

文章编号: 1673-3851 (2011) 05-0778-05

# 稳定下调 *SIRT1* 基因表达的肝癌细胞系的构建

张璇<sup>1</sup>, 刘佳<sup>2</sup>, 马蕾娜<sup>2</sup>, 胡徐庞<sup>1</sup>, 刘立<sup>1</sup>, 钱程<sup>1</sup>

(1. 浙江理工大学生命科学院, 杭州 310018; 2. 重庆市西南医院, 重庆 400038)

**摘要:** *SIRT1*(silent information regulator 1)与多种肿瘤的发病过程关系密切,但是其在肝癌中的作用尚不明确。为了研究 *SIRT1* 与肝癌的关系,通过构建慢病毒载体,病毒转染和包装,嘌呤霉素的筛选等实验方法,成功构建能稳定下调 *SIRT1* 基因表达的肝癌细胞系 Hep3B 和 PLC/PRF/5,为后期进一步研究 *SIRT1* 在肝癌发病过程中的功能奠定了基础。

**关键词:** *SIRT1*; 嘌呤霉素; 慢病毒载体; 肝癌细胞系

**中图分类号:** Q279      **文献标识码:** A

## 0 引言

肝癌是一种在我国的发病率,死亡率较高的疾病。而目前对于肝癌的治疗手段有限,而且治疗后病人的存活时间也较短,因而研究肝癌中癌症相关基因的功能对于了解肝癌的发生和发展机制,指导研发治疗肝癌的临床药物具有十分重要的现实意义。

*SIRT1* 是一种组蛋白去乙酰化酶,属于诱导沉默调节子 2(silent information regulator 2, *Sir2*)家族<sup>[1]</sup>。对 *SIRT1* 基因表达的调控主要是通过原癌基因和肿瘤抑制基因调节 *SIRT1* 基因的 mRNA 表达来实现。*SIRT1* 基因在肿瘤细胞中过表达主要发生在转录水平。肿瘤超甲基化因子 1(Hypermethylated in cancer, HIC1)是一种肿瘤抑制因子<sup>[2]</sup>、原癌基因 RNA 结合蛋白 HuR<sup>[3]</sup>、细胞循环和凋亡调节因子(E2F1)<sup>[4]</sup>,它能够调控 *SIRT1* 蛋白的表达量。而对 *SIRT1* 蛋白去乙酰化酶活性的调控主要是通过蛋白-蛋白相互作用与类泛素化来实现。*SIRT1* 的去乙酰化酶活性主要被蛋白激活调节因子(Proteins including active regulator, AROS)<sup>[5]</sup>、乳腺癌缺失因子 1(Deleted in breast cancer 1, DBC1)<sup>[6]</sup>、预凋亡去类泛素化核因子(Proapoptotic nuclear desumoylase, SENP1)调节<sup>[7]</sup>。

虽然 *SIRT1* 在很多肿瘤如白血病、胶质瘤、前列腺癌、结肠癌和皮肤癌病人的组织中表达是上调的<sup>[8-9]</sup>,但是在肝癌发展过程中所起的作用目前尚未有研究报道。为了开展 *SIRT1* 在肝癌中作用的研究,本实验拟通过构建表达携带靶向 *SIRT1* 基因的 shRNA,包装慢病毒 LV-Sh-*SIRT1* 来下调 *SIRT1* 基因表达,从而构建出稳定下调 *SIRT1* 基因表达的肝癌细胞系 Hep3B 和 PLC/PRF/5。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人肝癌细胞系 Hep3B 和 PLC/PRF/5, 胚肾成纤维细胞系 HEK-293FT(本实验室保存), DMEM 细胞

收稿日期: 2010-12-20

基金项目: 国家重点基础发展计划资助项目(973)(2010CB529406); 重庆市自然科学基金计划资助项目(CSTC 09BB5024)

作者简介: 张璇(1986-), 男, 江西新余人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤基因治疗方面的研究。

通讯作者: 刘立, 电子邮箱: liuli7001@yahoo.com.cn

培养液,胎牛血清(购于 GIBCO 公司),质粒 pLKO. 1-cloning 和 pLKO. 1-scrambled(购于 SIGMA 公司),限制性内切酶 *Bam*H I、DNA marker $\lambda$ -*Hind*III 和 DL2000(购于 TaKaRa 公司),基因组 DNA 纯化试剂盒(购于 QIAGEN 公司),Milipore 浓缩柱(购于 Milipore 公司)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 细胞培养

Hep3B、PLC/PRF/5 和 HEK-293FT 细胞在 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 条件下培养,培养液为含 10% FBS 的 DMEM。

### 1.2.2 慢病毒 LV-sh-*SIRT1* 的包装

将 *SIRT1* shRNA(Sh-*SIRT1*)1,2,3 三条序列接入 pLKO. 1 质粒中,即构建出三个载体 pLKO. 1-sh-*SIRT1*-1、pLKO. 1-sh-*SIRT1*-2 和 pLKO. 1-sh-*SIRT1*-3。将 pLKO. 1-sh-*SIRT1*-1、pLKO. 1-sh-*SIRT1*-2、pLKO. 1-sh-*SIRT1*-3 和 pLKO. 1-scrambled 与包装质粒 RRE、2G、REV 利用转染试剂 Lipofectamine2000 共转染至 HEK-293FT 细胞,48 h 和 72 h 后获得携带目的干扰序列和对照的慢病毒。

### 1.2.3 慢病毒 LV-sh-*SIRT1* 的纯化

将两次收集的病毒使用 1 000 r/min 离心 10 min 去除细胞碎片,取上清。上清用 0.45  $\mu$ m 的滤膜过滤,所有滤液(可分成几次)转移入 Milipore 的浓缩柱,5 000 r/min 离心至上层凹槽内的液体体积浓缩至 1 mL,将浓缩液分装,置于-80°C(若短期内使用,可置于 4°C)。

### 1.2.4 慢病毒 LV-sh-*SIRT1* 总量测定

24 孔细胞培养板每孔铺  $5 \times 10^4$  个 HEK-293FT 细胞,每孔细胞液体积为 1 mL,细胞贴壁后用系列稀释的制备病毒(原液,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  等)分别加入 24 孔细胞培养板,72 h 后,用基因组 DNA 纯化试剂盒(QIAGEN, DNA Blood mini kit 50)提取病毒转导的细胞基因组,采用实时定量 PCR 测定病毒转导单位滴度(TU/mL)。

### 1.2.5 Western blot 检测肝癌细胞中 *SIRT1* 基因表达

利用 Western blot 法测定 *SIRT1* 的蛋白表达。病毒处理过的等量细胞(6 孔细胞培养板每个孔中 1/4 的细胞)在 20  $\mu$ L 上样缓冲液中裂解,然后 2 000 r/min 离心 2 min,取 20  $\mu$ L 上清在 10% SDS PAGE 胶中分离,并转移至硝酸纤维素膜上。使用兔抗 *SIRT1* 的抗体作为一抗(购于 Santa Cruz 公司),然后用辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔抗体作为二抗(购于中杉金桥公司),加入底物进行检测。

### 1.2.6 嘌呤霉素筛选 *SIRT1* 的基因表达下调的肝癌细胞系

人肝癌细胞系 Hep3B 和 PLC/PRF/5 以每孔  $3.5 \times 10^5$  个细胞的密度种植于 6 孔细胞培养板中,过夜后,将原先含 10% FBS 的 DMEM 培养液换为无 FBS 的 DMEM 培养液,并分别加入对照病毒 LV-Sh-Scramble(MOI=10),目的病毒 LV-Sh-*SIRT1*-1、LV-Sh-*SIRT1*-2 和 LV-Sh-*SIRT1*-3(MOI=10),不加病毒孔作为对照。6 h 后,将无 FBS 的 DMEM 培养液重新换成含 10% FBS 的 DMEM 培养液。72 h 后,加入嘌呤霉素(Puromycin)(浓度分别为 1.6  $\mu$ g/mL 和 1.25  $\mu$ g/mL)进行筛选,每 2 d 换液 1 次,5 d 后观察细胞数目及形态。

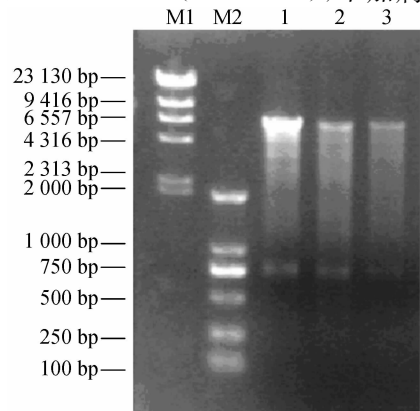
## 2 结果

### 2.1 慢病毒载体 LV-sh-*SIRT1*-1、LV-sh-*SIRT1*-2 和 LV-sh-*SIRT1*-3 的构建和鉴定

质粒 pLKO. 1-sh-*SIRT1*-1、pLKO. 1-sh-*SIRT1*-2 和 pLKO. 1-sh-*SIRT1*-3 被 *Bam*H I 消化完全后应得到 6 336 bp 和 750 bp 大小的片段,实验结果与预期一致,表明实验所需慢病毒载体构建成功,*Bam*H I 酶切鉴定电泳图(见图 1)。

### 2.2 检测肝癌细胞系 *SIRT1* 的表达

利用 Western blot 法测定肝癌细胞系 *SIRT1* 的蛋白表达,发现在



M1: Marker $\lambda$ -*Hind*III; M2: Marker DL2000; Lane1: PLKO. 1-Sh-*SIRT1*-1; Lane2: PLKO. 1-Sh-*SIRT1*-2; Lane3: PLKO. 1-Sh-*SIRT1*-3

图 1 *Bam*H I 酶切鉴定电泳图

不同的肝癌细胞中, *SIRT1* 的蛋白表达水平不一致, Hep3B 和 PLC/PRF/5 细胞中 *SIRT1* 的表达量明显增强(见图 2)。因此, 采用 *SIRT1* 基因表达高的细胞系 Hep3B 和 PLC/PRF/5 构建稳定下调表达 *SIRT1* 基因的肝癌细胞系。

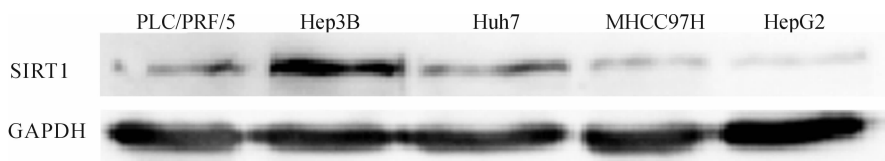
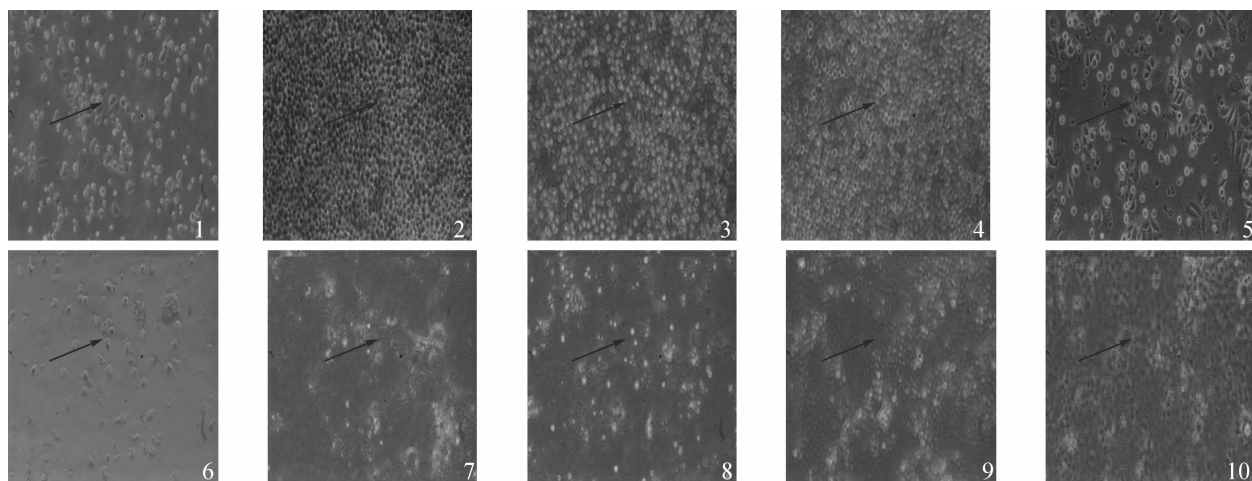


图 2 肝癌细胞系中 *SIRT1* 的蛋白表达情况

### 2.3 嘌呤霉素筛选稳定下调 *SIRT1* 基因表达的肝癌细胞系

将相同滴度的对照病毒 LV-sh-Scramble(MOI=10), 目的病毒 LV-Sh-*SIRT1*-1、LV-Sh-*SIRT1*-2 和 LV-Sh-*SIRT1*-3(MOI=10) 分别加入人肝癌细胞 Hep3B 和 PLC/PRF/5 的培养液中, 转染后 72 h, 加入嘌呤霉素(浓度分别为  $1.6 \mu\text{g/mL}$  和  $1.25 \mu\text{g/mL}$ ) 进行筛选, 每 2 d 换液 1 次, 5 d 后观察细胞数目及形态不加病毒的细胞作为对照。结果表明, 不加病毒的对照肝癌细胞 Hep3B 和 PLC/PRF/5 都已经死亡, 而加病毒的细胞几乎没有死亡的, 说明病毒的转染效率非常高(见图 3)。实验结果证明, 经过嘌呤霉素的筛选, 笔者成功地构建了稳定下调 *SIRT1* 基因表达的肝癌细胞系。



1-Hep3B 细胞; 2-Hep3B-NC 细胞; 3-Hep3B-S1 细胞; 4-Hep3B-S2 细胞; 5-Hep3B-S3 细胞; 6-PLC/PRF/5 细胞; 7-PLC/PRF/5-NC 细胞; 8-PLC/PRF/5-S1 细胞; 9-PLC/PRF/5-S2 细胞; 10-PLC/PRF/5-S3-S3 细胞

图 3 加入嘌呤霉素筛选 5 d 后的细胞(40 $\times$ )

### 2.4 构建的肝癌细胞系的有效性

为了验证所构建的稳定下调表达 *SIRT1* 基因表达的肝癌细胞系的有效性, 利用病毒处理过的等量细胞(6 孔细胞培养板每个孔中 1/4 的细胞) 收集蛋白, Western blot 法测定 *SIRT1* 蛋白表达。结果显示, 所构建的细胞系中 *SIRT1* 蛋白的表达与对照细胞 PLC/PRF/5 和 Hep3B 相比明显下调(见图 4)。表明所构建的稳定下调 *SIRT1* 基因表达的肝癌细胞系的确能够稳定下调 *SIRT1* 基因表达。

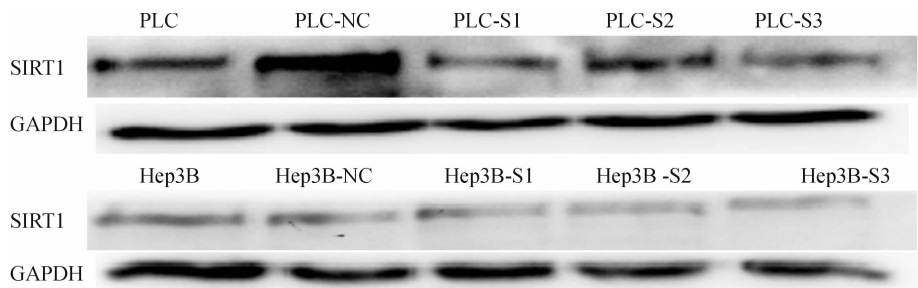


图 4 加病毒后肝癌细胞 Hep3B 和 PLC/PRF/5(PLC) 的 *SIRT1* 的蛋白表达情况

### 3 讨 论

目前在许多基因功能的研究中所采用的是化学合成的 siRNA 或基因表达的化学抑制剂,两者除了普遍存在着只能在短时间内下调基因表达,实验结果不稳定而且实验的重复性差的缺点外,siRNA 还存在转染效率不高的缺陷,而化学抑制剂也存在剂量控制难以掌控的问题<sup>[10-11]</sup>。与此相比,慢病毒携带干扰 *SIRT1* 表达的 shRNA 不仅能够长期、稳定下调 *SIRT1* 的表达,而且具有转染效率高,实验结果稳定以及重复性好的特点,同时也不存在剂量难以控制的问题。因此,采用慢病毒携带 shRNA 来干扰目的基因的表达,能够延长针对目的基因研究的时间。

本实验所构建的肝癌细胞系 Hep3B 和 PLC/PRF/5 (PLC) 已经被证明具有能够长时间稳定下调 *SIRT1* 表达的特性,克服了目前普遍采用化学合成的 siRNA 和基因表达的化学抑制剂不足之处。慢病毒 LV-sh-*SIRT1*-1、LV-sh-*SIRT1*-2 和 LV-sh-*SIRT1*-3 感染肝癌细胞后,经过恰当浓度嘌呤霉素的筛选,笔者成功构建出稳定下调 *SIRT1* 基因表达的肝癌细胞系 Hep3B 和 PLC/PRF/5,为后期进一步研究 *SIRT1* 在肝癌中的功能奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Bourguignon, Xia Weiliang, Gabriel Wong, et al. Hyaluronan-mediated CD44 interaction with p300 and *SIRT1* regulates beta-catenin signaling and NFkappaB-specific transcription activity leading to MDR1 and Bcl-xL gene expression and chemoresistance in breast tumor cells[J]. J Biol Chem, 2009, 284(5): 2657-2671.
- [2] Chen W Y, Wang D H, Yen, R C, et al. Tumor suppressor HIC1 directly regulates *SIRT1* to modulate p53-dependent DNA-damage responses[J]. Cell, 2005, 123: 437-448.
- [3] Abdelmohsen K, Pullmann R J, Lal A, et al. Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates *SIRT1* expression[J]. Mol Cell, 2007, 25: 543-557.
- [4] Wang C, Chen L, Hou X, et al. Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage[J]. Nat Cell Biol, 2006, 8: 1025-1031.
- [5] Kim E J, Kho J H, Kang M R, et al. Active regulator of *SIRT1* cooperates with *SIRT1* and facilitates suppression of p53 activity[J]. Mol Cell, 2007, 28: 277-290.
- [6] Zhao W, Kruse J P, Tang Y, et al. Negative regulation of the deacetylase *SIRT1* by DBC1[J]. Nature, 2008, 451: 587-590.
- [7] Yang Y, Fu W, Chen J, et al. *SIRT1* sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress[J]. Nat Cell Biol, 2007, 9: 1253-1262.
- [8] Huffman D M, Grizzle W E, Bamman M M, et al. *SIRT1* is significantly elevated in mouse and human prostate cancer [J]. Cancer Res, 2007, 67: 6612-6618.
- [9] Liu G, Yuan X, Zeng Z, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma[J]. Mol Cancer, 2006, 6: 67.
- [10] Yang D, Buchholz F, Huang Z, et al. Short RNA duplexes produced by hydrolysis with Escherichia coli RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(15): 9942-9947.
- [11] Gondai T, Yamaguchi K, Miyano-Kurosaki N, et al. Short-hairpin RNAs synthesized by T7 phage polymerase do not induce interferon[J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(16): e18.

## Establishment of Stable *SIRT1* Gene-Downregulated Hepatocarcinoma Cell Lines by Lentiviral Vector

ZHANG Xuan<sup>1</sup>, LIU Jia<sup>2</sup>, MA Lei-na<sup>2</sup>, HU Xu-pang<sup>1</sup>, LIU Li<sup>1</sup>, QIAN Cheng<sup>1</sup>

- (1. School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;
2. Southwest Hospital, Chongqing 400038, China)

**Abstract:** *SIRT1* is closely associated with malignant phenotypes in many types of cancer, but its role in HCC progression is still unknown. To find the relation between *SIRT1* and Hepatocellular carcinoma (HCC), through construction of lentiviral vector, viral production and package, selection with puromycin, and validation of *SIRT1* knockdown efficiency by immunoblotting, the authors successfully establish hepatocarcinoma cell lines, Hep3B and PLC/PRF/5, in which *SIRT1* expression is stably downregulated, providing a basic model for further study the role of *SIRT1* in HCC formation and progression.

**Key words:** *SIRT1*; puromycin; lentiviral vector; hepatocarcinoma cell lines

(责任编辑: 许惠儿)

---

(上接第 777 页)

## Blind Detection Algorithms for Forged Images Based on Artificial Neural Networks

GAO Qiang, ZHANG Hua-xiong

(School of Informatics and Electronics, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** Blind detection algorithms for images is a technique which uses image itself statistical features to identify the forged images. In this paper the authors bring forward a new algorithms which is based on imaging principle of digital camera, using artificial neural networks to forecasting the relationship between the relevant pixel. The image which has not been forged has only one interpolated algorithms, but the forged one may have two or more, so if using artificial neural networks to forecast two types of these images we will get different results, by this difference can find forged image. The result of simulation implies that this calculation has some effects.

**Key words:** blind detection algorithms for images; bayer color filter array; artificial neural networks

(责任编辑: 陈和榜)