

siRNA 抑制 α 乙酰辅酶 A 羧化酶基因表达促进前列腺癌干细胞凋亡*

杨 波¹, 赵德明², 刘 辉¹, 刘 峰¹, 郝继东¹, 王伟峰¹, 万建省¹ (1. 上海市浦东新区周浦医院 201318; 2. 上海市第七人民医院 201318)

【摘要】 目的 研究 ACC- α RNA 干扰对前列腺癌干细胞增殖的影响。**方法** 设计并合成 ACC- α 基因的小干扰 RNA (siRNA), 转染前列腺癌干细胞系, 通过 Western blot 检测 RNA 干扰对 ACC- α 表达的影响, 并使用 MTT 法检测 RNA 干扰对细胞增殖的影响, 使用荧光染色法分析前列腺癌干细胞的凋亡状况。**结果** siRNA 干扰 96 h 后可见 ACC- α 表达显著下调, 转染 96 h 后前列腺癌干细胞增殖状况显著下降, 通过荧光染色观察发现, siRNA 干扰造成癌细胞的大量凋亡。**结论** siRNA 干扰 ACC- α 可以通过诱导凋亡显著的抑制前列腺癌干细胞的增殖, ACC- α 是前列腺癌潜在的治疗靶点。

【关键词】 siRNA; α 乙酰辅酶 A 羧化酶; 前列腺癌; 干细胞

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2013. 22. 011 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)22-2960-02

Apoptosis of prostate cancer stem cells induced by α acetyl-CoA-carboxylase gene silencing mediated by siRNA* YANG Bo¹, ZHAO De-ming², LIU Hui¹, LIU Feng¹, HAO Ji-dong¹, WANG Wei-feng¹, WAN Jian-sheng¹ (1. Zhoupu Hospital of Shanghai Pudong New Area, Shanghai 201318, China; 2. the Seventh People's Hospital of Shanghai, Shanghai 201318, China)

【Abstract】 Objective To investigate the role of ACC- α siRNA interference in prostate stem cells proliferation. **Methods** The siRNA of ACC- α and transfect prostate stem cell were designed and synthesized. The effect of siRNA on ACC- α expression was detected by western blot. MTT assay was used to detect the prostate stem cell proliferation and the apoptosis of prostate stem cells were evaluated by fluorescent staining. **Results** The expression of ACC- α was significantly lower and the propagation of prostate cancer stem cells decreased obviously after 96 h transfection. There was a large number of cancer cell apoptosis under fluorescence microscopy by siRNA interference. **Conclusion** siRNA interference ACC- α can suppress prostate proliferation through inducing cell apoptosis, which was a potential therapeutic target of prostate cancer.

【Key words】 siRNA; α acetyl-CoA-carboxylase; prostate cancer; stem cells

目前的研究证实, 前列腺癌起源于前列腺癌干细胞, 前列腺癌干细胞在前列腺癌的发生、发展过程中具有至关重要的作用^[1-3]。联合应用传统肿瘤放化疗和肿瘤干细胞靶向治疗药物将可能从根本上治愈肿瘤, 因此肿瘤干细胞将成为人类癌症治疗的新靶标^[4]。小干扰 RNA (siRNA) 通过向细胞内导入长度为 21~23 的核苷酸序列, 高度特异性地降解同源 mRNA 序列, 从而有效地阻止相应蛋白质的表达^[5-6]。本研究将采用这一技术对前列腺癌干细胞进行干预, 并且以此为基础来发现药物的潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 标本来源 前列腺癌干细胞由本实验室从 DU145 细胞株中筛选来, 大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存, PsiencerTM 4.1-CMV neo 真核表达载体购自 Ambion 公司, 质粒抽提纯化试剂盒和 T4 DNA 连接酶购自 Takara 公司, 真核转染试剂 lipofectamineTM 2000 和 Trizol 购自 Invitrogen 公司, cDNA 合成试剂盒购自 MBI 公司, G418 购自美国 Alexis 公司, ACC- α 二抗购自碧云天生物技术公司。Hoechst 33342 染料购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 的合成 使用设计工具软件 (参见 www. ambion. com/ techlib/ misc/siRNAfinder. html), 依据试剂盒 (美国 Ambion 公司) 所提供步骤合成。 α 乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC-

α) siRNA 序列为: CAAUGGCAUUGCAGCAGUGdTdT, 反义序列: C ACUGCUGC AAUGC-C AUUGdTdT。

1.2.2 特异的 siRNA 表达载体的构建及序列测定 取 PsiencerTM 4.1-CMV neo 与退火后的双链 siRNA 模板混合, 在 T4 DNA 连接酶的作用下, 22 $^{\circ}\text{C}$ 1 h, 65 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 形成重组质粒。将重组质粒和 Ambion 公司试剂盒提供的阳性对照质粒和阴性对照转染至感受态细胞 DH5 α 。感受态细菌制备和转化参照文献。挑取阳性克隆扩增培养后, 抽提并纯化质粒, 由上海生工生物工程公司测序并鉴定阳性克隆。

1.2.3 细胞培养及转染 前列腺癌干细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱内培养。转染前 1 d 胰酶消化细胞并计数, 细胞铺板, 使其在转染日密度达到 90%。转染步骤按 LipofectamineTM 2000 说明书进行, 约 6~8 μg 的 ACC- α siRNA 质粒、P75 2-siRNA 质粒、P75 3-siRNA 质粒, 分别用 15 μL LipofectamineTM 2000 转染至 SKBR3 细胞, 空白对照以双蒸水替代质粒。

1.2.4 Western blot 检测 ACC- α 表达 分为空白对照组、ACC- α siRNA 转染组, 分别于处理 24、72、96 h 后提取蛋白, 定量并进行 SDS-PAGE 电泳, 120 伏电泳 90 min, 然后 200 mA 2 h 电转印于 PVDF 膜上。用封闭液 (1 $\times$ TBST, 5% 脱脂奶粉) 室温振荡封闭 2 h, 洗膜。加入兔抗人 P75 一抗 (1:200), 室温

* 基金项目: 上海市浦东新区卫生系统优秀学科带头人培养计划 (PWRd 2011-08); 上海市浦东新区卫生局科研课题项目 (PW2012A-34)。

孵育 2 h,洗膜,加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:2 000)室温孵育 1.5 h,洗膜。最后用 ECL 化学发光试剂盒检测杂交信号,在 Bio-Rad 凝胶仪上成像。

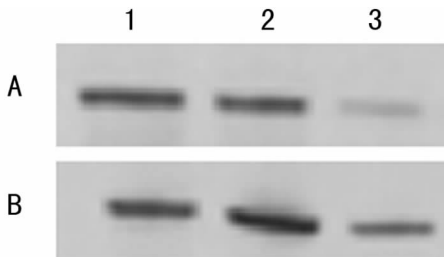
1.2.5 细胞增殖作用的影响 实验分两组:空白对照组,siRNA 转染组。按 2×10^4 /mL 接种于 96 孔板,细胞贴壁后更换无血清 DMEM 培养液,37℃、5% CO₂ 中培养 6 h,细胞同步化后用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液 100 μL(含 100 ng/μL NGF)^[3],继续培养 24、48、72 h,然后每孔加 20 μL MTT 继续培养 4 h,弃培养液,加入二甲亚砜(DMSO) 100 μL,振荡使结晶完全溶解,30 min 后用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度值[A(490)],每组平均 5 个复孔,重复 3 次。

1.2.6 荧光染色观察 转染 96 h 后在细胞培养液中加入 Hoechst 33342 染料,培养 2 h 后使用荧光显微镜观察细胞核的形态变化。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Western Blot 检测 siRNA 转染效果 细胞系转染 siRNA 后的 24、72 h 和 96 h 后提取细胞总蛋白经 Western blot 检测发现,ACC-α 的表达在转染后的 96 h 明显下调,说明 siRNA 转染成功抑制了 ACC-α 的表达。



注:A 为 ACC-α siRNA 转染组;B 为空白对照组;1 表示转染后 24 h;2 表示转染后 72 h;3 表示转染后 96 h。

图 1 Western Blot 检测结果

2.2 细胞增殖检测 使用 MTT 染色检测 siRNA 干扰 ACC-α 表达对细胞增殖和存活率的影响。结果发现,空白对照组细胞增殖状态良好;在转染后 72 h 时,转染组的活细胞数目开始低于对照组,但差异无统计学意义($P > 0.05$),在转染 96 h 后,转染组的活细胞数目开始大幅度降低,与空白对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。

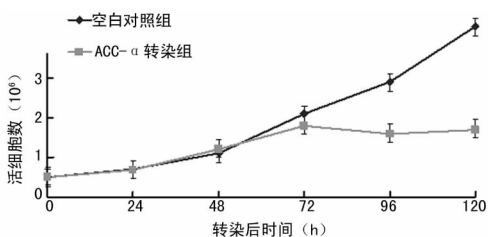
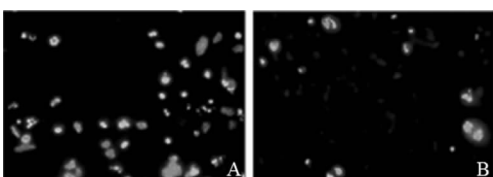


图 2 细胞增殖 MTT 检测结果



注:A 为 ACC-α siRNA 转染组;B 为空白对照组。

图 3 细胞凋亡检测

2.3 荧光染色检测细胞凋亡 经荧光染色发现,ACC-

α siRNA 转染组的细胞存在明显的核碎裂和染色质凝聚,这是细胞凋亡的典型标志,见图 3A。在空白对照组内只发现较低水平的细胞凋亡现象,见图 3B。

3 讨论

目前在很多肿瘤中都发现了脂类合成酶表达的增强。脂肪合成酶(FAS)是一类重要的脂类合成酶在长链脂肪酸的生物合成中起重要的催化作用,现已证明其在肿瘤早期的发生中起重要作用^[7-8]。在许多癌症中,FAS 也参与肿瘤后期的发生和发展。研究发现在前列腺癌中,ACC-α 也具有同样的作用,ACC-α 是脂肪合成过程中的限制酶,主要催化乙酰辅酶 A 和 CO₂ 反应生成丙二酰辅酶 A^[9]。

众多研究都发现,在所有良性成体瘤组织中脂类合成的水平都非常低,然而在恶性肿瘤中脂类合成水平却非常高。这提示肿瘤细胞内源性脂类物质的合成或许可以作为癌症治疗的潜在靶点^[10]。迄今为止,所有的相关研究都围绕 FAS 展开,化学 FAS 抑制剂和特异性更高的生物学方法,如 FAS siRNA 干扰等都具有抑制癌细胞增殖和诱导癌细胞凋亡的效果^[11]。在本研究中针对脂类合成过程中的 ACC-α 进行研究,发现通过 siRNA 干扰手段抑制 ACC-α 的表达后也对前列腺癌干细胞起到了较好的抑制作用。研究中还发现 ACC-α siRNA 干扰与目前广泛报道的 FAS siRNA 干扰所起到的效果基本类似,这提示 ACC-α 基因可能会成为前列腺癌治疗的新型靶点。

在肿瘤细胞中抑制脂肪生成和可能会导致肿瘤细胞死亡,但其具体机制有待进一步调查。本研究中抑制脂类合成后癌症干细胞出现凋亡,增生减少可能的解释如下。恶性肿瘤细胞的基本特征之一是不受控制的细胞增殖。细胞增殖的过程中需要合成大量的细胞膜,而脂类是合成细胞膜所需的重要成分。肿瘤细胞大量合成脂类物质或许就是用于增殖。细胞分裂的 G1 期是合成细胞膜的阶段,通过 siRNA 干扰,抑制脂类的合成,使肿瘤细胞无法形成细胞膜,扰乱细胞周期,从而也就相应的抑制了肿瘤细胞分裂和增殖^[12]。此外,细胞膜上还分布众多蛋白质,比如受体,这些分子在细胞信号转导中起关键作用。细胞膜合成受阻,肿瘤细胞生存和分裂相关的生理生化过程将受到抑制^[13]。这可能是 ACC-α siRNA 抑制肿瘤细胞分裂增殖的潜在机制。

参考文献

- [1] De Bono J S, Logothetis C J, Molina A, et al. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer[J]. N Engl J Med, 2011, 364(21): 1995-2005.
- [2] Schrder FH, Hugosson J, Roobol MJ, et al. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study [J]. N Engl J Med, 2009, 360(13): 1320-1328.
- [3] Liu C, Kelnar K, Liu B, et al. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44[J]. Nat Med, 2011, 17(2): 211-215.
- [4] Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, et al. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial [J]. N Engl J Med, 2009, 360(13): 1310-1319.
- [5] Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer[J]. Cancer cell, 2010, 18(1): 11-22.
- [6] Li C, Penet MF, Wildes F, et al. Nanoplex delivery of siRNA and prodrug enzyme for multimodality image-guided molecular pathway targeted cancer therapy(下转第 2963 页)

部分缓解患者占总患者的百分比。另外患者不良反应阳性为出现血液学毒性及消化系统毒性(包括恶心呕吐,白细胞计数过低,发热等),并对患者进行生活功能状态(KPS)评分^[3]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS15.0 与 DPS7.0 统计软件包联合统计,资料符合正态性及方差齐性检验采用单因素方差 One-way ANOVA 分析,不符合则进行 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 KPS 评分 结合组 KPS 分数升高率为 75%,与对照组 55%比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 两组患者患者生活功能状态(KPS)评价(n)

组别	n	变化情况				升高率 (%)
		增加 20 分	增加 10 分	持平	降低	
对照组	40	9	13	15	3	55
结合组	40	11	19	8	2	75*

注:与对照组相比,* $P<0.05$ 。

2.2 不良反应情况及临床疗效 治疗结束后,结合组不良反应阳性率为 7.5%(3/40),与对照组[20%(8/40)]相比,差异有统计学意义($P<0.05$);对照组完全缓解 6 例,部级缓解 15 例,稳定 15 例,进展 4 例,缓解率为 52.5%;结合组完全缓解 9 例,部分缓解 8 例,稳定 11 例,进展 1 例,缓解率为 70%,两组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨 论

恶性肿瘤胸腔积液的出现表明疾病已经发展到了晚期,因此在此症的治疗是应着重考虑如何提高患者的生存质量和生存时限,并尽可能地降低病情发展及治疗过程中出现的不良反应。本研究的治疗基础为引流胸腔积液后注入不同类型的药物来达到对抗肿瘤不良症状的作用。顺铂为一类临床使用频繁的对抗恶性胸腔积液的药物,其抗癌作用明确。有研究显示,顺铂在胸腔积液中的药物峰浓度可以达到血浆浓度的 40~90 倍,从而产生有效的治疗作用^[4]。另外,顺铂具有不易透过胸膜腔的特点,其消除率低,可以在胸腔内达到长时间的停留,产生持久的药效^[5]。乌体林斯为一类多功能免疫增强剂,可刺激 T 细胞释放 MAF、MIF、MCF 及 MMF 等细胞因子,同时还可以促进单核-巨噬细胞代谢释放氧自由基来杀灭肿瘤细胞^[6]。近年来,中医药应用于肿瘤的治疗取得了相当大的发展,越来越多的中药被应用于临床对抗肿瘤疾病并取得了令人瞩目的效果^[7-8]。中医药讲究整体观念,治疗时从患者的整体出发来对疾病进行综合治疗;另外大量研究显示在降低肿瘤西

药治疗的不良反应及减轻患者病痛方面,中药产生了不可忽视的作用^[9]。因此,笔者认为中西医结合治疗恶性肺癌胸腔积液较中西结合单独治疗具有明显优势,不仅可以在减轻患者病痛等“标症”方面产生积极的作用,同时还能在调理患者机体免疫能力,降低患者治疗中的不良反应等“本症”方面发挥不可替代的作用。本研究显示,中西医结合组患者在生活功能状态 KPS 评分、不良反应及临床疗效方面均较对照组优异,显示了中西结合治疗恶性肺癌胸腔积液的优势所在,此方法值得在临床进行推广,并可做进一步研究分析。

参考文献

[1] 刘亚贝,李烨,唐艳,等. 维拉帕米联合化疗药物治疗恶性胸腹水的临床观察[J]. 安徽医药,2010,14(4):453-455.

[2] Detterbeck FC,Tanoue LT,Daniel JB,et al. 肺癌分期分类相关的解剖学、生物学及理念[J]. 中国肺癌杂志,2010,13(1):1-8.

[3] 高兴华,江萍,白敏. 联合检测 NSE、CEA 和 CYFRA21-1 对肺癌胸腔积液的诊断价值[J]. 现代中西医结合杂志,2010,19(24):3047-3048.

[4] Song Z,Zhou L,Wang Y,et al. A study to explore Hp antibiotic resistance and efficacy of eradication therapy in China[J]. Helicobacter,2011,16(Suppl 1):117-118.

[5] 潘德键,周锡建,王东林. 吉非替尼联合胸腔内化疗治疗伴恶性胸水的非小细胞肺癌的初步疗效观察[J]. 现代肿瘤医学,2008,16(6):964-967.

[6] Weber DG,Johnen G,Taeger D,et al. Assessment of confounding factors affecting the tumor markers SMRP, CA125,and CYFRA21-1 in serum[J]. Biomark Insights,2010,5(5):1-8.

[7] 杨桐树,李文辉,孙喜文,等. 胸腔积液 5 种肿瘤标志物联合检测在肺癌诊断中的价值[J]. 中国卫生检验杂志,2010,20(7):1602-1605.

[8] 马金卫,钟晓莉. 红霉素、白细胞介素-2 联合顺铂胸腔注入治疗恶性胸腔积液的对比观察[J]. 中国实用医药,2008,3(19):101.

[9] Qu XH,Huang XL,Xiong P,et al. Does helicobacter pylori infection play a role in Iron deficiency anemia? a meta-analysis[J]. World J Gastroenterol,2010,16(7):886-896.

(收稿日期:2013-05-08 修回日期:2013-06-29)

(上接第 2961 页)

[J]. ACS Nano,2010,4(11):6707-6716.

[7] Anastasiou D,Cantley LC. Breathless cancer cells get fat on glutamine[J]. Cell Res,2012,22(3):443-446.

[8] Ma L,Corl BA. Transcriptional regulation of lipid synthesis in bovine mammary epithelial cells by sterol regulatory element binding protein-1[J]. J Dairy Sci,2012,95(7):3743-3755.

[9] Yen CL,Cheong ML,Grueter C,et al. Deficiency of the intestinal enzyme acyl CoA: monoacylglycerol acyltransferase-2 protects mice from metabolic disorders induced by high-fat feeding[J]. Nat Med,2009,15(4):442-446.

[10] Lang SH,Frame FM,Collins AT. Prostate cancer stem

cells[J]. J Pathol,2009,217(2):299-306.

[11] Wong RH,Sul HS. Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: a transcriptional perspective [J]. Curr Opin Pharmacol,2010,10(6):684-691.

[12] Escande C,Chini CC,Nin V,et al. Deleted in breast cancer-1 regulates SIRT1 activity and contributes to high-fat diet-induced liver steatosis in mice [J]. J Clin Invest,2010,120(2):545-558.

[13] Kuemmerle NB,Rysman E,Lombardo PS,et al. Lipoprotein lipase links dietary fat to solid tumor cell proliferation[J]. Mol Cancer Ther,2011,10(3):427-436.

(收稿日期:2013-04-28 修回日期:2013-06-27)