

siRNA 下调 Mcl-1 后奥沙利铂对人 Y79 细胞凋亡率的影响

周璐¹, 李娜²

作者单位:¹(315026) 中国浙江省宁波市眼科医院药剂科;
²(261000) 中国山东省潍坊市, 潍坊医学院附属医院眼科
作者简介:周璐, 副主任药师, 研究方向:眼科药学。
通讯作者:周璐. zyhnhk@163.com
收稿日期:2017-06-29 修回日期:2017-10-25

Effect of oxaliplatin on the survival rate of human Y79 cells after down-regulation of Mcl-1

Lu Zhou¹, Na Li²

¹Department of Pharmacy, Ningbo Eye Hospital of Zhejiang Province, Ningbo 315026, Zhejiang Province, China; ²Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Weifang Medical University, Weifang 261000, Shandong Province, China

Correspondence to: Lu Zhou. Department of Pharmacy, Ningbo Eye Hospital of Zhejiang Province, Ningbo 315026, Zhejiang Province, China. zyhnhk@163.com

Received:2017-06-29 Accepted:2017-10-25

Abstract

• **AIM:** To study the effect of oxaliplatin on the survival rate of Y79 after down-regulation of Mcl-1 by SiRNA.

• **METHODS:** Y79 cells were cultured in RPMI1640. The cultured cells were stimulated with 0.25 μmol/L of oxaliplatin. The expression of Mcl-1 protein was detected by Western blot after 6, 16 and 24h respectively. Cells in logarithmic phase were collected and used for single-cell suspension. Then they were transfected with empty plasmid, Mcl-1-homo-991, Mcl-1-homo-1114 and Mcl-1-homo-1235. After 6h, fluorescence microscope was used to observe the transfection efficiency and the optimal one was selected. The cells were divided into Group A and transfected with empty plasmids. The cells transfected with Mcl-1 were divided into Group B and Group C. Group A and Group C were treated with 0.25 μmol/L oxaliplatin for stimulating induction, and the apoptotic rate was compared after 24h.

• **RESULTS:** The expression of Mcl-1 in Y79 stimulated by oxaliplatin was the most after 24h of culture. Mcl-1-homo-991 significantly inhibited the expression of Mcl-1 in Y79 after transfection. There was no significant difference in the apoptosis rate in Group A (11.1% ± 1.2%) and in the control group (6.1% ± 0.6%) ($P > 0.05$). The apoptotic rate of Group C (49.2% ± 2.7%) was significantly higher than that of Group B (20.8% ± 1.9%).

At the same time, the apoptotic rates of these two groups were significantly higher than those of Group A and control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** Downregulation of Mcl-1 by siRNA can reduce the drug resistance of Y79, thereby enhancing the apoptosis of Y79, and reducing the survival rate of Y79.

• **KEYWORDS:** retinoblastoma; oxaliplatin; Mcl-1; apoptosis

Citation: Zhou L, Li N. Effect of oxaliplatin on the survival rate of human Y79 cells after down-regulation of Mcl-1. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(12):2226-2228

摘要

目的: 研究 siRNA 下调 Mcl-1 后奥沙利铂对 Y79 凋亡率的影响。

方法: 使用 RPMI1640 培养液培养 Y79 细胞。将培养后的细胞用 0.25 μmol/L 的奥沙利铂进行刺激, 分别在 6、16 和 24h 后, 使用 Western blot 法对 Mcl-1 蛋白的表达效果进行检测。收集对数生长期的细胞, 制备单细胞悬液, 分别转染空质粒和 Mcl-1-homo-991、Mcl-1-homo-1114、Mcl-1-homo-1235 质粒。6h 后使用荧光显微镜拍照, 观察转染效率, 选出最佳的 siRNA 序列。将未进行转染操作的 RB 细胞 Y79 分为 A 组, 将转染空质粒的为对照组, 将行转染下调 Mcl-1 操作后的细胞分为 B 组和 C 组, 其中 A 组和 C 组均采用 0.25 μmol/L 的奥沙利铂进行刺激诱导处理, B 组转染细胞常规培养, 24h 后采用 Annexin V-FITC/PI 双染法和流式细胞术进行检测对比 4 组的细胞凋亡率。

结果: Western blot 检测结果表明处理 Y79 细胞 24h 后 Mcl-1 的表达最为显著, 转染 Mcl-1-homo-991 质粒后能够明显抑制 Y79 细胞中 Mcl-1 的表达, 转染效率最高。采用 Annexin V-FITC/PI 双染法和流式细胞术进行检测 A 组凋亡率 (11.1% ± 1.2%) 与对照组 (6.1% ± 0.6%) 对比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); C 组 Y79 的凋亡率 (49.2% ± 2.7%) 显著高于 B 组 (20.8% ± 1.9%), 同时这两组的凋亡率都显著高于 A 组和对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

结论: 通过 siRNA 下调 Mcl-1 后, 可以降低 Y79 的抗药性, 从而增强奥沙利铂对 Y79 的凋亡, 降低了 Y79 的存活。

关键词: 视网膜母细胞瘤; 奥沙利铂; Mcl-1; 细胞凋亡
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.12.09

引用: 周璐, 李娜. siRNA 下调 Mcl-1 后奥沙利铂对人 Y79 细胞凋亡率的影响. 国际眼科杂志 2017;17(12):2226-2228

0 引言

视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, RB) 是一种目前在儿童群体中较为常见的恶性眼内肿瘤,多发生于 3 岁以下儿童。研究表明 RB 来源于光感受器前体的细胞,其发病因素包括 RB 基因变异和抑癌基因功能丧失等^[1]。RB 在国内眼部恶性肿瘤的发生率中高居首位,统计表明,此病在国内的眼球摘除率较高,而 5a 生存率也低于发达国家水平^[2-3]。化学减容治疗作为一种辅助治疗方法,广泛地应用到此病的治疗中。但随着癌细胞对于化疗药物敏感性的下降,致使其出现多药耐药,导致化疗失败,影响 RB 的治疗效果^[4]。本次研究通过探讨采用 siRNA 转染下调人骨髓细胞白血病蛋白-1 (Myeloid cell leukemia-1, Mcl-1) 后,奥沙利铂对 RB 细胞凋亡率的影响,为该病的临床治疗提供参考,现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 本次研究使用的 RB 细胞 (Y79 细胞株) 购于北京贝纳创联科技公司 ATCC 细胞库。注射用奥沙利铂采购自南京制药厂有限公司,生产批号 02603,规格 50mg×1 瓶/盒。siRNA 购于上海吉玛制药技术有限公司。鼠抗人 β -actin 和兔抗人 Mcl-1 抗体均采购于 Santa Cruz 公司。山羊抗兔 IgG 和羊抗小鼠 IgG 抗体采购自上海倍卓生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Y79 细胞使用 RPMI1640 培养液培养,孵育细胞覆盖达到培养瓶 80% 以上时传代。吸弃旧培养液取生长状态良好的细胞,使用 PBS 缓冲液漂洗一次,加入 1mL 0.25% 胰蛋白酶,放进 5% CO₂、37℃ 的培养箱中消化细胞直至细胞间隙变宽。使用 3mL 无菌巴氏吸管按顺序轻柔吹打细胞,离心,去上清,加入新鲜培养液并置入培养箱中培养。

1.2.2 细胞转染 收集对数生长期的细胞,制备单细胞悬液,按照 4×10⁵/孔的密度接种至 6 孔板中培养 24h 后,除去培养液并将细胞洗涤 1 遍。根据试剂盒操作说明书,按照最佳转染效率的比例进行转染操作^[5],分别转染空质粒和 Mcl-1-homo-991、Mcl-1-homo-1114、Mcl-1-homo-1235 质粒。6h 后使用荧光显微镜拍照,观察转染效率,选出最佳的 siRNA 序列。本研究所使用 siRNA 序列: Mcl-1-homo-991; 5'-GCAGGAUUGUGACUCUACUTT-3'; Mcl-1-homo-1114; 5'-GGGACUGGCUAGUAAAACATT-3'; Mcl-1-homo-1235; 5'-GCUGGUUUGGCAUAUCUAATT-3'。

1.2.3 Western Blot 法检测 Mcl-1 的表达 使用 Western blot 法检测 Mcl-1 蛋白的表达^[6]。收集对数生长期的细胞,根据实验要求处理细胞后,胰蛋白酶消化并收集细胞,加入细胞裂解液,冰浴 30min,离心,取上清液。BCA 法测定蛋白浓度。上样后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳;转膜至 PVDF 膜;封闭液封闭 1h;分别孵育鼠抗人 β -actin 抗体 (1:1000) 和兔抗人 Mcl-1 抗体 (1:500),4℃ 过夜;孵育相应的二抗 (1:2000),室温 1h;使用显色法显色,使用 Bio-Rad 凝胶成像系统获取图像。 β -actin 为内参蛋白。实验重复 3 次。

1.2.4 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法和流式细胞术检测细胞凋亡率^[7]。将待检测细胞置入 10mL 离心管中,1200r/min

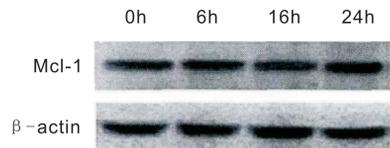


图 1 奥沙利铂对 Y79 细胞中 Mcl-1 表达的影响

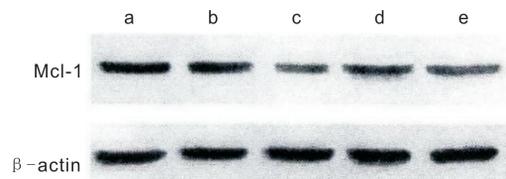


图 2 转染下调 Mcl-1 对 Y79 细胞中 Mcl-1 表达的影响 a: 正常细胞;b: 转染空质粒;c: 转染 Mcl-1-homo-991 质粒;d: 转染 Mcl-1-homo-1114 质粒;e: 转染 Mcl-1-homo-1235 质粒。

离心 10min,去上清,加入 Binding Buffer 500 μ L,重悬细胞后转入 5mL 离心管,加入 Annexin V-FITC 5 μ L 混合均匀,室温孵育 10min,避光,加入 PI 5 μ L,混合均匀,上机检测,激发光波长 488nm。实验重复 3 次。

1.2.5 细胞分组 根据处理条件不同将细胞分为 A、B、C 及对照组,A 组:未转染的细胞,采用 0.25 μ mol/L 奥沙利铂处理 24h;B 组:转染的细胞,常规培养 24h;C 组:转染的细胞,采用 0.25 μ mol/L 奥沙利铂处理 24h;对照组:空质粒转染的细胞,常规培养 24h。

统计学分析:采用 SPSS 20.0 软件作统计学分析,细胞凋亡率用均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,采用方差分析比较,两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P<0.05$ 时表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 奥沙利铂对 Y79 中 Mcl-1 的表达影响 Western blot 检测结果表明,用 0.25 μ mol/L 奥沙利铂分别作用 6、16 和 24h 后,Y79 细胞中 Mcl-1 的表达均升高,且处理 24h 后 Mcl-1 的表达最为显著,见图 1。

2.2 转染下调 Mcl-1 对 Y79 细胞中 Mcl-1 表达的影响 Western blot 检测结果表明,转染 Mcl-1-homo-991 质粒后细胞中 Mcl-1 蛋白表达明显低于其它各组,表明转染 Mcl-1-homo-991 质粒后能够明显抑制 Y79 细胞中 Mcl-1 的表达,转染效率最高,见图 2。

2.3 转染下调 Mcl-1 的表达对 Y79 凋亡率的影响 流式细胞术检测结果发现,四组细胞凋亡率比较差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。A 组细胞凋亡率 (11.1% \pm 1.2%) 与对照组 (6.1% \pm 0.6%) 比较差异无统计学意义 ($t=3.526, P=0.167$);C 组细胞凋亡率 (49.2% \pm 2.7%) 显著高于 B 组 (20.8% \pm 1.9%),差异有统计学意义 ($t=2.361, P=0.022$),同时这两组的凋亡率都显著高于 A 组和对照组,差异有统计学意义 (C 组与 A 组比较: $t=2.653, P=0.013$;C 组与对照组比较: $t=6.537, P=0.032$;B 组与 A 组比较: $t=4.529, P=0.008$;B 组与对照组比较: $t=3.365, P=0.027$)。

3 讨论

肿瘤可以分为良性肿瘤和恶性肿瘤两种,一般是指由于各种因素导致的机体局部组织的某一个细胞出现异常增生而形成的。RB 作为一种恶性肿瘤,其来自于视网

膜的胚胎性核层细胞。RB 不仅是儿童群体中发病率较高的眼内恶性肿瘤,其死亡率也较高,不仅威胁着国内儿童的生命健康,也对许多家庭和社会都带来了沉重的负担^[8-9]。研究表明,肿瘤发生以及发展的一项重要原因,就是肿瘤细胞的增殖和凋亡出现失衡,所以目前临床使用化学方法治疗肿瘤的关键就是,通过抑制肿瘤细胞的增殖并促进肿瘤细胞的凋亡,来达到化疗治疗的目的。但是近年来国内外的一些研究报告指出,在 RB 的临床治疗中,抗肿瘤药物耐受现象的出现,已经成为了晚期患儿治疗失败甚至死亡的主要原因之一^[10-11]。Y79 是世界范围内最先培养成功,也是已经被人类广泛应用的 RB 细胞株,其源自于一名有家族 RB 病史的女性 RB 患儿。siRNA 被称为干扰 RNA 或者沉默 RNA,其主要是参与到 RNA 干扰现象里面,其在导入细胞内后,能够对某一特定基因产生基因敲减效果,是目前在基因功能和药物目标领域中被广泛应用的重要工具^[12]。本次研究通过从细胞凋亡的机制入手,为减少临床治疗 RB 时细胞耐药性的问题提供参考。

奥沙利铂能够通过抑制 DNA 以及信使 RNA 的合成,起到一定的抗肿瘤活性和细胞毒作用,其作为第三代铂类抗肿瘤药物,主要被广泛地应用到成人的结直肠癌临床治疗中,并表现出了良好的体内抗肿瘤活性作用。由于 RB 多发生于3岁以下儿童,故尽量使用低浓度药物治疗可以更好地减少该类药物对患儿带来的负面影响,已往的一些研究表明,0.25 μmol/L 浓度的奥沙利铂即可带来显著的 RB 细胞增殖抑制效果^[13],故本次研究中奥沙利铂浓度均采用 0.25 μmol/L 来处理 RB 细胞。Mcl-1 是一种非常重要的抗凋亡因子,在细胞的生长和分化过程中有着重要的作用,而肿瘤的发生就与 Mcl-1 的多度表达有关,本次研究通过观察发现,经奥沙利铂作用后,Y79 中 Mcl-1 表达明显变强。siRNA 能够对一种特定的基因发挥出专一性的基因敲减作用,利用其这一特性,通过转染下调 Mcl-1 后检测 Y79 发现,Mcl-1-homo-991 起到了明显的抑制 Mcl-1 表达的作用。而敲减 Mcl-1 后,Y79 的凋亡率出现了显著的上升,这证实了国内外的此类研究观点,即 Mcl-1 在肿瘤细胞包括 Y79 中,都有一

定的抗凋亡作用^[14]。而在转染下调 Mcl-1 后再使用奥沙利铂作用诱导,发现 Y79 的凋亡率较敲减前有显著提升,也高于单纯敲减 Mcl-1 后组的凋亡率。

综上所述,通过 siRNA 下调 Mcl-1 后,显著增强了奥沙利铂对 Y79 的凋亡,降低了 Y79 的存活率,对于解决 RB 临床治疗中对化疗药物的抗药性有着重要的意义。

参考文献

- 1 陆焯,童剑萍. 视网膜母细胞瘤的发生机制及诊断和治疗进展. 现代肿瘤医学 2016; 24(6):1007-1014
- 2 翟晓文. 儿童视网膜母细胞瘤治疗进展. 中华实用儿科临床杂志 2015; 30(3):167-171
- 3 王一卓,黄东生,史季桐,等. 侵犯视神经的视网膜母细胞瘤患儿 465 例预后分析. 中华儿科杂志 2015; 53(2):109-113
- 4 张坚. 奥沙利铂对人视网膜母细胞瘤细胞增殖及凋亡的影响. 新乡医学院学报 2015; 32(11):989-991
- 5 Schlueter S, Metz K, Bornfeld N, et al. Intraokulare Raumforderungen im Kindesalter ohne Retinoblastom. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2015; 232(7):838-844
- 6 Marchetti A, Doglioni C, Barbareschi M, et al. Cyclin D1 and retinoblastoma susceptibility gene alterations in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2015; 75(2):187-192
- 7 Kim JY, Park Y. Treatment of retinoblastoma: the role of external beam radiotherapy. *Yonsei Med J* 2015; 56(6):1478-1491
- 8 郎莉莉,高玉,葛茸茸,等. siRNA 抑制缺氧诱导因子-1α 表达对人视网膜母细胞瘤细胞增殖与凋亡的影响. 海军医学杂志 2016; 37(1):22-26
- 9 刘智屏,周克英,陈俐丽,等. 视网膜母细胞瘤相关血清肿瘤标记物的初步研究. 中国当代儿科杂志 2017; 19(3):318-321
- 10 赵军阳,张诚玥,金丽文,等. 全麻下眼底检查在视网膜母细胞瘤诊断中的作用研究. 中国斜视与小兒眼科杂志 2016; 24(1):1-4
- 11 Ottaviani D, Alonso C, Szijan I. Uncommon RB1 somatic mutations in a unilateral retinoblastoma patient. *Medicina* 2015; 75(3):137-138
- 12 王军,孙岩峰,苗丽霞,等. 儿童视网膜母细胞瘤个体化综合治疗的临床分析. 武警医学 2015; 26(3):232-235
- 13 王锦连. 视网膜母细胞瘤患儿 30 例围手术期的护理体会. 医药 2015; 42(7):150
- 14 姚佳慧,王义仁,周楠,等. Mcl-1 小分子抑制剂在肿瘤治疗中的应用进展. 西北药学杂志 2016; 31(5):547-552