

• 论著·实验研究 •

慢病毒 RNA 干扰 GRP78 对肾癌细胞
生物学行为的影响研究*付伟金¹ 吕佰豪¹ 顾恺龙¹

[摘要] 目的:探讨慢病毒 RNA 干扰 GRP78 蛋白后对肾癌细胞生物学行为的影响。方法:构建慢病毒靶向 siRNA-GRP78 干扰载体进入肾癌细胞株。转染 48 h 后使用 Realtime-PCR 和 Western blotting 检测 GRP78 基因和蛋白表达,MTT 法和 transwell 法分别检测肾癌细胞增殖和侵袭力。结果:转染 48 h 后,Realtime-PCR 和 Western blotting 检测证实 siRNA1 抑制 GRP78 基因和蛋白效率最佳。SiRNA1-GRP78 可抑制肾癌细胞增殖和降低细胞侵袭力,促进细胞凋亡,阻滞细胞于 G1 期。结论:慢病毒 RNA 干扰可有效抑制肾癌细胞中 GRP78 基因和蛋白表达,GRP78 表达下调影响肾癌细胞增殖和降低细胞侵袭力,诱导细胞凋亡,阻滞细胞于 G1 周期。GRP78 可能成为肾癌治疗新靶点。

[关键词] 慢病毒 RNA 干扰;GRP78;增殖;侵袭力;细胞凋亡;细胞周期

doi: 10.13201/j.issn.1001-1420.2016.12.018

[中图分类号] R737.11 [文献标识码] A

Research on the effect of lentivirus-siRNA-GRP78 on biological
behavior of renal cell carcinoma

FU Weijin LV Baihao GU Kailong

(Department of Urology, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, 530021, China)

Corresponding author: FU Weijin, E-mail: fuwj66@aliyun.com

Abstract Objective: To investigate the effect of lentivirus-siRNA-GRP78 on biological behavior of renal cell carcinoma (RCC). **Method:** According to GRP78 gene sequences, we constructed three siRNA-GRP78 sequences and one scrambled siRNA sequence, which were transfected into RCC cell line 786-0. After transferring for 48h, we identified the expression level of GRP78 mRNA and protein by realtime-PCR and Western blot for selecting the optimal inhibiting siRNA-sequence. MTT, transwell, Annexin V, PI were used respectively to detect the ability of cell proliferation, cell invasion, cell apoptosis and cell cycle. **Result:** Subsequent experiments have focused on the siRNA1 because it was the most effective in inhibiting GRP78 mRNA and protein expression. SiRNA1-GRP78 may inhibit the cell proliferation, attenuate cell invasion, induce cell apoptosis and block cell cycle in G1 stage. **Conclusion:** Lentivirus-siRNA-GRP78 can effectively inhibit the expression GRP78 mRNA and protein, and the down-regulation of GRP78 expression could inhibit cell proliferation, attenuate cell invasion, induce cell apoptosis, block cell cycle in G1 stage. GRP78 may be a promising therapeutic target for RCC.

Key words lentivirus-siRNA; GRP78; proliferation; invasion; cell apoptosis; cell cycle

葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein78, GRP78) 是 GRP 家族中的重要成员,与热休克蛋白(heat shock protein70, HSP70)有较高的同源性,属于 HSP 70 家族的成员之一。GRP78 在肿瘤细胞株和肿瘤组织如肝癌、结肠癌及乳腺癌、神经胶质细胞瘤等高表达^[1,2],并可能与肿瘤的凋亡、耐药密切相关,我们前期研究已证实 GRP78 在肾癌中高表达,可能与肾癌的发生、发展密切相关^[3,4]。但 GRP78 表达与肾癌细胞体外增殖、细胞周期及细胞凋亡、细胞侵袭力等生物学特性相关研究少见^[5,6]。本研究拟利用 RNA 干扰慢病毒载体

转染肾癌细胞株,探讨下调 GRP78 表达后对肾癌细胞体外增殖、侵袭力、细胞周期及细胞凋亡等相关生物学特性的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人肾癌细胞株 786-0 细胞购自中科院上海细胞库, RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清、转染试剂 Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司,慢病毒 shRNA 购自上海汉恒公司,聚合酶链反应(PCR)试剂盒购自日本 TaKaRa 公司,PCR 引物由上海生工公司合成,兔抗小鼠 GRP78 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司。

1.2 实验分组

实验分为空白对照组(blank group)、阴性对

*基金项目:广西自然科学基金资助项目(编号 2012GXNSFBA053087)

¹广西医科大学第一附属医院泌尿外科(南宁, 530021)

通信作者:付伟金, E-mail: fuwj66@aliyun.com

照组 (scrabmle siRNA) 和 siRNA1、siRNA2、siRNA3 组共 5 组,空白对照组不做任何处理,阴性对照组转染 scrabmle siRNA 序列,试验组转染不同的 siRNA 序列(各组序列详见表 1)。

表 1 各干扰序列组成

名称	序列
SiRNA1	GAGCGCATTGATACTAGAAAT
SiRNA2	AGATTCAGCAACTGGTTAAAG
SiRNA3	CTTGTTGGTGGCTCGACTCGA
Scrambled siRNA	TTCTCCGAACGTGTCTACGTAA

1.3 细胞培养及转染

将处于对数生长期的 786-0 细胞按说明书用转染培养液和试剂转染各组,置 37℃,5%CO₂ 培养箱中培养 6 h 后更换 RPMI1640 培养液(含 10% 胎牛血清,5%CO₂,37℃),转染 48 h 后在荧光显微镜下观察转染效率,随机选取 10 个视野拍照,并用 Image Pro Plus 软件计数分析。

1.4 实时定量聚合酶链反应(Real-time PCR)

各组转染 48 h 后,按 Trizol 说明书提取各组细胞总 RNA,按 TaKaRa 公司说明书进行逆转录,在 StepOne III 系统上行 Real-time PCR。内参 GAPDH 上游引物:5-CGCTCTCTGCTCCTC-CTGTT-3,下游引物:5-5CCATGGTGTCT-GAGCGATGT-3;GRP78 上游引物:5-GAAAGAAGGTTACCCATGCAGT-3,下游引物:5-CAGGCCATAAGCAATAGCAGC-3。PCR 循环:95℃ 30 s 预变性,95℃ 5 s,60℃ 30 s,72℃ 5 min 共 40 个循环,各组实验重复 3 次。

1.5 免疫蛋白印迹(Western blotting)

各组转染 48 h 后,用细胞裂解液提取总蛋白,测蛋白浓度。配置 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶,每孔上 40 μg 蛋白进行 SDS-PAGE,转至 PVDF 膜。膜经封闭后,加兔抗小鼠 GRP78 单克隆抗体,4℃ 过夜。经洗涤,加二抗室温孵育 2 h,洗涤后,DAB 显色,成像,各组实验重复 3 次。

1.6 噻唑蓝(MTT)检测

各组转染 48 h 后,细胞按 3×10⁶/L 的密度接种于 96 孔板内,每组设 6 个复孔,分别于 24、48、72 h 取出,加入 MTT 试剂后在培养箱中孵育 4 h 吸出上清,每孔加入二甲基亚砷(DMSO)150 μl,振荡混匀使结晶充分溶解。在酶标仪上测定各孔在 490 nm 处的吸光度(A)值,计算抑制率,各组实验重复 3 次。

1.7 Transwell 侵袭实验

各组转染 48 h 后,在直径为 8 μm 的小室内铺用无血清 DMEM 稀释的基质胶,取对数生长期的各组细胞,浓度为 1.25×10⁶ 个/ml 的细胞悬液

400 μl 细胞种入上室,下室加入含 10% 血清 DMEM 600 μl;培养 48 h 后,取出小室,PBS 洗涤,棉签拭去小室上层未穿出细胞和基质胶,固定并染色。观察照相,按每组不少于 5 个随机视野计数穿出细胞,各组实验重复 3 次。

1.8 Annexin V 检测细胞凋亡

各组转染 48 h 后,使用冰 PBS 洗涤细胞两次,再用 1×Binding Buffer 缓冲液制成 1×10⁶ 细胞/ml 的悬液。加入 100 μl 细胞悬液。加入 Annexin V 与核酸染料各 1 μl 后轻轻混匀,室温避光处放置 15 min。分别加入 1×Binding Buffer 缓冲液 80 μl,1 h 内上流式细胞仪测定结果。检测结果用 Cflow Plus 软件分析。

1.9 PI 染色检测细胞周期

转染 48 h 后用 PBS 清洗细胞两次,然后用胰酶消化,1 000 rpm 离心 5 min,弃去培养液。各组加入 10 ml PBS 清洗细胞,得到细胞悬液 1×10⁶/ml,离心去除 PBS,加入冰预冷的 70% 乙醇,4℃ 冰浴过夜。1 000 rpm 5 min,弃去固定液,PBS 清洗细胞两次。在使用流式细胞仪之前 1 h,用 1 ml 50 μg/ml 的 PI 染液重悬细胞,4℃ 避光 30 min,流式细胞仪分析细胞周期,各组实验重复 3 次。

1.10 统计学方法

应用 SPSS18.0 统计软件分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间连续变量采用独立样本 *t* 检验或方差分析,多组间变量比较采用 ANOVA 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染效率

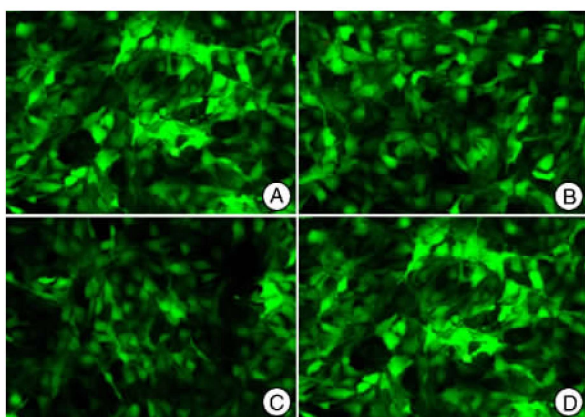
转染 48 h 后,在荧光显微镜下观察,可见大多数细胞的胞质内显示绿色荧光,随机取 10 个视野拍照,用 Image Pro Plus 软件计数分析各组转染效率 > 70%,证实各组可进入下一步研究(图 1)。

2.2 siRNA 慢病毒干扰对 GRP78 mRNA 表达的影响

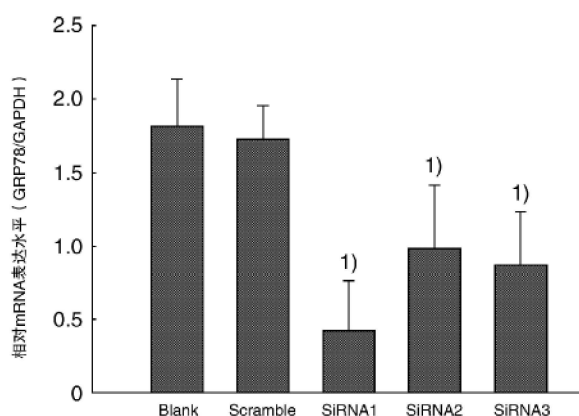
与空白对照组(1.85±0.08)或阴性对照组(1.79±0.15)比较,GRP78 mRNA 的表达水平在 siRNA1 组(0.32±0.09)、siRNA2 组(0.83±0.07)以及 siRNA3 组(0.79±0.11)均降低,差异有统计学意义(*P* < 0.01);而空白对照组与阴性对照组的 mRNA 的表达水平差异无统计学意义(*P* > 0.05)。根据检测结果,siRNA1 抑制 GRP78 mRNA 效率最佳(图 2)。

2.3 siRNA 慢病毒干扰对 GRP78 蛋白表达的影响

与空白对照组(1±0.03)或阴性对照组(1±0.07)比较,GRP78mRNA 的表达水平在 siRNA1 组(0.21±0.03)、siRNA2 组(0.79±0.03)以及 siRNA3 组(0.86±0.04)均降低,差异有统计学意



A: siRNA1 组; B: siRNA2 组; C: siRNA3 组; D: 阴性对照组
图 1 荧光显微镜对 48 h 各组转染效率的检测



与空白组相比, $^{1)} P < 0.05$ 。

图 2 实时定量聚合酶链反应检测 GRP78 mRNA 表达

义 ($P < 0.01$); 而空白对照组与阴性对照组 mRNA 的表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。根据检测结果, siRNA1 抑制 GRP78 蛋白效率最佳 (图 3)。

2.4 干扰 GRP78 对肾癌细胞增殖的影响

与空白对照组和阴性对照组相比, siRNA1 组肾癌细胞生长抑制明显, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$, 图 4), 随着时间增加, 抑制细胞生长作用逐渐增强; 而阴性对照组与空白对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 干扰 GRP78 对肾癌细胞侵袭力的影响

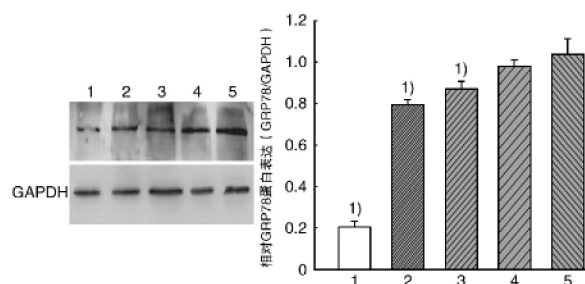
与空白对照组 (72 ± 1.42) 个细胞和阴性对照组 (71 ± 13.23) 个细胞相比, siRNA1 组肾癌细胞生长抑制明显 (26 ± 3) 个细胞, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$, 图 5); 而阴性对照组与空白对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.6 干扰 GRP78 对肾癌细胞凋亡的影响

空白对照组和阴性对照组细胞凋亡率分别为 (17.66 ± 3.05)% 和 (15.66 ± 2.08)%, siRNA1 组细胞凋亡率增加, 为 (32.66 ± 3.21)%, 组间比较差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$, 图 6)。

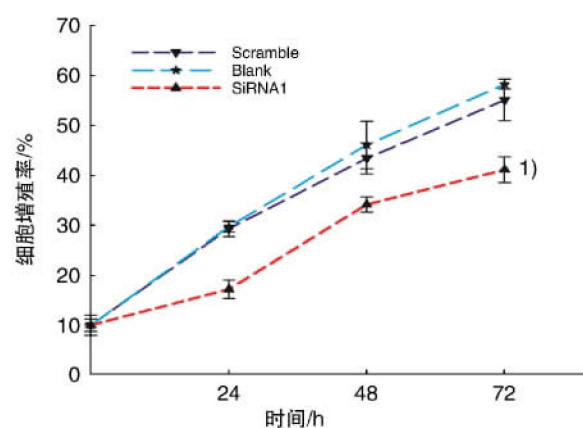
2.7 干扰 GRP78 对肾癌细胞周期的影响

空白对照组和阴性对照组 G1、S、G2/M 分别



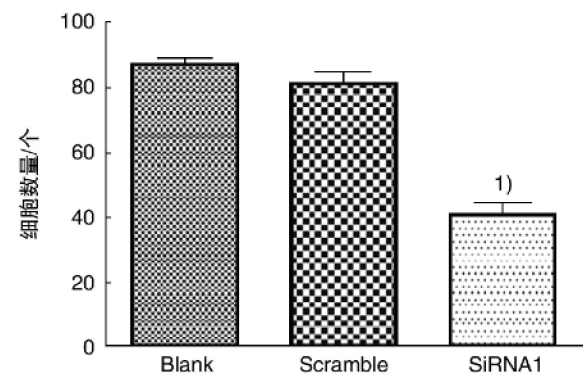
1: siRNA1; 2: siRNA2; 3: siRNA3; 4: Scramble siRNA; 5: Blank; 与空白组相比, $^{1)} P < 0.01$ 。

图 3 免疫蛋白印迹检测 GRP78 蛋白表达



与空白组相比, $^{1)} P < 0.01$ 。

图 4 MTT 法检测细胞增殖抑制率



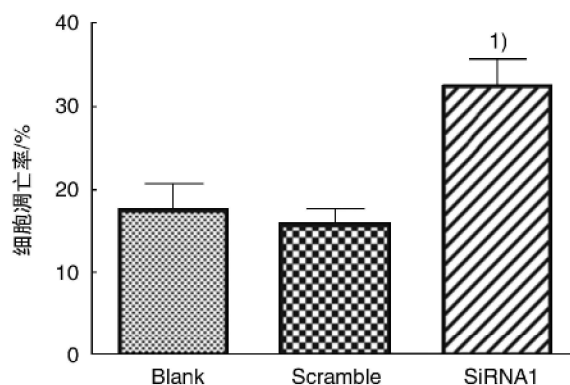
与空白组相比, $^{1)} P < 0.05$ 。

图 5 Transwell 法检测细胞侵袭力

为 (54 ± 4.36)%、(34.33 ± 3.51)%、(11.67 ± 5.51)%、(55 ± 4.58)%、(32.66 ± 3.21)%、(11.67 ± 5.51)%; siRNA1 组 G1、S、G2/M 分别为 (65.66 ± 5.03)%、(28.33 ± 1.51)%、(6 ± 2.64)%, 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 7)。

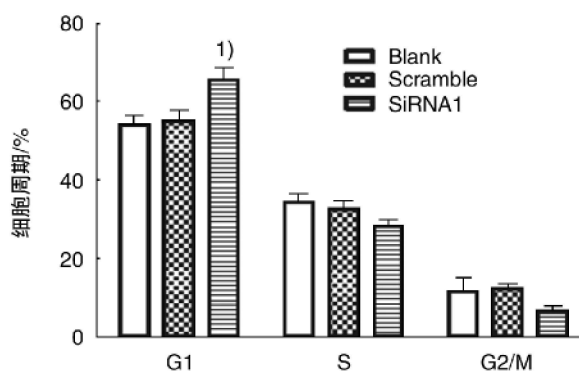
3 讨论

GRP78 在内质网应激 (ERS) 时表达异常增高, 可以看作 ERS 的标志性蛋白。细胞受刺激时 GRP78 高表达现象可能是细胞的一种重要的防御机制, 该机制对细胞有保护作用^[7,8], 高表达可延长细胞生存期。对于肿瘤细胞, GRP78 也存在保护作用, 在肿瘤组织如肝癌、结肠癌及肺癌、前列腺癌



与空白组相比, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

图 6 流式细胞检测各组细胞凋亡率



与空白组相比, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

图 7 流式细胞检测各组细胞周期

和肿瘤细胞株等高表达。本研究前期对肾癌细胞株及 42 例肾透明细胞癌(RCC)和癌旁正常肾组织的 GRP78 mRNA 和蛋白进行检测,发现不同肾癌细胞株中的 GRP78 mRNA 和蛋白均高表达。同时发现癌组织中 GRP78 mRNA 和蛋白均显著高于癌旁正常肾组织,其表达可能与肿瘤大小、分期密切相关^[3]。Kuroda 等^[4]对 120 例 RCC 的 GRP78 表达情况进行研究,发现 GRP78 表达与预后、复发呈正相关。Lin 等^[5]利用小分子片段 RNA 干扰下调肾癌细胞内 GRP78 表达,初步证实下调 GRP78 蛋白可抑制肾癌细胞增殖,但相关机制未做深入研究。

本研究首先成功构建 3 条 GRP78-RNA 干扰慢病毒载体和 1 条阴性对照 GRP78-RNA 干扰慢病毒载体,并设置空白对照组,将慢病毒载体和阴性对照载体分别转染至各组,Realtime-PCR 和 Western blot 结果提示 RNA 干扰 GRP78 后可以降低 GRP78 基因和蛋白表达水平,以 siRNA1 序列抑制效率最佳。后续研究通过 MTT 法检测细胞增殖,与空白对照组和阴性对照组相比,siRNA1 组肿瘤细胞的增殖能力受到明显抑制;Transwell 法检测细胞侵袭力,发现 siRNA1 组肿瘤细胞的侵袭能力下降。同时下调 GRP78 表达后,肾癌细胞凋亡率和 G1 期细胞增加,S 期细胞比例增加,提示肾癌细胞增殖下降可能与 RNA 干扰 GRP78 后产

生细胞凋亡率增加和细胞周期阻滞在 G1 期有关。以上细胞体外研究结果提示下调 GRP78 表达后可抑制肾癌细胞增殖,降低细胞侵袭力,增加肾癌细胞凋亡及阻滞细胞于 G1A 期,提示 GRP78 可能是调控肾癌细胞生长和侵袭力的重要蛋白。

肿瘤的生长和侵袭是一个复杂的过程,涉及多个通路及多种机制^[9,10]。而 GRP78 是通过何种机制参与调控肾癌细胞生长及促进细胞侵袭力,目前还不清楚,下一步本研究将探讨 GRP78 调控肾癌细胞生长及侵袭力的具体机制。

综上所述,本研究采用 Realtime-PCR 和 Western blot 印迹技术检测了慢病毒 RNA 干扰肾癌细胞株后 GRP78 mRNA 和蛋白的表达情况,结果显示 GRP78-siRNA1 可有效下调 GRP78 基因和蛋白表达,并可抑制肾癌细胞增殖,降低细胞侵袭力,增加细胞凋亡,提示 GRP78 有可能成为肾癌基因治疗的良好靶点和诊断标记物。

[参考文献]

- 1 Yerushalmi R, Raiter A, Nalbandyan K, et al. Cell surface GRP78: A potential marker of good prognosis and response to chemotherapy in breast cancer[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(4): 2149—2155.
- 2 Su R, Li Z, Li H, et al. Grp78 promotes the invasion of hepatocellular carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 20.
- 3 Fu W, Wu X, Li J, et al. Up-regulation of GRP78 in renal cell carcinoma and its significance[J]. *Urology*, 2010, 75(3): 603—607.
- 4 Kuroda K, Horiguchi A, Asano T, et al. Glucose-regulated protein 78 positivity as a predictor of poor survival in patients with renal cell carcinoma[J]. *Urol Int*, 2011, 87(4): 450—456.
- 5 Lin J A, Fang S U, Su C L, et al. Silencing glucose-regulated protein 78 induced renal cell carcinoma cell line G1 cell-cycle arrest and resistance to conventional chemotherapy[J]. *Urol Oncol*, 2014, 32(1): 29. e1—11.
- 6 Matsumura K, Sakai C, Kawakami S, et al. Inhibition of cancer cell growth by GRP78 siRNA lipoplex via activation of unfolded protein response[J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37(4): 648—653.
- 7 Ni M, Zhang Y, Lee A S. Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting[J]. *Biochem J*, 2011, 434(2): 181—188.
- 8 Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(7): 519—529.
- 9 Luo J, Lee S O, Cui Y, et al. Infiltrating bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) increase prostate cancer cell invasion via altering the CCL5/HIF2 α /androgen receptor signals[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(29): 27555—27565.
- 10 Gao J, Liu X, Yang F, et al. By inhibiting Ras/Raf/ERK and MMP-9, knockdown of EpCAM inhibits breast cancer cell growth and metastasis[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(29): 27187—27198.

(收稿日期:2016-04-22)