



group and negative control group ( $P < 0.01$ ). There was no significant difference of SCD-1 mRNA expression, apoptosis rate and cell cycle of HepG2 cell between blank control group and negative control group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** siRNA can inhibit the cell proliferation and promote apoptosis of HepG2 cell by down-regulating the SCD-1 RNA in HepG2 cell.

**Key words:** stearyl-CoA desaturase-1; human hepatocellular carcinoma HepG2 cells; small interfering RNA

原发性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是我国恶性肿瘤第 2 大死因<sup>[1]</sup>。针对 HCC 的发生、侵袭、转移,寻找适当靶基因有针对地进行靶向治疗正成为目前研究的热点。小分子干扰 RNA (short interfering RNA, siRNA) 是目前医学上用来研究基因功能和基因治疗最具潜力的工具之一<sup>[2-3]</sup>。硬脂酰辅酶 A 去饱和酶-1 (stearyl-CoA desaturase-1, SCD-1) 在多种肿瘤组织中过度表达,在肿瘤脂质代谢过程中起重要作用,与多种恶性肿瘤的发生、发展及预后密切相关<sup>[4]</sup>。本研究通过体外脂质体将 SCD-1 siRNA 转染肝癌细胞,研究 SCD-1 对肝癌细胞增殖和凋亡的影响,为肝癌治疗寻找新的靶点。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞株** 人肝癌细胞系 HepG2 细胞购自中国典型培养物保藏中心,  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

**1.2 主要试剂及仪器** 达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)、胰蛋白酶和胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 均购自美国 Gibco 公司; SCD-1 siRNA 和对照 siRNA 均购自美国 Santa Cruz 公司; 总 RNA 提取试剂 (total RNA isolation reagent, TRIzol)、反转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒购自宝生物工程 (大连) 有限公司; Annexin V 凋亡检测试剂盒购自美国 Biovision 公司。细胞培养箱 (美国 Sheldon 公司); DA7600 型实时荧光定量 PCR 仪 (中山大学达安股份有限公司); Anthos 2010 型 Biorad450 酶标仪 (英国 Biochrom 公司); 流式细胞仪 (美国 Beckman-Coulter 公司)。

**1.3 细胞培养及分组、转染** HepG2 细胞复苏后置于含体积分数 10% FBS 的 DMEM 中培养,当细胞传代到细胞状态稳定后,以每孔  $1 \times 10^6$  个细胞接种于 6 孔培养板,待细胞长至 90% 融合时,将 HepG2 细胞分为 3 组,即空白对照组、阴性对照组和 SCD-1 siRNA 组,空白对照组未做任何处理,阴性对照组采用脂质体介导法将对照 siRNA 转染至 HepG2 细胞,SCD-1 siRNA 组采用脂质体介导法将 SCD-1 siRNA 转染至 HepG2 细胞,操作严格按照说明书进行。

**1.4 RT-PCR 检测 SCD-1 mRNA** 收集转染 48 h 后的 3 组 HepG2 细胞,采取 TRIzol 一步提取法提取细胞总 RNA,反转录成 cDNA。SCD-1 上游引物: 5'-

GCAGGACGATATCTCTAGCT-3', 下游引物: 5'-GTCTCCAACCTTATCTCCTCCATTC-3'。反应条件:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  15 s,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 s,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s, 45 个循环。用比较阈值法来测定目的基因的相对表达量。

**1.5 细胞生长曲线检测** 收集转染 48 h 后的 3 组 HepG2 细胞,用含体积分数 10% FBS 的 DMEM 培养液配成单细胞悬液,以每孔 2 000 个细胞接种于 96 孔培养板,每孔体积 200  $\mu\text{L}$ ,培养 1 d 后细胞达到 80% 融合度。不同时间 (4、24、48、72 h) 移弃细胞培养液,每孔加入 10  $\mu\text{L}$   $5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的噻唑蓝溶液和 90  $\mu\text{L}$  新鲜培养液,继续孵育 4 h,终止培养,加入 100  $\mu\text{L}$  二甲基亚砷,轻轻振荡 10 min,使结晶物充分溶解。酶联免疫检测仪 (450 nm) 上测定各孔吸光度值 ( $A$ ),以空白对照组调零,实验重复 3 次,以时间为横轴,  $A$  为纵轴绘制细胞生长曲线。

**1.6 流式细胞术检测凋亡** 收集转染 48 h 后的 3 组 HepG2 细胞,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  预冷的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 洗细胞 2 次, 250  $\mu\text{L}$   $1 \times$  缓冲液重悬细胞制备成单细胞悬液,调节浓度为  $1 \times 10^6\text{ L}^{-1}$ 。取 500  $\mu\text{L}$  细胞悬液置于流式管中,加入 5  $\mu\text{L}$  异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白-V 和 10  $\mu\text{L}$  碘化丙啶,混匀后室温避光孵育 15 min,加入 400  $\mu\text{L}$  的 PBS,按照试剂盒说明书方法上机检测。

**1.7 细胞周期分析** 收集转染 48 h 后的 3 组 HepG2 细胞,每组细胞数为  $1 \times 10^6$  个,  $1\text{ }000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, PBS 漂洗细胞 3 次,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  体积分数 70% 预冷乙醇固定 30 min,预冷 PBS 漂洗 3 次,  $1\text{ }000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,重悬细胞于含 1 mL 碘化丙啶的 PBS 溶液中,避光孵育 30 min,上机检测, Modifit 软件分析细胞周期。

**1.8 统计学处理** 应用 SPSS 17.0 软件进行分析,计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,各组样本均数比较采用单因素方差分析。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组 HepG2 细胞 SCD-1 mRNA 表达比较

空白对照组、阴性对照组、SCD-1 siRNA 组的 SCD-1 mRNA 表达分别为  $0.95 \pm 0.09$ 、 $0.93 \pm 0.08$ 、 $0.47 \pm 0.04$ , SCD-1 siRNA 组的 SCD-1 mRNA 表达明显低于空白对照组和阴性对照组,差异有统计学意义

( $P < 0.01$ );空白对照组与阴性对照组 SCD-1 mRNA 表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**2.2 各组 HepG2 细胞增殖情况比较** 结果见表 1。在 24、48、72 h 时间点,SCD-1 siRNA 组 HepG2 细胞增殖较空白对照组和阴性对照组均显著减慢( $P < 0.01$ );而阴性对照组与空白对照组比较 HepG2 细胞增殖差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 1 空白对照组、阴性对照组及 SCD-1 siRNA 组 HepG2 细胞增殖情况比较

Tab. 1 Comparison of HepG2 cell proliferation among blank control group,negative control group and SCD-1 siRNA group				
	$(\bar{x} \pm s)$			
组别	4 h	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0.41±0.05	0.90±0.08	1.75±0.10	2.63±0.14
阴性对照组	0.41±0.05	0.86±0.08	1.66±0.10	2.52±0.13
SCD-1 siRNA 组	0.42±0.05	0.69±0.06 <sup>a</sup>	1.02±0.07 <sup>a</sup>	1.45±0.08 <sup>a</sup>

注:与空白对照级和阴性对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.01$ 。

**2.3 各组 HepG2 细胞凋亡情况比较** 空白对照组、阴性对照组、SCD-1 siRNA 组 HepG2 细胞凋亡率分别为(6.5±1.8)%、(6.9±1.9)%、(21.3±2.9)%,空白对照组与阴性对照组 HepG2 细胞凋亡率差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),SCD-1 siRNA 组 HepG2 细胞凋亡率明显高于空白对照组和阴性对照组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

**2.4 各组 HepG2 细胞周期情况比较** 结果见表 2。SCD-1 siRNA 组 HepG2 细胞在合成前期( $G_0/G_1$  期)细胞比例明显高于空白对照组和阴性对照组,在合成期(S 期)和合成后期( $G_2/M$  期)细胞比例均明显低于空白对照组和阴性对照组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。阴性对照组与空白对照组 HepG2 细胞在合成前期( $G_0/G_1$  期)、合成期(S 期)、合成后期( $G_2/M$  期)相比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 2 空白对照组、阴性对照组、SCD-1 siRNA 组 HepG2 细胞周期情况比较

Tab.2 Comparison of HepG2 cell cell cycle among blank control group,negative control group and SCD-1 siRNA group				
	$(\bar{x} \pm s)$			
组别	$G_0/G_1$ 期/%	S 期/%	$G_2/M$ 期/%	
空白对照组	40.91±2.15	33.97±1.89	25.12±1.41	
阴性对照组	41.53±2.32	33.01±1.90	25.46±1.43	
SCD-1 siRNA 组	62.41±3.17 <sup>a</sup>	24.15±1.54 <sup>a</sup>	13.44±1.22 <sup>a</sup>	

注:与空白对照组和阴性对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.01$ 。

3 讨论

HCC 是一种早期即发生转移的恶性肿瘤,手术、化学治疗、介入治疗在肝癌复发或转移中的治疗作用有限。新兴的 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术在肿瘤基因治疗方面具有较好的应用前景<sup>[5]</sup>。RNAi 是利用碱基互补原理,通过导入双链

RNA(double-stranded RNA, dsRNA)阻断同源基因的表达促使其 mRNA 降解,从而诱导该细胞目的基因功能丧失或出现特定基因缺失的表型,具有高效性与高特异性等特点<sup>[6-8]</sup>。siRNA 伴随 RNAi 现象被发现,并被认为是 RNAi 的主要效应物<sup>[9]</sup>,dsRNA 分子在细胞质中经 Dicer 酶复合体切割为 21~23 个核苷酸的小片段,即形成 siRNA。siRNA 在解旋酶作用下分解为 2 条单链,由反义链与核酸内切酶、外切酶、解旋酶等结合形成 RNA 诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)。单链 siRNA 在 RISC 中与同源基因 mRNA 通过碱基配对结合,并降解此 mRNA 或抑制其翻译,从而实现基因转录后表达调控。基于 siRNA 的 RNAi 是生物自身及外来遗传物质参与基因表达调控的共同途径,因此,在对各种肿瘤基因治疗的探索研究中,siRNA 的重要性日益显著<sup>[10]</sup>。

能量代谢的调控对于肿瘤细胞的增殖、死亡和衰老至关重要,特别是脂质代谢、膜脂的合成是肿瘤细胞增殖调控的关键因素,与肿瘤的发生发展关系密切<sup>[11]</sup>。研究显示 SCD-1 是催化单不饱和脂肪酸形成的关键限速酶<sup>[12]</sup>,与肝脏的脂质能量代谢密切相关<sup>[13]</sup>。而 SCD-1 所参与的新生脂肪合成则与肝癌发生发展及预后有关<sup>[14]</sup>。同时另有研究显示 SCD-1 在肾透明细胞癌、肺癌、乳腺癌、膀胱肿瘤等多种肿瘤中高表达<sup>[15-18]</sup>,而抑制 SCD-1 的表达能抑制肿瘤细胞的增殖和存活,促进其凋亡<sup>[19]</sup>。

本实验结果显示,用 siRNA 下调人肝癌细胞 HepG2 细胞株中 SCD-1 基因表达,可以显著降低肝癌细胞的增殖能力;细胞周期检测结果提示 SCD-1 表达下调后,更多细胞阻滞在  $G_0/G_1$  期,处于增殖旺盛期的细胞比例明显减少;同时,随着 SCD-1 表达下降,肝癌细胞凋亡率明显增加,说明 SCD-1 在肝癌细胞的增殖和凋亡过程中起重要作用。进一步研究 SCD-1 在肝癌发生、发展中的分子学机制有望为肝癌的分子靶向治疗提供新的理论依据。

参考文献:

[1] 戴小珍,熊新,王兰,等. CXCR7-shRNA 慢病毒载体对人肝癌细胞生长及侵袭能力的抑制作用[J]. 南方医科大学学报, 2013,33(7):994-998.

[2] Shibata M A,Shibata E,Morimoto J,et al. Therapy with siRNA for Vegf-c but not for Vegf-d suppresses wide-spectrum organ metastasis in an immunocompetent xenograft model of metastatic mammary cancer[J]. *Anticancer Res*,2013,33(10):4237-4247.

[3] 杨文巍,韩波,王介忠,等. CD40 siRNA 对实验性自身免疫性心肌炎大鼠 Th17 细胞及其细胞因子白细胞介素-17 与白细胞介素-23 的作用[J]. 中华实用儿科临床杂志,2013,28(19):1498-1501.

积可引起神经元膜脂质的过氧化,导致膜功能受损,引发  $\text{Ca}^{2+}$  内流,以致细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  超载,损伤细胞器,引发细胞毒性反应,从而产生更多的活性氧自由基,造成细胞损伤。 $\text{A}\beta$  的聚集可损伤机体内多种抗氧化酶功能,导致机体抗氧化能力下降,加重氧化应激反应造成的损伤。

动物实验表明,运动通过减少 tau 蛋白的磷酸化,从而减少 AD 模型动物大脑中高磷酸化 tau 蛋白的积累,促进脑内源性神经因子产生,减低脑自由基水平,改善脑血流,改变免疫反应和炎症反应<sup>[9]</sup>等多种因素,减少 AD 的发生。本实验模型对照组小鼠  $\text{A}\beta$  的表达明显高于正常对照组,通过运动干预后,大脑皮层及海马 CA1 神经元  $\text{A}\beta$  表达下降,小鼠学习记忆能力提高,提示适量运动可以抑制脑组织  $\text{A}\beta$  的表达,进而提高学习记忆能力。通过水迷宫实验,观察到模型对照组小鼠表现出了较低的空间记忆能力,而运动干预组小鼠空间构象的学习认知能力得到提高,提示运动能够有效改善 AD 小鼠模型的认知缺陷。总之,运动可以有效改善 AD 患者的认知能力。

参考文献:

[1] 王华丽,于欣. 中国阿尔兹海默病的流行病学现状[J]. 中华全科医师杂志,2006,6(6):355-360.

[2] Khairallah M I,Kassern L A. Alzheimer's disease;current status of

(上接第 3 页)

[4] Byberg L,Kilander L,Warensjö Lemming E,et al. Cancer death is related to high palmitoleic acid in serum and to polymorphisms in the SCD-1 gene in healthy Swedish men[J]. *Am J Clin Nutr*, 2014,99(3):551-558.

[5] Amberkar S,Kiani N A,Bartenschlager R,et al. High-throughput RNA interference screens integrative analysis:Towards a comprehensive understanding of the virus-host interplay[J]. *World J Vir-*

[6] 秦瑞英,华彩虹,朱丽红. 小分子干扰 RNA 下调星形细胞上调基因 1 的表达对卵巢癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 新乡医学院学报,2014,31(7):524-527.

[7] 刘彬,黄佳城,周迎春,等. 慢病毒介导 LOX-1 基因 RNA 干扰抑制氧化应激诱导心肌细胞凋亡[J]. 南方医科大学学报, 2012,32(2):165-172.

[8] 董敏,康刚劲. 后发性白内障基因治疗的研究进展[J]. 眼科新进展,2013,33(10):997-1000.

[9] 席文群,成洪波,张国明,等. 慢病毒介导的 RNA 干扰技术在滤过术后抗瘢痕的研究[J]. 眼科新进展,2013,33(5):489-492.

[10] Kanasty R,Dorkin J R,Vegas A,et al. Delivery materials for siRNA therapeutics[J]. *Nat Mater*,2013,12(11):967-977.

[11] Igal R A. Stearoyl-CoA desaturase-1:a novel key player in the mechanisms of cell proliferation,programmed cell death and transformation to cancer[J]. *Carcinogenesis*,2010,31(9):1509-1515.

[12] Liu J,Cinar R,Xiong K,et al. Monounsaturated fatty acids generated via stearoyl CoA desaturase-1 are endogenous inhibitors of fatty acid amide hydrolase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2013,

etiopathogenesis and therapeutic strategies[J]. *Park J Biol Sci*, 2011,14(4):257-272.

[3] De Bruijn R F,Schrijvers E M,De Groot K A,et al. The association between physical activity and dementia in an elderly population the Rotterdam Study[J]. *Eur J Epidemiol*,2013,28(3):277-283.

[4] Launer L J,Andersen K,Dewey M E,et al. Rates and risk factors for dementia and Alzheimer's disease: results from EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group and Work Groups. European Studies of Dementia[J]. *Neurology*, 1999, 52(1):78-84.

[5] Sutherland G T,Chami B,Youssef P,et al. Oxidative stress in Alzheimer's disease:Primary villain or physiological by-product[J]. *Redox Report*,2013,18(4):134-141.

[6] Raukas M,Rebane R,MahlpuuR,et al. Mitochondrial oxidative stress index,activity of redox-sensitive aconitase and effects of endogenous anti-and pro-oxidants on its activity in control,Alzheimer's disease and Swedish Familial Alzheimer's disease brain[J]. *Free Radic Res*,2012,46(12):1490-1495.

[7] Leem Y H,Lim H J,Shim S B,et al. Repression of tau hyperphosphory by choronic endurance exercise in aged transgenic mouse model of tauopathies[J]. *Neurosci Res*,2009,87(11):2561-2570.

[8] Di Bona D,Scapagnini G,Candore G,et al. Immune-in-flammatory responses and oxidative stress in Alzheimer's disease;therapeutic implications[J]. *Curr Pharm Des*,2010,16(6):684-691.

[9] Lu C,Guo Y,Yan J,et al. Design,synthesis,and evaluation of multitarget-directed resveratrol derivatives for the treatment of Alzheimer's disease[J]. *J Med Chem*,2013,56(14):5843-5859.

( 本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)

110(47):18832-18837.

[13] Sampath H,Ntambi J M. The role of stearoyl-CoA desaturase in obesity, insulin resistance, and inflammation[J]. *Ann N Y Acad Sci*,2011,1243:47-53.

[14] Calvisi D F,Wang C,Ho C,et al. Increased lipogenesis,induced by AKT-mTORC1-RPS6 signaling,promotes development of human hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(3):1071-1083.

[15] von Roemeling C A,Marlow L A,Wei J J,et al. Stearoyl-CoA desaturase 1 is a novel molecular therapeutic target for clear cell renal cell carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(9):2368-2380.

[16] Nashed M,Chisholm J W,Igal R A. Stearoyl-CoA desaturase activity modulates the activation of epidermal growth factor receptor in human lung cancer cells[J]. *Exp Biol Med(Maywood)*, 2012, 237(9):1007-1017.

[17] Holder A M,Gonzalez-Angulo A M,Chen H,et al. High stearoyl-CoA desaturase 1 expression is associated with shorter survival in breast cancer patients [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 137(1):319-327.

[18] Du X,Wang Q R,Chan E,et al. FGFR3 stimulates stearoyl CoA desaturase 1 activity to promote bladder tumor growth[J]. *Cancer Res*,2012,72(22):5843-5855.

[19] Leung J Y,Kim W Y. Stearoyl-CoA desaturase 1 as a ccRCC therapeutic target: death by stress [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(12):3111-3113.

( 本文编辑:李胜利 英文编辑:王 燕)