

- ter sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node metastases: the American College of Surgeons Oncology Group Z0011 randomized trial [J]. *Ann Surg*, 2010, 252(3): 426-432.
- 3 Meretoja TJ, Leidenius MH, Heikkilä PS, et al. International multi-center tool to predict the risk of nonsentinel node metastases in breast cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2012, 104(24): 1888-1896.
- 4 Perhac A, Perme MP, Hocevar M, et al. Ljubljana nomograms for predicting the likelihood of non-sentinel lymph node metastases in breast cancer patients with a positive sentinel lymph node [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 119(2): 357-366.
- 5 Pal A, Provenzano E, Duffy SW, et al. A model for predicting non-sentinel lymph node metastatic disease when the sentinel lymph node is positive [J]. *Br J Surg*, 2008, 95(3): 302-309.
- 6 van la Parra RF, Peer PC, Ernst MF, et al. Meta-analysis of predictive factors for non-sentinel lymph node metastases in breast cancer patients with a positive SLN [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2011, 37(4): 290-299.
- 7 Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, et al. Technical outcomes of sentinel-lymph-node resection and conventional axillary-lymph-node dissection in patients with clinically node-negative breast cancer: results from the NSABP B-32 randomised phase III trial [J]. *Lancet Oncol*, 2007, 8(10): 881-888.
- 8 Chen K, Zhu L, Jia W, et al. Validation and comparison of models to predict non-sentinel lymph node metastasis in breast cancer patients [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(2): 274-281.
- [收稿日期 2014-04-11] [本文编辑 刘京虹 吕文娟]

课题研究 · 论著

腺病毒过表达及 siRNA 干扰人肝癌 HepG2 细胞对 11 β -羟基类固醇脱氢酶 I 表达的影响

隋靖喆, 李国平, 李 山

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81060199)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院检验科(隋靖喆, 李 山); 100730 北京, 国家卫计委北京老年医学研究所生化室(李国平)

作者简介: 隋靖喆(1986-), 女, 研究生学历, 硕士学位, 检验技师, 研究方向: 肝癌的发生机制。E-mail: 236149848@qq.com

通讯作者: 李 山(1962-), 男, 医学博士, 教授, 研究方向: 肝癌的蛋白组学等。E-mail: lis8858@126.com

[摘要] 目的 观察腺病毒(Ad-11 β -HSD1)过表达系统及特异性 siRNA(siRNA-11 β -HSD1)干扰人肝癌 HepG2 细胞对 11 β -羟基类固醇脱氢酶 I(11 β -HSD1)表达的影响。方法 应用 Ad-11 β -HSD1 以及 siRNA-11 β -HSD1 转染人肝癌 HepG2 细胞, 用实时荧光定量 PCR 及 Western Blot 检测 11 β -HSD1 表达。结果 转染 72 h 后, 对照组及腺病毒过表达组细胞中均可见明显 GFP 荧光, 且转染 48 h 后蛋白水平明显升高; siRNA 干扰 48 h 后, mRNA 及蛋白水平均明显降低。结论 腺病毒转染可有效过表达 11 β -HSD1, 而 siRNA 干扰可有效抑制 11 β -HSD1 表达。

[关键词] HepG2; 腺病毒; siRNA 干扰; 11 β -羟基类固醇脱氢酶 I**[中图分类号]** R 44 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2014)06-0492-04

doi: 10.3969/j.issn.1674-3806.2014.06.03

The effects of overexpression and siRNA interference of the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 on the expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase I SUI Jing-zhe, LI Guo-ping, LI Shan. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To design a adenovirus vector based system and specific siRNA for exploring the effects of overexpression and siRNA interference of the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 on the expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase I. **Methods** A adenovirus overexpression vector and specific siRNA targeting the 11 β -HSD1 gene was designed and transfected into HepG2 cells. Expression of 11 β -HSD1 mRNA and

protein was analyzed by real time PCR and Western blotting. **Results** A adenovirus transfection resulted in upgrade of 11 β -HSD1 protein, and siRNA transfection led to inhibition of 11 β -HSD1 mRNA and protein. **Conclusion** Transfection of the hepatocellular carcinoma cell line HepG2 using a adenovirus vector and siRNA interference can significantly influence expression of 11 β -HSD1 mRNA and protein.

[**Key words**] HepG2; Adenovirus; siRNA interference; 11 β -HSD1

脂肪肝是指由于各种原因引起的肝细胞内脂肪堆积过多的病变。脂肪性肝病正严重威胁着人们的健康,成为仅次于病毒性肝炎的第二大肝病,已被公认为隐蔽性肝硬化的常见原因。脂肪肝属可逆性疾病,早期诊断并及时治疗常可恢复正常。近年来,大量研究^[1-3]发现 11 β -羟基类固醇脱氢酶 I (11 β -HSD1) 可通过激活糖皮质激素进而导致代谢综合征,而脂肪肝是代谢综合征主要的肝脏表现。因此,本研究通过腺病毒过表达及 siRNA 干扰人肝癌 HepG2 细胞,观察其对 11 β -HSD1 的影响,为后续研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株来源 人肝癌细胞 HepG2 细胞购自中国医学科学院基础研究所细胞中心。

1.1.2 主要试剂 MEM 培养基购自 Gibco 公司,胰蛋白酶购自 sigma 公司,胎牛血清购自美国 Hyclone,过表达腺病毒和 siRNA 购自上海吉凯基因化学技术有限公司,总核糖核酸(RNA)抽提试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒购自 Promega 公司,SYBR Premix 购自 TaKaRa 公司,蛋白裂解液购自北京索莱宝公司,BCA 蛋白检测试剂盒、蛋白酶抑制剂及 effectene 转染试剂购自 Thermo Scientific 公司,山羊抗人 11 β -HSD1 一抗购自 R&D 公司,鼠抗人 β -actin 内参一抗、辣根酶标记山羊抗鼠和兔抗山羊二抗均购自北京中杉金桥公司,PVDF 膜、滤纸及 ECL 化学发光液均购自 Millipore,Tris-HCl 缓冲液(TBS)由实验室配置,11 β -HSD1 引物及 18S 内参引物由北京赛百盛公司合成。

1.2 方法

1.2.1 Ad-11 β -HSD1 以及 siRNA-11 β -HSD1 的设计、构建及合成全部由上海吉凯基因化学技术有限公司完成。将构建好的腺病毒在 293T 细胞中测定并标定病毒滴度,再检测复感染指数(MOI 值:单个细胞感染的病毒颗粒数)后进行细胞腺病毒转染。

1.2.2 细胞培养和转染 人肝癌 HepG2 细胞用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基,置于 37 °C 含 5% CO₂ 的培养箱中培养。待培养瓶内细胞长满且状态良好时将其接种于六孔板中,当细胞密度约 70% 时,加

入 Ad-GFP 及 Ad-11 β -HSD1 处理细胞。对照组和过表达处理组均加入 MEM 培养基 1 ml,而后分别加入 50MOI Ad-GFP 10 μ l,50MOI Ad-11 β -HSD1 10 μ l,最后用 MEM 培养基将每孔液体量调至 2 ml。放入 37 °C 5% CO₂ 的培养箱中培养。8 h 后为六孔板换液,弃去细胞上清液,重新加入含血清的 MEM 培养基继续培养。另外接种一个六孔板,当细胞密度约为 30% 时,用 Effectene 转染试剂按照说明书将 sre-siRNA 及 siRNA-11 β -HSD1 转染细胞,然后放入 37 °C 5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.2.3 Western blot 检测 11 β -HSD1 蛋白的表达 收集过表达及干扰处理后的蛋白,用 BCA 试剂盒检测标准品及样品,计算出样本浓度。应用 12% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离胶及 5% 的浓缩胶,以恒压 80 V 待溴酚蓝进入分离胶后调至 120 V,到达底部后停止电泳。恒流 300 mA 电转移 3 h 至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后分别放入 11 β -HSD1 一抗(1:1 000 稀释)及 β -actin 一抗(1:5 000 稀释)中 4 °C 过夜孵育。次日用 TBST(TBS 加 1% 吐温 20)漂洗 PVDF 膜 3 次,10 min/次。再放入辣根过氧化物酶标记的相应二抗(均 1:8 000 稀释)中室温孵育 2 h,而后再用 TBST 漂洗 PVDF 膜 3 次,10 min/次。等量 ECL 发光液 A 液和 B 液混合均匀滴加到膜上面显影,最后用 Quality One 软件分析蛋白条带灰度值。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测 siRNA 干扰 11 β -HSD1 蛋白表达 用 Trizol 试剂按说明书提取细胞总 mRNA,后用逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录合成 cDNA。根据 RT-PCR 说明书操作,每组各 3 个平行孔分别扩增 11 β -HSD1 基因及 18S 内参基因,读取 Ct(cut-off)值,结果参考“2^{- $\Delta\Delta$ Ct}”法^[4]计算。

1.3 统计学方法 应用 SPSS16.0 软件对数据进行统计学处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两个样本均数比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组转染后 11 β -HSD1 蛋白相对表达水平比较 Western blot 法检测结果显示腺病毒转染入人肝癌 HepG2 细胞后,11 β -HSD1 蛋白表达水平明显

上升(见图1,表1);siRNA 转染后,11 β -HSD1 蛋白表达水平明显被抑制(见图2,表2)。



图1 腺病毒转染后 11 β -HSD1 的蛋白表达情况

表1 腺病毒转染后两组 11 β -HSD1 蛋白
相对表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	11 β -HSD1 蛋白表达
对照组(Ad-GFP)	3	0.745 $\pm$ 0.004
腺病毒组(Ad-11 β -HSD1)	3	1.270 $\pm$ 0.006
<i>t</i>	-	-271.715
<i>P</i>	-	1.354E-05



图2 siRNA 转染后 11 β -HSD1 的蛋白表达情况

表2 siRNA 转染后两组 11 β -HSD1 蛋白
相对表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	11 β -HSD1 蛋白表达
对照组(sre-siRNA)	3	1.232 $\pm$ 0.004
siRNA 组(siRNA-11 β -HSD1)	3	0.691 $\pm$ 0.008
<i>t</i>	-	239.947
<i>P</i>	-	1.737E-05

2.2 两组转染 48、72 h 后 11 β -HSD1 mRNA 相对表达水平比较 实时荧光定量 PCR 检测结果表明,将 siRNA 转染入人肝癌 HepG2 细胞株后,48 h 即可检测到绿色荧光蛋白(GFP)荧光,72 h 后 GFP 荧光明显增强(见图3)。siRNA 转染后 11 β -HSD1 mRNA 明显被抑制,且与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表3。



对照组 HepG2 细胞的荧光表
达($\times 100$)

腺病毒组 HepG2 细胞的荧光
表达($\times 100$)

图3 siRNA 转染 72 h 后两组 HepG2 细胞的荧光表达

表3 siRNA 转染后两组 11 β -HSD1 mRNA
相对表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	11 β -HSD1 mRNA 表达
对照组(sre-siRNA)	3	1.000 $\pm$ 0.000
siRNA 组(siRNA-11 β -HSD1)	3	0.815 $\pm$ 0.002
<i>t</i>	-	185.000
<i>P</i>	-	2.922E-05

3 讨论

3.1 11 β -HSD1 是一种微粒体酶,位于内质网膜上^[5],在人肝脏及脂肪组织中大量表达,在老鼠肝脏内的表达量及酶的活性约是其他组织的 10 倍。11 β -HSD 主要分为两种亚型,分别是 11 β -HSD1 和 11 β -HSD2,然而二者的作用并不相同。11 β -HSD1 是一种双向调节的氧化还原酶,既可以使糖皮质激素失活,还可将惰性代谢物激活;而 11 β -HSD2 是一种单向调节脱氢酶,只可将活性糖皮质激素转化为惰性代谢物^[6]。11 β -HSD1 在人体中可将可的松转化为有活性的氢化可的松,在老鼠体内则是将肾上腺酮转化为 11-脱氢皮质酮^[7];11 β -HSD2 则可将肾脏及肠内氢化可的松转化为无活性的可的松^[8]。11 β -HSD1 由于其对糖皮质激素的活化作用进而导致了代谢综合征等代谢异常疾病而得到了广泛的关注。代谢综合征主要是由于糖皮质激素分泌过多导致,而脂肪肝是其主要的肝表现。有研究^[9]证明,人肝癌 HepG2 细胞较易构建脂肪肝模型,因此本课题选择此细胞系进行实验。

3.2 近年来,脂肪肝在中国人群中的发病率越来越高,随之而来的相关研究也不断增加。11 β -HSD1 由于其可催化无活性的糖皮质激素转化为有活性的糖皮质激素,进而影响糖脂代谢,造成糖脂代谢异常,进而进展为代谢综合征。对此,有相关研究^[10]发现长期抑制 11 β -HSD1 可以有效地降低高血压、胰岛素抵抗及血脂异常等代谢综合征症状。目前已发现姜黄素及姜黄素类似物等可用作 11 β -HSD1 特异性抑制剂通过干扰脂肪合成,而成为治疗代谢综合征的靶点^[2,8]。代谢综合征由于其复杂的发病机理及临床症状,一直以来都是研究的热点。而肝脏的主要表现脂肪肝的发病原因及机理也同样未十分明确。

3.3 本课题通过腺病毒包装过表达技术及 siRNA 技术,将腺病毒及 siRNA 转染入人肝癌 HepG2 细胞,成功的过表达或抑制 11 β -HSD1 蛋白的水平。

由此证明腺病毒介导的转染及 siRNA 介导的瞬时转染均可以有效影响 11 β -HSD1 的表达。这不仅进一步验证了两种方法的可行性及有效性,为腺病毒及 siRNA 转染技术的发展和运用提供了依据,同时为进一步研究过表达及抑制 11 β -HSD1 基因的表达对脂肪肝和胰岛素抵抗等代谢综合征的影响奠定了基础。

参考文献

- 1 Ahmed A, Rabbitt E, Brady T, et al. A switch in hepatic cortisol metabolism across the spectrum of non alcoholic fatty liver disease [J]. PLoS One, 2012, 7(2): e29531.
- 2 Bujalska IJ, Gathercole LL, Tomlinson JW, et al. A novel selective 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor prevents human adipogenesis[J]. J Endocrinol, 2008, 197(2): 297-307.
- 3 Konopelska S, Kienitz T, Hughes B, et al. Hepatic 11 β -HSD1 mRNA expression in fatty liver and nonalcoholic steatohepatitis[J]. Clin Endocrinol(Oxf), 2009, 70(4): 554-560.
- 4 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- 5 Walker EA, Clark AM, Hewison M, et al. Functional expression, characterization, and purification of the catalytic domain of human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1[J]. J Biol Chem, 2001, 276(24): 21343-21350.
- 6 Morris DJ, Brem AS, Ge R, et al. The functional roles of 11 β -HSD1: vascular tissue, testis and brain[J]. Mol Cell Endocrinol, 2003, 203(1-2): 1-12.
- 7 Ricketts ML, Shoemith KJ, Hewison M, et al. Regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in primary cultures of rat and human hepatocytes[J]. J Endocrinol, 1998, 156(1): 159-168.
- 8 Hu GX, Lin H, Lian QQ, et al. Curcumin as a potent and selective inhibitor of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1: improving lipid profiles in high-fat-diet-treated rats[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e49976.
- 9 Okamoto Y, Tanaka S, Haga Y. Enhanced GLUT2 gene expression in an oleic acid-induced in vitro fatty liver model[J]. Hepatol Res, 2002, 23(2): 138-144.
- 10 Schnackenberg CG, Costell MH, Krosky DJ, et al. Chronic inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity decreases hypertension, insulin resistance, and hypertriglyceridemia in metabolic syndrome[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 427640.

[收稿日期 2014-03-26][本文编辑 杨光和 蓝斯琪]

课题研究·论著

正畸固定矫治器矫治乳前牙反骀的疗效观察

卢仕英, 谭桂萍, 黄敏方

基金项目: 广西卫生厅科研课题(编号:Z2007149); 广西自然科学基金资助项目(编号:2012GXNSFAA053164)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院口腔正畸科

作者简介: 卢仕英(1987-), 女, 在读研究生, 研究方向: 口腔正畸学的临床及基础研究。E-mail: lucial110@qq.com

通讯作者: 黄敏方(1966-), 女, 医学硕士, 主任医师, 研究方向: 口腔科学, 尤其是口腔正畸医学的临床及基础研究。E-mail: mfhmf@sina.com

[摘要] 目的 探讨固定矫治器治疗乳前牙反骀的疗效。方法 对 2011-01~2014-03 在广西壮族自治区人民医院口腔正畸科自愿选择固定矫治器进行矫治的 15 例错骀畸形病例的治疗效果进行分析。结果 15 例患者最长反骀解除时间 2 个月, 最短 3 周, 平均疗程(4 $\pm$ 0.5)个月。矫治后前牙覆骀(牙骀)覆盖关系正常, 追踪 2 年, 13 例牙性及功能性反骀疗效稳定, 无复发。2 例有骨性反骀遗传史, 反骀复发。结论 固定矫治器治疗乳前牙反骀能够减少患儿的不配合及就诊次数, 并顺利地解除乳前牙反骀, 是一种治疗乳前牙反骀的高效矫治器。

[关键词] 固定矫治器; 疗法; 乳牙; 前牙; 反骀

[中图分类号] R 782 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2014)06-0495-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2014.06.04