

siRNA 沉默 C-erbB-2 基因对人喉癌 Hep-2 细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响*

余文发¹ 赵玉林² 王萍³ 马慧敏¹ 张国正¹ 鲁保才¹ 董明敏³

[摘要] 目的:探讨 siRNA 沉默人喉癌 Hep-2 细胞 C-erbB-2 基因对细胞增殖的影响,及其与 PI3K/Akt 信号通路的关系。方法:利用 siRNA 技术转染 Hep-2 细胞 C-erbB-2 基因,RT-PCR3 检测 siRNA 转染后 C-erbB-2 mRNA 的水平变化,MTT 检测细胞增殖情况改变,Western blot 检测 ERK1/2 和 AKT1 蛋白磷酸化变化情况。结果:转染 C-erbB-2 siRNA 24 h 后的 Hep-2 细胞 C-erbB-2 mRNA 水平出现下调,细胞增殖抑制率增加,ERK1/2 和 AKT1 蛋白磷酸化水平也相应降低,C-erbB-2 基因表达与 ERK1/2 和 AKT1 蛋白磷酸化水平之间有显著相关性。结论:siRNA 沉默 Hep-2 细胞 C-erbB-2 抑制 Hep-2 细胞增殖,这种增殖抑制可能通过降低 ERK1/2 和 AKT1 蛋白磷酸化水平实现。

[关键词] 喉肿瘤;C-erbB-2 基因;ERK1/2;AKT1
doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2014.12.017
[中图分类号] R739.65 **[文献标志码]** A

The effects of C-erbB-2 siRNA on PI3K/Akt signaling pathway in human laryngeal cancer Hep-2 cells

YU Wenfa¹ ZHAOYulin² WANG Ping³ MA Huimin¹
ZHANG Guozheng¹ LU Baocai¹ DONG Mingmin³

(¹Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, 453100,China;²Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery,the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University;³Department of Functional Examination, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College)
Corresponding author: YU Wenfa,E-mail: yuwenfa197288@aliyun.com

Abstract Objective:To investigate the effects of short interfering RNA(siRNA) silencing C-erbB-2 gene on the proliferation of laryngeal carcinoma Hep-2 cells and to explore the relationship between C-erbB-2 gene and PI3K/Akt signal pathway. **Method:**C-erbB-2 siRNA was transfected to Hep-2 cells,and mRNA expression of C-erbB-2 was detected by RT-PCR. MTT was applied to detect the proliferation of Hep-2 cells. Western blot was used to detect the phosphorylation changes of protein ERK1/2 and AKT1. **Result:**The mRNA level of C-erbB-2 in Hep-2 cells declined obviously at 24 h after transfection of C-erbB-2 siRNA. The proliferation of transfected Hep-2 cells was inhibited, and protein phosphorylation levels of ERK1/2 and AKT1 decreased simultaneously. The expression of C-erbB-2 gene was obviously correlated with the protein phosphorylation levels of ERK1/2 and AKT1. **Conclusion:**C-erbB-2 silence by siRNA can efficiently inhibit the proliferation of Hep-2 cells, which may be achieved by decreasing the phosphorylation level of ERK1/2 and AKT1.

Key words laryngeal neoplasms; C-erbB-2 gene; ERK1/2; AKT1

研究表明,C-erbB-2 基因在多种肿瘤中过量表达,与肿瘤恶性程度、转移能力、化疗抵抗及预后密切相关^[1],同时 PI3K/Akt 信号通路是细胞信号传导的重要通路之一,参与调节细胞增殖、凋亡和新陈代谢等,与肿瘤的发生亦密切相关^[2]。关于 C-

erbB-2 基因、PI3K/Akt 信号通路与喉癌的相关性文献报道较少。本研究探讨了 siRNA 沉默人喉癌 Hep-2 细胞 C-erbB-2 基因对 Hep-2 细胞增殖的影响及其与 PI3K/Akt 信号通路的关系,为进一步研究喉癌发生机制打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人喉癌 Hep-2 细胞系购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。Reverse transcription system、C-erbB-2 单抗、dNTP、Trizol 和 Taq DNA 聚合酶均购自 Takara 公司;非特异性 siRNA 由王凯

* 基金项目:河南省高等学校青年骨干教师资助计划(No: 2010GGJS-120)和河南省卫生科技创新人才工程(No: 2010141)联合资助

¹新乡医学院第一附属医院耳鼻咽喉头颈外科(河南新乡, 453100)

²郑州大学第一附属医院耳鼻咽喉头颈外科

³新乡医学院第三附属医院功能检查科

通信作者:余文发,E-mail: yuwenfa197288@aliyun.com

博士惠赠,四甲基偶氮唑蓝(MTT)、碘化丙啶(PD)和 RNase 购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 转染细胞 无核酸酶水稀释 5 nmol/L 的 C-erbB-2 siRNA,使其终浓度达到 20 μ mol/L。根据 GenBank 的序列设计与合成 C-erbB-2 基因和内参照引物 PCR 扩增产物,设计可以扩增的引物是利用 DNA club 和 VectorNT 16.0 软件,GAPDH 上游引物为 5'-CTTTGG-TATCGTGGAAGGA-3';下游引物为 5'-CAC-CCTGTTGCTGTAGCC-3',扩增片段长度为 474 bp。非特异性 siRNA 靶序列:正义链为 5'-AUUGGCUACUACCGAAGAG-3';反义链为 5'-CUCUUCGGUAGUAGCCAAU-3',终浓度 20 μ mol/L。C-erbB-2 上游引物为 5'-CTTCAAAGGGACACCTACGG-3';下游引物为 5'-CAGC-CATCTGGGAAGTCAA-3',扩增片段长度为 232 bp。分别稀释适量的干扰用 siRNA、Lipofectamine 2000 于 Opti-MEM 培养液中,混匀,室温孵育 5 min。混合稀释的 Lipofectamine 2000 与稀释的 siRNA,室温下孵育 20 min,使 siRNA-Lipofectamine 2000 复合体形成。

将对数生长期的 Hep-2 细胞以 3×10^5 个/孔在转染前接种于 96 孔板,正常培养液中铺板细胞,24 h 内细胞融合达到 40%~60% 时进行转染,加入复合物前换用 1 ml 的培养液,在培养板中加入脂质体复合体,转染体系为 500 μ l。以空白组、非转染组和非特异性 siRNA 组作为对照。转染的特异性 siRNA 终浓度分别为 50、100、150、200 nmol/L,每个浓度做 9 个平行孔,每孔 200 μ l,空白对照组以培养液补足。

1.2.2 RT-PCR 检测 C-erbB-2 mRNA 的水平 Trizol 抽提转染 24 h 后细胞中总 RNA,将 1 μ l MMLV,1 μ l dNTPs,4 μ l $5 \times$ MMLV 反转录缓冲液,0.4 μ l R Nasin,1 μ l Olig(dT)混合后,加 8 μ l RNA,用 ddH₂O 补足至 20 μ l,混匀,37 $^{\circ}$ C 水浴 2 h。95 $^{\circ}$ C 变性 5 min,逆转录反应。取逆转录产物 1 μ l,0.4 μ l Taq 酶,10 SCR 反应缓冲液 5 μ l,目的引物各 2 μ l,1 μ l dNTPs,加水补足至 50 μ l,PCR 扩增,反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,58 $^{\circ}$ C 退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,共 35 个循环。同时,PCR 扩增 GAPDH 作为检验反转录是否成功的标准,分别取 5 μ l PCR 产物琼脂糖凝胶电泳。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖情况 将 Hep-2 细胞以 2×10^5 /ml 密度接种于 96 孔培养板每孔 200 μ l。置入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱内培养 24 h 后,将其分为空白对照组,共 3 孔;非转染细胞对照组,共

3 孔,加入 RPMI 1640 培养液 20 μ l;非特异性对照组,加入非特异性 siRNA,共 3 孔;实验组加入特异性 siRNA,浓度分为 50、100、150、200 nmol/L,每种浓度的药物重复 9 孔,每孔 20 μ l,继续置入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱内培养 24 h。之后取出 96 孔培养板,离心(1000 r/min \times 5 min),去上清液,每孔加入纯 RPMI 1640 培养液 200 μ l 及 5 mg/ml MTT 20 μ l,继续置入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱内培养 4 h 后,取出 96 孔培养板,离心(1000 r/min \times 10 min),小心吸去上清液,每孔加入 200 μ l DMSO,置于微量振荡器上震荡 5 min,酶标仪上测出各孔光密度值 OD,检测波长为 492 nm,计算细胞增殖抑制率。

1.2.4 Western blot 检测 ERK1/2 和 AKT1 蛋白磷酸化情况 实验组为转染组,对照组为空白组、未转染组和非特异性 siRNA 组,提取各组细胞的总蛋白,并用 BCA 法测定蛋白浓度,加热变性后 -20 $^{\circ}$ C 保存。取各组细胞的总蛋白 70 μ g 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,将分离后的蛋白质电转移到 PVDF,封闭液封闭滤膜 4h,按约 0.1 ml/cm² 的量加入封闭液和适量一抗 ERK1/2、AKT1,洗膜,DAB 显色试剂盒进行显色,拍照记录。

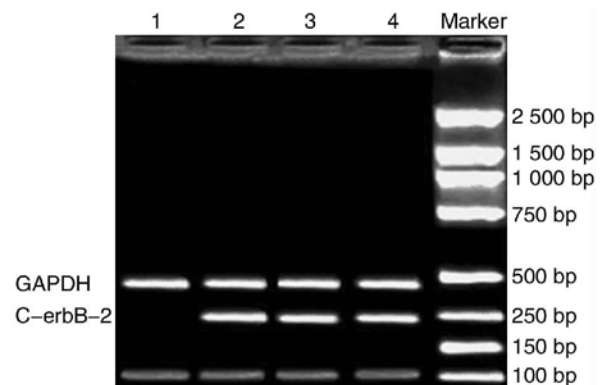
1.3 统计学方法

采用统计软件 SPSS 17.0 因素方差分析,两两比较,采用单检验进行多组间参照。

2 结果

2.1 C-erbB-2 siRNA 转染对 Hep-2 细胞 C-erbB-2 mRNA 水平的影响

与空白对照组、未转染对照组和非特异性 siRNA 组比较,转染 C-erbB-2 siRNA 24 h 后的 Hep-2 细胞 C-erbB-2 mRNA 水平出现下调,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 1)。



1:特异 siRNA 转染组;2:空白对照组;3:未转染对照组;4:非特异性 siRNA 组。

图 1 100 nmol/L C-erbB-2 siRNA 转染对 Hep-2 细胞 C-erbB-2 mRNA 水平的影响

2.2 C-erbB-2 siRNA 转染对 Hep-2 细胞增殖的影响

MTT 结果显示,50 nmol/L C-erbB-2 siRNA 对 Hep-2 细胞增殖有一定抑制作用,随着浓度增加抑制率也增加。100 nmol/L 时抑制率为 (41.794±0.65)%,与 50 nmol/L 组比较 Hep-2 细胞增殖抑制率明显升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$),100、150、200 nmol/L 三个浓度组间比较,细胞的增殖抑制率差异无统计学意义(图 2)。

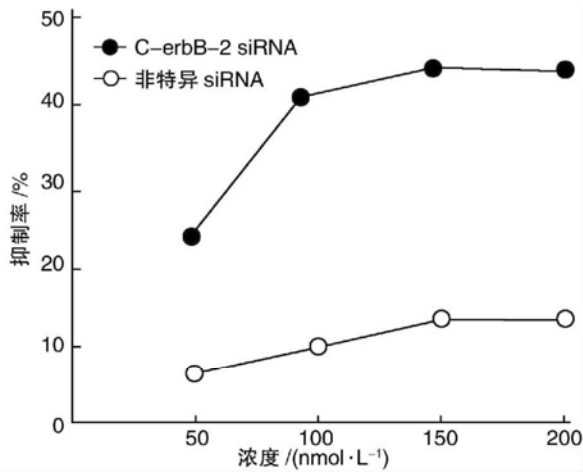
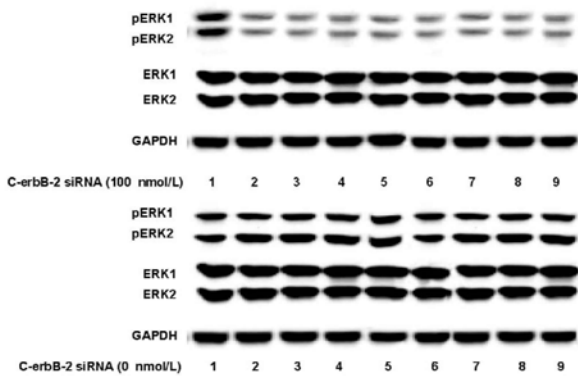


图 2 C-erbB-2 siRNA 对 Hep-2 细胞增殖抑制作用

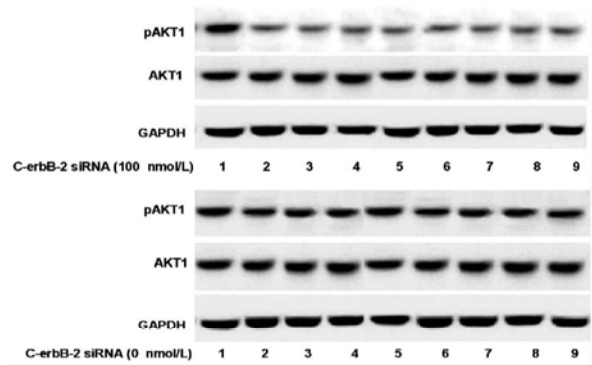
2.3 C-erbB-2 siRNA 转染对 Hep-2 细胞 ERK1/2 和 AKT1 蛋白磷酸化的影响

与空白对照组、未转染对照组和非特异性 siRNA 组比较,特异 C-erbB-2 siRNA 转染 24 h 后的 Hep-2 细胞 C-erbB-2 mRNA 水平出现下调后,ERK1/2 和 AKT1 蛋白磷酸化水平也相应降低,差异有统计学意义 ($P<0.05$,图 3、4)。



1 为空白对照组;2~9 为相同浓度不同培养孔的 siRNA 转染组。

图 3 C-erbB-2 siRNA 转染 24 h 后的 Hep-2 细胞 ERK1/2 蛋白磷酸化水平变化情况



1 为空白对照组;2~9 为相同浓度不同培养孔的 siRNA 转染组。

图 4 C-erbB-2 siRNA 转染 24 h 后的 Hep-2 细胞 AKT1 蛋白磷酸化水平变化情况

2.4 Hep-2 细胞 C-erbB-2 mRNA 水平与 ERK1/2 和 AKT1 蛋白磷酸化的相关性分析

C-erbB-2 siRNA 转染 Hep-2 细胞 C-erbB-2 基因与 ERK1/2 和 AKT1 蛋白磷酸化水平相关性分析发现,Hep-2 细胞中 siRNA 转染 Hep-2 细胞 C-erbB-2 基因与 ERK1/2 和 AKT1 蛋白磷酸化水平密切相关 ($r=0.9168, P<0.05$)。

3 讨论

近年喉癌在我国发病率有增高的趋势,但其发生发展机制至今仍不甚明确。C-erbB-2 基因的过表达与多种恶性肿瘤如乳腺癌、肺癌和胃癌等的发生密切相关^[1,3-4]。siRNA 技术使细胞内同源 mRNA 降解,产生特异的基因沉默,已被成功应用在动物和植物细胞中沉默多种基因。近来研究表明,应用 siRNA 技术沉默 C-erbB-2 基因,使 C-erbB-2 基因表达下调可以影响细胞增殖,导致细胞凋亡,因此在肿瘤细胞中抑制 C-erbB-2 基因表达已成为肿瘤的治疗方案之一^[5-7]。关于喉癌 C-erbB-2 基因的研究文献报道较少,在本研究中,我们应用 siRNA 技术检测了沉默 C-erbB-2 基因对人喉癌 Hep-2 细胞增殖的影响,结果显示,与空白对照组、未转染组和非特异性 siRNA 组比较,特异性 siRNA 组转染 C-erbB-2 siRNA 24 h 后的 Hep-2 细胞 C-erbB-2 mRNA 水平出现下调,增殖抑制率明显升高,差异有显著性。

C-erbB-2 属于 EGFR 酪氨酸激酶家族,EGFR 家族由 C-erbB-1、C-erbB-2、C-erbB-3 和 C-erbB-4 等 4 个跨膜酪氨酸激酶受体构成。Yang 等^[8]应用逆转录病毒介导的靶向 C-erbB-2 siRNA 通过调节多种信号途径抑制卵巢和乳腺肿瘤细胞增殖,使细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期,其具体机制可能是 siRNA 沉默 C-erbB-2 基因影响了细胞周期中的信号通路。在细胞周期信号通路中,PI3K/Akt 信号通路是细胞信号传导的重要通路之一,广泛存在于细

胞中,参与细胞生长、增殖、分化调节。本研究检测了 siRNA 沉默 C-erbB-2 基因对 Hep-2 细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响,结果表明,siRNA 沉默 Hep-2 细胞 C-erbB-2 降低 ERK1/2 和 AKT1 蛋白磷酸化水平, siRNA 沉默 Hep-2 细胞 C-erbB-2 与 ERK1/2 和 AKT1 蛋白磷酸化水平关系密切相关,这种结果表明,siRNA 沉默 C-erbB-2 基因可能通过改变 PI3K/Akt 信号通路进而抑制细胞增殖。这种相关性与 Saglam 等^[9]对子宫癌的研究结果相似,其机制可能是:PI3K 是由 1 个催化亚基 p110 和 1 个调节亚基 p85 构成的异源二聚体,PI3K 家族被分为 I、II、III 三类。其中 IA 类 PI3K(p110)由 RTKs(酪氨酸受体)激活,具有调节细胞增殖、生长、存活等功能^[10]。Akt 又称蛋白激酶 B,是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。PI3K 激活的结果是催化细胞膜上第二信使磷脂酰肌醇 3,4,5 三磷酸(PIP3),PIP3 与细胞内信号蛋白 Akt 结合,Akt 转位于细胞膜并获得催化活性,进而导致 Akt 的完全活化^[11-13],对细胞周期和细胞凋亡产生调节作用。C-erbB-2 属于酪氨酸激酶家族,siRNA 沉默 Hep-2 细胞 C-erbB-2 后,酪氨酸激酶活性降低,而 PI3K/Akt 由酪氨酸受体激活,酪氨酸激酶活性降低影响酪氨酸受体激活,从而引起 ERK1/2 和 AKT1 蛋白磷酸化水平降低,磷酸化水平降低的 ERK1/2 和 AKT1 使 PI3K/Akt 信号通路功能降低,进而抑制 Hep-2 细胞增殖。这种相关性在乳腺癌的研究中也得到了验证^[14],但关于喉癌发生发展与 C-erbB-2 基因及 PI3K/Akt 信号通路的确切关系仍需进一步研究。

参考文献

- [1] HYNES N E, STERN D F. The biology of erbB-2/neu/Her-2 and its role in cancer[J]. *Biochem Biophys Acta*, 1994, 1198: 165-184.
- [2] 曾慧敏,王丹红,刘文贤. PI3K/Akt 通路与肿瘤治疗[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(1): 82-85.
- [3] MAHLKNECHT G, MARON R, MANCINI M, et al. Aptamer to ErbB-2/HER2 enhances degradation of the target and inhibits tumorigenic growth[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 8170-8175.
- [4] SILVA J G, SANCHEZ V, POLO S M, et al. Expression of C-erbB-2 in breast cancer cell lines as experimental receptor of magnetic nanoparticles [J]. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2013, 2013: 4498-4501.
- [5] YARDEN Y, SLIWKOWSKI M X. Untangling the ErbB signaling network [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2: 127-137.
- [6] RIESE D J 2nd, STERN D F. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network [J]. *Bioessays*, 1998, 20: 41-48.
- [7] 任淑华,张伟,曲平,等. RNA 干扰 C-erbB-2 对肺腺癌细胞 calu-3 增殖的影响[J]. *癌症*, 2005, 24(10): 1173-1178.
- [8] YANG G, CAI K Q, THOMPSON-LANZA J A, et al. Inhibition of breast and ovarian tumor growth through multiple signaling pathways by using retrovirus-mediated small interfering RNA against Her-2/neu gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 4339-4345.
- [9] SAGLAM O, HUSAIN S, TORUNER G. AKT, EGFR, C-erbB-2, and C-kit expression in uterine carcinosarcoma [J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2013, 32: 493-500.
- [10] LUO J, SOBKOWSKI C L, HIRSHMAN M F, et al. Loss of class IA PI3K signaling in muscle leads to impaired muscle growth, insulin response, and hyperlipidemia [J]. *Cell Metab*, 2006, 3: 355-366.
- [11] OSAKI M, OSHIMURA M, ITO H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer [J]. *Apoptosis*, 2004, 9: 667-676.
- [12] EDWARDS L A, THIESSEN B, DRAGOWSKA W H, et al. Inhibition of ILK in PTEN-mutant human glioblastomas inhibits PKB/Akt activation, induces apoptosis, and delays tumor growth [J]. *Oncogene*, 2005, 24: 3596-3605.
- [13] SONG G, OUYANG G, BAO S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival [J]. *J Cell Mol Med*, 2005, 9: 59-71.
- [14] ZHANG W, DING W, CHEN Y, et al. Up-regulation of breast cancer resistance protein plays a role in HER2-mediated chemoresistance through PI3K/Akt and nuclear factor-kappa B signaling pathways in MCF7 breast cancer cells [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2011, 43: 647-653.

(收稿日期:2013-11-22)