

. 实验研究 .

靶向沉默 c-fos 基因表达对胶质瘤 U87MG 细胞增殖与侵袭的影响

桂志勇 冯 军 黄俊红 白敬洋

【摘要】目的 探讨靶向沉默 c-fos 基因表达对胶质瘤 U87MG 细胞体外增殖与侵袭的影响。**方法** 构建慢病毒载体 c-fos-shRNA, 将其转染人脑胶质瘤 U87MG 细胞, 同时将空载体转染细胞作为空载对照, 未转染细胞作为空白对照; 观察 U87MG 细胞形态、c-fos mRNA 和蛋白表达变化、细胞侵袭和迁移能力、细胞生存率和细胞凋亡率。**结果** c-fos-shRNA 慢病毒转染 U87MG 细胞 48 h 后, 荧光显微镜下观察发现空白对照组 U87MG 细胞无绿色荧光, 而空载体组和转染组 U87MG 细胞可见绿色强荧光和清晰的细胞轮廓。与空白对照组、空载体组相比, 转染组 U87MG 细胞 c-fos mRNA 和 c-fos 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$); 慢病毒转染 U87MG 细胞 24 h 后, 转染组 U87MG 细胞存活率显著降低 ($P<0.05$), 细胞活力显著减弱 ($P<0.05$); 细胞迁移和侵袭能力明显减弱 ($P<0.05$); 慢病毒转染 72 h 后, 转染组 U87MG 细胞凋亡数量显著上升 ($P<0.05$)。**结论** 沉默 c-fos 基因表达可显著抑制脑胶质瘤 U87MG 细胞增殖和侵袭能力。

【关键词】 胶质母细胞瘤; c-fos; shRNA; 细胞增殖; 细胞侵袭; RNA 干扰技术
【文章编号】 1009-153X(2017)12-0834-05 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 789

Effects of c-fos targeted silence on proliferation and invasiveness of human glioma cell U87

GUI Zhi-yong¹, FENG Jun², HUANG Jun-hong¹, BAI Jingyang¹. 1. Department of Neurosurgery, the First people's Hospital of Luohe City, Luohe 462000, China; 2. Department of Neurosurgery, Affiliated Union Hospital, Tongji Medical School, Huazhong University of Sciences and Technology, Wuhan 430022, China

【Abstract】Objective To explore the effects of lentivirus-mediated c-fos targeted silence on the proliferation and invasiveness of human glioma cell U87 in vitro. **Methods** Lentiviral vector c-fos-shRNA was transfected into human glioma U87 cells. Empty vector-transfected human glioma U87 cells served as the no-load control, and non-transfected human glioma U87 cells serve as the blank control. The morphology of U87 cells, the expression of c-fos mRNA and c-fos protein, the invasiveness and migration ability of U87 cells, and the survival rate of glioma cells, and the apoptosis rate of U87 cells were observed in all the groups. **Results** No green fluorescence of U87 cells in the blank control group, strong green fluorescence and clear cell outline of U87 cells in the no-load group and the transfection group were observed by the fluorescence microscope. The levels of c-fos mRNA and protein expressions were significantly lower in the transfection group 48 hours after the transfection than those in the no-load and blank control groups ($P<0.05$). The survival rate, migration and invasion ability of U87 cells were significantly lower in the transfection group 48 hours after the transfection than those in the blank control and no-load groups ($P<0.05$). The number of apoptotic cells was significantly more in transfection group 72 hours after the transfection than that in the blank control and no-load groups ($P<0.05$). **Conclusions** It is suggested that c-fos targeted silence can significantly inhibit the proliferation and invasiveness of human glioma U87 cells, and c-fos-shRNA lentivirus-mediated gene therapy may be targeted as a new candidate for c-fos gene therapy.

【Key words】 Human glioma; c-fos; shRNA; Proliferation; Invasiveness

胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤, 其中多形性胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)恶性程度最高, 易复发, 预后极差。GBM 组织常出现多基因异常表达。原癌基因过度表达而抑癌基因却突变、缺失, 致使肿瘤细胞不能被正常调控^[1-3]。RNA

干扰(RNA interfere, RNAi)是近年来不断成熟的基因表达沉默技术, 其中短发卡 RNA(short hairpin RNA, shRNA)能高效抑制靶基因的表达, 而慢病毒载体可转染不同状态的细胞^[4,5]。本研究通过慢病毒载体介导 RNAi 技术沉默胶质瘤 U87MG 细胞株 c-fos 的表达, 观察其对胶质瘤 U87MG 细胞增殖和侵袭的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和慢病毒载体构建 将液氮冻存的胶

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2017.12.011
作者单位: 462000 河南, 漯河市第一人民医院神经外科(桂志勇、黄俊红); 430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院神经外科(冯 军、白敬洋)

质瘤 U87MG 细胞株(ATCC 细胞库)取出后解冻复苏,接种于含 10%胎牛血清 DMEM 高糖完全培养液(均购自美国 Gibco 公司)中,并放置在 37℃恒温、5%浓度 CO₂的培养箱中培养成单层贴壁细胞。通过查阅文献找到 3 条 c-fos 的 siRNA 靶点序列,筛选出靶向 c-fos 沉默效果最好序列 5'-CTT CAT TCC CAC GGT CAC T-3'(177-195)^[6,7],合成靶向 c-fos 干扰序列的单链 DNA(5'-正义-环-反义-3'),退火形成互补双链,用特定限制酶酶切后,用 T4 DNA 连接酶连接到线性化慢病毒载体 GV248 上,转化 DH5 α 感受态,对 PCR 鉴定为阳性的载体进行测序,测序结果正确的病毒用 HEK293T 细胞包装。

1.2 细胞转染并观察脑胶质瘤细胞形态 取对数生长期 U87MG 细胞,按每孔 5 万个细胞接种于 6 孔板,加入 DMEM 高糖培养液(不含抗生素)培养 24 h,待细胞增殖至瓶底 70%~80%时开始转染。操作步骤参照 Lipofectamine RNAiMAX 转染试剂盒(北京博迈斯生物公司)说明书转染后,弃掉培养液,向每个孔中滴加 1 μ l Trizol,利用 qRT-PCR 技术检测 siRNA 慢病毒的干扰效率,并利用倒置荧光显微镜观察转染组和对照组细胞的形态差异。同时把空载体转染细胞作为对照,分空白对照组(Control)、空载体组(NC-shRNA)和转染组(c-fos-shRNA)。

1.3 qRT-PCR 检测胶质瘤细胞 c-fos mRNA 表达变化 收集各组传代 U87MG 细胞,利用 Trizol 法提取 RNA,经琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,并用紫外分光光度计检测其纯度及浓度。采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT}法分析 qRT-PCR 结果,以 GAPDH 作为内参基因,用 NCBI Primer Blast 设计定量引物序列。PCR 引物(上海生工公司合成)序列:c-fos 上游引物 5'-GTC TTC CTT TGT CTT CAC CTA CCC-3',下游引物 5'-CCC TGC CTT CTC TGA CTG CT-3'; GAPDH 上游引物 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3',下游引物 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'。

1.4 Western blot 检测 c-fos 蛋白表达变化 收集各组传代 U87MG 细胞,加入适量蛋白缓冲液,按常规方法提取蛋白,BCA 法进行蛋白定量,调好蛋白浓度。每组取 50 μ g 蛋白样品,与上样缓冲液混合后于沸水中煮 5~7 min 使蛋白变性;80 V 恒压 SDS-PAGE 电泳 30 min,100 V 恒压电泳至溴酚蓝刚出玻璃板底部时停止;转至 PVDF 膜,将膜置于含 5%脱脂奶粉 TBST 溶液,避光封闭 1 h;用 TBST 溶液漂洗 5 min 后,将膜置于一抗稀释液(c-fos 兔抗鼠 IgG 溶液,1:4 000 稀释)中,4℃孵育过夜;次晨将膜用 TBST 溶液漂洗 3

次后,置于二抗稀释液(山羊抗兔 IgG 溶液,1:2 000 稀释)中,在摇床上室温孵育 1 h,用 TBST 溶液漂洗 3 次;将发光液均匀加在湿润的膜上,反应 5 min 后吸去多余溶液,置于暗盒中曝光、显影和定影。使用 GIS-2020 数码图像分析系统扫描胶片并分析净吸光度值。以 β -actin 作为内参基因。

1.5 MTT 法检测细胞增殖 转染后 24 h,将 U87MG 细胞按每孔 100 μ l(约 2 千个细胞)接种至 96 孔板,每组设置 5 个重复,接种后 1、2、3、4、5 d 分别进行 MTT 检测,每孔加入 20 μ l MTT 磷酸缓冲液(5 g/L),于 37℃孵箱中继续培养 4 h 后,小心弃去上清并加入二甲基亚砷,振荡 20 min 溶解结晶。采用酶标分析仪在 450 nm 波长处检测各孔的吸光度(A)。设 U87MG 空白对照组的存活率是 100%,据此计算各组细胞的存活率。

1.6 Transwell 检测细胞侵袭和迁移能力 转染后 48 h,在 Transwell(美国 CorningCostar 公司)上室中加入 DMEM 稀释后的基质胶制成凝胶,在下室中加入 DMEM 培养液。用不含血清 DMEM 培养液将待检细胞制成单细胞悬液,将约 10 万个细胞加入上室中,培养 24 h 后,倒掉上室液体,除去上室未穿膜细胞,用甲醇固定并风干,最后用 0.1%结晶紫染色。显微镜下统计 5 个视野(上下左右中)黏附细胞数,求取平均值。每组设置 4 个技术重复,3 次生物学重复。细胞迁移实验 Transwell 上室面不铺基质胶,其他操作同侵袭实验。

1.7 流式细胞仪检测细胞凋亡 转染后 48 h,收集 U87MG 细胞,用磷酸缓冲盐溶液漂洗并加入结合缓冲液重悬细胞,接着加入 Annexin V、碘化丙啶培养,用 EPICSXL 流式细胞仪(美国 Beckman Couhe 公司)进行数据采集及分析,用 CellQuest 软件分析凋亡细胞百分比。

1.8 统计学方法 利用 SPSS 20.0 软件进行处理,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 *t* 检验;计数资料用 χ^2 检验;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒转染 U87MG 细胞 c-fos-shRNA 慢病毒转染 U87MG 细胞 48 h 后,荧光显微镜下观察发现空白对照组 U87MG 没有绿色荧光,而空载体组和转染组绝大部分 U87MG 细胞绿色荧光很强,与背景形成明显反差,可观察到清晰的细胞轮廓。详见图 1。

2.2 U87MG 细胞 c-fos mRNA 表达 c-fos-shRNA 慢病毒转染 U87MG 细胞 48 h 后,与空白对照组、空载

体组相比,转染组 U87MG 细胞 *c-fos* mRNA 表达水平明显降低($P<0.05$)。详见图 2。

2.3 U87MG 细胞 *c-fos* 蛋白表达 *c-fos*-shRNA 慢病毒转染 U87MG 细胞 48 h 后,与空白对照组、空载体组相比,转染组 U87MG 细胞 *c-fos* 蛋白表达显著降低($P<0.05$)。详见图 3。

2.4 沉默 *c-fos* 基因表达对 U87MG 细胞增殖的影响 *c-fos*-shRNA 慢病毒转染 U87MG 细胞 24 h 后,与空白对照组、空载体组相比,转染组 U87MG 细胞存活率显著降低($P<0.05$),且 U87MG 细胞活力显著减弱($P<0.05$)。详见图 4。

2.5 沉默 *c-fos* 基因表达对 U87MG 细胞迁移、侵袭能力的影响 *c-fos*-shRNA 慢病毒转染 U87MG 细胞 24 h 后,与空白对照组、空载体组相比,转染组 U87MG 细胞迁移和侵袭能力明显减弱($P<0.05$)。详见图 5。

2.6 沉默 *c-fos* 基因表达对 U87MG 细胞凋亡的影响 *c-fos*-shRNA 慢病毒转染 72 h 后,空白对照组 $[(16.64\pm2.25)\%]$ 、空载体组 $[(17.55\pm1.52)\%]$ 相比,转染组 U87MG 细胞凋亡率 $[(37.71\pm3.14)\%]$ 显著上升($P<0.05$)。详见图 6。

3 讨论

在生理情况下,*c-fos* 基因对细胞的生长、增殖、分化起着重要调节作用^[8]。研究表明,*c-fos* 基因与瘤细胞的恶性增殖有密切关系,胶质瘤恶性程度越高,*c-fos* 基因表达就越高^[9]。GBM 属于高恶性(WHO IV 级)的胶质瘤,其 *c-fos* 基因高度过表达。*c-fos* 常被用来作为胶质瘤的增值性指标,而且,有研究应用 *c-fos* 启动子驱动自杀基因来诱导癌细胞死亡^[10,11]。*c-fos* 是与肿瘤发生、发展密切相关的原癌基因,抑制其表达对肿瘤治疗很有价值。

RNAi 技术作用机制是异源基因片段进入机体细胞后,激发机体的自身免疫作用,同时引发与 siRNA 序列同源的 mRNA 降解,是生物体防御外来基因的固有方式,具有很好的安全性、可行性^[12]。慢病毒载体没有复制能力,不包含致病基因,可转染不同类型的细胞,产生突变的几率很小,能在转染细胞中稳定又持久地表达,能被拆分为 3~4 个质粒系统而显著提高它的生物安全性^[13,14]。慢病毒是一个有效的靶基因 siRNA 转移工具。因此,本研究通过

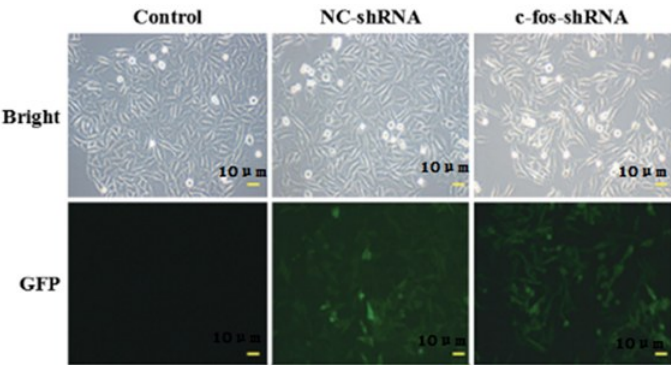


图 1 荧光显微镜下观察慢病毒转染 48 h 后 U87MG 细胞的形态 Control. 空白对照组; NC-shRNA. 空载体组; *c-fos*-shRNA. *c-fos*-shRNA 转染组

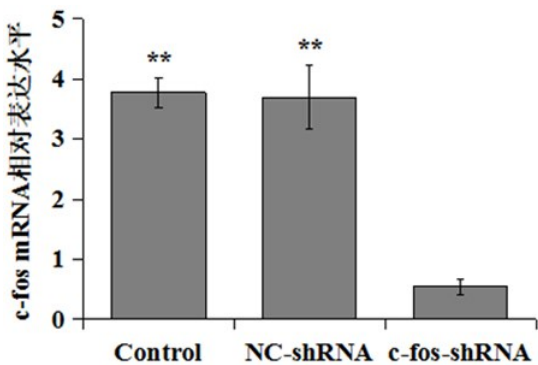


图 2 慢病毒转染 U87MG 细胞 *c-fos* mRNA 表达水平 Control. 空白对照组; NC-shRNA. 空载体组; *c-fos*-shRNA. *c-fos*-shRNA 转染组;与 *c-fos*-shRNA 组相比,** $P<0.05$

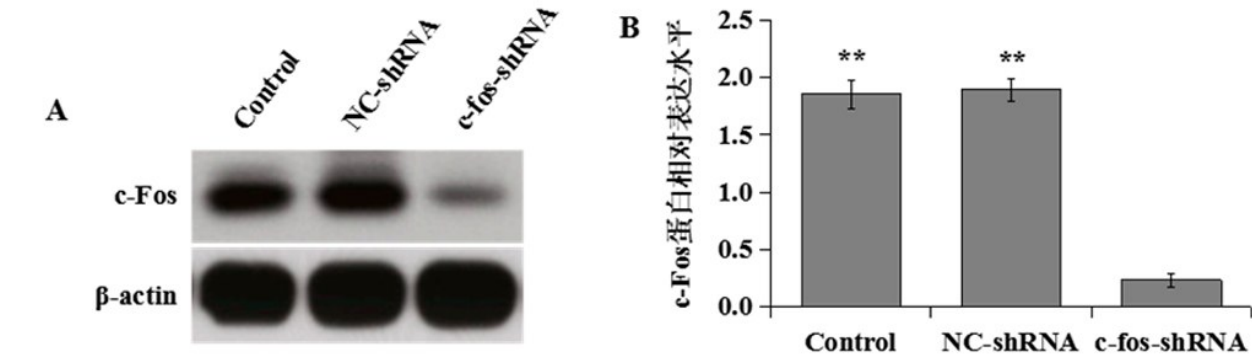


图 3 慢病毒转染 U87MG 细胞 *c-fos* 蛋白表达水平 Control. 空白对照组; NC-shRNA. 空载体组; *c-fos*-shRNA. *c-fos*-shRNA 转染组;与 *c-fos*-shRNA 组相比,* $P<0.05$,** $P<0.05$

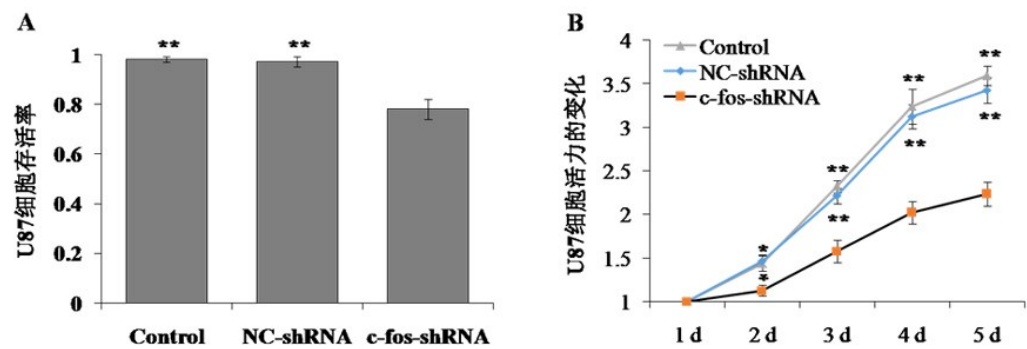


图4 沉默c-fos基因表达对U87MG细胞增殖的影响

A. 慢病毒转染48 h后U87MG细胞存活率;B:U87MG细胞活力变化;Control. 空白对照组;NC-shRNA. 空载体组; c-fos-shRNA. c-fos-shRNA转染组;与c-fos-shRNA组相比,** $P<0.05$

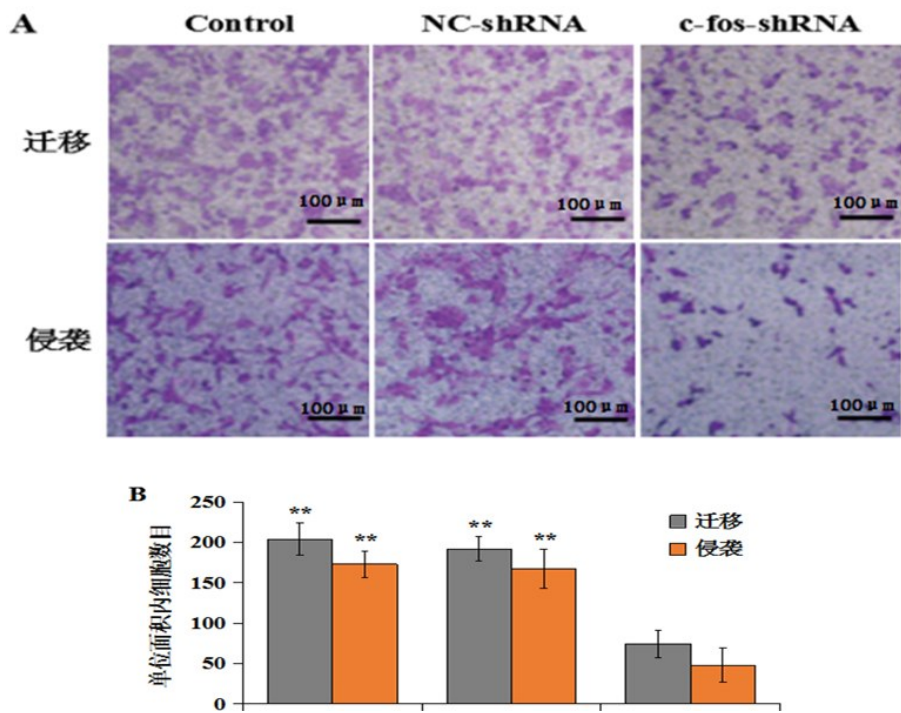


图5 沉默c-fos基因表达对U87MG细胞迁移、侵袭能力的影响

A. 慢病毒转染24 h后U87MG细胞的迁移和侵袭情况;B. U87MG细胞迁移和侵袭的数目;Control. 空白对照组;NC-shRNA. 空载体组;c-fos-shRNA. c-fos-shRNA转染组;与c-fos-shRNA组相比,** $P<0.05$

c-fos-shRNA慢病毒介导的方式沉默U87MG c-fos的表达,结果发现转染U87MG细胞c-fos mRNA和蛋白表达水平明显下降,这说明筛选的c-fos-shRNA基因靶点既高效又特异。另外,MTT、Transwell和流式细胞仪结果显示,转染c-fos-shRNA慢病毒组U87MG细胞存活率显著下降,细胞凋亡率显著上升,细胞的增殖侵袭能力明显受到抑制,说明抑制c-fos基因表达,U87MG细胞增殖、侵袭受限且出现明显凋亡。这进一步证实抑制c-fos基因的表达能够控制癌细胞的增殖、侵袭并诱导癌细胞的凋亡,同时说明胶质瘤靶向c-fos基因治

疗有望通过c-fos-shRNA慢病毒介导的方式来实现。

综上所述,转染靶向c-fos基因的siRNA慢病毒,不仅有效下调U87MG细胞c-fos基因表达,同时进一步证实沉默c-fos基因的表达可抑制肿瘤细胞的体外增殖和侵袭,并促进肿瘤细胞的凋亡。

【参考文献】

[1] 刘森,沈野,于洪飞,等. 基于RNA-seq研究胶质母细胞瘤中差异表达基因及蛋白相互作用网络[J]. 基因组

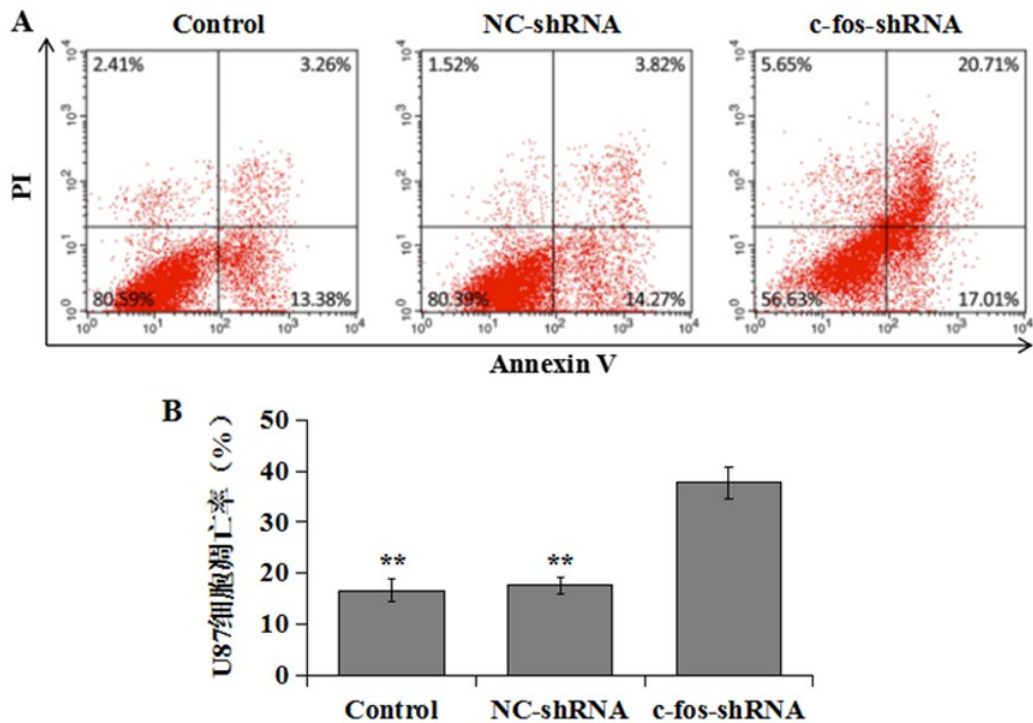


图6 沉默c-fos基因表达对U87MG细胞凋亡的影响

Control. 空白对照组;NC-shRNA. 空载体组;c-fos-shRNA. c-fos-shRNA转染组;与c-fos-shRNA转染组相比,** $P<0.05$

学与应用生物学,2017,8(4):1280-1287.

[2] Gudbergsson JM, Elbæk KJ, Stolberg CB, *et al.* Characterization of glioblastoma multiforme exosomes [J]. Dig Dis Sci, 2015, 43(11): 2398-2404.

[3] Amanda S, Varsha H, Zainab A, *et al.* MicroRNAs in glioblastoma multiforme pathogenesis and therapeutics [J]. Cancer Med, 2016, 5(8):1917-1946.

[4] 董梦梦,孙倩玲,张灵芝,等. CKS2 shRNA 慢病毒表达载体的构建及其抑制卵巢癌 A2780 细胞增殖[J]. 基础医学与临床,2016,36(2):145-150.

[5] Yang B, Janardhanan R, Vohra P, *et al.* Adventitial transduction of lentivirus-shRNA-VEGF-A in arteriovenous fistula reduces venous stenosis formation [J]. Kidney Int, 2014, 85(2): 289-306.

[6] Chambellan A, Leahy R, Xu W, *et al.* Pivotal role of c-Fos in nitric oxide synthase 2 expression in airway epithelial cells [J]. Nitric Oxide, 2009, 20(3): 143-149.

[7] Liu Z, Yan R, Al-Salman A, *et al.* Epidermal growth factor induces tumour marker AKR1B10 expression through activator protein-1 signalling in hepatocellular carcinoma cells [J]. Biochem J, 2012, 442(2): 273-282.

[8] Senecal A, Munsky B, Proux F, *et al.* Transcription factors modulate c-Fos transcriptional bursts [J]. Cell Rep, 2014, 8(1): 75-83.

[9] Pozas E, Ballabriga J, Planas AM, *et al.* Kainic acid-induced excitotoxicity is associated with a complex c-Fos and c-Jun response which does not preclude either cell death or survival [J]. Dev Neurobiol, 2015, 33(3): 232-246.

[10] Pan J, Wang H, Liu X, *et al.* Tumor restrictive suicide gene therapy for glioma controlled by the FOS promoter [J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0143112.

[11] Figueiredo HF, Bruestle A, Bodie B, *et al.* The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expression in the forebrain depending on type of stressor [J]. Eur J Neurosci, 2015, 18(8): 2357-2364.

[12] 王浩,潘建青,胡继良,等. C-fos启动子在人胶质瘤细胞株及正常组织的转录活性研究[J]. 中华神经医学杂志,2015,14(7):669-673.

[13] 李霏,李松林,尹元琴. NK4基因重组慢病毒载体的构建及在肝癌细胞中的表达[J]. 中国医科大学学报,2011,40(12):1081-1084.

[14] 史梦婷,孟露萍,包海洋,等. 结核分支杆菌 Rv2031c 慢病毒载体的构建及其对 RAW264.7 细胞凋亡的影响[J]. 动物医学进展,2015,36(5):1-5.

(2017-08-19 收稿,2017-10-13 修回)