

WISP-2 siRNA 对人脑胶质瘤 U251 细胞增殖、凋亡的影响

唐智^{1*}, 袁贤瑞², 何正文¹

1 湖南省肿瘤医院神经外科(即中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院), 湖南 长沙 410013;

2 中南大学湘雅医院神经外科, 湖南省颅底外科与神经肿瘤研究中心, 湖南 长沙 410008

摘 要:目的 探讨 siRNA 沉默 WISP-2 基因表达对人脑胶质瘤细胞 U251 增殖、凋亡的影响。方法 脂质体介导 siRNA 转染人脑胶质瘤细胞 U251 后, 检测 U251 细胞的增殖、凋亡的变化, 并用 Western blot 法检测 WISP-2、Bcl-2、Bax 蛋白的表达。结果 WISP-2 siRNA 能有效抑制 U251 细胞株的生长, 诱导凋亡, siRNA 干扰组 WISP-2 蛋白表达水平为 $(18.67 \pm 1.40)\%$, 明显低于空白对照组 $(70.18 \pm 1.82)\%$ 和阴性对照组 $(69.41 \pm 1.77)\%$, 且差异有统计学意义 ($P < 0.01$); siRNA 干扰组 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平为 $(29.67 \pm 1.47)\%$ 、 $(31.62 \pm 1.32)\%$, 明显低于空白对照组和阴性对照组, 且差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 WISP-2 siRNA 抑制 WISP-2 mRNA 和蛋白表达后, 能有效抑制胶质瘤细胞的增殖, 增加 U251 细胞凋亡, 可能通过下调 Bcl-2/Bax 蛋白表达的比值来诱导细胞凋亡。

关键词: 胶质瘤; WISP-2; 增殖; 凋亡; Bcl-2/Bax

Effects of WISP-2 siRNA on proliferation and apoptosis of human glioma U251 cells

TANG Zhi¹, YUAN Xian-rui², HE Zheng-wen¹, 1. Neurosurgery Department of Hunan Provincial Tumor Hospital (The Affiliated Tumor Hospital of Xiangya Medical School of Central South University), Changsha, Hunan 410013; 2. Neurosurgery Department of Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008

Abstract: Objective To investigate the effects of siRNA-mediated WISP-2 gene silencing on the proliferation and apoptosis of human glioma cell line U251. **Methods** Liposome-mediated transfection with WISP-2 siRNA was performed in human glioma U251 cells. The effects of WISP-2 suppression on the proliferation and apoptosis of U251 cells were evaluated by MTT assay and flow cytometry. The protein expression of WISP-2, Bcl-2, and Bax after the gene silencing of WISP-2 in U251 cells was measured by Western blot. **Results** The MTT assay showed that the cell growth rate was significantly lower in siRNA interference group than in blank control group and negative control group ($P < 0.05$). The flow cytometry showed that the mean apoptotic rate of siRNA interference group was $16.59 \pm 1.40\%$, significantly lower than those of blank control group $(3.13 \pm 0.34\%)$ and negative control group $(3.42 \pm 0.48\%)$ ($P < 0.01$). WISP-2 siRNA significantly inhibited the growth and induced the apoptosis of U251 cells. WISP-2 protein expression was significantly lower in siRNA interference group $(18.67 \pm 1.40\%)$ than in blank control group $(70.18 \pm 1.82\%)$ and negative control group $(69.41 \pm 1.77\%)$ ($P < 0.01$). The protein expression of Bcl-2 and Bax was significantly lower in siRNA interference group $(29.67 \pm 1.47\%$ and $31.62 \pm 1.32\%)$ than in blank control group and negative control group ($P < 0.01$). **Conclusions** WISP-2 siRNA, which inhibits the mRNA and protein expression of WISP-2, can effectively suppress the proliferation and promote the apoptosis of U251 cells. And the cell apoptosis may be induced by down-regulating the Bcl-2/Bax ratio.

Key words: glioma; WISP-2; proliferation; apoptosis; Bcl-2/Bax

WISP-2 属于即刻早期基因高半胱氨酸蛋白 61/结缔组织生长因子/肾母细胞瘤过度表达基因 (cysteine rich 61/connective tissue growth factor/nephroblastoma overexpressed gene, CCN) 家族成员之

一, 在多种肿瘤组织中高表达^[1]。研究显示^[2] WISP-2 在正常脑组织中无表达, 但在胶质瘤中的表达升高, 且在高病理级别的胶质瘤组织中的表达高于其在低病理级别的胶质瘤中的表达, WISP-2

收稿日期: 2013-02-28; 修回日期: 2013-05-03

作者简介: 唐智 (1982-), 博士, 主治医师, 主要从事神经肿瘤的临床与基础研究。

可能在胶质瘤的生物学行为中起一定作用。本研究用 WISP-2 siRNA 转染人胶质瘤细胞 U251 细胞株,以研究 WISP-2 基因沉默后对人胶质瘤细胞增殖、凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人脑胶质瘤细胞株 U251 (中南大学湘雅中心实验室细胞库), WISP-2、GDPDH 引物 (北京博迈得公司), RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司), Lipofectamine TM 2000、RNA Trizolrose (intrivogen 公司), 兔抗人单克隆抗体 WISP-2、GDPDH (Abcam 公司), 兔抗人单克隆抗体 Bcl-2、Bax (北京博奥森公司), S-P 试剂盒、DAB 试剂盒 (北京中山公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含 10% 灭活胎牛血清的 RPMI 640、 1×10^5 U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素作为培养基,将 U251 胶质瘤细胞置于含 5% CO_2 、37℃ 细胞培养箱内培养,每 2~3 天传代 1 次。取对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 WISP siRNA 的合成与转染 从化学合成的 3 条 WISP-2-siRNA 序列中筛选出 1 条最有效的 siRNA 序列 WISP-2-siRNA-289,正义链: 5'-GACAGCAGCUGUGAGGUGATT-3',反义链: 5'-UCACUCACAGCUGCUGUUTT-3'。用 Free-RNase 水将干粉 siRNA 稀释成浓度为 20 nmol/L。转染前 24 h,取对数生长期的细胞用胰酶消化、计数,按 Lipofectamine 2000 说明书进行转染,然后加入新鲜培养基,继续培养。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖 将对数生长期的 U251 细胞分为 3 个组,空白对照组:未予任何干扰的 U251 细胞株;阴性对照组:加入非特异性 siRNA/Lipofectamine 复合物的 U251 细胞株;siRNA 干扰实验组:为 WISP-2-siRNA-289 脂质体转染的 U251 细胞株。收集对数期 U251 细胞,调整细胞悬液浓度,接种于 96 孔,每孔 200 μl ,含细胞数约 1×10^4 个/孔,置 37℃、5% CO_2 温箱培养。各实验组分别于培养后 24 h、48 h、72 h、96 h、5 d 用于 MTT 检测;(二甲基亚砜),在酶标仪上测定各孔,492 nm 波长处 OD 值,以空白细胞组作为对照组。以培养时间为横轴,OD 值为纵坐标,在 SPSS 13.0

软件中绘制生长曲线。

1.2.4 Western blot 法检测 WISP-2、Bcl-2、Bax 蛋白的表达 分组同上。转染 48 h 后,以含 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞,用终浓度为 1 mmol/L 蛋白裂解液 RIPA 裂解细胞,在 4℃、12000 r/min,离心 15 分钟,取上清,测蛋白浓度后,每个样品蛋白终浓度均调整为 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, -80℃ 保存备用。将定量后的蛋白质 100℃ 加热 5 分钟后上样电泳,经 15% SDS-PAGE 电泳后转 PVDF 膜 90 min,用 1 ml 1:4000 稀释的 I 抗 4℃ 封闭过夜,弃 I 抗后加入 1 ml 辣根过氧化物酶标记二抗 (1:5000 稀释),室温温育 2 h 后漂洗,发光液显影,成像。以 GDPDH 检测作为内对照。

1.2.5 流式细胞术 (FCM) 检测细胞凋亡 分组同上。各处理组在转染 48 h 后以 0.25% 胰酶消化,制成单细胞悬液 (1×10^6 /ml),1000 g 离心 5 分钟,PBS 洗涤细胞 3 次,用 4℃ 预冷的 70% 乙醇固定 (4℃ 保存),固定不少于 12 小时。1000 g 离心去除乙醇。调整细胞浓度为 1×10^6 /ml,取 1 毫升细胞悬液,用 PBS 洗三次,细胞重悬于 1 毫升 PI 染液中 (PI 染液浓度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$,含 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A),4℃ 染色 30 分钟,上机检测。流式细胞仪检测分析细胞凋亡情况,低于 G1 期的细胞 (亚二倍体) 为凋亡细胞,其占细胞总数的比例为凋亡细胞率。

1.3 统计学处理

各试验均独立重复 3 次,应用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法检测细胞增殖能力

MTT 结果显示,siRNA 干扰组在转染 12 h、24 h、48 h、72 h 及 96 h,MTT 法检测各组 OD 值分别为 0.082 ± 0.008 、 0.106 ± 0.012 、 0.160 ± 0.022 、 0.270 ± 0.014 、 0.438 ± 0.017 ,转染 12 h、24 h、48 h、72 h 及 96 h 时 siRNA 干扰组细胞生长速度较其他两组显著降低 ($P < 0.05$),空白对照组与阴性对照组在各时间点比较无统计学差异 ($P > 0.05$,图 1),以培养时间为横轴,平均 OD 值为纵坐标绘制生长曲线,siRNA 干扰组生长曲线低缓 (图 2)。

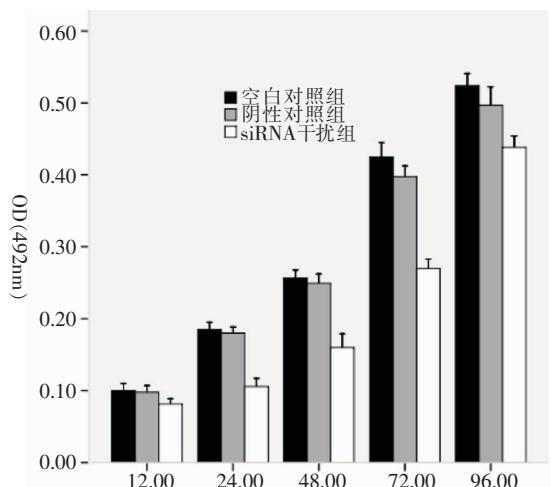


图 1 WISP-2 siRNA 对 U251 细胞增殖活性的影响。

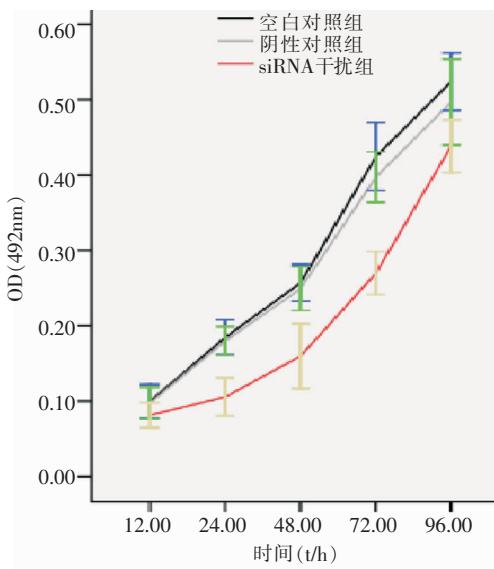
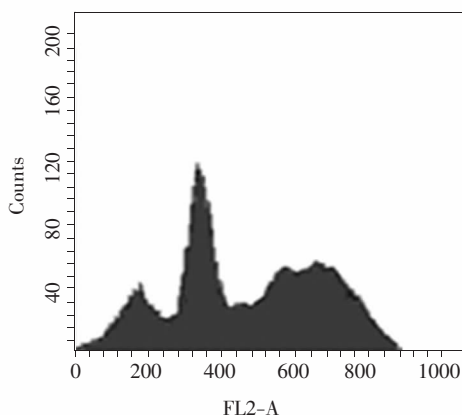
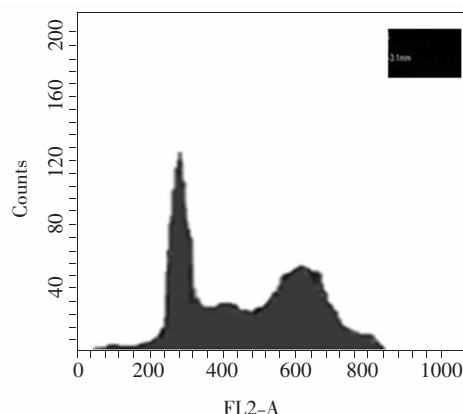
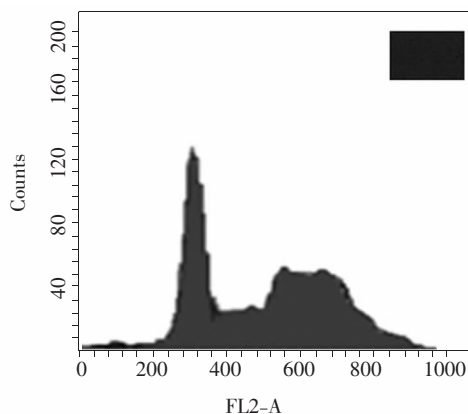


图 2 WISP-2 siRNA 对 U251 细胞生长曲线的影响。

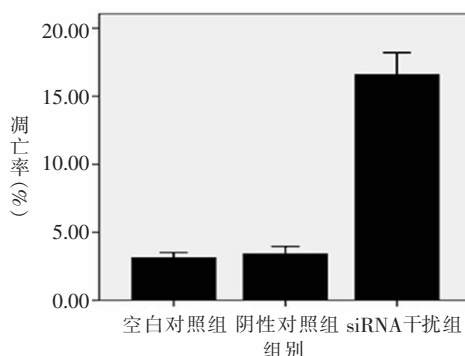
2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡

培养 48 h 后收集细胞经流式细胞仪检测细胞凋亡,结果显示:空白组平均凋亡率为 $(3.13 \pm 0.34) \%$,阴性组平均凋亡率为 $(3.42 \pm 0.48) \%$,siRNA 干扰组平均凋亡率为 $(16.59 \pm 1.40) \%$,统

计分析结果显示 siRNA 干扰组与阴性对照组、空白对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$),阴性对照组与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P = 0.698$,图 3)。



WISP-2 基因沉默对 U251 细胞凋亡的影响



2.3 Western blot 法检测 WISP-2、Bcl-2、Bax 蛋白的表达

siRNA 干扰组 WISP-2 蛋白表达相对水平为 $(18.67 \pm 1.40)\%$, 明显低于空白对照组 $(70.18 \pm 1.82)\%$ 和阴性对照组 $(69.41 \pm 1.77)\%$, 且差异显著 ($P < 0.01$), 空白对照组和阴性对照组 WISP-2 蛋白表达水平比较, 无明显统计学差异 ($P > 0.05$, 图 4)。siRNA 干扰组 Bcl-2 蛋白表达水平为 $(29.67 \pm 1.47)\%$, 明显低于空白对照组 $(49.51$

$\pm 1.71)\%$ 和阴性对照组 $(49.07 \pm 1.35)\%$, 且差异显著 ($P < 0.01$), 空白对照组和阴性对照组 Bcl-2 蛋白表达水平比较, 无明显统计学差异 ($P > 0.05$)。siRNA 干扰组 Bax 蛋白表达水平为 $(31.62 \pm 1.32)\%$, 明显高于空白对照组 $(23.98 \pm 1.47)\%$ 和阴性对照组 $(24.06 \pm 1.55)\%$, 且差异显著 ($P < 0.01$), 空白对照组和阴性对照组 Bax 蛋白水平比较, 无明显统计学差异 ($P > 0.05$)。

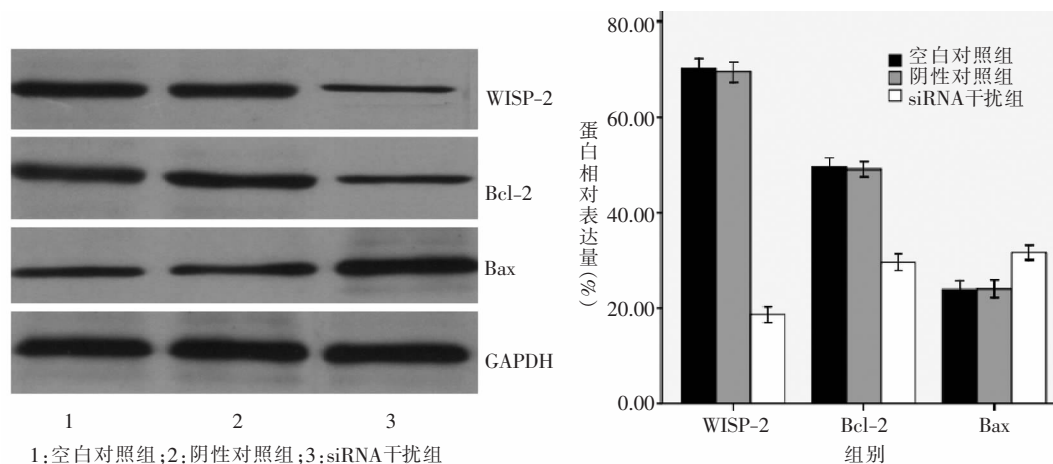


图 4 siRNA 沉默 WISP-2 对 U251 细胞 WISP-2、Bcl-2、Bax 蛋白的影响

3 讨论

CCN 家族包括高半胱氨酸蛋白 61 (cysteine-rich 61, Cyr61)、结缔组织生长因子 (CTGF)、肾母细胞瘤过度表达基因 (NOV)、WISP-1、WISP-2、WISP-3^[3]。CCN 家族间在氨基酸序列上有着高度的同源性和保守性, 同时具有相似的结构模块, 与其他成员相比, WISP-2 在结构上缺少 C 末端结构模块且仅含有 28 个半胱氨酸, 这意味着 WISP-2 可能与其他 CCN 蛋白存在功能上的不同。在不同的肿瘤组织中, WISP-2 的分布及生物学作用不同, WISP-2 正向或负向调节肿瘤的发展^[4]。Saxena 等^[5-6]的研究表明 WISP-2 在 4 种乳腺癌细胞系 (MCF-7、ZR-75、T-47D 和 SKBR2) 中都有高表达, 而在正常乳腺上皮细胞中几乎没有检测到 WISP-2 的表达。WISP-2 在乳腺增生性和乳腺导管原位癌组织中高表达, 而在浸润性乳腺癌中低表达, 在正常乳腺组织中则完全缺乏表达^[7], 这表明 WISP-2 在乳腺癌的发生和发展中起着双向作用。WISP-2 的存在是非浸润乳腺癌细胞增殖雌激素受体所需, 同时, 它

的存在保护原位癌细胞进展成侵袭性癌细胞。Dhar 等^[8]等用定量 PCR 和免疫组化染色法对 7 例胰腺癌患者的癌组织和邻旁正常胰腺组织及 5 例慢性胰腺炎患者的胰腺组织的 WISP-2 mRNA 和蛋白表达水平进行测定, 结果显示在正常胰腺和慢性胰腺炎组织中, WISP-2 mRNA 和蛋白高表达在胰腺导管和腺泡, 而在胰腺癌组织中 WISP-2 mRNA 和蛋白低表达或不表达。

本课题针对 WISP-2 基因设计筛选的 1 对特异 siRNA, 通过脂质体转染 U251 细胞后, 检测 WISP-2 基因沉默对 U251 细胞增殖、凋亡的影响, 并检测干预后 WISP-2、Bcl-2 及 Bax 蛋白的表达水平变化。我们先采用 MTT 法检测 WISP-2 基因沉默后 U251 细胞株的生长活性。我们发现经过 siRNA 抑制 WISP-2 表达后, 随着作用时间的延长, U251 细胞增殖的抑制作用逐渐增强, 呈明显的时效依赖性。绘制生长曲线后分析发现沉默 WISP-2 基因表达后, U251 细胞生长明显减缓, 表明其增殖能力受到抑制。运用流式细胞仪检测经干扰 48 小时后

的 U251 细胞凋亡率,发现细胞凋亡率从空白组平均凋亡率 (3.13 ± 0.34)%, 阴性组平均凋亡率 (3.42 ± 0.48)% 上升到干预组的 (16.59 ± 1.40)%, 提示 WISP-2 基因沉默能够增加诱导 U251 胶质母细胞株的凋亡。通过以上实验我们发现 WISP-2 基因沉默后能够在体外有效的抑制 U251 细胞的增殖、促进其凋亡。为了进一步了解 WISP-2 基因沉默诱导 U251 细胞凋亡的机制,干扰 48 小时后, Western blot 检测 U251 细胞 WISP-2 蛋白的表达,检测凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达情况,结果显示,抗凋亡因子 Bcl-2 表达减少,促凋亡因子 Bax 表达增加, Bcl-2/ Bax 比值下降,由此可以推断凋亡因子 Bcl-2 蛋白表达减少和 Bax 蛋白表达的上调是 WISP-2 蛋白下调后的早期事件,从而改变了 Bcl-2 与 Bax 的比值,使 Bcl-2 与 Bax 之间的平衡被打破, Bax 在结合了 Bcl-2 之后,余下的 Bax 即形成 Bax /Bax 同二聚体,发挥其凋亡作用^[9-10]。WISP-2 siRNA 诱导 U251 细胞发生凋亡可能与其改变凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达,使 Bcl-2/ Bax 比值下降有关。

综上所述, WISP-2 基因沉默能抑制 U251 细胞的增殖, U251 细胞的凋亡增加,并推测 siRNA 沉默 WISP-2 基因诱导 U251 细胞的凋亡通过下调 Bcl-2 蛋白表达,上调 Bax 蛋白的表达来诱导 U251 细胞的凋亡。试验结果在一定程度上证实了 WISP-2 在星形细胞瘤细胞增殖、凋亡中发挥重要作用,同时提示我们是否可以将 WISP-2 作为临床治疗星形细胞瘤的分子靶点,或联合其他药物进行特异性靶向治疗,为星形细胞瘤的治疗开辟新的思路。

参 考 文 献

- [1] Holbourn KP, Acharya KR, Perbal B. The CCN family of proteins: structure-function relationships. *Trends Biochem Sci*, 2008, 33(10): 461-473.
- [2] 唐智,袁贤瑞. WISP-2 在人脑星形细胞瘤中的表达研究. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2010, 37(1): 1-4.
- [3] Inadera H, Shimomura A, Tachibana S. Effect of Wnt-1 inducible signaling pathway protein-2 (WISP-2/CCN5), a downstream protein of Wnt signaling, on adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 379(4): 969-974.
- [4] Colston JT, de la Rosa SD, Koehler M, et al. Wnt-induced secreted protein-1 is a prohypertrophic and profibrotic growth factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293(3): H1839-1846.
- [5] Saxena N, Banerjee S, Sengupta K, et al. Differential expression of WISP-1 and WISP-2 genes in normal and transformed human breast cell lines. *Mol Cell Biochem*, 2001, 228(1-2): 99-104.
- [6] Banerjee SK, Banerjee S. CCN5/WISP-2: A micromanager of breast cancer progression. *J Cell Commun Signal*, 2012, 6(2): 63-71.
- [7] Haque I, Banerjee S, Mehta S, et al. Cysteine-rich 61-connective tissue growth factor-nephroblastoma-overexpressed 5 (CCN5)/Wnt-1-induced signaling protein-2 (WISP-2) regulates microRNA-10b via hypoxia-inducible factor-1 α -TWIST signaling networks in human breast cancer cells. *J Biol Chem*, 2011, 286(50): 43475-43485.
- [8] Dhar G, Mehta S, Banerjee S, et al. Loss of WISP-2/CCN5 signaling in human pancreatic cancer: a potential mechanism for epithelial-mesenchymal-transition. *Cancer Lett*, 2007, 254(1): 63-70.
- [9] Sun SN, Jia WD, Chen H, et al. Docosahexaenoic acid (DHA) induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(2): 281-289.
- [10] Weaver CV, Liu SP. Differentially expressed pro-and anti-apoptogenic genes in response to benzene exposure: Immunohistochemical localization of p53, Bag, Bad, Bax, Bcl-2, and Bcl-w in lung epithelia. *Exp Toxicol Pathol*, 2008, 59(5): 265-272.