

siRNA 沉默 G6PD 表达对人皮肤黑色素瘤细胞生长及凋亡的影响*

朱月春** 吕会茹 李丹怡 童淑芬

(昆明医学院生物化学教研室, 昆明 650031)

摘要 研究表明, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)与肿瘤的发生、发展、临床表型及治疗和预后有关。为阐明 G6PD 与肿瘤的关系及其机理, 针对人 G6PD 基因设计 3 条 siRNA 和一条无关序列, 再据每一序列, 合成两条互补并含 siRNA 正反义链的 DNA, 退火后与含 GFP 的载体 pRNAT-U6.2/Lenti 连接, 转染人皮肤黑色素瘤 A375 细胞, Real-time PCR 筛选有效的一条 siRNA, 经病毒颗粒包装和病毒生产并感染 A375 细胞, G418 筛选后, 挑取单个阳性克隆放大培养, Western blotting 检测 siRNA 干扰 G6PD 效率为 88.83%, 构建成 G6PD 缺陷型 A375 稳转细胞(A375-G6PDΔ)。与野生型 A375 细胞(A375-WT)比较, A375-G6PDΔ 的 G6PD 活性仅为 21.53%, 细胞倍增时间延长, 增殖被抑制, 克隆形成率降低 25% ($P < 0.05$), 凋亡细胞数增加 2.86 倍($P < 0.01$), SPF 增加 33.8 %($P < 0.05$), PI 增加 59.7 %($P < 0.01$), G0/G1 期下降 27.7 % ($P < 0.01$), 凋亡相关蛋白 P53 下降 54.7%($P < 0.01$)、Caspase-3 增加 2.2 倍($P < 0.01$)和 Bcl-2 降低 21.7% ($P > 0.05$), 提示, G6PD 缺陷可能通过下调 P53 蛋白表达和上调 Caspase-3 的表达, 抑制 G2/M 期向G0/G1 期转换的进程, 促进 A375 的凋亡, 机理有待于进一步探讨。

关键词 siRNA 干扰, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 人皮肤黑色素瘤, 稳转细胞株, 细胞周期, P53, Caspase-3

学科分类号 R73

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD, EC1.1.1.49)是看家基因表达的酶, 存在于所有组织器官, 其基因定位于基因高密度区 Xq28, 全长 18 kb, 由 13 个外显子和 12 个内含子组成。人 G6PD 的 cDNA 全长 1 548 bp, 编码 515 个氨基酸, 有活性的酶为二聚体或四聚体。G6PD 也是磷酸戊糖途径(the pentose phosphate shunt, PPP)的关键酶, 提供还原型辅酶 II (reduced form of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, NADPH)和五磷酸核糖 (ribose-5-phosphate, R-5-P)。NADPH 用于维持细胞内还原型谷胱甘肽 (glutathione-SH, GSH) 的水平, R-5-P 则是核酸合成的原料。

研究发现, 卵巢癌和肾癌细胞 GSH 及其代谢酶活性的改变与临床分期相关, 如谷胱甘肽还原酶、谷胱甘肽过氧化物酶等^[1, 2]。人食管癌细胞 G6PD 可高于正常 10 倍以上, 将高于对照 2~16 倍 G6PD 表达的 NIH 3T3 细胞注射到裸鼠皮下可快速诱导裸鼠产生肿瘤, 而且肿瘤的大小与 G6PD 活性高低相关^[3]。然而, 流行病学观察到 G6PD 缺陷鼻咽癌患者预后较差, 复发率高^[4]。共聚焦激光扫描

显微镜(confocal laser scanning microscopy, CLSM)证实 G6PD 在凋亡的纤维肉瘤细胞低表达^[5]。Ohl 等^[6, 7]在检测人膀胱癌和前列腺癌细胞内看家基因时发现, G6PD 表达不稳定并与肿瘤的恶性程度相关。国内张德太等^[8, 9]发现 G6PD 的非竞争性抑制剂脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone, DHEA)通过抑制细胞 G6PD 酶活性可减慢 Burkitt 淋巴瘤的生长。

可见, G6PD 与肿瘤的发生、发展、临床表现及治疗均有关系。然而, 至今尚未阐明 G6PD 与肿瘤的关系及其机理, 甚至有不一致的观点和结论。原因之一可能是肿瘤细胞内源性 G6PD 的干扰。鉴于国内外缺乏 G6PD 缺陷的肿瘤细胞株及其相关研究, 为了阐明 G6PD 在肿瘤细胞生长、增殖中的作用, 本文用 siRNA 靶向沉默人皮肤黑色素瘤 A375 细胞内源性 G6PD 表达的 88.83%, 构建了 G6PD 缺陷型 A375 稳转细胞株(A375-G6PDΔ), 并对其生长及凋亡情况进行了初步探究。

* 国家自然科学基金资助项目(30460049)。

** 通讯联系人。

Tel: 0871-5338911, Fax: 0871-5332390, E-mail: yzh399@yahoo.com

收稿日期: 2008-01-08, 接受日期: 2008-02-25

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和细胞. 大肠杆菌 DH5 α 、293T 细胞、pRNAT-U6.2/Lenti siRNA expression vector 均购自上海康成公司, A375 细胞购自中国科学院细胞库.

1.1.2 试剂. T4 Ligase、*Bam*H I、*Xho* I、慢病毒包装系统(KCPACK-Lentivaris plasmids mix)、Horseradish Peroxidase-HRP 二抗、HRP- 结合的抗生物素抗体和 KCTM 化学发光试剂盒均购自上海康成公司, QIAGEN plasmid mini kit 购自 QIAGEN 公司, Fetal Bovine Serum、Trypsin、Opti-MEM 购自 GIBCO 公司, LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司, MMLV 反转录酶和 Taq 聚合酶购自 Promega 公司. Millex-HV 0.45 μ m PVDF filters 购自 Millipore 公司. P53、Bcl-2、Caspase-3 检测试剂盒为 Backman Coulter 产品.

1.1.3 仪器. OligoEngine RNAi 设计软件、引物设计软件 Primer 5.0、电泳仪及电泳转移装置

(BIO-RAD)、酶标仪(Bio-TEK)、Real time PCR 仪(Corbett Research)、荧光显微镜 (Nikon Eclipse E600)、图像分析软件 ImageJ、PCR 仪(杭州大和热磁电子有限公司)和流式细胞仪(CoulterEpics XL).

1.2 方法

1.2.1 siRNA 表达载体的构建. OligoEngine RNAi 软件设计 3 条针对人 G6PD 基因 (GenBank: NM_000402) 3'端非编码区的 siRNA 和一条对照的无关 siRNA 序列, 再据每条 siRNA, 合成 2 条互补的含 siRNA 正义链和反义链的 DNA 模板(表 1), 中间以 9 个脱氧核苷酸的 Loop 结构相连, 后面接 RNA Poly III 聚合酶转录终止位点, 并在模板链两端引入 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点. 2 条单链 DNA 经退火, 与含 GFP 的质粒 pRNAT-U6.2/Lenti 连接; 连接产物转化 *E. coli* DH5 α , 涂布平板, 过夜培养, 每组样品挑取 2 个单菌落经 PCR 检测 (表 1). PCR 条件为: 94 $^{\circ}$ C 10 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 33 个循环, 培养阳性菌落, 提取质粒测序鉴定.

Table 1 Sequences of siRNA, DNA and PCR primers

Numbers	Sequences of siRNA	Sequences of DNA
siRNA 1	GCCTCAGTGCCACTTGACA	I : 5' GATCCCGCCTCAGTGCCACTTGACATTGATATCCGT GTCAAGTGGCACTGAGGCTTTTTTCCAAC 3'
siRNA 2	CGTGAGAGAATCTGCCTGT	II : 5' TCGAGTTGGAAAAAGCCTCAGTGCCACTTGACAC GGATATCAATGTCAAGTGGCACTGAGGCGG 3' I : 5' GATCCCGTGAGAGAATCTGCCTGTTTGATATCCGA CAGGCAGATTCTCTCACGTTTTTTCCAAC 3'
siRNA 3	TTGACCTCAGCTGCACATT	II : 5' TCGAGTTGGAAAAACGTGAGAGAATCTGCCTGTC GGATATCAAACAGGCAGATTCTCTCACGGG 3' I : 5' GATCCCTTGACCTCAGCTGCACATTTTGATATCCGA ATGTGCAGCTGAGGTCAATTTTTTCCAAC 3'
Negative	TTCTCCGAACGTGTCACGT	II : 5' TCGAGTTGGAAAAATTGACCTCAGCTGCACATTC GGATATCAAAATGTGCAGCTGAGGTCAAGG 3' I : 5' GATCCCGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAA CGTGACACGTTCCGAGAATTTTTTCCAAA 3'
PCR primers		II : 5' AGCTTTTGAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTTTC TCTTGAAACGTGACACGTTCCGAGAACGG 3'
Real-time PCR primers	β -actin	F 5' TACGATACAAGGCTGTTAGAGAG 3' R 5' TAGAAGGCACAGTCGAGG 3'
	G6PD	F 5' CCTGTACGCCAACACAGTGC 3' R 5' ATACTCCTGCTTGCTGATCC 3' F 5' CTGACCTACGGCAACAGATACAA 3' R 5' TGCCCTCATACTGGAAACCC 3'

1.2.2 有效 siRNA 序列的筛选. 接种 A375 细胞至 6 孔板中, 培养 24 h, 贴壁细胞密度达到 80%, 换新鲜 DMEM +10% FBS 的培养基. 取 6 支 Eppendorf 管, 其中 3 管按照每孔 250 μ l 加入 Opti-MEM, 再加入 4 μ g 的质粒 DNA, 另外 3 管按照每孔 250 μ l 加入 Opti-MEM, 再加入 10 μ l 的

LipofectamineTM 2000, 静置 5 min 后将 2 种液体混合, 静置 20 min, 滴加到细胞液中, 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 孵箱培养 48 h 后, 提取 Total RNA, 经 MMLV 反转录酶合成 cDNA 后, 以 β -actin 为内参照, 荧光实时定量 PCR 检测干扰效率. β -actin 和 G6PD 的循环条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 10 s, 57 $^{\circ}$ C 15 s,

85.5℃ 收集荧光 5 s, 共 35 个循环. 每个样品 G6PD 基因浓度除以其 β -actin 基因浓度, 即为此样品的相对含量.

1.2.3 病毒的包装、生产和滴度测定. 慢病毒包装质粒混合物和 siRNA1 慢病毒穿梭质粒共转染 293T 细胞, 24 h 换为含 10%FBS 的 DMEM 培养液, 48 h 收集细胞, 5 000 r/min 离心 5 min, 0.45 μ m 的 PVDF 膜过滤上清, 用作待测病毒液. 接种 293T 细胞至 96 孔板中, 以 1×10^8 cfu/L(病毒集落形成单位, Colony forming unit, cfu) 的标准病毒液为对照, 两组样品按感染复数(multiplicity of infection, MOI) 值分为 5 个梯度: 1、3、5、10 和 20; 感染 24 h 经荧光显微镜观察绿色荧光强度和数量以确定病毒滴度.

1.2.4 病毒颗粒感染 A375 细胞并筛选稳转细胞株. 接种生长状态良好的 A375 细胞至 6 孔板, 用无抗生素、含 10%FBS 的 DMEM 培养基, 37℃ 和 5%CO₂ 培养至 70%~80% 的细胞贴壁. 加入病毒液缓慢混匀, 24 h 换液, 96 h 用 G418 (浓度为 500 mg/L) 筛选, 192 h 挑出单克隆, 转移到 24 孔板, 1 天后改用含抗生素的培养基, 当 70% 的细胞贴壁时, 转移到 6 孔板中再培养. 荧光显微镜观察 A375 细胞克隆生长良好, 逐步放大培养; 反复冻存细胞观察其荧光表达是否稳定.

1.2.5 siRNA 干扰效率及 G6PD 活性测定. Western blotting 检测 G6PD 表达: 50 μ g 的总蛋白经 10% SDS-PAGE 胶, 60mA 恒流 4~5 h 分离, 经转膜、封闭和抗体孵育, 通过 KC™ 化学发光和 X 光胶片曝光, ImageJ 软件定量分析特异条带, 确定 siRNA 干扰效率. 紫外分光光度法测定 340 nm 时, 一定量总蛋白中 G6PD 在单位时间内将 NADP⁺ 转变为 NADPH 的量来确定 G6PD 酶活性^[10].

1.2.6 A375-G6PD Δ 稳转细胞的功能检测.

MTT 法(噻唑蓝比色法)测定生长曲线. 接种

A375-G6PD Δ 和 A375-WT 细胞每孔 3×10^4 /ml 于 24 孔板中, 以培养液为空白对照, 置酶联检测仪上测定 490 nm 吸光度值. 每天测定 3 个孔, 共记录 10 天. 平板克隆试验测定细胞增殖能力. 取对数生长期细胞作梯度倍数稀释, 按每孔 2 000、1 000、500、250、125、62.5 个细胞密度, 分别接种于 6 孔板中, 静止培养 10 天. 当出现肉眼可见克隆时, 姬姆萨染色 20 min, 倒置平板于带网格的透明胶片上, 计数克隆.

流式细胞仪(FCM, Flow cytometry) 碘化丙啶(propidium iodide, PI) 染色检测细胞凋亡. 1×10^6 细胞经 PBS 洗涤, 70%乙醇固定, PI 染色 30 min, 上机检测. 每一样品收集 10 000 个细胞, 分析 DNA 含量, Coulter Wincycle 软件处理数据. 分析指标: a. 细胞凋亡 (Apo, apoptosis). DNA 直方图上, 二倍体 G0/G1 细胞峰前出现的亚二倍体 DNA 含量的细胞峰为 Apo 峰; b. S 期细胞比率 (SPF, S-phase fraction): $SPF(\%) = [S / (G0/G1 + S + G2/M)] \times 100\%$; c. 增殖指数 (proliferation index, PI). $PI(\%) = [(S + G2/M) / (G0/G1 + S + G2/M)] \times 100\%$. 流式细胞仪检测凋亡相关蛋白 P53、Bcl-2 和 Caspase-3. 单细胞悬液 1×10^6 经 PBS 洗涤, 70%乙醇固定, Triton-X 100 和 Rnase 破膜 15 min 后, 加入 P53、Bcl-2 和 Caspase-3 的单克隆抗体 10 μ l 孵育 20 min, 用 PBS 在 1 500 r/min 洗涤 2 次, 再加入二抗(H+L)-PE 20 min, 洗涤后上机检测^[11].

1.2.7 统计学方法. 实验数据用($\bar{x} \pm s$)表示, 进行 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 siRNA 阳性重组子的筛选与鉴定

阳性质粒 DNA 经 PCR 扩增后可得包括插入 siRNA 片段的产物 316 bp(图 1a); 测序结果与设计的序列一致, 图 1b 示 siRNA1 的测序.

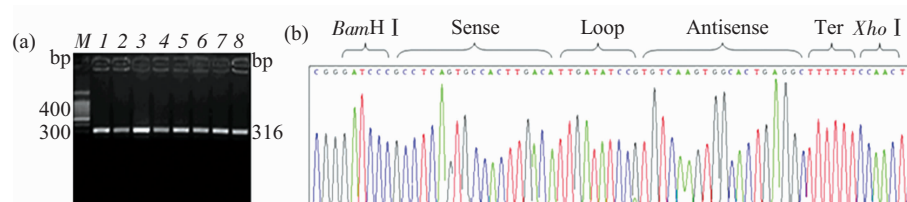


Fig. 1 Identification of siRNA positive recombinant

(a) DNA fragments with siRNA sequences were obtained by PCR. M: 100 bp DNA Ladder. 1, 2: PCR product of siRNA1; 3, 4: PCR product of siRNA2; 5, 6: PCR product of siRNA3; 7, 8: PCR product of siRNA-negative. (b) siRNA1 positive recombinants were sequenced with plasmid vector primers. Sense: Sense strand of siRNA1. Antisense: Antisense strand of siRNA1. Ter: RNA Poly III transcriptional termination site.

2.2 有效 siRNA 干扰序列的筛选

提取 4 个不含内毒素的表达质粒 DNA (图 2a), 分别转染 A375 细胞, 24 h 转染效率约为 50%, 48 h 提取 Total RNA, 以 β -actin 为内参照, Real-time

PCR 检测 G6PD 表达. 一号质粒转染的细胞内源性 G6PD 表达是未转染细胞的 51% (图 2b), 即 49% 的 G6PD 被 siRNA 抑制, 故选用一号质粒进行后续实验.

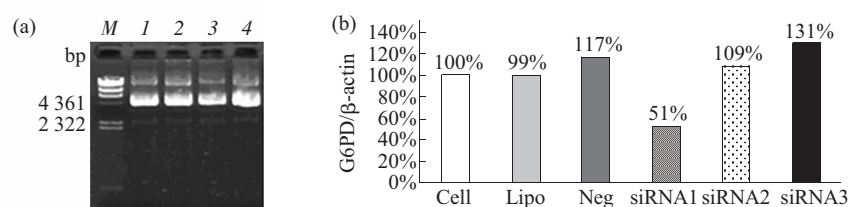


Fig. 2 Screening of effective siRNA sequences

(a) Extraction of plasmid DNA. M: λ /Hind III DNA marker. 1~3: G6PD-p-siRNA 1~3; 4: G6PD-p-siRNA-negative. (b) Results of siRNA interference of G6PD expression using real-time PCR. Cell: No siRNA plasmid transfection; Lipo: Lipofectamine-only transfection; Neg: Negative control sequence transfection; siRNA1~3: siRNA1, siRNA2 and siRNA3 sequences transfection.

2.3 病毒颗粒感染 A375 细胞和稳转细胞株的筛选

慢病毒包装质粒混合物和 siRNA1 慢病毒穿梭质粒共转染 293T 细胞, 24 h 后待测病毒液滴度为 1.0×10^8 cfu/L. 用病毒液感染 A375 细胞, 48 h 出现荧光, 细胞状态良好, 贴壁细胞约为 80%, 96 h 感染效率接近 100%, 经 G418 ($600 \mu\text{mol/L}$) 筛选, 192 h 挑出单克隆细胞, 逐步放大培养, 经反复冻融和传代, 荧光表达稳定 (图 3a, b).

2.4 siRNA 干扰效率的检测

Western blotting 测得 A375-WT 细胞 G6PD 表达量为 2.301 ± 0.285 , 而 A375-G6PD Δ 细胞为 0.257 ± 0.074 , 是 A375-WT 的 11.17% ($P < 0.01$)

(表 2, 图 4a, b), 故 siRNA 干扰效率为 88.83%. 结果来自于 3 次测定.

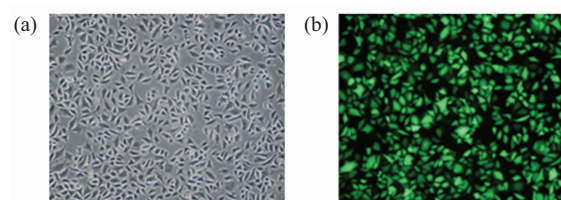


Fig. 3 Stable A375 cell strain with siRNA silencing G6PD expression

(a) Stable A375 cells under an optical microscope with 10 $\times$ magnification. (b) Stable A375 cells under a fluorescence microscope with 10 $\times$ magnification.

Table 2 Relative amount of G6PD expression with Western blotting

A375	Sample	β -actin	G6PD	G6PD/ β -actin	$\bar{x} \pm s$	Percentage
Wild type	Cell1	1 372	2 746	2.001	2.301 ± 0.286	100%
	Cell2	1 255	2 925	2.331		
	Cell3	1 221	3 138	2.570		
Stable cell with siRNA	siRNA1	1 237	321	0.259	$0.257 \pm 0.074^{1)}$	11.17%
	siRNA2	1 231	406	0.330		
	siRNA3	1 375	250	0.182		

¹⁾ $P < 0.01$, vs A375-WT, $\bar{x} \pm s$.

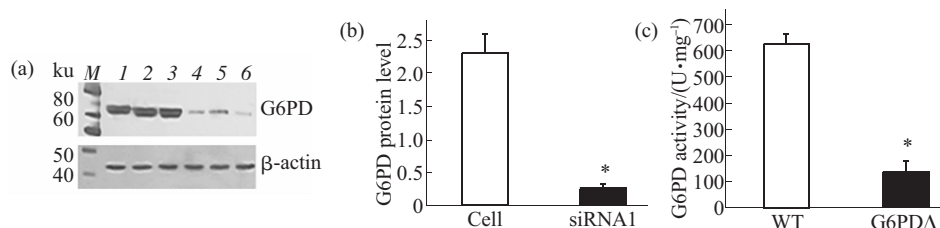


Fig. 4 Identification of G6PD silencing A375 cells

(a) Western blotting analysis with antibodies to human G6PD (upper panel) and β -actin (lower panel). 1~3: A375-WT; 4~6: G6PD silencing A375 cells. (b) The relative amount of G6PD expression by the image analysis software ImageJ. (c) The G6PD activity. The photographs showed here are representative of three experiments. Compared with A375-WT, * $P < 0.01$.

2.5 A375-G6PDA 细胞的功能检测

2.5.1 细胞增殖能力. 从生长曲线可知 A375-G6PDΔ 和 A375-WT 细胞的对数生长期为接种后的 5~9 天, 但 G6PDΔ 细胞倍增时间延长, 生长速率

明显下降, 增殖受到抑制. 与 A375-WT 相比, 在培养的第 5~9 天, G6PDΔ 细胞数量减少了 24.4%~37.5% (图 5a), 平均克隆形成率降低了 25% ($P<0.05$) (图 5b, 表 3).

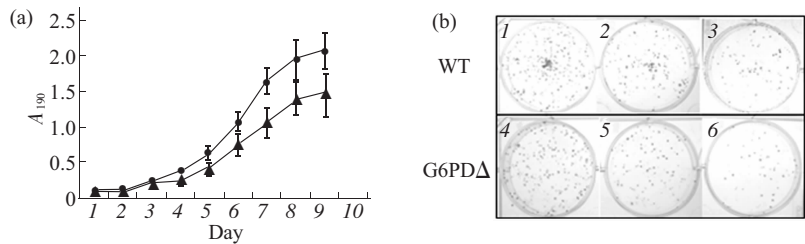


Fig. 5 Cell proliferation assay of A375-WT and A375-G6PDA cells

(a) The growth curve of A375-WT and A375-G6PDA cells. ●—●: A375-WT; ▲—▲: A375-G6PDA. (b) Colony formation of A375-WT and A375-G6PDA cells with Giemsa staining. Dish 1 and dish 4: Seed cell number with 250; Dish 2 and dish 5: Seed cell number with 125; Dish 3 and dish 6: Seed cell number with 62.5.

Table 3 Clone forming efficiencies of A375-WT and A375-G6PDA cells

Seed cell number	A375-WT		A375-G6PDA	
	Clone number	Clone forming efficiency/%	Clone number	Clone forming efficiency/%
250	272	108.8	213	85.2
125	154	123.2	123	98.4
62.5	84	134.4	57	91.2
$\bar{x} \pm s$		122.13 $\pm$ 12.83		91.6 $\pm$ 6.61 ¹⁾

¹⁾ $P<0.05$, vs A375-WT, $\bar{x} \pm s$.

2.5.2 细胞周期和细胞凋亡分析. DNA 组分分析显示, A375-G6PDΔ 的凋亡细胞数是 A375-WT 的 2.86 倍 ($P<0.01$), SPF 比 A375-WT 增加了 33.8% ($P<0.05$), PI 增加了 59.7% ($P<0.01$), G0/G1 期下降了 27.7% ($P<0.05$) (图 6, 表 4). 凋亡相关蛋白分析: A375-G6PDΔ 细胞的 P53 蛋白表达为(47.9 ± 8.5)%, 与 A375-WT 细胞(21.7 ± 4.7)% 相比下降 54.7% ($P<0.01$); Caspase-3 的表达是(28.5 ± 5.8)%, 比 A375-WT(8.9 ± 2.6)% 增加 2.2 倍($P<0.01$); Bcl-2 表达(36.18 ± 6.60)% 虽下降 21.7%, 但与 A375-WT (28.34 ± 5.20)% 相比, 无统计学意义($P>0.05$).

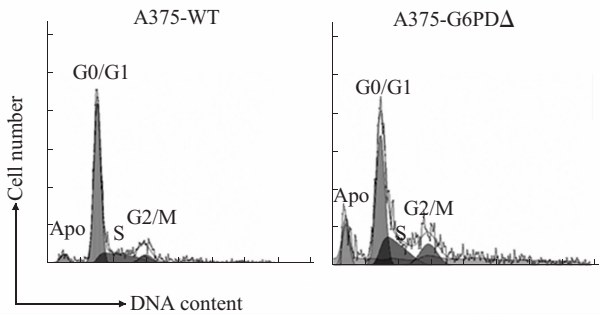


Fig. 6 Cell cycle analysis of A375-WT and A375-G6PDA cell by flow cytometry

Apo: apoptosis peak; S: S-phase; G0/G1: G0/G1 phase; G2/M: G2/M phase.

Table 4 Results of cell cycle analysis in A375-WT and A375-G6PDA cell with PI staining

Cell	n	Apo	SPF	PI	G0/G1
A375-WT	6	2.79 $\pm$ 0.13	22.2 $\pm$ 1.8	30.0 $\pm$ 3.1	70.0 $\pm$ 5.6
A375-G6PDA	6	7.99 $\pm$ 0.24 ¹⁾	29.7 $\pm$ 2.3 ²⁾	49.5 $\pm$ 2.9 ¹⁾	50.5 $\pm$ 4.5 ¹⁾

¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.05$, vs A375-WT, $\bar{x} \pm s$.

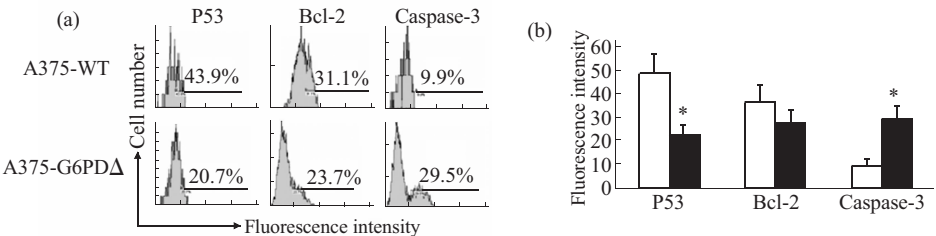


Fig. 7 P53, Bcl-2 and Caspase-3 expression analysis of A375-WT and A375-G6PDA cells

(a) Expression of P53, Bcl-2 and Caspase-3 in A375-WT and A375-G6PDA cell by flow cytometry analysis. (b) □: A375-WT; ■: A375-G6PDA. The results represent means of triplicates. Compared with A375-WT, * $P<0.01$.

3 讨 论

迄今为止,文献报道的 G6PD 缺陷细胞有三个来源,均不是人的肿瘤细胞. 其一是 G6PD 缺陷的 CJ7 小鼠胚胎干细胞 (CJ7 G6PD Δ ES), 由 Filosa 实验室采用 Cre/lox 系统介导的位点特异性重组技术,在 G6PD-Loxed 中瞬时表达 Cre 重组酶获得^[12],并用于氧化性损伤及其机理的研究^[13]. 第二是 Pandolfi 等从小鼠 129sv 噬菌体基因组文库中分离得到目的基因,构建阳性和阴性选择载体,经电穿孔法转入 ABI ES 细胞,筛选后从 156 个单克隆中找到“G6PD null ES cells”,其 G6PD 表达活性是正常对照的 14%^[14],用于 G6PD 严重缺陷引起的溶血性疾病基因治疗的研究^[15]. 第三个 G6PD 缺陷的细胞是中国仓鼠卵巢细胞 E89 或 E48 (Chinese hamster ovary cell, CHO),由 Stamato 等^[16]从含 G6PD 突变体的 CHO 细胞筛选得到,其活性约为 CHO K1 (野生型) 的 10%,用于电离辐射损伤及其机理研究^[17].

基因敲除(Gene knockout)技术难度较高、操作复杂且周期长. 自从 Fire 和 Mello 等^[18]发现 RNAi 作用机制后,利用 RNAi 能有效抑制体外培养细胞中靶基因的表达(如果蝇细胞、小鼠胚胎细胞和人 HeLa 细胞等)^[19~21]. 因该技术具有快速、经济和简便的特点,所以广泛应用于基因功能的研究.

本文以无关序列作对照,从针对人 G6PD 基因的 3 条 siRNA 中筛选出一条有效沉默 A375 细胞内源性 G6PD 表达的序列,并用慢病毒包装系统成功构建了 G6PD 缺陷型 A375 稳转细胞株 (A375-G6PD Δ). 与 A375-WT 相比, A375-G6PD Δ 内源性 G6PD 表达被沉默了 88.83%, G6PD 活性减少了 78.5%,但仍然可以存活. 然而, A375-G6PD Δ 细胞生长速度明显减慢,单细胞克隆形成能力降低,凋亡细胞数增加,提示 G6PD 缺陷可明显抑制肿瘤细胞的生长和增殖. 细胞周期分析表明 G0/G1 期降低, S 期增高 (SPF 增加), G2/M 期亦增加 (PI 增加),推测 G6PD 缺陷可能抑制了 G2/M 期向 G0/G1 期转换的进程. 在有丝分裂的 M 期,合成后的遗传物质不能精确等分到 2 个子细胞中,使细胞停滞在 G2/M 期,累积到一定程度有可能抑制 S 期向 G2/M 的转换,其机理还需进一步探讨.

细胞凋亡是一系列基因调控的细胞主动死亡过程,在多数细胞中, P53 与 Bcl-2 和 Caspase 蛋白家族都是重要调节因子,通过其相互联系和作用来

调控细胞凋亡. 在人 A375, 凋亡的发生与 P53 蛋白、Bax/Bcl-2 的比值以及 Caspase-3 的激活密切相关^[22, 23]. P53 基因有野生型和突变型,前者是抑癌基因,其表达蛋白半衰期仅 6~10 min,难以被检测;后者是癌基因,其表达蛋白半衰期是 4~8 h,正是此研究检测到的 P53 蛋白. 当沉默人 A375 细胞内源性 G6PD 表达后, P53 蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$),可能是 A375 凋亡细胞数增加的原因之一. 此外,有学者认为 Bcl-2 通过抑制氧自由基的产生而有抗凋亡作用^[22]. G6PD 缺陷使 GSH 减少,氧自由基清除障碍而集积,推测 A375-G6PD Δ 的 Bcl-2 蛋白下降不明显可能与清除过多的氧自由基有关. Park 等^[23]用 Caspase-3 抑制剂可阻止 A375 细胞凋亡的发生,故认为 Caspase-3 激活和表达增加是 A375 细胞凋亡的主要因素. 然而,本研究中看家基因表达蛋白 G6PD 缺陷引起 Caspase-3 表达明显增加的机理尚需进一步研究.

总之,本研究建立了 G6PD 缺陷的人黑色素瘤细胞模型,发现 G6PD 缺陷可能通过下调 P53 蛋白表达和上调 Caspase-3 的表达,诱发 A375 细胞凋亡,将细胞周期阻断在 G2/M 期.

致谢 感谢昆明医学院细胞生物学教研室何永蜀副教授和昆明医学院皮肤病学教研室李晓岚副教授对本文初稿的审阅和提出的宝贵意见.

参 考 文 献

- 1 Lusini L, Tripodi S A, Rossi R, *et al.* Altered glutathione antioxidant metabolism during tumor progression in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer*, 2001, **91** (1): 55~59
- 2 Lewandowicz G M, Britt P, Elgie A W, *et al.* Cellular glutathione content, *in vitro* chemo response, and the effect of BSO modulation in samples derived from patients with advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2002, **85** (2): 298~304
- 3 Kuo W Y, Lin J Y, Tang K T. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene transforms NIH 3T3 cells and induces tumors in nude mice. *Int J Cancer*, 2000, **85** (6): 857~864
- 4 Cheng A, Chiu D T, See L C, *et al.* Poor prognosis in nasopharyngeal cancer patients with low glucose-6-phosphate-dehydrogenase activity. *Jpn J Cancer Res*, 2001, **92**(5): 576~581
- 5 Frederiks W M, Van Marle J, Van Oven C, *et al.* Improved localization of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cells with 5-cyano-2,3-ditolyl-tetrazolium chloride as fluorescent redox dye reveals its cell cycle-dependent regulation. *J Histochem Cytochem*, 2006, **54**(1): 47~52
- 6 Ohl F, Jung M, Radonic A, *et al.* Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies of

- human bladder cancer. *J Urol*, 2006, **175**(5): 1915~1920
- 7 Ohl F, Jung M, Xu C, *et al.* Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization. *J Mol Med*, 2005, **83** (12): 1014~1024
 - 8 张德太, 胡丽华, 杨渝珍, 等. 脱氢表雄酮对体外培 Burkitt 淋巴瘤细胞抗氧化能力影响的研究. *医学研究生学报*, 2005, **18** (9): 776~783
Zhang D T, Hu L H, Yang Y Z, *et al.* *Journal of Medical Postgraduates*, 2005, **18** (9): 776~783
 - 9 张德太, 胡丽华, 杨渝珍. 去氢表雄酮及 G6PD 反义寡核苷酸对 Raji 细胞的某些影响. *中国病理生理杂志*, 2006, **22** (12): 2397~2400
Zhang D T, Hu L H, Yang Y Z. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2006, **22** (12): 2397~2400
 - 10 杨银峰, 朱月春, 李鸿钧, 等. 云南阿昌族 G6PD 突变 G487A 在 DF213 中的表达. *生物物理学报*, 2007, **23** (1): 20~27
Yang Y F, Zhu Y C, Li H J, *et al.* *Acta Biophysica Sinica*, 2007, **23** (1): 20~28
 - 11 Morgan E, Varro R, Sepulveda H, *et al.* Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clin Immunol*, 2004, **110** (3): 252~266
 - 12 Filosa S, Fico A, Paglialunga F, *et al.* Failure to increase glucose consumption through the pentosephosphate pathway results in the death of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene-deleted mouse embryonic stem cells subjected to oxidative stress. *Biochem J*, 2003, **370** (pt3): 935~943
 - 13 Flco A, Paglialunga F, Cigliano L, *et al.* Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a crucial role in protection from redox-stress-induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 2004, **11** (8): 823~831
 - 14 Pandolfi P P, Sonati F, Rivi R, *et al.* Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *EMBO J*, 1995, **14** (21): 5209~5215
 - 15 Rovira A, Angioletti M D, Camacho-Vanegas O, *et al.* Stable *in vivo* expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and rescue of G6PD deficiency in stem cells by gene transfer. *Blood*, 2000, **96** (13): 4111~4117
 - 16 Tuttle S, Stamato T, Perez M, *et al.* Glucose-6-phosphate dehydrogenase and the oxidative pentose phosphate cycle protect cells against apoptosis induced by low doses of ionizing radiation. *Radiation Research*, 2003, **153** (6): 781~787
 - 17 Stamato T D, Richardson E, Ianacone J, *et al.* Isolation and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient Chinese hamster cells derived from pure mutant colonies. *Mutagenesis*, 1989, **4** (4): 259~264
 - 18 Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, **391** (6669): 806~811
 - 19 Hammond S M, Bernstein E, Beach D, *et al.* An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 2000, **404** (6775): 293~296
 - 20 Grabarek J B, Wianny F, Plusa B, *et al.* RNA interference by production of short hairpin dsRNA in ES cells, their differentiated derivatives, and in somatic cell lines. *Biotechniques*, 2003, **34** (4): 734~736
 - 21 Hossbach M, Gruber J, Osborn M, *et al.* Gene silencing with siRNA duplexes composed of target-mRNA-complementary and partially palindromic or partially complementary single-stranded siRNAs. *RNA Biology*, 2006, **3** (2): 82~89
 - 22 Yu F, Watts R N, Zhang X D, *et al.* Involvement of BH3-only proapoptotic proteins in mitochondrial-dependent Phenoxodiol-induced apoptosis of human melanoma cells. *Anticancer Drugs*, 2006, **17**(10): 1151~1161
 - 23 Park B C, Bosire K O, Lee E S, *et al.* Asiatic acid induces apoptosis in SK-MEL-2 human melanoma cells. *Cancer Lett*, 2005, **218** (1): 81~90

Effects of Silencing G6PD Expression on The Growth and Apoptosis in Human Skin Melanoma*

ZHU Yue-Chun**, LÜ Hui-Ru, LI Dan-Yi, TONG Shu-Fen

(Department of Biochemistry, Kunming Medical College, Kunming 650031, China)

Abstract Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) derives from the expression of the house-keeping gene G6PD. Recent studies have indicated that G6PD is related to tumor genesis, growth, clinical phenotype, therapy, and prognosis. To elucidate the relationship between G6PD and cancer, three siRNA sequences and one negative control sequence were designed based on the 3' noncoding region of the human G6PD gene. Two complementary single-strand DNA (sense and antisense) were designed and synthesized based on siRNA sequences. The DNA fragments were annealed and ligated to the GFP expression vector pRNAT-U6.2/Lenti. One siRNA with higher interference efficiency than the other two was found after siRNA plasmid transfecting human skin A375 melanoma cells. After lentivirus particle packaging and virus production, the A375 cells were infected, and the single cell clone was acquired and cultured to establish the stable cell strain. Western blotting showed that the endogenous G6PD in the stable A375 cell strain was 0.257 ± 0.074 , which was 11.17% of G6PD expression (2.301 ± 0.286) in wild type A375 cells. The final siRNA interference efficiency in this stable cell strain was 88.83%. The G6PD activity of A375-G6PD Δ was 21.53% of A375-WT. Further study showed that A375-G6PD Δ doubling generation time prolonged, and its proliferation was greatly inhibited and the cloning efficiency lowered 25% ($P < 0.05$), compared with A375-WT cell. FCM analysis indicated that apoptosis cell in A375-G6PD Δ was 2.86 times as that of A375-WT ($P < 0.01$) with 33.8 % increase of SPF ($P < 0.05$), 59.7 % raise of PI ($P < 0.01$), and 27.7 % decrease of G0/G1 phase ($P < 0.01$). Furthermore, apoptosis-associated protein check showed that Caspase-3 was 2.86 times as that of A375-WT ($P < 0.01$) with 54.7% descend of P53 ($P < 0.01$). It is proposed that G6PD can maintain the growth and proliferation of A375 cell. G6PD deficiency probably restrains the change proceeding of G2/M phase to G0/G1 phase in A375 Δ cell cycle through down-regulation P53 expression and up-regulation Caspase-3 expression. The role and mechanism of G6PD in cell growth, proliferation, and differentiation of tumor cells need to be further investigated.

Key words siRNA interference, glucose-6-phosphate dehydrogenase, human skin melanoma, stable cell strain, cell cycle, P53, Caspase-3

*This work was supported by a grant from The National Science Foundation of China (30460049).

**Corresponding author . Tel: 86-871-5338911, Fax: 86-871-5332390, E-mail: yzh399@yahoo.com

Received: January 8, 2008 Accepted: February 25, 2008