

• 基础实验研究论著 •

RNA 干扰介导的 prohibitin 基因沉默对 BRL-3A 细胞增殖的影响

孙青菊¹, 梁 冰¹, 焦炳华²

(1. 中国人民解放军第四〇一医院检验科, 山东青岛 266071; 2. 第二军医大学

生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433)

摘 要:目的 观察 RNA 干扰介导的 prohibitin 基因沉默对大鼠肝细胞 BRL-3A 细胞增殖及细胞周期的影响。方法 化学合成针对 prohibitin 基因的小干扰 RNA (siRNA), 使用脂质体将其转染至 BRL-3A 细胞中, 应用 Real-time PCR 和 Western blotting 分别检测 siRNA 转染后细胞 prohibitin mRNA 和蛋白的表达, MTT 法检测转染后的细胞增殖情况, 流式细胞术检测转染后细胞周期的变化。结果 与对照组比较, prohibitin siRNA 转染 BRL-3A 细胞后, prohibitin mRNA 和蛋白表达明显下降; 细胞活力升高; G1 期细胞减少, S 期细胞明显增多 ($P < 0.05$)。结论 Prohibitin siRNA 能有效抑制大鼠肝细胞 BRL-3A 细胞 prohibitin mRNA 和蛋白的表达, 并促进细胞增殖。

关键词: 基因; 细胞周期; 流式细胞术

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.07.010

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)07-0784-02

Effect of RNAi-mediated gene silencing of prohibitin on the proliferation of rat liver cell line BRL-3A

Sun Qingju¹, Liang Bing¹, Jiao Binghua²

(1. Department of Clinical Laboratory, NO. 401 Hospital of PLA, Qingdao, Shandong 266071, China;

2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of silencing prohibitin gene by small interfering RNA (siRNA) on the cell proliferation and the cell cycle of the rat liver cell line BRL-3A. **Methods** The siRNAs targeting prohibitin were synthesized, which were transfected into BRL-3A cells using a liposome approach. The expressions of prohibitin mRNA and protein in BRL-3A cells after transfection were determined by quantitative real-time PCR and Western blotting, respectively. The cell proliferation and cell cycle were detected by MTT method and flow cytometry (FCM), respectively. **Results** As compared with the control, the expression levels of prohibitin mRNA and protein were decreased after transfection with prohibitin siRNA, the cell viability was increased, the number of G1-phase cells were decreased and S-phase cells were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Prohibitin siRNA can effectively suppress the expressions of prohibitin mRNA and protein in rat liver cell line BRL-3A, and promote the cell proliferation in vitro.

Key words: genes; cell cycle; flow cytometry

肝细胞在肝损伤时会迅速表现出强大的增殖和自我调控能力。研究肝再生分子机制对肝脏移植、创伤、各种肝病及肝肿瘤诊治具有重要意义^[1-2]。前期通过亚细胞蛋白质组学方法, 发现线粒体蛋白 prohibitin 在肝再生早期表达下调^[3]。本研究应用 RNA 干扰技术, 观察靶向抑制 prohibitin 基因表达对大鼠肝细胞 BRL-3A 增殖的影响, 为进一步研究 prohibitin 在肝再生中的作用建立基础。

1 材料与方法

1 材料 正常大鼠肝细胞 BRL-3A 购于中科院上海生化细胞所。

1.1 仪器与试剂 7300 real-time PCR 仪由 ABI 公司提供; 蛋白电泳及转膜装置由 Bio-Rad 公司提供。lipofectimine 2000 阳离子脂质体由 Invitrogen 公司提供; PI 染液由晶美生物公司提供; prohibitin 一抗由 Abcam 公司提供; 二抗由 Santa Cruz 公司提供; 实时定量 PCR 试剂盒由 ABI 公司提供。

1.2 细胞培养 大鼠正常肝细胞 BRL-3A, 置于 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 于 37 °C、CO₂ 体积分数 5% 的培养箱中培养, 转染前 24 h 换无抗菌药物的培养基过夜。

1.3 siRNA 合成及细胞转染 siRNA 由上海 GeneChem 公

司设计合成。靶向目的基因 prohibitin 的 siRNA 序列, 正义链: 5'-GCC AGA UUU GUG GUG GAA Att-3'; 反义链: 5'-UUU CCA CCA CAA AUC UGG Ctt-3'。阴性对照 siRNA 序列, 正义链: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG Utt-3'; 反义链 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA Att-3'。按其说明书提供的方法进行细胞转染。实验分空白组、阴性对照组 (Mock) 和 RNA 干扰组 (PHBi)。空白组不经任何处理, 对照组转染阴性对照 siRNA, 实验组转染 prohibitin-siRNA。转染 6 h 后, 更换含血清及抗菌药物培养液继续培养, 在相应时间点进行检测。

1.4 Real-time PCR 检测 prohibitin mRNA 的表达 细胞转染 72 h 后, 提取细胞总 RNA, 进行 RT-PCR。Prohibitin 上游引物 5'-GCG GTG GAA GCC AAA CAG-3', 下游引物 5'-TTC TTC TGC TGC TCA GCC TTT-3'; 内参 β -actin 上游引物 5'-ATG GTG GGT ATG GGT CAG AAG-3', 下游引物 5'-TGG CTG GGG TGT TGA AGG TC-3'; 反应体系为 5 μ L DNA 模板, 10 μ L 的缓冲液, 0.2 μ L 20 mmol/L 的上下游引物, 4.6 μ L 双蒸水。扩增条件为 95 °C 变性 1 min, 随后 96 °C 15 s, 60 °C 1 min 循环 40 次。按参考文献[4]的方法计算 pro-

hibitin 基因的沉默效率。

1.5 prohibitin 蛋白表达 分别收集转染 72 h 后的各组细胞,提取细胞总蛋白,于 12% 的聚丙烯酰胺凝胶中电泳,将蛋白电转移至硝酸纤维素膜上,用 TBST(含 5% 脱脂奶粉)封闭 1 h;加入 1:1 000 稀释的抗 prohibitin 单克隆抗体和抗 β -actin 抗体,4 ℃ 反应过夜;用 TBST 洗涤后,加入 1:1 000 稀释的 HRP 标记的荧光二抗,于室温下反应 1 h;TBST 洗膜,经显色、曝光、显影、定影后,使用 ImageScanner 扫描仪进行图像扫描,按参考文献[5]用 Photoshop CS2 软件分析结果。

1.6 MTT 比色测定细胞活力 取对数生长期的细胞接种至 96 孔培养平板中,细胞转染 48 h 后,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL)20 μ L,37 ℃,继续孵育 4 h,终止培养,吸弃孔内培养上清液,每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷,振荡 10 min,在酶联免疫检测仪上测定各孔光密度值,检测紫色 formazon 晶体的产生量,判断细胞活力变化。

1.7 细胞周期检测 6 孔板培养的细胞,转染 72 h 后,用不含 EDTA 的 0.25% 胰酶进行消化,离心 2 000 $\times$ g 5 min,收集细胞;用 PBS 洗 1 遍,弃上清;然后缓慢加入 -20 ℃ 预冷的 70% 酒精,4 ℃ 固定 3 h(可以过夜,第 2 天染色);吹散细胞后离心,去上清;加 100 μ L 5 mg/mL RNA 酶溶液,37 ℃ 保温 30 min,然后冰浴终止酶作用;加 PI 染液(100 μ g/mL)避光染色 30 min;流式细胞仪(FCM)测细胞周期。

1.8 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

Real-time PCR 和 Western blotting 结果显示与阴性对照组(Mock)相比,RNA 干扰组(PHBi)BLR-3A 细胞 prohibitin mRNA 和蛋白表达都明显降低($P < 0.05$)。通过检测对照组(Mock)和实验组(PHBi)光吸收值大小,可见经 RNA 干扰,prohibitin 表达被抑制后,BLR-3A 细胞活力升高。FCM 检测结果显示,转染 72 h,与阴性对照组相比,BLR-3A 细胞 prohibitin 表达被抑制后,细胞周期分布 G_1 期细胞减少,S 期细胞明显增多($P < 0.05$)。

3 讨 论

Prohibitin 属于 prohibitin 家族,广泛分布于不同组织的线粒体、细胞核、细胞膜上,在棕色脂肪、心脏、肝脏以及发育的肾小管和神经元高度表达,在肺、外分泌腺低表达^[6]。据报道,prohibitin 与多种细胞活动相关,如细胞周期调节,转录调节,肿瘤抑制,凋亡等^[7-10]。目前对 prohibitin 在肝再生中的作用及作用机制并不清楚。RNA 干扰是一种内源基因沉默机制,由于 siRNA 的高效性、特异性,使其成为基因功能及基因治疗研究的新方法^[11-12]。为了探讨 prohibitin 是否与肝细胞的增殖相关,本实验通过 RNA 干扰技术,观察靶向抑制 prohibitin 表达后对 BLR-3A 细胞增殖和细胞周期的影响。结果显

示,通过 siRNA 沉默 prohibitin 基因的表达后 BLR-3A 细胞的活力升高;细胞周期分布 G_1 期减少,S 期明显增多,说明 prohibitin 能明显抑制大鼠肝细胞细胞周期的进入,阻止细胞周期从 G_1 期到 S 期的转换。

本研究从细胞分子水平证实 prohibitin 的表达对 BLR-3A 细胞的增殖具有调控作用,提示其在肝再生早期表达下调可能与早期肝细胞增殖、肝再生的启动相关,其很可能成为肝再生调节的潜在新靶点,具体作用机制还有待于更深入的研究。

参考文献

- [1] Böhm F, Köhler UA, Speicher T, et al. Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines[J]. EMBO Mol Med, 2010, 2(8):294-305.
- [2] Booth C, Soker T, Baptista P, et al. Liver bioengineering: current status and future perspectives[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(47):6926-6934.
- [3] 孙青菊, 梁冰, 缪明永, 等. 肝再生早期线粒体差异表达蛋白质组分析[J]. 解放军医学杂志, 2010, 35(11):1341-1344.
- [4] Schmittgen TD, Livak J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method [J]. Nature Protocols, 2008, 3(6):1101-1108.
- [5] Luhtala N, Parker R. LSM1 over-expression in *Saccharomyces cerevisiae* depletes U6 snRNA levels [J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(16):5529-5536.
- [6] Chowdhury I, Garcia-Barrio M, Harp D, et al. The emerging roles of prohibitins in folliculogenesis[J]. Front Biosci(Elite Ed), 2012, 1(4):690-699.
- [7] He B, Feng Q, Mukherjee A, et al. A repressive role for prohibitin in estrogen signaling[J]. Mol Endocrinol, 2008, 22(2):344-360.
- [8] Mishra S, Murphy LC, Nyomba BL, et al. Prohibitin: a potential target for new therapeutics[J]. Trends Mol Med, 2005, 11(4):192-197.
- [9] Zhou TB, Qin YH, Zhou C, et al. Less expression of prohibitin is associated with increased caspase-3 expression and cell apoptosis in renal interstitial fibrosis rats [J]. Nephrology(Carlton), 2012, 17(2):189-196.
- [10] Sánchez-Quiles V, Segura V, Bigaud E, et al. Prohibitin-1 deficiency promotes inflammation and increases sensitivity to liver injury [J]. J Proteomics, 2012, (18):5783-5792.
- [11] Zhou HJ, Tsai SY, Tsai MJ. RNAi technology and its use in studying the function of nuclear receptors and coregulators[J]. Nucl Recept Signal, 2003, 1(1):e008.
- [12] Davidson BL, McCray PB Jr. Current prospects for RNA interference-based therapies[J]. Nat Rev Genet, 2011, 12(5):329-340.

(收稿日期:2012-12-06)

本刊对由院士撰写,或涉及“863”、“973”和国家自然科学基金资助项目的稿件开辟绿色通道,稿件通过终审后,力争在 3 个月内刊登,投稿时请在文章中注明。