

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2015.02.006

# RNAi 介导 ObR 基因沉默 对人乳头状甲状腺癌 K1 细胞增殖与侵袭能力的影响\*

王 帅<sup>1,2</sup> 孔 霞<sup>3</sup> 张国安<sup>4</sup> 侯 森<sup>5</sup> 崔 文<sup>5△</sup>

(<sup>1</sup> 济南大学山东省医学科学院医学与生命科学学院, 山东 济南 250062, <sup>2</sup> 山东省医学科学院, 济南 250022;

<sup>3</sup> 济宁医学院附属济宁市第一人民医院, 山东 济宁 272011;

<sup>4</sup> 济宁医学院基础学院; <sup>5</sup> 济宁医学院法医学与医学检验学院, 济宁 272067)

**摘 要** **目的** 探讨用 RNAi 介导瘦素受体基因(ObR)沉默人乳头状甲状腺癌 K1 细胞(K1 细胞)增殖与侵袭能力的影响。**方法** 使用 siRNA 干扰技术瞬时转染构建 siRNA-ObR。瞬时转染后, Real-time PCR 和 Western blotting 在 mRNA 水平和蛋白水平检测 siRNA-ObR 是否有效抑制 K1 细胞内靶基因的表达; MTT 实验研究 ObR 沉默后 K1 细胞的增殖能力; Transwell 实验检测 ObR 沉默后 K1 细胞的侵袭能力。**结果** Real-time PCR 实验结果显示, ObR 基因沉默后 K1 细胞 ObR mRNA 表达显著降低; Western blotting 实验结果显示, ObR 基因沉默后 K1 细胞 ObR 蛋白表达显著降低; MTT 实验结果显示 ObR 对 K1 细胞的增殖没有意义; Transwell 实验结果显示 ObR 沉默后 K1 细胞侵袭能力显著下降。**结论** ObR 基因沉默能有效抑制 K1 细胞 ObR 基因的表达, 降低 K1 细胞的侵袭能力。

**关键词** RNAi; 基因沉默; siRNA; 人乳头状甲状腺癌 K1 细胞; ObR 基因

**中图分类号:** R736.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9760(2015)04-099-04

## Effect on the proliferation and invasion of human papillary thyroid carcinoma K1 cells after RNAi mediated knockdown

WANG Shuai, ZHANG Guoan, HOU Sen, KONG Xia, CUI Wen

(College of Life Science and Medicine, Jinan University & Shandong Academy of Medicine Sciences, Jinan 250062, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of RNAi-mediated OBR gene silencing on human papillary thyroid carcinoma cell K1. **Methods** siRNA interference technology transient transfection was used to construction of siRNA-ObR. After transfection, we detected whether siRNA-ObR inhibited the expression of target genes in mRNA level and protein level. MTT and Transwell respectively detected proliferation and invasion of K1 cells after OBR gene knockdown. **Results** Real-time PCR results showed that the level of mRNA expression decreased in K1 cells after ObR gene silencing. Western Blotting results exhibited that the level of protein expression was inhibited by ObR gene silencing. MTT results showed the silencing of ObR did not influence the proliferation of K1 cells. Transwell results demonstrated the silencing of ObR decreased K1 cells invasion. **Conclusion** OBR siRNA could effectively inhibit the expression of target gene and reduce invasive ability of human papillary thyroid carcinoma cell K1.

**Keywords:** RNAi; Gene silencing; siRNA; Human papillary thyroid carcinoma cell K1; ObR gene

甲状腺癌是目前增长最快的内分泌恶性肿瘤, 发生率显著升高。乳头状甲状腺癌占 80%~

85%, 在甲状腺癌中最为常见<sup>[1]</sup>。有研究显示肥胖人群中甲状腺癌有更高的发病率<sup>[2]</sup>, 是恶性肿瘤发生的危险因素之一。瘦素是由肥胖基因(ob)编码的蛋白类激素。对于食物摄取与能量平衡、新陈代谢、神经内分泌也有调节作用<sup>[3]</sup>。瘦素受体(ObR)是一种跨膜蛋白, 属于 I 类细胞因子超家族<sup>[4]</sup>, 与 Leptin 瘦素有很高的亲和力。本文探讨

\* [基金项目] 山东省自然科学基金(编号: 2009ZRB02352); 济宁市科技发展计划(编号: 2011-31); 济宁医学院青年基金(编号: JYQ 2011KM006); 山东省高等学校计划项目(编号: J13 LK14); 山东省高校优秀科技创新团队计划资助。

△ [通信作者] 崔文, E-mail: cuiwenmd@163.com

敲除 ObR 基因后对人乳头状甲状腺癌细胞(K1 细胞)增殖和侵袭能力的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

K1 细胞系购于欧洲细胞库。DMEM 培养基购自 Fisher 公司;胎牛血清(FCS)购自杭州四季青公司;ObR 基因沉默序列购于上海吉玛制药技术有限公司;LipofectamineTM2000 Reagent 购于 Invitrogen 公司;OPTI-MEM 购于 Gibco 公司;TRIZOL 购于 Ambion 公司;FastQuant RT Kit (with gDNase)试剂盒购于北京天根生化科技有限公司;SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)试剂盒购于北京天根生化科技有限公司;鼠抗人  $\beta$ -Actin 多克隆抗体、羊抗鼠-LgG(H+L)/HRP、羊抗人多克隆抗体、驴抗羊-LgG(H+L)/HRP 均购于 Santa cruz 公司。引物由上海生工设计,ObR 上游: 5'-ACCTCTGGTTCCCCAAAAGG-3', 下游: 5'-TTGGCAAGGCACAAGACAT-3'; GAPDH 上游: 5'-GGAGCGAGATCCCTC-CAAAAT-3', 下游: 5'-GGCTGTTGTCATACT-TCTCATGG-3'。

siRNA-ObR 由上海吉玛基因设计:上游:5'-GUGCAGUGUUCAGAGAUAUTT-3', 下游:5'-AUAUCCUGAACACUGCACTT-3'; 阴性对照上游: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', 下游:5'-AUGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。

### 1.2 方法

**1.2.1 K1 细胞培养与分组** 在 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内,将 K1 细胞置于含 10% FBS 的 DMEM 培养液中培养,取对数生长期的 K1 细胞用于实验。实验分为 K1-CON 组(空白对照组即未转染 siRNA-ObR 的细胞)、K1-NC 组(阴性对照组即转染 OPTI-NC-siRNA 的细胞)和 K1-ObR 组(转染 OPTI-ObR-siRNA 的细胞)。

**1.2.2 siRNA 构建** 实验前一天使用无双抗含血清培养基铺 6 孔板,细胞密度为  $6 \times 10^5$ /孔。18h,细胞融合度达 60%时开始转染。取 1.5ml EP 管,每管各加入 OPTI-MEM 50 $\mu$ L,分别加入 siRNA-ObR 各 5 $\mu$ L,室温静置 5min,制成 A 液。另取 1.5ml EP 管,每管各加入 OPTI-MEM 50 $\mu$ L,加入 Lipofectamine 2 000 2 $\mu$ L,室温静置 5min,制成 B 液;将 B 液加入到 A 液中,轻柔混合,室温静置 20min。将 A,B 混合液加入到每个已经

含有 OPTI-MEM 的 6 孔板中,前后左右轻轻混匀;培养箱中箱孵育 8h 后,将转染液换为无双抗含血清培养基。

**1.2.3 Real-time PCR 检测** 1)RNA 提取 转染后细胞培养 48h,弃去培养基,加入 1ml trizol,裂解 5min 后,轻轻吹打移入 1.5ml EP 中。加入 0.2ml 氯仿,剧烈震荡 EP 管 15s,室温孵育 3min。4℃ 12 000g 离心 15min,将上层吸出至一 1.5ml EP 管中,加入 0.5ml 异丙醇,室温孵育 10min。4℃ 12 000g 离心 4min,吸掉上层液体,加入 1ml 配置好的 75%乙醇。4℃ 7500g 离心 5min,吸掉上层液体。加入 1ml 配置好的 75%乙醇,4℃ 7500g 离心 5min,吸掉上层液体,空气干燥 5min。加入适量 RNAsae-free,轻轻混匀,55℃ 水浴 10min。nano-drop 测量模板 RNA 的浓度和纯度;2)逆转录 冰上解冻,每种溶液漩涡震荡混匀,简短离心收集,所有步骤操作完成快速置于冰上。建立 gDNA 去除反应体系,置于 42℃,孵育 3min;建立反转录反应体系,42℃,孵育 15min,95℃,孵育 3min 之后放于冰上,得到 cDNA。3)根据试剂盒说明书建立和进行 Real-time PCR 反应体系。

**1.2.4 Western blotting 检测** 1)总蛋白提取 转染后 24h 提取蛋白,常规消化离心细胞,1.5ml EP 管收集;弃去上清,加入 1ml 预冷的 PBS,吹打均匀;1000 rpm,离心 5min;弃去上清,加入适量 RIPA 与 PMSF(比例为 100 : 1),轻轻吹打;漩涡震荡 30min;4℃,12000rpm,离心 30min,吸出上清;测定蛋白浓度,计算出上样体积。2)SDS-PAGE 电泳 配制 10%分离胶,灌胶、水封后,室温凝固 40min;配制 5%的浓缩胶 10ml,插入梳子,室温凝固 30min;凝固后将胶板放入电泳槽内,拔掉梳子,电泳槽中加入配制好的电泳液,孔中加入预染蛋白 Ladder 与已经变性好的蛋白样品;电流最大,恒定电压,电泳 4h;PVDF 膜、海绵、玻璃棒、吸水纸等浸泡在转膜液中;撬开玻璃板,用转膜液冲洗胶,根据蛋白分子量 Mark 所示留下样品蛋白对应的条带;放好海绵、滤纸、PVDF 膜、胶准备转膜;恒流转膜 300A,2h;5%的脱脂奶粉室温封闭 1h;一抗 4℃孵育过夜;二抗室温孵育 1h;ECL 试剂盒两种液体等体积混合后对目的蛋白显色,使用 ChemiDocMP 成像分析仪曝光。

**1.2.5 MTT 检测** 取对数生长期的 K1 细胞,常规消化,1000rpm,离心 5min;弃去上清,加入适量培养基,制成细胞悬液;细胞计数,铺 96 孔板,细胞

密度为  $5 \times 10^3/100\mu\text{L}$ ; 18h 后 SiRNA 瞬时转染, 每组做 3 个平行复孔; 分别在适当时间加入  $25\mu\text{L}$  MTT 溶液, 培养箱中孵育 2h 加入 Lysis Buffer  $100\mu\text{L}$ ; 过夜后, 放于酶标仪上测 570 nm 波长处的 OD 值。

**1.2.6 Transwell 实验** 用  $30\mu\text{L}$   $1:3$  稀释的 Matrigel 胶铺于 Transwell 小室上层, 2h 后加  $100\mu\text{L}$  DMEM 培养基水化, 上室加入转染好的 K1 细胞  $2 \times 10^5$  个, 下室加入  $500\mu\text{L}$  含 10% FBS 的培养基, 每组设 3 个复孔。放置培养箱中培养 72h。72h 后取出小室, PBS 清洗 3 遍, 棉签轻轻擦去上室内细胞, 无水甲醇固定 30min, 0.5% 的结晶紫染色 30min, PBS 清洗 3 次, 自然风干, 每个浓度组正置显微镜下取 5 个视野拍照。以上实验重复 3 次, 取平均值。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 RNAi 介导 ObR 基因沉默后 K1 细胞 ObR mRNA 的表达

K1 细胞转染 48h 后, 提取 RNA, 做 Real-time PCR, 检测沉默 ObR 基因后 K1 细胞 mRNA 表达量分别是  $(0.00218 \pm 0.000486)$ 、 $(0.00357 \pm 0.000937)$ 、 $(0.00426 \pm 0.000426)$ , 如下图所示与阴性对照组和空白对照组相比 siRNA-ObR 沉默组的表达量下降了一半。经 SPSS 统计学分析后  $F=7.797$ 、 $P=0.021$ , 具有统计学意义 (见图 1)。说明 siRNA-ObR 在 mRNA 水平上能显著抑制 K1 细胞的基因表达。

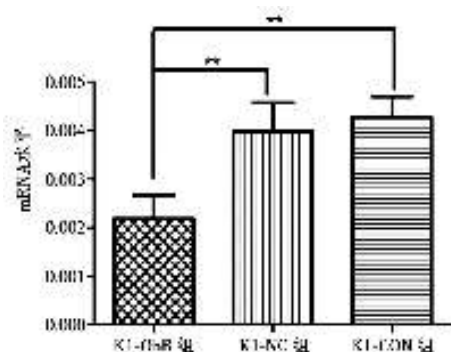


图 1 沉默 ObR 基因后 K1 细胞的 mRNA 水平的表达量

### 2.2 RNAi 介导 ObR 基因沉默后 K1 细胞 ObR 蛋白的表达

K1 细胞转染 24h 后, 提取蛋白做 Western

blotting, 检测沉默 ObR 基因后蛋白水平上表达量。以  $\beta$ -actin 作为内参, 如下图显示 ObR 基因沉默组比空白对照组与阴性对照组蛋白水平上的表达量下降, 相对表达水平分别是  $(0.455 \pm 0.013)$ 、 $(0.412 \pm 0.014)$ 、 $(0.226 \pm 0.0106)$ , 经统计学分析  $F=287.098$ 、 $P=0.000$ , 具有统计学意义 (见图 2)。



图 2 沉默 ObR 基因后蛋白水平上 K1 细胞的表达量

### 2.3 RNAi 介导 ObR 基因沉默对 K1 细胞增殖的影响

分别在转染 24h 和 48h 后, 在酶标仪上测吸光度值。24h 吸光度值分别是  $(0.0618 \pm 0.0035)$ 、 $(0.0577 \pm 0.0043)$ 、 $(0.0630 \pm 0.0037)$ , ( $F=3.243$ ,  $P=0.068$ ); 48h 吸光度值分别是  $(0.0822 \pm 0.0073)$ 、 $(0.0765 \pm 0.0056)$ 、 $(0.0818 \pm 0.0077)$  ( $F=2.366$ ,  $P=0.128$ ) 经 SPSS 分析得出吸光度值没有统计学意义 ( $P>0.05$ ) (见图 3)。沉默 ObR 基因对 K1 细胞增殖并没有影响, 实验结果得出瘦素及其受体不影响 K1 细胞的增殖。

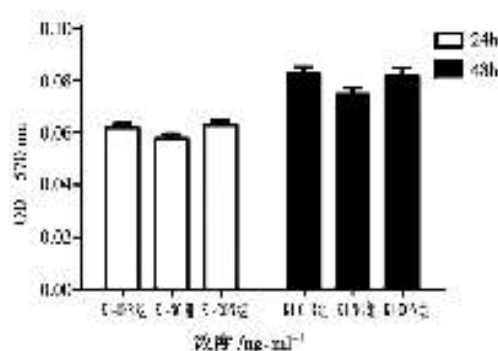


图 3 沉默 ObR 基因后对 K1 细胞活性的影响

### 2.4 RNAi 介导 ObR 基因沉默对 K1 细胞侵袭能力的影响

Transwell 实验可以检测细胞的侵袭能力, K1 细胞转染后铺在上室培养 72h 后, 正置显微镜下拍照选取 5 个视野计算穿出细胞个数。结果分析数据为  $(47.00 \pm 2.000)$ 、 $(85.67 \pm 0.577)$ 、 $(92.00 \pm 1.00)$ , 可见 ObR 沉默后穿出的细胞个数减少 (见图 4)。说明靶基因沉默后 K1 细胞侵袭能力减弱。经统计学分析  $F=1001.313$ 、 $P=0.000$ , 具有统计学意义。

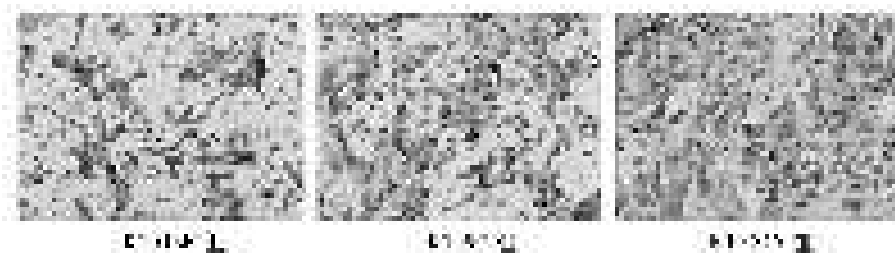


图4 沉默 ObR 基因后对 K1 细胞侵袭的影响

### 3 讨论

瘦素是一种脂肪因子,在许多恶性肿瘤的发生和发展中起了重要的作用,包括胃癌、乳腺癌、子宫内膜癌和结肠癌等。虽然瘦素在体内的致癌作用并非特别显著,但在大多数癌中起到促进癌细胞增殖的作用<sup>[5-10]</sup>,抑制癌细胞的凋亡。Uddin<sup>[11]</sup>等研究了瘦素在甲状腺癌中 PI3K/AKT 的信号机制,显示瘦素通过 PI3K/AKT 通路的激活来刺激细胞增殖、抑制细胞凋亡。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是正常生物体内抑制特定基因表达的一种现象,是在进化过程中高度保守的、由双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)诱发的、同源 mRNA 高效特异性降解的现象。RNAi 技术可以抑制相关癌基因的表达。RNA 沉默是在转录水平、逆转录水平和翻译水平上来阻断基因表达,并且可以特异的剔除或关闭特定基因的表达。siRNA 通过抑制靶向基因的沉默,阻断下游 RNA 诱导沉默复合体的生物活性来增强抑制肿瘤的作用。

本实验使用 RNAi 介导 ObR 基因沉默分析对 K1 细胞增殖与侵袭能力的影响。沉默 ObR 基因后观察对 K1 细胞增殖的影响,结果显示瘦素对 K1 细胞的增殖并没有影响。这或许是瘦素及其受体仅仅在患癌的起始阶段起了一定的作用,对与癌细胞生长并没有作用;也或许与瘦素抵抗(瘦素无法发挥应有的效应)有一定的关系,原因还需要通过进一步实验来证明。侵袭性是恶性肿瘤不同于其他疾病的显著特点,若在恶性肿瘤发展的过程中用某些方式阻断这一生物学行为,便可以很好地遏制疾病。本文通过 Transwell 实验探讨 KNAi 介导 ObR 基因沉默对 K1 细胞侵袭能力的影响。沉默 ObR 基因后 K1 细胞的侵袭能力显著下降。siRNA-ObR 可以有效沉默 K1 细胞中 ObR

基因的表达,降低 K1 细胞的侵袭能力,因此,siRNA-ObR 可以成为甲状腺癌基因靶向治疗的分子。

### 参考文献:

- [1] Podnos Y D, Smith D D, Wagman L D, et al. Survival in patients with papillary thyroid cancer is not affected by the use of radioactive isotope[J]. J Surg Oncol, 2007, 96(1): 3-7.
- [2] Han J M, Kim T Y, Jeon M J, et al. Obesity is a risk factor for thyroid cancer in a large, ultrasonographically screened population[J]. Eur J Endocrinol, 2013, 168(6): 879-86.
- [3] Rehem R A, Elwafa W A, Elwafa R A, et al. Study of Serum Leptin in Well-differentiated Thyroid Carcinoma: Correlation with Patient and Tumor Characteristics[J]. World J Surg, 2014.
- [4] Garofalo C, Surmacz E. Leptin and cancer[J]. J Cell Physiol, 2006, 207(1): 12-22.
- [5] 聂明, 崔文. 瘦素与卵巢癌研究进展[J]. 济宁医学院学报, 2012, 35(3): 212-214.
- [6] Vona-Davis L, Rose D P. Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression[J]. Endocr Relat Cancer, 2007, 14(2): 189-206.
- [7] 侯森, 崔文. 瘦素脂联素及其受体甲状腺癌关系的研究进展[J]. 济宁医学院学报, 2013, 36(3): 221-224.
- [8] Chen C, Chang Y C, Liu C L, et al. Leptin-induced growth of human ZR-75-1 breast cancer cells is associated with up-regulation of cyclin D1 and c-Myc and down-regulation of tumor suppressor p53 and p21WAF1/CIP1[J]. Breast Cancer Res Treat, 2006, 98(2): 121-132.
- [9] Chen C, Chang Y C, Liu C L, et al. Leptin induces proliferation and anti-apoptosis in human hepatocarcinoma cells by up-regulating cyclin D1 and down-regulating Bax via a Janus kinase 2-linked pathway[J]. Endocr Relat Cancer, 2007, 14(2): 513-529.
- [10] Shahab Uddin, Prashant Bavi, Abdul K Siraj, et al. Leptin-R and its association with PI3K/AKT, signaling pathway in papillary thyroid carcinoma[J]. Endocrine-Related Cancer, 2010 (17): 191-202.

(收稿日期 2015-03-20)