

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201606010

· 论著 ·

# RNAi 干扰 Twist 基因对喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞株增殖与侵袭力及 E-钙黏蛋白甲基化的影响

孙志宏<sup>1</sup>, 齐莹<sup>2</sup>

(1. 平顶山市第二人民医院耳鼻咽喉科, 河南 平顶山 467000; 2. 中国医科大学第四医院耳鼻咽喉科, 辽宁沈阳 110032)

**摘要:** **目的** 探讨 RNAi 干扰 Twist 基因对喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞株增殖、侵袭力及 E-钙黏蛋白甲基化的影响。**方法** 培养人喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞株, 分别转染 siRNA-Twist (siRNA-Twist 组)、阳性对照 siRNA-GAPDH (阳性对照组) 和阴性对照错义链 (阴性对照组), 利用实时荧光定量 PCR 技术检测各转染组细胞中 Twist 和 E-cad 基因表达, Western blot 法检测各转染组细胞中 Twist 和 E-cad 蛋白表达, MTT 比色法检测各转染组细胞增殖情况, Transwell 小室检测细胞迁移和侵袭能力, 甲基化特异性聚合酶链式反应 (MSP) 检测不同转染组细胞中 E-cad 甲基化表达。**结果** siRNA-Twist 组细胞中 Twist mRNA 和 Twist 蛋白表达量均低于阳性对照组和阴性对照组, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); siRNA-Twist 组细胞中 E-cad mRNA 和 E-cad 蛋白表达量均高于阳性对照组和阴性对照组, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与阳性对照组和阴性对照组相比, siRNA-Twist 组细胞转染 48 h ~ 96 h 时细胞增殖能力明显减弱, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); siRNA-Twist 组细胞迁移细胞数和侵袭细胞数均低于阳性对照组和阴性对照组, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); MSP 检测结果显示, siRNA-Twist 组细胞中 E-cad 甲基化扩增条带呈弱阳性, 表达强度显著低于阳性对照组和阴性对照组, 而非甲基化扩增条带呈阳性。**结论** 特异性抑制 Twist 基因表达可能通过影响 E-cad 甲基化而上调 E-cad 表达, 从而抑制细胞增殖及侵袭能力, 有望为喉鳞状细胞癌基因治疗提供新的靶点。

**关键词:** 喉鳞状细胞癌; RNAi 干扰; Twist 基因; 侵袭力

中图分类号: R739.65 文献标识码: A 文章编号: 1007-1520(2016)06-0467-05

## Effects of Twist gene silenced by RNAi interference on proliferation, invasiveness and methylation of E-cadherin in laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 cells

SUN Zhi-hong, QI Ying

(Department of Otolaryngology, the Second People's Hospital of Pingdingshan City, Pingdingshan 467000, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects of Twist gene silenced by RNAi interference on proliferation, invasiveness and methylation of E-cadherin in laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 cells. **Methods** Human laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 cell lines were cultured, and then transfected with siRNA-Twist (siRNA-Twist group), positive control siRNA-GAPDH (positive control group) and negative control missense chain (negative control group). The expressions of Twist and E-cad genes in cells of all 3 groups were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The expressions of Twist and E-cad proteins were detected by Western blot. MTT assay and transwell chamber were adopted to examine cell proliferations, cell migration and invasion respectively. The expression of methylation of E-cad was detected by methylation-specific polymerase chain reaction (MSP). **Results** The expressions of Twist mRNA and proteins in siRNA-Twist group were lower than those in the positive control group and negative control group respectively, and the differences were all statistically significant (all  $P < 0.05$ ). The expressions of E-cad mRNA and proteins in siRNA-Twist

基金项目: 辽宁省自然科学基金(2013021008)。

作者简介: 孙志宏, 男, 副主任医师。

通信作者: 孙志宏, Email: 15537591331@163.com

group were higher than those in the positive and negative control groups respectively, the differences were all statistically significant (all  $P < 0.05$ ). The cell proliferation in siRNA-Twist group was significantly reduced after transfected 48 h ~ 96 h, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The migration cells and invasion cells in siRNA-Twist group were lower than those in the positive and negative control groups, the differences were statistically significant (all  $P < 0.05$ ). MSP test results showed that the amplified bands of E-cad methylation in the siRNA-Twist group were weakly positive, its expression intensity was significantly lower than those of the positive and negative control groups, while the unmethylation amplified bands were positive. **Conclusions** Specific inhibition of Twist gene might up-regulate E-cad expression via influencing the methylation of E-cad, thereby inhibit cell proliferation and invasion. It is expected to provide new target for gene therapy of laryngeal squamous cell carcinoma.

**Key words:** Laryngeal squamous cell carcinoma; RNAi interference; Twist gene; Invasiveness

喉鳞状细胞癌作为头颈部常见恶性肿瘤,恶性程度高、侵袭力强,占有恶性肿瘤的2%左右,已成为仅次于肺癌的呼吸道第二位高发恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。随着临床诊疗技术的进步,该病治疗效果得到很大改善,但患者预后仍不佳,远期生存率较低<sup>[2]</sup>。Twist基因是胚胎发育过程中关键性调控因子,在细胞增殖、分化、凋亡、肿瘤发生中发挥重要作用,可通过诱导上皮细胞-间质细胞转化(EMT)而参与肿瘤侵袭过程<sup>[3]</sup>,研究表明<sup>[4]</sup>喉鳞状细胞癌患者组织中Twist蛋白表达上调,且与肿瘤侵袭、转移有关,其促上皮-间质转化作用可能是重要机制。E-钙黏蛋白(E-cadherin, E-cad)作为EMT过程中关键性因子,具有抗肿瘤侵袭转移作用,其表达缺失可诱导EMT发生而促使肿瘤发生转移及复发<sup>[5]</sup>。本研究拟利用RNA干扰技术使Twist基因特异性沉默,探讨其对喉鳞状细胞癌Hep-2细胞株增殖、侵袭力的影响,以及对E-cad蛋白表达的影响及可能的机制,以进一步探明Twist基因在喉鳞状细胞癌中的作用机制,为临床实践提供基础资料。

## 1 资料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

人喉鳞状细胞癌Hep-2细胞株购自中科院上海细胞库,胎牛血清、胰蛋白酶液和RPMI 1640培养液购自杭州四季青生物工程材料有限公司,引物序列及内参、siRNA-Twist、阳性对照siRNA-GAPDH和阴性对照错义链均由上海生工公司设计合成,Trizol总RNA提取试剂盒和LipofectamineTM 2000转染试剂盒购自美国Invitrogen公司,逆转录试剂盒和PCR试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司,兔抗人Twist多克隆抗体、兔抗人E-cad单克隆抗体和山羊抗兔IgG-HRP均购自美国santa crus公司,MTT检测试剂盒购自北京碧云天生物制剂有限公司,Tran-

swell小室购自北京乐博生物科技有限公司,细胞基因组提取试剂盒购自天根生化科技公司,EZ DNA甲基化全套试剂盒购自美国Zymo Research公司,实时荧光定量PCR仪购自美国ABI公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养与转染处理 Hep-2细胞株用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液,于37℃条件下5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱中培养,待细胞生长速度达到80%左右时,用0.25%胰蛋白酶消化传代。于转染前24 h,按 $4 \times 10^4$ 个/孔将细胞接种于24孔板,根据Lipofectamine TM 2000转染试剂盒操作说明分别转染siRNA-Twist(siRNA-Twist组)、阳性对照siRNA-GAPDH(阳性对照组)和阴性对照错义链(阴性对照组),各组细胞转染后培养48 h,收集细胞。

1.2.2 利用实时荧光定量PCR技术检测各转染组细胞中Twist和E-cad基因表达 取转染48h细胞,用细胞裂解液裂解后,利用Trizol总RNA提取试剂盒对总RNA进行提取,用紫外分光光度计对总RNA进行检测,取A260/A280 $\geq 1.80$ 样本完成后续实验。利用逆转录试剂盒获得模板链cDNA,以cDNA为模板用PCR试剂盒完成PCR。Twist及内参引物序列分别为: Twist引物: 上游: 5'-GCCG-GAGACCTAGATGTCAT-3', 下游: 5'-CCTAGAAG-CATTTGCGGTGGA-3'; E-cad引物: 上游: 5'-CTTT-GACGCCGAGAGCTACA-3', 下游: 5'-TTT-GAATCGGGTGTTCGAGGG-3';  $\beta$ -actin引物: 上游: 5'-CTATCGGCAATGAGCGGTTCC-3', 下游: 5'-TGTGTTGGCATAGAGTCTTTACC-3'。PCR反应条件: 94℃ 60 s, 92℃ 30 s, 56℃ 30 s, 74℃ 25 s, 连续循环38次。每个样品均设置3个平行反应复孔。用2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup>法计算Twist和E-cad基因相对表达量。

1.2.3 Western blot法检测各转染组细胞中Twist和E-cad蛋白表达 取转染48 h细胞,裂解后提取细胞中总蛋白,BCA法测定蛋白质浓度。取30  $\mu$ g

蛋白行 SDS-PAGE 电泳后,电转至 PVDF 膜,用无脂奶粉封闭 120 min,将兔抗人 Twist 多克隆抗体(1:500 稀释)一抗加入,室温下孵育 90 min,用 TBST 洗膜 3 次,将山羊抗兔 IgG-HRP(1:2000 稀释)加入,室温下反应 60 min,用 TBST 洗膜 3 次,利用 ECL 化学发光试剂显影。以 GAPDH 为内参,用 Image J 软件分析条带灰度值,获得各转染组细胞中 Twist 和 E-cad 蛋白表达量。

1.2.4 MTT 比色法检测各转染组细胞增殖情况 取转染 48 h 细胞,接种于 96 孔板,  $5 \times 10^4$  个/孔,每组均设 3 个反应复孔,分别于转染 24、48、72 和 96 h,将孔内液体洗出,加入新鲜培养液及 MTT 液,于 37℃ 条件下 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4 h,加入 DMSO,振荡 20 min 后,利用酶标仪测定各转染组细胞 490 nm 波长处吸光度值(A 值)。

1.2.5 Transwell 小室检测细胞侵袭能力 取转染 48 h 细胞,用胰酶消化后,用血清培养液重新制备细胞悬液,用 Matrigel 胶将 Transwell 小室包被,Transwell 小室上室中加入  $2 \times 10^6$  个细胞,下室中加入 600  $\mu$ l 培养基(含 15% 胎牛血清),培养 24 h,取出小室,轻轻擦拭去上室内的细胞,用 PBS 冲洗 3 次,固定,再次用 PBS 冲洗,用结晶紫进行染色后,清水冲洗,用高倍镜进行观察,随机取 5 个视野计数,取均值作为侵袭细胞数,重复进行 3 次实验。

1.2.6 甲基化特异性聚合酶链式反应(MSP)检测不同转染组细胞中 E-cad 甲基化表达 取转染 48 h 细胞,用胰酶消化后,细胞裂解液裂解,室温下静置 60 s,利用细胞基因提取试剂盒对 DNA 进行提取,并用紫外分光光度计对 DNA 纯度进行检测。取 DNA 样品 20  $\mu$ l,按照 EZ DNA 甲基化全套试剂盒说明置于 PCR 仪上对 DNA 进行重亚硫酸盐修饰和纯化,使 DNA 序列上非甲基位点上的胞嘧啶(C)转化为尿嘧啶(U),之后进行甲基化 PCR 扩增。MSP 扩增引物:甲基化:上游:5'-ATTTTAGGTTAGAGGTTATCGC-3',下游:5'-ACAAATACTTTACAATTCGACG-3';非甲基化:上游:5'-TCACAAATACTTTACAATTCGAACA-3',下游:5'-TAATTTTAGGTTAGAGGTTATTGT-3'。反应条件:94℃ 10 min,94℃ 35 s,52℃ 30 s,74℃ 60 s,连续进行 38 次循环。利用凝胶成像系统对结果进行分析。

### 1.3 统计学处理

利用 SPSS 21.0 统计分析软件进行统计学处理,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验,  $P < 0.05$

为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同转染组细胞中 Twist 基因和蛋白表达情况的比较

siRNA-Twist 组细胞中 Twist mRNA 和 Twist 蛋白表达量均低于阳性对照组和阴性对照组,差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ ),详见表 1 和图 1。

表 1 不同转染组细胞中 Twist 基因和蛋白表达情况的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Twist mRNA 相对表达量	Twist 蛋白相对表达量
siRNA-Twist 组	0.49 $\pm$ 0.11 <sup>*#</sup>	0.42 $\pm$ 0.09 <sup>*#</sup>
阳性对照组	0.92 $\pm$ 0.13	0.87 $\pm$ 0.12
阴性对照组	0.91 $\pm$ 0.10	0.85 $\pm$ 0.11
F	49.208	75.978
P	<0.001	<0.001

注:与阴性对照组相比,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与阳性对照组相比,<sup>#</sup> $P < 0.05$

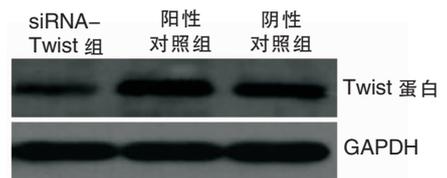


图 1 不同转染组细胞中 Twist 蛋白表达

### 2.2 不同转染组细胞中 E-cad 基因和蛋白表达情况的比较

siRNA-Twist 组细胞中 E-cad mRNA 和 E-cad 蛋白表达量均高于阳性对照组和阴性对照组,差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ ),详见表 2 和图 2。

表 2 不同转染组细胞中 E-cad 基因和蛋白表达情况的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	E-cad mRNA 相对表达量	E-cad 蛋白相对表达量
siRNA-Twist 组	3.94 $\pm$ 1.12 <sup>*#</sup>	0.59 $\pm$ 0.05 <sup>*#</sup>
阳性对照组	1.12 $\pm$ 0.87	0.33 $\pm$ 0.07
阴性对照组	1.09 $\pm$ 0.84	0.31 $\pm$ 0.06
F	53.175	43.681
P	<0.001	<0.001

注:与阴性对照组相比,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与阳性对照组相比,<sup>#</sup> $P < 0.05$

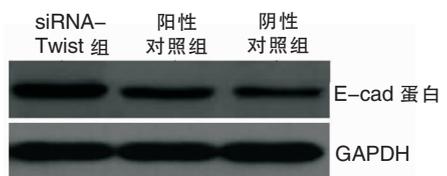


图 2 不同转染组细胞中 E-cad 蛋白表达

## 2.3 不同转染组细胞增殖情况的比较

与阳性对照组和阴性对照组相比, siRNA-Twist 组细胞转染 48 ~ 96 h 时细胞增殖能力明显减弱, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 详见表 3 和图 3。

表 3 不同转染组细胞增殖情况的比较 ( $\bar{x} \pm s, A$  值)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
siRNA-Twist 组	0.17 ± 0.05	0.25 ± 0.04 <sup>**</sup>	0.47 ± 0.09 <sup>**</sup>	0.58 ± 0.12 <sup>**</sup>
阳性对照组	0.16 ± 0.03	0.39 ± 0.07	0.62 ± 0.11	0.91 ± 0.13
阴性对照组	0.18 ± 0.07	0.41 ± 0.08	0.64 ± 0.13	0.94 ± 0.16
<i>F</i>	1.602	57.088	22.467	85.108
<i>P</i>	0.206	0.000	0.000	0.000

注: 与阴性对照组相比, <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ ; 与阳性对照组相比, <sup>#</sup>  $P < 0.05$

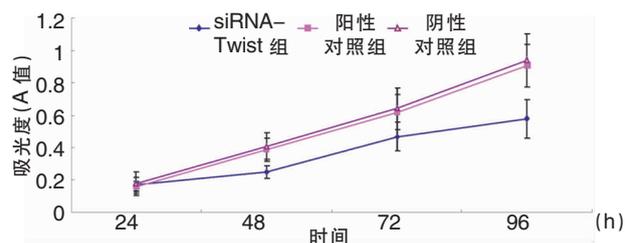


图 3 不同转染组细胞增殖情况

## 2.4 不同转染组细胞侵袭能力情况比较

siRNA-Twist 组侵袭细胞数  $98.5 \pm 11.8$ , 均低于阳性对照组和阴性对照组, 分别为  $134.9 \pm 15.2$  和  $138.1 \pm 17.4$ , 差异均具有统计学意义 ( $F = 83.634$ ,  $P < 0.05$ ), 详见图 4。

## 2.5 不同转染组细胞中 E-cad 甲基化情况比较

MSP 检测结果显示, siRNA-Twist 组细胞中 E-cad 甲基化扩增条带呈弱阳性, 表达强度显著低于阳性对照组和阴性对照组, 而非甲基化扩增条带呈阳性, 表达强度显著高于阳性对照组和阴性对照组, 详见图 5。

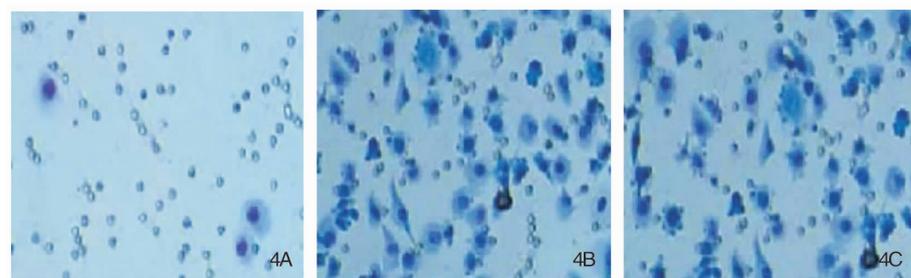


图 4 不同转染组细胞侵袭能力情况比较 (结晶紫  $\times 200$ ) A: siRNA-Twist 组; B: 阳性对照组; C: 阴性对照组

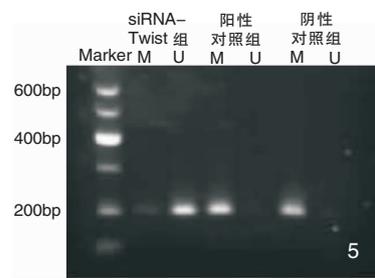


图 5 MSP 检测不同转染组细胞中 E-cad 甲基化表达

## 3 讨论

喉鳞状细胞癌作为喉癌主要病理类型, 约占喉癌的 95%, 恶性程度高、侵袭力强, 易发生侵袭转移, 严重影响患者预后<sup>[6]</sup>。研究表明<sup>[7]</sup>, EMT 与喉鳞状细胞癌侵袭转移密切相关。Twist 基因作为高度保守的转录因子家族成员, 不仅在胚胎发育中发挥重要作用, 而且参与调控细胞增殖、分化和凋亡过程, 是 EMT 过程的关键性调控因子<sup>[8]</sup>。E-cad 作为一种黏附分子, 在维持细胞稳定结构中发挥至关重要的作用, 其表达缺失可激活细胞中 Wnt 通路而诱导 EMT 发生, 是导致多种上皮性癌转移、侵袭及复发的重要机制<sup>[9]</sup>。有研究指出<sup>[10]</sup>, E-cad 蛋白在喉鳞状细胞癌组织中呈低表达。本研究为进一步探讨 Twist 基因对喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞生物学特性及 EMT 过程中关键性因子 E-cad 的影响, 利用 siRNA 技术对 Twist 基因特异性抑制。结果显示, siRNA-Twist 组细胞中 Twist mRNA 和 Twist 蛋白表达量均低于阳性对照组和阴性对照组, 提示喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞中 Twist 基因被特异性抑制。

本研究显示, siRNA-Twist 组细胞转染 48 ~ 96 h 时细胞增殖能力明显减弱, 说明将喉鳞状细胞癌细胞中 Twist 基因特异性沉默, 可抑制细胞增殖, 提示 Twist 基因参与了鳞状细胞癌细胞增殖过程。研究表明<sup>[11]</sup>, 肿瘤侵袭过程与 EMT 密切相关, 而 Twist 参与调控 EMT 发生过程。有研究指出<sup>[12]</sup>, Twist 基因过表达显著增强细胞侵袭能力。本研究显示, siRNA-Twist 组细胞侵袭细胞数均低于阳性对照组和阴性对照组, 说明特异性抑制 Twist 基因表达, 可有效抑制喉鳞状细胞侵袭能力。进一步对 EMT 过程中的关键性因子 E-cad 分析发现, siRNA-Twist 组

细胞中 E-cad mRNA 和 E-cad 蛋白表达量均高于阳性对照组和阴性对照组,说明 Twist 基因被特异性抑制后,E-cad 表达被激活,而高表达 E-cad 可通过抑制 EMT 过程而具有抗肿瘤细胞侵袭、转移作用。研究表明<sup>[13]</sup>,E-cad 基因启动子区 CpG 岛区异常甲基化与多种恶性肿瘤中 E-cad 表达缺失有关。本研究利用 MSP 检测不同转染组细胞中 E-cad 甲基化表达,结果显示,siRNA-Twist 组细胞中 E-cad 甲基化扩增条带呈弱阳性,表达强度显著低于阳性对照组和阴性对照组,而非甲基化扩增条带呈阳性,说明随着 Twist 表达下调,E-cad 基因启动子区完全甲基化程度亦显著减弱,且出现部分逆转为非甲基化。因此,我们推测 Twist 基因沉默在一定程度上可逆转 E-cad 高甲基化状态,从而使 E-cad 表达增加。程庆峰研究指出<sup>[14]</sup>,在颈静脉球体瘤多种凋亡相关基因启动子中存在甲基化,且 DNA 甲基化是可逆转的,可为肿瘤靶向治疗提供有效靶点。

综上所述,特异性抑制 Twist 基因表达可能通过影响 E-cad 甲基化而上调 E-cad 表达,从而抑制细胞增殖能力,显著减弱细胞侵袭能力,但对于甲基化调控 E-cad 的机制尚待进一步研究表明,有望为喉鳞状细胞癌基因治疗提供新的靶点。

#### 参考文献:

- [1] 周芑,邓世山,刘海. USP7 在喉癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2015, 21(1):27-30.
- [2] Zhu G, Liu L, She L, et al. Elevated expression of histone demethylase PHF8 associates with adverse prognosis in patients of laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma[J]. Epigenomics, 2015, 7(2):143-153.
- [3] Le NA. Lipoprotein-associated oxidative stress: a new twist to the postprandial hypothesis[J]. Int J Mol Sci, 2014, 16(1):401-

419.

- [4] 平金良,顾栋桦,徐炜,等. 喉鳞状细胞癌组织 Twist 表达与上皮-间质转化相关性分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 22(18):1451-1455.
- [5] Hu QP, Kuang JY, Yang QK, et al. Beyond a tumor suppressor: Soluble E-cadherin promotes the progression of cancer[J]. Int J Cancer, 2016, 138(12):2804-2812.
- [6] 凌航,廖前进,钟外生,等. p53、p73 与生存素及 caspase-7 蛋白酶在喉癌组织中的表达及临床意义[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2015, 21(6):447-452.
- [7] Yu C, Liu Y, Tan H, et al. Metadherin regulates metastasis of squamous cell carcinoma of the head and neck via AKT signalling pathway-mediated epithelial-mesenchymal transition[J]. Cancer Lett, 2014, 343(2):258-267.
- [8] Liu L, Huang Y, Chen Y, et al. Orbital angular moment of an electromagnetic Gaussian Schell-model beam with a twist phase[J]. Opt Express, 2015, 23(23):30283-30296.
- [9] 杨年婷,刘超,李果,等. MiR-324-3p 经上皮-间质转化调控鼻咽癌迁移侵袭的实验分析[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2016, 22(2):95-99.
- [10] Paksoy M, Hardal U, Caglar C. Expression of cathepsin D and E-cadherin in primary laryngeal cancers correlation with neck lymph node involvement[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(9):1371-1377.
- [11] 张文静,邓文彬,秦鑫. 转录因子调控 EMT 参与肿瘤侵袭和转移[J]. 基础医学与临床, 2016, 36(2):272-276.
- [12] 尉春艳,张熙,孙学军,等. 重组质粒 pEGFP-N1-Twist 对 SK-OV3 细胞增殖、侵袭及迁移能力的影响[J]. 山西医科大学学报, 2014, 45(8):695-698, 785.
- [13] Wu X, Zhuang YX, Hong CQ, et al. Clinical importance and therapeutic implication of E-cadherin gene methylation in human ovarian cancer[J]. Med Oncol, 2014, 31(8):100-107.
- [14] 陈庆峰,李熙焯,朱伟栋,等. 颈静脉球体瘤中多种凋亡相关基因启动子甲基化状态及意义分析[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2016, 22(2):91-94.

(收稿日期:2016-06-12)