

PIWIL1 基因沉默对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响*

张淑君 单梦圆 翟羽佳 李 闯 季丙元[△]

(济宁医学院精神卫生学院, 济宁 272013)

摘 要 目的 PIWIL1 基因沉默对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖活性的影响, 为乳腺癌的基因诊断和治疗提供理论依据。方法 针对 PIWIL1 mRNA 序列设计合成 siRNA 并筛选最佳 siRNA, 构建 pGCSilencerTM H1/GFP/Neo/PIWIL1 RNAi 和 pGCSilencerTM H1/GFP/Neo/Non RNAi 重组质粒; 将重组质粒导入乳腺癌 MCF-7 细胞株, G418 筛选获得稳定转染的细胞株; 实验分为脂质体对照组、阴性质粒转染对照组(阴性对照组)及 PIWIL1-shRNA 重组质粒转染组(PIWIL1-shRNA 组), 实时荧光定量 PCR 法检测 PIWIL1 mRNA 表达水平的变化, Western blot 检测细胞中 PIWIL1 蛋白表达, CCK-8 检测干扰质粒对 MCF-7 细胞增殖活性的影响。结果 荧光显微镜检测显示稳定表达重组质粒 pGCSilencerTM H1/GFP/Neo/PIWIL1 RNAi 的乳腺癌 MCF-7 细胞株筛选成功, 其 PIWIL1 mRNA 抑制率(74%)明显高于阴性对照组(5.4%), PIWIL1-shRNA 组细胞 PIWIL1 蛋白表达水平显著低于脂质体对照组和阴性对照组细胞, MCF-7 细胞增殖活性显著低于阴性对照组和脂质体对照组差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 重组质粒 pGCSilencerTM H1/GFP/Neo/PIWIL1 RNAi 可抑制乳腺癌细胞中 PIWIL1 基因的表达, 进而降低细胞活性。

关键词 shRNA; PIWIL1; 乳腺癌; MCF-7 细胞株

中图分类号: R737.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2019)02-117-05

Effects of PIWIL1 gene silencing on proliferation of human breast cancer MCF-7 cells

ZHANG Shujun, SHAN Mengyuan, ZHAI Yujia, LI Chuang, JI Bingyuan[△]

(School of Mental Health, Jining Medical University, Jining 272013, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of silencing PIWIL1 gene on the viability of human breast cancer MCF-7 cells, and to provide evidence in diagnosis and treatment for breast cancer. **Methods** Specific siRNA for PIWIL1 was designed and synthesized, and the optimal siRNA was selected. Then, the two recombinant plasmids pGCSilencerTM H1/GFP/Neo/PIWIL1 RNAi and pGCSilencerTM H1/GFP/Neo/Non RNAi were constructed. The two plasmids were transfected into MCF-7 cells, and the positive cell clones were obtained by G418 selection. The breast cancer cell lines MCF-7 were divided into three groups: liposome-treated control group, negative plasmid-transfected control group and PIWIL1-shRNA transfected group. The mRNA and protein levels of PIWIL1 were determined by real-time quantitative PCR and Western blot, respectively. The proliferation of cells was also observed by CCK-8 viability assay. **Results** The MCF-7 cell lines stably expressing recombinant plasmid pGCSilencerTM H1/GFP/Neo/PIWIL1 RNAi was successfully selected. The results of real-time quantitative PCR indicated that the inhibitory rates of mRNA in pGCSilencerTM H1/GFP/Neo/PIWIL1 transfected group (74%) was higher than that in negative plasmid transfected control group (5.4%). And the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The PIWIL1 protein levels were also significantly decreased in RNAi cells. The CCK-8 assay results showed that the cell proliferation in PIWIL1-shRNA transfected group was lower than that in negative plasmid transfected control group and liposome-treated control group. **Conclusion** The recombinant plasmid pGCSilencerTM H1/GFP/Neo/PIWIL1 can suppress the expression of PIWIL1 in breast cancer cells resulting in the reduction of cell viability.

Keywords: shRNA; PIWIL1; Breast cancer; MCF-7 cell Lines

* [基金项目] 济宁医学院大学生科研项目 (JYXS2017KJ013)

[△] [通信作者] 季丙元, E-mail: jby2006@126.com

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,严重危害女性的身心健康,已成为导致女性死亡的重要因素。PIWI 是一类肿瘤相关基因,参与了包括乳腺癌在内的多种肿瘤的发生发展过程。PIWI 基因家族有 4 个成员,即 Piwil1 (Piwi-like homolog1)、Piwil2、Piwil3 和 Piwil4。PIWIL1 (PIWI-like protein 1, PIWIL1) 是 Argonaute 蛋白家族的重要成员,在细胞增殖、肿瘤发生、胚胎发育等生物学过程中发挥重要的作用^[1]。Sun 等^[2]研究发现,结肠癌组织中 PIWIL1 蛋白表达水平远远高于正常结肠组织,提示 PIWIL1 可作为检测结肠癌的重要的分子标记物。随着研究的不断深入,已发现多种分子在乳腺癌的发生过程中发挥重要的作用。CYP3A4 是墨西哥女性乳腺癌发病的重要检测分子^[3]。ESR1 和 PGR 与乳腺导管癌的发生密切相关^[4],同时 EMSY (一种新的 BRCA2 连接蛋白) 参与了乳腺癌的淋巴结转移^[5]。PIWIL 的高表达与肿瘤的低分化和高转移率密切相关,甚至会导致周围神经侵袭^[6]。胃癌组织高水平表达 PIWIL,常被看作癌细胞生长的标志物^[7],而敲除 PIWIL 则会抑制裸鼠肺癌的生长^[8],这充分表明 PIWIL 参与了多种肿瘤发生,并可作为癌症治疗的潜在药物靶标。

本实验应用 RNAi 技术特异性沉默乳腺癌细胞株 MCF-7 中 PIWIL1 基因的表达,探讨 PIWIL1 基因的靶向抑制对乳腺癌细胞增殖的影响,为乳腺癌的早期基因诊断和治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

乳腺癌 MCF-7 细胞株由本研究所培养保存,细胞培养所用胎牛血清和 DMEM 培养基均购自美国 Gibco 公司;SYBR Green I 购自罗氏公司;RNA 提取试剂 TRIzol 和细胞转染试剂 LipofectamineTM 2000 均购自 Invitrogen 公司;RT-PCR 试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。针对目的基因 PIWIL1 的干扰质粒 pGCsilencerTM H1/GFP/Neo/PIWIL1 和对照质粒 pGCsilencerTM H1/GFP/Neo/Non 均由上海吉凯公司设计并构建。

1.2 靶向 PIWIL1 的 shRNA 表达载体的构建

根据目的基因 PIWIL1 的 mRNA 序列 (Accession number of PIWIL1 mRNA: AB079366) 设计合成其靶向 siRNA,并从中选择干扰效率最高的一条 siRNA 构建表达载体 pGCsilencerTM H1/GFP/Neo/

PIWIL1,该表达载体在脊椎动物细胞内表达针对 PIWIL1 的 shRNA。同时设计合成一条非特异 siRNA,构建阴性对照表达载体 pGCsilencerTM H1/GFP/Neo/Non。

1.3 细胞培养

人乳腺癌 MCF-7 细胞株常规培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,5% CO₂,37℃ 条件下培养、传代。实验随机分为脂质体对照组,阴性质粒转染对照组(阴性对照组)及 PIWIL1-shRNA 重组质粒转染组(PIWIL1-shRNA 组)。

1.4 稳定转染细胞株的筛选

MCF-7 细胞接种于 24 孔板,24h 后转染干扰质粒,48h 后更换含有 G418 的 DMEM 培养基,每 2~3 天更换一次新鲜培养液,G418 浓度由预实验确定。约 10~15d 后转染 PIWIL1-shRNA 组质粒的细胞多数死亡,未转染带有抗性基因质粒的细胞组全部死亡。最后,挑取阳性细胞克隆继续扩大培养,直至获得稳定转染的细胞。

1.5 PIWIL1 mRNA 表达的检测

为检测干扰质粒对目的基因表达水平的影响,对 PIWIL1-shRNA 组、阴性对照组和脂质体对照组各组细胞进行 PIWIL1 mRNA 表达水平检测。提取各组细胞总 RNA,然后反转录成 cDNA。利用软件 Primer Premier 5.0 设计 PIWIL1 和内参 GAPDH 引物,为避免基因组 DNA 的污染,上下游引物跨越 2 个内含子。PIWIL1:上游引物 5'-TCACCTGAGCAAAGACAAC-3',下游引物 5'-TCCCGTAAAGGACAGTAAG-3',片段长度 126bp;GAPDH:上游引物 5'-CGATCTGAACCTACATGGTTTAC-3',下游引物 5'-TCTGCCCCATTTGATGTTGC-3',片段长度 151bp。按照试剂盒操作规程,运用实时荧光定量 PCR 检测各组细胞中 PIWIL1 mRNA 表达水平。以 GAPDH 作内参,用公式 $2^{-Ct(GAPDH)-Ct(PIWIL1)}$ 计算目的基因 mRNA 相对表达量。

1.6 Western blot 检测细胞中 PIWIL1 蛋白表达

将培养于 6 孔细胞培养板中的 MCF-7 细胞去除培养基,预冷的 PBS 洗两遍。每孔加入 200μl RIPA 细胞裂解液(含 1% PMSF),置于冰上裂解 30min,提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。10% 的 SDS-PAGE 进行电泳分离、转膜。5% 的脱脂蛋白室温封闭 1h,TBST 洗 3 次,10min/次;PIWIL1 一抗 4℃ 孵育过夜,TBST 洗 3 次,10min/次;辣根过氧化物酶标记的二抗山羊抗兔 IgG 室温孵

育 1h, TBST 洗 3 次, 10min/次; ECL 显色、X 曝光。扫描仪扫描 X 光片上的条带, Image J2x 软件进行条带的灰度值计算。所得结果用 SPSS13.0 进行统计分析, 结果以 3 次独立实验的 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.7 CCK-8 (Cell Counting Kit-8) 检测细胞增殖活性

将脂质体对照组、PIWIL1-shRNA 组和阴性对照组等各组 MCF-7 细胞接种于 96 孔培养板中, 细胞密度为 10^4 个/孔, CO_2 培养箱常规培养。24h 后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液; 细胞培养箱内继续孵育 1h; 在 450nm 测定吸光度。实验重复 3 次。

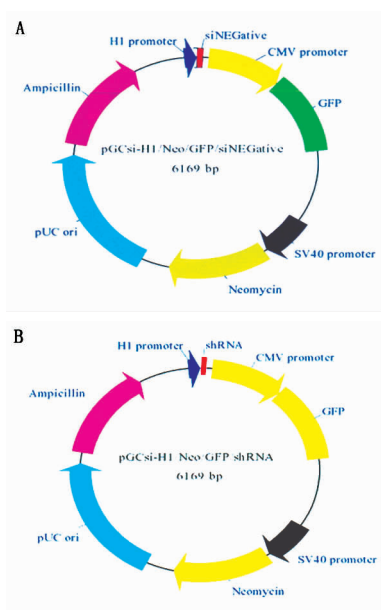
1.8 统计学方法

数据用 SPSS18.0 软件进行统计分析, 采用方差分析进行多组间比较, 采用 SNK-q 检验进一步两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PIWIL1-shRNA 表达载体的构建与鉴定

阳性干扰质粒 pGCsilencerTM H1/GFP/Neo/PIWIL1 和阴性对照重组质粒构建后经测序证实 100% 靶向目的基因, 同时该载体在细胞内可表达用于筛选的 GFP 蛋白, 表明该重组质粒构建成功。见图 1。

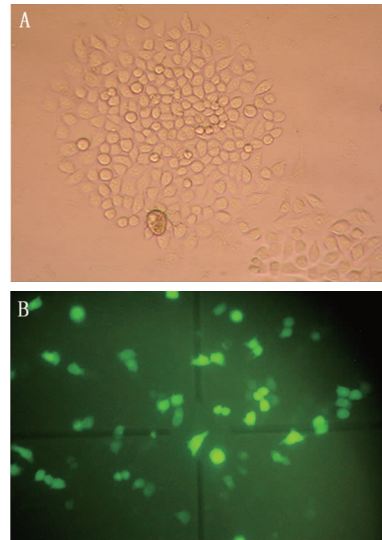


注: A. pGCsilencerTM H1/GFP/Neo/NON RNAi 质粒图谱;
B. pGCsilencerTM H1/GFP/Neo/PIWIL1 RNAi 质粒图谱
图 1 RNAi 质粒构建图谱

2.2 稳定转染细胞株的筛选

含阳性重组质粒的 MCF-7 细胞株在经过

G418 抗性筛选后, 细胞爬片, 荧光显微镜观察, 证实已成功获得稳定转染的阳性细胞克隆, 可用于后续实验。见图 2。



注: A. 稳定转染 pGCsilencerTM H1/GFP/Neo/ PIWIL1 质粒的 MCF-7 细胞在普通显微镜下的生长状态; B. 稳定转染 pGCsilencerTM H1/GFP/Neo/ PIWIL1 质粒的 MCF-7 细胞在荧光显微镜下的生长状态

图 2 MCF-7 稳转细胞的筛选及鉴定

2.3 PIWIL1-shRNA 对 MCF-7 细胞中 PIWIL1 mRNA 表达的影响

2.3.1 电泳鉴定结果 PCR 扩增后 DNA 电泳结果显示, PIWIL1 和内参 GAPDH 大小与实际大小一致, 表明 MCF-7 细胞内源性表达 PIWIL1 mRNA, 且 PCR 对 2 种基因进行了特异性扩增。见图 3。

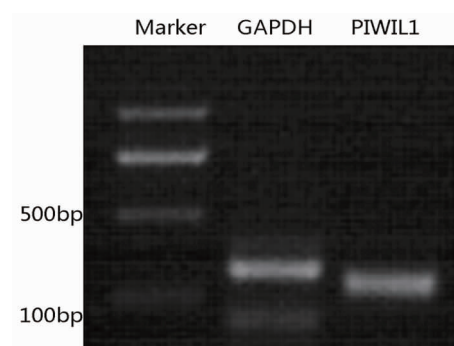


图 3 Real-time PCR 扩增后 PIWIL1 和 GAPDH 电泳图

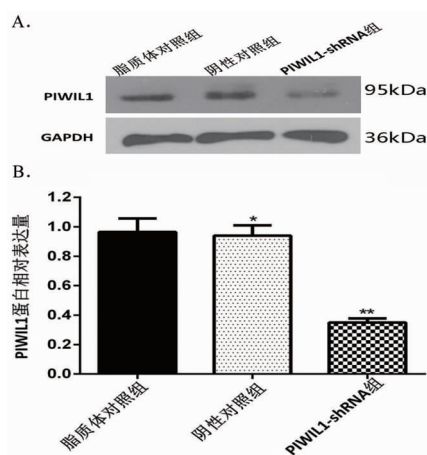
2.3.2 PIWIL1 mRNA 的相对定量 PIWIL1-shRNA 重组质粒转染 MCF-7 细胞后, 目的基因 PIWIL1 mRNA 的表达水平受到了显著的抑制, mRNA 表达水平比脂质体对照组降低了 73.9%。阴性对照组和脂质体对照组 MCF-7 细胞的 PIWIL1 mRNA 表达水平无显著性差异。见表 1。

表 1 稳定转染后各组细胞 PIWIL1 mRNA 的相对抑制率

分组	PIWIL1	GAPDH	ΔCt (GAPDH-PIWIL1)	$\Delta\Delta Ct$	1-2 $\Delta\Delta Ct$
脂质体对照组	25.63	21.16	-4.47	—	—
阴性对照组	25.84	21.29	-4.55	-0.08	5.4 %
PIWIL1-shRNA 组	27.84	21.43	-6.41	-1.94	73.9%

2.4 PIWIL1-shRNA 对 MCF-7 细胞中 PIWIL1 蛋白表达的影响

PIWIL1-shRNA 组 PIWIL1 蛋白表达显著低于脂质体对照组和阴性对照组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),而阴性对照组和脂质体对照组间无统计学差异。见图 4。



注:3 组间比较, $F = 51.18, P < 0.05$;

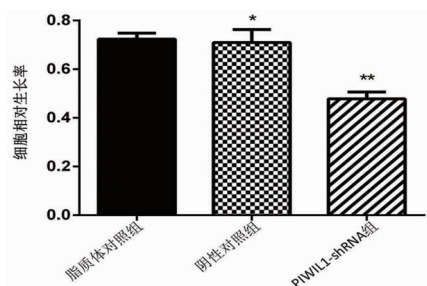
与脂质体对照组及阴性对照组比较, $** P < 0.05, n = 6$;

与脂质体对照组相比, $* P > 0.05, n = 6$

图 4 PIWIL1-shRNA 对 MCF-7 细胞中 PIWIL1 蛋白表达水平的影响

2.5 PIWIL1-shRNA 对 MCF-7 细胞的增殖活性的影响

PIWIL1-shRNA 质粒转染 MCF-7 细胞后, PIWIL1-shRNA 细胞增殖活性显著低于阴性对照组和脂质体对照组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),而阴性对照组和脂质体对照组间没有差异。



注:3 组间比较, $F = 40.65, P < 0.05$;

与脂质体对照组及阴性对照组比较, $** P < 0.05, n = 6$;

与脂质体对照组相比, $* P > 0.05, n = 6$

图 5 PIWIL1-shRNA 对 MCF-7 细胞活性的影响

3 讨论

PIWI 是人类 Argonaute 蛋白家族重要成员,而 Argonaute 蛋白是 RNA 介导的干扰复合物的中心成分。PIWI 参与了几乎所有的生物学过程,并且与多种恶性肿瘤的发生密切相关^[9]。作为 PIWI 蛋白亚家族成员,PIWIL1 广泛分布于前列腺、卵巢、乳腺、肝脏、心脏等多种人体组织中,在细胞增殖、凋亡、粘附、转移和肿瘤的发生等生物学过程中发挥了关键的作用^[10-11]。

本实验中,我们首先根据 siRNA 设计原则,针对 PIWIL1 基因设计了 3 条 siRNA 和 1 条阴性对照 siRNA,通过筛选优化得到了一条干扰效果最佳的 siRNA,随后用这条 siRNA 构建了 PIWIL1-shRNA 表达质粒,用以筛选稳转细胞和后期的动物实验。该表达质粒除可高效表达 shRNA,还可表达 GFP 和 Neo 2 种蛋白,用以检测转染效率和进行抗性筛选,扩大培养。

稳转细胞株的筛选,我们选用了 G418 抗性筛选方法。荧光显微镜检测结果显示,转染 PIWIL1-shRNA 质粒的 MCF-7 细胞经过抗性筛选后稳定高效表达绿色荧光蛋白,且 PIWIL1 主要在细胞质中表达,表明稳定表达 PIWIL1-shRNA 质粒和阴性对照质粒的 MCF-7 细胞株筛选成功,为后续实验的顺利实施奠定了研究基础。随后,我们从 mRNA 水平和蛋白水平对稳转细胞中 PIWIL1 基因的表达进行了检测。实时荧光定量 PCR 结果显示,转染 PIWIL1-shRNA 质粒的 MCF-7 细胞, PIWIL1 mRNA 的表达受到了明显的抑制,与脂质体对照组相比, mRNA 表达水平降低了 73.9%。而转染阴性对照质粒的 MCF-7 细胞和脂质体对照组相比, PIWIL1 mRNA 的表达水平无显著性差异,表明 PIWIL1-shRNA 显著抑制了 PIWIL1 mRNA 的表达。同样,蛋白免疫印迹结果显示, PIWIL1-shRNA 组的蛋白表达水平显著低于脂质体对照组和阴性对照组 ($P < 0.05$),表明 PIWIL1-shRNA 不仅抑制了 PIWIL1 基因的 mRNA 的表达,进而还引起了 PIWIL1 蛋白表达的降低。

研究表明, PIWIL1 参与了多种恶性肿瘤的发生发展。PIWIL1 的异常表达促进了结肠癌细胞的增殖,还可通过上调 DNA 的甲基化影响癌细胞的活性^[12-13]。肺癌细胞增殖活性的激活同样依赖

PIWIL1 基因的过表达^[14], 因此, PIWIL1 常被作为多种恶性肿瘤早期诊断和预后的标志物^[2,15]。本实验中, PIWIL1-shRNA 重组质粒的转染抑制了乳腺癌细胞 MCF-7 中 PIWIL1 mRNA 和蛋白的表达。为检测基因水平的变化是否会影响细胞的增殖, 我们运用 CCK-8 方法进行了细胞增殖活性检测。实验结果显示, PIWIL1-shRNA 组细胞的增殖活性显著低于脂质体组和阴性对照组细胞 ($P < 0.05$), 表明 PIWIL1 表达水平的降低抑制了细胞的增殖, 进而也说明 PIWIL1 能够促进 MCF-7 细胞的增殖, 具有促进乳腺癌增殖的潜力, 是一种促癌基因。

综上所述, 我们运用 RNAi 和实时荧光定量等方法, 证实在对乳腺癌细胞 MCF-7 中的 PIWIL1 进行沉默后, PIWIL1 mRNA 和蛋白表达显著降低。CCK-8 细胞活性分析实验表明, PIWIL1 能够促进乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖, 提示 PIWIL1 是一种肿瘤促进基因, 为乳腺癌的早期诊断和治疗提供了新的思路, 为抗癌药物的设计和研究提供了新的实验依据。

参考文献:

- [1] Liu WK, Jiang XY, Zhang ZX. Expression of PSCA, PIWIL1 and TBX2 and its correlation with HPV16 infection in formalin-fixed, paraffin-embedded cervical squamous cell carcinoma specimens[J]. Arch Virol, 2010, 155(5): 657-663. DOI: 10. 1007/s00705-010-0635-y.
- [2] Sun R, Gao CL, Li DH, et al. Expression status of PIWIL1 as a prognostic marker of colorectal cancer[J]. Dis Markers, 2017, 2017: 1204937. DOI: 10. 1155/2017/1204937.
- [3] Floriano-Sanchez E, Rodriguez NC, Bandala C, et al. CYP3A4 expression in breast cancer and its association with risk factors in Mexican women[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(8): 3805-3809.
- [4] Medina-Jaime AD, Reyes-Vargas F, Martinez-Gaytan V, et al. ESR1 and PGR gene promoter methylation and correlations with estrogen and progesterone receptors in ductal and lobular breast cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(7): 3041-3044.
- [5] Madjd Z, Akbari ME, Zarnani AH, et al. Expression of EMSY, a novel BRCA2-Link protein, is associated with lymph node metastasis and increased tumor size in breast carcinomas[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(4): 1783-1789.
- [6] Oh SJ, Kim SM, Kim YO, et al. Clinicopathologic implications of PIWIL2 expression in colorectal cancer[J]. Korean J Pathol, 2012, 46(4): 318-323. DOI: 10. 4132/KoreanJPathol. 2012. 46. 4. 318.
- [7] Liu XY, Sun Y, Guo JP, et al. Expression of hiwi gene in human gastric cancer was associated with proliferation of cancer cells[J]. Int J Cancer, 2006, 118(8): 1922-1929. DOI: 10. 1002/ijc. 21575.
- [8] Liang D, Dong M, Hu LJ, et al. Hiwi knockdown inhibits the growth of lung cancer in nude mice[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(2): 1067-1072.
- [9] Völler D, Linck L, Bruckmann A, et al. Argonaute family protein expression in normal tissue and cancer entities[J]. PLoS One, 2016, 11(8): e0161165. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0161165.
- [10] Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, et al. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins[J]. Nature, 2006, 442(7099): 199-202. DOI: 10. 1038/nature04917.
- [11] Kwon C, Tak H, Rho M, et al. Detection of PIWI and piRNAs in the mitochondria of mammalian cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 446(1): 218-223. DOI: 10. 1016/j. bbrc. 2014. 02. 112.
- [12] Yang L, Bi L, Liu QW, et al. Hiwi promotes the proliferation of colorectal cancer cells via upregulating global DNA methylation[J]. Dis Markers, 2015, 2015: 383056. DOI: 10. 1155/2015/383056.
- [13] Wang HL, Chen BB, Cao XG, et al. The clinical significances of the abnormal expressions of Piwil1 and Piwil2 in colonic adenoma and adenocarcinoma[J]. Onco Targets Ther, 2015, 8: 1259-1264. DOI: 10. 2147/OTT. S77003.
- [14] Reeves ME, Firek M, Chen ST, et al. Evidence that RASSF1C stimulation of lung cancer cell proliferation depends on IGFBP-5 and PIWIL1 expression levels[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101679. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0101679.
- [15] Wang Y, Liu YX, Shen XY, et al. The PIWI protein acts as a predictive marker for human gastric cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2012, 5(4): 315-325.

(收稿日期 2019-01-29)

(本文编辑:石俊强)