

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.03.004

沉默 SEPT9 基因对肝癌 HepG2 细胞增殖及凋亡的影响

曾永秋¹,曹洋²,梅志强³,刘岚¹,税青林¹

Effects of SEPT9 Gene Silencing on Cell Proliferation and Apoptosis of HepG2 Hepatoma Cells

Zeng Yongqiu¹, Cao Yang², Mei Zhiqiang³, Liu Lan¹, Shui Qinglin¹

1. Department of Medical Biology and Genetics, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China, 2. Department of Physiology, 3. Research Centre for Preclinical Medicine

Corresponding Author: Shui Qinglin, E-mail: shuiql889@163.com

Abstract: Objective To explore the relationship between SEPT9 gene and hepatocellular carcinoma, and to reveal the role of SEPT9 in tumorigenesis and development of hepatoma. Methods The expression vector containing SEPT9 gene was transfected into the human hepatoma cell line HepG2 with LipofectamineTM 2000. The transfection efficacy was studied under fluorescence microscopy, and the mRNA and protein levels of SEPT9 were detected with reverse transcript polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot assay. CCK-8 method was used to detect cell proliferation, and FCM was served to detect the cell apoptosis. Results The transfection efficiency was up to 70%, and expression of mRNA and protein of SEPT9 were suppressed significantly. And the result of CCK-8 assay showed significantly inhibition of in the experiment group, and FCM assay showed that the apoptotic rate in the experiment group increased significantly comparing to the control group ($P < 0.05$). Conclusion Suppression of the expression of SEPT9 gene can effectively inhibit the proliferation of HepG2 cell, and promote apoptosis significantly.

Key words: SEPT9 gene; RNAi; HepG2 cell; Cell proliferation; Cell apoptosis

摘要: 目的 探讨 SEPT9 基因与肝癌的关系,进一步揭示 SEPT9 基因在肝癌发生发展过程中的作用。**方法** 将构建的针对 SEPT9 基因的 shRNA 表达载体通过脂质体 LipofectamineTM 2000 转染人肝癌 HepG2 细胞,荧光显微镜下观察细胞的转染效率,RT-PCR、Western blot 法分别检测 SEPT9 mRNA 和蛋白质的表达抑制情况,CCK-8 检测细胞的生长抑制情况,流式细胞术检测细胞凋亡情况。**结果** 荧光显微镜观察细胞的转染效率达到 70% 以上;SEPT9 mRNA 及蛋白表达抑制率均受到明显抑制。CCK-8 法检测结果显示,实验组 HepG2 细胞的生长受到明显抑制;流式细胞术检测结果显示实验组 HepG2 细胞凋亡明显($P < 0.05$)。**结论** 抑制 SEPT9 基因的表达可有效抑制 HepG2 细胞的增殖,并对细胞凋亡有明显的促进作用。

关键词: SEPT9 基因;RNAi;HepG2 细胞;细胞增殖;细胞凋亡

中图分类号:R394.3;R735.7 文献标识码:A

0 引言

Septin(SEPT)是一类广泛存在于真核生物中进化上保守的细胞骨架 GTP 结合蛋白家族,主要参与细胞质分裂^[1-2]、细胞内物质转运^[3]、细胞周期调控及细胞凋亡^[4]等重要生理过程。最近研究发现它与一些人类疾病关系密切^[5],如肿瘤^[6]、神经功能障碍^[7]和病原微生物感染^[8]等。因此,SEPT 家族的功能研究正逐步成为细胞生物学及疾病病理学研究的新热点。

SEPT9 是 SEPT 基因家族成员之一,现有大量研究证实 SEPT9 与肿瘤的关系非常密切。基因芯片结果显示,SEPT9 在乳腺、中枢神经系统、子宫内膜、肾、肝、肺、淋巴、食管、卵巢、胰腺、软组织、皮肤、甲状腺等来源的肿瘤组织中高表达^[9]。但在不同类型的肿瘤中 SEPT9 的表达程度以及功能均有所差异,在肿瘤细胞中的具体功能及发生机制也不十分清楚。现阶段,对于 SEPT9 与肿瘤关系的研究主要集中在乳腺癌^[10]、结肠癌^[11]、前列腺癌^[12]等少数几种肿瘤中,而本室前期研究发现 SEPT9 在肝癌组织及多种肝癌细胞系中均高表达,因此本实验通过构建的 SEPT9 shRNA 表达载体抑制人肝癌 HepG2 细胞中 SEPT9 基因的表达,研究其对细胞增殖及凋亡的影响,进一步探讨 SEPT9 基因对肝癌的作用,为其作为一个新的肿瘤基因治疗靶点提供实验依据。

收稿日期:2012-05-28;修回日期:2012-08-15

基金项目:四川省卫生厅基金资助项目(100211)

作者单位:1. 646000 四川泸州,泸州医学院医学细胞生物学与遗传学教研室,2. 生理学教研室,3. 医学实验中心

通信作者:税青林,E-mail:shuiql889@163.com

作者简介:曾永秋(1980-),女,硕士,讲师,主要从事肿瘤分子遗传学的研究

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌 HepG2 细胞由本室保存; SEPT9 基因的 shRNA 表达载体 pGPU6/Neo-SEPT9 由上海吉玛制药有限公司负责构建; DMEM 高糖培养液、小牛血清购于 Gbico 公司; Trizol 试剂和 LipofectamineTM 2000 购于 Invitrogen 公司; TaKaRa one step RNA PCR Kit (AMV) 购于大连宝生物公司; 抗 Septin-9 购于 Proteintech 公司; 内参 GAPDH 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记二抗购自 Bioworld 公司; RIPA 裂解液、PMSF 及 CCK-8 购于碧云天公司; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购于南京凯基生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌 HepG2 细胞株于含有 100 μ g/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中, 37°C、5% CO₂ 常规培养和传代。

1.2.2 SEPT9 基因 shRNA 表达载体对人肝癌 HepG2 细胞的转染 利用 Dharmacron 公司提供的在线工具设计 4 对针对 SEPT9 mRNA 的 RNAi 靶序列, 由上海吉玛制药有限公司构建 4 个相应的 SEPT9 基因 shRNA 表达载体, 并同时构建不针对任何基因的带绿色荧光蛋白基因 (GFP) 的阴性对照质粒, 经 BLAST 比对分析未发现同源序列。通过预实验筛选出一个有效干扰重组质粒 pGPU6/Neo-SEPT9-1253, 其靶序列为 GGCAGCCCATCATGAAGTTCA, 于转染前一日接种 4×10^5 个 HepG2 细胞于 6 孔板中, 并设实验组(转染 SEPT9-shRNA 表达质粒)、阴性对照组(转染阴性对照质粒)和空白组(正常培养的 HepG2 细胞), 共 3 组。转染当日细胞生长至 70%~80% 汇片时, 按转染试剂说明书将质粒 DNA 和脂质体 LipofectamineTM 2000 以 1:2.5 的比例混合, 室温放置 20 min 后加入各孔中, 每组设 3 个复孔。

1.2.3 荧光显微镜检测转染效率 转染后 48 h 荧光显微镜下观察阴性对照组细胞转染效率, 两人独立估计相同视野下荧光细胞与自然光线下细胞总数的百分比, 取其平均值作为转染效率。

1.2.4 半定量 RT-PCR 检测 SEPT9 mRNA 的表达 转染后 48 h 用 Trizol 试剂裂解各组细胞, 提取细胞总 RNA。采用两步法 RT-PCR: 首先每组取 1 μ g RNA 用于反转录反应制备 cDNA, 反应条件为 42°C 30 min, 99°C 5 min, 5°C 5 min, 1 个循环。接着进行 PCR 反应, SEPT9 上游引物序列: 5'-AT-CACGCACGATATTGAGGAG-3', SEPT9 下游引物序列: 5'-ACCTGGTACTCGTGGTCAGT-3', 扩增片段长度为 491 bp。内对照 GAPDH 基因上游引物: 5'-AGGTCGGAGTCAACGGATTG-3'; GAPDH 下游引物序列: 5'-GTGATGGCATG-GACTGTGGT-3', 扩增片段长度为 545 bp。PCR

反应条件: 94°C 预变性 2 min, 94°C 变性 30 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 共 30 个循环。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像分析系统 (UVP 公司) 进行吸光度扫描, 每组重复 3 次。

1.2.5 Western blot 检测 SEPT9 蛋白的表达 转染后 48 h 吸尽各孔培养液, 加入预冷 PBS 洗细胞 2 次, 弃尽 PBS。向每孔细胞中加入含 1% PMSF 的 RIPA 缓冲液 150 μ l, 冰浴 10 min, 用细胞刮刮下细胞, 移入 1.5 ml EP 管中, 用 1 ml 注射器反复抽吸 5~6 次以充分裂解细胞, 4°C、12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, BCA 法测定蛋白质浓度, 按比例加入加样缓冲液后煮沸 5 min。各组取等量蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳, 转 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 分别加入相应的一抗(兔抗人 Septin-9 多克隆抗体 1:500、鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体 1:1 000), 4°C 过夜, TBST 洗膜 3 次, 随后分别加入二抗(羊抗兔 1:5 000, 羊抗鼠 1:10 000) 反应 1 h, TBST 洗膜 3 次, 用 Odyssey 荧光扫描系统激发底物发光显色。

1.2.6 CCK-8 法检测细胞增殖情况 将 HepG2 细胞按 5 000 个/孔接种于 96 孔板, 设实验组、阴性对照组和空白对照组, 每组 6 个复孔, 各组分别进行相应重组质粒的转染。分别于转染后的 0、24、48 和 72 h 直接在孔中加入 CCK-8 10 μ l, 继续培养 2 h 后, 于酶标仪 450 nm 波长测 A 值。每组取平均值, 绘制生长曲线, 并计算实验组和阴性对照组的生长抑制率。细胞生长抑制率 (IR) = (空白对照组 A_{450} 值 - 实验组 A_{450} 值或阴性对照组 A_{450} 值) / 空白对照组 A_{450} 值 × 100%。

1.2.7 流式细胞仪检测细胞凋亡情况 转染后 48 h, 用不含 EDTA 的胰酶消化收集 6 孔板中的细胞, PBS 洗涤细胞 2 次, 按照试剂盒说明书每孔细胞加入 500 μ l 的 Binding buffer 悬浮细胞, 加入 5 μ l Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5 μ l PI, 混匀, 室温, 避光 15 min, 上机检测。

1.3 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 由 SPSS12.0 软件统计包完成。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

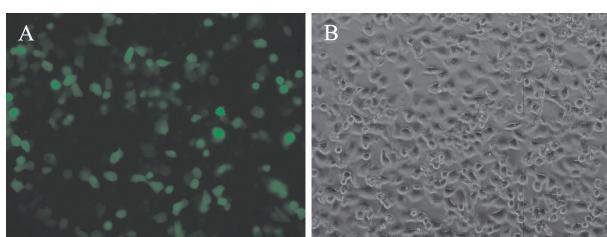
2 结果

2.1 HepG2 细胞的转染效率

荧光显微镜下观察, HepG2 细胞转染 48 h 后转染率为 75% 左右, 见图 1。

2.2 各组 HepG2 细胞中 SEPT9 mRNA 的表达

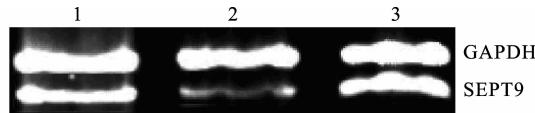
RT-PCR 检测结果显示, 与阴性对照组和空白组相比, 实验组 HepG2 细胞中 SEPT9 mRNA 表达水平明显降低, 说明转染 SEPT9-shRNA 表达质粒的 HepG2 细胞中, SEPT9 在 RNA 水平上能够被显著抑制, 见图 2。



A: fluorescence microscope ($\times 200$); B: inverted phase contrast microscope ($\times 200$)

图1 荧光显微镜下观察 HepG2 细胞的转染效率

Figure 1 Detection of the transfection rate under fluorescence microscope



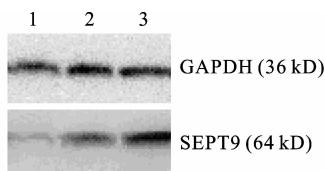
1: negative control group; 2: experiment group; 3: blank group

图2 RT-PCR 检测 SEPT9 mRNA 的表达

Figure 2 Detection of the expression of SEPT9 mRNA with RT-PCR

2.3 各组 HepG2 细胞中 SEPT9 蛋白的表达

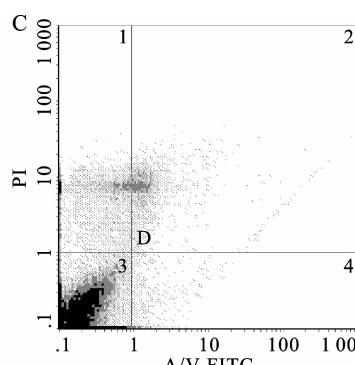
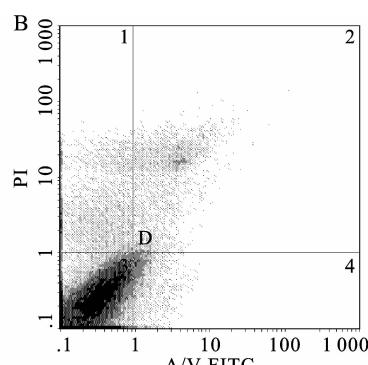
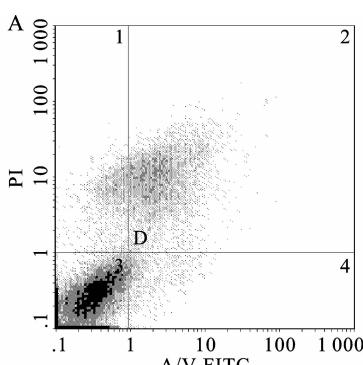
Western blot 检测结果显示,与阴性对照组和空白组相比,实验组 HepG2 细胞中 SEPT9 蛋白表达水平明显受到抑制,说明 SEPT9-shRNA 表达质粒在蛋白质水平上显著抑制了 HepG2 细胞中 SEPT9 的表达,见图 3。



1: experiment group; 2: negative control group; 3: blank group

图3 Western blot 检测 SEPT9 蛋白的表达

Figure 3 Detection of the expression of SEPT9 protein with Western blot



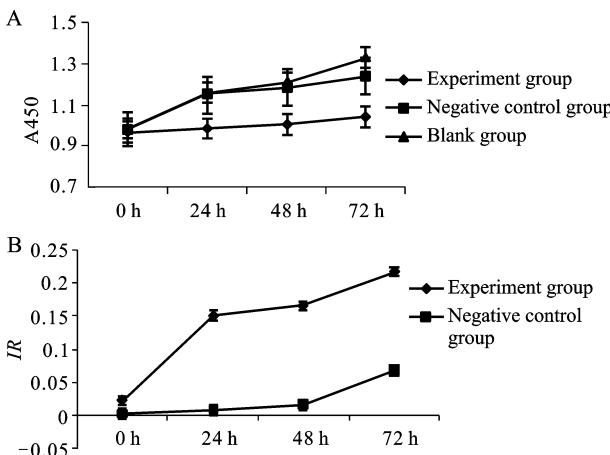
A: experiment group; B: negative control group; C: blank group

图5 FCM 法检测细胞凋亡的变化

Figure 5 Detection the changes of the cell apoptosis with FCM

2.4 抑制 SEPT9 的表达对 HepG2 细胞增殖的影响

以细胞在不同时间点(0、24、48 和 72 h)的 A_{450} 值绘制各组细胞生长曲线,见图 4A,并计算实验组和阴性对照组的生长抑制率,见图 4B,可见,实验组细胞生长速度明显减慢,细胞增殖抑制显著,以 72 h 最为明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



A: the cell growth curves of each group at different time points; B: the growth inhibition ratios of the experiment group and negative control group relative to the blank group at different time points

图4 CCK-8 法检测 SEPT9 shRNA 表达载体对细胞增殖的影响

Figure 4 Effects of the SEPT9 shRNA expression vector on cell proliferation were detected with CCK-8

2.5 抑制 SEPT9 的表达对 HepG2 细胞凋亡的影响

FCM 法检测细胞凋亡结果显示,实验组的细胞凋亡率为 $(28.26 \pm 3.47)\%$,明显高于阴性对照组的 $(5.12 \pm 2.09)\%$ 和空白组的 $(3.79 \pm 1.75)\%$,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 5。

3 讨论

SEPT9 定位于染色体 17q25,编码 SEPT9 蛋白。研究发现 SEPT9 基因能产生 18 种变异剪接本,编码 15 种多肽^[13],正是因其特殊的结构特征以及在多种肿瘤中的表达差异引起了研究者对其功能

的关注,但其功能大多还不十分清楚。

目前,对于 SEPT9 属于癌基因还是抑癌基因的属性定位还存在争议。早期研究发现,约 70% 的卵巢癌患者 17q25 染色体等位基因丢失,因此认为 SEPT9 可作为卵巢癌的一个候选肿瘤抑制基因^[14]。在结直肠癌^[15-16]和头颈部鳞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)^[17] 中, SEPT9 存在 DNA 甲基化修饰,也表现为抑癌基因的作用。但现在越来越多的研究则更支持 SEPT9 为潜在原癌基因,在乳腺癌转基因鼠实验中,发现 SEPT9/SNT1 的显著扩增和过表达,SNT1 是 SEPT9 基因的鼠类直系同源物,与原癌基因有 96% 的同源性^[18]。Gonzalez 等^[19]发现,SEPT9 在大多数乳腺癌细胞株和原发性乳腺癌组织中有明显的 DNA 扩增,mRNA 和蛋白质表达水平上升。将 SEPT9 基因转染至永生化的人乳腺癌上皮细胞中,其高表达可使细胞增殖加速、侵袭性增加和染色体异倍体增多;当抑制 SEPT9 高表达后,肿瘤细胞的生长特性受到抑制。以上研究证实 SEPT9 与多种肿瘤的恶性表型有关,并在肿瘤的发生发展过程中起着重要的作用,并可能成为抗肿瘤治疗的潜在靶点。

本实验前期研究发现肝癌组织中 SEPT9 蛋白的表达明显高于癌旁组织,且该蛋白在多种肝癌细胞株中也呈现高表达,提示 SEPT9 基因可能与肝癌的发生发展有密切关系。本研究通过已构建的针对 SEPT9 基因的 shRNA 表达载体,将其转染人肝癌 HepG2 细胞,在 mRNA 和蛋白质水平,SEPT9 基因的表达均受到明显抑制,而且 HepG2 细胞的生长抑制明显,凋亡显著。该结果在一定程度上表明 SEPT9 基因在肝癌细胞中可能充当着原癌基因的角色,与其在乳腺癌^[19]及前列腺癌^[20]中的研究成果相似,并可能成为肝癌基因治疗的又一理想靶点。

而对于 SEPT9 参与肿瘤发生发展的机制,最近有学者通过对前列腺癌细胞系内外实验研究发现,MSF-A(SEPT9_v1)可以通过抑制缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)的泛素化降解途径,使 HIF 转录活性增加、细胞增殖速度加快,促进肿瘤血管形成^[20],而敲低 SEPT9_v1 后则可以减少 HIF-1 α 的表达,抑制细胞增殖、肿瘤生长和血管生成^[12]。该研究为 SEPT9 在肿瘤发生、发展中的作用提供了直接证据。同时有研究表明,在大多数乳腺癌细胞株中 SEPT9 呈高表达,并且伴有 Thsp1 和 bax 表达下调,细胞凋亡受到抑制;当 siRNA 抑制 SEPT9 的表达后,细胞凋亡抑制解除^[18]。因而推测 SEPT9 也可能通过 HIF-1 途径和 bax 参与肝癌的发生和细胞凋亡的抑制。但抑制 SEPT9 基因表达导致的肝癌细胞生长抑制、细胞凋亡的具体作用机制及其对细胞周期、肿瘤细胞迁移等的影响尚有待进一步证实。

参考文献:

- Dobbelaere J, Barral Y. Spatial coordination of cytokinetic events by compartmentalization of the cell cortex[J]. Science, 2004, 305(5682):393-6.
- Spiliotis ET, Kinoshita M, Nelson WJ. A mitotic septin scaffold required for mammalian chromosome congression and segregation[J]. Science, 2005, 307(5716):1781-5.
- Kartmann B, Roth D. Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis[J]. J Cell Sci, 2001, 114(Pt 5):839-44.
- Gottfried Y, Rotem A, Lotan R, et al. The mitochondrial ARTS protein promotes apoptosis through targeting XIAP[J]. EMBO J, 2004, 23(7):1627-35.
- Hall PA, Russell SH. The pathobiology of the septic gene family[J]. J Pathol, 2004, 204(4):489-505.
- Larisch S. The ARTS connection: role of ARTS in apoptosis and cancer[J]. Cell Cycle, 2004, 3(8):1021-3.
- Ihara M, Tomimoto H, Kitayama H, et al. Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmic inclusions found in Parkinson's disease and other synucleinopathies[J]. J Biol Chem, 2003, 278(26):24095-102.
- Cossart P, Pizarro-Cerda J, Leclerc M. Invasion of mammalian cells by Listeria monocytogenes: functional mimicry to subvert cellular functions[J]. Trends Cell Biol, 2003, 13(1):23-31.
- Scott M, McCluggage WG, Hillan KJ, et al. Altered patterns of transcription of the septic gene, SEPT9, in ovarian tumorigenesis[J]. Int J Cancer, 2006, 118(5):1325-9.
- Connolly D, Yang Z, Castaldi M, et al. Septin 9 isoform expression, localization and epigenetic changes during human and mouse breast cancer progression[J]. Breast Cancer Res, 2011, 13(4):R76.
- Tóth K, Galamb O, Spisák S, et al. The influence of methylated septic 9 gene on RNA and protein level in colorectal cancer [J]. Pathol Oncol Res, 2011, 17(3):503-9.
- Amir S, Golan M, Mabjeesh NJ. Targeted knockdown of SEPT9_v1 inhibits tumor growth and angiogenesis of human prostate cancer cells concomitant with disruption of hypoxia-inducible factor-1 pathway[J]. Mol Cancer Res, 2010, 8(5):643-52.
- McIlhatten MA, Burrows JF, Donaghy PG, et al. Genomic organization, complex splicing pattern and expression of a human septic gene on chromosome 17q25.3[J]. Oncogene, 2001, 20(41):5930-9.
- Kalikin LM, Sims HL, Petty EM. Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septic-like fusion gene(MSF) that map to a 17q25 region of loss in breast and ovarian tumors[J]. Genomics, 2000, 63(2):165-72.
- Grützmann R, Molnar B, Pilarsky C, et al. Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septic 9 DNA methylation assay[J]. PLoS One, 2008, 3(11):e3759.
- deVos T, Tetzner R, Model F, et al. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer [J]. Clin Chem, 2009, 55(7):1337-46.
- Bennett KL, Karpenko M, Lin MT, et al. Frequently methylated tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Cancer Res, 2008, 68(12):4494-9.
- Montagna C, Lyu MS, Hunter K, et al. The Septin 9 (MSF) gene is amplified and overexpressed in mouse mammary gland adenocarcinomas and human breast cancer cell lines[J]. Cancer Res, 2003, 63(9):2179-87.
- Gonzalez ME, Peterson EA, Privette LM, et al. High SEPT9_v1 expression in human breast cancer cells is associated with oncogenic phenotypes[J]. Cancer Res, 2007, 67(18):8554-64.
- Amir S, Wang R, Matzkin H, et al. MSF-A interacts with hypoxia-inducible factor-1alpha and augments hypoxia-inducible factor transcriptional activation to affect tumorigenicity and angiogenesis[J]. Cancer Res, 2006, 66(2):856-66.