

· 论 著 ·

RNA 干扰抑制 JMJD3 基因表达对肝癌细胞生长,增殖和侵袭的影响

张培培

(天津市儿童医院检验科 300134)

摘 要:目的 研究小干扰 RNA(siRNA)抑制含 Jumonji 结构域蛋白 3(JMJD3)基因对肝癌细胞 QGY-7703 和 HepG2 的生长、增殖和侵袭能力的影响。方法 利用 RNA 干扰技术沉默 JMJD3(siR-JMJD3),以非特异性序列(pSilencer 2.1)转染肝癌细胞 QGY-7703 细胞和 HepG2 细胞作为阴性对照,采用四甲基噻唑蓝(MTT)法、集落形成、Transwell 侵袭实验来检测肝癌细胞生长、增殖和侵袭能力的变化。结果 Western Blot 检测结果显示,转染 siR-JMJD3 质粒的试验组成功抑制肝癌细胞中 JMJD3 的蛋白表达水平。MTT 结果显示转入 siR-JMJD3 后,QGY-7703 和 HepG2 细胞的生长活性与对照组相比分别降低了约 25%和 17%。集落形成结果显示 2 种细胞系的集落形成数分别降低了约 31%和 25%。Transwell 侵袭实验结果显示穿膜细胞数分别下降了约 44%和 47%。结论 应用 siRNA 技术能有效抑制 JMJD3 基因的表达,同时有效抑制肝癌细胞 QGY-7703 和 HepG2 体外生长、增殖和侵袭,为肝癌的生物学治疗提供了新思路。

关键词:RNA 干扰; 含 Jumonji 结构域蛋白 3; 肝癌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.10.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)10-1333-03

Influence of RNAi inhibiting JMJD3 gene expression on growth,proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells

ZHANG Peipei

(Department of Clinical Laboratory, Tianjin Municipal Children's Hospital, Tianjin 300134, China)

Abstract:**Objective** To study the influence of small interfering RNA(siRNA) inhibiting Jumonji-containing JMJD3 gene on growth,proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells. **Methods** JMJD3 was silenced by RNA interference(siR-JMJD3),non-specificity sequence pSilencer 2.1 was transfected into liver cancer cells QGY 7703 and HepG2 cells as the negative control. MTT assay,colony formation and Transwell invasion assays were used to detect the cell growth,proliferation and invasion ability of hepatocellular carcinoma cells. **Results** The Western Blot detection results showed that the siR-JMJD3 plasmid transfected experiment group successfully inhibited the JMJD3 protein expression level in liver cancer cells. The MTT results showed that after transfecting siR-JMJD3,the growth activity of QGY-7703 and HepG2 were decreased by 25% or 17% compared with the control group. The colony formation results showed that in the colony formation number of two cell lines were decreased by 31% and 25% respectively. The Transwell invasion test results indicated that transmembrane cells number was decreased by 44% and 47% respectively. **Conclusion** Using siRNA technique can effectively inhibit JMJD3 gene expression,meanwhile effectively inhibits the in vitro growth,proliferation and invasion of liver cancer cells QGY-7703 and HepG2 and provides a new thinking for the biological therapy of liver cancer.

Key words:RNA interference; JMJD3; hepatocellular carcinoma

原发性肝癌(PHC)是指肝细胞或肝内胆管细胞发生的恶性肿瘤,前者称肝细胞癌(HCC),后者称胆管细胞癌,肝细胞癌作为肝癌的主要类型,占肝癌的 80%~90%,目前肝癌的治疗方法大多不理想,即使是小于 2 cm 的小肝癌,术后的 5 年复发和转移率仍高达 70%^[1],我国 HCC 的病死率已升至恶性肿瘤的第 2 位。本研究前期发现含 Jumonji 结构域蛋白 3(JMJD3)即赖氨酸特异性去甲基化酶 6B(KDM6B)在肝癌组织中的表达水平升高。JMJD3 是一个特异性的组蛋白去甲基化酶,能水解 H3K27me3 上的甲基,去除 H3K27me3 对基因转录的抑制作用^[2-4]。目前发现 JMJD3 与肿瘤的发生有着密切的关系,因此对其功能进行深入研究有着重要的意义。本试验采用小干扰 RNA(siRNA)技术研究 JMJD3 基因对肝癌细胞 QGY-7703 和 HepG2 细胞生长、增殖和侵袭的影响,报道如下。

1 材料与与方法

1.1 材料 肝癌细胞系 QGY-7703 细胞, HepG2 细胞,干扰质粒 pSilencer2.1/JMJD3-siRNA(siR-JMJD3),对照质粒 pSilencer2.1(siR-ctrl),均由天津医科大学生命科学中心实验室汤

华教授惠赠。

1.2 仪器与试剂 RPMI1640 培养基(GIBCO BRL,美国), MEM-α 培养基(GIBCO BRL,美国),细胞培养箱(Thermo Forma,美国),台式离心机(Eppendorf,德国),脂质体 Lipofectamine 2000 Reagent(Invitrogen,美国),四甲基噻唑蓝(MTT,SIGMA-ALDRICH,德国),Matrigel 胶(BD 公司),Transwell 侵袭小室(美国 Corning 公司),LabWorks™ 凝胶成像及分析系统(UVP,美国),兔源抗-JMJD3 抗体(天津赛尔生物技术有限公司),兔源抗-GAPDH 抗体(SIGMA-ALDRICH,德国),HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体(天津赛尔生物技术有限公司),BioTrace NT 硝酸纤维素膜(PALL,美国),Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent(PerkinElmer,美国),SuperRX 感光胶片,(FUJIFILM,日本),HQ-350XT 型显影、定影设备(苏州虎丘影像设备有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与转染 QGY-7703 细胞的培养基为 10%胎牛血清、100 IU/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 RPMI 1640; HepG2 的培养基为含 20%胎牛血清、100 IU/mL 青霉素、100

μg/mL 链霉素的 MEM-α,均置于 37 ℃ 含 5% CO₂ 的细胞培养箱培养。每 48~72 h 用含有 0.02% EDTA、0.1% 胰蛋白酶的消化液消化后,进行常规传代培养。将 QGY-7703/HepG2 细胞分为 2 组:转染阴性对照 (siR-ctrl) 组及干扰 JMJD3 (siR-JMJD3) 组,转染前 1 d 将细胞传代于 25 mL 细胞培养瓶中,待转染时细胞融合达到 60%~80%,按 Lipofectamine™ 2000 说明书的步骤分别转染 siR-ctrl 组和 siR-JMJD3 组。

1.3.2 Western Blot 检测 JMJD3 蛋白表达水平 转染后 48 h 弃掉原培养液,用蛋白裂解液提取细胞总蛋白。总蛋白进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,电转移至硝酸纤维素形成印迹,将膜置于含一抗的 5% 脱脂牛奶中室温封闭 2 h,漂洗后加入对应二抗,室温避光缓摇 2 h,暗室内,定影液定影,显影液现显影,曝光于 X 线片上。胶片用凝胶成像系统拍照,用分析系统分析检测的目的基因和内参 GAPDH,目的基因量化值比内参 GAPDH 量化值比表示蛋白表达丰度的相对值,从而反映细胞表达目的基因蛋白含量的差异。

1.3.3 MTT 检测分析细胞生长活性 转染前 1 d 分别取对数生长期的 QGY-7703 细胞和 HepG2 细胞种于 96 孔板中,每孔 QGY-7703 细胞用 0.15 μg, HepG2 细胞用 0.3 μg 的质粒 siR-ctrl 及 siR-JMJD3 转染细胞,每组设 3 个复孔。转染后 72 h,每孔加 MTT 10 μL (5 mg/mL),置 37 ℃,5% CO₂ 的孵箱,4 h 后每孔加 100 μL DMSO 终止反应并溶解甲臞蓝紫色颗粒,避光震荡混匀,分光光度计测波长为 570 nm 的各孔吸光度 (A₅₇₀) 值。

1.3.4 集落形成实验分析细胞集落形成能力 转染前 1 d 分别取对数生长期的 QGY-7703 细胞和 HepG2 细胞种于 24 孔板中,每孔 QGY-7703 细胞用 1 μg 的质粒, HepG2 用 2 μg 质粒转染细胞,转染后 48 h 后通过细胞计数将 QGY-7703 细胞 200 个/孔, HepG2 细胞 800 个/孔,种入 12 孔板中。每 3 d 更换 1 次培养液,以细胞数 ≥ 50 作为集落形成的标准,直至接种 12 孔板中集落之间发生互相融合后结束计数。选取代表性视野拍照。

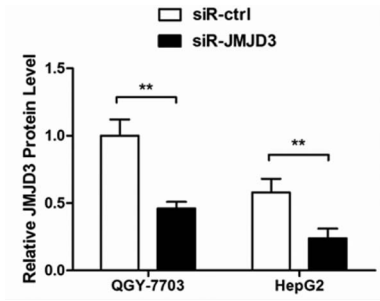
1.3.5 Transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力 将 Matrigel 于 4 ℃ 冰箱融化过夜,然后将 Matrigel 用无血清的 RPMI 1640 或 MEM-α 培养液稀释至终浓度为 2.5 mg/mL。每个小室中加 40 μL 稀释好的 Matrigel,左右倾斜晃动使胶均匀铺在上层小室中,放在 37 ℃ 孵箱中约 1 h,使胶重组成为模拟基底膜结构。常规消化细胞,将 60 000 个 QGY-7703 细胞或 120 000 个 HepG2 细胞稀释于 0.2 mL 含有 1% FBS 的 RPMI 1640 或 MEM-α 培养液中,直接接种到 Transwell 小室中央,每组 3 个复孔。小室下层为 800 μL 含 20% FBS 的 RPMI 1640 培养液或 30% FBS 的 MEM-α 培养液,37 ℃ 孵箱中放置。QGY-7703 细胞培养 24 h, HepG2 细胞培养 48 h,然后用棉签擦除小室里面的细胞,固定滤膜反面的细胞,2% 结晶紫溶液染色 15 min 后封闭,显微镜下观察并计数贴在滤膜反面的所有细胞,选取代表性视野拍照。

1.4 统计学处理 采用统计软件 SPSS19.0 进行数据分析,计数资料组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Western Blot 检测 JMJD3 蛋白表达 在 QGY-7703 细胞和 HepG2 细胞中,分别转染 siR-JMJD3 和 siR-ctrl 质粒,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳验证干扰质粒的有效性,结果显示转染 siR-JMJD3 后细胞中 JMJD3 的蛋白表达水平明显降低,分别下降了约 54% 和 59%,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),见

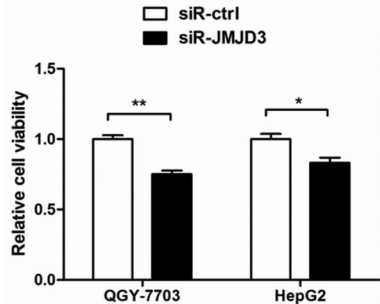
图 1。



注:与对照组 siR-ctrl 相比, ** $P < 0.01$ 。

图 1 转染 siR-JMJD3 及对照 siR-ctrl 后 JMJD3 在 QGY-7703 和 HepG2 细胞系中蛋白表达情况

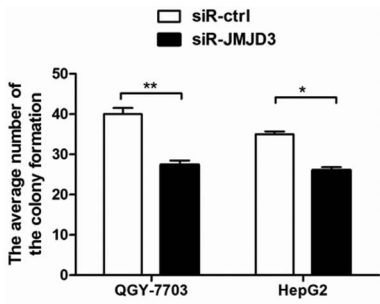
2.2 JMJD3 对肝癌细胞生长活性的影响 在 QGY-7703 细胞中,通过 MTT 实验检测细胞的生长活性,72 h 后发现转入 siR-JMJD3 敲降 JMJD3 的表达后,细胞生长活性与对照组相比降低约 25%,在 HepG2 细胞中,转入 siR-JMJD3 后,细胞生长活性约比对照组下降了 17%,见图 2。



注:与对照 siR-ctrl 相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 MTT 分析转染 siR-JMJD3 及对照 siR-ctrl 后 2 种细胞系的生长情况

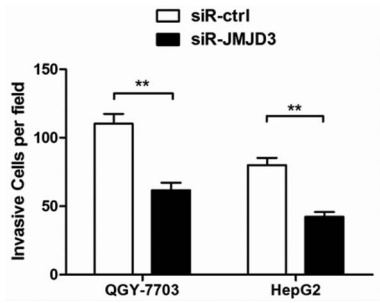
2.3 JMJD3 对肝癌细胞集落形成能力的影响 在 QGY-7703 细胞和 HepG2 细胞中,敲降 JMJD3 后,细胞的集落形成数量与对照组相比都有所减弱,QGY-7703 细胞与对照组相比下降了约 31%, HepG2 细胞下降了 25%。差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 3 和图 4 (见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。



注:与对照 siR-ctrl 相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 转染 siR-JMJD3 及对照 siR-ctrl 后 2 种细胞系集落计数的定量分析

2.4 JMJD3 对肝癌细胞侵袭能力的影响 在 QGY-7703 细胞和 HepG2 细胞中,通过转入 siR-JMJD3 后,与对照组相比侵袭率在 QGY-7703 细胞中下降了约 44%,在 HepG2 细胞中下降了约 47%,见图 5 和图 6 (见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。



注:与对照 siR-ctrl 相比, ** $P < 0.01$ 。

图 5 转染 siR-JMJD3 及对照 siR-ctrl 后 2 种细胞系在显微镜下每个视野平均侵袭细胞数的定量分析

3 讨论

肝癌是一种在世界范围内常见的恶性肿瘤,它的发生和发展是一个多基因参与、多步骤完成的复杂过程,肝癌发病率目前仍呈上升趋势,且发病年龄变小。肝癌的侵袭转移是一个复杂的多步骤过程^[5],涉及细胞间黏附的改变、基底膜的降解、新生血管生成、肿瘤细胞的侵袭运动等多个步骤。因此,从分子生物学角度寻找肿瘤生长增殖及侵袭迁移的标志物已成为目前研究的热点。

组蛋白甲基化是一种重要的表观遗传学修饰,在基因表达调节方面发挥着重要的作用。JMJD3 是一个特异性的组蛋白去甲基化酶,对于巨噬细胞、T 细胞、B 细胞、神经元和软骨细胞发育分化具有重要调节作用^[6-9]。有研究报道,巨噬细胞中的 JMJD3 可催化 H3K27me3 去甲基化,该过程发现与炎症反应有密切关联^[2],这项研究为某些慢性炎症治疗带来了希望。另外, JMJD 家族去甲基化酶是通过参与性激素受体的信号转导来发挥其生理功能的,因此也可能与女性生殖系统肿瘤有一定联系。在女性乳腺癌细胞中 JMJD3 表达明显增加^[3],这是因为正常乳腺细胞中与发育相关的 HOX 基因启动子区的组蛋白往往发生甲基化修饰 (H3K27me3/2),这造成基因失活, JMJD3 活性过高可使组蛋白去甲基化,部分 HOX 基因表达增强,细胞发育异常最终癌变^[10]。有文献报道, JMJD3 不仅在女性乳腺癌中高表达,在 HPV 感染的女性宫颈癌^[11],转移性前列腺癌^[4], EB 病毒感染的霍奇金淋巴瘤^[12]、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤^[13],以及原发性肾癌^[14]中都是高表达,因此, JMJD3 在肿瘤的发生和发展中扮演着一个促癌基因的角色。本试验中 JMJD3 作为一个促癌基因,在肝癌细胞系中也是高表达的,为了研究 JMJD3 在肝癌细胞系中的功能本组做了以下试验。利用 RNA 干扰 (RNAi) 技术来降低内源性 JMJD3 的表达,以探索其在肝癌中的作用。RNAi 是正常生物体内抑制特定基因表达的一种现象,它是指当细胞中导入与内源性 mRNA 编码区同源的双链 RNA 时,该 mRNA 发生降解而导致基因表达沉默的现象。RNAi 具有特异性和高效性。本研究构建了 pSilencer/siR- JMJD3 质粒以达到敲除 JMJD3 基因的目的,来研究 JMJD3 对肝癌细胞的影响。在肝癌细胞中转染入 JMJD3 的干扰质粒后,肝癌细胞的生长、增殖、侵袭能力均降低。提示 JMJD3 可以作为肝癌基因治疗的一个潜在靶点,为肝癌治疗和研究提供了新的思路。

参考文献

[1] Roayaie S, Obeidat K, Sposito C, et al. Resection of hepatocellular cancer ≤ 2 cm: results from two western centers

[J]. Hepatology, 2013, 57(4): 1426-1435.

[2] De SF, Totaro MG, Prosperini E, et al. The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing[J]. Cell, 2007, 130(6): 1083-1094.

[3] Lan F, Bayliss PE, Rinn JL, et al. A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development[J]. Nature, 2007, 449(7163): 689-694.

[4] Xiang Y, Zhu Z, Han G, et al. JMJD3 is a histone H3K27 demethylase[J]. Cell Res, 2007, 17(10): 850-857.

[5] Mareel MM, Van Roy FM, Bracke ME. How and when do tumor cells metastasize[J]. Crit Rev Oncog, 1993, 4(5): 559-594.

[6] Satoh T, Takeuchi O, Vandenbon A, et al. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection [J]. Nat Immunol, 2010, 11(10): 936-944.

[7] Zhang F, Xu L, Xu L, et al. JMJD3 promotes chondrocyte proliferation and hypertrophy during endochondral bone formation in mice[J]. J Mol Cell Biol, 2015, 7(1): 23-34.

[8] Park DH, Hong SJ, Salinas RD, et al. Activation of neuronal gene expression by the JMJD3 demethylase is required for postnatal and adult brain neurogenesis[J]. Cell Rep, 2014, 8(5): 1290-1299.

[9] Manna S, Kim JK, Baugé C, et al. Histone H3 Lysine 27 demethylases Jmjd3 and Utx are required for T-cell differentiation[J]. Nat Commun, 2015, 6: 8152.

[10] Agger K, Cloos PA, Christensen J, et al. UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development[J]. Nature, 2007, 449(7163): 731-734.

[11] McLaughlindrubin ME, Crum CP, Mürger K. Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming[J]. Proc Nat Acad Sci, 2011, 108(5): 2130-2135.

[12] Anderton JA, Bose S, Vockerodt M, et al. The H3K27me3 demethylase, KDM6B, is induced by Epstein-Barr virus and over-expressed in Hodgkin's lymphoma[J]. Oncogene, 2011, 30(17): 2037-2043.

[13] Yan Z, Long S, Stupack DG, et al. JMJD3 promotes survival of diffuse large B-cell lymphoma subtypes via distinct mechanisms [J]. Oncotarget, 2016, 7(20): 29387-29399.

[14] Shen Y, Guo X, Wang Y, et al. Expression and significance of histone H3K27 demethylases in renal cell carcinoma[J]. BMC Cancer, 2012, 12(1): 470.

(收稿日期: 2016-12-12 修回日期: 2017-02-08)

