

靶向 p21 的 shRNA 对姜黄素诱导肝癌细胞 Huh7 凋亡的影响

王伟章^{1*}, 张碧鱼², 梅文杰¹, 毛建文¹, 李明¹

(1. 广东药学院, 广东 广州 510006; 2. 中山大学珠海校区基础教学中心, 广东 珠海 519082)

摘要: 探讨靶向 p21 的 shRNA 对姜黄素诱导肝癌细胞 Huh7 凋亡的影响。采用 RT-PCR 和 Western blotting 方法检测姜黄素对肝癌细胞 Huh7 中 p21 mRNA 和蛋白表达的影响; 构建针对 p21 的 shRNA 干扰表达载体 pSi-p21; 采用 RT-PCR 和 Western blotting 方法检测 pSi-p21 对 p21 mRNA 和蛋白表达的影响; 通过 DAPI 核染色法检测 pSi-p21 抑制 p21 表达后姜黄素诱导 Huh7 细胞的凋亡情况。实验结果显示, 姜黄素能明显上调 p21 mRNA 和蛋白的表达水平。干扰载体 pSi-p21 可以显著降低 p21 的表达水平和抑制姜黄素诱导肝癌细胞 Huh7 凋亡。研究结果提示, 姜黄素通过上调 p21 的表达进而诱导肝癌细胞 Huh7 发生凋亡。

关键词: p21 shRNA; 姜黄素; 肝癌细胞 Huh7; 细胞凋亡

中图分类号: R963; R979.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 10-1102-05

Effect of p21-targeted shRNA on curcumin-induced apoptosis of human hepatoma Huh7 cells

WANG Wei-zhang^{1*}, ZHANG Bi-yu², MEI Wen-jie¹, MAO Jian-wen¹, LI Ming¹

(1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. Experimental Center of Foundation Teaching, Zhuhai Campus, Sun Yat-sen University, Zhuhai 519082, China)

Abstract: In the present study, shRNA plasmid of pSi-p21 targeting p21 mRNA was constructed and the effect of p21 shRNA on curcumin-induced apoptosis of human hepatoma Huh7 cells was investigated. The effect of curcumin on the expression of p21 mRNA and protein and the silence efficiency of pSi-p21 were detected with RT-PCR and Western blotting. The effect of pSi-p21 on curcumin-induced apoptosis of Huh7 cells was evaluated with DAPI staining. The results showed that curcumin significantly upregulated p21 mRNA and protein expression, which was knocked down by pSi-p21 of Huh7 cells. DAPI staining results showed that pSi-p21 significantly decreased curcumin-induced apoptosis of Huh7 cells. The data suggested that curcumin induced apoptosis of Huh7 cells via upregulation of p21 expression.

Key words: p21 shRNA; curcumin; hepatoma Huh7 cell; apoptosis

p21 基因是 1993 年发现并克隆的细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子 (cyclin-dependent kinase inhibitor, CDKI) 的家族成员^[1], 它参与细胞的多种功能活动。近年许多研究表明, p21 基因除了参与细胞周期调控外, 在细胞凋亡、细胞生长和细胞衰老等多种生理过程中也起着十分重要的作用^[2]。姜黄素 (curcumin)

是从姜科姜黄属植物姜黄 (curcuma) 根茎中提取的主要有效成分, 具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、抑制血管生成等多种药理作用^[3]。大量的研究已经证实, 诱导细胞凋亡是姜黄素发挥其抗肿瘤作用的主要机制^[4]。虽然对姜黄素的药理作用及其分子机制已进行了广泛的研究, 但是多数工作是采用乳腺癌、大肠癌及白血病细胞株, 关于姜黄素抗肝癌的效果及其机制研究却很少报道。姜黄素能够诱导肝癌细胞 Huh7 发生显著的凋亡^[5], 但是其分子机制尚不清楚。本研究观察了姜黄素对肝癌细胞 Huh7 中 p21 表达水平的影

收稿日期: 2009-05-04.

基金项目: 广东省医学科研基金资助项目 (A2008316); 广东药学院重点培养青年教师基金资助项目.

*通讯作者 Tel / Fax: 86-20-39352187, E-mail: wzwss@163.com

响, 通过 RNA 干扰 (RNAi) 的方法抑制 p21 表达对姜黄素诱导 Huh7 细胞凋亡的作用, 探讨 p21 在姜黄素诱导肝癌细胞凋亡中的作用, 阐明姜黄素诱导肝癌细胞凋亡的分子机制, 为寻求治疗肝癌的临床有效药物提供实验依据。

材料与方法

试剂 姜黄素和 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 购自美国 Sigma 公司。RT-PCR 试剂盒购自美国 Promega 公司。Trizol 和 lipofectamin plus 试剂购自美国 Invitrogen 公司。p21 单克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。 β -Actin 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

细胞培养 Huh7 细胞和 293T 细胞购自中国科学院上海分院细胞库。细胞培养在含 10%胎牛血清 (PAA 公司, 澳大利亚) 的 DMEM 培养液 (Gibco 公司, 美国) 中, 培养条件为含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱。

pSi-p21 载体的构建 pSi-Vector 载体的结构如图 1A 所示。首先合成靶序列的 shRNA 模板 DNA (图 1B), 然后将合成的 shRNA 模板序列退火, 形成 DNA 双链, 连接到经 *EcoRI* 和 *XbaI* 双酶切的质粒 pSi-Vector 上, 得到靶向 p21 的 RNA 干扰载体 pSi-p21, 实验同时设计一个不针对任何人类靶基因的对照质粒 pSi-Mock。

RT-PCR 检测 姜黄素 (终浓度为 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 Huh7 细胞 0、12、24、36 和 48 h 后, 使用 Trizol 试剂 (Invitrogen 公司) 并按照一步法进行 RNA 的提取。RT 使用 Promega 公司的逆转录试剂盒, 以逆转录合成的 cDNA 为模板, 以特异引物进行 PCR, 检测目标基因 mRNA 的表达水平。PCR 反应条件: 于 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 28 个循环后于 72 °C 再延伸 8 min。产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 凝胶成像系统分析成像。所用引物序列应用 Primer Premier 5.0 软件自行设计,

由上海英骏生物技术有限公司合成。引物序列为 p21 F: 5'-GACCAGCATGACAGATTCTACCA-3', R: 5'-CAATCTGAGACTAAGGCAGAAGATGT-3', 产物长度 146 bp; hPBGD F: 5'-TCTGGTAACGGCAATGCGG-3', R: 5'-GCAGATGGCTCCGATGGTG-3', 产物长度 271 bp。

Western blotting 检测 姜黄素 (终浓度为 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 Huh7 细胞 0、12、24、36 和 48 h 后, 收集细胞并提取蛋白, 通过 BCA 试剂盒测定各组的蛋白浓度。0.1% DMSO 处理的样品作为溶剂对照组。样品经 SDS-PAGE 电泳分离, 湿电转移至硝酸纤维素膜, 膜在室温下用封闭液封闭 2 h, 加入 1%BSA 稀释的 p21 和 β -actin 抗体 (1 : 1 000), 4 °C 过夜, 洗膜后加入封闭液稀释的二抗稀释液 (1 : 5 000), 室温 2 h。用 ECL solution 显色, 最后进行显影, 定影。用 Bankscan 软件进行灰度分析, 分析目标基因的表达水平时用 β -actin 为内源对照。

pSi-p21 载体转染效率的检测 取对数生长期的 293T 细胞和 Huh7 细胞接种于 6 孔培养板 (细胞数分别为 1×10^6 /孔和 5×10^5 /孔), 培养过夜至细胞完全贴壁后进行转染, 设阴性对照质粒转染组 pSi-Mock 和 pSi-p21 转染组, 分别以质粒 2 μg 和脂质体 8 μL 转染细胞, 转染后 6 h 换全新培养基, 继续培养 48 h 后分别收集 293T 细胞和 Huh7 细胞。通过流式细胞仪检测 EGFP 表达阳性的 293T 细胞和 Huh7 细胞的个数, 从而统计 pSi-p21 载体转染 293T 细胞和 Huh7 细胞的效率。

pSi-p21 载体抑制 p21 表达效率的检测 293T 细胞按照质粒转染的方法进行瞬时转染, 转染 48 h 后提取 RNA 并通过 RT-PCR 和 Western blotting 的方法检测 p21 mRNA 和蛋白的表达水平。

细胞凋亡检测 pSi-Mock 和 pSi-p21 质粒分别转染 Huh7 细胞 48 h 后, 给予 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素刺激 Huh7 细胞。24 h 后吸去培养上清液, 加入 4%多聚甲

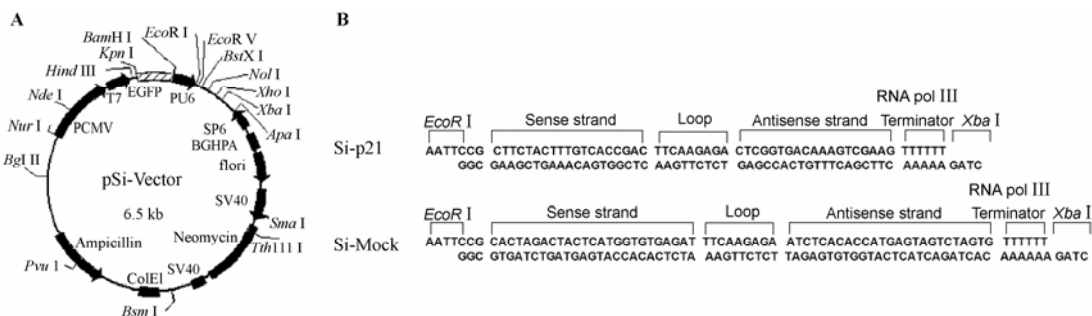


Figure 1 The plasmid and the DNA sequences used to produce siRNA. A: Map of plasmid pSi-Vector. B: The DNA sequences that were subcloned into the pSi-Vector to produce the siRNA

醛室温固定 15 min; 1×PBS 润洗细胞 2 次, 加入终浓度 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 DAPI 染液室温染色 5 min; 1×PBS 润洗细胞 2 次, 加入抗荧光淬灭剂, 荧光显微镜拍照。每个处理组计数至少 200 个 EGFP 表达阳性的细胞, 染色质固缩和核碎裂的细胞均认为是发生凋亡的细胞。细胞凋亡率计算方法: 细胞凋亡率 (%) = EGFP 表达阳性的凋亡细胞个数 / (EGFP 表达阳性的凋亡细胞个数 + EGFP 表达阳性的正常细胞个数) × 100%。

统计学处理 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 差异显著性分析采用 t 检验。

结果

1 姜黄素对 Huh7 细胞 p21 mRNA 和蛋白表达的影响

姜黄素能够诱导人肝癌细胞 Huh7 发生显著的凋

亡^[5]。为了探讨 p21 是否与姜黄素诱导 Huh7 细胞凋亡相关, 首先检测姜黄素处理 Huh7 细胞后 p21 mRNA 和蛋白的表达水平。结果如图 2 所示, $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素能够明显地上调 p21 mRNA 和蛋白的表达水平, 且上调时间从 12 h 开始并持续至 48 h。

2 pSi-p21 载体对 p21 表达的影响

为了验证 p21 是否是姜黄素诱导 Huh7 细胞凋亡的关键因子, 构建了 p21 基因的 RNAi 载体, 如图 1 所示。由于 pSi-p21 载体转染 Huh7 细胞的效率只有约 23% (图 3), 难以检测对 p21 基因表达的抑制效率。因此, 将 pSi-p21 载体转染至 293T 细胞中, 转染效率接近 80% (图 4A、4B 所示)。RT-PCR 和 Western blotting 结果也显示在此转染效率的情况下, pSi-p21 载体对 p21 基因表达抑制率超过 60% (图 4C), 表明 pSi-p21 载体能较有效地抑制 p21 基因的表达 ($P < 0.01$)。

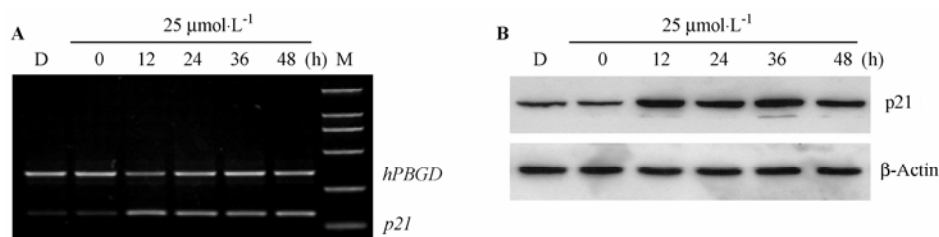


Figure 2 Effect of curcumin on the expression of p21 mRNA and protein. Huh7 cells were treated with DMSO (vehicle control, D) for 48 h or $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ curcumin for indicated times and harvested for the detection of p21 mRNA and protein with RT-PCR (A) and Western blotting (B). The *hPBGD* and β -actin was served as internal control for mRNA and protein levels

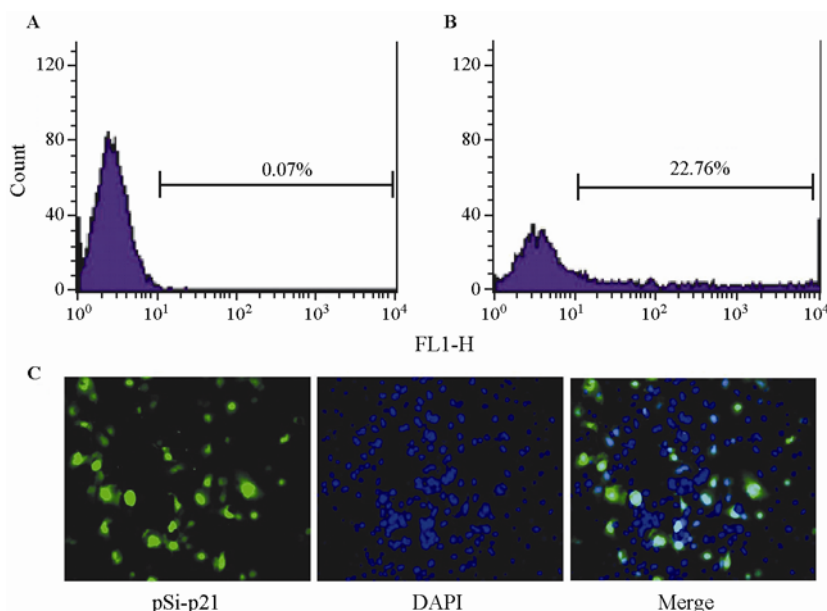


Figure 3 The transfection efficiency of pSi-p21 in Huh7 cells. Cells were transfected with (B) or without (A) pSi-p21 for 48 h and harvested for the detection of transfection efficiency of pSi-p21 by fluorescence-activated cell sorting (FACS) or fluorescence microscope (C)

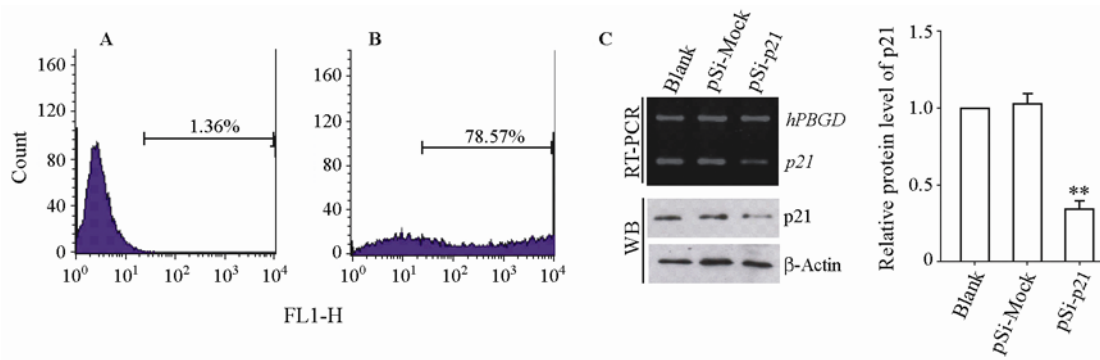


Figure 4 pSi-p21 decreased p21 expression in 293T cells. Cells were transfected with (B) or without (A) pSi-p21 for 48 h and harvested for the detection of transfection efficiency of pSi-p21 by FACS. Cells were analyzed 48 h after transfection with pSi-p21 by RT-PCR and Western blotting (WB, C). The *hPBGD* or β -actin was served as internal control for mRNA and protein levels. The intensity for each band was densitometrically quantified and then normalized by the intensity of β -actin in each lane. The normalized intensity in the first lane was set as relative expression level of 1. Blank: 293T cells without any treatment. ** $P < 0.01$ vs blank group

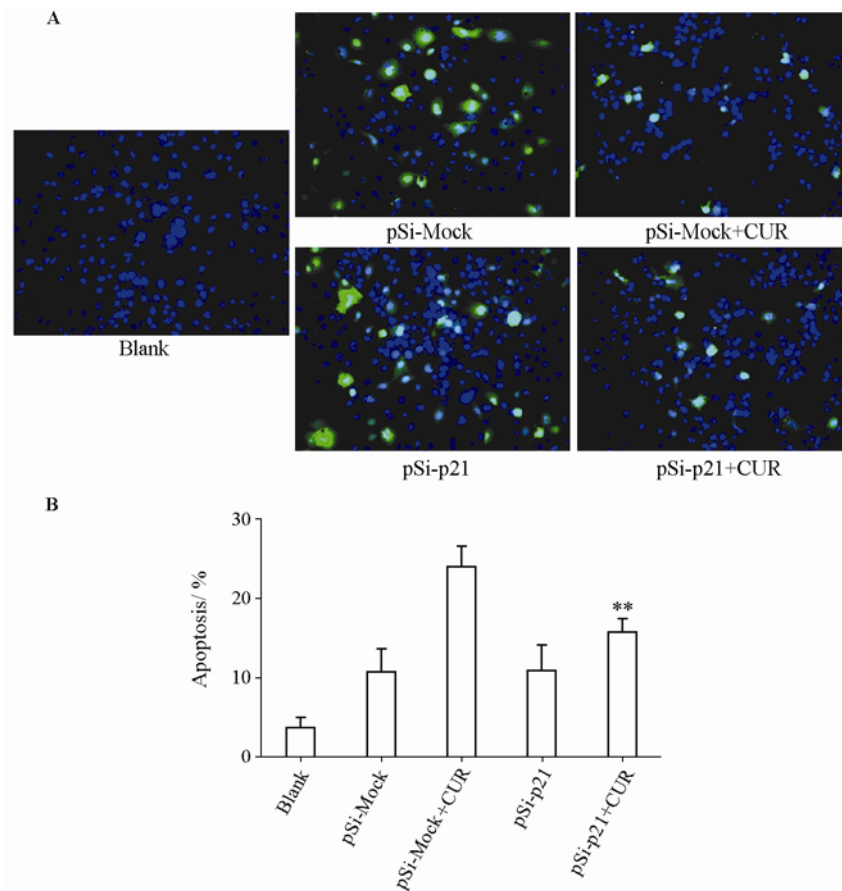


Figure 5 pSi-p21 inhibited curcumin-induced apoptosis of Huh7 cells. A: Representative photos of DAPI staining (blue) and plasmid transfection (green); B: Cells were transfected with pSi-p21 for 48 h, followed by treatment with $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ curcumin for another 24 h and then applied to apoptosis analysis. Results were derived from three independent experiments and the error bars indicate standard error of the means. CUR: Curcumin; Blank: Huh7 cells without any treatment. ** $P < 0.01$ vs pSi-Mock + CUR group

3 pSi-p21 对姜黄素诱导 Huh7 细胞凋亡的影响

结果 (图 5) 显示, 转染 pSi-p21 质粒并给予 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素刺激后 24 h, Huh7 细胞凋亡百分数明显低于转染 pSi-Mock 质粒组 ($P < 0.01$), 表明抑制 p21 表达可显著抑制姜黄素诱导 Huh7 细胞凋亡。

讨论

研究已经表明, 逃避凋亡是肿瘤发生的重要机制之一, 而凋亡基因突变或者表达下调是肿瘤逃避凋亡的主要原因。因此, 如何调控凋亡相关基因或其相应产物, 提高肿瘤细胞对药物的敏感性, 并诱导细

胞进入凋亡,是目前肿瘤治疗研究的热点和关键,也是评估抗癌药物作用能力的重要指标。在本研究中,姜黄素能够上调 p21 基因的表达,从而诱导肝癌细胞 Huh7 发生凋亡。

p21 基因的表达产物 p21 蛋白是目前已知的具有最广泛激酶抑制活性的细胞周期抑制蛋白,可通过两条途径发挥其功能^[6]。一是由 p53 介导的途径,当细胞受到来自体内外的各种刺激后,野生型 p53 蛋白迅速结合到 p21 基因上游的转录结合区,使其迅速表达并发挥其生物学功能。另一条途径是非 p53 依赖的途径,在 p53 基因和蛋白缺失的细胞中,其他因子如 Sp1/Sp3 和 Smads 等也可诱导 p21 的表达^[7]。以往的研究已经发现,姜黄素能够诱导 p53 基因缺失的前列腺癌细胞 PC-3 表达 p21^[8]。本研究也发现,姜黄素能够显著地上调带有突变 p53 基因的肝癌细胞 Huh7 中 p21 mRNA 的表达。这些结果表明,姜黄素能够通过非 p53 依赖途径调控 p21 基因表达。

p21 与细胞周期关系密切,但其对细胞凋亡的影响尚无定论。一方面, DNA 损伤时在 p21 的作用下使生长周期停滞并进行 DNA 修复,从而保护细胞免受凋亡。例如,腺病毒可选择性地促使缺乏 p53 和 p21 的细胞发生凋亡,而在 p53 和 p21 完整表达的细胞则无凋亡发生,但可停滞在细胞周期的 G₂ 期,并伴有 p53 活性增加和 p21 表达上调^[9]。另一方面,许多报道也指出 p21 在某些条件下具有促进细胞凋亡的作用。古曲霉素 A 在诱导破骨细胞凋亡的过程中是通过上调 p21 来实现的^[10]。Zoli 等^[11]在研究阿霉素、紫杉醇联合 5-氟尿嘧啶治疗乳腺癌的过程中发现, p21 的表达上调与细胞凋亡数量呈显著正相关。本研究也显示,姜黄素能够诱导 p21 转录上调,通过 RNAi 的方法抑制 p21 表达可显著地抑制姜黄素诱导 Huh7 细胞凋亡。与作者的研究结果一致的是,姜黄素在诱导前列腺癌细胞 PC-3 细胞凋亡时伴随着 p21 的表达上调, p21 的 siRNA 同样可抑制姜黄素诱导的细胞凋亡^[12]。这些结果表明, p21 是姜黄素诱导肿瘤细胞凋亡的关键因子。

由于超过 50% 的肿瘤中存在 p53 功能的缺失^[13],这些肿瘤对大多数的放疗或者化疗均不敏感。本研究结果给予我们的重要提示在于,姜黄素能够通过非 p53 依赖途径调控 p21 表达,进而诱导肿瘤细胞凋亡,将为姜黄素应用于 p53 功能缺失的肿瘤治疗提供

重要的参考资料。

References

- [1] Harper JW, Adami GR, Wei N, et al. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases [J]. *Cell*, 1993, 75: 805–816.
- [2] Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? [J]. *Trends Cell Biol*, 2003, 13: 65–70.
- [3] Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far [J]. *Eur J Cancer*, 2005, 41: 1955–1968.
- [4] Karunagaran D, Rashmi R, Kumar TR. Induction of apoptosis by curcumin and its implications for cancer therapy [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2005, 5: 117–129.
- [5] Wang WZ, Cheng J, Luo J, et al. Abrogation of G2/M arrest sensitizes curcumin-resistant hepatoma cells to apoptosis [J]. *FEBS Lett*, 2008, 582: 2689–2695.
- [6] Macleod KF, Sherry N, Hannon G, et al. p53-Dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage [J]. *Genes Dev*, 1995, 9: 935–944.
- [7] Gartel AL, Radhakrishnan SK. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences [J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 3980–3985.
- [8] Hour TC, Chen J, Huang CY, et al. Curcumin enhances cytotoxicity of chemotherapeutic agents in prostate cancer cells by inducing p21 (WAF1/CIP1) and C/EBPβ expressions and suppressing NF-κB activation [J]. *Prostate*, 2002, 51: 211–218.
- [9] Raj K, Ogston P, Beard P. Virus-mediated killing of cells that lack p53 activity [J]. *Nature*, 2001, 412: 914–917.
- [10] Yi T, Baek JH, Kim HJ, et al. Trichostatin A-mediated upregulation of p21 (WAF1) contributes to osteoclast apoptosis [J]. *Exp Mol Med*, 2007, 39: 213–221.
- [11] Zoli W, Ulivi P, Tesei A, et al. Addition of 5-fluorouracil to doxorubicin-paclitaxel sequence increases caspase-dependent apoptosis in breast cancer cell lines [J]. *Breast Cancer Res*, 2005, 7: R681–689.
- [12] Srivastava RK, Chen Q, Siddiqui I, et al. Linkage of curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis by cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (WAF1/CIP1) [J]. *Cell Cycle*, 2007, 6: 2953–2961.
- [13] Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types [J]. *Nature*, 1989, 342: 705–708.