

• 论 著 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2022.09.006

siRNA 干扰下调 DJ-1 的表达对人支气管上皮细胞生物学行为的影响*

魏旺丽¹, 谭 潭¹, 崔亚娟², 刘国栋^{3△}

1. 湖南省郴州市第一人民医院检验医学中心, 湖南郴州 423000; 2. 中南大学湘雅二医院血液内科, 湖南长沙 410011; 3. 湖南省郴州市第一人民医院南院急诊科, 湖南郴州 423000

摘 要:目的 探讨 DJ-1 表达下调对人支气管上皮细胞(HBE 细胞)生物学行为的影响。方法 构建 DJ-1 基因 siRNA 慢病毒载体, 感染 HBE 细胞(DJ-1 siRNA 组), 并设置 Control siRNA 慢病毒载体对照(Control siRNA 组)及空白对照(BC 组), 分别采用流式细胞术检测各周期细胞, 四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测细胞增殖情况, 克隆形成试验检测细胞克隆情况, Transwell 小室试验检测细胞迁移情况。结果 DJ-1 siRNA 组 G₁ 期细胞比例高于 BC 组、Control siRNA 组, S 期、G₂ 期细胞比例低于 BC 组、Control siRNA 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 Control siRNA 组和 BC 组比较, DJ-1 siRNA 组在接种后 24、48、72、96 h 的吸光度值明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); DJ-1 siRNA 组在接种后 48、72、96 h 的增殖抑制率分别是 36.9%、60.8% 和 37.6%。DJ-1 siRNA 组的克隆数、迁移细胞数明显少于 Control siRNA 组与 BC 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 下调 DJ-1 的表达具有抑制 HBE 细胞分裂、增殖、迁移和侵袭的作用。

关键词: DJ-1; 人支气管上皮细胞; 细胞增殖; 细胞周期; 细胞迁移

中图分类号: R446

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2022)09-1173-04

Effects of down-regulation of DJ-1 expression by siRNA interference on biological behavior of human bronchial epithelial cells*

WEI Wangli¹, TAN Tan¹, CUI Yajuan², LIU Guodong^{3△}

1. Department of Laboratory Medicine Center, Chenzhou First People's Hospital, Chenzhou, Hunan 423000, China; 2. Department of Hematology, The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410011, China; 3. Department of Emergency Medicine, Chenzhou First People's Hospital, Chenzhou, Hunan 423000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of down-regulation of DJ-1 expression on the biological behavior of human bronchial epithelial cells (HBE cells). **Methods** Constructed DJ-1 gene siRNA lentiviral vector, infected HBE cells (DJ-1 siRNA group), and set Control siRNA lentiviral vector control (Control siRNA group) and blank control (BC group). Flow cytometry was used to detect cells in each cycle, MTT colorimetry method used to detect cell proliferation, clone formation assay was used to detect cell clones, and Transwell chamber assay was used to detect cell migration. **Results** The proportion of cells in G₁ phase in DJ-1 siRNA group was higher than that in BC group and Control siRNA group, and the proportion of cells in S phase and G₂ phase was lower than that in BC group and Control siRNA group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the Control siRNA group and the BC group, the absorbance values of the DJ-1 siRNA group at 24, 48, 72 h and 96 h after vaccination were significantly decreased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The proliferation inhibition rates of the DJ-1 siRNA group at 48, 72 h and 96 h after vaccination were 36.9%, 60.8% and 37.6% respectively. The number of clones and migrated cells in the DJ-1 siRNA group were significantly less than those in the Control siRNA group and the BC group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Down-regulation of DJ-1 expression inhibited the division, proliferation, migration and invasion of HBE cells.

Key words: DJ-1; human bronchial epithelial cells; cell proliferation; cell cycle; cell migration

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30972970); 湖南省科技厅项目(2017sk1102); 湖南省郴州市第一人民医院院内课题(N2020-7)。

作者简介: 魏旺丽, 女, 主管技师, 主要从事肺癌的相关研究。△ 通信作者, E-mail: wwllar190413@126.com。

本文引用格式: 魏旺丽, 谭潭, 崔亚娟, 等. siRNA 干扰下调 DJ-1 的表达对人支气管上皮细胞生物学行为的影响[J]. 检验医学与临床, 2022, 19(9): 1173-1176.

DJ-1 又称帕金森病相关蛋白 7(PARK7), 是已知的帕金森病相关蛋白^[1], 位于染色体 1p36.23, 相对分子质量为 20×10^3 , 长度为 24 kb, 属于肽酶 C56 蛋白家族成员。DJ-1 在很多组织中广泛表达, 如肝脏、骨骼肌、肾脏等, DJ-1 作为众所周知的致癌因子, 在肿瘤的发生和发展中也起着至关重要的作用^[2-3]。DJ-1 在很多肿瘤中都有过表达现象, 如乳腺导管癌、非小细胞肺癌等^[4]。DJ-1 的功能很多, 包括转录调节、抗氧化应激等^[5]。DJ-1 的抗氧化应激功能可有效保护神经细胞免受氧化应激的损伤, 促进神经细胞生长及增殖。DJ-1 是已知的肺癌转移相关蛋白^[6], 为研究 DJ-1 对细胞生物学行为的影响, 本研究选择人支气管上皮细胞(HBE 细胞)作为研究对象, 探讨低表达 DJ-1 对 HBE 细胞增殖、凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料来源 实验室保存的 HBE 细胞; DJ-1 siRNA 慢病毒载体、Control siRNA 慢病毒载体购自上海吉凯基因化学技术有限公司; 四甲基偶氮唑盐(MTT)、胎牛血清(FBS)、1640 培养基等购自美国赛默飞世尔公司。

1.2 方法

1.2.1 分组 构建 DJ-1 基因 siRNA 慢病毒载体, 感染 HBE 细胞(DJ-1 siRNA 组), 并设置 Control siRNA 慢病毒载体对照(Control siRNA 组)及空白对照(BC 组)。

1.2.2 流式细胞术检测各周期细胞 消化收集的细胞, 洗涤离心后用 70% 乙醇重悬细胞, 制成 1×10^6 /mL 的细胞悬液; 于 4℃ 冰箱中过夜固定后用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤, 加入 100 μ L 核糖核酸酶 A(RNase A), 37℃ 水浴 30 min; 加入碘化丙啶(PI)染液 400 μ L, 4℃ 避光放置 30 min 后采用流式细胞仪检测各周期细胞。

1.2.3 MTT 比色法检测细胞增殖情况 消化收集的细胞, 梯度稀释成 1×10^4 /mL 的细胞悬液, 以每孔 200 μ L 接种于 96 孔培养板, 共接种 4 块板, 每组每板接种 20 孔。此外, A1 孔中加入 200 μ L 完全培养基作为空白对照, 再在其他 15 个空白孔中加入 200 μ L 无菌 PBS 以保证试验结果的稳定性和可靠性。于接种后 24、48、72、96 h 各选 1 块培养板进行检测, 各实验孔及空白对照孔中加入 MTT(5 mg/mL) 20 μ L, 37℃ 培养 4 h 后去除孔内液体, 每孔加入二甲亚砜(DMSO)各 150 μ L, 于酶标仪上快速振荡 60 s 充分溶解孔内沉淀后, 在 570 nm 波长处检测各孔吸光度(A)值。

1.2.4 克隆形成试验检测细胞克隆情况 消化收集的对数生长期细胞, 吹打制成单个细胞悬液, 每组分别以每孔 200 个细胞接种于 6 孔培养板中。2 周后肉眼可见的克隆出现后终止培养, 弃上清液后用 PBS 洗涤 2 次, 加入 4% 多聚甲醛 2 mL 放置 15 min 固定细

胞。去固定液, 吉姆萨染液染色 10~30 min 后流水缓慢冲洗, 自然干燥。随机选取 6 个视野, 分别计数每个视野下单个细胞形成克隆(细胞数 > 5 个)的数量。

1.2.5 Transwell 小室试验检测细胞迁移情况 消化收集的对数生长期细胞, 调整细胞水平至 $(0.5 \sim 1.0) \times 10^6$ /mL。将 500 μ L 含 10% FBS 的培养基加入 24 孔板下室中; 侵袭小室内加入细胞悬液 300 μ L。孵育 48 h 后去除侵袭小室内未穿过基底层膜的细胞; 4% 多聚甲醛固定, 结晶紫染色 20 min; 冲洗掉多余的染色液后自然干燥; 随机选取不同视野($\times 100$)并计数细胞个数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验; 计数资料以例数或百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DJ-1 下调对 HBE 细胞周期的影响 流式细胞术检测结果显示, DJ-1 siRNA 组、Control siRNA 组、BC 组细胞周期为 G_1 期的细胞分别占 65.80%、20.57% 和 22.44%; S 期细胞分别占 16.39%、31.56% 和 30.35%; G_2 期细胞分别占 17.81%、47.87% 和 47.21%。与 Control siRNA 组相比, DJ-1 siRNA 组的 G_1 期细胞比例增高 45.23%, 而 S 期和 G_2 期细胞比例分别减少 15.17%、30.06%。DJ-1 siRNA 组 G_1 期细胞比例高于 BC 组、Control siRNA 组, S 期、 G_2 期细胞比例低于 BC 组、Control siRNA 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), BC 组、Control siRNA 组各周期细胞比例比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 DJ-1 下调对 HBE 细胞增殖的影响 采用 MTT 比色法检测 3 组细胞增殖情况, 结果显示, 与 Control siRNA 组和 BC 组比较, DJ-1 siRNA 组在接种后 24、48、72、96 h 的 A 值明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 1。DJ-1 siRNA 组在接种后 48、72、96 h 的增殖抑制率分别是 36.9%、60.8% 和 37.6%。

2.3 克隆形成试验结果 采用克隆形成试验检测 3 组单个细胞的克隆形成情况, 结果显示, DJ-1 siRNA 组、Control siRNA 组和 BC 组的克隆数分别为 (8.00 ± 1.67) 、 (12.50 ± 2.17) 个和 (11.50 ± 1.52) 个, DJ-1 siRNA 组的克隆数明显少于 Control siRNA 组与 BC 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 1。

2.4 DJ-1 下调对细胞迁移能力的影响 Transwell 小室试验结果显示, DJ-1 siRNA 组、Control siRNA 组及 BC 组迁移细胞数分别为 (44.7 ± 2.1) 、 (50.3 ± 1.5) 、 (51.3 ± 1.2) 个, 与 Control siRNA 组、BC 组比较, DJ-1 siRNA 组的迁移细胞数明显减少, 差异有统

计学意义($P<0.05$),而 BC 组和 Control siRNA 组 图 2。
迁移细胞数比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见

表 1 3 组细胞接种后不同时间点 A 值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
DJ-1 siRNA 组	0.400±0.064* [#]	0.650±0.067* [#]	0.870±0.055* [#]	1.170±0.084* [#]
Control siRNA 组	0.520±0.065	0.890±0.081	1.400±0.130	1.610±0.140
BC 组	0.500±0.062	0.870±0.074	1.410±0.092	1.580±0.170

注:与 Control siRNA 组比较,* $P<0.05$;与 BC 组比较,[#] $P<0.05$ 。

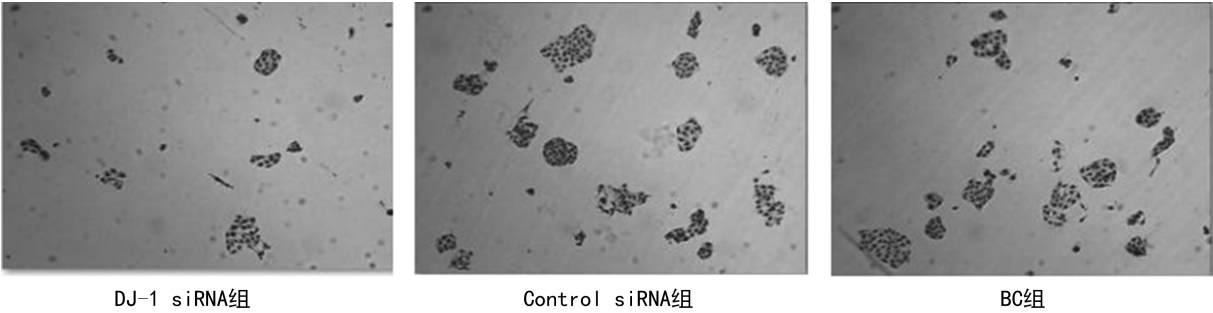


图 1 3 组单个细胞培养 2 周后的镜下图($\times 100$)

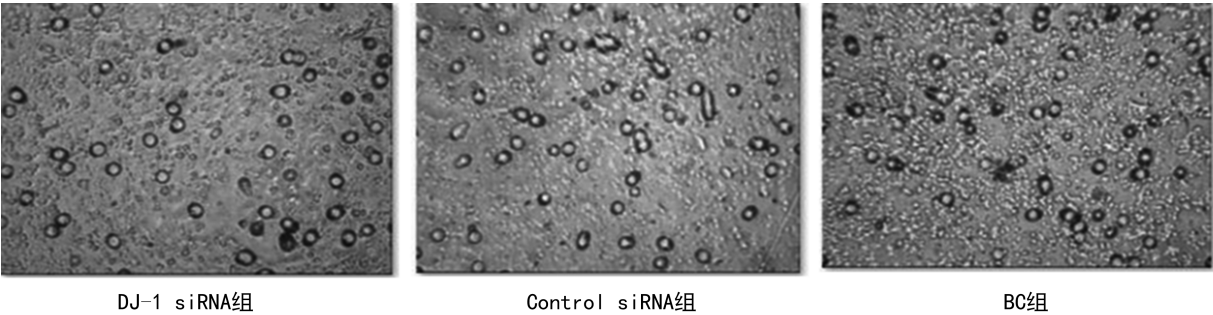


图 2 3 组迁移细胞镜下图($\times 100$)

3 讨 论

DJ-1 广泛存在于人胰腺、肾、肌肉、肝脏等多种器官及组织的细胞中。DJ-1 含有 189 个氨基酸残基及 3 个半胱氨酸(Cys)残基,其中 Cys-106 为活性位点。研究发现,DJ-1 不仅与帕金森病密切相关,而且在很多肿瘤中都存在过表达现象,因此其可能在肿瘤的发生和发展过程中起着重要作用^[1-3]。DJ-1 与肺鳞癌的发生、发展密切相关,DJ-1 是一种高度保守的蛋白,在肺鳞癌中高表达,促进癌细胞分裂、增殖、迁移、侵袭。DJ-1 的作用机制复杂,涉及细胞转录调控、氧化应激等多种病理、生理过程。

本研究通过下调 DJ-1 的表达抑制了 HBE 细胞的分裂、增殖、迁移、侵袭,可能涉及的 DJ-1 作用机制有以下几点:(1)调节人第 10 号染色体缺失的磷酸酶(PTEN)/磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/丝氨酸苏氨酸激酶(Akt)信号通路。DJ-1 可以通过抑制 PTEN 的活性来拮抗细胞凋亡,从而促进细胞增殖,使得 PTEN/PI3K/Akt 信号通路的活性增强^[7-8]。(2)参与抗氧化应激。DJ-1 含有 3 个可被氧化的 Cys 位点,

分别是 Cys-46、Cys-53、Cys-106,其中 Cys-106 为活性位点,可被氧化突变为丙氨酸后丧失抗凋亡能力,调节核因子 E2 相关因子(Nrf2)信号通路的转录过程,参与抗氧化应激^[9-10]。

正常的细胞周期进程是细胞增殖的前提。本研究采用流式细胞术检测下调 DJ-1 表达后的 HBE 细胞周期变化,结果表明,下调 DJ-1 表达后 HBE 细胞的细胞周期发生明显变化,细胞阻滞于 G₁ 期(与 Control siRNA 组相比,DJ-1 siRNA 组的 G₁ 期细胞比例增高 45.23%),S 期与 G₂ 期细胞数量显著减少,细胞有丝分裂受阻。MTT 比色法检测细胞增殖情况,结果显示,DJ-1 siRNA 组在接种后 48、72、96 h 的增殖抑制率分别是 36.9%、60.8%和 37.6%,表明下调 DJ-1 的表达会抑制 HBE 细胞的增殖。克隆形成试验结果显示,DJ-1 siRNA 组的克隆数明显少于 Control siRNA 组与 BC 组($P<0.05$),表明下调 DJ-1 的表达能够抑制 HBE 单个细胞的克隆,进一步证实抑制 DJ-1 的表达会抑制 HBE 细胞增殖。结合细胞周期检测结果,表明细胞有丝分裂受阻导致了细胞

增殖能力减弱。Transwell 小室试验检测结果显示,与 Control siRNA 组、BC 组比较,DJ-1 siRNA 组的迁移细胞数明显减少,表明下调 DJ-1 的表达后 HBE 细胞的体外迁移和侵袭能力减弱。

DJ-1 参与调节细胞的生长周期,在细胞的分裂、增殖、迁移、侵袭中起到了重要作用。笔者前期的研究表明,DJ-1 作为促癌因子加速了细胞周期进程,促进了肺鳞癌细胞系(SK-MES-1 细胞)的侵袭与迁移^[11]。结合本研究结果,表明 DJ-1 作为促癌因子,不仅在肺鳞癌细胞的生长、增殖过程中起作用,而且可能在 HBE 细胞的生长、增殖过程中也起到重要作用。目前,DJ-1 的作用机制尚未完全明确,因此对 DJ-1 的不断深入研究可加深人们对帕金森病以及肿瘤发生、发展、转移等的认知,为临床治疗提供新的研究方向。

参考文献

- [1] YAMANE T, KOZUKA M, YAMAMOTO Y, et al. Protease activity of legumain is inhibited by an increase of cystatin E/M in the DJ-1-knockout mouse spleen, cerebrum and heart[J]. *Biochem Biophys Res*, 2017, 9: 187-192.
- [2] ARIGA H, IGUCHI-ARIGA S M M. Introduction/overview[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1037: 1-4.
- [3] BIOSA A, SANDRELLI F, BELTRAMINI M, et al. Recent findings on the physiological function of DJ-1: beyond Parkinson's disease[J]. *Neurobiol Dis*, 2017, 108: 65-72.
- [4] KAWATE T, TSUCHIYA B, IWAYA K. Expression of DJ-1 in cancer cells: its correlation with clinical significance[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1037: 45-59.
- [5] YANG J, KIM K S, IYIRHIARO G O, et al. DJ-1 modulates the unfolded protein response and cell death via up-regulation of ATF4 following ER stress[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(2): 135.
- [6] GUADAGNO E, BORRELLI G, PIGNATIello S, et al. Anti-apoptotic and anti-oxidant proteins in glioblastomas: immunohistochemical expression of beclin and DJ-1 and its correlation with prognosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(16): 4066.
- [7] IM J Y, LEE K W, WOO J M, et al. DJ-1 induces thioredoxin 1 expression through the Nrf2 pathway[J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(13): 3013-3024.
- [8] KIM R H, PETERS M, JANG Y, et al. DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN[J]. *Cancer Cell*, 2005, 7(3): 263-273.
- [9] MARTIN-NIETO J, URIBE M L, ESTEVE-RUDD J, et al. A role for DJ-1 against oxidative stress in the mammalian retina[J]. *Neurosci Lett*, 2019, 708: 134361.
- [10] ELTOWEISSY M, DIHAZI G H, MULLER G A, et al. Protein DJ-1 and its anti-oxidative stress function play an important role in renal cell mediated response to profibrotic agents[J]. *Mol Biosyst*, 2016, 12(6): 1842-1859.
- [11] 魏旺丽, 汤参娥, 詹显全, 等. siRNA 抑制 DJ-1 基因表达对肺鳞癌 SK-MES-1 细胞生物学行为的影响[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2013, 38(1): 7-13.

(收稿日期: 2021-09-10 修回日期: 2022-03-09)

(上接第 1172 页)

互换性,发现其互换性结果并不理想,且稀释后的 ERM-DA471 在大部分检测系统组合间的互换性发生改变,厂家在使用其进行量值传递的过程中需注意稀释对 ERM-DA471 互换性结果的影响。由于本研究仅使用 EP14-A3 对标准物质 ERM-DA471 的互换性进行评估,可能造成评估结果的片面性,今后的研究中将结合 IFCC 提出的互换性评估方案^[9],使标准物质的互换性评估更加合理、可靠。

参考文献

- [1] 国秀芝, 吴洁, 侯立安, 等. 五种可溯源胱抑素 C 检测结果的一致性评价[J]. *中华检验医学杂志*, 2014, 37(5): 365-370.
- [2] Institute for Reference Materials and Measurements, Joint Research Centre, European Commission. Certification of cystatin C in the human serum reference material ERM-DA471/IFCC[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2010, 48: 1619-1621.
- [3] 康娟, 王军, 李彦超, 等. 胱抑素 C 国家标准物质的研制[J]. *中华检验医学杂志*, 2013, 36(10): 942-946.
- [4] 张传宝, 赵海建, 曾洁, 等. 胱抑素 C 标准物质 ERM-DA471/IFCC 的互通性研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2015, 38(5): 306-309.
- [5] GRUBB A, BLIRUP-JENSEN S, LINDSTROM V, et al. First certified reference material for cystatin C in human serum ERM-DA471/IFCC [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2010, 48(11): 1619-1621.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of commutability of processed samples; approved guideline-third edition; EP14-A3[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2014.
- [7] 刘庆香, 张天娇, 龙琪琛, 等. 参考物质互通性评价方案[J]. *检验医学*, 2021, 36(3): 245-249.
- [8] 陈宝荣, 邵燕, 刘春龙, 等. 不同评价方法对标准物质互换性评价结果的影响[J]. *临床检验杂志*, 2016, 34(11): 808-812.
- [9] NILSSON G, BUDD J R, GREENBERG N, et al. IFCC working group recommendations for assessing commutability part 2: using the difference in bias between a reference material and clinical samples[J]. *Clin Chem*, 2018, 64(3): 455-464.

(收稿日期: 2021-08-16 修回日期: 2022-02-09)