

KDM5C基因shRNA重组慢病毒载体的构建及其对肝癌HepG2细胞的增殖和迁移的影响

胡敏敏, 詹浩炼, 刘丽璇, 项梦琦, 蒲泽锦, 李国平, 吴灵飞

胡敏敏, 詹浩炼, 刘丽璇, 项梦琦, 蒲泽锦, 李国平, 吴灵飞, 汕头大学医学院第二附属医院消化内科 广东省汕头市 515041

胡敏敏, 硕士, 主要从事消化系统肿瘤治疗的研究。

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目, No. 2014A030313470; 教育部广东省高水平大学重点学科建设“感染性疾病研究与防治”项目, No. 粤财教[2015]286号。

作者贡献分布: 课题设计由吴灵飞完成; 胡敏敏与詹浩炼负责研究过程与数据分析; 刘丽璇、项梦琦及李国平负责提供试剂; 蒲泽锦与李国平提供技术指导; 本论文写作由胡敏敏与詹浩炼共同完成。

通讯作者: 吴灵飞, 教授, 主任医师, 515041, 广东省汕头市金平区东厦北路69号, 汕头大学医学院第二附属医院消化内科。1808435253@qq.com

收稿日期: 2017-01-24

修回日期: 2017-02-16

接受日期: 2017-02-27

在线出版日期: 2017-03-18

Construction of a recombinant lentiviral vector expressing shRNA targeting KDM5C gene and its effect on proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma HepG2 cells

Min-Min Hu, Hao-Lian Zhan, Li-Xuan Liu, Meng-Qi Xiang, Ze-Jin Pu, Guo-Ping Li, Ling-Fei Wu

Min-Min Hu, Hao-Lian Zhan, Li-Xuan Liu, Meng-Qi Xiang, Ze-Jin Pu, Guo-Ping Li, Ling-Fei Wu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong Province, China

Supported by: Guangdong Natural Science Foundation in China, No. 2014A030313470; and the Ministry of

Education-Guangdong Government Top-tier University Development Scheme for Research and Control of Infectious Diseases, No. [2015]286.

Correspondence to: Ling-Fei Wu, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, 69 Dongxia North Road, Jinping District, Shantou 515041, Guangdong Province, China. 1808435253@qq.com

Received: 2017-01-24

Revised: 2017-02-16

Accepted: 2017-02-27

Published online: 2017-03-18

Abstract

AIM

To screen specific short hairpin RNA (shRNA) targeting the KDM5C gene, generate a recombinant lentiviral vector carrying KDM5C specific shRNA (Lv-shKDM5C), and investigate its effect on the proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma HepG2 cells and lncRNA GAS5 expression.

METHODS

Three pairs of shRNA fragments against the KDM5C (shKDM5C) gene and one negative control shRNA (shNC) were designed and synthesized, and a recombinant lentiviral vector was constructed using subcloning techniques. Subsequently the recombinant lentiviruses were packaged into 293T cells by co-transfection with four plasmids. The titer of virus was detected according to the expression of enhanced green fluorescent protein (GFP). The packaged lentiviruses were transfected into HepG2 cells, and the mRNA and protein

背景资料

原发性肝癌具有发病率高、易侵袭转移及预后差的特点, 多种机制参与其中, 其中启动子甲基化调控抑癌基因受到关注。本研究检测HepG2细胞中KDM5C的表达并应用RNA干扰技术观察沉默KDM5C基因后对HepG2细胞增殖、迁移及长链非编码RNA GAS5的影响, 为肝癌分子靶向治疗打下基础。

同行评议者

范辉, 副教授, 副主任医师, 江苏省南通市第二人民医院消化科; 张明鑫, 主治医师, 第四军医大学唐都医院消化内科

研究前沿

RACK7/KDM5C 复合物可协同作用通过控制活化启动子或增强子处H3K4me1与H3K4me3的动态平衡, 扮演活化启动子或增强子“刹车”的角色, 以抑制其过度激活, 而丧失这种监管机制可能促成肿瘤发生。本文通过干扰人*KDM5C*基因探讨对肝癌HepG2细胞生物表型及长链非编码RNA *GAS5*表达的影响, 显示长链非编码RNA *GAS5*受到*KDM5C*的调控。

expression of *KDM5C* was detected by qRT-PCR and Western blot, respectively. The optimal recombinant lentiviral vector for *KDM5C* silencing was screened. The proliferation and invasion of HepG2 cells were detected by MTT and wound healing assay, respectively.

RESULTS

Three recombinant lentiviruses were constructed successfully. The titers of Lv-sh*KDM5C*-1, Lv-sh*KDM5C*-2 and Lv-sh*KDM5C*-3 were 4.95×10^8 TU/mL, 3.46×10^8 TU/mL and 3.08×10^8 TU/mL, respectively. HepG2 cells had higher *KDM5C* expression than normal hepatic cells (L02 cells; $P < 0.05$). Compared to non-infected and negative control cells, the mRNA and protein expression levels of *KDM5C* were significantly inhibited in HepG2 cells transfected with Lv-sh*KDM5C*, with Lv-sh*KDM5C*-3 having the highest interference efficiency. The cell proliferation was significantly decreased at 48 h and 72 h ($P < 0.05$ for both) and the wound closure rate was significantly decreased at 48 h after Lv-sh*KDM5C*-3 transfection, compared to the Lv-shNC group ($P < 0.05$). Moreover, Lv-sh*KDM5C*-3 transfection significantly increased the mRNA level of lncRNA *GAS5* ($P < 0.05$).

CONCLUSION

A recombinant lentiviral vector expressing shRNA targeting the human *KDM5C* gene has been successfully constructed, and it can effectively inhibit the proliferation and invasion of HepG2 cells. Inhibition of *KDM5C* expression increases the expression of lncRNA *GAS5* in HepG2 cells.

© The Author(s) 2017. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: HepG2 cells; Lv-sh*KDM5C*; lncRNA *GAS5*; Cell proliferation; Cell invasion

Hu MM, Zhan HL, Liu LX, Xiang MQ, Pu ZJ, Li GP, Wu LF. Construction of a recombinant lentiviral vector expressing shRNA targeting *KDM5C* gene and its effect on proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2017; 25(8): 691-701 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v25/i8/691.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v25.i8.691>

摘要

目的

制备干扰*KDM5C*基因重组慢病毒载体, 观

察干扰人*KDM5C*基因后对肝癌HepG2细胞增殖、迁移及长链非编码RNA *GAS5*表达的影响。

方法

设计3对针对*KDM5C*基因短发夹型RNA干扰序列(short hairpin RNA, shRNA)和1对阴性对照序列, 退火后连接到pLKD载体上, 经转化PCR阳性克隆筛选及测序鉴定。使用四质粒包装系统共转染293FT细胞包装重组慢病毒, 慢病毒包装后用孔稀释法进行滴度测定。将慢病毒感染HepG2细胞, qRT-PCR和Western blotting检测HepG2细胞*KDM5C*的mRNA和蛋白表达。MTT法及细胞划痕实验检测转染Lv-sh*KDM5C*后细胞增殖及迁移能力, 同时观察lncRNA *GAS5* mRNA的表达水平变化。

结果

PCR扩增和测序结果证明, 成功构建Lv-sh*KDM5C*慢病毒载体。经包装产生的3组慢病毒载体滴度: Lv-sh*KDM5C*-1是 4.95×10^8 TU/mL, Lv-sh*KDM5C*-2是 3.46×10^8 TU/mL, Lv-sh*KDM5C*-3是 3.08×10^8 TU/mL。与正常肝细胞相比, 肝癌HepG2细胞*KDM5C*表达明显增加。与未转染组及阴性对照组相比, 3组Lv-sh*KDM5C*病毒感染HepG2细胞后*KDM5C*的mRNA及蛋白表达量均显著下降($P < 0.05$); 其中Lv-sh*KDM5C*-3组下降最为明显($P < 0.05$), 因此选取Lv-sh*KDM5C*-3进行后续实验。MTT结果显示Lv-sh*KDM5C*-3转染肝癌HepG2细胞后48 h和72 h细胞生长增殖均受到抑制($P < 0.05$)。细胞划痕实验结果显示Lv-sh*KDM5C*-3中细胞迁移率明显低于阴性对照组($P < 0.05$)。qRT-PCR结果表明干扰*KDM5C*后lncRNA *GAS5* mRNA表达显著升高($P < 0.05$)。

结论

本研究成功构建了特异性沉默人*KDM5C*基因的shRNA慢病毒载体。将其转染肝癌HepG2后可有效抑制细胞增殖和迁移。我们首次发现干扰*KDM5C*还可增加长链非编码RNA *GAS5*的表达。

© The Author(s) 2017. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

关键词: HepG2细胞; Lv-sh*KDM5C*; *GAS5*; 细胞增殖; 细胞迁移

核心提要: 检测表明肝癌HepG2细胞组蛋白去

甲基化酶*KDM5C*表达增加; 采用短发夹型RNA干扰序列的方法成功构建有效干扰*KDM5C*重组慢病毒载体; 将慢病毒转染肝癌后可抑制细胞增殖、迁移并上调lncRNA *GAS5*的表达, *KDM5C*或许可以成为肝癌基因治疗的新靶点.

胡敏敏, 詹浩炼, 刘丽璇, 项梦琦, 蒲泽锦, 李国平, 吴灵飞. *KDM5C*基因shRNA重组慢病毒载体的构建及其对肝癌HepG2细胞的增殖和迁移的影响. 世界华人消化杂志 2017; 25(8): 691-701 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v25/i8/691.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v25.i8.691>

0 引言

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球最常见的恶性肿瘤之一, 我国肝癌发病及死亡数约占全球的50%以上且病死率在恶性肿瘤中排第3位, 其中男性多于女性^[1,2]. HCC具有进展快、易侵袭转移、复发率高和预后差的特点^[3], 因此其早期诊断和有效的治疗尤为重要. HCC的发生发展是复杂的过程, 常涉及到癌基因激活、抑癌基因失活等多信号通路和基因调控^[4,5], 而这些基因的调控常与表观遗传学有关. 组蛋白甲基化是表观遗传的重要类型之一. 最近研究^[6,7]表明, 组蛋白甲基化异常可导致基因错误表达引起发育异常、代谢紊乱甚至肿瘤发生. *KDM5C*是一种组蛋白去甲基化酶, 可催化H3K4me3/me2去甲基化而转换为H3K4me2/me1^[8]. *KDM5C*通过降低H3K4三甲基化水平使基因转录处于非活化状态^[9]. *KDM5C*在前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌等多种肿瘤组织中高表达并参与抑癌基因表达的调控^[10-13]. 然而*KDM5C*在肝癌细胞中的作用目前仍不清楚. *GAS5*是一种抑癌基因, 研究表明*GAS5*在多种恶性肿瘤中如胃癌、肺癌、乳腺癌、宫颈癌等表达下调, 与肿瘤发展、转移及预后密切相关^[14-17]. *KDM5C*是否影响肝癌细胞lncRNA *GAS5*的表达尚无文献报道. 本研究检测HepG2细胞中*KDM5C*的表达并应用RNA干扰技术, 观察沉默*KDM5C*基因后对HepG2细胞增殖、迁移及lncRNA *GAS5*的影响, 为肝癌分子靶向治疗打下基础.

1 材料和方法

1.1 材料 人正常肝细胞L02为本实验室保存; 肝癌HepG2细胞及293FT购自中科院上海细

胞研究所; 胎牛血清及DMEM购自GIBCO公司; 胰酶、TRIzol及脂质体Lipofectamine 2000购自美国Invitrogen公司; 慢病毒载体系统: pLKD、pLP1、pLP2、pLP/VSVG等质粒及Obio病毒包装转染试剂由上海和元生物公司提供; DNA内切酶(*Age* I 和*Eco* R I)、DNA连接酶、DNAMaker、M-MLV逆转录酶和dNTP购自Takara公司; 基因组抽提试剂盒购自上海捷瑞公司; BCA Protein Assay Kit及ECL-PLUS/Ki购自美国Amersham公司; *KDM5C*一抗, GAPDH一抗及MTT试剂盒均购自美国Abcam公司; Goat Anti-mouse IgG二抗(美国Santa-Cruz公司); 逆转录试剂盒(日本TakaRa公司); 荧光定量PCR试剂盒(日本TakaRa公司); Prestained Protein Ladder(美国Thermo Scientific™公司).

1.2 方法

1.2.1 *KDM5C* shRNA慢病毒载体的构建: 根据GenBank中*KDM5C*的基因序列(NM_004187003823), 利用Invitrogen公司在线设计软件(Block-IT RNAi Designer), 按照RNA干扰设计原则, 设计3对针对*KDM5C*的短发夹型RNA干扰序列(short hairpin RNA, shRNA)和一条阴性对照序列(表1)送上海和元生物公司进行引物合成. 将单链的引物退火成双链oligo序列, 连接入经*Age* I 和*Eco* R I 内切酶对表达载体进行双酶切得到线性化的RNA干扰载体, 替换掉原来的ccdB毒性基因. 转化感受态细胞DH5 α , 将已转化的感受态细胞接种到LB琼脂平板, 挑取平板上长出的转化子重悬于10 μ L LB培养液中, 取1 μ L做模板进行菌落PCR鉴定, 筛选的阳性克隆进行测序验证. 测序验证正确的克隆, 进行高纯度质粒抽提.

1.2.2 慢病毒包装和滴度检测: 测序通过的质粒与pLP1、pLP2和pLP/VSVG质粒经病毒包装转染试剂共转染进293FT细胞进行慢病毒包装, 培养48、72 h后收集细胞培养上清, 用离心超滤装置收集、浓缩病毒, 随后采用10%胎牛血清的DMEM培养液稀释慢病毒原液, 感染293FT细胞, 根据病毒表达绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)产生绿色荧光和孔稀释法测定病毒滴度.

1.2.3 细胞培养: 正常人肝细胞L02和肝癌HepG2细胞于含10%胎牛血清的DMEM培养基, 37 $^{\circ}$ C、95%湿度和50 mL/L CO₂常规培养,

■ 相关报道
前期研究表明*KDM5C*在前列腺癌、乳腺癌、胃癌等肿瘤组织高表达; 可通过H3K4me3去甲基化作用抑制抑癌基因启动子复合物形成并参与增强子活性的调控, 从而抑制肿瘤细胞增殖、迁移; *KDM5C*对肝癌细胞是否也存在这种作用尚不清楚, 因此本研究进行了探索.

创新点

本研究通过短发夹型RNA干扰序列(short hairpin RNA, shRNA)的方法成功构建*KDM5C*基因重组慢病毒载体, 通过干扰*KDM5C*对其在肝癌增殖迁移方面进行了初步探索, 作者首次观察到抑制*KDM5C*后细胞生长及迁移出现抑制而且lncRNA *GAS5*表达量上升, 表明*KDM5C*不仅与HepG2细胞恶性生长有关而且参与了lncRNA *GAS5*表达的调控。本研究对于寻找肝癌治疗的新靶点有一定的价值。

表 1 shKDM5C和shNC引物序列

名称	正反义链(5'→3')
shKDM5C-1-F	CCGGGCCAACCTTGTGCAGTGTACTCAAG AGATACACTGCACAAGGTTGGCTTTTTTG
shKDM5C-1-R	AATTCAAAAAAGCCAACCTTGTGCAGTGT ATCTCTTGAGTACACTGCACAAGGTTGGC
shKDM5C-2-F	CCGGCCACAGCAATGCCAGTTTCTCAAG AGAAAACCTGGGCATTGCTGTGGTTTTTTG
shKDM5C-2-R	AATTCAAAAAACCACAGCAATGCCAGTT TTCTCTTGAGAACTGGGCATTGCTGTGG
shKDM5C-3-F	CCGGGCTGACACCTGAACTATTTCTCAAG AGAAAATAGTTCAGGTGTCAGCTTTTTTG
shKDM5C-3-R	AATTCAAAAAAGCTGACACCTGAACTATT TTCTCTTGAGAAATAGTTCAGGTGTCAGC
shNC-F	CCGGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAG AGAACGTGACACGTTCCGAGAATTTTTTG
shNC-R	AATTCAAAAAATTCTCCGAACGTGTCACG TTCTCTTGAAACGTGACACGTTCCGAGAA

0.05%胰蛋白酶、0.02%EDTA消化细胞, 每2-3 d 传代1次, 取对数生长期的细胞用于实验。

1.2.4 重组慢病毒感染HepG2细胞: 将HepG2细胞接种到6孔板, 每个孔内接种 5×10^4 - 8×10^4 个目的细胞, 铺板时细胞的融合率为30%左右, 每孔加入1.5 mL含10%胎牛血清DMEM培养基; 进行病毒感染时细胞的融合度约为30%-50%左右, 根据预实验总结出此慢病毒转染HepG2的MOI值(MOI = 10)和pIyobrene (5 μ g/mL)用量加入HepG2细胞中, 混匀后放于二氧化碳培养箱(37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂)孵育过夜; 在12 h后将含有慢病毒的培养液更换成正常培养液; 实验设置未转染对照组(Control), 空干扰病毒转染组(Lv-shNC), 转染干扰*KDM5C*病毒1组(Lv-shKDM5C-1), 转染干扰*KDM5C*病毒2组(Lv-shKDM5C-2), 转染干扰*KDM5C*病毒3组(Lv-shKDM5C-3)。感染48 h后, 在荧光显微镜下观察HepG2细胞GFP表达情况, 随机选取上中下5个低倍视野, 计数转染细胞占细胞总数的百分比来评价转染效率。

1.2.5 qRT-PCR检测*KDM5C*、*GAS5* mRNA表达: Lv-shKDM5C感染72 h后收集细胞, 采用TRIzol法提取细胞总RNA, 逆转录合成cDNA, 再以cDNA为模板进行Real-time PCR检测。目的基因*KDM5C*上游引物序列为5'-CGGCAGTACCTGCGGTATC-3'; 下游引物序列为5'-TCAGTTCTTCAAGGCTGCG-3';

*GAS5*上游引物序列为5'-TATGGAGAGTC-GGCTTGA-3'; 下游引物序列5'-CTTGCTTG-TTGTGGTTCATTA-3'; 内参*GAPDH*上游引物序列为5'-GTCAACGGATTTGGTC-TGTATT-3'; 下游引物序列为5'-AGTCTTCTG-GGTGGCAGTGAT-3'。设定程序为两步法Real-Time定量。预变性95 $^{\circ}$ C, 30 s, 之后每一步变性95 $^{\circ}$ C, 5 s, 退火延伸60 $^{\circ}$ C, 34 s, 共进行40个循环。每次在延伸阶段读取吸光值。PCR结束后, 在95 $^{\circ}$ C变性1 min。然后冷却至55 $^{\circ}$ C, 使DNA双链充分结合。从55 $^{\circ}$ C开始到95 $^{\circ}$ C, 每一步增加0.5 $^{\circ}$ C, 保持4 s, 同时读取吸光值。制作熔解曲线。PCR结束后, 在95 $^{\circ}$ C变性1 min。然后冷却至55 $^{\circ}$ C, 使DNA双链充分结合。从55 $^{\circ}$ C开始到95 $^{\circ}$ C, 每一步增加0.5 $^{\circ}$ C, 保持4 s, 同时读取吸光值。实验重复3次。经SDS2.0软件分析循环阈值(Ct)值。以*GAPDH*作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行目的基因mRNA相对表达水平分析, 其中 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$, $\Delta Ct = Ct_{\text{靶基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$ 。

1.2.6 Western blotting检测蛋白表达: 细胞培养72 h后, 弃去细胞培养液, PBS洗涤1-2次; 弃去PBS, 加入适量预冷的NP-40细胞裂解液, 细胞刮刮下细胞, 将样品转移入Ep管中, 冰上裂解细胞10-15 min; 4 $^{\circ}$ C, 14000 g, 离心5 min; 取上清, 用BCA法测蛋白浓度, 样品-80 $^{\circ}$ C保存备用。以60 μ g/孔上样, 在10%SDS-PAGE凝胶

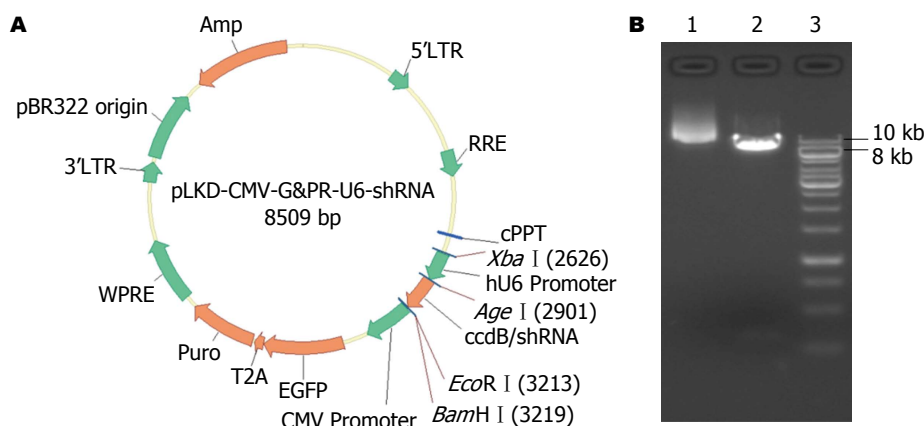


图1 慢病毒表达载体和表达载体的线性化。A: 带有GFP荧光和puromycin抗性基因标记的*KDM5C*干扰慢病毒载体; B: 电泳图。1: 未酶切的干扰载体; 2: 经*Age* I和*Eco*R I双酶切的干扰载体; 3: DNA ladder Marker。GFP: 绿色荧光蛋白。

进行电泳分离30 mA 2 h后, 转移至硝酸纤维素PVDF膜(4 °C, 300 mA恒流条件下电转120 min)上, 然后用含5%脱脂奶粉的TBST中室温封闭1 h, 加入1:1000稀释的鼠抗人*KDM5C*抗体, 4 °C孵育过夜, 经TBST洗涤10 min×3次后, 加入1:3000稀释的过氧化物酶标记山羊抗鼠IgG的二抗, 室温下孵育PVDF膜2 h, TBST洗膜3次, 每次10 min, 采用Amersham公司ECL+plus™ Western blotting system试剂盒进行显色, 天能4200全自动化学发光成像分析系统曝光。使用该软件进行灰度分析, 以*GAPDH*为内参照, 目的蛋白量 = 目的蛋白条带灰度值/*GAPDH*条带灰度值, 实验重复3次。

1.2.7 MTT法检测细胞增殖: 收集感染后24 h的细胞, 将细胞重悬, 以每孔 5×10^3 个接种于96孔板, 每孔200 μL, 并设置5个复孔。继续培养细胞0、24、48及72 h, 采用MTT法检测细胞生长活性(以490 nm波长处的吸光度值表示), 待测孔加入20 μL MTT, 4 h后弃去旧培养基, 每孔加入150 μL DMSO后水平摇床上轻摇10 min使结晶充分溶解, 在酶标仪上于490 nm波长处测定吸光度值, 以MTT比色值为纵坐标, 时间为横坐标绘制出各组细胞的生长曲线。

1.2.8 细胞划痕实验检测细胞迁移: 将 2×10^6 细胞/孔均匀接种于6孔板中, 置于培养箱孵育至细胞贴壁并形成均匀单层后, 进行划痕; PBS轻洗细胞3次, 去除游离细胞, 加入无血清培养基培养, 倒置显微镜下拍照; 继续培养24、48 h后, 再次拍照; 每次拍照均利用Image J软件测量划痕宽度。每组实验重复3次, 计算划痕修复率。划痕修复率 = (0 h的划痕宽度-48 h的划痕宽度)/0 h的划痕宽度×100%。

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件进行统计学处理, 成正态分布的计量资料以mean±SD表示, 组间比较用单因素方差分析, 每组实验至少重复3次, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 表达载体的线性化, 菌落PCR鉴定及测序结果 用*Age* I和*Eco*R I内切酶对表达载体(图1A)进行双酶切得到312 bp的*ccdB*基因和8.2 kb的载体片段, 经酶切后的质粒在8 kb左右的位置出现明显条带, 表明表达载体线性化已达目标(图1B)。3组重组干扰载体转化感受态细胞DH5α后, 各挑取8个菌落进行PCR鉴定, 阳性克隆得到332 bp的片段, 阴性对照(水和空载体质粒作为阴性对照)得到586 bp的片段(图2), 将3组阳性克隆进行测序鉴定, 结果显示序列正确(图2)。

2.2 包装好的慢病毒滴度测定 Lv-sh*KDM5C*和Lv-shNC分别与包装质粒共转染293FT细胞, 细胞的生长状态良好, 提示成功包装病毒。收集病毒, 用稀释法测定滴度: Lv-sh*KDM5C*-1的滴度是 4.95×10^8 TU/mL, Lv-sh*KDM5C*-2的滴度是 3.46×10^8 TU/mL, Lv-sh*KDM5C*-3的滴度是 3.08×10^8 TU/mL, Lv-shNC的滴度是 1.36×10^9 TU/mL。

2.3 重组慢病毒感染HepG2细胞效率 感染48 h后荧光显微镜观察各组细胞报告基因GFP的表达情况。随机选取上中下左右5个视野中的细胞计算转染效率, 绿色荧光率均达到90%以上, 各转染组之间转染效率无明显差异($P > 0.05$, 图3)。

2.4 肝癌细胞中*KDM5C*的表达 将正常肝细胞L02组作为对照, qRT-PCR检测L02和HepG2两

应用要点

本文探讨抑制*KDM5C*后对肝癌细胞表型及lncRNA *GAS5*表达的影响, 为肝癌临床治疗提供新思路。

同符评价

本文从RNA干扰的角度研究抑制*KDM5C*基因对肝癌细胞生长及长链非编码RNA*GAS5*表达的影响, 显示肝癌细胞组蛋白去甲基化酶*KDM5C*表达增加, 而干扰*KDM5C*不仅可抑制细胞生长而且可上调lncRNA*GAS5*表达, 为研究组蛋白甲基化参与抑癌非编码RNA调控机制提供新思路, 在一定程度上反映肿瘤研究的先进水平, 具有一定创新性。整篇文章目的明确, 方法合理, 实验图片精良, 讨论详尽, 内容描述准确。

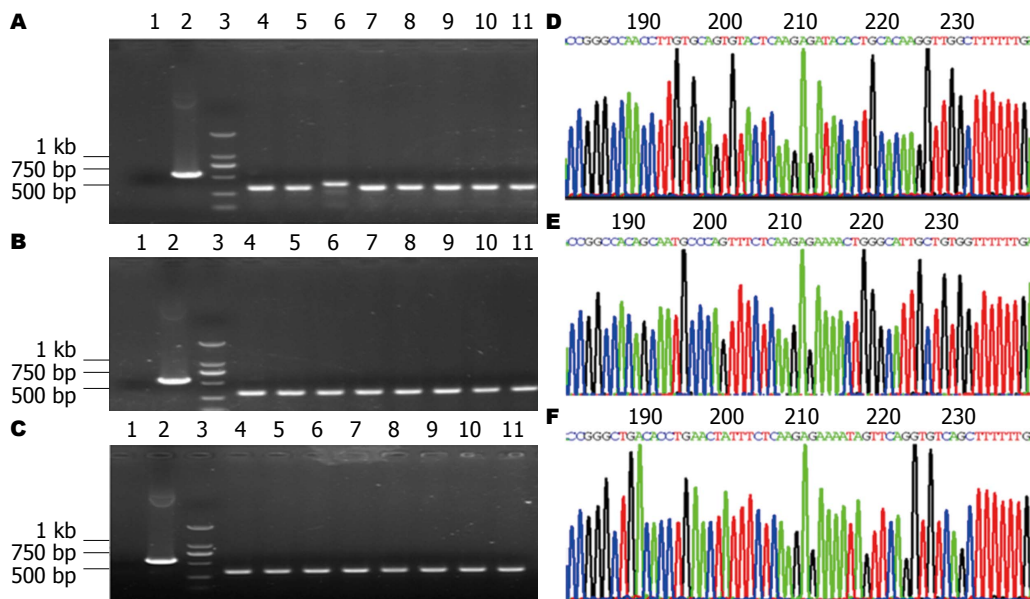


图 2 菌落PCR鉴定图和重组载体测序图。A, B, C分别为shKDM5C-1、shKDM5C-2及shKDM5C-3菌落PCR鉴定图; 1: 阴性对照(水); 2: 阴性对照(空载体质粒); 3: DNA Marker; 4-11为挑取的8个转化子。D, E, F: 分别为shKDM5C-1、shKDM5C-2及shKDM5C-3重组载体部分测序结果。

组细胞mRNA表达水平, 结果显示: HepG2组*KDM5C*基因的相对表达量为L02组的3.62倍(图4A)。Western blotting检测两组中*KDM5C*蛋白表达水平, 结果显示: HepG2组*KDM5C*蛋白相对表达量为L02组的3.49倍(图4B,C)。本实验结果表明肝癌细胞*KDM5C*表达均高于正常肝细胞(均 $P<0.05$, 图4)。

2.5 Lv-shKDM5C转染对HepG2细胞*KDM5C*表达的影响 未转染病毒的肝癌HepG2细胞作为阴性对照(Control), 空干扰病毒转染组(Lv-shNC)作为对照, qRT-PCR检测各组细胞mRNA表达水平, 结果显示: Lv-shKDM5C-1、Lv-shKDM5C-2、Lv-shKDM5C-3 3组中*KDM5C*的mRNA相对表达量分别为对照组(Lv-shNC)的28%、33%及19%(图5A); Western blotting检测各组细胞*KDM5C*的蛋白表达水平, 结果显示: Lv-shKDM5C-1、Lv-shKDM5C-2、Lv-shKDM5C-3 3组中*KDM5C*蛋白的相对表达量分别为对照组的24%、26%及10%(图5B, C), 表明3组病毒载体均对HepG2细胞*KDM5C*的表达有明显干扰效果(均 $P<0.05$), 其中Lv-shKDM5C-3干扰效果最为显著。

2.6 Lv-shKDM5C-3转染对HepG2细胞生长的影响 采用MTT法检测各组细胞0、24、48和72 h的生长活性, Lv-shNC组48、72 h HepG2细胞的 A_{490} 值分别为: 0.66 ± 0.07 、 0.87 ± 0.06 ; 而Lv-shKDM5C-3组 A_{490} 值分别为: $0.48\pm$

0.02 、 0.70 ± 0.03 。与对照组相比均有显著性差异($P<0.05$, 图6)。表明干扰*KDM5C*可明显抑制HepG2细胞的增殖。

2.7 Lv-shKDM5C-3转染对HepG2细胞迁移能力的影响 细胞划痕实验结果显示: Lv-shNC组HepG2细胞48 h划痕修复率为 $60.80\%\pm8.70\%$, Lv-shKDM5C-3组为 $16.30\%\pm3.90\%$, 两组差异有统计学意义($P<0.05$, 图7), 表明干扰*KDM5C*可明显抑制HepG2细胞的迁移能力。

2.8 Lv-shKDM5C-3转染对HepG2细胞*KDM5C*、*GAS5* mRNA水平的影响 检测两组细胞*KDM5C*、*GAS5*的mRNA表达水平, 结果显示: Lv-shKDM5C-3组中*KDM5C* mRNA相对表达量为对照组的19%, 而*GAS5*的mRNA相对表达量为对照组的1.88倍($P<0.05$, 图8)。此结果提示干扰*KDM5C*后显著上调*GAS5* mRNA表达。

3 讨论

*KDM5*家族包含*KDM5A*、*KDM5B*、*KDM5C*及*KDM5D* 4种成员, 这些蛋白可以促进转录因子的活化, 因此影响激素反应、干细胞修复、细胞的增殖和分化^[18-21]。有研究^[22]表明, *KDM5C*在肝癌组织和Huh7、MHCC97L肝癌细胞系中高表达并通过下调抑癌基因*BMP7*表达促进细胞侵袭、转移和上皮间叶组织转化, 扮演癌基因的角色。然而, *KDM5C*在肝癌

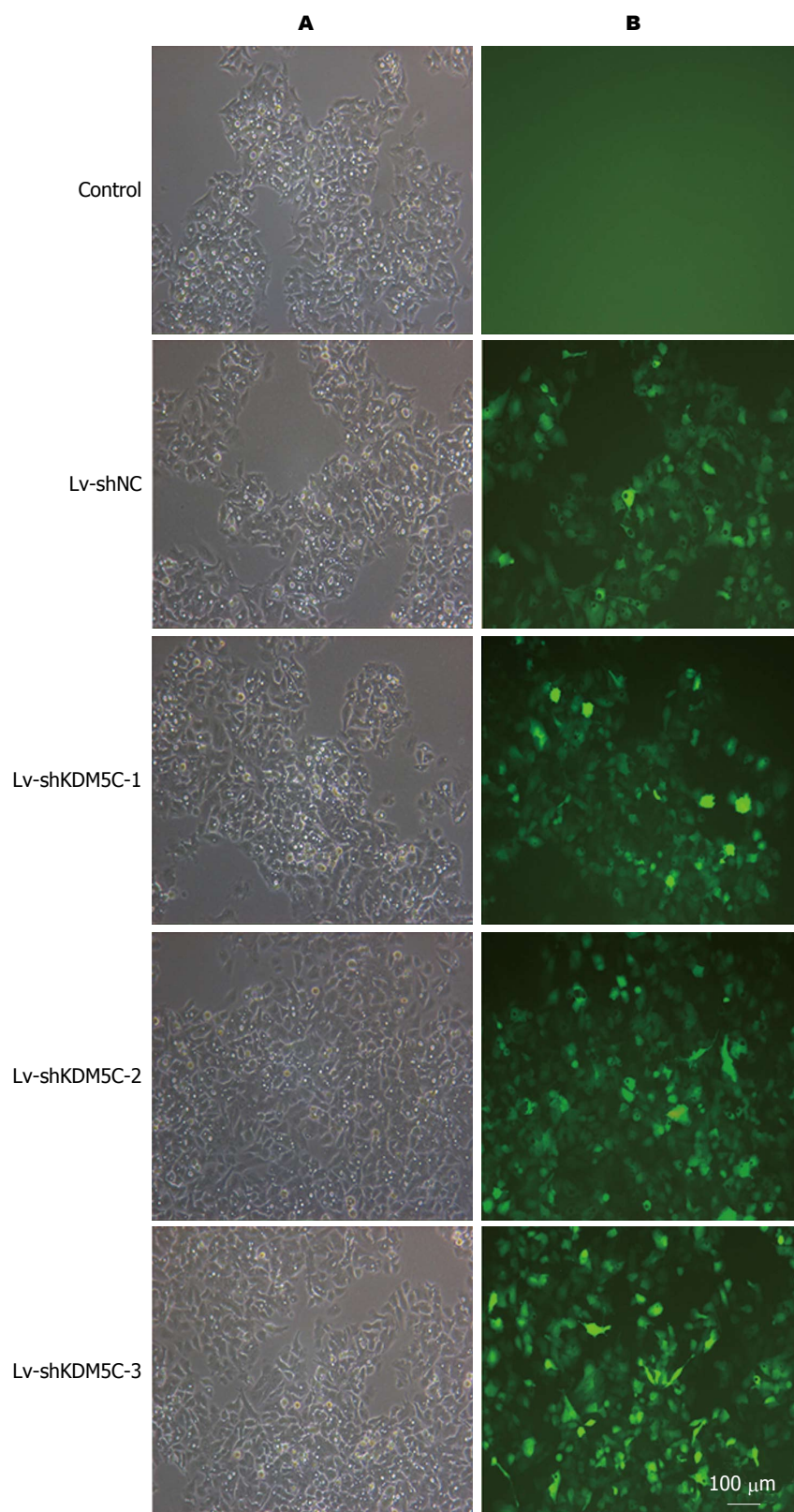


图 3 慢病毒干扰载体感染HepG2细胞(48 h). A: 正常显微镜下观察; B: 荧光显微镜下观察.

HepG2细胞中是否亦异常表达并参与癌症的发生、发展尚不清楚. 本研究采用qRT-PCR和Western blotting技术检测HepG2细胞和正常肝

L02细胞*KDM5C*的表达量, 结果显示*KDM5C*在肝癌HepG2细胞中的表达量明显高于正常肝细胞(图4).

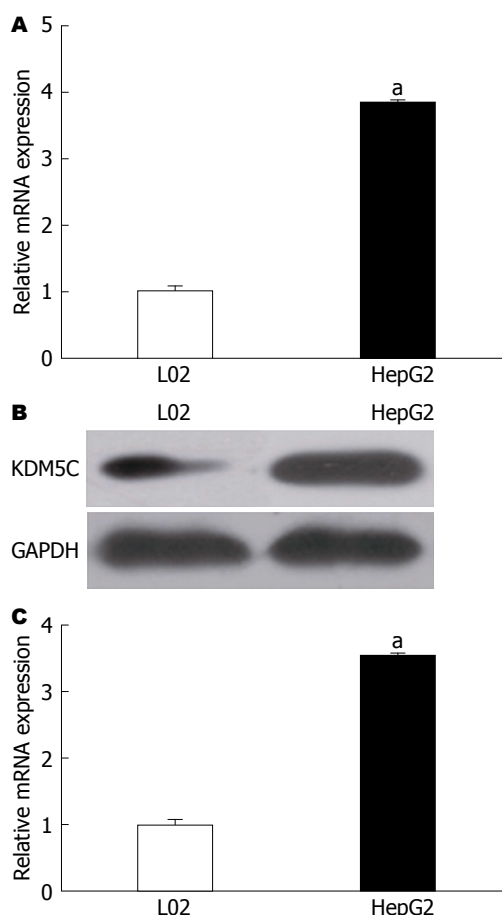


图 4 qRT-PCR和Western blotting检测细胞*KDM5C*表达水平。A: 正常肝细胞L02组和HepG2组细胞*KDM5C*的mRNA相对表达量; B: L02组和HepG2组细胞*KDM5C*蛋白电泳条带; C: L02组和HepG2组细胞*KDM5C*的蛋白相对表达量。^a*P*<0.05 vs L02组。

RNA干扰技术可以特异性降低或关闭特定基因的表达, 该技术已被广泛用于探索基因功能和恶性肿瘤的基因治疗。shRNA作为RNA干扰的一种方法, 由2个短反方向重复序列和1个loop环组成发夹结构组成, 并由U6启动子控制, 随后再连上5-6个T作为RNA聚合酶III的转录终止子。细胞内转录的shRNA被加工后掺入RNA诱导的沉默复合物, 引导核酸酶降解靶RNA^[23]。慢病毒载体是在人类免疫缺陷病毒基础上改造成的病毒载体系统, 能高效地将目的基因整合到宿主细胞基因组中且能稳定持久表达。慢病毒介导RNAi作用持续且稳定, 他可将目的基因整合至靶细胞基因组长期表达, 同时扩大了载体感染细胞的范围, 适于体内基因治疗。将其作为shRNA的携带者, 不但具备特异性地使基因表达沉默的能力, 还可以充分发挥病毒载体自身所具备的优势, 为研究基因功能提供了更强有力的工具^[24,25]。本实验采

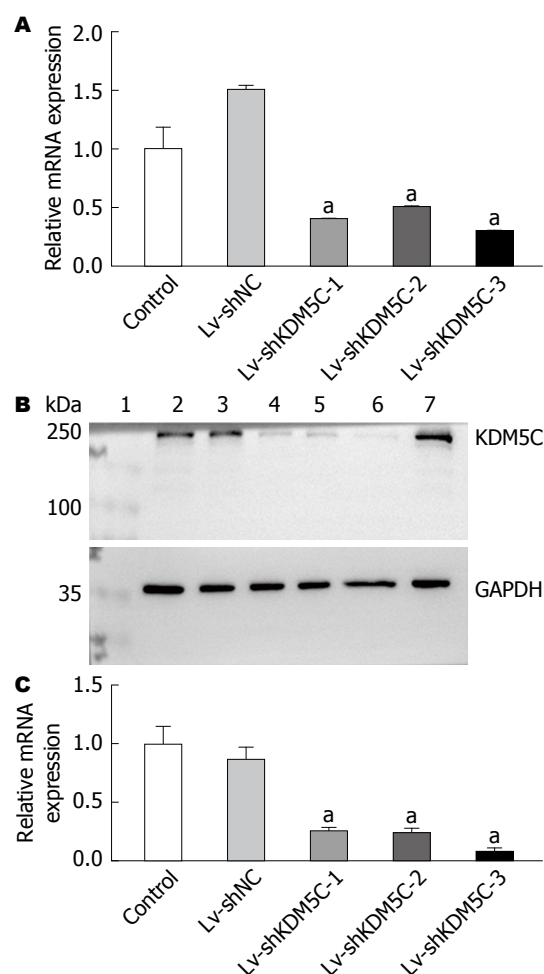


图 5 qRT-PCR和Western blotting检测细胞*KDM5C*表达水平。A: 各组细胞*KDM5C*的mRNA相对表达量; B: 各组细胞*KDM5C*的蛋白电泳图。1: Marker; 2: Control; 3: Lv-shNC; 4: Lv-shKDM5C-1; 5: Lv-shKDM5C-2; 6: Lv-shKDM5C-3; 7: Control; C: 各组细胞*KDM5C*的蛋白相对表达量。^a*P*<0.05 vs Lv-shNC组。

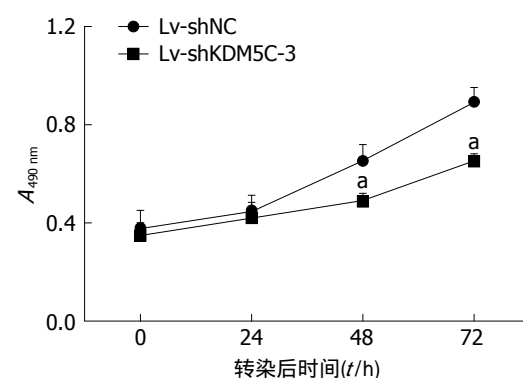


图 6 MTT法检测不同时间HepG2细胞生长状态。Lv-shNC为空白病毒转染组; Lv-shKDM5C-3为*KDM5C*慢病毒干扰组。^a*P*<0.05 vs Lv-shNC组。

用shRNA方法靶向*KDM5C*的3组慢病毒载体, 经检测其病毒滴度分别为 4.95×10^8 TU/mL、 3.46×10^8 TU/mL及 3.08×10^8 TU/mL; 病毒感

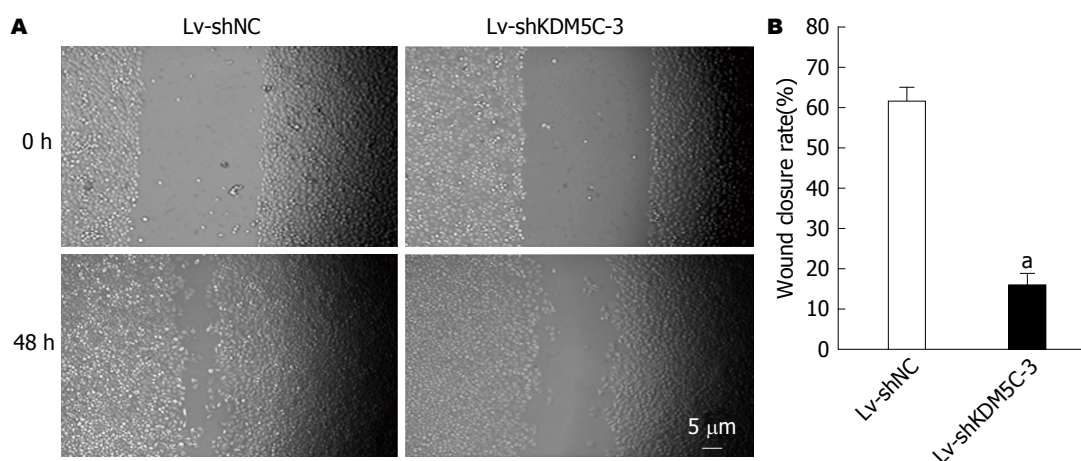


图 7 Lv-shKDM5C对HepG2细胞迁移能力的影响. A: 细胞划痕实验图(Bar = 5 μ m); B: 空干扰病毒转染组及*KDM5C*干扰组细胞相对迁移速率的比较. ^a $P < 0.05$ vs Lv-shNC组.

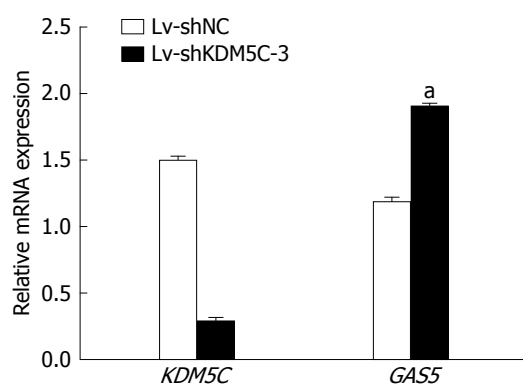


图 8 qRT-PCR检测转染Lv-shKDM5C-3细胞*KDM5C*、*GAS5*的mRNA表达水平. 空干扰病毒转染(对照组); Lv-shKDM5C-3为*KDM5C*慢病毒干扰组. ^a $P < 0.05$ vs Lv-shNC组.

染HepG2细胞后绿色荧光率均达到90%以上, 表明构建有效的Lv-shKDM5C病毒载体成功.

H3K4me3多定位于靶基因启动子区域并与基因激活相关, 作为活化性组蛋白修饰可以被特定的蛋白质识别并招募下游的共调节分子, 促进基因转录表达^[26,27]. 研究^[28,29]表明*KDM5C*可通过H3K4me3去甲基化作用抑制抑癌基因启动子复合物形成并参与增强子活性的调控. Stein等^[10]报道下调*KDM5C*表达可导致前列腺癌细胞的生长阻滞, 认为*KDM5C*的过表达是前列腺癌切除术后肿瘤复发的一个独立的预测指标; Xu等^[30]报道干扰*KDM5C*在胃癌细胞中可改变抑癌基因*p53*启动子区域H3K4甲基化状态而降低其增殖能力; Wang等^[31]发现在乳腺癌细胞中干扰*KDM5C*亦可改变抑癌基因*BRMS1*启动子区域H3K4甲基化状态而降低细胞转移能力. 本实验我们制备了干扰

*KDM5C*的慢病毒载体并感染肝癌HepG2细胞株, 结果观察到干扰*KDM5C*可抑制肝癌细胞的增殖和迁移, 与上述文献报道结果一致, 显示出*KDM5C*可能作为癌基因参与了肝癌的发生及进展.

lncRNA作为表观遗传调控网络中的重要部分在肿瘤的发生、发展中发挥越来越重要的作用. *GAS5*是新近发现的lncRNA. 研究^[32]表明, 低表达lncRNA *GAS5*的癌症患者生存期低于高表达的患者, 并且低表达lncRNA *GAS5*与肿瘤远处转移和淋巴结转移有关. 本实验我们首次观察到抑制*KDM5C*后lncRNA *GAS5*表达量上升而且细胞生长出现抑制, 表明在肝癌HepG2细胞中*GAS5*的表达受到*KDM5C*的调控. *GAS5*活化如何抑制肿瘤进展其机制有待进一步研究.

总之, 本研究我们成功制备了干扰*KDM5C*的慢病毒载体, 将其转染HepG2细胞可减少*KDM5C*的表达并抑制其增殖和迁移. 我们证实干扰*KDM5C*还可增加肝癌细胞lncRNA *GAS5*的表达, 表明组蛋白去甲基化酶*KDM5C*可能参与了*GAS5*表达的调控.

4 参考文献

- 1 Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65: 87-108 [PMID: 25651787 DOI: 10.3322/caac.21262]
- 2 Chen W, Zheng R, Baade PD, Zhang S, Zeng H, Bray F, Jemal A, Yu XQ, He J. Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015; 66: 115-132 [PMID: 26808342 DOI: 10.3322/caac.21338]
- 3 Aino H, Sumie S, Niizeki T, Kuromatsu R, Tajiri N, Nakano M, Satani M, Yamada S, Okamura S, Shimose S, Sumie H, Torimura T, Sata M.

- Clinical characteristics and prognostic factors for advanced hepatocellular carcinoma with extrahepatic metastasis. *Mol Clin Oncol* 2014; 2: 393-398 [PMID: 24772306 DOI: 10.3892/mco.2014.259]
- 4 Liu LX, Deng W, Zhou XT, Chen RP, Xiang MQ, Guo YT, Pu ZJ, Li R, Wang GF, Wu LF. The mechanism of adenosine-mediated activation of lncRNA MEG3 and its antitumor effects in human hepatoma cells. *Int J Oncol* 2016; 48: 421-429 [PMID: 26647875 DOI: 10.3892/ijo.2015.3248]
- 5 Chen RP, Huang ZL, Liu LX, Xiang MQ, Li GP, Feng JL, Liu B, Wu LF. Involvement of endoplasmic reticulum stress and p53 in lncRNA MEG3-induced human hepatoma HepG2 cell apoptosis. *Oncol Rep* 2016; 36: 1649-1657 [PMID: 27432655 DOI: 10.3892/or.2016.4919]
- 6 Black JC, Van Rechem C, Whetstine JR. Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Mol Cell* 2012; 48: 491-507 [PMID: 23200123 DOI: 10.1016/j.molcel.2012.11.006]
- 7 Labbé RM, Holowatyj A, Yang ZQ. Histone lysine demethylase (KDM) subfamily 4: structures, functions and therapeutic potential. *Am J Transl Res* 2013; 6: 1-15 [PMID: 24349617]
- 8 Klose RJ, Kallin EM, Zhang Y. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 715-727 [PMID: 16983801 DOI: 10.1038/nrg1945]
- 9 Wynder C, Stalker L, Doughty ML. Role of H3K4 demethylases in complex neurodevelopmental diseases. *Epigenomics* 2010; 2: 407-418 [PMID: 22121901 DOI: 10.2217/epi.10.12]
- 10 Stein J, Majores M, Rohde M, Lim S, Schneider S, Krappe E, Ellinger J, Dietel M, Stephan C, Jung K, Perner S, Kristiansen G, Kirfel J. KDM5C is overexpressed in prostate cancer and is a prognostic marker for prostate-specific antigen-relapse following radical prostatectomy. *Am J Pathol* 2014; 184: 2430-2437 [PMID: 25016185 DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.05.022]
- 11 Patani N, Jiang WG, Newbold RF, Mokbel K. Histone-modifier gene expression profiles are associated with pathological and clinical outcomes in human breast cancer. *Anticancer Res* 2011; 31: 4115-4125 [PMID: 22199269]
- 12 Sun YX, Zhang YX, Zhang D, Xu CM, Chen SC, Zhang JY, Ruan YC, Chen F, Zhang RJ, Qian YQ, Liu YF, Jin LY, Yu TT, Xu HY, Luo YQ, Liu XM, Sun F, Sheng JZ, Huang HF. XCI-escaping gene KDM5C contributes to ovarian development via downregulating miR-320a. *Hum Genet* 2017; 136: 227-239 [PMID: 27896428 DOI: 10.1007/s00439-016-1752-9]
- 13 Kaiser J. Genes link epigenetics and cancer. *Science* 2010; 330: 577 [PMID: 21030621 DOI: 10.1126/science.330.6004.577]
- 14 Sun M, Jin FY, Xia R, Kong R, Li JH, Xu TP, Liu YW, Zhang EB, Liu XH, De W. Decreased expression of long noncoding RNA GAS5 indicates a poor prognosis and promotes cell proliferation in gastric cancer. *BMC Cancer* 2014; 14: 319 [PMID: 24884417 DOI: 10.1186/1471-2407-14-319]
- 15 Shi X, Sun M, Liu H, Yao Y, Kong R, Chen F, Song Y. A critical role for the long non-coding RNA GAS5 in proliferation and apoptosis in non-small-cell lung cancer. *Mol Carcinog* 2015; 54 Suppl 1: E1-E12 [PMID: 24357161 DOI: 10.1002/mc.22120]
- 16 Pickard MR, Williams GT. Regulation of apoptosis by long non-coding RNA GAS5 in breast cancer cells: implications for chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2014; 145: 359-370 [PMID: 24789445 DOI: 10.1007/s10549-014-2974-y]
- 17 Cao S, Liu W, Li F, Zhao W, Qin C. Decreased expression of lncRNA GAS5 predicts a poor prognosis in cervical cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7: 6776-6783 [PMID: 25400758]
- 18 Whetstine JR, Nottke A, Lan F, Huarte M, Smolnikov S, Chen Z, Spooner E, Li E, Zhang G, Colaiacovo M, Shi Y. Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell* 2006; 125: 467-481 [PMID: 16603238 DOI: 10.1016/j.cell.2006.03.028]
- 19 Fodor BD, Kubicek S, Yonezawa M, O'Sullivan RJ, Sengupta R, Perez-Burgos L, Opravil S, Mechtler K, Schotta G, Jenuwein T. Jmjd2b antagonizes H3K9 trimethylation at pericentric heterochromatin in mammalian cells. *Genes Dev* 2006; 20: 1557-1562 [PMID: 16738407 DOI: 10.1101/gad.388206]
- 20 Kawazu M, Saso K, Tong KI, McQuire T, Goto K, Son DO, Wakeham A, Miyagishi M, Mak TW, Okada H. Histone demethylase JMJD2B functions as a co-factor of estrogen receptor in breast cancer proliferation and mammary gland development. *PLoS One* 2011; 6: e17830 [PMID: 21445275 DOI: 10.1371/journal.pone.0017830]
- 21 Shi Y, Whetstine JR. Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. *Mol Cell* 2007; 25: 1-14 [PMID: 17218267 DOI: 10.1016/j.molcel.2006.12.010]
- 22 Ji X, Jin S, Qu X, Li K, Wang H, He H, Guo F, Dong L. Lysine-specific demethylase 5C promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through inhibition BMP7 expression. *BMC Cancer* 2015; 15: 801 [PMID: 26503415 DOI: 10.1186/s12885-015-1798-4]
- 23 Noguchi K, Ishitu Y, Miyano-Kurosaki N, Takaku H. Expression of shRNA using intron splicing. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 2007; (51): 409-410 [PMID: 18029760 DOI: 10.1093/nass/nrm205]
- 24 Nishitsuji H, Ikeda T, Miyoshi H, Ohashi T, Kannagi M, Masuda T. Expression of small hairpin RNA by lentivirus-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells. *Microbes Infect* 2004; 6: 76-85 [PMID: 14738896 DOI: 10.1016/j.micinf.2003.10.009]
- 25 Neschadim A, McCart JA, Keating A, Medin JA. A roadmap to safe, efficient, and stable lentivirus-mediated gene therapy with hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 1407-1416 [PMID: 18022569 DOI: 10.1016/j.bbmt.2007.09.014]
- 26 Shao GB, Chen JC, Zhang LP, Huang P, Lu HY, Jin J, Gong AH, Sang JR. Dynamic patterns of histone H3 lysine 4 methyltransferases and demethylases during mouse preimplantation development. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2014; 50: 603-613 [PMID: 24619213 DOI: 10.1007/s11626-014-9741-6]

- 27 Hung T, Binda O, Champagne KS, Kuo AJ, Johnson K, Chang HY, Simon MD, Kutateladze TG, Gozani O. ING4 mediates crosstalk between histone H3 K4 trimethylation and H3 acetylation to attenuate cellular transformation. *Mol Cell* 2009; 33: 248-256 [PMID: 19187765 DOI: 10.1016/j.molcel.2008.12.016]
- 28 Outchkourov NS, Muiño JM, Kaufmann K, van Ijcken WF, Groot Koerkamp MJ, van Leenen D, de Graaf P, Holstege FC, Grosveld FG, Timmers HT. Balancing of histone H3K4 methylation states by the Kdm5c/SMCX histone demethylase modulates promoter and enhancer function. *Cell Rep* 2013; 3: 1071-1079 [DOI: 10.1016/j.celrep.2013.02.030]
- 29 Sims RJ, Millhouse S, Chen CF, Lewis BA, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Manley JL, Reinberg D. Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 2007; 28: 665-676 [PMID: 18042460 DOI: 10.1016/j.molcel.2007.11.010]
- 30 Xu L, Wu W, Cheng G, Qian M, Hu K, Yin G, Wang S. Enhancement of Proliferation and Invasion of Gastric Cancer Cell by KDM5C Via Decrease in p53 Expression. *Technol Cancer Res Treat* 2016 Feb 7. [Epub ahead of print] [PMID: 26858085 DOI: 10.1177/1533034616629261]
- 31 Wang Q, Wei J, Su P, Gao P. Histone demethylase JARID1C promotes breast cancer metastasis cells via down regulating BRMS1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 464: 659-666 [PMID: 26182878 DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.07.049]
- 32 Song W, Wang K, Zhang RJ, Dai QX, Zou SB. Long noncoding RNA GAS5 can predict metastasis and poor prognosis: a meta-analysis. *Minerva Med* 2016; 107: 70-76 [PMID: 26763654]

编辑: 闫晋利 电编: 胡珊



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 © 2017 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

• 消息 •

《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), DOI: 10.11569, *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology*], 是一本由来自国内31个省、市、自治区、特别行政区和美国的1040位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

除了公开存取之外, 《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾, 即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲, 包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价。

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤, 食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学, 以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术。

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
8226 Regency Drive, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

