

# 沉默*hnRNP A2B1*基因促进肾癌细胞凋亡

杨时来<sup>1</sup> 陈勇<sup>2</sup> 张唯力<sup>1\*</sup> 张建华<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>重庆医科大学附属第二医院泌尿外科, 重庆 400010; <sup>2</sup>重庆医科大学附属涪陵中心医院泌尿外科, 重庆 408000)

**摘要** 为观察不均一型核糖核蛋白A2B1(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2B1, *hnRNP A2B1*)基因沉默对786-0肾癌细胞株凋亡的影响及其可能的机制, 构建了针对*hnRNP A2B1*基因的短发夹RNA(shRNA)重组质粒, 并转染786-0细胞; RT-PCR检测重组质粒对*hnRNP A2B1*基因的沉默效果以及对凋亡因子Bcl-X亚型表达的影响; 流式细胞计数检测细胞凋亡改变; MTT比色法检测细胞增殖能力。结果显示, 与对照组相比, 基因沉默组细胞凋亡率明显增加, 而细胞增殖率显著降低( $P < 0.05$ )。沉默组中促凋亡因子Bcl-X(S)亚型mRNA明显增加, Bcl-X(S)/Bcl-X(L)比值增大( $P < 0.05$ )。*hnRNP A2B1*基因沉默促进786-0肾癌细胞凋亡, *hnRNP A2B1*基因对凋亡的调节与影响促凋亡因子Bcl-X(S)的表达有关。

**关键词** *hnRNP A2B1*; 基因沉默; Bcl-X; 细胞凋亡

## Gene Silencing on *hnRNP A2B1* Promotes Apoptosis of Renal Cell Carcinoma Cells

Yang Shilai<sup>1</sup>, Chen Yong<sup>2</sup>, Zhang Weili<sup>1\*</sup>, Zhang Jianhua<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Urology, The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China;

<sup>2</sup>Department of Urology, Fuling Central Hospital, Chongqing 408000, China)

**Abstract** To investigate the effects of *hnRNP A2B1* gene silencing on apoptosis of 786-0 cells and its potential mechanism, *hnRNP A2B1* shRNA recombinant plasmids were constructed and transfected into renal cell carcinoma 786-0 cells. The effects of *hnRNP A2B1* shRNA recombinant plasmids on *hnRNP A2B1* gene silencing and the expression of Bcl-X isoforms were detected by RT-PCR. The apoptosis of 786-0 cells were assayed by flow cytometry. MTT method was used to observe the proliferation ability of 786-0 cells. Compared to the control groups, the apoptosis rates of gene-silencing groups were increased significantly while the cell multiplication rates were notably decreased ( $P < 0.05$ ); The mRNA expression levels of pro-apoptotic factor Bcl-X(S) and the ratio of Bcl-X(S)/Bcl-X(L) were increased significantly after the *hnRNP A2B1* gene have been silenced ( $P < 0.05$ ). In conclusion, *hnRNP A2B1* gene silencing could effectively promote apoptosis of 786-0 cells, the mechanism of which probably relates to its affection on the expression of Bcl-X(S).

**Key words** *hnRNP A2B1*; gene silencing; Bcl-X; apoptosis

不均一型核糖核蛋白(heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, hnRNPs)是与mRNA生物学功能密切相关的RNA结合蛋白家族, 参与mRNA前

体选择性剪切、mRNA在核质间的转运以及介导mRNA的翻译和更新, 通过调节细胞增殖与凋亡, 参与许多肿瘤的形成<sup>[1]</sup>。不均一型核糖核蛋白

收稿时间: 2013-04-11 接受时间: 2013-07-15

\*通讯作者。Tel: 023-63693574, E-mail: 66zwl@sina.com; Tel: 023-63693574, E-mail: zjhua61@126.com

Received: April 11, 2013 Accepted: July 15, 2013

\*Corresponding authors. Tel: +86-23-63693574, E-mail: 66zwl@sina.com; Tel: +86-23-63693574, E-mail: zjhua61@126.com

网络出版时间: 2013-08-26 14:44 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130826.1444.005.html>

A2B1(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2B1, hnRNP A2B1)是hnRNPs家族中的重要成员,在mRNA转录后调节中起重要作用,该基因作为一个重要的促癌基因,在许多肿瘤中呈现过表达,与肿瘤形成密切相关<sup>[2-3]</sup>,但目前尚未见到该基因与肾癌相关的研究。本研究通过RNA干扰技术(RNA interference)探讨该基因对786-0肾癌细胞凋亡的影响及其可能的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

786-0肾癌细胞株购自中国科学院上海细胞库。DNA重组质粒与pGenesil-1.1空质粒购自武汉浙玛生物技术有限公司,转染试剂MegaTran 1.0购自OriGene公司。Trizol、逆转录试剂盒与RT-PCR引物购自TaKaRa公司,RPMI-1640培养基和胎牛血清为Hyclone公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 质粒构建** 按照Genbank中*hnRNP A2B1*的mRNA序列(NM-031243),合成针对该基因转录区序列的重组质粒。序列信息正义链:5'-CAC CGT GGA AGA GGA GGC AAC TTT GCT ATG GAC ACA AAG TTG CCT CCT CTT CCA CTT TTT TG-3';反义链:5'-AGC TCA AAA AAG TGG AAG AGG AGG CAA CTT TGT GTC CAT AGC AAA GTT GCC TCC TCT TCC AC-3',大小1 062 bp,Blast分析序列特异性,质粒构建与测序均由武汉浙玛公司完成,使用pGenesil-1.1空质粒作为对照。

**1.2.2 稳定转染质粒细胞株的筛选** 将786-0肾癌细胞用含有10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗的RPMI-1640培养液,于37 °C,5% CO<sub>2</sub>恒温箱中培养。实验设P-shRNA-A2B1组(沉默组)、P-shRNA-GFP(空质粒组)、Untreated-786-0组(正常组),分别给予转染针对*hnRNP A2B1*基因序列的重组质粒、空质粒以及只加转染试剂的处理。转染48 h后用1 200 ng/mL G418的培养基筛选,2周后建立稳定克隆质粒的细胞株。

**1.2.3 各组*hnRNP A2B1*、*Bcl-X(S)*与*Bcl-X(L)* mRNA水平的检测** 采用SYBR<sup>®</sup>Green荧光定量PCR法。取对数生长期各组细胞,分别加入1 mL Trizol试剂,提取细胞总RNA,经鉴定后,逆转录合成cDNA,于-20 °C保存。设计引物序列如下:hnRNP A2B1-F: 5'-CAG

CGG CAG TTC TCA CTA CA-3', hnRNP A2B1-R: 5'-ATC CCT CAT TAC CAC ACA GTC T-3', 241 bp; Bcl-X(S)-F: 5'-AGG CAG GCG ACG AGT TTG A-3', Bcl-X(S)-R: 5'-TCC ACA AAA GTA TCC TGT TCA AAG C-3', 115 bp; Bcl-X(L)-F: 5'-CAC TGT GCG TGG AAA GCG TA-3', Bcl-X(L)-R: 5'-GAT CCA AGG CTC TAG GTG GTC AT-3', 101 bp;  $\beta$ -Actin-F: 5'-CCA CTG GCA TCG TGA TGG-3',  $\beta$ -Actin-R: 5'-GCG GAT GTC CAC GTC ACA CT-3', 291 bp。总反应体系10  $\mu$ L: 5  $\mu$ L Eva@green, 3  $\mu$ L无RNA酶水,正反引物各0.5  $\mu$ L, cDNA 1  $\mu$ L。反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 10 s, 56 °C 30 s, 40个循环。待测样品与内参同时检测,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [ $\Delta Ct = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{内参基因})$ ,  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{处理组}) - \Delta Ct(\text{对照组})$ ]法表示基因表达的相对变化,由Bio-Rad CFX Manager软件自动计算得到处理组与对照组相同基因表达差异。每组实验重复3次。

**1.2.4 细胞凋亡率检测** 采用流式细胞技术法。取正常培养96 h后的各组细胞,0.125%胰酶消化后制成单细胞悬液,800 r/min,离心5 min,弃上清,溶于PBS制成单细胞悬液,流式细胞仪检测凋亡率,实验重复3次。

**1.2.5 MTT比色法检测细胞增殖并绘制生长曲线** 用0.125%的胰酶消化各组细胞制成悬液,显微镜下计数,调整细胞密度为 $4 \times 10^4$ /mL。每孔取细胞悬液200  $\mu$ L(约 $8 \times 10^3$ 个细胞)种于96孔板,每组设3个复孔,分别培养12, 24, 48, 72, 96 h后加入MTT液20  $\mu$ L继续培养4 h,再加入DMSO 120  $\mu$ L,震荡10 min,在全自动酶联免疫检测仪中取492 nm波段检测各孔的吸光度值( $D_{492}$ ),并以此作为衡量细胞增殖能力。每组试验重复3次。

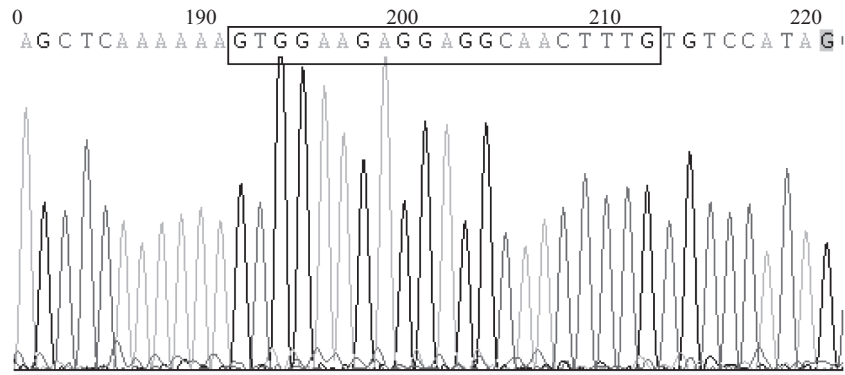
### 1.3 统计学分析

使用SPSS 19.0软件进行统计分析,数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用方差分析结合多重比较LSD检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒构建与转染

基因测序显示质粒中植入序列与预期相符(图1)。按转染试剂MegaTran 1.0说明书转染重组质粒与空质粒,后在含1 200 ng/mL G418的培养基中培养,1周左右可见大量细胞死亡,筛选2周后建立稳定



黑框处显示成功植入的*hnRNA2B1*的特异序列。

The sequence in the black frame demonstrated that the distinguished sequence of *hnRNA2B1* has been imbedded successfully.

图1 目的重组质粒部分基因测序图

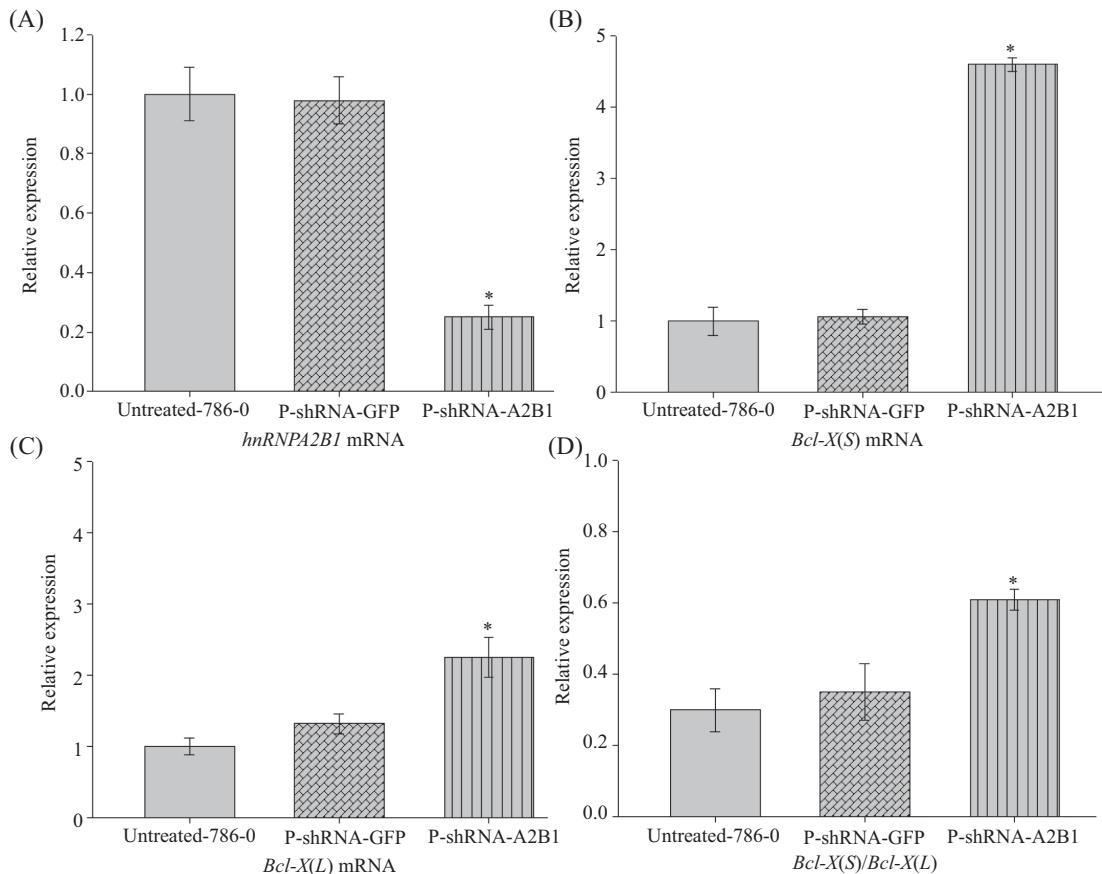
Fig.1 A part of the gene sequencing graph of the purpose plasmid

克隆质粒的细胞株。

## 2.2 各组*hnRNA2B1*、*Bcl-X(S)*与*Bcl-X(L)* mRNA水平表达

荧光定量PCR检测结果表明,与Untreated-786-0组相比, P-shRNA-A2B1组*hnRNA2B1* mRNA

表达量平均降低75%左右( $P=0.000$ )(图2A); *Bcl-X(S)* mRNA表达量平均增加4.6倍( $P=0.000$ )(图2B); *Bcl-X(L)* mRNA表达量平均增加2.25倍( $P=0.001$ )(图2C); *Bcl-X(S)*与*Bcl-X(L)* mRNA表达量比值平均增加2倍( $P=0.001$ )(图2D); 各基因在P-shRNA-A2B1组与



\* $P < 0.05$ , 与Untreated-786-0组比较。

\* $P < 0.05$  compared with Untreated-786-0 group.

图2 *hnRNA2B1*、*Bcl-X(S)*和*Bcl-X(L)* mRNA的表达

Fig.2 The mRNA expression of *hnRNA2B1*, *Bcl-X(S)* and *Bcl-X(L)*

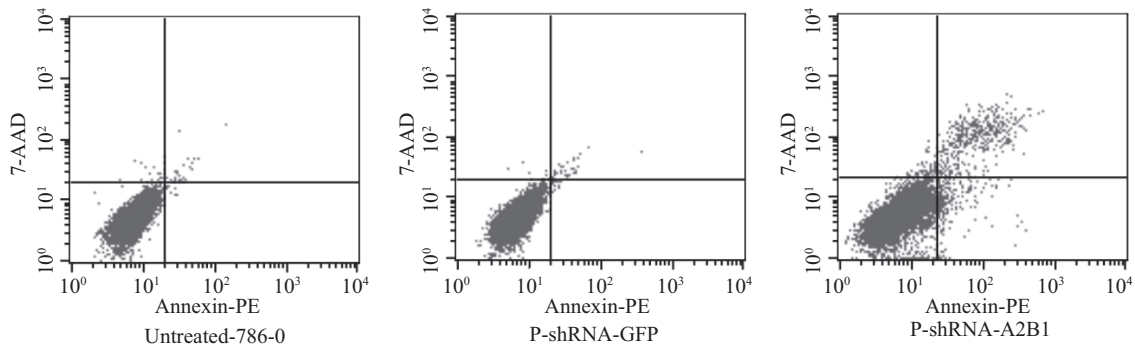


图3 各组肾癌细胞凋亡率

Fig.3 The apoptosis rates of renal cancer cells in each group

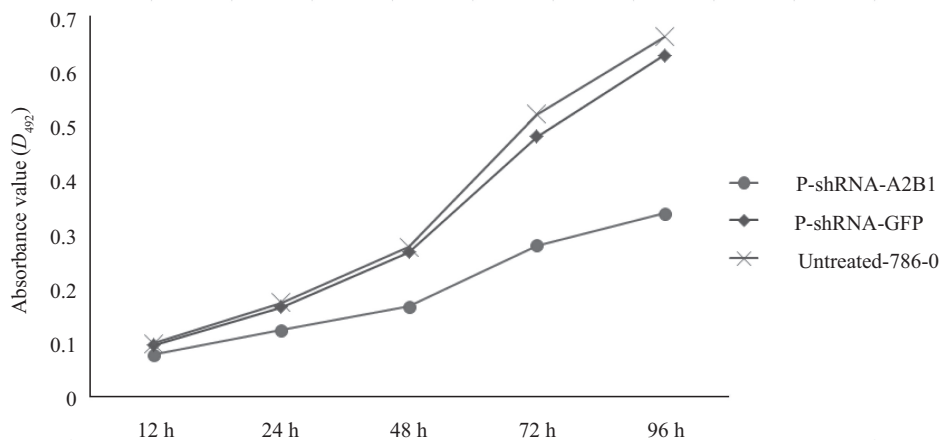


图4 各组肾癌细胞的生长曲线

Fig.4 Growth curves of renal cancer cells in each group

P-shRNA-GFP中表达差异均无统计学意义( $P>0.05$ ) (图2)。说明所构建质粒特异性抑制了*hnRNPA2B1*基因表达,并引起以促凋亡因子Bcl-X(S)亚型增高为主的Bcl-X表达改变,尽管Bcl-X(S)/Bcl-X(L)比值增加,但肾癌细胞中抗凋亡Bcl-X(L)亚型仍高于促凋亡Bcl-X(S)亚型。

### 2.3 流式细胞计数检测各组细胞凋亡率

P-shRNA-A2B1组细胞总凋亡率( $15.05\pm 0.76\%$ )与Untreated-786-0组( $1.40\pm 0.50\%$ )相比显著增加,差异有统计学意义( $P=0.000$ ); P-shRNA-GFP组( $1.75\pm 0.70\%$ )与Untreated-786-0组之间差异无统计学意义( $P=0.830$ ),表明*hnRNPA2B1*基因沉默后癌细胞凋亡明显增加(图3)。

### 2.4 MTT比色法检测各组癌细胞增殖速度

与Untreated-786-0组相比, P-shRNA-A2B1组细胞在12, 24, 48, 72, 96 h的吸光度值( $D_{492}$ )分别下降了( $21.65\pm 3.24\%$ )、( $29.65\pm 4.65\%$ )、( $39.78\pm 3.86\%$ )、( $46.63\pm 2.27\%$ )、( $49.17\pm 4.28\%$ )( $F=64.56$ ;  $P=0.00$ ),而

P-shRNA-GFP组与Untreated-786-0组之间差异无统计学意义( $P=0.32$ )(图4)。结果表明, P-shRNA-A2B1组细胞增殖明显受抑制。

## 3 讨论

肾癌是泌尿系统常见的肿瘤,约占整个人类恶性肿瘤的3%,其中以肾透明细胞癌组织类型多见。但目前肾癌的发病机制仍不清楚。本研究以786-0肾透明细胞癌细胞株为研究对象,探讨*hnRNPA2B1*基因在肾癌细胞生长中的作用,特别是对癌细胞凋亡的影响。*hnRNPA2B1*是一种RNA结合蛋白,是*hnRNPs*家族A/B亚型中含量最丰富且研究最多的两个亚型,二者来自同一个基因具有高度同源性<sup>[1]</sup>。在肺癌研究中最先提出该基因过表达与癌症密切相关,并被认为是早期肺癌检测标志物<sup>[4]</sup>。后续研究证实,*hnRNPA2B1*的过表达与肺癌、胰腺癌、大肠癌、乳腺癌、胶质母细胞瘤等多种肿瘤的发生及预后相关<sup>[3-6]</sup>。同时体外研究也发现,*hnRNPA2B1*可以调

节癌细胞周期,抑制细胞凋亡并促进癌细胞增殖<sup>[6]</sup>。但该基因促癌的具体机制仍不清楚,很多研究表明*hnRNPA2B1*基因可以通过对其靶基因mRNA前体进行选择剪切,选择性表达靶基因亚型,从而发挥其调节mRNA的生物学作用<sup>[1]</sup>。据统计, hnRNPs中以*hnRNPA2B1*为主的6种亚型,参与了人体细胞中半数以上前体mRNA选择性剪切<sup>[7]</sup>。

选择性剪切在调节细胞凋亡中同样具有重要作用,许多凋亡蛋白通过选择性剪切产生功能彼此对抗的两种亚型,以维持机体细胞正常的增殖与凋亡,当凋亡因子的选择性剪切作用紊乱后就有可能导致肿瘤的形成<sup>[8]</sup>。Chen等<sup>[5]</sup>研究发现在胰腺癌细胞中*hnRNPA2B1*可与*Bcl-X* mRNA结合,抑制*hnRNPA2B1*基因可上调*Bcl-X(S)*与*Bcl-X(L)*的比值,从而促进胰腺癌细胞的凋亡。凋亡蛋白*Bcl-X*是B淋巴细胞瘤-2基因(B-cell lymphoma-2, *Bcl-2*)家族中的重要成员,与凋亡密切相关。*Bcl-X*通过选择性剪切作用,产生两种功能相反的亚型:促凋亡蛋白*Bcl-X(S)*与抗凋亡蛋白*Bcl-X(L)*<sup>[9]</sup>。Gobe等<sup>[10]</sup>发现,抗凋亡蛋白*Bcl-X(L)*在肾癌中过表达并抑制肾癌细胞凋亡,抑制*Bcl-X(L)*活性则可以促进细胞凋亡并增加肿瘤对化疗药物的敏感性<sup>[11]</sup>。与之相反,增加促凋亡蛋白*Bcl-X(S)*表达则引起肉瘤细胞大量死亡,在增加*Bcl-X(L)*后,*Bcl-X(S)*的促凋亡作用受到抑制<sup>[12]</sup>。总之,*Bcl-X*蛋白在调节细胞凋亡中发挥重要作用,并与肿瘤的形成密切相关。

本研究探讨了*hnRNPA2B1*基因与肾癌的相关性,我们发现通过RNA干扰技术沉默该基因后,肾癌细胞凋亡明显增加,增殖受到明显抑制。同时该基因抑制后引起促凋亡因子*Bcl-X(S)*表达显著增加,*Bcl-X(S)/Bcl-X(L)*比值明显增高,这与Chen等<sup>[5]</sup>在胰腺癌中的研究结果一致,而且该基因沉默在促进促凋亡因子*Bcl-X(S)*表达的同时也引起抗凋亡*Bcl-X(L)*因子轻度增高,这与Tacke等<sup>[13]</sup>在白血病研究中发现的现象相同,其具体机理并不清楚,可能是由于*Bcl-X(S)*增加激发机体自身负反馈调节而引起*Bcl-X(L)*代偿性上调,这说明癌细胞具有抑制细胞凋亡的自身调节机制。再者,我们发现肾癌细胞中抗凋亡*Bcl-X(L)*因子基础表达量明显高于促凋亡因子*Bcl-X(S)*,这或许是导致癌细胞能无限增殖的原因之一。总之,研究表明*hnRNPA2B1*基因沉默具有促进肾癌细胞凋亡抑制其增殖的作用,这一作用机制

可能与其增加促凋亡因子*Bcl-X(S)*表达有关。因此,在*hnRNPA2B1*基因影响肾癌发生发展方面更深入研究以及该基因调节*Bcl-X*表达影响细胞凋亡方面更深入的探讨,可以为肾癌的发病机制和*hnRNPA2B1*的促癌机理提供新的理论依据,为肾癌的基因治疗提供新的靶点。

### 参考文献 (References)

- 1 Krecic AM, Swanson MS. hnRNP complexes: Composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11(3): 363-71.
- 2 Blanchette M, Green RE, MacArthur S, Brooks AN, Brenner SE, Eisen MB, *et al.* Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing and RNA-binding specificities of the *Drosophila* hnRNP A/B family members. *Mol Cell* 2009; 33(4): 438-49.
- 3 Golan-Gerstl R, Cohen M, Shilo A, Suh SS, Bakacs A, Coppola L, *et al.* Splicing factor hnRNP A2/B1 regulates tumor suppressor gene splicing and is an oncogenic driver in glioblastoma. *Cancer Res* 2011; 71(13): 4464-72.
- 4 Katsimpoula S, Patrinoiu-Georgoula M, Makrilia N, Dimakou K, Guialis A, Orfanidou D, *et al.* Overexpression of hnRNPA2/B1 in bronchoscopic specimens: A potential early detection marker in lung cancer. *Anticancer Res* 2009; 29(4): 1373-82.
- 5 Chen ZY, Cai L, Zhu J, Chen M, Chen J, Li ZH, *et al.* Fyn requires HnRNPA2B1 and Sam68 to synergistically regulate apoptosis in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 2011; 32(10): 1419-26.
- 6 He Y, Brown MA, Rothnagel JA, Saunders NA, Smith R. Roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A and B in cell proliferation. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 14): 3173-83.
- 7 Huelga SC, Vu AQ, Arnold JD, Liang TY, Liu PP, Yan BY, *et al.* Integrative genome-wide analysis reveals cooperative regulation of alternative splicing by hnRNP proteins. *Cell Rep* 2012; 1(2): 167-78.
- 8 Mercatante DR, Bortner CD, Cidowski JA, Kole R. Modification of alternative splicing of Bcl-x pre-mRNA in prostate and breast cancer cells. analysis of apoptosis and cell death. *J Biol Chem*, 2001; 276(19): 16411-7.
- 9 Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, *et al.* bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993; 74(4): 597-608.
- 10 Gobe G, Rubin M, Williams G, Sawczuk I, Buttyan R. Apoptosis and expression of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax in renal cell carcinomas. *Cancer Invest* 2002; 20(3): 324-32.
- 11 Chen J, Jin S, Abraham V, Huang X, Liu B, Mitten MJ, *et al.* The Bcl-2/Bcl-X(L)/Bcl-w inhibitor, navitoclax, enhances the activity of chemotherapeutic agents *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cancer Ther* 2011; 10(12): 2340-9.
- 12 Mitra RS, Benedict MA, Qian D, Foreman KE, Ekhterae D, Nickoloff BJ, *et al.* Killing of sarcoma cells by proapoptotic Bcl-X(S): Role of the BH3 domain and regulation by Bcl-X(L). *Neoplasia* 2001; 3(5): 437-45.
- 13 Tacke F, Marini FC, 3rd, Zhao S, McQueen T, Konopleva M, Ruvolo PP, *et al.* Expression of inducible Bcl-X(S) in myeloid leukemia: Compensatory upregulation of Bcl-X(L) and Bcl-2 prevents apoptosis and chemosensitization. *Cancer Biol Ther* 2004; 3(3): 340-7.