

靶向增殖细胞核抗原 shRNA 的构建及其对 HepG2 细胞增殖与凋亡的影响*

张小鹰^{1, 2)} 吴风云^{1, 3)} 何金花^{1, 4)} 廖晓莉¹⁾ 王 威¹⁾ 蒋建伟^{1)**}

(¹⁾ 暨南大学医学院生化教研室, 广州 510630; (²⁾ 广东省佛山市南海区妇幼保健院检验科, 佛山 528200;

(³⁾ 浙江省温州市平阳县人民医院, 温州 325400; (⁴⁾ 广东省广州市番禺中心医院检验科, 番禺 511440)

摘要 为了探讨抑制增殖细胞核抗原(PCNA)基因表达对人肝癌 HepG2 细胞增殖及凋亡的影响, 将前期筛选出的最佳 siRNA 序列转化为能表达其小发夹结构 RNA (small hairpin RNAs, shRNA)的 DNA 序列, 并与 pSilencer2.0-U6 质粒定向连接, 构建靶向 PCNA 基因的 siRNA 真核表达载体 pShPCNA, 经 DNA 测序证实与设计完全一致. 随后采用 WST 法及克隆形成抑制观察细胞增殖抑制情况、划痕实验来观察细胞迁移能力, 流式细胞术、Hoechst 33258 染色、细胞线粒体膜电位改变检测细胞凋亡. 在转染 HepG2 细胞 48 h 后, pShPCNA 组细胞 PCNA mRNA 表达明显下调, 并出现明显的增殖抑制作用, 明显抑制细胞克隆的形成和细胞的迁移力, 且呈剂量-效应关系. 流式细胞术检测发现: pShPCNA 组细胞明显阻滞于 G0/G1 期, 并出现明显的亚二倍体凋亡峰, 出现明显的早期凋亡细胞群. 荧光显微镜检测表明, 细胞线粒体膜电位降低, 并且细胞出现核固缩、凋亡小体等凋亡形态学变化. 上述结果表明, 成功构建了靶向 PCNA 基因的 siRNA 真核表达载体 pShPCNA, pShPCNA 转染 HepG2 细胞 48 h 后, 能够显著抑制细胞的生长增殖、诱导细胞凋亡、细胞周期阻滞于 G0/G1 期.

关键词 RNA 干扰, 增殖细胞核抗原, 真核细胞表达载体, HepG2 细胞, 肝癌

学科分类号 R734.2, R73-36+2

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00573

增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 是 DNA 聚合酶 δ 、 ϵ 的辅助蛋白, 在恶性肿瘤组织中的表达量远远高于正常组织, 并随肿瘤浸润深度增加及转移, 其表达呈明显上升趋势. PCNA 在恶性肿瘤的发生和发展中起着不可替代的作用, 并与其预后相关^[1]. 肝癌细胞处于高增殖、低凋亡水平, PCNA 表达旺盛, 而正常肝细胞绝大多数处于静止期, 不表达 PCNA^[2]. RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是一种由双链 RNA (dsRNA) 引发的基因表达抑制途径, 近来已经在功能基因组研究和基因治疗方面取得了巨大进展. 通过化学合成小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 分子和构建短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 表达载体均可在细胞内介导 RNAi 现象的产生^[3-4]. 在我们的前期工作中^[5-6], 已经利用体外转录合成的 siRNA 分子筛选出了靶向 PCNA 基因的最佳 RNAi 作用位点, 本研究以此为基础构建靶向 PCNA 特异性 siRNA 真核表达载体 pShPCNA, 通过瞬时转染肝癌细胞 HepG2, 以探讨 pShPCNA

重组质粒对 HepG2 细胞体外增殖及凋亡的影响.

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RNAi 真核表达载体 pSilencer 2.0-U6 购买于 Ambion 公司; 限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、T4 DNA 连接酶购自日本 TAKARA 公司; 琼脂糖凝胶回收 DNA 片段试剂盒、质粒小量提取试剂盒购自美国 Omega 公司; DMEM/F12 培养基、Opti-MEM 培养基购自 Gibco 公司; 脂质体 LipofectamineTM2000 购自美国 Invitrogen 公司; Annexin V-PI 双染试剂盒购自美国 BD 公司; Hoechst 33258 购自 Sigma 公司; CCK-8 (Cell Count

* 广东省科技计划 (2009B080701051) 和广东省医学科研基金 (A2007322) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 020-85220256, E-mail: jjw703@163.com

收稿日期: 2009-09-27, 接受日期: 2009-11-26

Kit-8)试剂购自日本同仁化学研究所. 人肝癌 HepG2 细胞由暨南大学医学院生化教研室提供.

1.2 PCNA 特异性 shRNA 的设计、制备和鉴定

在我们的前期工作中, 根据以上 siRNA 的设计原则设计了 4 条靶向 PCNA 基因的 siRNA, 筛选出作用效果较好的 siRNA 序列^[9], 在此基础上将筛选出的 siRNA 序列转化为能表达其小发夹结构

RNA 的 DNA 序列, BLAST 检索, 确认所设计 siRNA 序列的唯一性. 针对 PCNA 基因的特异性 siRNA 序列, 中间加入茎环序列, 两端加上 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点, 并以 polyT 作为转录终止子, 序列全长为 62 bp. 另设计非特异性干扰序列, 送上海生工生物工程有限公司合成. 具体序列如图 1 所示.

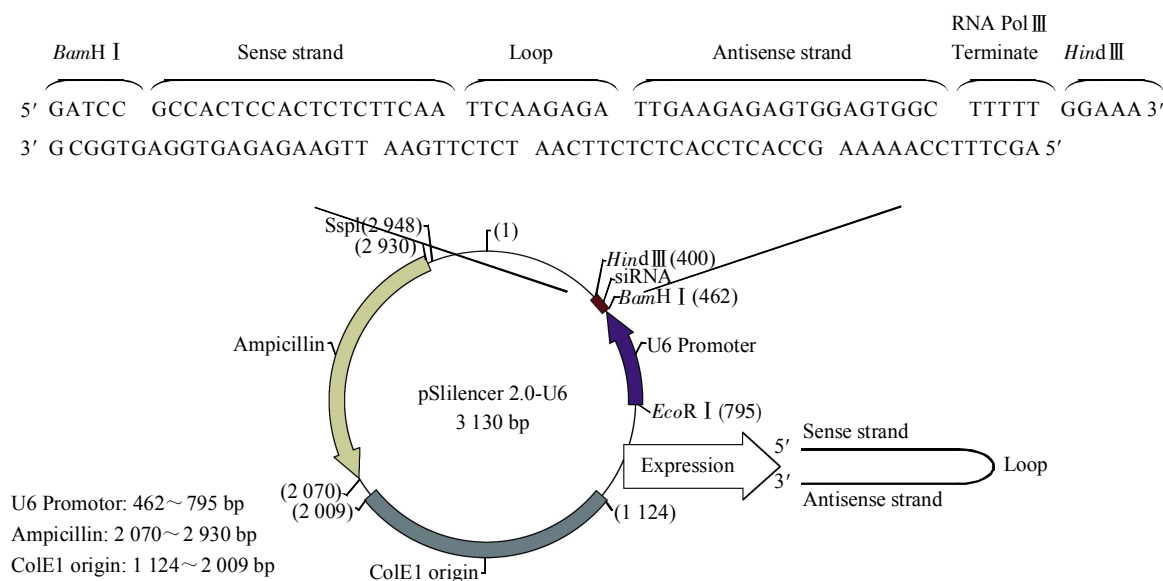


Fig. 1 Physical map of plasmid pSilencer 2.0-U6

由上海生工生物工程有限公司合成的两条单链 DNA, 各加 16 μ l TE 溶解, 分别溶解后再各取 5 μ l 混合, 退火, 形成双链 DNA. 采用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 对提取质粒 pSilencer 2.0-U6 进行双酶切, 37 $^{\circ}$ C 水浴 4 h, 将酶切后的反应液用凝胶回收纯化试剂盒进行纯化. 在 T4 DNA 连接酶作用下, 将上述双链 DNA 与酶切纯化后的质粒 DNA 于 16 $^{\circ}$ C 连接 12 h. 取 15 μ l 连接反应物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞. 取转化后的菌液 150 μ l 均匀涂布于含氨苄青霉素(50 mg/L)的 LB 平板, 倒置于 37 $^{\circ}$ C 孵箱, 培养 12 h. 从转化 *E. coli* DH5 α 宿主菌的平板用 10 μ l 加样器头随机挑取 2~3 个单克隆菌落, 分别接种于 100 ml 含氨苄青霉素(50 mg/L)的 LB 液体培养基中. 37 $^{\circ}$ C 200 r/min 震荡 12 h, 由上海生工生物工程有限公司 ABI PRISM 377 DNA 自动测序仪测定插入片段 DNA 的序列. 质粒提取试剂盒提取质粒 DNA, 经检测 $A_{260}/A_{280}=1.78$, 浓度为 122.6 mg/L, -20 $^{\circ}$ C 保存.

1.3 细胞培养和转染

1.3.1 细胞培养和转染.

肝癌细胞 HepG2 用含 10% 小牛血清的

DMEM/ F12 培养基, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 细胞培养箱常规培养, 每 3 天传代一次, 细胞贴壁达到 70%时, 以 0.25% 胰酶消化传代.

取对数增殖期的人肝癌 HepG2 细胞, 于含有 10% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基培养, 采用 LipofectamineTM 2000 转染试剂, 转染操作严格按转染试剂说明进行. 实验分为 3 组, 细胞对照组, PCNA shRNA 组 (*pShPCNA*), 非特异性对照组 (*pShNPC*). 具体方法为, 在 5% CO₂ 孵箱内 37 $^{\circ}$ C 孵育 12~18 h 至细胞长满板的 50%~80%, 将人肝癌 HepG2 细胞用无血清 Opti-MEM 洗 1 次. 同时用无血清的 Opti-MEM 稀释 *pShPCNA*, 加入到适量的 LipofectamineTM 2000 中(1 μ g 质粒每 2.5 μ l 脂质体), 混匀, 室温孵育 30 min, 形成复合物, 加在洗涤后的人肝癌 HepG2 细胞中, 在 CO₂ 孵箱内 37 $^{\circ}$ C 孵育 4~6 h, 随后更换新的含有 10% 小牛血清的 DMEM/F12 培养液.

1.3.2 转染效率的测定. 由于本实验采用的质粒不含绿色荧光蛋白基因, 故将 *pShPCNA* 与绿色荧光质粒 *pEGFP* 以质量比为 2:1 混合, 用 LipofectamineTM 2000 按上述操作转染人肝癌 HepG2

细胞, *pShPCNA* 终浓度为 0.5 mg/L, 36 h 后, 倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况, 之后消化收集细胞, PBS 洗涤 3 次, 避光保存, 流式细胞仪检测表达绿色荧光蛋白的 HepG2 细胞在所有细胞中的比例。

1.4 RT-PCR 检测 PCNA mRNA 水平

以 1.5×10^5 / 孔的密度将 HepG2 细胞接种于 12 孔培养板, 1 ml/ 孔, 每组设 3 个复孔, *pShPCNA* 作用终浓度为 0.25 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L、2 mg/L。Trizol 试剂从各组肝癌 HepG2 细胞中提取总 RNA。引物根据 NCBI GenBank 中人 PCNA 的 mRNA (ID: NM_002592) 设计 PCNA 引物序列。PCNA 上游引物, 5' GGCCGAAGATAACGCGGATAC 3', 下游引物, 5' GGCATATACGTGCAAA-TTCACCAG 3', 扩增片段长度 173 bp; β -actin 上游引物, 5' TGGGTCAGAAGGATTCCTATGT 3', 下游引物, 5' CAGCCTGGATAGCAACGTACA 3', 扩增片段长度 276 bp。采用 TIANScript RT Kit TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒进行逆转录反应, 随后进行 PCR 反应, PCR 条件分别为: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 30 s, 57℃ 1 min, 72℃ 1 min, 36 个循环; 72℃ 再次延伸 10 min。反应结束后, 每管各取 5 μ l 扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳 (60 V, 40 min)。电泳结束后, 核酸紫外检测仪观察、照相, Gel-Doc 1000 型紫外凝胶图像分析仪自带软件分析各条带的灰度值, 以 PCNA 与 β -actin 相对比值比较 PCNA 基因 mRNA 的表达高低。用以下公式计算 PCNA mRNA 表达的相对抑制率。抑制率 = $[1 - (A_{\text{实验组样品}} / A_{\text{实验组内参}}) / (A_{\text{对照组样品}} / A_{\text{对照组内参}})] \times 100\%$ 。

1.5 WST 法检测细胞增殖抑制率

人肝癌 HepG2 细胞, 调 8×10^4 个 / ml, 接种于 96 孔培养板, 每组设 5 个复孔, *pShPCNA* 的终浓度为 0.25 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L、2 mg/L, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱, 48 h 后, 每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂, 继续孵育 1 h, 酶标仪检测吸光值 (测定波长 450 nm, 参比波长 655 nm), 计算各组增殖抑制率。增殖抑制率 (%) = $(1 - A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

1.6 克隆形成抑制实验

以 300 / 孔的密度将 HepG2 细胞接种于 12 孔培养板, 1 ml/ 孔, 每组设 3 个复孔, *pShPCNA* 作用终浓度为 0.002 5 mg/L、0.005 mg/L、0.01 mg/L、0.02 mg/L, 转染后置 37℃, 5% CO₂ 培养 7 天后,

吸去培养液, PBS 洗涤, 甲醇:冰醋酸(3:1)固定液固定 10 min, 吉姆萨染色 30 min 后流水冲洗, 倒置显微镜下计数细胞克隆 (> 20 个细胞记一个克隆) 并拍照。克隆形成抑制率 = (对照组细胞克隆数 - 实验组细胞克隆数) / 对照组细胞克隆数 $\times 100\%$ 。

1.7 伤口愈合实验

伤口愈合实验参照文献[7]。10 g/L 小牛血清白蛋白, 10 mg/L 纤维连接蛋白(Fn), 以 500 μ l/ 孔分别加入 24 孔培养板, 4℃ 过夜。以 1.5×10^5 / 孔的密度将 HepG2 细胞接种于包被 FN 的 24 孔培养板中, 置 37℃、5% CO₂ 培养, 待细胞覆盖孔底 80% 以上时, 在单层细胞表面用 200 μ l 加样器头轻轻地沿培养板底部呈“一”字形划痕, 镜下记录划痕区相对距离, 用无血清 DMEM/F12 培养液洗涤 2 次, 加入不同浓度的药物, 终体积 1 000 μ l/ 孔, 每组设 3 个复孔。*pShPCNA* 作用终浓度为 0.25 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L、2 mg/L, 置 37℃、5% CO₂ 继续培养 48 h 后, 倒置显微镜下观察划痕处细胞的覆盖情况。随机测量 8 点垂直于划痕方向的宽度, 计算 8 点的均值作为实验的初始划痕宽度值。按公式计算细胞迁移速率 = (初始划痕宽度值 - 相应点划痕宽度值) / 初始划痕宽度值 $\times 100\%$ 。

1.8 PI 单染检测亚二倍体率和细胞周期

以 1.5×10^5 / 孔的密度将 HepG2 细胞接种于 12 孔培养板, 1 ml/ 孔, 每组设 3 个复孔, *pShPCNA* 作用终浓度为 0.25 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L、2 mg/L, 48 h 后收集细胞, 70% 乙醇 4℃ 固定过夜, PBS 洗涤细胞 1 次, 加入 PI 染色液 (含 RNA 酶), 终浓度 50 mg/L, 避光染色 30 min, 300 目尼龙网过滤后上流式细胞仪分析细胞 DNA 含量, 每个样本随机分析 12 000 个细胞, 得各组细胞亚二倍体率和细胞生长周期比例, 美国 BD FAC Sort Cell Quest 软件分析处理结果。

1.9 Annexin V-PI 双染测定细胞凋亡比例

以 1.5×10^5 / 孔的密度将 HepG2 细胞接种于 12 孔培养板, 1 ml/ 孔, 每组设 3 个复孔, *pShPCNA* 作用终浓度为 0.25 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L、2 mg/L, 48 h 后, 消化收集细胞, PBS 洗涤 3 次, 吸尽上清, 加入 200 μ l 试剂盒提供的结合缓冲液, 重悬细胞后, 分别加入 10 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI, 轻轻混匀, 4℃ 避光反应 30 min, 再加入 300 μ l 结合缓冲液, 上机检测。Annexin V-FITC⁺, PI⁻的细胞群 (即 LR 细胞群) 为早期凋亡细胞群。

1.10 细胞凋亡线粒体膜电位检测

参照文献[8], 以 1.5×10^5 孔的密度将 HepG2 细胞接种于 12 孔培养板, 1 ml/孔, 每组设 3 个复孔, *pShPCNA* 作用终浓度为 0.25 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L、2 mg/L, 转染 48 h 后, 收集细胞, PBS 洗涤, 取 500 μ l JC-1 工作液将细胞悬浮, 置 37℃、5% CO₂ 中孵育 20 min 后, 孵育缓冲液洗 2 次, 取 500 μ l 孵育缓冲液重悬细胞, 滴一滴细胞悬液于载玻片上, 盖上盖玻片, 于荧光显微镜下观察。

1.11 Hoechst 33258 染色观察凋亡细胞形态学变化

以 1.5×10^5 孔的密度将 HepG2 细胞接种于 12 孔培养板, 1 ml/孔, 每组设 3 个复孔, *pShPCNA* 作用终浓度为 0.25 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L、2 mg/L, 转染 48 h 后, 消化收集细胞, PBS 洗涤, 涂片, 室温自然干燥, 甲醇:冰醋酸(3:1)固定液固定 10 min, Hoechst 33258 染色工作液(10 mg/L)避光染色 2 min, 流水冲洗 5 min, 荧光显微镜观察并拍照。

1.12 统计学处理

计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, SPSS13.0 统计软件处理数据, 采用完全随机设计的单因素方差分析(one-way ANOVA)分析组间差异的显著性。

2 结 果

2.1 重组质粒的测序鉴定结果

重组质粒经自动基因测序仪测序(上海生工生物工程有限公司), 测序结果与设计序列完全相符, 所含目的基因序列准确无误, 表明成功构建了重组真核表达载体 *pShPCNA*。

2.2 质粒转染效率

pEGFP 与 *pShPCNA* 共转染 HepG2 细胞 36 h 后, 倒置荧光显微镜下观察 HepG2 细胞绿色荧光蛋白的表达情况。表达绿色荧光蛋白的 HepG2 细胞在所有细胞中的比例达到 50 % 以上。流式细胞术检测发现表达绿色荧光蛋白的 HepG2 细胞在所有细胞中的比例为 64.4%, 而未转染组仅为 0.6% (图 2)。

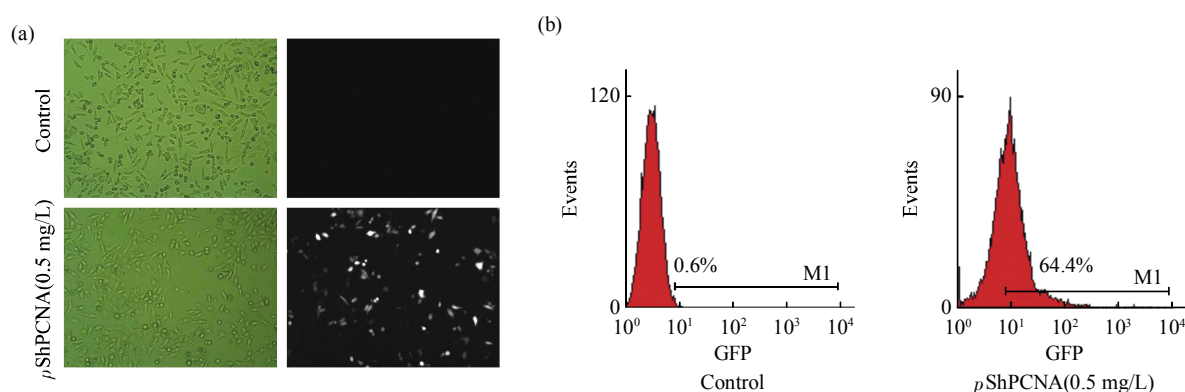


Fig. 2 Transfecting rates of *pShPCNA* on HepG2 cells detected by flow cytometry

(a) Transfecting rate detected by fluorescence microscope($\times 100$). (b) Transfecting rate detected by flow cytometry.

2.3 RT-PCR 检测 PCNA mRNA 表达

瞬时转染 HepG2 细胞 48 h 后, RT-PCR 半定量分析 PCNA mRNA 表达, 用琼脂糖凝胶电泳条带中 PCNA 与 β -actin 的灰度比值来判断 PCNA 的 mRNA 表达, 实验结果显示, PCNA 在 mRNA 目的基因条带 173 bp 处在细胞对照组和非特异性对照组均有明显表达, 而转染组 PCNA 的 mRNA 表达明显下调, 与前两组相比有明显差异($P < 0.01$). 随着 *pShPCNA* 浓度的增高, PCNA 的 mRNA 表达下调越明显。另外, 非特异性对照组 PCNA mRNA 表达无明显变化(图 3)。

2.4 细胞增殖抑制率检测

特异性真核表达载体 *pShPCNA* 转染肝癌 HepG2 细胞 48 h 后, 出现明显的增殖抑制作用(图 4)。非特异性真核表达载体 *pShNPC* 组与细胞对照组相比差异无显著性($P > 0.05$)。不同浓度的 *pShPCNA* 处理组与细胞对照组相比, 均有统计学意义($P < 0.01$)。随着 *pShPCNA* 浓度的增加, HepG2 细胞的增殖抑制越明显。根据各浓度组的抑制率计算得到, 作用 48 h, *pShPCNA* 对 HepG2 细胞的半数抑制浓度(IC_{50})为 0.57 mg/L。

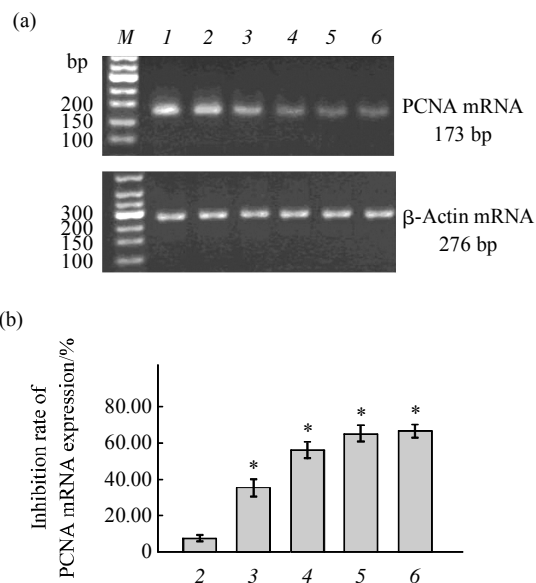


Fig. 3 Expression of PCNA mRNA in HepG2 cells after the treatment of *pShPCNA* detected by RT-PCR

(a) Electrophoresis map. (b) The relative inhibition rate of the expression of PCNA mRNA detect by RT-PCR(%). *M*: Marker; *1*: Cell control; *2*: *pShNPC*; *3*: *pShPCNA* 0.25 mg/L; *4*: *pShPCNA* 0.5 mg/L; *5*: *pShPCNA* 1 mg/L; *6*: *pShPCNA* 2 mg/L. * $P < 0.01$ vs control and *pShNPC*.

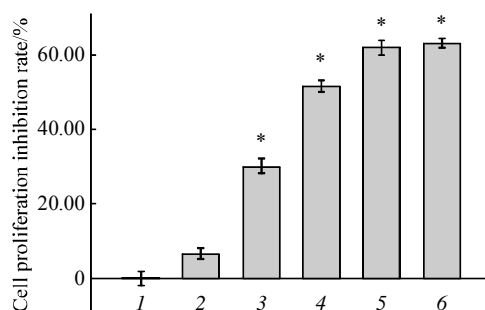


Fig. 4 The proliferation inhibition of *pShPCNA* on HepG2 cell lines for 48 h

The inhibition rate was detected by cck-8 reagent. The data was ($\bar{x} \pm s$) of the three independent experiments. * $P < 0.01$ vs control and *pShNPC* groups. *1*: Control; *2*: *pShNPC*; *3*: *pShPCNA* 0.25 mg/L; *4*: *pShPCNA* 0.5 mg/L; *5*: *pShPCNA* 1 mg/L; *6*: *pShPCNA* 2 mg/L.

特异性真核表达载体 *pShPCNA* 转染肝癌 HepG2 细胞 48 h, 细胞较为稀疏, 细胞间隙增大, 细胞大小不一, 有较多的细胞变圆, 体积比对照组细胞小, 细胞贴壁慢, 部分细胞不贴壁或贴壁不牢, 易被消化离壁. 而非特异性真核表达载体 *pShNPC* 组与细胞对照组无明显差别, 细胞生长旺盛, 细胞饱满, 贴壁良好, 细胞间隙小.

2.5 *pShPCNA* 对 HepG2 细胞克隆形成的影响

各组的克隆形成情况如图 5 所示, 与细胞对照组相比较, *pShNPC* 组未见明显差异. 而 *pShPCNA* 组随着浓度增加克隆逐渐减小, 且克隆数量逐渐减少, 浓度为 0.002 5 mg/L 时, HepG2 细胞即产生明显的克隆形成抑制作用, 当浓度达到 0.01 mg/L 时, 基本无克隆细胞株形成.

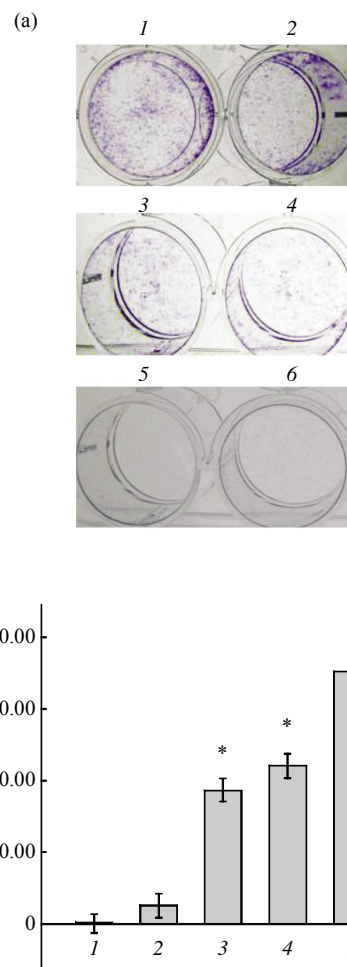


Fig. 5 Clone formation assay of *pShPCNA* on HepG2 cells

(a) A representative photo of clone formation assay. (b) The inhibition of clone formation rates of every groups, $n=3$, * $P < 0.01$ vs control and *pShNPC* groups. *1*: Control; *2*: *pShNPC* 0.01 mg/L; *3*: *pShPCNA* 0.002 5 mg/L; *4*: *pShPCNA* 0.005 mg/L; *5*: *pShPCNA* 0.01 mg/L; *6*: *pShPCNA* 0.02 mg/L.

2.6 伤口愈合实验检测细胞的迁移能力

实验组和细胞对照组划线后在镜下视野中可见一条细长等宽的无细胞划痕区, 48 h 后细胞对照组和 *pShNPC* 组细胞运动迁移基本上覆盖了大部分划痕区, 而 *pShPCNA* 组随着 *pShPCNA* 浓度的增大, HepG2 细胞向划痕区移动的距离越来越小, 划痕

区依然明显存在, 见图 6a. 各组细胞迁移速率如图 6b 所示, 与细胞对照组相比较, *p*ShNPC 组未见明显差异. 而 *p*ShPCNA 组随着浓度增加细胞迁移速率减小. 可见 *p*ShPCNA 能明显抑制 HepG2 细胞的迁移, 且成剂量 - 效应关系.

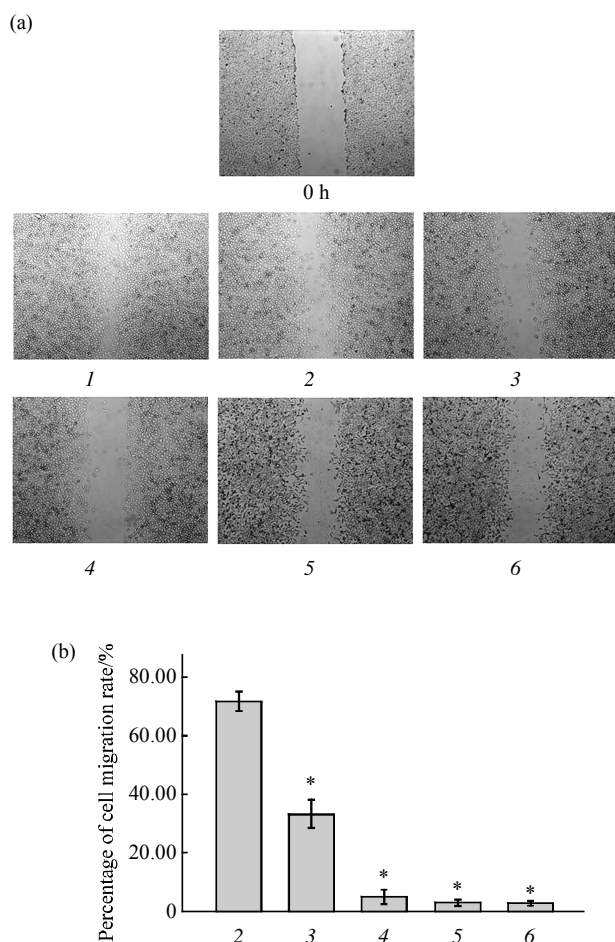


Fig. 6 The effect of the migrating activity of *p*ShPCNA on HepG2 cells

(a) The photo of cell migration ($\times 100$). (b) The cell migrating activity inhibited by *p*ShPCNA. * $P < 0.01$ vs control and *p*ShNPC groups. 1: Control; 2: *p*ShNPC 1 mg/L; 3: *p*ShPCNA 0.25 mg/L; 4: *p*ShPCNA 0.5 mg/L; 5: *p*ShPCNA 1 mg/L; 6: *p*ShPCNA 2 mg/L.

2.7 PI 单染流式细胞仪检测细胞周期和亚二倍体百分率

*p*ShNPC 组细胞周期比例与细胞对照组细胞相似, 而 *p*ShPCNA 组细胞 G0/G1 期细胞比例明显上升, 出现明显 G0/G1 期阻滞, S 期、G2/M 细胞减少, 见图 7. 提示 *p*ShPCNA 可能延缓了肝癌细胞由 G1 期向 S 期的过渡.

与细胞对照组、*p*ShNPC 组相比, *p*ShPCNA 组细胞出现明显的亚二倍体凋亡峰($P < 0.01$), 随着 *p*ShPCNA 浓度的增大, HepG2 细胞的亚二倍体率增加.

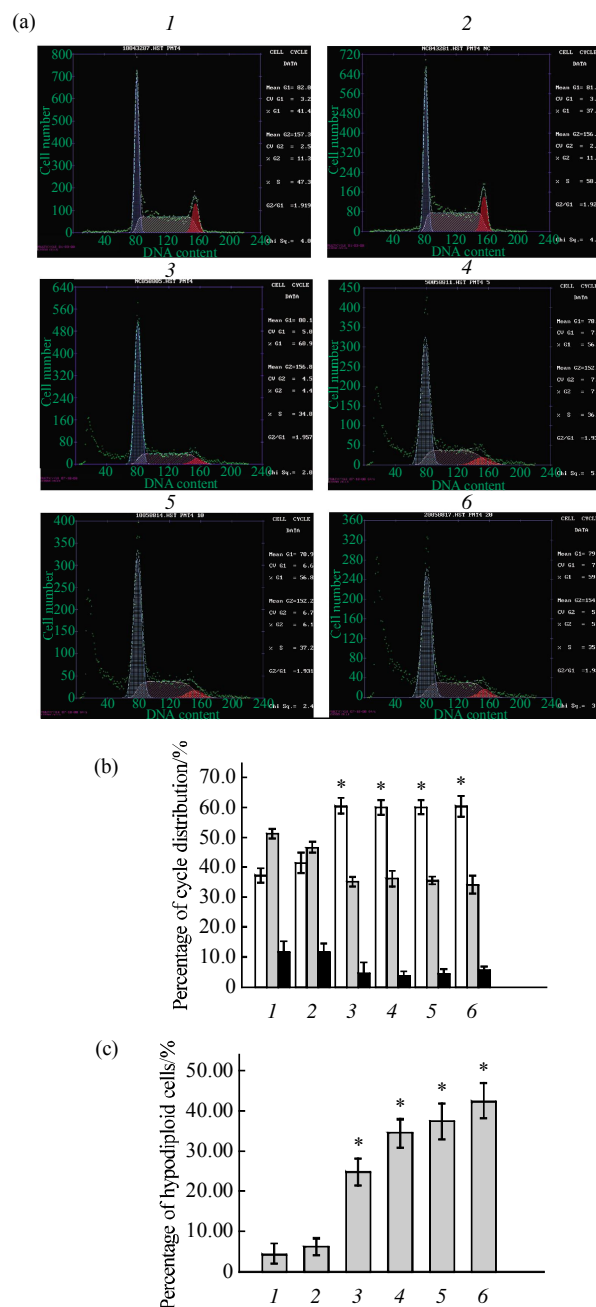


Fig. 7 The change of cell cycle distribution of *p*ShPCNA on HepG2 cells detected by flow cytometry

HepG2 cells treated with *p*ShPCNA for 48 h was determined with propidium iodide (PI) staining, and the percentage of hypodiploid cells was detected by flow cytometry. $n=3$. (a) A representative results of *p*ShPCNA on HepG2 cell cycle distribution. (b) Comparison of cell cycle distribution in every groups. * $P < 0.05$ vs control and *p*ShNPC.

□: G0/G1; ▨: S; ■: G2/M. (c) The percentage of hypodiploid cells of HepG2 cells. * $P < 0.01$ vs control and *p*ShNPC. 1: Control; 2: *p*ShNPC 1 mg/L; 3: *p*ShPCNA 0.25 mg/L; 4: *p*ShPCNA 0.5 mg/L; 5: *p*ShPCNA 1 mg/L; 6: *p*ShPCNA 2 mg/L.

2.8 Annexin V /PI 双染流式细胞仪检测结果

在细胞凋亡的早期就有细胞膜表面破损发生. 破损时凋亡细胞表面的磷脂酰丝氨酸(PS)可以从细胞内膜翻转至细胞的外膜. 该过程发生在 DNA 片段化之前, 因而检测 PS 的表达, 能反映早期凋亡. AnnexinV 是相对分子质量为 35 000 的 Ca^{2+} 依赖的磷脂结合蛋白, 对 PS 有很高的亲和性, 可以与暴露于细胞外的 PS 相结合. 利用这一原理, 将 AnnexinV 标记荧光可以识别早期的细胞凋亡. 通

常利用 AnnexinV-FITC 和碘化丙锭(PI)来区分凋亡和坏死细胞. PI 的膜通透性很差, 只能标记坏死细胞. 在流式细胞术的结果中可见 AnnexinV-FITC(+)、PI(-)细胞为凋亡细胞, 而 AnnexinV-FITC(+)、PI(+)细胞为坏死细胞.

pShNPC 组细胞早期凋亡率为 6.1%, 与细胞对照组相比无统计学差别($P > 0.05$), *pShPCNA* 组细胞出现明显的早期凋亡细胞群, 与细胞对照组相比差别有统计学意义($P < 0.01$), 见图 8.

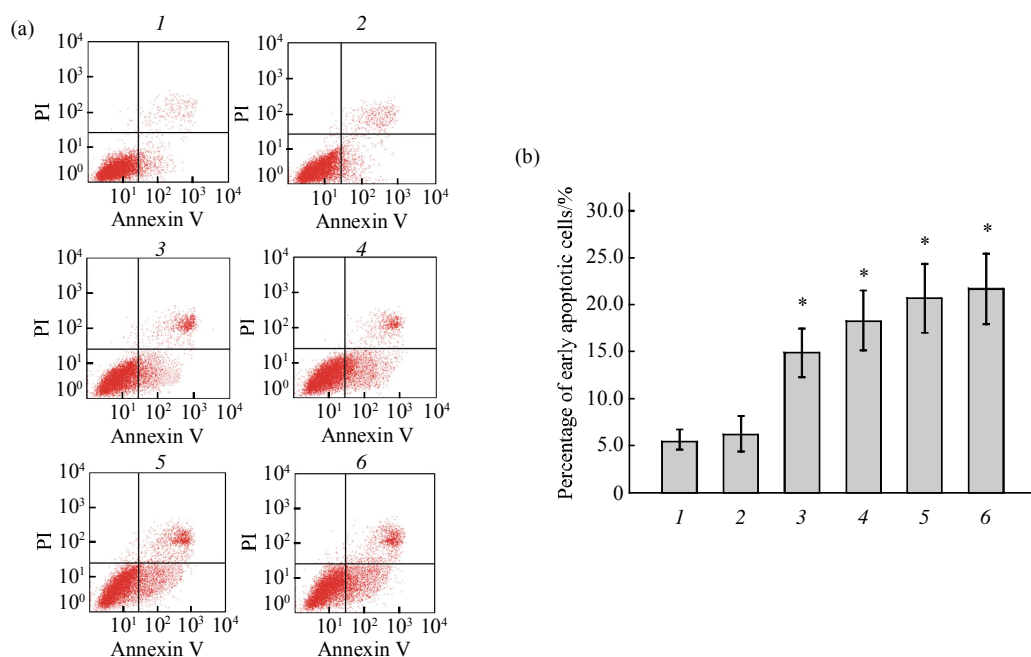


Fig. 8 Early apoptosis of *pShPCNA* on HepG2 cells detected with Annexin V-FITC and PI dual parameter by flow cytometry

(a) A representative results of Annexin V/PI double staining. (b) Comparing of the percentage of early apoptosis in every groups. * $P < 0.01$ vs control and *pShNPC*. 1: Control; 2: *pShNPC* 1 mg/L; 3: *pShPCNA* 0.25 mg/L; 4: *pShPCNA* 0.5 mg/L; 5: *pShPCNA* 1 mg/L; 6: *pShPCNA* 2 mg/L.

2.9 线粒体膜电位检测

亲脂性阳离子荧光探针 JC-1 以单体形式存在, 可发出绿色荧光(527 nm), 若以多聚体形式存在, 可发出红色荧光(590 nm). JC-1 可透过正常细胞膜以单体状态进入胞内, 正常健康线粒体的膜电位($\Delta\psi$)具有极性, JC-1 依赖于 $\Delta\psi$ 的极性被迅速摄入线粒体内, 并形成多聚体, 发出红色荧光(590 nm, 线粒体)和绿色荧光(527 nm, 胞液). 而细胞发生凋

亡时, 线粒体跨膜电位被去极化, JC-1 从线粒体内释放, 线粒体内红光强度减弱(590 nm), 以单体的形式存在于胞液内而发绿色荧光(527 nm). 因此在双色滤光片下观察, 正常细胞为高绿高红, 凋亡细胞为高绿低红. *pShNPC* 组与细胞对照组细胞相似, 都表现为: 绿++ 红++(高绿高红), 而 *pShPCNA* 组细胞表现为: 绿++ 红+(高绿低红), 见图 9.

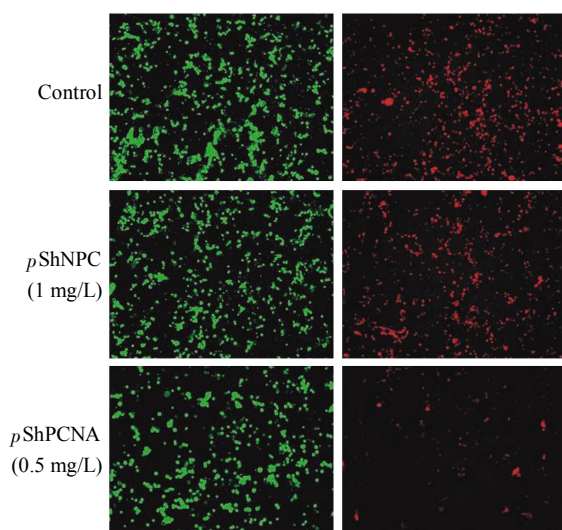


Fig. 9 The change of mitochondria membrane potential of pShPCNA on HepG2 cells detected by fluorescence microscope ($\times 100$)

2.10 Hoechst 33258 染色观察凋亡细胞形态学变化

pShPCNA 组细胞可见核固缩、边聚和裂解、凋亡小体形成等凋亡形态学变化(图 10)。

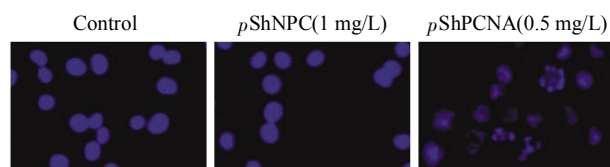


Fig. 10 The morphology of HepG2 cells examined by fluorescence microscope after hoechst 33258 staining ($\times 400$)

3 讨 论

增殖细胞核抗原(PCNA), 也称周期蛋白或 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白, 是真核细胞合成所必需的核蛋白, 在 DNA 复制中起重要作用。在静止期细胞含量很少, 增殖 S 期达到高峰, M 期降至最低水平, 其量的变化与 DNA 合成一致, 肿瘤细胞增殖越活跃, PCNA 表达越高^[1,9]。PCNA 在正常肝细胞中表达的阳性率很低, 随着肝细胞增生活跃, 特别是异型增生最后发生癌变, 阳性率逐渐增加, 说明了细胞的增殖能力逐渐增强。研究表明, PCNA 与肿瘤的分级及恶性程度、转移与预后密切相关^[10]。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种新型基因阻断技术, 其主要参与成分为小干扰 RNA (siRNA), siRNA 可特异性抑制靶目标 mRNA 的表达^[3]。RNA 干扰能高效特异地干涉目标靶基因的表达, 可作为一种简单有效的代替基因敲除的工具。目前, RNA 干扰已广泛应用于肿瘤研究工作中, 并取得了一些突破性进展。利用 RNAi 来阻断 PCNA 基因的研究文献报道较少, 仅有如下几篇: Li 等^[11]通过大鼠实验证明 PCNA shRNA 能有效地沉默增殖相关基因的表达, 如 PCNA、Ki-67、mucin-3、 β -glucuronidase 有效地预防胆结石摘除术后胆石症再次复发; Huang 等^[12]构建 PCNA shRNA 表达质粒, 导入宫颈癌 HeLa 细胞中去, 结果表明, PCNA shRNA 能有效地沉默 PCNA 蛋白的表达, 并且促使 HeLa 细胞的凋亡, Western blot 结果显示实验组活化的 caspase3、PARP 明显增加, 证明 PCNA shRNA 介导的凋亡是通过 caspase 通路来完成的; 张其亮等^[13]构建了 PCNA shRNA 表达载体 pSilence2.1-neo-PCNA, 导入人骨肉瘤细胞 MG263, 可显著抑制 PCNA mRNA 及蛋白质的表达, 有效抑制人骨肉瘤细胞的增殖活性。

在前期工作中^[15-6], 我们参照 siRNA 设计原则, 设计出 4 对 PCNA siRNA 序列, 并筛选出了靶向 PCNA 基因的 2 条最佳 siRNA 序列。本研究以此最佳 siRNA 序列 2 设计 DNA 模板, 为 Sense+Loop+Antisense, 两端引入 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点, 选择含 U6 启动子的 pSilencer 2.0-U6 载体。通过酶切和测序表明, 重组载体构建成功, RT-PCR 半定量分析 PCNA mRNA 表达, 实验结果显示, 细胞对照组与非特异性对照组 PCNA 的 mRNA 表达无明显变化, 而转染组 PCNA 的 mRNA 表达明显下调。WST 法及克隆形成试验结果证实, pShPCNA 转染可有效抑制人肝癌细胞的增殖活性, 其抑制细胞增殖的作用随浓度升高而增强, 表现出剂量依赖性, 而错义 shRNA(pShNPC)对生长无明显抑制作用, 提示 pShPCNA 对 HepG2 细胞抑制作用具有特异性。

流式细胞术分析细胞周期发现, pShPCNA 组转染的 HepG2 细胞中, G1 期细胞数明显增多, S 期细胞数明显减少, G2 期细胞数减少。其原因为: a. PCNA 是一种核周期性因子, 在 G1 期开始出现, S 期达到高峰, G2 期及 M 期逐渐下降。PCNA 蛋白会和 DNA 多聚酶结合, 促进细胞进入 S 期, 产生细胞过度增殖及癌变。但 pShPCNA 抑

制 PCNA 的表达, 延缓了肿瘤细胞由 G1 期向 S 期的过渡, 从而减少 S 期细胞含量, 抑制肝癌细胞的增殖. b. 由于 PCNA-P21 可以和多种 CDK/cyclin 形成四聚体^[1], 当 PCNA 表达被抑制, 使 CDK 活性被抑制, 从而影响 RB 蛋白磷酸化和与之结合的转录因子的释放, 导致细胞不能通过 G1 期检验点进入 S 期.

JC-1 是一种碳氰化合物类荧光染料^[14], 在细胞内以聚合体和单体两种不同的物理形式存在, 分别处于不同的荧光发射峰. 当 JC-1 浓度升高, 形成聚合物, 激发波长为 590 nm 时发出红色的荧光, 激发波长为 527 nm 时呈绿色荧光; 当 JC-1 浓度低, 主要以单体形式存在, 激发波长为 590 nm 时发出较弱的红色荧光, 激发波长为 527 nm 时呈绿色荧光, 通过鉴定线粒体内荧光染料 JC-1 浓度, 可间接检测线粒体膜电位的改变. 荧光显微镜检测, *pShPCNA* 转染组细胞线粒体膜电位的下降, 出现高绿低红的凋亡细胞特征, 细胞对照组、*pShPNA* 组为高红高绿, 说明 *pShPCNA* 转染组出现线粒体膜电位下降, 蛋白性孔道(permeability transition pore, PTP)开放. 经流式细胞术检测, *pShPCNA* 转染组出现了大量亚二倍体细胞群、出现 AnnexinV-FITC (+)、PI(-) 特征的早期凋亡细胞群, 且呈剂量 - 效应关系; Hoechst 33258 染色发现 *pShPCNA* 组细胞可见核固缩、边聚和裂解、凋亡小体形成等凋亡形态学变化.

本实验证明, *pShPCNA* 诱导 HepG2 细胞凋亡. 此凋亡信号传导途径是否为线粒体凋亡途径, 还需进一步检测线粒体细胞色素 c 的释放以及 caspase 9、caspase 3 的活性, 加以佐证.

本研究成功构建针对 PCNA 基因的 siRNA 真核表达载体, 并在人肝癌细胞系 HepG2 细胞中成功地表达了 siRNA, 有效地抑制了 PCNA 的表达, 进而抑制 HepG2 细胞增殖、诱导细胞凋亡、并使细胞出现 G0/G1 期阻滞, 说明我们构建的针对 PCNA 的真核表达载体是正确有效的, 为后续研究 PCNA 基因在肝癌 HepG2 细胞中的功能, 以及其他基因之间的相互关系提供实验工具.

参 考 文 献

[1] Maga G, Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a

dancer with many partners. *J Cell Sci*, 2003, **116**(15): 3051-3060

- [2] Osada S, Saji S, Kuno T. Clinical significance of combination study of apoptotic factors and proliferating cell nuclear antigen in estimating the prognosis of hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol*, 2004, **85**(1): 48-54
- [3] Duxbury M S, Whang E E. RNA interference: a practical approach. *J Surg Res*, 2004, **117**(2): 339-344
- [4] Scherr M, Morgan M A, Eder M. Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells. *Curr Med Chem*, 2003, **10**(3): 245-256
- [5] 蒋建伟, 史金桃, 吴志慧, 等. 增殖细胞核抗原 siRNA 序列的设计, 合成与筛选. *中国病理生理学报*, 2008, **24**(3): 484-489
Jiang J W, Shi J T, Wu Z H, *et al.* *Chin J Pathophysiol*, 2008, **24**(3): 484-489
- [6] 陈 洁, 史金桃, 蒋建伟, 等. 增殖细胞核抗原小干扰 RNA 对人结肠癌 CaCO2 细胞抑制作用. *中华实验外科杂志*, 2007, **24**(4): 454-456
Chen J, Shi J T, Jiang J W, *et al.* *Chin J Exp Surg*, 2007, **24**(4): 454-456
- [7] 柏燕燕, 史 毅, 惠国桢, 等. EphA2 对神经胶质瘤细胞系 U251 的凋亡、增殖、迁移和侵袭的研究. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(4): 464-470
Bai Y Y, Shi Y, Hui G Z, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(4): 464-470
- [8] Salvioli S, Ardizzone A, Franceschia C. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess $\Delta\psi$ changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Letters*, 1997, **411**(1): 77-82
- [9] Astudillo H, Lopez T, Castillo S, *et al.* p53, Bcl-2, PCNA expression, and apoptotic rates during cervical tumorigenesis. *Ann NY Acad Sci*, 2003, **1010**(1): 771-774
- [10] Czyżewska J, Guzinska-Ustymowicz K, Lebelt A. Evaluation of proliferating markers Ki-67, PCNA in gastric cancers. *Rocz Akad Med Białymst*, 2004, **49**(Suppl1): 64-66
- [11] Li F Y, Cheng N S, Cheng J Q, *et al.* Proliferating cell nuclear antigen shRNA treatment attenuates chronic proliferative cholangitis in rats. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, **24**(5): 920-926
- [12] Huang H, Tu X, Yang N C, *et al.* Short-interfering RNA-mediated silencing of proliferating cell nuclear antigen inhibit proliferation and induce apoptosis in HeLa cells. *Int J Gynecol Cancer*, 2008, **18**(1): 36-42
- [13] 张其亮, 杨述华, 刘红云, 等. 增殖细胞核抗原短发夹状 RNA 对人骨肉瘤细胞生长的影响. *中华病理学杂志*, 2005, **34** (3): 167-170
Zhang Q L, Yang S H, Liu H Y, *et al.* *Chin J Pathol*, 2005, **34** (3): 167-170
- [14] Ly J D, Grubb D R, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) in apoptosis. *Apoptosis*, 2003, **8**(2): 115-128

Construction of shRNA Targeting PCNA Gene and Its Effects on Proliferation and Apoptosis of HepG2 Cell Lines*

ZHANG Xiao-Ying^{1,2)}, WU Feng-Yun^{1,3)}, HE Jin-Hua^{1,4)}, LIAO Xiao-Li¹⁾, WANG Wei¹⁾, JIANG Jian-Wei^{1)**}

¹⁾ Department of Biochemistry, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510630, China;

²⁾ Department of Laboratory, Nanhai Women and Children Health Hospital, Foshan 528200 China;

³⁾ Pingyang People's Hospital, Wenzhou 325400 China; ⁴⁾ Department of Laboratory, Panyu Center Hospital, Guangzhou 511400, China)

Abstract In order to explore the function of PCNA gene on the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma HepG2 cells, to provide the experimental evidence and a new tool to further explore the function of PCNA gene and the feasibility of its gene therapy, the eukaryotic expression vector targeting PCNA was constructed. According to the sequence screened in previous work, PCNA siRNA was converted into cDNA coding expression of shRNA (small hairpin RNA). The cDNA was synthesized and inserted into plasmid *pSilencer2.0-U6* to construction of eukaryotic expression vector of siRNA specific for targeting PCNA gene, the negative plasmid *pShPCNA* was also constructed. The plasmids were identified by sequence analysis. The plasmid was transiently transfected into hepatocellular carcinoma HepG2 cells for 48 h, proliferation and the clone formation of HepG2 cells were detected by CCK-8 and clone formation assay respectively. The percentage of hypodiploid cells and early apoptotic cells was detected by flow cytometry. The morphology was examined by fluorescence microscope after Hoechst 33258 staining. Compared with control group and negative control group, PCNA mRNA level was reduced by *pShPCNA* detected by RT-PCR. The proliferation and clone formation of HepG2 cells treated with *pShPCNA* for 48 h were significantly inhibited ($P < 0.01$). The migration was also attenuated when PCNA was knocked down by shRNA, and flow cytometry analysis showed an increase of the percentage of G0/G1 phase cells, along with a decrease of cell population in the S phase. Percentages of hypodiploid cells and early apoptosis rates were significantly higher in treatment groups than those in control and negative control group ($P < 0.01$). Mitochondrial membrane potential was reduced in *pShPCNA* group detected by JC-1 fluorescent staining. Apoptotic morphology such as cell shrinkage, nuclear condensation, nuclear fragmentation, chromatin condensation and apoptotic bodies were also observed by staining with Hoechst33258 under fluorescence microscope. The study indicated the eukaryotic expression vector, PCNA shRNA has been successfully constructed, and effectively inhibits proliferation and induces apoptosis and arrested HepG2 cells in G0/G1 phase.

Key words RNA interference, proliferating cell nuclear antigen, eukaryotic expression vector, HepG2 cell line, hepatocellular carcinoma

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00573

*This work was supported by grants from Sci-Tech Project Foundation of Guangdong Province in China (2009B080701051) and Medical Scientific Research Foundation of Guangdong Province in China(2007322).

**Corresponding author.

Tel: 86-20-85220256, E-mail: jjw703@163.com

Received: September 27, 2009 Accepted: November 26, 2009