RNAi检测IFRD1在肝癌增殖中的作用及不同中医治法的调节*

□梁　超**　方肇勤**　管冬元　胡　卫　代小平　吴中华
（上海中医药大学基础医学院　上海　201203）
高必峰　（美国科罗拉多大学医学院　丹佛　CO 80220）

摘　要：目的：观察不同中医治法对大鼠肝癌干扰素相关发育调节因子1（IFRD1）表达的调控差异，以及IFRD1在人肝癌细胞增殖中的作用。方法：（1）采用二乙基亚硝胺（DEN）诱发大鼠肝癌，分别经中药健脾益气、清热解毒、活血化瘀等治疗后，Affymetrix rat 230A GeneChip arrays检测肝癌组织IFRD1表达的差异；（2）设计3个人IFRD1基因siRNA靶点，将重组质粒电转入SMMC-7721人肝癌细胞株，MTT法检测细胞生长增殖情况、Realtime-PCR检测该基因的表达差异。结果：（1）芯片结果显示，IFRD1基因在大鼠肝癌形成后表达显著增加，不同中医治法对其具有不同程度的下调作用，其中活血化瘀治法下调作用较明显，对照西药化疗反而具有上调作用；（2）采用MTT法筛选到1个IFRD1基因RNA干扰有效靶序列，转染144h后细胞的生长增殖得到了明显的抑制（与阴性对照组相比，$P<0.01$）；（3）实时荧光定量PCR检测表明，转染72h后该基因的表达明显降低。结论：SMMC-7721肝癌细胞恶性增殖有赖于IFRD1基因的高表达，而中药活血化瘀治法对其具有下调作用。

关键词：肝癌　IFRD1　基因芯片　RNA干扰　治法
doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2010.05.010

原发性肝癌（Primary Liver Cancer，PLC）是我国高发性恶性肿瘤之一，占全世界肝癌年死亡人数的43.7%。中医药辨证论治在防治肝癌方面具有一定的疗效，并积累了丰富的临床经验，其常用的治则治法主要包括健脾益气、清热解毒、活血化瘀[1]。我们的研究表明，中药治疗组与模型组和西药对照组相比，这些治法均能不同程度地延长二乙基亚硝胺诱发肝癌大鼠生存期，且不同中医治法在肝癌的作用、生存期延长等方面作用不尽相同[2]。

为进一步探索其作用机制，我们采用Affymetrix Rat 230A GeneChip技术发现在二乙基亚硝胺（DEN）诱导大鼠肝癌发生与发展过程中存在着大量的基因表达异常[3~4]。其中，大多基因与肝癌的关系尚不明确，其中包括IFRD1。IFRD1在肝癌细胞中表达升高

收稿日期：2010-01-05
修回日期：2010-01-12
*　国家自然科学基金面上项目（30271576）：不同治法对大鼠肝癌后基因组转录调控的进一步研究，负责人：方肇勤；国家自然科学基金面上项目（30672574）：采用RNAi检测若干与中医治法相关肝癌高表达新基因的作用，负责人：方肇勤。
**　联系人：梁超，在职博士研究生，主要研究方向：证的基础研究，Tel：021-51322116；E-mail：ysw141@126.com；方肇勤，教授，博士研究生导师，主要研究方向：证的基础研究，Tel：021-51322115；E-mail：zqfang@sh163d.net。

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

具有什么病理意义？检索文献，国内外对 IFRD1 在肝癌细胞中的生物学作用研究甚少。因此，我们采用 RNAi 技术令该基因在肝癌细胞中表达后沉默，观察其表达沉默后肝癌细胞增殖的变化，初步探讨其生物学功能，及不同中医治法对其调控的意义。

一、材料与方法

1. 大鼠肝癌模型的制备及分组与治疗

雄性 Wistar 大鼠，6 周龄，体重 100~120g，72 只，随机分为 6 组，除正常组外，各造模大鼠自由饮用含 80ppm DEN（购自中国科学院南京土壤研究所）水溶液，制作肝细胞性肝癌模型，至 20 周末动物处死；各治疗组，于造模 14 周后开始给药至实验结束共计 6 周，中药浸膏和西药水溶液拌入颗粒饲料，摄入剂量中药约为成人公斤体重的 10 倍、西药约为 5 倍。分组和处方见表 1。

2. 药　品

中药饮片购自上海市徐汇中药饮片厂；FT-207 购自上海华联制药有限公司。

3. 芯片检测

所有大鼠在处死时迅速取正常组肝组织、造模组病灶比较严重的肝组织或肝癌组织，用 Trizol 试剂盒提取组织总 RNA，经质量检测与浓度测定后，将同阶段 RNA 的样本分别取 10μg 混合，标注为正常组，及 5 种不同治法（共 10 份检测样本）。RNA 经反转录后，进行 Affymetrix rat 230A GeneChip 检测（共 10 张芯片）。

4. RNA 干扰检测的主要材料与方法

（1）RNA 干扰检测的主要仪器和试剂。

基因电转仪为 GenePluler XcellTM（Bio-Rad 公司）；实时荧光定量 PCR 仪为 Rotor-Gene 3000（GENE 公司）；酶标仪为 ELX800（BIO-TEK 公司）。

转染细胞为 SMMC-7721 肝癌细胞株（购自中国科学院上海细胞所）；转染载体为 pSilencerTm2.1-U6 neo 质粒（Ambion 公司）；BamH I 与 Hind III 限制性内切酶（Ambion 公司）；质粒纯化试剂盒 PureYieldTM Plasmid Midiprep System（Promega 公司）；实时荧光定量 PCR 试剂盒（TAKARA，SYBR Premix Ex Taq：Perfect Real Time）。

IFRD1 基因的 RNAi 靶序列分别为：AAT TGA AAC AAT GAG CCA TTG；AAC TAT ACT CAA CTC TGG AAT；AAA TGT ATT TGA ACT TGG ACC。IFRD1 基因干扰效率的实时荧光定量 RTPCR 检测引物为：上游 GCC CTG GAA TTG AAA GTG AA，下游 TGG GCA TAT GGT CAG CAG TA，扩增产物长度为 299bp。GAPDH 内参基因的实时荧光定量 RT-PCR 检测的上下游引物分别为：GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT，TTG ATT TTG GAG GGA TCT CG，扩增产物长度为 238bp。

（2）RNA 干扰检测的方法。

通过 BLAST 工具比对大鼠与人的 IFRD1 基因。

从 GenBank 数据库中搜索到人 IFRD1 基因的 mRNA 序列（登录号为 NM_001007245），相似性为 88%，确认 cds 区。

针对 IFRD1 基因的 mRNA 序列的 cds 区，应用 Ambion 公司在线的 siRNA 设计软件*设计 RNA 干扰序列（长度为 21bp），并进行 BLAST 比对，以确定干扰序列的特异性。同时，每个靶序列通过该软件可自动生成 2 条克隆入质粒的序列（含正、反向 RNA 干扰序列与 BamH I 与 Hind III 限制性内切酶酶切位点，长度为 64bp），该序列由 Invitrogen 公司合成。

将合成后的同一干扰位点上的两条单链，退火结合成双链后，重组到经 BamH I 与 Hind III 双酶切的 pSilencer2.1-U6 neo 质粒中，并转染到大肠杆菌 DH5α 中。

重组后质粒经大肠杆菌大量扩增后，由质粒纯化试剂盒得到待转染的含 RNA 干扰序列的重组质粒，经 DNA 测序验证后，稀释成 0.1μg·μL^{-1}。

用基因电转仪将重组质粒转入 SMMC-7721 肝癌

表 1　动物分组及治疗情况（n=12）

组别	治疗方法
正常组	-
模型组	-
西药组	喃氟啶（FT207）
清热组	半枝莲 30g、白花蛇草 30g、蒲公英 30g
活血组	柴胡 6g、八月札 10g、丹参 15g、桃仁 10g、赤芍 15g、茵陈 10g、郁金 10g
健脾组	白术 10g、薏苡仁 15g、黄芪 30g、白芍 15g、神曲 10g、云苓 15g、法半夏 10g

*http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html).

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

细胞株中，电转体系含 80μL 重组质粒（0.1μg·μL^{-1}）、400μL 细胞（浓度：2×10^5 个/100μL，以不含血清的 1640 液悬浮细胞）。同时，设立空白对照组（质粒用去离子水代替）与阴性对照组（采用相同浓度的自身环化的质粒）。

电转染后，混匀于 6mL 含牛血清的 1640 培养液，一部分加入到 96 孔板中，细胞分高、中两个浓度，分别于 24h、72h、144h 后进行 MTT 检测；一部分加入到 6 孔板中，72h 后提取其总 RNA，进行实时荧光定量 RT-PCR 检测。所有细胞均于 24h 后换用含 G418（浓度 400μg·μL^{-1}）的培养液进行培养。

MTT 检测：常规 MTT 检测（波长为 490nm），每个样本平行做 4 个复孔。

实时荧光定量 RT-PCR 检测：收集电转染 72h 后的细胞，用 Trizol 液提取其总 RNA 并检测所得 RNA 的 OD_{260} 和 OD_{280}，各实验组取 2μg 总 RNA 进行反转录，再以反转录产物为模板，用 TAKARA 公司的 SYBR Premix Ex Taq（Perfect Real Time）试剂盒进行标准曲线的绘制，并以 GAPDH 为内参做相对表达量分析。扩增反应体系（共计 25μL）为：消毒双蒸水 9.5μL，SYBR Premix Ex Taq（2×）12.5μL，上、下游引物（各 5μmol·L^{-1}）2μL，RT 产物 1μL。扩增反应条件：95 度×30s；95 度×5s，60 度×30s，40 个循环。结果以采用 ΔΔCT 法加以分析。

琼脂糖凝胶电泳：取电转染组 PCR 产物 20μL 与上样缓冲液 4μL 混匀后取 20μL 上样于 1.4%的琼脂糖凝胶中，80V 电压，电泳 1h。紫外灯下查看，并拍照。

5. 数据分析

基因芯片数据的分析：详细步骤和灵敏度问题以及定量的方法参考 Affymetrix GeneChip 网站的技术手册；所有计量资料均采用 SSPS 12.0 软件包的方差分析。

二、结　果

1. 大鼠肝癌诱发过程中不同时期肝脏病理形态学观察

正常组大鼠肝脏经外观与病理检查，均正常（见图 1~2）。在 20 只造模组中，除第 4、8、16 周末各处死 2 只大鼠及第 19 周意外死亡 2 只（经解剖发现腹腔大量出血所致）外，其余 12 只大鼠肝癌组织病理观察结果均表现出肝细胞癌病理特征。第 4 周时，肝脏外观色泽偏淡，表面光滑，但肝脏已轻度肿胀；光镜下，肝小叶中央的肝细胞混浊，轻度水样变性，伴炎症细胞浸润（见图 3~4）。第 8 周时，肝脏表面呈暗红色，并有细小的灰白结节；光镜下，肝细胞水样变性与炎症细胞浸润较第 4 周更加明

图 1　正常组肝脏外观

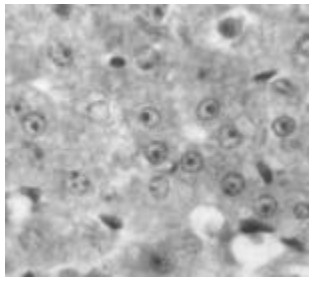

图 2　正常组肝脏病理（HE，×400）

图 3　造模 4 周后肝脏外观

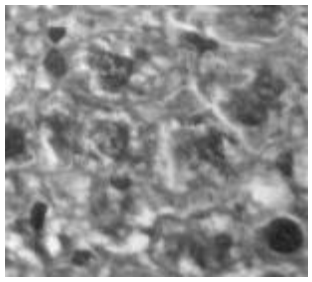

图 4　造模 4 周后肝脏病理（HE，×400）

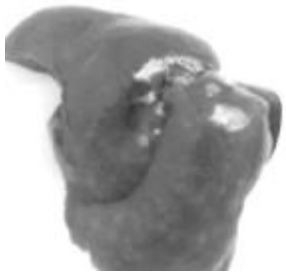

图 5　造模 8 周后肝脏外观

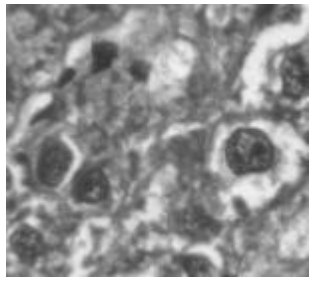

图 6　造模 8 周后肝脏病理（HE，×400）

图 7　造模 16 周后肝脏外观

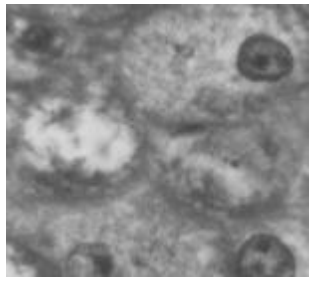

图 8　造模 16 周后肝脏病理（HE，×400）

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

显，并偶见桥性坏死，细胞排列出现混乱（见图 5~6）。第 16 周时，肝脏体积明显增大，表面灰白结节，直径大小不一；光镜下，可见明显的增生结节，结节内细胞增生相当活跃，伴显著异型性，可见双核与多核等病理性有丝分裂相（见图 7~8）。第 20 周时，肝脏体积显著增大，表面布满大小不一的灰白结节，分布无规律，直径在 0.1~1.5cm 之间不等，同时伴有出血斑点；光镜下，可见柱状及腺管结构肝细胞癌，癌细胞形态不一，有嗜碱性小癌细胞、嗜酸性大癌细胞及透明细胞等几种形态，癌细胞核的大小、规则不一，病理性有丝分裂相多见（见图 9~10）。

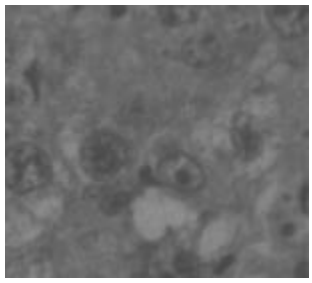

图 9 造模 20 周后肝脏外观 图 10 造模 20 周后肝脏病理（HE,×400）

2. IFRD1 在 DEN 大鼠肝癌中表达升高，不同中西医治法对其调节作用不同

芯片检测结果表明，IFRD1 基因在正常大鼠肝脏表达不高，芯片读数计算值不足 500，而肝脏所有 15710 个基因的平均计算值仅为 890。肝癌形成后，该基因表达明显增加，芯片读数计算值大于 1200，见图 1。

不同中西医治法对其调节作用不同，其中活血化瘀治法下调该基因的作用最强，健脾益气与清热解毒治法次之，全方再次之；而西药化疗作用相反，具有进一步上调的作用，见图 11。

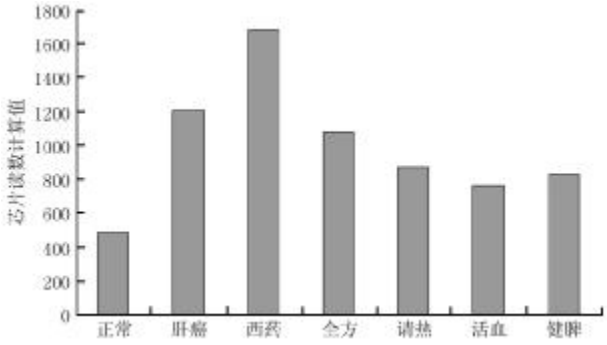

图 11 IFRD1 基因在不同治疗组芯片读数

3. 人肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖有赖于 IFRD1 基因的表达

MTT 法检测空白对照组、阴性对照组、RNA 干扰组 SMMC-7721 肝癌细胞的生长增殖情况。在 3 个 RNAi 靶序列中，仅其中一个靶点为有效靶点，其序列为 AAT TGA AAC AAT GAG CCA TTG，转染该 RNAi 表达载体后，MTT 检测显示，随着 G418 对空白对照 SMMC-7721 的增殖抑制，该组 OD 值逐渐下降；转染入阴性载体的 SMMC-7721 细胞，在早期增长抑制后（3d），出现增殖现象（6d）；而转染 IFRD1 的 RNAi 表达载体细胞则相反，表现出增殖显著抑制的现象，经 t 检验，与阴性载体对照具有统计意义（$P<0.01$）。表明经 RNA 干扰引起的 IFRD1 基因功能沉默的生物学效应，即在人肝癌细胞 SMMC-7721 肝癌细胞中 IFRD1 基因的生物学功能可能与该细胞的恶性增殖有关。见图 12~13。

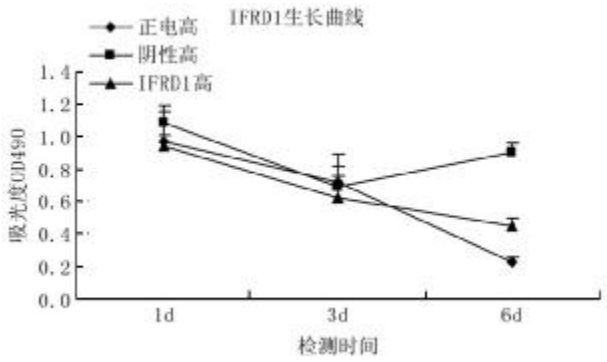

图 12 高浓度肝癌细胞 RNAi 后的生长曲线

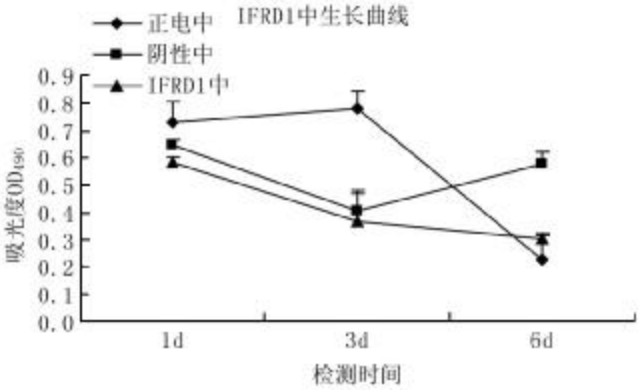

图 13 中浓度肝癌细胞 RNAi 后的生长曲线

4. 实时荧光定量 RT-PCR 对 RNAi 现象的验证

实时荧光定量 RT-PCR 检测表明，转染后 3d，IFRD1 的 RNAi 现象显著，该基因相对表达量显著下降，不到阴性载体的 1/2（以空白对照组为参照，

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 2　高浓度肝癌细胞 RNAi 后吸光度(OD_{490})

检测时间	吸光度均数(OD_{490})			标准差		
组别	1d	3d	6d	1d	3d	6d
正电高	0.965	0.721	0.232	0.189	0.176	0.025
阴性高	1.084	0.687	0.903	0.104	0.133	0.059
IFRD1 高	0.936	0.625	0.455*	0.071	0.136	0.045

注:*与阴性相比,增殖显著抑制(P<0.01)。

表 3　中浓度肝癌细胞 RNAi 后吸光度(OD_{490})

检测时间	吸光度均数(OD_{490})			标准差		
组别	1d	3d	6d	1d	3d	6d
正电中	0.728	0.781	0.231	0.075	0.064	0.094
阴性中	0.649	0.404	0.575	0.016	0.080	0.048
IFRD1 中	0.581	0.370	0.307*	0.024	0.101	0.009

注:*与阴性相比,增殖显著抑制(P<0.01)。

表 4　中浓度肝癌细胞 RNAi 后目的基因相对表达量

组别	IFRD1 基因的相对表达量
空白对照组	1
阴性对照组	0.96
RNA 干扰组	0.45

GAPDH 基因为内参,进行 CT 法分析),见图 15,提示 RNAi 现象显著,该基因出现表达后沉默;RT-PCR 的扩增曲线图,见图 14。

实时荧光定量 RT-PCR 电泳结果见图 16,PCR 产物为单一条带,分子量与预期的一致。

三、讨　论

在国家自然科学基金(项目编号:30271576)的资助下,我们与美国科罗拉多大学医学院基因芯片核心实验室合作,采用 Affymetrix Rat 230A GeneChip 等技术对二乙基亚硝胺(DEN)所诱导的大鼠肝癌及不同治疗组肝癌组织进行检测。结果发现,与正常大鼠肝脏比较,在二乙基亚硝胺(DEN)所诱导的大鼠肝癌中,出现了大量基因表达的上调,其中部分基因表达被健脾、活血、清热及其综合治法(全方)中药复方下调[3-4]。检索国内外文献,这些基因以往研究大多未涉及肝癌。另外,最近在国家自然科学基金(项目编号:30672574)的资助下,从贴近临床实际出发,我们依据这些基因的人类序列和采用人肝癌 SMMC-

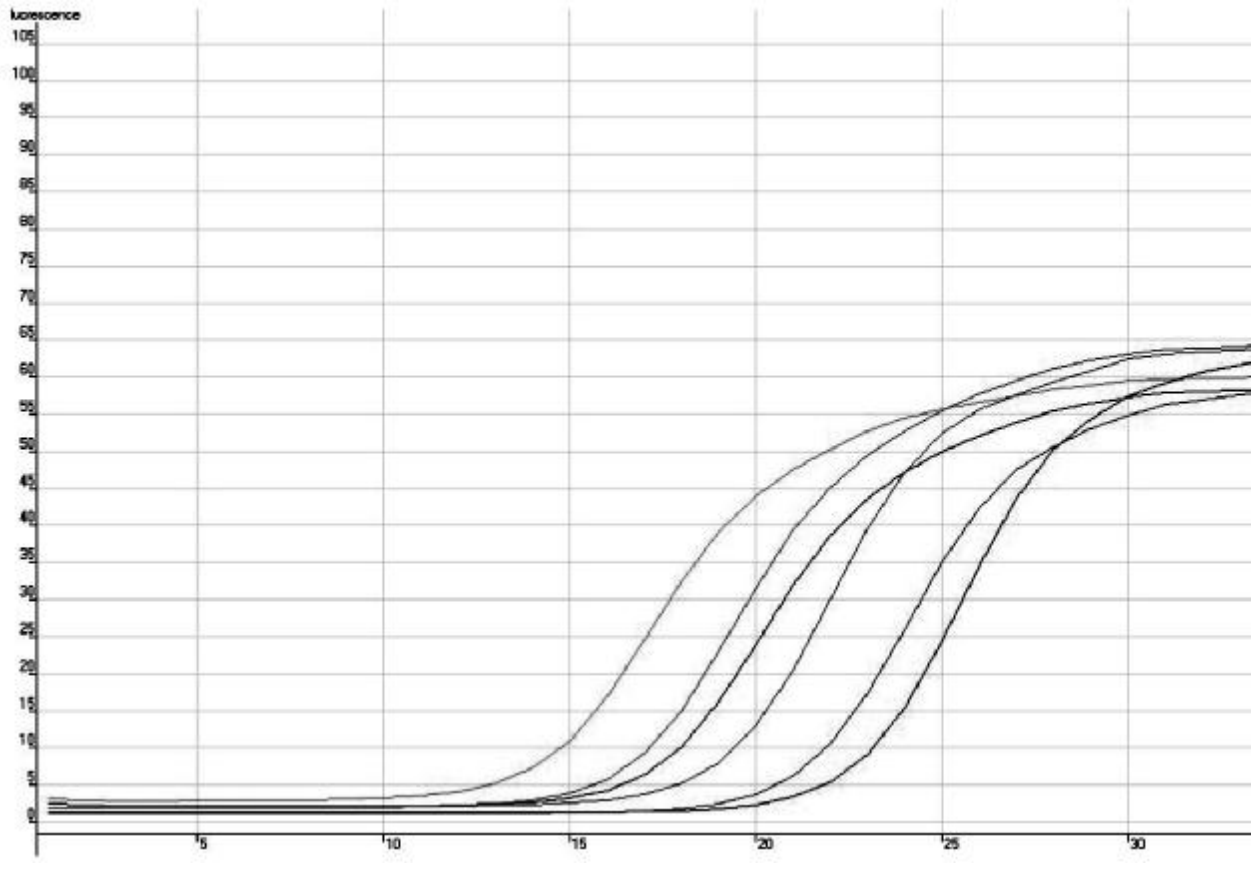

图 14 实时荧光定量 RTPCR 的扩增曲线

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

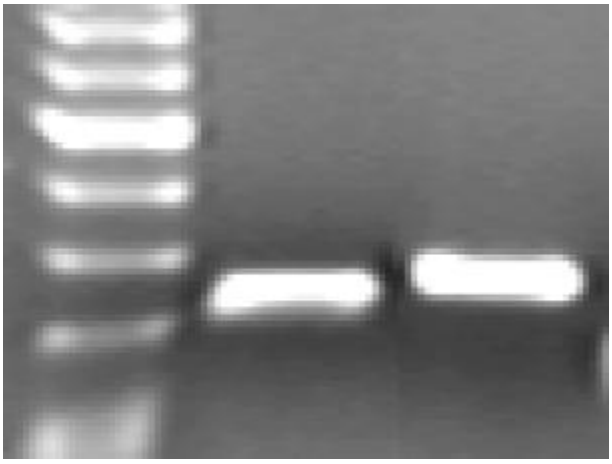

图 16 RT-PCR 产物电泳结果

注:图中第一泳道为 Marker,第二泳道为 GAPDH(238bp),第三泳道为 IFRD1(299bp)。

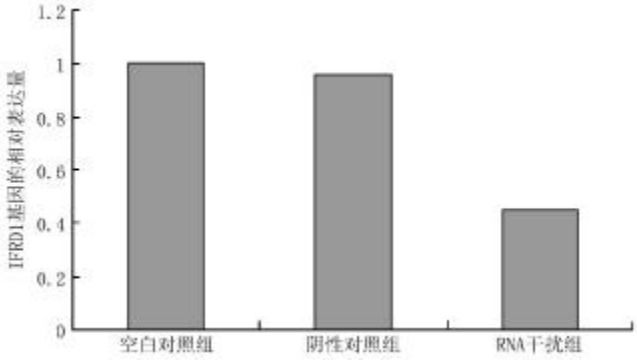

图 15 IFRD1 基因电转染 72h 后的干扰效率

注:▲ 扩增曲线从左至右分别是空白对照组 GAPDH、阴性对照组 GAPDH、干扰序列转染后 GAPDH、空白对照组 IFRD1、阴性对照组 IFRD1、干扰序列转染后 IFRD1。

7721 细胞株,采用 RNAi 等技术开展研究,多次重复实验后发现,在 50 多个被检基因中,IFRD1 等基因表达沉默后,肝癌细胞的增殖受到严重影响,表明肝癌细胞的恶性增殖依赖这些基因的表达,这是在国内外首先观察到的现象。我们之前的研究表明,不同的中医治法对 IFRD1 均有一定的下调作用,对照西药治疗反而出现上调。

干扰素相关发育调节因子 1(Interferon-related developmental regulator 1, IFRD1)基因又称 TIS7(TAP inducible sequence7)、PC4(pheochromocytoma-cell-4)基因,定位人染色体 7q2~2q31,核酸长度 2604kb,含 12 个外显子。该基因编码的蛋白质由 453 个氨基酸组成,分子量 50685Da,可直接作用于 SIN3 复合物,并以 HDAC(Histone deacetylase)活性依赖的方式调节下游基因表达[5~7]。IFRD1 基因最早是作为神经生长因子刺激 PC12 神经细胞分化过程中分泌的即早基因而被克隆出来的,随后在一系列细胞株及体内实验中发现其在肌细胞分化中起重要作用。最近在肺癌细胞系 H1299 中的研究认为[8],该基因通过协助 p53 与 DNA 结合、诱导 Bax 基因的表达而诱导凋亡;通过抑制 SP1 的激活和通过 Lef-1 下调 OPN 基因的表达;通过下调 Beta-catenin/ Tcf-4 转录,抑制 c-myc 和 OPN 等基因在肿瘤细胞中的表达,这些结果显然与我们观察到的相反。

推测可能的原因是,乙酰化的 IFRD1 增强 DNA 的弯曲并激活 p53 与 DNA 对应的应答启动因子(Bax 和 p21 蛋白)结合的能力,而磷酸化的 IFRD1 却减弱这种 p53 与 DNA 的结合,通过这样途径正、负调节 p53 的功能;该基因极有可能在不同种类肿瘤细胞中的所起的作用有所不同。因而,IFRD1 基因的不同表现值得我们深入研究,进一步的了解该基因的功能,将有助于更深入的了解原发性肝癌的发病机理,提供可能的基因治疗的靶点。同时,在一定方面有助于阐明中医药的作用机制,进而提高中医药对原发性肝癌的疗效。

参考文献

1 Dong-yuan Guan, Zhao-qin Fang. Advances in TCM Treatment of Primary Hepatocarcinoma. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2000:20(3):223~226.

2 方肇勤,管冬元,梁尚华,等.不同中医治法对 DEN诱发大鼠肝癌作用的比较研究.中医杂志,2002,43(7):542~544.

3 盛学仕,方肇勤,管冬元,等. DEN 诱发大鼠肝癌过程中肝组织基因表达谱的演变. 中国中医基础医学杂志,2005,11(10): 737~746.

4 阚卫兵,方肇勤,管冬元,等. 二乙基亚硝胺所诱导大鼠肝癌表达上调的基因. 世界华人消化杂志,2005,13(20):2420~2426.

5 Vadivelu SK, Kurzbauer R, Dieplinger B, et al. Muscle regeneration and myogenic differentiation defect s in mice lacking TIS7. Mol Cell Biol, 2004,24:3514~3525.

6 Buanne P, Incerti B , Guardavaccaro D, et al. Cloning of the human interferonrelated developmental regulator (IFRD1) gene coding for t he PC4 protein, a member of a novel family of developmentally regulated genes. Genomics, 1998, 51:233~242.

7 Vietor I, Vadivelu SK, Wick N, et al. TIS7 interacts with the mammalian SIN3 histone deacetylase complex in epithelial cells. EMBO J,2002,21:4621~4631.

8 Kiran, Batta, Tapas K. Activation of p53 Function by Human Transcriptional Coactivator PC4: Role of Protein-Protein nteraction, DNA Bending, and Posttranslational Modifications. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 2007, 27(21):7603~7614.

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

Role of IFRD1 in Hepatocarcinoma Cells and Regulation Effects of Several TCM Therapeutic Methods on Its Expression

Liang Chao[1], Fang Zhaoqin[1], Guan Dongyuan[1], Hu Wei[1],
Dai Xiaoping[1], Wu Zhonghua[1], Gao Bifeng[2]
(1. Basic Medical School, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;
2. Medical College of Coloroda State University, Denver, CO 80220, USA)

Abstract: This work aimed to study the regulation effects of several common TCM formula therapies on the expression of IFRD1 gene in rat liver cancer and its role in growth and proliferation of human hepatocarcinoma cells. Rat hepatocellular carcinoma (HCC) models were induced by diethylnitrosamine (DEN). The rats were treated by different therapeutical methods, including nourishing spleen and enriching qi, clearing away heat and toxic material, and activating blood circulation. Then gene chips were used to measure the expression of IFRD1 gene. Two siRNA targets toward IFRD1 gene were designed. Recombinant plasmid was transfected to hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. The gene expression of IFRD1 was determined using real-time quantitative PCR, and the cell viability was determined by the MTT assay. According to the gene chip results, the expression of IFRD1 was significantly increased after HCC formation. All three methods had therapeutic effects, while nourishing spleen and enriching qi prescription had the significant down-regulation effect. An effective siRNA target sequence in IFRD1 was got by the MTT assay. The cell growth and proliferation were greatly inhibited when the interfered target was transfected for 144 h. The real-time quantitative PCR result showed that the gene expression was greatly decreased 72 h after the transfection. Taken together, the proliferation of malignant hepatocarcinoma cells is related with high expression of IFRD1 gene, so it may act as a target for screening and evaluating the curative effect to hepatocarcinoma.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, IFRD1, RNA interference, Gene chip, Therapeutical principles and methods

（责任编辑：李沙沙，责任译审：张立崴）

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn