

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.02.005

Pokemon 基因在肝癌细胞中的表达及意义

赵心恺^{1,2}, 宁巧明², 孙晓宁², 田德安¹

Pokemon Gene Expression in Hepatoma Cells and Its Significance

Zhao Xinkai^{1,2}, Ning Qiaoming², Sun Xiaoning², Tian Dean¹

1. Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Department of Gastroenterology, Hainan Provincial People's Hospital

Corresponding Author: Tian Dean, E-mail: TianDA1971@163.com

Abstract: Objective To research pokemon expression in hepatoma cells and apoptosis of liver cancer cells through down-regulation of Pokemon Gene. **Methods** Pokemon expression was detected by western blot assay in hepatoma cellular lines HepG2, SMMC7721 and human embryonic stem cells LO2 cell lines. Pokemon gene silencing was induced by siRNA inhibition and then apoptosis of hepatoma cells was analyzed by flow cytometry. **Results** Pokemon expressions in HepG2 and SMMC7721 were significantly higher than those in human fetal liver cells LO2. siRNA inhibition of the expression of Pokemon triggered apoptosis of the liver cancer cells. **Conclusion** Proto-oncogene Pokemon expression in liver cancer cells was significantly increased, and played an important role in hepatocellular carcinoma development.

Key words: Pokemon; Hepatocellular carcinoma(HCC); Gene silencing

摘要:目的 探讨 Pokemon 在肝癌细胞中的表达及意义,进一步阐明肝细胞癌发生发展过程中的分子机制。**方法** 选择肝癌细胞 HepG2、SMMC7721 和人胚胎肝细胞 LO2 细胞株,应用 Western blot 法检测 Pokemon 在不同细胞中的表达;应用基因沉默方法抑制 Pokemon 在肝癌细胞中的表达,应用流式细胞仪观察肝癌细胞的凋亡情况。**结果** Pokemon 在肝癌细胞 HepG2、SMMC7721 中的表达明显高于人胚胎肝细胞 LO2;siRNA 抑制 Pokemon 的表达后,肝癌细胞凋亡明显增加。**结论** 原癌基因 Pokemon 在肝癌细胞中表达明显增高, Pokemon 可能在肝癌的发生、发展过程中起重要作用。

关键词: Pokemon 基因;肝细胞癌;基因沉默

中图分类号:R730.231+.3;R735.7 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2012)02-0137-03

0 引言

近来研究^[1-4]表明, Pokemon 基因作为 POK 家族转录抑制因子的一员,可能位于多种癌基因的上游,在某些癌基因引起细胞恶性转化的过程中起关键作用,但它在肿瘤发生发展中的详细作用机制及在肝癌中作用和意义尚不清楚。因此,我们从细胞学水平研究分析 Pokemon 基因在肝癌细胞中的表达及其对肝癌细胞凋亡的影响,探讨 Pokemon 基因在肝癌细胞中的表达及意义。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人肝癌细胞株 HepG2、SMMC7721、人胚胎肝

细胞株 LO2 购自中国科学院上海生物所细胞库。细胞培养在 RPMI 1640 培养液中,常规加入 10% 胎牛血清(FBS),在 5%CO₂ 培养箱中 37℃ 培养。

1.2 核蛋白提取及 Western blot 检测

NE-PER[®] Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (PIERCE)参照说明书进行操作。Western blot 采用化学发光法(PIERCE Biotecology)和放射自显影进行检测。

1.3 Pokemon 的 RNA 干扰

Pokemon 小分子干扰核糖核酸 (siRNA: 5'-GCUGGACCUUGUAGAUCAA-3'购自上海生工)转染入肝癌细胞 HepG2、SMMC7721 中。首先将处于对数生长期的细胞以 3.0×10^6 个/孔铺于 6 孔板中,待到细胞融合至 80%~90% 时进行转染。转染时取 10 μ l 的 Lipofectamine 2000 与 4 μ g siRNA 分别加入到 250 μ l 的 OPTI-MEM 中,混匀后室温孵育 30 min,再将混合液加入每个孔中,37℃、5% CO₂ 孵育 4 h 后换用含有 10% 胎牛血清的培养液培养。转染后 48 h 提取细胞中总蛋白, Western blot 检测 Pokemon 蛋白的表达。

收稿日期:2011-05-07;修回日期:2011-09-12

基金项目:海南省卫生厅科研立项资助课题(琼卫 2010-8)

作者单位:1. 430030 武汉,华中科技大学同济医学院同济医院消化内科;2. 海南省人民医院消化内科

通信作者:田德安, E-mail: TianDA1971@163.com

作者简介:赵心恺(1971-),男,博士在读,副主任医师,主要从事肝硬化及重症肝病的研究工作

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数生长期的细胞以 3×10^5 个/孔接种 6 孔板,待细胞融合达到 80%~90%时,胰酶消化收集细胞。进行细胞凋亡检测时,PBS 细胞洗 3 次,加入 10 μ l 的 Annexin V 混匀后避光保存 30 min,再加入 5 μ l 的 PI,立即上机检测。

1.5 统计学方法

用 SPSS11.0 进行数据处理,采用均数 \pm 标准误差表示,同一组变量比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA),组间两两比较采用 SNK 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Pokemon 蛋白在 HepG2、SMMC7721 和 LO2 中的表达

Western blot 显示肝癌细胞中 Pokemon 蛋白表达明显高于胚胎肝细胞 LO2,两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 1。

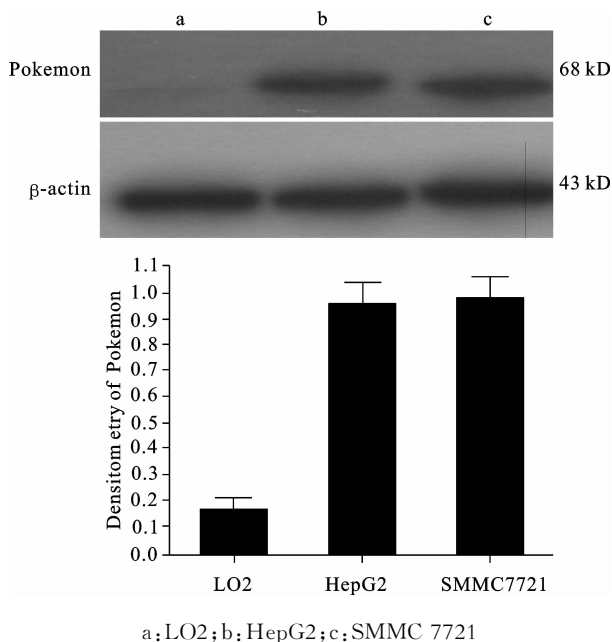


图 1 Pokemon 蛋白在 LO2、HepG2、SMMC7721 细胞株中的表达
Figure 1 Pokemon protein expression in LO2, HepG2 and SMMC7721 cell lines

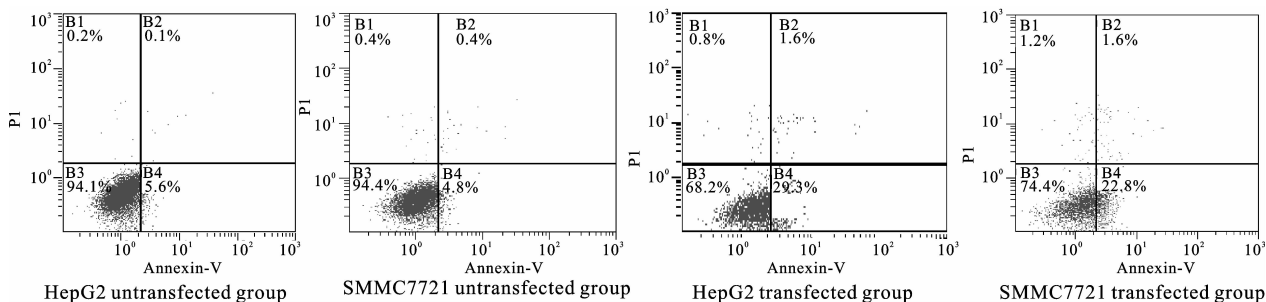
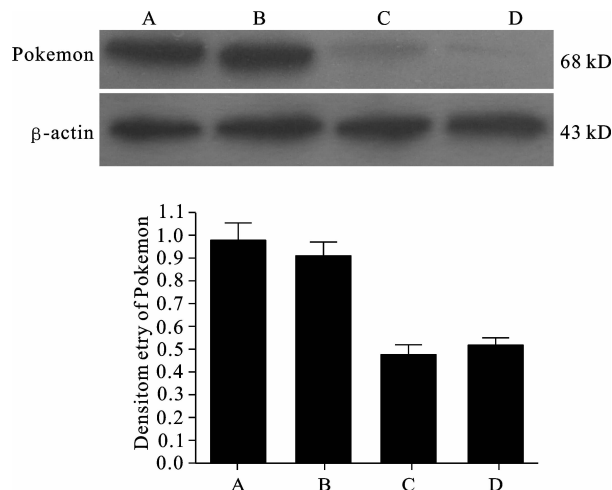


图 3 siRNA 抑制 Pokemon 对 HepG2、SMMC7721 细胞凋亡的影响
Figure 3 siRNA Pokemon induces apoptosis of HepG2 and SMMC7721 cells

2.2 siRNA 抑制 Pokemon 后肝癌细胞的凋亡状况

2.2.1 Western blot 检测结果 Western blot 显示转染 48 h 后 HepG2 和 SMMC7721 细胞中 Pokemon 蛋白的表达明显下调 ($P < 0.05$),见图 2。



A; HepG2 untransfected group; B; SMMC7721 untransfected group; C; HepG2 transfection group; D; SMMC7721 transfection group; C vs. A, D vs. B, $P < 0.05$
图 2 Pokemon 蛋白在 HepG2、SMMC7721 及其转染组中的表达
Figure 2 Pokemon protein in HepG2 and SMMC7721 group (transfected or untransfected)

2.2.2 siRNA 抑制 Pokemon 对 HepG2、SMMC7721 细胞凋亡的影响 siRNA 转染 HepG2、SMMC7721 细胞后 48 h 通过流式细胞仪检测及软件分析显示, siRNA 转染组细胞凋亡率显著增加,分别为 $(39.65 \pm 3.75)\%$ 和 $(33.21 \pm 3.66)\%$,明显高于未转染组细胞的凋亡率 $[(5.07 \pm 0.46)\%、(5.71 \pm 0.83)\%]$ ($P < 0.05$)。阴性对照组细胞之间的凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 3。

3 讨论

Pokemon^[1-4] 基因即 POK 红系髓性致癌因子 (POK erythroid myeloid Ontogenic factor),也被称为 LRF, OCZF, FBI-1,是被发现的第一个 ARF 特异

性转录抑制物,通过 ARF-p53 路径对肿瘤的发生发展进行调解。Pokemon 不仅与胚胎的发育和细胞的分化有关,而且通过作用于一些抑癌基因和原癌基因而发挥作用^[5-12]。

Maeda 等^[1]研究发现原癌基因 pokemon 通过特异抑制 P14^{ARF} 转录来调控细胞周期、诱导肿瘤发生,但同时认为 pokemon 可能还通过作用于其他目的基因而阻遏肿瘤细胞凋亡。

综上所述,我们推测原癌基因 pokemon 与肝癌的发生发展有一定的相关性,为此我们设计了这一研究。

首先,我们检测了肝癌细胞和正常肝脏胚胎细胞中原癌基因 pokemon,结果显示在肝癌细胞系(HepG2、SMMC7721)中高表达,明显高于人胚胎肝细胞(LO2)中的表达。为了进一步揭示 pokemon 在肝癌中的调控作用,我们应用基因沉默的方法下调 pokemon 的表达,结果发现下调 pokemon 的表达可明显抑制肿瘤细胞的生长,肝癌细胞凋亡明显增加。

在本研究中我们借鉴了近几年来出现的有关 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)的技术在实验中获得成功,为我们下一步的研究奠定了基础。

综合本研究结果提示在肝癌信号网络调控中 pokemon 基因与肝癌的形成密切相关,干扰 pokemon 的表达后可以阻止细胞周期进展,抑制肿瘤细胞增殖,促进细胞的凋亡。有助于我们进一步阐明肝细胞癌发生发展过程中的分子机制。

参考文献:

- [1] Maeda T, Hobbs RM, Merghoub T, et al. Role of the proto-oncogene Pokemon in cellular transformation and ARF repression[J]. *Nature*, 2005, 433 (7023): 278-285.
- [2] Maeda T, Hobbs RM, Pandolfi PP. The transcription factor Pokemon; a new key player in cancer pathogenesis[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(19): 8575-8578.
- [3] Apostolopoulou K, Pateras IS, Evangelou K, et al. Gene amplification is a relatively frequent event leading to ZBTB7A (Pokemon) overexpression in non-small cell lung cancer[J]. *J Pathol*, 2007, 213(3): 294-302.
- [4] Zhao ZH, Wang SF, Yu L, et al. Expression of transcription factor Pokemon in non-small cell lung cancer and its clinical significance[J]. *Chin Med J*, 2008, 121(5): 445-449.
- [5] Lin RJ, Nagy L, Inoue S, et al. Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia[J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 811-814.
- [6] Melnick A, Carlile G, Ahmad KF, et al. Critical residues within the BTB domain of PLZF and Bcl-6 modulate interaction with corepressors[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(6): 1804-1818.
- [7] Adhikary S, Peukert K, Karsunky H, et al. Miz1 is required for early embryonic development during gastrulation[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(21): 7648-7657.
- [8] Chen WY, Zeng X, Carter MG, et al. Heterozygous disruption of Hic1 predisposes mice to a gender dependent spectrum of malignant tumors[J]. *Nature Genet*, 2003, 33(2): 197-202.
- [9] Agrawal A, Yang J, Murphy RF, et al. Regulation of the P14ARF-Mdm2-P53 Pathway: an overview in breast cancer[J]. *Exp Mol Pathol*, 2006, 81 (2): 115 -122.
- [10] Stogios PJ, Downs GS, Jauhal JJ, et al. Sequence and structural analysis of BTB domain proteins[J]. *Genome Biology*, 2005, 6 (10): R82.
- [11] Stogios PJ, Chen L, Privé GG. Crystal structure of the BTB domain from the LRF/ZBTB7 transcriptional regulator[J]. *Protein Sci*, 2007, 16(2): 336-342.
- [12] Davies JM, Hawe N, Kabarowski J, et al. Novel BTB/POZ domain zinc-finger protein, LRF, is a Potential target of the LAZ-3/Bcl-6 oncogene[J]. *Oncogene*, 1999, 18(2): 365-375.

[编辑:刘红武;校对:黄园玲]

[1] Maeda T, Hobbs RM, Merghoub T, et al. Role of the proto-oncogene Pokemon in cellular transformation and ARF repression