

## · 论 著 ·

# siRNA 干扰 ARD1 对人结直肠腺癌细胞株基因表达谱的影响\*

王晓斌<sup>1</sup>, 杨宏军<sup>1</sup>, 孙相华<sup>1</sup>, 代锡锋<sup>1</sup>, 周华华<sup>2</sup>, 白 松<sup>1△</sup>

1. 昆明医科大学第一附属医院干疗科, 云南昆明 650031;

2. 云南省曲靖市第一人民医院肿瘤科, 云南曲靖 655000

**摘要:**目的 探讨 siRNA 干扰抑制 ARD1 的表达对人结直肠腺癌细胞株基因表达谱的影响。方法 利用脂质体将筛选出的有效沉默 ARD1 的 siRNA 分别转染到 SW620、HCT-8 两株细胞中, 提取两株细胞的总 RNA 并应用安捷伦人全基因表达谱芯片检测转染前后基因表达谱的变化。结果 两株细胞中, 转染组相对于阴性对照组, 21 个基因共同上调 2 倍以上, 15 个基因共同下调 2 倍以上。结论 人结直肠腺癌细胞株 ARD1 沉默前后具有明显不同的基因表达谱, ARD1 在结直肠癌发生、发展中发挥原癌基因的作用。

**关键词:**ARD1; 结直肠癌; siRNA; RNA 干扰; 基因表达谱

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2021.05.003      **中图法分类号:**R735.34

**文章编号:**1673-4130(2021)05-0521-06

**文献标志码:**A

## Effect of siRNA interference ARD1 on gene expression profile of human colorectal adenocarcinoma cell line<sup>\*</sup>

WANG Xiaobin<sup>1</sup>, YANG Hongjun<sup>1</sup>, SUN Xianghua<sup>1</sup>, DAI Xifeng<sup>1</sup>, ZHOU Huahua<sup>2</sup>, BAI Song<sup>1△</sup>

1. Department of Cadre Recuperation, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650031, China; 2. Department of Oncology, the First People's Hospital of Qujing, Qujing, Yunnan 655000, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of siRNA interference on the gene expression profile of human colorectal adenocarcinoma cell line by inhibiting the expression of ARD1. **Methods** The liposomes were used to transfect the selected siRNA that effectively silenced ARD1 into SW620 and HCT-8 cells. The total RNA of the two cells was extracted and the gene was detected by Agilent human gene expression profile chip. **Changes in expression profiles.** **Results** Compared with the negative control group, 21 genes were up-regulated more than 2 times and 15 genes were down-regulated more than 2 times. **Conclusion** Human colorectal adenocarcinoma cell line ARD1 is obviously different gene expression profiles before and after silencing, and ARD1 plays a role of proto-oncogene to promote the initiation and development of colorectal cancer.

**Key words:** ARD1; colorectal cancer; siRNA; RNA interference; gene expression profile

结直肠癌包括结肠癌和直肠癌, 其病理类型有腺癌、鳞癌、腺鳞癌、髓样癌、印戒细胞癌、未分化癌等, 但其中最常见是腺癌。2018 年全球癌症数据统计报告显示, 全球结直肠癌的发病率在所有肿瘤中占第 3 位<sup>[1]</sup>。大量研究表明结直肠癌的发生发展由基因、环境、遗传及表观遗传学改变等复杂的因素所致<sup>[2]</sup>。近年来, 随着基因工程及分子生物学技术的发展, 肿瘤的靶向治疗和免疫治疗在结直肠癌的治疗中发挥了重要作用, 因此, 寻找新的、有效检测和治疗靶点, 阐明结直肠癌的发病机制, 对结直肠癌的早期诊断和治疗尤为重要。ARD1 基因编码的 ARD1 蛋白是一个

乙酰转移酶, 首先是在酵母细胞中发现的, 在酵母细胞中, ARD1 蛋白与细胞周期相关<sup>[3]</sup>; 而在真核细胞中的 ARD1 蛋白也具有乙酰转移酶的活性, 能乙酰化多种蛋白质<sup>[4]</sup>。我国多位学者研究发现, 人 ARD1 (hARD1)蛋白在胃癌、结肠癌、乳腺癌、鼻咽癌等恶性肿瘤组织中呈高表达<sup>[5-8]</sup>, 但相对于其他很多已知功能的基因和蛋白, ARD1 的生物学功能仍不清楚。据此, 本研究通过 siRNA 特异性抑制人结直肠腺癌细胞株 ARD1 的表达, 再利用基因芯片技术分析 ARD1 沉默前后基因表达谱的变化, 旨在通过对其他已知生物学功能的基因变化来阐明 ARD1 的功能及其在结

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81660410)。

作者简介: 王晓斌, 男, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤、老年学及临床营养相关研究。 △ 通信作者, E-mail: baisong523@163.com。

本文引用格式: 王晓斌, 杨宏军, 孙相华, 等. siRNA 干扰 ARD1 对人结直肠腺癌细胞株基因表达谱的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2021,

直肠癌发生发展中的分子生物学机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料来源** 结直肠腺癌细胞株 HCT-8 和 SW620(中科院上海肿瘤研究所);培养基 Opti-MEM<sup>®</sup>、Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000、Trizol(美国 Invitrogen 公司);RPMI-1640 培养基、L-15 粉剂、0.25% 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);焦碳酸二乙酯(DEPC)、二甲基亚砜(DMSO)由美国 Sigma 公司提供;新生牛血清(中国杭州四季青公司);PBS 干粉(北京中杉金桥公司);siRNA 由 RiboBio 公司(上海)合成。本研究使用由上海伯豪生物技术有限公司/生物芯片上海国家工程研究中心提供的安捷伦人全基因 4×44K 芯片并由该公司提供技术平台及数据分析系统。

**1.2 人结直肠腺癌细胞株 HCT-8 和 SW620 培养** HCT-8 生长于含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养基中,SW620 细胞生长于含 10% 新生牛血清的 L-15 培养基,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温条件下常规培养及传代。

**1.3 siRNA 的设计合成** 本课题组前期的研究中<sup>[9]</sup>,筛选出沉默效率最高的 siRNA,该序列成功将 HCT-8 和 SW620 的 ARD1 基因沉默,并通过反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)证实该 siRNA 沉默效率达 79.7%(以 Actin 为内参),其靶序列为 GGT GGA GAG CAA AGG CAA T,正义链:5'-GGU GGA GAG CAA AGG CAA U dTdT-3',反义链:3'-dTdT CCA CCU CUC GUU UCC GUU A-5'。将该序列交由 Ribobio 公司合成,阴性对照-siRNA 也购自该公司,锐博公司对该序列保密。

**1.4 siRNA 转染 HCT-8、SW620 细胞** HCT-8 和 SW620 两株细胞分别设转染组、阴性对照组和空白对照组。其中转染组使用 ARD1-siRNA 按 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 转染步骤进行细胞转染;阴性对照组使用阴性对照-siRNA 转染,转染步骤同转染组。空白对照组培养板中不做任何处理。

**1.5 转染效率检测** 转染 20 h 后,用倒置荧光显微镜对各组细胞进行拍照、对比及记录,观察结束后将培养板放入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下继续培养。

**1.6 RNA 提取和质检** 培养 72 h 后,Trizol 试剂提取 6 个样品的总 RNA,用 Nanodrop ND-1000 超微量分光光度计检测 RNA 浓度和纯度,采用安捷伦 2100 生物分析仪按标准流程评估 6 个 RNA 样品的质量,合格样品的标准是 2 100RIN≥7.0 并且 28S/18S≥0.7。

**1.7 基因芯片检测质控** 各组基因芯片质控指标为变异系数(CV)和检出率,CV 计算方法为标准偏差与平均值之比,用百分数表示,安捷伦表达谱芯片通过

10 次重复探针点信号的 CV 来判断芯片的稳定性和技术的稳定性;检出率的计算方法为检出点总数与全部探针数的比值。

**1.8 芯片的杂交和分析** 使用安捷伦微阵列芯片扫描仪对本研究完成杂交的芯片进行扫描,然后用安捷伦特征提取软件 10.7 读取数据,用安捷伦基因表达数据分析软件 11.0 对数据归一化处理,算法为四方位点函数。差异基因筛选标准为上调或下调的倍数变化(FC)≥2.0 或 FC≤0.5。为使差异基因更具代表性,本研究分别在两株细胞的阴性对照组与空白对照组之间比较、转染组与阴性对照组之间比较,比较出两组细胞的差异基因后用 Microsoft office Access 2003 软件求其交集得出共同发生了变化的基因,再在共同变化的基因中挑选出共同上调或下调 2 倍以上的基因,除去 GenBank 中没有注释的基因后作为研究的基因。将筛选出的表达差异的基因上传至 SBC 生物芯片分析系统(网址: <http://sas.ebioservice.com/>),采用美国国家生物技术信息中心(NCBI)基本信息注释(NCBI Entrez Gene 数据库 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)、基因本体论(GO)功能注释(GO 数据库 <http://www.geneontology.org/>)、京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析(KEGG 数据库 <http://www.genome.jp/kegg/>)等方法对差异基因按生物学过程进行归类,查阅核苷酸序列数据库(GenBank)及相关文献,对其结果进行深入的分析和讨论。

**1.9 统计学处理** 使用 SBC 生物芯片分析系统(网址: <http://sas.ebioservice.com/>),数据采用 t 检验进行统计学分析,取 P<0.05 和 q<0.05 为筛选显著性 pathway 和 GO 的阈值。

## 2 结 果

**2.1 荧光显微镜观察 siRNA 转染效率** 转染 20 h 后倒置荧光显微镜观察,荧光细胞代表成功转染的细胞,两株细胞的转染效率均达到 80% 以上。

**2.2 各组 RNA 样品的提取和质检结果** HCT-8-转染组、HCT-8-阴性对照组和 HCT-8-空白对照组总 RNA 样本的 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 的值分别为 1.87、1.88、1.90;SW620 转染组、SW620-阴性对照组和 SW620-空白对照组总 RNA 样本的 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 的值分别为 1.85、1.88、1.89。电泳结果证实 6 个样品均为 2 100RIN>7.0 并且 28S/18S>0.7,说明已抽提到纯度较高、完整性较好的总 RNA,见图 1、2。

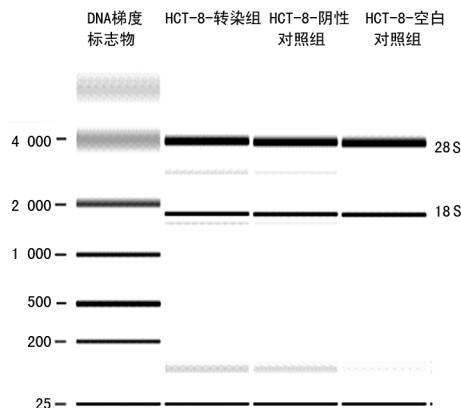


图 1 HCT-8 细胞总 RNA 样品凝胶电泳图

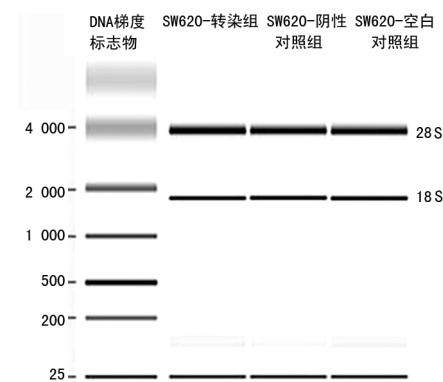


图 2 SW620 细胞总 RNA 样品凝胶电泳图

**2.3 基因芯片检测质控** 对各组芯片进行检测质控, 显示质控指标 CV 全部小于 10%, 表示芯片具有良好的稳定性和技术性, 见表 1。

表 1 各组芯片质控指标 CV 和检出率(%)

组别	CV	检出率
HCT-8-转染组	3.75	69.50
HCT-8-阴性对照组	3.63	69.59
HCT-8-空白对照组	3.55	68.65
SW620-转染组	4.30	71.33
SW620-阴性对照组	4.35	68.60
SW620-空白对照组	3.87	70.34

**2.4 差异基因的筛选** 安捷伦人全基因表达谱芯片涵盖了 17 704 个转录本(RNA), 通过该芯片分析, HCT-8 和 SW620 两株细胞阴性对照组与空白对照组比较, 共同上调 2 倍以上的基因数有 13 个, 包括 IFI44L、XDH、CCL4 等, 共同下调 2 倍以上的基因数有 8 个, 包括 RCOR1、ANKLE1、DUOX1 等; 转染组与阴性对照组比较, HCT-8 和 SW620 两株细胞共同上调 2 倍以上的基因数有 21 个, 共同下调 2 倍以上的基因数有 15 个, 见表 2、3。

表 2 HCT-8 和 SW620 两株细胞转染组和阴性对照组比较共同上调 2 倍以上的基因

基因号	基因名称	基因描述	HCT-8 FC	SW620 FC
2832	NPBWR2	神经肽 B/W 受体 2	2.116 8	2.057 9
7007	TECTA	肌动蛋白 $\alpha$	5.267 7	2.061 8
3663	IRF5	干扰素调节因子 5	2.338 7	2.070 3
10913	EDAR	外胚叶发育不全 A 受体	5.571 5	2.140 7
196951	C15orf33	15 号染色体开放阅读框 33	2.505 2	2.358 3
3239	HOXD13	同源盒 D13	4.806 5	2.371 4
220202	ATOH7	无性同源物 7(果蝇)	2.989 9	2.427 0
115908	CTHRC1	胶原三股螺旋重复蛋白 1	2.032 5	2.443 6
10767	HBS1L	HBS1 样蛋白(酿酒酵母)	4.748 8	2.488 7
8334	HIST1H2AC	组蛋白簇 1, H2ac	2.287 3	2.854 3
85236	HIST1H2BK	组蛋白簇 1, H2bk	2.016 7	2.871 2
401105	FLJ42393	假定蛋白 LOC401105	3.039 3	3.649 9
112755	STX1B	突触融合蛋白 1B	3.078 4	4.036 0
346	APOC4	阿朴脂蛋白 C-IV	3.337 5	4.121 3
170689	ADAMTS15	具有血小板结合蛋白结构域的去整合素金属蛋白酶 15	21.787 6	4.220 6
100288144	LOC100288144	假定蛋白 LOC100288144	3.173 9	4.782 7
145282	MIPOL1	镜像多指畸形 1	3.045 0	7.737 7
7042	TGFB2	转化生长因子- $\beta$ 2	2.057 9	9.588 4
2155	F7	凝血因子 VII(血清凝血酶原转化促进剂)	3.429 4	10.713 8
3741	KCNA5	电压门控通道钾离子蛋白 5	6.293 5	10.976 9
120400	FAM55A	序列相似家族 55, 成员 A	4.388 5	15.604 0

表 3 HCT-8 和 SW620 两株细胞转染组和阴性对照组比较共同下调 2 倍以上的基因

基因号	基因名称	基因描述	HCT-8 FC	SW620 FC
340252	ZNF680	锌指蛋白 680	0.090 4	0.043 8
1009	CDH11	钙黏蛋白 11, 第 2 型, OB-钙黏蛋白(成骨细胞)	0.494 0	0.070 4
10964	IFI44L	干扰素诱导蛋白 44 样蛋白	0.026 0	0.076 1
572558	LOC572558	假设基因座 LOC572558	0.083 4	0.163 7
6351	CCL4	CC 趋化因子配体 4	0.171 6	0.210 5
7498	XDH	黄嘌呤脱氢酶	0.263 4	0.229 5
642838	LOC642838	类似于 hCG1742442	0.369 6	0.231 0
10499	NCOA2	核受体辅活化子 2	0.439 3	0.256 2
114614	MIRHG2	microRNA 宿主基因 2(非蛋白质编码)	0.293 5	0.265 5
10579	TACC2	转化酸性卷曲含蛋白质 2	0.401 3	0.331 7
84779	ARD1B	ARD1 同源物 B(酿酒酵母)	0.404 1	0.397 4
8260	ARD1A	ARD1 同源物 A, N-乙酰基转移酶(酿酒酵母)	0.363 4	0.404 2
718	C3	补体成分 3	0.485 9	0.428 2
91010	FMNL3	成蛋白样 3 型蛋白	0.182 2	0.450 5
653509	SFTPA1	表面活性蛋白 A1	0.481 0	0.459 1

## 2.5 差异基因的生物学信息分析

**2.5.1 差异基因功能 GO 分析** 通过 GO 分析, 阴性对照组与空白对照组比较, 与分子功能相关的差异表达基因占 0.07% (11/15 374), 其中包括催化活性、运输活性、结合、电子载体活性等; 与生物过程相关的差异表达基因占 0.09% (13/14 369), 其中包括繁殖、免疫系统过程、代谢过程、细胞过程等功能; 与细胞组成相关的差异表达基因占 0.08% (13/16 123), 包括胞外器官、大分子复合物、突触等。GO 分析结果显示, 差异表达的基因主要与电子载体活性、病毒繁殖、对刺激的反应等相关性较高。转染组与阴性对照组比较, 与分子功能相关的差异表达基因占 0.17% (26/15 374), 其中包括结构分子活动、转运活动、通道调节活动、核酸结合、蛋白结合、转录调节活性、翻译调节活性、分子传感器活动及转录因子活性等; 与细胞组成相关的差异表达基因占 0.17% (27/16 123), 包括细胞质、细胞外基质、细胞膜等。与生物过程相关的差异表达基因占 0.2% (29/14 369), 其中包括: 代谢过程、免疫系统程序、繁殖程序、发育过程等; GO 分析结果显示, 差异表达的基因与胞外器官、节律程序、生殖程序、免疫系统程序、生物黏附、辅助性运输蛋白活性、翻译调控活动、生物过程的正向调节等功能相关性较高。

**2.5.2 差异基因与信号通路的相关性分析** 差异基因信号通路分析结果显示, 阴性对照组与空白对照组比较表达差异的基因与自由基诱导细胞凋亡通路、细胞因子与炎性反应、IL-17 信号通路、细胞因子与细胞因子相互作用、胰岛素信号通路、过氧化物酶体增生

物激活受体信号通路等多种重要信号通路相关。转染组与阴性对照组比较表达差异的基因与 Tolls 样受体信号通路、自由基诱导细胞凋亡通路、ERBB2 在信号转导和肿瘤中的作用、细胞因子受体在 T 细胞极化进程中的选择性表达、大肠癌、胰腺癌、肾细胞癌、转化生长因子-β 信号通路、细胞周期、细胞因子信号通路、促分裂原活化蛋白激酶信号通路、癌症通路等多种重要信号通路相关。差异表达的基因中主要是 XDH、转化生长因子-β2 等基因参与了上述通路的信号转导。

## 3 讨 论

ARD1 在健康人体组织中都有表达<sup>[10]</sup>, 但在肿瘤组织, 特别是恶性肿瘤组织中呈高表达, 本课题组前期的研究中从 mRNA 和蛋白水平证明了 ARD1 在人结直肠癌细胞株 HCT-8、LS174T 和 SW620 中均为高表达<sup>[11]</sup>; 从蛋白水平证明了 ARD1 在人体组织中的表达水平结直肠癌组织高于癌旁和切缘组织, 正常结直肠组织几乎不表达<sup>[6]</sup>; 在结直肠癌裸鼠动物模型的肿瘤组织中也得出了类似的结果<sup>[12]</sup>。研究发现 ARD1 的 5 种亚型, 分别是 mARD1198、mARD1225、mARD1235、hARD1131 和 hARD1235, ARD1 在人类正常细胞中, ARD1 对细胞增殖起促进作用, 但在人类的肿瘤细胞中, 起促进细胞增殖和抑制细胞凋亡的作用<sup>[13-14]</sup>。这些研究表明 ARD1 有可能成为结直肠癌早期诊断的特异性肿瘤标志物或者基因治疗中的特异性靶点。RNA 干扰作为未知基因功能的研究手段之一, 广泛应用于肿瘤的研究和治疗<sup>[15-19]</sup>; 我国学者也预测 RNA 干扰药物可能在未来成为治疗肿瘤、

艾滋病、阿尔茨海默病等重大疾病的主流药物<sup>[20]</sup>。

本研究发现 ARD1 经 RNA 干扰后的转染组和阴性对照组与空白对照组比较,随着时间的延长,细胞的生长速度显著减慢,凋亡细胞显著增多。这不仅证实了 ARD1 对保持细胞的正常活性有着重要的意义和 ARD1 在细胞生存中的关键作用,同时也反向说明了本研究中 siRNA-ARD1 对 ARD1 的沉默效果。此外,利用基因芯片技术杂交分析后转染组与阴性对照组比较,HCT-8 和 SW620 两株细胞均出现了 ARD1 的同源基因 ARD1A 和 ARD1B 下调,再次验证了本研究中 siRNA-ARD1 对 ARD1 的沉默效果。对于 siRNA 沉默 ARD1 后出现的这种细胞增殖速度减慢、凋亡增加的现象,推测可能与以下几种机制有关:(1)与 ARD1 的关系。前面提到 ARD1 蛋白作为乙酰转移酶,在肿瘤细胞中起促进 ARD1 作为 NATs 中增殖和抑制凋亡的作用,当 ARD1 被 siRNA 沉默后,靶蛋白被其他乙酰转移酶乙酰化,错误的乙酰化蛋白无法被细胞识别而是细胞进入凋亡程序。ARD1 与  $\beta$ -catenin 有关。研究证实了在肺癌中 ARD1 激活了  $\beta$ -catenin,进而激活了 cyclin D1 促进肺癌发展的途径<sup>[21]</sup>,ARD1 对  $\beta$ -catenin 乙酰化后激活上述通路,加速癌细胞发展的细胞周期循环。有研究发现 ARD1- $\beta$ -catenin-cyclin D1 途径中可能有外源性因子直接影响  $\beta$ -catenin 或 cyclin D1,可能是 NATH-hARD1 底物乙酰化激活了一个组氨酸转移酶,后者 HAT 再乙酰化  $\beta$ -catenin 导致它的活化。(2)与转染试剂脂质体的关系。大量研究证实了脂质体作为转染试剂,本身会参与及影响细胞的增殖及凋亡,如抑制 ATP 酶的活性、参与蛋白激酶 C 通路调节等<sup>[22]</sup>。而这些作用就是脂质体所致的细胞毒性,对细胞的生理活动产生很大的影响。本研究中,对转染后的细胞进行动态观察时发现有时阴性对照组部分细胞出现成片死亡,其原因可能就是该部位由于脂质体的浓集导致的细胞成片死亡。因为阴性对照组中加入阴性对照-siRNA 不会对细胞基因表达产生影响,通过对比阴性对照组和空白对照组在基因表达谱上的差异,实际上就是验证脂质体对细胞基因表达产生的影响,将对比发现的差异基因通过信号通路分析,差异基因主要参与了自由基诱导细胞凋亡通路、IL-17 信号通路等有关,其中在自由基诱导细胞凋亡中可能通过上调 XDH 基因、介导超氧阴离子发挥诱导细胞凋亡的作用,从而诱导细胞发生凋亡。通过本研究也从基因 mRNA 层面证明了脂质体对细胞生理活动会产生影响。所以,RNA 干扰的研究中应充分关注脂质体的细胞毒性作用,同时需要研发新的转染速度快、转染效率和基因沉默率高、细胞毒性低的转染试剂。本研究利用转染组与阴

性对照组比较其基因表达谱的差异,是因为转染组和阴性对照组的细胞受到脂质体的影响,转染组的 siRNA-ARD1 进入细胞后可以高选择性、高效率地沉默 ARD1,而阴性对照组中加入的阴性对照-siRNA 进入细胞后并不会引起基因表达谱的变化,这样的设计最大程度消除了脂质体对研究结果的影响,使实验结果更加客观。此外,本研究将两株细胞分析所得差异基因的数据用 Microsoft office Access 2003 软件求其交集得出了共同发生变化的基因,再在共同变化的基因中挑选出共同上调和下调 2 倍以上的基因,除去 GenBank 中没有注释的基因后作为进一步研究的基因。虽然这样筛选出的差异基因少了,但这些基因均在两株细胞中出现了共同的变化,与 ARD1 和结直肠癌的关系更密切,不仅可以减少数据分析的工作量,还更有助于发现与 ARD1 紧密相关的基因。按上述方法筛选出基因,经 GO 分析和信号通路分析后,发现 ARD1 与结直肠癌通路、转化生长因子- $\beta$  信号通路、促分裂原活化蛋白激酶信号通路等相关性最大,差异表达的基因中主要是转化生长因子- $\beta$ 2 基因参与了上述通路的信号转导。转化生长因子- $\beta$ 2 是转化生长因子- $\beta$  家族中的一个亚型,通过检索 Oncomine 数据库中转化生长因子- $\beta$ 2 在实体肿瘤中表达水平,在 456 个研究数据中有 44 个研究表达升高,有 34 项研究表达降低。赵丽等<sup>[23]</sup>研究发现转化生长因子- $\beta$ 2 在肺腺癌组织中表达明显下调,且转化生长因子- $\beta$ 2 低表达的肺癌患者总生存期更短。在结直肠癌发生发展中,转化生长因子- $\beta$  也是作为肿瘤抑制因子发挥作用的<sup>[24]</sup>。但在细胞分化的各个时期,其机制并不相同,在 G1 早期,转化生长因子- $\beta$  通过诱导抑制信号作用于原癌基因 c-myc,从而阻止肿瘤形成;而在 G1 晚期,转化生长因子- $\beta$  通过增加 CDK 的抑制性蛋白抑制 CDK 的功能,使 G1 期细胞停止生长,进而诱导细胞分化或凋亡。本研究中,结直肠癌细胞系中 ARD1 沉默后转化生长因子- $\beta$ 2 表达明显上调,结合前期研究,推测 ARD1 是在结直肠癌的发生发展中发挥原癌基因的作用,通过结直肠癌通路、转化生长因子- $\beta$  信号通路、促分裂原活化蛋白激酶信号通路等参与了结直肠癌的发生发展。

本研究利用基因表达谱芯片分析了 siRNA 干扰 ARD1 的表达后对人结直肠腺癌细胞株基因表达谱的影响,首先,本研究从基因层面证明了脂质体对细胞的毒性作用,在以脂质体为载体的科学实验中,其对细胞的毒性作用需要研究者引起足够的重视;另外,本研究初步探讨了 ARD1 的功能和它在人结直肠腺癌细胞中的生物学效应,推测 ARD1 是在结直肠癌的发生发展中发挥原癌基因的作用,通过结直肠癌通

路、转化生长因子-β信号通路、促分裂原活化蛋白激酶信号通路等参与了结直肠癌的发生发展。本研究也为继续深入研究 ARD1 提供了新的线索,为研究者了解结直肠癌的发病机制、药物研发、疫苗研制和基因治疗等更深入的研究提供了理论依据。

## 参考文献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] GUINNEY J, DIENSTMANN R, WANG X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer[J]. Nat Med, 2015, 21(11): 1350-1356.
- [3] ARNESEN T, ANDERSON D, BALDERSHEIM C, et al. Identification and characterization of the human ARD1-NATH protein acetyltransferase complex[J]. Biochem J, 2005, 386(3): 433-443.
- [4] VO T T L, PARK J H, SEO J H, et al. ARD1-mediated aurora kinase A acetylation promotes cell proliferation and migration[J]. Oncotarget, 2017, 8(34): 57216-57230.
- [5] WANG Y G, XU L, JIA R R, et al. DDR2 induces gastric cancer cell activities via activating mtorc2 signaling and is associated with clinicopathological characteristics of gastric cancer[J]. Dig Dis Sci, 2016, 61(8): 2272-2283.
- [6] 白松, 邵佳发, 王维琦, 等. hARD1 在人大肠腺癌中的表达及与肿瘤分化的相关性[J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(15): 1585-1590.
- [7] LIU M, ZHANG W Y, TANG W, et al. Isocyclopamine, a novel synthetic derivative of cyclopamine, reverts doxorubicin resistance in MCF-7/ADR cells by increasing intracellular doxorubicin accumulation and downregulating breast cancer stem-like cells[J]. Tumour Biol, 2016, 37(2): 1919-1931.
- [8] 贾培荣, 曾妍, 郑军, 等. ARD1 在鼻咽癌中的表达及临床意义研究[J]. 重庆医学, 2016, 45(2): 183-185.
- [9] 钟孝斌. RNA 干扰 ARD1 对大肠癌细胞株细胞周期影响的研究[D]. 昆明: 昆明医学院, 2011.
- [10] JEONG J W, BAE M K, AHN M Y, et al. Regulation and destabilization of HIF-1 alpha by ARD1-mediated acetylation[J]. Cell, 2002, 111(5): 709-720.
- [11] 白松, 周媛媛, 田风, 等. ARD1 在人大肠腺癌细胞 SW620、LS-174T 和 HCT-8 中的表达[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(5): 914-916.
- [12] 陈占旗. VEGF, bcl-2 和 TNF-a 在 shRNA 沉默 ARD1 后大肠癌裸鼠移植瘤中的表达及相关性研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2016.
- [13] ARNESEN T, GROMYKO D, PEDINO F, et al. Induction of apoptosis in human cells by RNAi-mediated knockdown of hARD1 and NATH, components of the protein N-alpha-acetyltransferase, complex [J]. Oncogene, 2006, 25(31): 4350-4360.
- [14] PARK J, KANAYAMA A, YSMSMOYO K, et al. ARD1 binding to RIP1 mediates doxorubicin-induced NF-κB activation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 422(2): 291-297.
- [15] HOY S M. Patisiran: first global approval[J]. Drugs, 2018, 78(15): 1625-1631.
- [16] KEAM S J. Inotersen: first global approval[J]. Drugs, 2018, 78(1): 1371-1376.
- [17] ADAMS D, GONZALEZ-DUARTE A, O'RIORDAN W D, et al. Patisiran, an RNAi therapeutic, for hereditary transthyretin amyloidosis[J]. N Engl J Med, 2018, 379(1): 11-21.
- [18] BENSON M D, WADDINGTON-CRUZ M, BERK J L, et al. Inotersen treatment for patients with hereditary transthyretin amyloidosis[J]. N Engl J Med, 2018, 379(1): 22-31.
- [19] WOOD H. FDA approves patisiran to treat hereditary transthyretin amyloidosis[J]. Nat Rev Neurol, 2018, 14(10): 570.
- [20] 颜炳学, 米玉倩, 崔庆为, 等. RNA 干扰药物: 下一代治疗药物[J]. 科学通报, 2020, 65(7): 540-546.
- [21] LIM J H, PARK J W, CHUN Y S. Human arrest defective 1 acetylates and activates beta-catenin, promoting lung cancer cell proliferation[J]. Cancer Res, 2006, 66(22): 10677-10682.
- [22] DATILES M J, JOHNSON E A, MCCARTY R E. Inhibition of the ATPase activity of the catalytic portion of ATP synthases by cationic amphiphiles[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1777(1): 362-368.
- [23] 赵丽, 章淑芳, 周杨, 等. TGF-β2 表达水平与肺腺癌患者预后的关系[J]. 临床肺科杂志, 2020, 25(1): 82-87.
- [24] 李毅, 程勇. TGF-β-Smad 信号转导通路与大肠癌发生发展相关性研究的现状[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 20(15): 1181-1184.

(收稿日期: 2020-05-18 修回日期: 2021-02-06)