

· 论著 ·

SMP30 对肝癌细胞增殖影响作用机制

郭丽萍¹, 刘宇宏², 杨建军², 党冬梅¹

(1. 延安大学医学院, 陕西 延安 716000; 2. 延安大学附属医院, 陕西 延安 716000)

摘要:目的 探究 SMP30 对肝癌细胞的调控作用, 分析 SMP30 沉默对人肝脏细胞系 Hep G2 增殖、凋亡、侵袭等作用的影 响。方法 培养 Hep G2 细胞株, 从第二代开始隔一代收集培养细胞, 进行细胞总蛋白的提取, 提取肝癌细胞的细胞核蛋白、细胞浆蛋白、细胞膜蛋白, 利用蛋白质印迹法检测 SMP30 蛋白含量, 将肝癌细胞注入裸鼠腋部皮下作为裸鼠种植模型, 将其分为 2 周组、4 周组、6 周组, 每组各 10 只, 选择 10 只无荷瘤裸鼠作为对照组, 对裸鼠血清进行 Western blot 检测, 分析 SMP30mRNA 的相对表达量。结果与结论 肝癌发展状况与 SMP30 表达水平变化密切相关, DNA 甲基化能够降低肝癌 SMP30 蛋白, SMP30 可以有效抑制肝癌细胞的侵袭能力。

关键词: SMP30; 肝癌; Hep G2; DNA 甲基化; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R256.4

文献标识码: A

DOI: 10.19613/j.cnki.1671-3141.2018.67.005

本文引用格式: 郭丽萍, 刘宇宏, 杨建军, 等. SMP30 对肝癌细胞增殖影响作用机制[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(67):8-9.

Effect Mechanism of SMP30 on Hepatoma Cells Proliferation

GUO Li-ping¹, LIU Yu-hong², YANG Jian-jun², DANG Dong-mei¹

(1. Medicine School, Yan'an University, Yanan Shaanxi 716000; 2. Yan'an University Affiliated Hospital, Yanan Shaanxi 716000)

ABSTRACT: **Objective** to investigate regulation effect of SMP30 on hepatoma cells, analyze effect of SMP30 silence on proliferation, apoptosis and invasion of human liver cell line Hep G2. **Methods** culture Hep G2 cell line, collect cultured cells from second generations every other generation, abstract cell protein including cell nuclear protein, cytoplasmic protein and cell membrane protein, detect SMP30 protein content with Western blotting method, inject hepatoma cells into nude mice armpit subcutaneous area as nude mouse planting model. Divide them into 2-week group, 4-week group and 6-week group, 10 cases in each, choose 10 nude mice without tumor bearing as control group. Detect serum of nude mice by Western blotting, analyze relative expression of SMP30mRNA. **Conclusion** liver cancer development is closely related to SMP30 expression level changes. DNA methylation can reduce SMP30 protein in liver cancer, and SMP30 can inhibit the invasion ability of hepatoma cells effectively.

KEY WORDS: SMP30; Liver cancer; Hep G2; DNA methylation; Cell proliferation; Apoptosis

0 引言

肝癌指发生于肝脏的恶性肿瘤, 死亡率较高, 其是肝脏内的细胞所引发的癌病, 肝癌细胞的恶性增殖, 严重威胁到肝癌患者的身体健康, 临床证明, SMP30 对抑制肝癌细胞的恶性增殖具备极强的作用, 试验证明, 在 DNA、RNA、蛋白水平方面可以抑制大鼠肝细胞增殖, 对人肝癌细胞的增殖也有抑制作用^[1]。

1 材料

1.1 标本。人肝癌细胞选自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 主要试剂与设备。涉及到细胞培养用试剂、BSA、胰蛋白酶、MTT 细胞增值试剂盒、FQ-PCR 用试剂等, 实验设备包括通用设备、荧光显微镜、流式细胞仪、细胞培养设备等。

2 方法

2.1 设计 siRNA。其 siRNA 片段为 RGN-homo-1035, RGN-homo-1413, RGN-homo-1681 等。

2.2 肝癌细胞的培养传代及转染。以 4.5×10^4 对数生长期细胞接种于 24 孔板, 当细胞融合度达到 30%-50% 时转染, 转染前一天换无血清 DMEM 液, 每孔加入 0.4 mL, 做好每孔转染混合液, 将 siRNA-Xfec polymer 复合物加到培养

液及肝癌细胞的培养孔内。在一定温度培养 4 小时后, 将培养液换为常规培养液, 含有血清及青链双抗。培养 36 小时后, 提取总 RNA, 培养 2 天后, 提取总蛋白^[2]。

2.3 转染率测定。观察 FAM-siRNA 的转入细胞情况, 在 10 倍物镜下提取 6 个视野计数, 分析所标记细胞占总细胞的比值, 将其作为转染效率。

2.4 干扰效率的计算。利用荧光定量 PCR 测肝癌细胞内的 SMP30 mRNA, 进行相对表达量计算, 计算其 RQ 值。

2.5 肝癌细胞的生长曲线。配置 MTT 液, 将肝癌细胞以 104 个细胞 / 孔接种于 96 孔板, 每板接种 27 个孔, 共 5 板。各代表时间点 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h。将 96 孔板分为 3 组, 分别为 SMP3-siRNA 实验组、阴性对照组、空白组。每组 9 孔, 每孔加入含 1%-FBS 的 DMEM 液, 每 24 小时换液一次, 每孔加入一定量 MTT 溶液, 进行孵育, 进行各孔吸光值的测量, 设置调零孔, 反三次取平均值, 绘制生长曲线。

2.6 Transwell 侵袭实验。将无血清 EMEM 培养基与 matrigel 胶进行混匀, 选择对数生长期的各组细胞, 在 Transwell 上室内加入细胞悬液, 培养 2 天, 加入含有甲醇的孔内, 将膜风干, 移到加入结晶紫染液的孔内, 晾干后, 选取 6 个中倍视野计数。

2.7 流式细胞仪检测细胞凋亡及细胞周期的检测。将细胞培养液加入矢量胰酶细胞消化液, 加入细胞培养液, 用 PBS 轻轻重悬细胞进行计数, 离心弃上清, 加入 Annexin V-FITC 结合液, 加入碘化丙啶染色液, 做好流式细胞仪检测。

取对数生长期肝癌细胞, 以 1 mL 体积接种于 24 孔板, 转染

基金项目: 陕西省教育厅资助项目(项目编号: 09JK818);
延安大学科研计划资助项目(项目编号: YD2011-01, YD2006-11)

作者简介: 郭丽萍, 女, 延安大学, 硕士, 讲师, 研究方向: 分子病理学。

后放入培养箱 24 h, 利用含 EDTA 胰蛋白酶消化 5 分钟, 离心收集细胞, 弃上清, 用预冷 PBS 洗两次, 加入 75% 乙醇, 加入 PI, 以 300, 目尼龙网过滤细胞, 进行细胞增值指数计算。

2.8 统计分析。利用 SPSS 20.0 展开统计学处理, 使用单因素方差分析, 若 $P < 0.05$, 则差异具备统计学意义。

3 结果

3.1 转染率测定。利用荧光显微镜观察发荧光细胞, 其转染率为 86.8%。

3.2 测定干扰效率。计算相对表达量 RQ 值, 得出 RGN-homo-1035 为 $(43.52 \pm 10.64) \%$; RGN-homo-1413 为 $(8.25 \pm 1.96) \%$; RGN-homo-1681 为 $(65.58 \pm 12.69) \%$ 。干扰 48 小时后, 提取肝癌细胞内的总蛋白, 干扰效率 RGN-homo-1035 为 $(41.46 \pm 10.93) \%$; RGN-homo-1413 为 $(8.97 \pm 1.25) \%$; RGN-homo-1681 为 $(68.62 \pm 13.77) \%$ 。

3.3 MTT 检测肝癌细胞增值。检测三组肝癌细胞 OD 值, 具体信息如下表 1。

表 1 利用 MTT 法检测三组细胞不同时间点的吸光值

分组	时间段					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
空白组	1	1.56	3.12	5.63	8.87	13.08
对照组	1	1.65	2.99	5.74	8.98	12.76
实验组	1	1.77	4.64	8.85	13.96	18.55

3.4 细胞侵蚀实验。入室 2 天后, 结晶紫染色, 光镜下观察得知, 相比于对照组及空白组的穿膜细胞数量, 干扰组数量明显增加, 差别具备统计学意义 ($P < 0.05$), 空白组与对照组无显著性差异。

3.5 流式细胞仪测细胞凋亡。进行各实验组细胞收集, 加入 Annexin V-FITC 及碘化丙啶避光染色, 观察细胞凋亡率, 干扰组为 $(7.54 \pm 1.36) \%$, 高于其他两组。流式检测效果发现, 干扰组细胞调零率为 $(45.45 \pm 11.36) \%$, 高于空白组及对照组。

3.6 测调零相关蛋白 Bcl-2 与 Bax。通过 western-blot 法测试, 得知实验组、空白组、对照组的 Bcl-2 的相对表达量分别是

(24.33 ± 2.53) 、 (44.67 ± 2.76) 、 (47.25 ± 5.45) 。实验组的 bcl-2, 具备统计学差异 ($P < 0.05$)。测 Bax 蛋白, 计算相对表达量, 实验组、空白组、对照组 Bax 相对表达量分别为 (65.38 ± 5.46) 、 (45.13 ± 3.26) 、 (46.25 ± 5.45) 。实验组 Bax 表达明显提高。

3.7 流式细胞仪测细胞周期。流式检测结果得知, 实验组细胞增值指数提高, 具备统计学差异。实验组、空白组、对照组的细胞增值指数分别为 $(44.38 \pm 5.28) \%$ 、 $(25.45 \pm 3.89) \%$ 、 $(26.25 \pm 5.64) \%$ 。

4 讨论

RNAi 是一种基因沉默技术, 起到调节细胞内基因表达的作用。SiRNA 有效结合靶基因 mRNA 是 RNAi 的核心, 为了提升 siRNA 转染效率, 需要避免 RNA 酶受到污染, 所选用 Xfect 转染试剂不受血清感染, 得出 RGN-homo-1035 组及 RGN-homo-1681 组的干扰效率均高于 50%, 可以作为候选目标。RGN-homo-1681 组可以作为后续实验的干扰序列。SMP30 在 DNA、RNA、蛋白水平方面可以抑制大鼠肝细胞增殖, 对人肝癌细胞的增殖也有抑制作用^[3]。研究表明, 内源性 SMP30 对多种参与蛋白质代谢和信号传导的酶都具备抑制分泌的作用, SMP30 表达降低的结果导致细胞凋亡的增加, SMP30 可抑制紫外照射导致的肝癌细胞凋零, 对于生理状态下的肝癌细胞不具备调节凋亡作用。Bax/bcl-2 比值决定同源二聚体与异源二聚体的比值, 决定了细胞能否进入凋亡状态。

参考文献

- [1] 黄朋, 范升龙, 凌敏, 等. 肝癌相关抗原 SMP30 重组基因的构建、表达及分子伴侣共表达系统的探索 [J]. 生物技术通报, 2012(4):170-175.
- [2] 李月英. 小 G 蛋白 RhoA 在肿瘤细胞核内的分布及其影响因素 [D]. 江苏大学, 2011.
- [3] 滕晓英. 肝硬变组织中变异肝细胞结节的检出及其遗传学改变 [D]. 北京协和医学院, 2009.

(上接第 2 页)

- [6] 罗月婵. 血液灌流联合血液透析治疗尿毒症患者的综合护理 [J]. 护理实践与研究, 2017,14(8):44-45.
- [7] 王淑萍. 血液透析联合血液灌流治疗尿毒症皮肤瘙痒患者的临床护理观察 [J]. 实用临床医药杂志, 2017,21(4):71-73.
- [8] 魏莹. 血液灌流与血液透析联合治疗尿毒症皮肤瘙痒的护理方法 [J]. 中国医药指南, 2017,15(20):234-235.
- [9] Raine A, Cordonnier D, Ritz E. Effect of Hematodialysis Combined with Hemoperfusion on Insulin Resistance and Nutritional Status of Patients with End-Stage Diabetic Nephropathy [J]. 2015,3(3).
- [10] 范转爱. 综合护理干预对尿毒症皮肤瘙痒患者的疗效观察 [J].

医药前沿, 2015,5(30):302-302.

- [11] 高亚丽, 李艳玲, 钟健鹏. 综合护理对血液灌流串联血液透析治疗尿毒症皮肤瘙痒的影响 [J]. 当代医学, 2017,23(5):160-161.
- [12] 董莉. 对行血液透析联合血液灌流治疗的尿毒症患者施行综合护理的效果分析 [J]. 当代医药论丛, 2016,14(16):136-137.
- [13] 王晓丽, 聂忠, 曾健梅. 协同护理模式对维持性血液透析串联血液灌流治疗尿毒症皮肤瘙痒临床分析 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2017,27(2):160-161.
- [14] Zhi-Qiang O U, Lun L D, Xin-Lun L I, et al. Long-term clinical study of effects of hemodialysis combined with hemoperfusion on clearance of protein-bound uremic toxins in maintenance hemodialysis patients [J]. Military Medical Sciences, 2017,32(3):78.

(上接第 7 页)

invasion and metastasis in gastric cancer by targeting Tgif2 [J]. International Journal of Clinical & Experimental Pathology, 2015,8(8):8921.

- [9] Zhou YJ, Yang HQ, Xia W, Cui L, Xu RF, Lu H, Xue Z, Zhang B, Tian ZN and Cao YJ. Down-regulation of miR-605 promotes the proliferation and invasion of prostate cancer cells by up-regulating EN2 [J]. Life Sciences, 2017,190.