

干扰 Bmi-1 表达对宫颈癌 Hela 细胞 TGF- β /Smads 通路基因表达的影响

邓小园, 武向梅, 刘革力, 翁华莉, 易发平, 卜友泉, 宋方洲
(重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 分子生物学与生物化学教研室, 重庆 400016)

摘要: [目的] 干扰 Bmi-1 对 siRNA 转染宫颈癌细胞系 Hela 中 TGF- β 、Hey1、Hes1、Bmp7、Smad3、Casp3 和 Casp6 基因的表达影响, 为寻找宫颈癌中 Bmi-1 的靶基因奠定基础。[方法] 将 Bmi-1 siRNA 转染 Hela 细胞, 实时荧光定量 RT-PCR 方法检测转染前后 Hela 细胞中 TGF- β 、Hey1、Hes1、Bmp7、Smad3、Casp3 和 Casp6 基因的表达变化, 对有明显变化的基因用 Western Blot 在蛋白水平进一步验证。[结果] Hela 细胞中 Bmi-1 基因 RNA 干扰后, TGF- β 表达上调, Smad3、Casp3 和 Casp6 基因表达下调。[结论] 沉默 Bmi-1 的表达可使宫颈癌细胞系 Hela 中 TGF- β 、Smad3、Casp3 和 Casp6 的表达量均有不同程度的改变, Bmi-1 基因在宫颈癌发生发展中可能与 TGF- β /Smads 信号通路有关。

关键词: Bmi-1 基因; 宫颈癌; RNA 干扰

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2013)07-0581-05

doi: 10.11735/j.issn1004-0242.2013.07.A014

Impact of Bmi RNAi on TGF- β /Smads Pathway in Hela cells

DENG Xiao-yuan, WU Xiang-mei, LIU Ge-li, et al.

(Chongqing Medical University, Molecular Medicine Center, Cancer Research Center, Molecular Biology and Biochemistry, Chongqing 400016, China)

Abstract: [Purpose] To evaluate the effect of Bmi RNAi on TGF- β , Hey1, Hes1, Bmp7, Smad3, Casp3 and Casp6 expressions in cervical cancer cell line Hela, in order to look for a basis for Bmi-1 targeted tumor gene in cervical cancer. [Methods] Hela cells were transfected with siRNA, then Real-time quantitative RT-PCR was used to detect the expression of TGF- β , Hey1, Hes1, Bmp7, Smad3, Casp3 and Casp6 in Hela cells. The genes with different expression after RNAi were validated at the protein level by Western blot. [Results] RNAi caused upregulation of TGF- β and downregulation of Smad3, Casp3 and Casp6 genes. [Conclusions] Bmi-1 RNAi leads to change expression levels of TGF- β , Smad3, Casp3 and Casp6 in a definite level. It suggests Bmi-1 gene might play a role in carcinogenesis for cervical cancer by acting on the TGF- β /Smads signaling pathway.

Key words: Bmi-1 gene; cervical neoplasm; RNA interference

B 细胞特异的莫洛尼白血病病毒插入位点 1 (B cell-specific moloney murine leukemia virus insertion site 1, *Bmi-1*) 基因是 1991 年荷兰研究中心在鼠淋巴瘤细胞中发现的多梳基因家族 (polycomb group-genes, PcG) 中的重要调节基因。Bmi-1 广泛表达于前列腺癌^[1]、鼻咽癌^[2]、乳腺癌^[3]、造血干细胞^[4]、神经干细胞^[5]和宫颈癌^[6,7]等多种肿瘤中。现有研究认为

Bmi-1 在维持细胞的自我更新、凋亡、肿瘤增殖、转移中均扮演着重要角色^[8]。目前, 已有研究通过基因芯片技术筛选出了大量 Bmi-1 相关基因。本文旨在将 Bmi-1-siRNA 瞬时转染人宫颈癌细胞系并确定 Bmi-1 在其中低表达后, 观察其对基因芯片筛选出的 Hey1 基因、转录因子 Hes1、骨形态发生蛋白 7 (Bmp7)、细胞信号转导分子 Smad3、凋亡相关半胱氨酸蛋白酶 3 (Casp3)、凋亡相关半胱氨酸蛋白酶 6 (Casp6) 的表达影响^[9,10], 为进一步探讨 Bmi-1 在宫颈癌发生发展中的作用机制奠定基础。

收稿日期: 2012-12-31; 修回日期: 2013-03-26

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金 (20125503110012);

教育部高等学校博士学科点新教师基金项目 (20115503120007);

重庆市自然科学基金项目 (cstc2011jjA10035)

通讯作者: 宋方洲, E-mail: fzsongcq@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司;质粒小抽试剂盒、Trizol 试剂、RT-PCR 试剂盒,荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR Ex Taq™ II 购自 Tamara 公司; Lipofectamine RNAiMAX 为 Invitrogen 公司产品; Anti-TGF Beta1, Anti-Bmi-1 购自 Bioss 公司; Anti-Casp3, Anti-Casp6, Anti-Smad3 购自武汉三鹰; 化学发光检测试剂为碧云天 BeyoECLPlus; 其他试剂均为分析纯。Bmi-1siRNA-269 的序列为 5p-AU-GAA-GAGAAGAAGGGAUUTT-3p, Bmi-1siRNA-546 的序列为 5p-AAUGGACAUAACCUAAUACUTT-3p, Bmi-1siRNA-GFP 的序列为 5p-GCAAGCUGACCCU-GAAGUUCTT-3p。

1.2 细胞培养

Hela 细胞为重庆医科大学分子生物学与肿瘤研究中心保存。采用 100ml 培养瓶,用含 10%FBS 的 DMEM 培养基 37℃、5%CO₂ 饱和湿度环境下培养。

1.3 筛选有效 siRNA

Hela 细胞分 3 组:对照组、siRNA269 组和 siRNA546 组。分别转染 GFPsiRNA, Bmi-1siRNA-269, Bmi-1siRNA-546。

转染方法为 6 孔板培养,待 Hela 细胞生长汇集约 35%时,配置转染液:每孔无血清培养 DMEM 100μl, siRNA 5μl(60pmol), Lipofectamine RNAiMAX 5μl 计算配置混匀。转染液室温下放置 20min 加入。再加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基定容至 2ml, 6h 后换液。转染后 24h 观察细胞生长状态。48h 提取 RNA。72h 提取细胞蛋白。在后续实验中用有效干扰序列 Bmi-1siRNA-269 转染 Hela 细胞,以 GFP-siRNA 转染作为阴性对照。

1.4 荧光定量 PCR 检测

1.4.1 siRNA 设计与合成

基因 TGFβ、Hey1、Hes1、Bmp7、Smad3、Casp3 和 Casp6 引物(Table 1)由本课题组设计,生工生物(上海)有限公司合成。

1.4.2 荧光定量 PCR 检测转染后细胞 Bmi-1 及各基因的表达量

转染 48h 后,分别提取转染 Bmi-1-

siRNA269, Bmi-1-siRNA546 和 GFP-siRNA 转染组各 2 个孔的 Hela 细胞 RNA,检测提取的 RNA 纯度和浓度。

逆转录生成 cDNA,反应体系为 10μl。其中 RNA 500ng,反应条件:37℃ 15min, 95℃ 5s。荧光定量 PCR 反应体系 20μl,其中含 SYBREx Taq™ II 10μl,上下游引物各 0.8μl,空白组、阴性对照组或实验组细胞的 cDNA 模板各 2μl (100ng), ddH₂O 6.4μl。反应条件:95℃预变性 2min, 95℃ 10s, 58℃ 30s, 72℃ 30s, 循环 40 次。

1.5 Western Blot 检测基因表达

收集细胞,制备裂解液,SDS-PAGE,将蛋白从凝胶上转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜)上,5%脱脂奶封闭 3h,一抗 Anti-Bmi-1, Anti-TGF-β, Anti-Smad3, Anti-Casp3, Anti-Casp6, Anti-GAPDH 孵育 12~16h, TBST 冲洗,二抗孵育,冲洗后用 ECL 法检测。

1.6 统计学处理

应用 SPSS17.0 软件进行数据分析,各个基因的相对表达量通过对其 Ct 值用 2^{-ΔΔCt} 处理后采用单因素方差分析, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

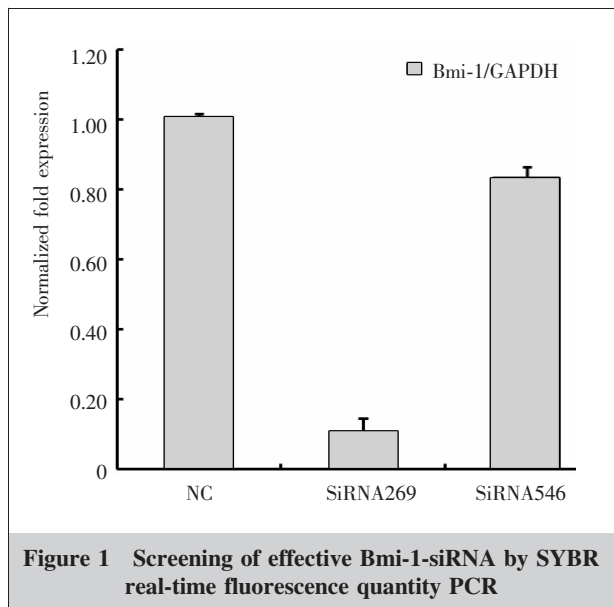
2.1 筛选有效的 Bmi-1-siRNA

以转染 siRNA546 后的 Hela 细胞提取的 RNA 为模板的进行 SYBR Green Real-Time PCR 扩增后,发现 Bmi-1 的表达量与对照组差别不大, siRNA546

Table 1 Primer Sequence

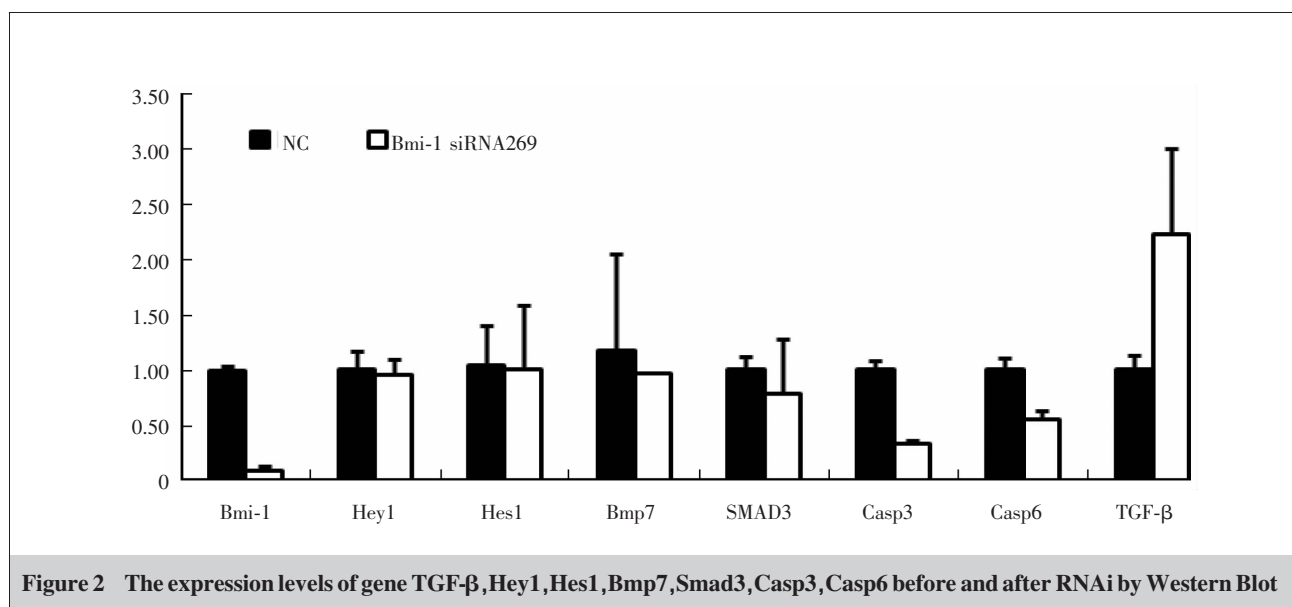
Primer name		Sequence	Length
TGF-β	Forward	5p-CCCAGCATCTGCAAAGCTC-3p	20
	Reverse	5p-GTCAATGTACAGCTGCCGCA-3p	20
Hey1	Forward	5p-CGAGGTGGAGAAGGAGAGTG-3p	20
	Reverse	5p-CTGGGTACCAGCCTTCTCAG-3p	20
Hes1	Forward	5p-GGTGCTGATAACAGCGGAAT-3p	20
	Reverse	5p-TCAGCTGGCATTTTCCTTTT-3p	20
Bmp7	Forward	5p-TDGTGGAACATGACAAGGAA-3p	20
	Reverse	5p-CTGATCCGGAACGTCTCATT-3p	20
Smad3	Forward	5p-ATAGGTGCTTTGGGCGTATG-3p	20
	Reverse	5p-CTGCTATCCAGTCACCAGCA-3p	20
Casp3	Forward	5p-TTTTTCAGAGGGGATCGTTG-3p	20
	Reverse	5p-CGGCCTCCACTGTTATTTA-3p	20
Casp6	Forward	5p-ATTCTCACCGGAAACTGTG-3p	20
	Reverse	5p-AATTGCACTTGGGTCTTTC-3p	20

干扰效果不明显。而以转染 siRNA269 后的Hela 细胞提取的 RNA 为模板的进行 SYBR Green Real-Time PCR 扩增后,发现 Bmi-1 的表达量与对照组有
明显差异, 与阴性组相比 Bmi-1 的表达量下降了 91%, 而 siRNA546 是无效用的 siRNA(Figure 1)。



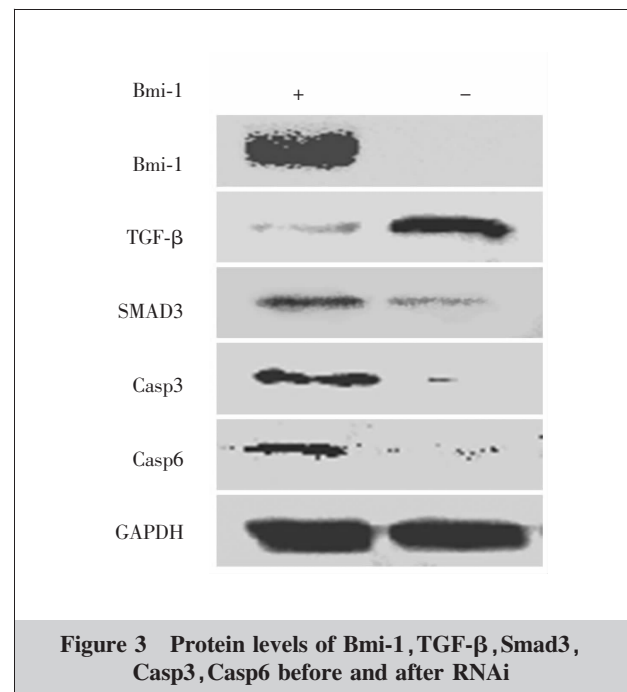
2.2 RNA 干扰前后 TGF- β , Hey1, Hes1, Bmp7, Smad3, Casp3, Casp6 基因表达水平变化

在转染了 siRNA269 的 Hela 细胞中,与转染了 GFP-siRNA 的 Hela 细胞相比,Smad3, Casp3, Casp6 表达分别下调了 23%, 66%, 34%, TGF- β 上调了 50%, Hey1, Hes1, Bmp7 表达变化不明显。(Figure 2)。



2.3 RNA 干扰前后 Bmi-1, TGF- β , Smad3, Casp3, Casp6 蛋白表达水平变化

根据定量 PCR 检测结果选择 Bmi-1, TGF- β , Smad3, Casp3, Casp6 基因进行蛋白量变化的检测。灰度分析检测结果: 转染了 si-RNA269 组 Bmi-1, TGF- β , Smad3, Casp3, Casp6, GAPDH 灰度分析值分别为: 13.98%, 84.34%, 29.86%, 24.85%, 30.18% 和 49.71% Adj.Vol。转染了 GFP-siRNA 组为: 86.02%, 15.66%, 70.14%, 75.15%, 69.82% 和 50.29% Adj.Vol(Figure 3)。



3 讨论

Bmi-1 是一种在多种组织细胞中广泛表达的核蛋白,参与细胞增殖调控,对于细胞自我更新及分化至关重要。Bmi-1 蛋白还是一种转录抑制因子,能保持特异靶基因稳定的抑制状态^[11]。研究发现体外沉默 Bmi-1 的表达可抑制 Hela 细胞增殖^[7],但其具体作用机制及信号通路目前尚不清楚。本研究发现,利用 RNA 干扰技术沉默 Hela 细胞中 *Bmi-1* 基因后, *Casp3*, *Casp6*, *Smad3* 基因表达下调, *TGF-β* 基因的表达水平增高。

Casp3 是 Caspase 家族中重要成员,广泛表达于多种人类正常组织和肿瘤组织中, *Casp3* 编码半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶家族中的一员,是凋亡的促进子和效应子,正常细胞中只含有少量的 *Casp3* 并处于无活性的酶原状态^[12],激活后激发细胞凋亡程序。此外死亡受体途径也有激活的 Caspase 参与^[13]。现研究表明 *Casp3* 表达与肿瘤分化、转移密切相关^[12]。*Casp6* 通过构象改变可自行结合载体,甚至不需要等酶原裂解,也不需要与 *Casp6*, *Casp7* 复合,这表明 *Casp6* 可自行裂解或可能受其他蛋白酶裂解^[14]。芦荟大黄素可通过 *Casp6* 引导细胞停留在 G₂/M 期和凋亡^[15]。本实验结果提示 *Casp3* 和 *Casp6* 表达受 Bmi-1 的调节, Bmi-1 在宫颈癌发生发展中的机制可能与其调控 *Casp3* 和 *Casp6* 的表达水平,进而影响细胞凋亡进程有关。

本研究发现敲除 Bmi-1 引起 *TGF-β* 表达升高,说明 Bmi-1 通过 *TGF-β* 介导下游信号改变。*TGF-β* 家族通过 Smads 家族蛋白传递信号^[16]。*TGF-β* 在肿瘤细胞的发生发展过程中具有双向调节作用,在肿瘤早期阶段 *TGF-β* 通过 *TGF-β*/Smads 信号通路发挥抑制细胞增殖,使细胞停留在 G₁ 期,诱导细胞凋亡,抑制肿瘤发展的作用^[17,18]。在这一信号通路中,磷酸化的 Smad2, Smad3 进入细胞核与 Smad4 结合形成复合物,然后与各转录因子结合调控靶基因的转录。但在本研究中, Bmi-1 表达下降却引起 Smad3 表达下降,推测与 Bmi-1 相关的 *TGF-β* 通路可能涉及其他的 Smad 成员。

Smad 基因家族的主要成员包括 *Smad2*, *Smad3* 和 *Smad4*。*Smad3* 在哺乳动物的不同种属中具有高度保守性,其基因产物是 *TGF-β* 信号通路中的细胞

浆成分。*TGF-β* 可磷酸化活化 Smad2, Smad3 使两者与 Smad4 一起形成复合物,聚集于细胞核内交接靶基因的转录。Smad2/3/4 可在核质间不断穿梭来维持 *TGF-β* 的受体活性^[19]。Smad 与同源异形框基因 Six1 在乳腺癌中一同增强 *TGF-β* 信号通路^[20]。有研究发现,小鼠在敲除了 *Smad3* 基因后虽能生存,但免疫功能受损,易发生肿瘤^[21]。本实验结果发现在沉默 *Bmi-1* 基因后,可显著降低 Smad3 基因及蛋白表达水平。我们推测 Smad3 是 Bmi-1 的下游靶基因, Bmi 可能并非完全通过调控经典的 *TGF-β*/Smads 信号通路在宫颈癌中发挥作用。

总之, *Bmi-1* 基因的表达在宫颈癌的发生发展及转移中有重要意义,参与了多种信号通路和因子的调节, *Bmi-1* 基因表达在宫颈癌的发生发展中可能与 *TGF-β*/Smads 信号通路, Caspase 家族的促凋亡作用密切相关。

参考文献:

- [1] Lukacs RU, Memarzadeh S, Wu H, et al. Bmi-1 is a crucial regulator of prostate stem cell self-renewal and malignant transformation[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(6): 682-693.
- [2] Song LB, Li J, Liao WT, et al. The polycomb group protein Bmi-1 represses the tumor suppressor PTEN and induces epithelial-mesenchymal transition in human nasopharyngeal epithelial cells[J]. J Clin Invest, 2009, 119(12): 3626-3636.
- [3] Joensuu K, Hagstrom J, Leidenius M, et al. Bmi-1, c-myc, and Snail expression in primary breast cancers and their metastases-elevated Bmi-1 expression in late breast cancer relapses[J]. Virchows Arch, 2011, 459(1): 31-39.
- [4] Park IK, Qian DL, Kiel M, et al. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells[J]. Nature, 2003, 423(6937): 302-305.
- [5] Molofsky AV, He S, Bydon M, et al. Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways [J]. Genes Dev, 2005, 19(12): 1432-1437.
- [6] Gao QL, Lu XQ, Li HX, et al. Expression and clinical significance of B-1 oncogene in cervical carcinoma[J]. Chinese Journal of Practical Medicine, 2010, 37(17): 17-19. [高巧玲, 吕新全, 李惠翔, 等. Bmi-1 在宫颈癌组织中的表达及相关性研究[J]. 中国实用医刊, 2010, 37(17): 17-19.]

- [7] Liu DD, Jiang Y, Liu B, et al. Effects of siRNA silencing of Bmi-1 expression on proliferation of Hela cells[J]. Journal of Dalian Medical University, 2012, 34(2): 109–114. [刘丹丹, 姜悦, 刘奔, 等. Bmi-1 siRNA 对宫颈癌 Hela 细胞体外增殖能力的影响[J]. 大连医科大学学报, 2012, 34(2): 109–114.]
- [8] Xu F, Yang R, Wu L, et al. Overexpression of BMI1 confers clonal cells resistance to apoptosis and contributes to adverse prognosis in myelodysplastic syndrome[J]. Cancer Lett, 2012, 317(1): 33–40.
- [9] Meng S, Luo M, Sun H, et al. Identification and characterization of Bmi-1-responding element within the human p16 promoter[J]. J Biol Chem, 2010, 285(43): 33219–33229.
- [10] Bracken AP, Dietrich N, Pasini D, et al. Genome-wide mapping of polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions[J]. Genes Dev, 2006, 20(9): 1123–1136.
- [11] Park IK, Qian D, Kiel M, et al. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells[J]. Nature, 2003, 423(6937): 302–305.
- [12] Xia L, Xue XZ. Immunohistochemical study of NF-kappa B p65, c-IAP2 and caspase-3 expression in cervical cancer[J]. Oncology Letters, 2012, 3(4): 839–844.
- [13] Odonkor CA, Achilefu S. Modulation of effector caspase cleavage determines response of breast and lung tumor cell lines to chemotherapy[J]. Cancer Invest, 2009, 27(4): 417–429.
- [14] Edgington LE, van Raam BJ, Verdoes M, et al. An optimized activity-based probe for the study of caspase-6 activation[J]. Chem Biol, 2012, 19(3): 340–352.
- [15] Suboj P, Babykutty S, Srinivas P, et al. Aloe emodin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis via activation of caspase-6 in human colon cancer cells[J]. Pharmacology, 2012, 89(1–2): 91–98.
- [16] Shi YG, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus[J]. Cell, 2003, 113(6): 685–700.
- [17] Liu YP, Song JH. Progression of TGF-Smad signaling pathway and TGF-beta and Smad4 in cervical carcinoma[J]. Journal of Inner Mongolia Medical College, 2011, 33(1): 76–79. [刘亚萍, 宋静慧. TGF-beta/smads 信号转导通路及 TGF-beta-1、smad4 在宫颈癌的研究[J]. 内蒙古医学院学报, 2011, 33(1): 76–79.]
- [18] Zhang J, Li SZ. Expression of transforming growth factor beta1 and smad4 in cervical carcinoma and its clinical significance[J]. The Practical Journal of Cancer, 2008, 23(5): 465–468. [张兢, 李胜泽. TGF-beta1 及 Smad4 蛋白在子宫颈癌组织中的表达及其意义[J]. 实用癌症杂志, 2008, 23(5): 465–468.]
- [19] Inman GJ, Nicolas FJ, Hill CS. Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity[J]. Mol Cell, 2002, 10(2): 283–294.
- [20] Micalizzi DS, Christensen KL, Jedlicka P, et al. The Six1 homeoprotein induces human mammary carcinoma cells to undergo epithelial-mesenchymal transition and metastasis in mice through increasing TGF-beta signaling[J]. Journal of Clinical Investigation, 2009, 119(9): 2678–2690.
- [21] Yang X, Letterio JJ, Lechleider RJ, et al. Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF-beta[J]. EMBO J, 1999, 18(5): 1280–1291.