

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.23.010

siRNA 下调 EZH2 基因对肾癌细胞系 769-P 增殖的影响 *

王国栋^{1,2} 党亚正¹ 魏 铭² 郑 甲² 温伟红^{2△}

(1 解放军第 323 医院肿瘤中心 陕西 西安 710054; 2 第四军医大学肿瘤生物学国家重点实验室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:运用小干扰 RNA 下调果蝇 zeste 基因增强子人类同源物(enhancer of zeste homolog 2, EZH2)在肾癌细胞系 769-P 中的表达,明确其对肾癌细胞增殖的影响。**方法:**将处于对数生长期 769-P 细胞分为实验组(experiment group)、阴性对照组(negative group)、空白对照组(blank group),合成靶向 EZH2 基因的小干扰 RNA 片段(EZH2-siRNA)和无效序列片段后,通过脂质体介导分别转染至实验组和阴性对照组,空白对照组未做任何处理。以 qRealtime-PCR 检测 EZH2 基因 mRNA 水平的变化情况,以 MTT 法检测各组细胞增殖变化;流式细胞术(FCM)检测转染后细胞周期变化情况。**结果:**实验组中 EZH2 在 mRNA 表达水平明显受抑制;MTT 实验中第 4 天始,实验组中 769-P 细胞的增殖能力开始受抑制,第 5 天时实验组细胞抑制更明显,与阴性对照组和空白组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。siRNA 转染后实验组中 G0/G1 期细胞比例明显增多($81.32 \pm 3.14\%$),与阴性对照组($44.13 \pm 1.52\%$)和空白对照组($45.71 \pm 2.32\%$)差异有统计学意义。**结论:**EZH2-siRNA 可有效下调并抑制肾癌细胞 769-P 的增殖, EZH2 在肾癌的发生、发展中发挥了重要作用,为下一步研究肾癌基因治疗提供了理论支持。

关键词:肾细胞癌;RNAi;EZH2

中图分类号:R737.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)23-4440-04

Effect of EZH2 after Silenced by siRNA on the Proliferation of Renal Cell Carcinoma Cell Line 769-P*

WANG Guo-dong^{1,2}, DANG Ya-zheng¹, WEI Ming², ZHENG Jia², WEN Wei-hong^{2△}

(1 Cancer center, 323 hospital of the Chinese People's Liberation Army, Xi'an, Shaanxi, 710054, China; 2 State key laboratory of tumor biology, the Forth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the influence of siRNA targeting the enhancer of homolog2(EZH2) gene on the proliferation of renal cell carcinoma (RCC) cell line 769-P in vitro. **Methods:** The cell line 769-P which were in the period of logarithmic phase were divided into experiment group, negative group and blank group. siRNA sequence targeting EZH2 were designed and synthesized according to genebank, with a scramble sequence as negative control, which were transected to the 769-P cells conducted by Lipofectamine 2000. The expression of EZH2 in mRNA level was detected by qRT-PCR after downregulated. MTT assay was used to observe the growth of 769-P cells in experiment group, negative group and blank group. And, cell cycle distribution of 769-P cells were detected by flow cytometry. **Results:** The expression of EZH2 in mRNA level was significantly suppressed by siRNA. MTT assay results revealed that cell inhibitory rate of experiment group was more lower than that of negative group and blank group. The proliferation of 769-P cells were inhibited remarkably in experiment group with cell rate of G0/G1 phrase being ($81.32 \pm 3.14\%$), and there were statistic difference as compared with negative control group ($44.13 \pm 1.52\%$) and blank group ($45.71 \pm 2.32\%$). **Conclusions:** EZH2 gene silencing can be conducted effectively by siRNA. EZH2 may play important roles in the development and progression of RCC, EZH2 may be a potential therapeutic target, and provides an important theoretical basis for gene therapy of RCC.

Key words: Renal cell carcinoma; RNAi; EZH2

Chinese Library Classification(CLC): R737.11 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)23-4440-04

前言

肾癌作为泌尿系常见恶性肿瘤,其早期外科手术治疗效果较好,而晚期肾癌因易复发、转移及对放、化疗不敏感,目前 5

年生存率较低^[1],靶向药物的出现为晚期肾癌患者的治疗提供了一种新手段^[2,3]。临床试验结果表明,目前针对晚期肾癌患者的靶向药物还存在完全缓解率低、远期生存率未明显提高^[4]等问题,因此需继续寻找新的肾癌药物靶点。EZH2(enhancer of

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81171924)

作者简介:王国栋(1983-),男,硕士研究生,医师,主要研究方向:泌尿系肿瘤基础与临床研究,电话:029-84756228,

E-mail:wanguodong021014@163.com

△通讯作者:温伟红, E-mail:wenweih@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2013-12-13 接受日期:2014-01-12)

zeste homolog 2) 是果蝇 zeste 基因增强子人类同源物,是多梳 PcG 基因家族的重要成员之一。PcG 和 TrxG 基因是参与防止细胞身份改变的细胞记忆系统的重要组成部分,参与阻止细胞的恶性变^[9]。EZH2 基因同时具备组蛋白甲基转移酶和去乙酰化酶(HDAC)等多种调控作用,作为转录抑制因子参与了多种恶性肿瘤的发生、发展^[6,9]。为明确 EZH2 基因在肾癌细胞中的生物学作用,本实验拟通过 RNA 干扰技术下调 EZH2 在肾癌细胞 769-P 中的表达,检测 EZH2-siRNA 对 769-P 细胞增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂

肾癌 769-P 细胞由第四军医大学肿瘤生物学国家重点实验室保存,总 RNA 提取试剂盒(RNeasy Mini Kit)购于德国 QIAGEN 公司,脂质体(Lipofectamine™ 2000)由美国 Invitrogen 公司生产,荧光实时定量 qRT-PCR 试剂 SYBR Premix Ex Taq™ II 和 RNA 反转录试剂 PrimeScript RT Master Mix 由日本 TaKaRa 公司生产,噻唑蓝(MTT)由美国 Sigma 公司生产。

1.2 siRNA 的设计与合成

根据 Gene bank 提供的 EZH2 序列(NM-004456.3),由上海吉玛公司合成 siRNA,一条为有效的靶点序列:5'-GACUCUGAAUGCAGUUGCUTT-3',命为实验组,另一条为无效序列:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',命为阴性对照组。

1.3 细胞培养和 siRNA 转染

用含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养肾癌细胞 769-P,置于 37℃、5%CO₂ 浓度细胞培养箱中孵育,以 0.25%胰酶消化细胞传代。取对数生长期的细胞接种于 6 孔板,待融合率约 40%~60%后每孔先加 1 mL 无血清 DMEM,后再加由 5 μL siRNA 与 250 μL DMEM 和 5 μL Lipofectamine2000 与 250 μL DMEM 的混合液,混合前室温静置 30 min,于 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中孵育 6 h 后,换含 10%血清 DMEM。

1.4 转染后 EZH2 mRNA 的检测

收集转染后 48 h 769-P 细胞,以 RNeasy Mini Kit 试剂盒提取总 RNA,用 PrimeScript® RT Master Mix(for Real Time)试剂盒进行反转录,具体操作步骤见说明书,反转录反应条件:37℃ 15 min(反转录反应),85℃ 5 sec(反转录酶的失活反应),4℃(反应终止后)。EZH2 实时定量 PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成:EZH2 上游引物 5'-ttgttgccggaagcgtg-taaaatc-3',EZH2 下游引物 5'-tcctagtcccgcgaatgagc-3';管家基因 GAPDH 上游引物 5'-accacagtccatgccatcac-3',下游引物 5'-tccaccaccctgttgctga-3'。反应条件为 95℃ 预变性 5 min,95℃ 10 sec,60℃ 30 sec,共 30 个循环。

1.5 MTT 法检测 769-P 细胞的增殖

取对数生长期的各组肾癌细胞制备成浓度为 4×10^3 个/ml 单细胞悬液,接种于 96 孔板,每组设 5 个复孔,并设置一对照孔,只加培养基;待细胞贴壁率达 50%左右,开始转染 siRNA;转染后分别于 6 h、2 d、3 d、4 d、5 d 每孔加入 20 μL MTT,37℃ 孵育 4 h,吸弃上清;后每孔加入 150 μL DMSO,振荡 10 min,保证结晶充分溶解,紫外分光光度计 490 nm

处测定 OD 值,计算 5 孔的平均值。以 GraphPad Prism5 软件绘图。

1.6 流式细胞术检测 769-P 细胞周期变化

取转染后 48 h 处于对数生长期的肾癌 769-P 细胞(细胞密度到 1.0×10^6),以 0.25%胰酶消化成单细胞悬液,用无菌 PBS、900 rpm 洗涤 5 min,弃 PBS;加入 1 mL PBS 和 2 mL 无水乙醇固定,上机前 PBS 洗涤 1 次,用含 0.01%RNase 和 0.5%PI 4℃处理细胞 20 min;过 300 目尼龙网上机,在 488 nm 激发波长下测定 769-P 细胞各周期 DNA 含量。

1.7 统计学分析

采用统计软件 SPSS17.0 进行数据分析,组间比较采用 t 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义,以 GraphPad Prism5 软件作图。

2 结果

2.1 肾癌细胞 769-P 转染 siRNA 后 EZH2 mRNA 表达水平明显下调

EZH2-siRNA 转染 769-P 细胞 48 h 后,提取细胞总 RNA,qRT-PCR 检测相关 mRNA 表达水平,发现较空白对照组和阴性对照组,实验组在 mRNA 表达水平上明显下调(P<0.05),而空白组和阴性对照组之间无明显差别(P>0.05),见图 1。

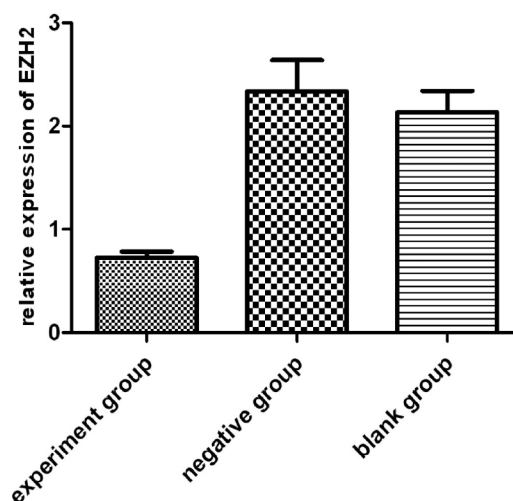


图 1 769-P 转染 siRNA 后各组 mRNA 表达水平变化

Fig. 1 Relative expression of the mRNAs encoding EZH2 in 769-P cells after transfected interference sequence in different groups

*注:a:P<0.05,与阴性对照组和空白组比较。

*Note: a:P<0.05, compared with negative group and blank group.

2.2 EZH2-siRNA 明显抑制肾癌细胞的增殖能力

结果显示第 4 天始,769-P 细胞中实验组的增殖能力较阴性对照组和空白组细胞开始受抑制,第 5 天时实验组细胞增殖抑制更明显(P<0.05)(图 2)。

2.3 流式细胞术检测肾癌 769-P 细胞周期

转染后 48 小时流式细胞术检测肾癌细胞周期变化,结果显示:实验组细胞的周期 G1 期数量比例明显多于空白对照组和阴性对照组的凋亡数量比例,差异有统计学意义(P<0.05)图 3。

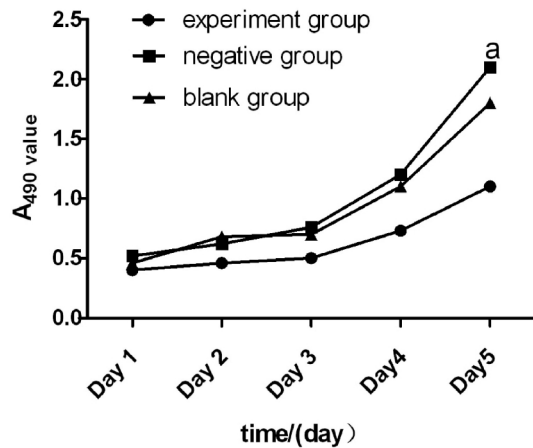


图 2 769-P 转染 siRNA 后各组细胞增殖能力变化

Fig. 2 The changes of proliferation ability after transfected RNA interference sequence in 769-P cells

* 注: a: $P < 0.05$, 与阴性对照组和空白组比较。

*Note: a: $P < 0.05$, compared with negative group and blank group.

3 讨论

组蛋白翻译后修饰是表面遗传改变致癌症发生的机制之一。甲基化作为一种组蛋白共价修饰,它可以发生在赖氨酸或精氨酸上,如 H3K27 甲基化就是一种抑制性修饰。人类细胞中介导 H3K27 甲基化的酶是 EZH2^[9],是果蝇 Zeste 增强子 E(z) 的同源蛋白,定位于 7 号染色体短链 35 区,共包含 20 个外显子,其长度在 41-323 bp 不等,而内含子长度在 0.15-17.7 kb 不等,其 cDNA 全长 2.7 kb,包含一个开放阅读框架^[10]。EZH2 通过发挥组蛋白甲基转移酶和组蛋白去乙酰化酶(HDAC)等调控作用参与靶基因的转录抑制,从而促进多种人类细胞的恶性变^[11-13]。EZH2 还可作用于 pRb2/p130 蛋白 C- 碳末端与组蛋白去乙酰化(HDAC1)相联的区域,促进细胞周期异常增殖和恶性变,推测 EZH2 有可能成为新的肿瘤 Marker^[14]。

RNA 干扰(RNAi)是一种反义技术,利用碱基互补原理合成与 mRNA 对应的双链 RNA(dsRNA),导入后使 mRNA 发生特异降解而导致相应基因沉默,属于基因转录后修饰^[15]。dsRNA 经 Dicer 酶切割加工成长度为 21~24nt 的非编码小分

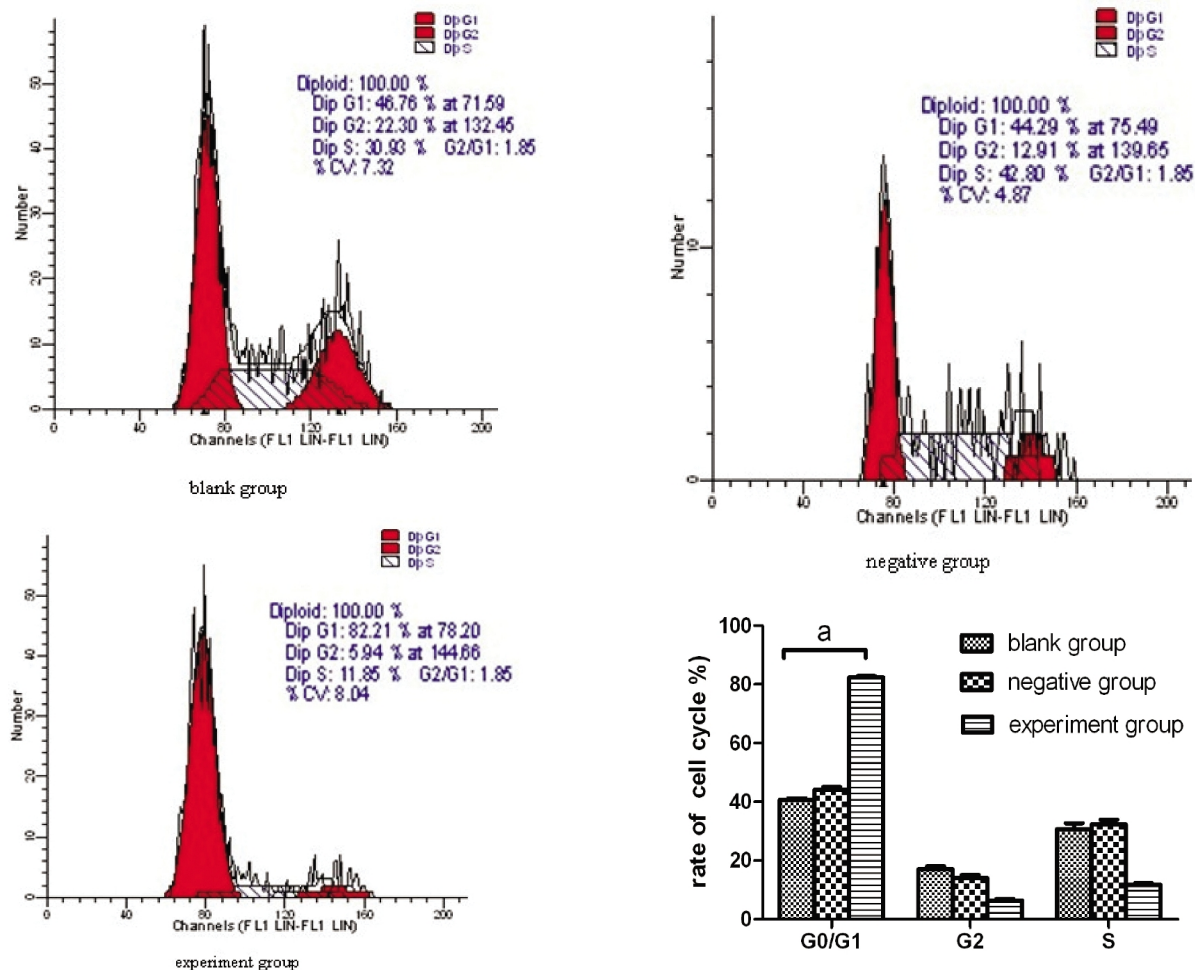


图 3 siRNA 转染后肾癌 769-P 细胞周期变化

Fig. 3 The changes of cell cycle distribution after transfected RNA interference sequence in 769-P cells

* 注: a: $P < 0.05$, 与阴性对照组和空白组比较。

*Note: a: $P < 0.05$, compared with negative group and blank group.

子 RNA(siRNA),在 RNA 聚合酶催化下形成沉默复合体,具有极高的特异性。进入细胞后稳定性好,因不含病毒序列,不会整合入宿主染色体内,且结构简单,容易设计及大量合成,现已被广泛用于探索基因功能和恶性肿瘤的基因治疗领域^[16]。目前,国内外多名学者^[17-19]已检测了 EZH2 在肾癌组织和癌旁组织的表达情况,发现 EZH2 在肾癌组织中明显异常高表达,且 EZH2 表达水平与肾癌病理恶性程度及临床侵袭性呈正相关。Xu B^[20]等通过组织芯片检测分析 223 例肾透明细胞癌和 21 例乳头状细胞癌中 EZH2 的表达率与生存率间的关系,认为 EZH2 可作为预测肾癌不良预后的指标,EZH2 是肾癌发生和转移的关键分子。本实验中我们根据 RNAi 原理,通过合成靶向人 EZH2 基因的 siRNA 并转染至肾癌细胞系 769-P,检测 EZH2 下调后对肾癌细胞生物学行为的变化。本实验结果提示 RNAi 技术可有效沉默 EZH2 的表达,EZH2 基因沉默后肾癌 769-P 细胞的增殖能力明显受到抑制,进一步在肿瘤生物学方面证实了 EZH2 在肾癌发生中的作用。为下一步研究肾癌基因治疗提供了理论支持,靶向抑制 EZH2 有望成为肾癌基因治疗的新途径。

当前针对 EZH2 基因在肾癌发生、发展中的作用研究多局限在组织和细胞水平,EZH2 基因在肾癌中具体分子调控机制并未得到详细阐明,下一步拟利用基因芯片技术行 EZH2 在 siRNA 干扰沉默后基因表达谱差异分析,以期为肾癌发病机制和选择新的药物治疗靶点提供依据。

参考文献(References)

- [1] Escudier B, Szczylik C, Hutson TE, et al. Randomized phase II trial of first-line treatment with sorafenib versus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma[J]. Clin Oncol, 2009, 27(8): 1280-1289
- [2] Moore M, Hirte HW, Siu L, et al. Phase I study to determine the safety and pharmacokinetics of the novel Raf kinase and VEGFR inhibitor BAY 43-9006, administered for 28 days on/7 days off in patients with advanced, refractory solid tumors[J]. Ann Oncol, 2005, 16(10): 1688-1694
- [3] Huang T, Song XS, Zhang ZW. Efficacies of sorafenib plus interferon in advanced renal cell carcinoma: a report of 57 cases [J]. National Medical Journal of China, 2013, 93(24): 1903-1905
- [4] Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, et al. Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma[J]. Clin Oncol, 2009, 27(22): 3584-3590
- [5] Levine S.S., Weiss A., Erdjument-Bromage H., et al. The core of the Polycomb Repressive Complex is compositionally and functionally conserved in flies and humans[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(17): 6070-6078
- [6] Kim W, Bird GH, Neff T, et al. Targeted disruption of the EZH2-EED complex inhibits EZH2-dependent cancer[J]. Nat Chem Biol, 2013, 9(10): 643-650
- [7] Collett K, Eide GE, Arnes J, et al. Expression of enhancer of zeste homologue 2 is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(4): 1168-1174
- [8] Tang B, Zhang Y, Liang R, et al. RNAi-mediated EZH2 depletion decreases MDR1 expression and sensitizes multidrug-resistant hepatocellular carcinoma cells to chemotherapy[J]. Oncol Rep, 2013, 29(3): 1037-1042
- [9] Au SL, Wong CC, Lee JM, et al. Enhancer of zeste homolog 2 epigenetically silences multiple tumor suppressor microRNAs to promote liver cancer metastasis[J]. Hepatology, 2012, 56(2): 622-631
- [10] Hillier LW, Fulton RS, Fulton LA, et al. The DNA sequence of human chromosome 7[J]. Nature, 2003, 424(6945): 157-164
- [11] McCabe MT, Ott HM, Ganji G, et al. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations [J]. Nature, 2012, 492(7427): 108-112
- [12] Xu Ke-xin, Wu Zhen-hua, Jeremy, Anna C, et al. EZH2 oncogenic activity in castration resistant prostate cancer cells is polycomb-independent[J]. Science, 2012, 338(6113): 1465-1469
- [13] Chang CJ, Hung MC. The role of EZH2 in tumour progression [J]. Br J Cancer, 2012, 106(2): 243-247
- [14] Bracken AP, Pasini D, Capra M, et al. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer [J]. EMBO J, 2003, 22(20): 5323-5335
- [15] Castel SE, Martienssen RA. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond [J]. Nat Rev Genet, 2013, 14(2): 100-112
- [16] Ramachandran PV, Ignacimuthu S. RNA interference-a silent but an efficient therapeutic tool[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2013, 169(6): 1774-1789
- [17] Wagener N, Holland D, Bulkescher J, et al. The enhancer of zeste homolog 2 gene contributes to cell proliferation and apoptosis resistance in renal cell carcinoma cells [J]. Int J Cancer, 2008, 123(7): 1545-1550
- [18] Wagener N, Macher-Goeppinger S, Pritsch M, et al. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) expression is an independent prognostic factor in renal cell carcinoma[J]. BMC Cancer, 2010, 10(6): 524-529
- [19] Sakurai T, Bilim VN, Uolkov AV, et al. The enhancer of homolog 2 (EZH2), a potential therapeutic target, is regulated by miR-101 in renal cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 422(2): 607-614
- [20] ZAXu B, Abourbih S, Sircar K, et al. Enhancer of zeste homolog 2 expression is associated with metastasis and adverse clinical outcome in clear cell renal cell carcinoma: a comparative study and review of the literature[J]. Arch Pathol Lab Med, 2013, 137(10): 1326-1336