

The Effects of RNA Interference Targeting ID-1 on the Growth of Hepatocellular Carcinoma Xenografts in Nude Mice

Chunkang Su¹, Fuli Su¹, Hongyu Zheng¹, Jiandan Zhang¹, Enjie Hu¹, Jiajian Ye², Quanming Wu³

¹Yongding Hospital in Fujian, Longyan

²Fujian Geriatric Hospital, Fuzhou

³Fujian Center for Clinical Laboratory, Fuzhou

Email: suchunkang@126.com

Received: Sep. 10th, 2013; revised: Sep. 20th, 2013; accepted: Oct. 9th, 2013

Copyright © 2013 Chunkang Su et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: Objective: To investigate the inhibition effects of RNA interference targeting ID-1 (si-RNA-ID-1) on the growth of Hepatocellular Carcinoma (HCC) in nude mice and the potential mechanism of ID-1 in the development of HCC. **Methods:** HCC xenografts were developed by injecting HepG2 cells into BALB/C-nu nude mice. The tumor-bearing mice were randomly divided into 3 groups, including blank control group, control-siRNA group and siRNA-ID-1 group. Each group was treated by isovolumetric normal saline, control-siRNA or siRNA-ID-1 on day 1, 4, 7, 10 and 13, respectively. The growth curves of HCC xenografts were made by the tumor sizes, which were measured per week. The nude mice were executed on day 28. The tumor tissue was prepared for the HE staining. **Results:** The tumor sizes in siRNA-ID-1 group were significantly smaller than that in control groups ($P < 0.05$). The apoptotic cells observed in siRNA-ID-1 group were increased in HE slides. **Conclusions:** The growth of HCC xenografts could be inhibited by si-RNA-ID-1 injection. Both proliferation inhibition and apoptosis induction play important roles in this progress. The results implied that ID-1 might be a potential target for the therapeutic strategy of HCC.

Keywords: RNA Interference; ID-1; Hepatocellular Carcinoma; Transfection; Inhibition Tumor

SiRNA-ID-1 对人肝癌细胞 HepG₂ 裸鼠皮下移植瘤生长的影响

苏春康¹, 苏富丽¹, 郑洪裕¹, 张建丹¹, 胡恩杰¹, 叶加建², 吴泉明³

¹福建省永定县医院, 龙岩

²福建省老年医院, 福州

³福建省临床检验中心, 福州

Email: suchunkang@126.com

收稿日期: 2013年9月10日; 修回日期: 2013年9月20日; 录用日期: 2013年10月9日

摘要: 目的: 观察以 RNA 干扰技术沉默 ID-1 表达对人肝癌细胞 HepG₂ 裸鼠皮下移植瘤生长的抑制作用, 探讨抑制 ID-1 表达对肝癌可能存在的抑癌作用。 **方法:** 向 BALB/C-nu 系雄性裸鼠皮下注射 HepG₂ 细胞建立裸鼠荷瘤模型, 成瘤后随机将裸鼠分为空白组、转染对照组和 siRNA-ID-1 处理组, 在第 1、4、7、10 和 13 d 分别注射等量的生理盐水、control-siRNA 和甲基化的 siRNA-ID-1。每周测量肿瘤体积, 绘制肿瘤生长曲线。于第 28 d 处死裸鼠, 取肿瘤组织行常规 HE 染色。 **结果:** siRNA-ID-1 处理组裸鼠肿瘤体积较空白组和转染对照组的体积小 ($P < 0.05$); 转染后癌细胞凋亡增多, 空白组及转染对照组瘤细胞排列密集, 细胞界限不清, 生长活跃, 核大深染, 有较多核分裂象。 **结论:** 以 siRNA 技术沉默肝癌移植瘤组织中的 ID-1 表达可抑制肿瘤的生长, ID-1 具有促肿瘤生长作用。

关键词: siRNA; ID-1; 肝癌细胞; 转染; 肿瘤抑制

1. 引言

肝癌(Hepatocellular Carcinoma, HCC)是我国最常见的恶性肿瘤之一, 预后差, 寻找有效的生物学指标对肝癌的早期诊断及防治有重要的意义。而近期研究发现 DNA 结合/分化抑制蛋白-1(inhibitor of differentiation/DNA binding-1, ID-1)在肝癌组织中存在过度表达^[1], 其在促进肝癌发生发展的过程中发挥了广泛的生物学作用。目前尚缺乏利用 RNA 干扰技术沉默 ID-1 表达对人肝癌细胞的抑制作用的研究, 所以本文力求通过观察甲基化的 siRNA-ID-1 对肝癌细胞系 HepG₂ 细胞裸鼠皮下移植瘤增殖的影响并检测相关增殖、凋亡基因和蛋白的表达, 综合分析 ID-1 在 HCC 中的作用机制, 进一步明确 ID-1 基因在促进 HCC 发生发展过程中的可能途径, 为寻找从 mRNA 水平作用 ID-1 靶点, 进而减缓 HCC 生长, 以及降低其恶性生物学行为提供参考。

2. 材料与方法

2.1. 材料

人肝癌细胞株 HepG₂ 细胞(上海科学院细胞中心); 清洁级 BALB/C-nu 系裸鼠, 雄性, 5 周龄, 14~18 克(上海肿瘤动物研究中心, 于福建医科大学实验动物中心 SPF 级饲养合格证书号: SYXK(闽)2008-0001)。

2.2. 主要试剂

RPMI 1640 培养基/FBS/胰酶(Hyclone Co., USA); 青霉素和链霉素(碧云天生物技术研究所, 中国); DMSO (Sigma Co., USA); siRNA-ID-1/试剂 control-siRNA(NControl, 05815)(广州锐博生物公司); 无 RNAase 的 ddH₂O(Gibco Co., USA)。

2.3. 分组

随机将裸鼠分为三组, 每组 5 只, 即空白对照组; 转染对照组; siRNA-ID-1 处理组。

2.4. 方法

2.4.1. HepG₂ 细胞培养

人肝癌细胞株 HepG₂ 细胞复苏后, 常规培养于含

10%FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI1640 培养基, 37°C、5%CO₂ 浓度下, 于恒温培养箱中培养。

2.4.2. 细胞传代

待细胞生长至约 80%融合后传代, 吸去旧培养液, PBS 洗涤 2 遍; 每一培养瓶中加入 0.25%胰蛋白酶-EDTA1mL, 室温消化 2~5 分钟; 倒置显微镜下观察, 当细胞回缩, 细胞间隙增大时, 加入含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基(按每 1 mL 胰酶加入 3 mL 培养基比例)终止消化; 收集细胞悬液于离心管中, 离心 1000 rpm, 5 min, 弃上清, 再向管中加入含 10%FBS 的 RPMI1640 培养液使细胞重新悬浮, 并吹散成单个细胞悬液, 以 10⁵/mL 的细胞密度接种于新培养瓶中。常规 1~2 天换液一次, 3~4 天传代一次。

2.4.3. 裸鼠肝癌模型的建立

取处于对数生长期的 HepG₂ 细胞, 用含 10%FBS 的 RPMI1640 培养液将其轻轻吹打成均匀的细胞悬液, 并将 HepG₂ 细胞浓度调至 5 × 10⁶/mL。安尔碘局部消毒裸鼠皮肤, 于裸鼠右侧腋窝处皮下注射 HepG₂ 细胞悬液 0.2 mL。接种约 5 天, 裸鼠接种部位出现 3 mm~4 mm 的白色硬结, 成瘤率为 100%。

2.4.4. siRNA-ID-1 瘤内给药

试剂配制: 取 20 nmol 的 siRNA-ID-1 及 control-siRNA 冻干粉离心集中至 Ep 管底, 将其溶解于 500 μL 的 Rnase-free 水, 制成终浓度为 40 μM 的贮存液, -20 °C 条件下保存。瘤内给药: 空白对照组, 瘤内注射 100 μL 的生理盐水; 转染对照组, 瘤内注射 100 μL control-siRNA, 给药量为 4 nmol; siRNA-ID-1 处理组, 瘤内注射 100 μL 的 siRNA-ID-1 试剂, 给药量为 4 nmol。以给药第一天算起, 第 1 天, 第 4 天, 第 7 天, 第 10 天, 第 13 天如此按以上给药方案重复 5 次给药。

2.5. 疗效观察

观察动物的一般生长状况, 如精神状况、活动状况、饮食状况等, 同时测量裸鼠体重、皮下肿瘤体积和重量。每周用游标卡尺测量肿瘤最长径及最短径, 体积按如下公式计算: 肿瘤体积(mm³) = 1/2 × A ×

B²(A、B 分别为肿瘤的最大径和最小径)。制作肿瘤体积生长曲线, 观察不同时间 siRNA-ID-1 对肿瘤生长的影响, 抑瘤率(Inhibitory, IR)按如下公式计算: 肿瘤体积抑制率(IR) = (1 - Vt/Vt') × 100%。Vt 和 Vt' 分别代表同一观察时间点 siRNA-ID-1 处理组和空白对照组裸鼠皮下肿瘤的平均体积。取转染 siRNA-ID-1 后对裸鼠抑瘤率最大的周龄, 采用颈椎脱臼法处死裸鼠, 分离肿瘤, 浸入生理盐水漂洗后, 快速切除肿瘤, 检查肿瘤外观、坏死部位, 取部分放入液氮瓶中保存, 供 RT-PCR 及免疫组化检测, 另一部分以 10% 的中性甲醛固定肝癌组织, 24 hrs 后作常规病理检查。

2.6. 统计学处理

采用 SPSS(11.5) (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA)分析。计数资料均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 方差齐性资料各组间采用单因素方差分析(analysis of variance, One-Way ANOVA), 以 $\alpha = 0.05$ 为检验标准, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3. 结果

3.1. 裸鼠肝癌模型的建立

于裸鼠右腋皮下注射人肝癌细胞 HepG₂ 后约 3 天, 可在皮下触到直径约 3 mm~4 mm 肿瘤结节, 致瘤成功率 100%, 成瘤后观察移植瘤生长情况, 测量荷瘤裸鼠的体重及皮下移植瘤的体积和重量。治疗前后, 各组裸鼠存活良好, 无一例出现死亡。见图 1。

3.2. 裸鼠的一般状况

荷瘤裸鼠行动活跃, 饮食饮水正常, 随着种植侧瘤结节逐渐长大, 裸鼠皮下脂肪慢慢消耗, 并出现精神不振, 饮食饮水较前明显减少, 行动稍迟缓; 而 siRNA-ID-1 处理裸鼠后, 种植侧瘤结节较对照组相

比, 生长速度缓慢, 荷瘤裸鼠饮食饮水稍减少, 行动活跃如初。

3.3. 荷瘤裸鼠的体重变化

分别于第 0, 1, 2, 3, 4 w 末, 称量并记录荷瘤裸鼠的体重变化。结果显示, 从 siRNA-ID-1 处理第 2 周起, 处理组荷瘤裸鼠体重增长速度减缓, 与对照组相比肿瘤体重差别有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

3.4. 裸鼠皮下移植瘤的体积

选择治疗前(即 0 w)与治疗结束后的第 1, 2, 3, 4 w 末, 采用颈椎脱臼法处死裸鼠, 测量肿瘤体积, 计算肿瘤体积抑制率。剥离皮肤与肿瘤组织, 称重, 比较各组肿瘤质量。结果显示, 空白对照组及转染对照组皮下肿瘤体积逐渐增大, siRNA-ID-1 处理组皮下肿瘤体积增长速度明显减缓, 从处理 2 周起, 与对照组相比肿瘤体积差别有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

3.5. 裸鼠皮下肿瘤体积抑制率

见表 3。

3.6. 皮下移植瘤的重量

见表 4。



Figure 1. Subcutaneous carcinoma model
图 1. 裸鼠皮下肝癌模型的建立

Table 1. siRNA-ID-1 treated mice in each group of weight ($\bar{x} \pm s, n = 5, g$)

表 1. siRNA-ID-1 处理后各组裸鼠的体重($\bar{x} \pm s, n = 5, g$)

组别	0 w	1 w	2 w	3 w	4 w
空白对照组	19.01 ± 2.80	22.46 ± 2.85	22.97 ± 2.31	25.76 ± 3.56	27.64 ± 2.87
转染对照组	18.96 ± 2.69	21.57 ± 3.55	22.78 ± 2.86	24.91 ± 3.08	26.24 ± 0.80
siRNA-ID-1处理组	19.13 ± 3.06	21.75 ± 3.88	21.94 ± 2.61*	22.24 ± 3.15*	23.46 ± 2.10*

注: siRNA-ID-1 处理前各组荷瘤裸鼠体重无统计学差异($P > 0.05$)。空白对照组与转染对照组相比无统计学差异($P > 0.05$)。*与空白组相比有统计学差异($P < 0.05$)。

Table 2. siRNA-ID-1 nude mice in each group after treatment of tumor volume change ($\bar{x} \pm s$, mm³)
表 2. siRNA-ID-1 处理后各组裸鼠皮下肿瘤的体积变化($\bar{x} \pm s$, mm³)

组别	0 w	1 w	2 w	3 w	4 w
空白组	67.86 ± 19.52	125.81 ± 57.83	701.32 ± 72.15	1601.42 ± 146.08	2526.44 ± 168.91
转染对照组	72.35 ± 20.19	124.78 ± 61.37	698.64 ± 83.21	1598.75 ± 125.52	2591.39 ± 187.62
siRNA-ID-1	69.25 ± 24.38	116.93 ± 63.54	425.45 ± 74.67*	991.27 ± 113.85*	1576.19 ± 133.27*

注: siRNA-ID-1 处理前各组荷瘤裸鼠皮下肿瘤体积无统计学差异($P > 0.05$)。空白对照组与转染对照组相比无统计学差异($P > 0.05$)。治疗第 2 w 起, *与空白组相比有统计学差异($P < 0.05$)。

Table 3. siRNA-ID-1 nude mice after treatment changes in tumor volume inhibition rate (IR, %)
表 3. siRNA-ID-1 处理后裸鼠皮下肿瘤体积抑制率的变化(IR, %)

分组	IR(%)			
	1 w	2 w	3 w	4 w
siRNA-ID-1处理组	7.1	39.3	38.1	37.6

Table 4. siRNA-ID-1 in each group after subcutaneous tumor weight ($\bar{x} \pm s$, g)
表 4. siRNA-ID-1 处理后各组裸鼠皮下肿瘤的重量($\bar{x} \pm s$, g)

组别	0 w	1 w	2 w	3 w	4 w
空白组	2.86 ± 0.52	3.91 ± 0.83	5.32 ± 0.15	7.47 ± 0.48	10.04 ± 0.91
转染对照组	2.55 ± 0.19	3.78 ± 0.37	4.94 ± 0.21	6.98 ± 0.52	9.91 ± 0.62
siRNA-ID-1处理组	2.65 ± 0.38	2.93 ± 0.54	3.45 ± 0.67*	4.97 ± 0.85*	6.68 ± 0.27*

注: siRNA-ID-1 处理前各组荷瘤裸鼠皮下肿瘤重量无统计学差异($P > 0.05$)。空白对照组与转染对照组相比无统计学差异($P > 0.05$)。治疗第 2 w 起, *与空白组相比有统计学差异($P < 0.05$)。

3.7. 皮下肿瘤组织 HE 染色镜检

见图 2。空白对照及转染对照组见肿瘤细胞呈多角形,聚集成团,核大深染,核分裂象较多。siRNA-ID-1 处理组见片状变性坏死,多数胞核完全溶解,细胞结构消失,可见多量凋亡细胞,胞质浓缩,胞核深染固缩,染色体成团块状。周围肿瘤细胞与对照组相比残留较少,可见间质炎性反应增多、淋巴细胞浸润明显。

4. 讨论

HCC 是在国内发病率高,预后差,寻找有效的生物学指标对肝癌的早期诊断及防治有重要的意义。近期 DNA 结合/分化抑制蛋白-1(inhibitor of differentiation/DNA binding-1, ID-1)在肝癌组织中存在过度表达^[1]的发现为促进肝癌的诊治水平提供了新的思路,有研究认为, ID-1 过度表达可影响乙型肝炎相关肝细胞癌的预后,可将其作为一项潜在的恶变风险评估手段^[2]及治疗靶点。

ID 蛋白属于螺旋-环-螺旋(helix-loop-helix, HLH)中的一类,具有 ID-1、ID-2、ID-3 及 ID-4 共 4 个亚型,这类蛋白能够抑制 bHLH 转录因子活性^[3],具备广泛的生物学功能^[4],如抑制细胞分化、促进细胞增殖,其中 ID-1 具有 ID 类蛋白典型的特点和作用。目前的多数研究认为, ID-1 是细胞周期调控和肿瘤血管发生的关键分子,其通过加快细胞周期^[5]、促进血管生成^[5-7]在肿瘤的发生发展过程中扮演了重要角色。我们先前的研究发现, ID-1 在手术切除 HCC 标本的癌旁组织中(病理显示肝硬化组织共 16 例)存在过度表达,提示 ID-1 可能参与了肝癌发生的早期阶段,但其在 HCC 发生早期所起的作用如何尚有待深入研究。

RNA 干扰技术是一种高效的基因沉默手段,外源性小分子双链干扰 RNA 通过介导同源靶基因 mRNA 的特异性降解,导致转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)。小分子干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)是一种双链 RNA 分子,通过设计针对靶基因的特异 siRNA,可有效沉默目标基因,

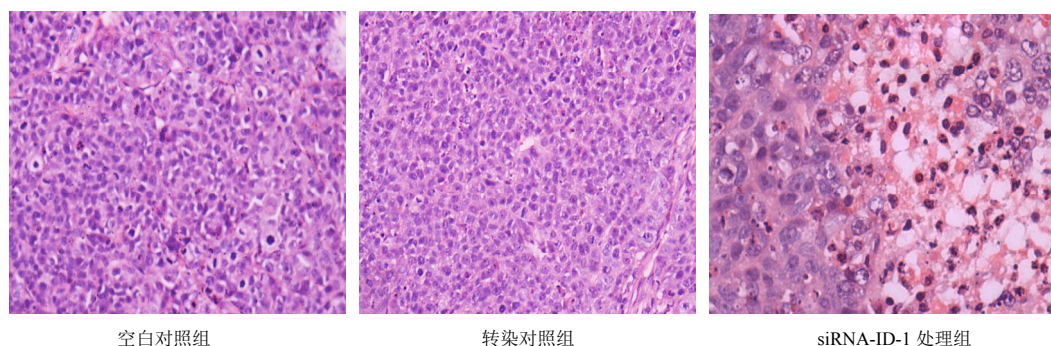


Figure 2. Endoscopic tumor models in each group (100×)
图 2. 各组肿瘤模型镜下表现(100×)

而正常基因不受影响。作为一种简便、特异而又高效特异的抑制靶基因表达的新技术, RNA 干扰技术已被广泛应用于基因功能、遗传规律、生长发育、信号转导及抗肿瘤等多领域的研究^[8], 其中在多种肿瘤治疗研究中取得了明显的效果。

本实验成功构建了裸鼠皮下荷瘤肝癌模型, 肿瘤组织的 HE 染色镜检也证实了这一点。荷瘤裸鼠随着种植侧瘤结节逐渐长大, 裸鼠皮下脂肪慢慢消耗, 并出现精神不振, 饮食饮水较前明显减少, 行动稍迟缓; siRNA-ID-1 处理裸鼠后, 种植侧瘤结节较对照组相比, 生长速度缓慢, 荷瘤裸鼠饮食饮水稍减少, 行动活跃如初; 裸鼠体重增长速度减缓, 与对照组相比肿瘤体积小($P < 0.05$); 肿瘤体积抑制率逐渐增大, 肿瘤组织的重量明显较空白组、转染对照组小($P < 0.05$)。处理组见片状变性坏死, 多数胞核完全溶解, 细胞结构消失, 可见多量凋亡细胞, 胞质浓缩, 胞核深染固缩, 染色体成团块状, 周围肿瘤细胞与对照组相比残留较少, 可见间质炎性反应增多、淋巴细胞浸润明显。

以上现象说明, siRNA-ID-1 处理后能够明显抑制肝癌细胞的生长, 并在第 2 周到达抑制高峰, 由于 siRNA 瞬时转染作用, 随着时间推移, RNAi 作用消失, 皮下肿瘤生长较前相比抑制作用并不明显, 我们认为, siRNA-ID-1 处理前后 HCC 生长的差别与 ID-1 的作用有关, ID-1 参与了肝癌细胞生长过程, 发挥着促癌作用。由于 ID-1 在不同肿瘤细胞中的作用机制不同, 且前期针对食管鳞癌的研究显示, ID-1 并非促进食管鳞癌增殖的主要因素, 那么, HCC 中 ID-1 的作用究竟以促肿瘤细胞增殖为主还是抑制细胞凋亡为主或是二者皆有作用需要进一步进行研究。

已明确 siRNA-ID-1 可通过抑制细胞增殖水平发

挥抑制移植瘤生长的作用, 其是否也参与了 HepG₂ 细胞凋亡的诱导? Cheung 等^[8]通过对鼻咽癌的研究发现, ID-1 能够介导 Raf/MEK 信号途径, 从而抑制细胞凋亡。我们的结果显示, siRNA-ID-1 处理组组织切片有明显的细胞凋亡的特征, 提示抑制细胞凋亡亦是 ID-1 参与 HCC 癌变进展的机制之一。本研究结果支持 siRNA-ID-1 诱导 HCC 细胞凋亡的作用, 其与抑制细胞增殖共同参与了 siRNA-ID-1 对裸鼠皮下移植瘤的抑瘤效应。

ID-1 通过促进肿瘤细胞增殖、抑制凋亡等参与肿瘤生长过程, 在 HCC 发生发展过程中发挥多种潜在的作用。我们认为, ID-1 的过表达可作为 HCC 预后不良的参考指标, 而利用 siRNA-ID-1 沉默 ID-1 基因的靶向治疗可能是一项有效的降低 HCC 恶性生物学行为的预防策略。

参考文献 (References)

- [1] 刘豫瑞, 方明霞, 曾达武. Id-1 在肝细胞癌中的表达及其临床意义[J]. 福建医科大学学报, 2009, 43(1): 32-35.
- [2] R. Ding, S. Han, Y. Lu, C. Guo, H. Xie, N. Zhang, Z. Song, L. Cai, J. Liu and K. Dou. Overexpressed Id-1 is associated with patient prognosis and HBx expression in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Cancer Biology & Therapy*, 2010, 10(3): 105-107.
- [3] Y. C. Wong, X. Wang and M. T. Ling. Id-1 expression and cell survival. *Apoptosis*, 2004, 9(3): 279-289.
- [4] 吴育晶, 金娟, 胡姗姗, 王迪, 张玲玲, 孙妮戈, 魏伟. 儿茶素对人肝癌细胞 HepG₂ 的影响[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(12): 1598-1602.
- [5] Z. Dong, S. Liu, C. Zhou, T. Sumida, H. Hamakawa, Z. Chen, P. Liu and F. Wei. Overexpression of Id-1 is associated with tumor angiogenesis and poor clinical outcome in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 2010, 46(3): 154-157.
- [6] S. Bertin, T. Mohsen-Kanson, P. Baqué, A. Gavelli, D. Momier, F. Anjuere, G. F. Carle and V. Pierrefite-Carle. Tumor microenvironment modifications induced by soluble VEGF receptor expression in a rat liver metastasis model. *Cancer Letters*, 2010,

SiRNA-ID-1 对人肝癌细胞 HepG₂ 裸鼠皮下移植瘤生长的影响

- 298(2): 264-272.
- [7] M. K. Maw, J. Fujimoto and T. Tamaya. Expression of the inhibitor of DNA-binding (ID)-1 protein as an angiogenic mediator in tumour advancement of uterine cervical cancers. *British Journal of Cancer*, 2008, 99(10): 1557-1563.
- [8] R. Zhao, X. Q. Liu, X. P. Wu, Y. F. Liu, Z. Y. Zhang, G. Y. Yang, S. Guo, J. Niu, J. Y. Wang and K. S. Xu. Vascular endothelial growth factor (VEGF) enhances gastric carcinoma invasiveness via integrin alpha(v)beta6. *Cancer Letters*, 2010, 287(2): 150-156.