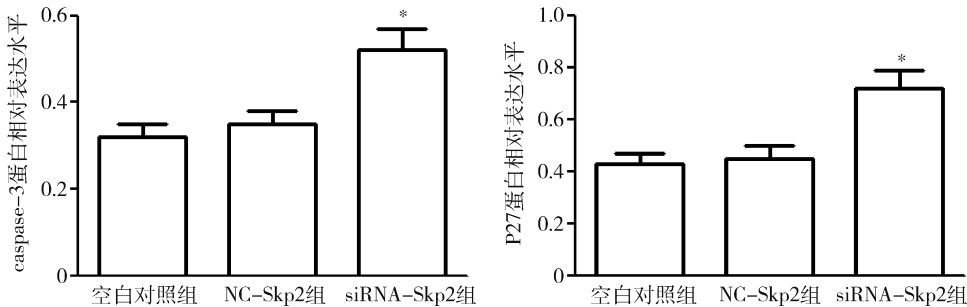


图 6 转染 siRNA-Skp2 对 caspase-3、P27 蛋白水平的影响
与 NC-Skp2 组比较, *P<0.05

已有研究表明,P27 低表达与高度侵袭性肿瘤相关,而 P27 高水平可以抑制癌细胞的增殖^[14]。本实验通过 CCK-8 实验检测了转染 siRNA-Skp2 后 HepG₂ 细胞增殖的影响,结果表明 siRNA-Skp2 能有效的抑制 HepG₂ 细胞的增殖。而且实验还观察到转染 siRNA-Skp2 72h 后,HepG₂ 细胞中 Skp2 表达水平下调的同时,P27 蛋白水平反而上升,这也间接说明 Skp2 可能通过 P27 蛋白信号通路调控细胞增殖。当然,肿瘤细胞能在机体内快速增值与细胞凋亡受到抑制也存在一定的关系。为了进一步研究 Skp2 对细胞凋亡的影响,本研究采用流式细胞仪分析了 siRNA-Skp2 转染 HepG₂ 细胞后的凋亡情况。结果

达水平,膀胱癌 T24 细胞增殖和侵袭受到显著抑制。目前,已有研究表明,Skp2 在肝癌组织中的阳性表达明显高于癌旁组织,但其机制并不太明确^[8]。本研究结果显示,Skp2 mRNA 在肝癌组织中表达水平明显高于癌旁组织,这与相关研究一致。为了进一步研究 Skp2 在肝癌的进展中的作用,将体外合成的 siRNA-Skp2 转染 HepG₂ 细胞 72h 后,采用 qRT-PCR 分析靶基因 Skp2 的 mRNA 水平变化。结果表明,siRNA-Skp2 能有效降低 Skp2 基因表达。

siRNA-Skp2 可有效的促进 HepG₂ 细胞凋亡,提示 Skp2 在抗肿瘤细胞凋亡方面发挥着重要作用。而且 siRNA-Skp2 转染 72h 后,凋亡蛋白 caspase-3 也显著增加,表明 Skp2 下调后可通过 caspase 信号通路诱导 HepG₂ 细胞凋亡。为了研究 siRNA-Skp2 转染对 HepG₂ 细胞体外侵袭力的影响,本研究采用 Transwell 小室检测细胞侵袭力。结果显示,siRNA-Skp2 可有效降低 HepG₂ 细胞体外侵袭能力。已有研究表明,肿瘤细胞外基质的消化与肿瘤的侵袭有关^[15,16]。肿瘤细胞分泌的 MMP 家族成员可以降解细胞外基质成分^[17-19]。而且也有文献显示沉默 Skp2 后可下调 MMP2 和 MMP9

的分泌,进而抑制肿瘤的侵袭能力^[20]。本研究通过MMP2和MMP9水平检测也表明,转染siRNA-Skp2后,HepG₂细胞分泌MMP2和MMP9的能力明显降低。因此,降低Skp2表达水平,可通过降低MMP2和MMP9的分泌,抑制肝癌的侵袭力。

总之,Skp2基因沉默后肝癌HepG₂细胞增殖和侵袭能力下降,细胞凋亡增强,其机制可能与调控P27、caspase-3、MMP2和MMP9有关。因此,抑制Skp2的表达,也可能成为肝癌基因治疗的新策略。

参考文献

- 1 陈薇,游佳,陈靖,等.微小RNA-21对肝癌患者的HepG2细胞增殖的调控作用[J].中国临床药理学杂志,2018,34(1):21-24
- 2 李波,王沈,颜昭勇,等.Per2对肝癌患者预后及肝癌细胞生长和凋亡的作用[J].基础医学与临床,2018,38(4):464-469
- 3 Wong CM, Tsang HC, Ng OL. Noncoding RNAs in hepatocellular carcinoma: molecular functions and pathological implications[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 15(3):137
- 4 Ouyang J, Xu H, Li M, et al. Paeoniflorin exerts antitumor effects by inactivating S phase kinase-associated protein 2 in glioma cells[J]. Oncol Rep, 2018, 39(3):1052-1062
- 5 马丹,张丽,徐少勇.Skp2基因对大肠癌侵袭与转移的影响及其机制[J].武汉大学学报:医学版,2016,37(6):905-910
- 6 俞文秀,朱海杭,乐安君,等.SIRT3和Skp2在结直肠癌中的表达及意义[J].国际消化病杂志,2015,53(6):431-433
- 7 Wang ST, Ho HJ, Lin JT, et al. Simvastatin-induced cell cycle arrest through inhibition of STAT3/SKP2 axis and activation of AMPK to promote p27 and p21 accumulation in hepatocellular carcinoma cells[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(2):e2626
- 8 靳文剑,张焜和,陈火国,等. β -Catenin、Skp2和p(27)在老年肝细胞癌中的表达及相关性[J].中国老年学杂志,2014,34(5):1173-1175
- 9 贾静,方健飞,任娟,等.宫颈癌HeLa细胞内SKP2结合蛋白的筛选和功能预测[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2018,25(3):258-262
- 10 Jo Y, Shin DY. Repression of the F-box protein Skp2 is essential for

actin damage-induced tetraploid G1 arrest[J]. Bmb Rep, 2017, 50(7):379

- 11 李胜,梅同华.Skp2基因沉默对SPC-A-1肺癌细胞增殖和凋亡的影响[J].重庆医学,2016,45(17):2334-2336,2339
- 12 刘江涛,谭立君,李慧军,等.RNA干扰抑制Skp2表达对喉癌细胞系Hep-2的影响[J].中国肿瘤,2016,25(1):63-69
- 13 Xu ST, Ding X, Ni QF, et al. Targeting MACC1 by RNA interference inhibits proliferation and invasion of bladder urothelial carcinoma in T24 cells[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(7):7937-7944
- 14 Lee HL, Lin CS, Kao SH, et al. Gallic acid induces G1 phase arrest and apoptosis of triple-negative breast cancer cell MDA-MB-231 via p38 mitogen-activated protein kinase/p21/p27 axis[J]. Anticancer Drugs, 2017, 28(10):1150-1156
- 15 谭战民,许志鹏,陈小龙,等.基质金属蛋白酶在口腔鳞状细胞癌中的表达及其对生物学行为的影响[J].空军医学杂志,2018,34(1):61-64
- 16 He W, Zhang H, Wang Y, et al. CTHRC1 induces non-small cell lung cancer (NSCLC) invasion through upregulating MMP-7/MMP-9[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1):400
- 17 Jia S, Qu T, Wang X, et al. KIAA1199 promotes migration and invasion by Wnt/ β -catenin pathway and MMPs mediated EMT progression and serves as a poor prognosis marker in gastric cancer[J]. PLoS One, 2017, 12(4):e0175058
- 18 Zhang W, Yin L, Song G, et al. LKB1 loss cooperating with BRAF V600E promotes melanoma cell invasion and migration by up-regulation MMP-2 via PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(69):113847-113857
- 19 Ivanovic RF, Viana NI, Morais DR, et al. miR-29b enhances prostate cancer cell invasion independently of MMP-2 expression[J]. Cancer Cell Int, 2018, 18(1):18
- 20 张连峰,魏争,韩利坤,等.RNAi沉默Skp2抑制胃癌细胞SGC7901侵袭作用的实验研究[J].医学综述,2014,20(12):2230-2232

(收稿日期:2018-04-25)

(修回日期:2018-05-23)

(上接第145页)

- 13 Yang XY, Yu H, Li KM, et al. Uterine artery embolisation combined with loca methotrexate for treatment of caesarean scar pregnancy [J]. BJOG, 2010, 117(8):990-996
- 14 Litwicka K, Greco E. Caesarean scar pregnancy: a review of management options [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2013, 25(6):456-461
- 15 陈向东,陈莉婷,柳晓春,等.两种子宫瘢痕妊娠手术方式的疗效及术后生活质量的比较[J].广东医学,2016,37(3):380-382
- 16 韦晓昱,于晓兰.停经7周以内的Ⅱ型和Ⅲ型剖宫产术后子宫瘢

痕妊娠两种治疗方法的安全性比较[J].中华妇产科杂志,2017,52(7):449-454

- 17 陈正云,李小永,赵达,等.宫腔镜手术终止早期Ⅱ型剖宫产术后子宫瘢痕妊娠的临床研究[J].中华妇产科杂志,2017,52(10):669-674
- 18 曾薇薇,金平,古衍,等.三种术式治疗Ⅱ型子宫瘢痕妊娠70例临床分析[J].现代妇产科进展,2017,26(8):616-618
- 19 付丽萍,汤丽荣.剖宫产切口瘢痕部位妊娠临床治疗探讨[J].医学研究杂志,2015,44(6):104-106

(收稿日期:2018-05-10)

(修回日期:2018-05-31)