

# *Bmi-1* 基因沉默对人视网膜母细胞瘤 SO-RB<sub>50</sub> 细胞生长的体外抑制作用

谢满云, 钟秀凤, 李永平\*, 郑健樑, 林健贤, 张文忻

(中山大学中山眼科中心//眼科学国家重点实验室病理室, 广东 广州 510060)

**摘要:**【目的】探讨体外沉默 *Bmi-1* 基因对人视网膜母细胞瘤 SO-RB<sub>50</sub> 瘤细胞增殖和凋亡的影响。【方法】免疫组织化学和 RT-PCR 分别检测 *Bmi-1* 基因在人视网膜母细胞瘤组织和 SO-RB<sub>50</sub> 瘤细胞中的表达。体外化学合成法合成的靶向 *Bmi-1* 基因的 siRNA 双链转染培养的人 SO-RB<sub>50</sub> 瘤细胞。荧光定量 RT-PCR 和 western-blot 分别检测转染 *Bmi-1* siRNA 后的人 SO-RB<sub>50</sub> 瘤细胞中 *Bmi-1* mRNA 和蛋白水平的变化。MTT 法测定 *Bmi-1* 基因干扰后 SO-RB<sub>50</sub> 瘤细胞增殖情况。流式细胞仪检测 *Bmi-1* siRNA 对人 SO-RB<sub>50</sub> 瘤细胞凋亡的影响。【结果】免疫组化和 RT-PCR 显示 *Bmi-1* 基因在人视网膜母细胞瘤组织和 SO-RB<sub>50</sub> 瘤细胞中表达。人 SO-RB<sub>50</sub> 瘤细胞经 *Bmi-1* 沉默处理后, 与阴性对照组相比, *Bmi-1* 在 mRNA 和蛋白水平抑制率分别为  $(83.9 \pm 3.2)\%$  和  $(82.8 \pm 1.1)\%$ 。MTT 结果显示干扰组细胞在第 3 天增殖抑制作用最明显, 抑制率达  $(52.5 \pm 1.9)\%$ 。干扰组人 SO-RB<sub>50</sub> 瘤细胞凋亡率为  $(20.7 \pm 1.1)\%$ , 阴性组细胞凋亡率为  $(1.9 \pm 0.2)\%$ , 两者有统计学差异。【结论】*Bmi-1* 特异性 siRNA 能显著抑制人 SO-RB<sub>50</sub> 瘤细胞 *Bmi-1* 基因的表达, 抑制细胞生长, 可能通过促进瘤细胞凋亡而起作用, *Bmi-1* 基因可能为 RB 治疗的新靶点。

**关键词:** 视网膜母细胞瘤; *Bmi-1*; RNA 干扰

中图分类号: R739.7; R774.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2011)06-0723-06

## Inhibitory Effect of *Bmi-1* Knockdown on Growth of Human SO-RB<sub>50</sub> Cells In Vitro

XIE Man-yun, ZHONG Xiu-feng, LI Yong-ping\*, ZHENG Jian-liang, LIN Jian-xian, ZHANG Wen-xin

(Department of Pathology, State Key Laboratory of Ophthalmology//Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the effect of *Bmi-1* gene knockdown on the proliferation and apoptosis in human SO-RB<sub>50</sub> cells. 【Methods】 *Bmi-1* expression was examined in human retinoblastoma tissue and SO-RB<sub>50</sub> cells by immunohistochemistry and RT-PCR. Chemically synthesized *Bmi-1* siRNA was transfected into SO-RB<sub>50</sub> cells. After *Bmi-1* siRNA transfection, expression of *Bmi-1* mRNA and protein in SO-RB<sub>50</sub> cells were examined by real time RT-PCR and Western blot analysis. Cell growth and proliferation were analyzed by MTT assay. Cell apoptosis was observed by flow cytometry. 【Results】 *Bmi-1* was expressed in human retinoblastoma tissue and SO-RB<sub>50</sub> cells. After *Bmi-1* siRNA treatment, *Bmi-1* mRNA and protein in SO-RB<sub>50</sub> cells were dramatically decreased by  $(83.9 \pm 3.2)\%$  and  $(82.8 \pm 1.1)\%$ , respectively. After *Bmi-1* knockdown, MTT showed that *Bmi-1* siRNA could significantly inhibit SO-RB<sub>50</sub> cell proliferation. The inhibitory effect reached peak at 96 hours [ $(52.5 \pm 1.9)\%$ ] after transfection. Cell apoptosis rate was promoted up to  $(20.7 \pm 1.1)\%$  in the siRNA treated cells while cell apoptosis rate was  $(1.9 \pm 0.2)\%$  in the negative group. 【Conclusion】 Specific *Bmi-1* siRNA could inhibit the expression of *Bmi-1* and inhibit human SO-RB<sub>50</sub> cell growth in vitro. The effect might be attributed to promoting cell apoptosis. These results suggest that *Bmi-1* may be a new therapy target in RBs.

**Key words:** retinoblastoma; *Bmi-1*; RNAi

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(6): 723-728]

收稿日期: 2011-07-08

基金项目: 国家自然科学基金(30672276); 广东省科技计划项目(2006B36006007; 2008B030301081)

作者简介: 谢满云, 硕士, E-mail: xiemanyn701@yahoo.cn; \* 通信作者, 李永平, 教授, 研究方向: 眼疾病的发病机理, E-mail: yongpingli1961@yahoo.com.cn

视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)为婴幼儿最常见的眼内恶性肿瘤。现有针对 RB 的治疗手段包括化疗、激光光凝、冷冻、放疗和眼球摘除等。首选的治疗方案为全身化疗联合局部巩固治疗(如光凝和冷冻),但这种方案对晚期 RB 患者疗效差,同时化疗伴随有严重的毒副作用,且面临着化疗耐药性的问题<sup>[1]</sup>。近年来肿瘤分子生物学新发现层出不穷,使得基因治疗成为一种具有广阔应用前景的治疗方式。*Bmi-1* 在多种肿瘤中表达,且和肿瘤发生发展和预后息息相关<sup>[2]</sup>。本研究采用 RNA 干扰技术来抑制 *Bmi-1* 基因的表达,观察 *Bmi-1* siRNA 对人视网膜母细胞瘤细胞株 SO-RB<sub>50</sub> 瘤细胞中 *Bmi-1* 基因表达的抑制作用及对细胞增殖和凋亡的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞株 SO-RB<sub>50</sub> 的培养

人视网膜母细胞瘤细胞株 SO-RB<sub>50</sub> 瘤细胞由本实验室培养建立<sup>[3]</sup>,于 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液中在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养。

### 1.2 瘤组织及 SO-RB<sub>50</sub> 瘤细胞中 *Bmi-1* 的免疫组织化学染色

免疫组化染色采用标准 SP 法。人视网膜母细胞瘤瘤组织经甲醛溶液固定,石蜡包埋后,4 μm 连续切片,组织薄片置于载玻片上,脱蜡至水;在高温下 0.01 mol/L 枸橼酸盐作组织抗原修复后 PBS 冲洗 3 min × 3 次;30 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 37 °C 孵育 10 min 后 PBS 冲洗 3 min × 3 次,以阻断内源性过氧化物酶的活性;100 mL/L 的山羊血清 37 °C 下孵育 10 min,鼠抗人 *Bmi-1* 单克隆抗体(1:100, abcam ab14389)37 °C 孵育 1 h,增强剂 37 °C 下孵育 15 min,羊抗鼠二抗 37 °C 孵育 20 min;DAB 显色 6 min, Mayer 苏木素复染 1 min。将 L-多聚赖氨酸处理过的盖玻片置于培养皿中,加入 SO-RB<sub>50</sub> 细胞悬液行细胞爬片,培养 1 d 后取出盖玻片,PBS 洗 3 遍,无水甲醇固定 5 min,PBS 冲洗;3 mL/L 的 Triton X-100 室温下孵育 20 min 进行破膜,PBS 漂洗 3 次 × 2 min;;100 mL/L 的山羊血清 37 °C 下孵育 10 min,余下步骤同组织免疫组化步骤。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。上述所用的抗体及试剂盒除一抗外,均来自福州迈新生物技术公司。

### 1.3 RT-PCR

收集培养的 SO-RB<sub>50</sub> 细胞,PBS 洗 3 遍,采用 RT-PCR 法检测 *Bmi-1* mRNA 的表达。步骤简述如下:总 RNA 的提取按 Trizol(Invitrogen)操作说明书进行,紫外分光光度计检测 RNA 的吸光度值,各组 RNA 的 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 均为 1.8 ~ 2.0。取 1 μg 总 RNA,用 cDNA 第一链合成试剂盒(fermentas)进行逆转录。*Bmi-1* 引物:上游为 5' ggagaccagcaagtattg tctctttg 3',下游为 5' cattgctgctgggcatcgttaag 3',产物长度为 368 bp(58 °C)。 $\beta$ -actin 引物:上游为 5' catctcttgctcgaagtcca 3',下游为 5' atcatgtttgagacctt caac 3',产物长度为 318 bp(58 °C),引物由英骏生物技术有限公司合成。扩增条件为:94 °C 3 min,94 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 30 s,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经质量浓度为 2% 琼脂糖凝胶电泳后,GOLDVIEW(上海赛百盛)染色,凝胶成像系统照相。

### 1.4 细胞株转染效率的测定

Alexa Fluor 488 标记的阴性 siRNA(简称阴性 siRNA)转染 SO-RB<sub>50</sub> 细胞流程按照 Qiagen 公司提供的 Hiperfect 转染悬浮细胞的说明进行,简述如下:将 750 ng 的阴性 siRNA(Qiagen)加入 100 μL 无双抗无血清的 DMEM/F12 培养液(GIBCO)中稀释,轻轻吹打混匀后,加入转染试剂 Hiperfect(Qiagen)9 μL,充分混匀,室温下静置 10 min 使转染复合物充分形成。在 24 孔板中加入 100 μL 密度为 2 × 10<sup>6</sup> 的 SO-RB<sub>50</sub> 细胞悬液 100 μL,逐滴加入上述转染混合物,6 h 后每孔细胞加入 400 μL DMEM/F12 培养液。24 h 后收集细胞,PBS 洗涤,做细胞涂片,荧光显微镜下观察细胞的转染情况。

### 1.5 siRNA 靶向沉默 SO-RB<sub>50</sub> 细胞中的 *Bmi-1*

*Bmi-1* 干扰链购自 Qiagen 公司,分第一干扰链组(正义链为 5' AGACCAGACCACUACUGAATT 3',反义链为 5' UUCAGUAGUGGUCUGGUCUTG 3',靶向 *Bmi-1* 基因序列 5' caagaccagaccactactgaa 3';简称 1 链组),第二干扰链组(正义链为 5' GGGUCAUCAGCAACUUCUUTT 3',反义链为 5' AAGAAGUUGCUGAUGACCCAT 3',靶向 *Bmi-1* 基因序列 5' atgggtcatcagcaacttctt 3';简称 2 链组),阴性链组。转染流程以及 siRNA 和转染试剂用量比例如上。48 h 后分别收集各组 SO-RB<sub>50</sub> 细胞 RNA 及蛋白,行荧光定量 PCR 和 Western blot 分析,并筛选出在 mRNA 和蛋白水平干扰效率较高

的一个干扰链,用于以下干扰后细胞增殖和凋亡率变化的实验。

**1.5.1 荧光定量 PCR** 各组总 RNA 提取以及第一链合成参照前述,所用的 *Bmi-1* 引物和内参引物如上。按 Fermentas 公司提供的程序程序行 PCR:先 50 °C 2 min,95 °C 10 min 进行预处理和预变性;95 °C 15 s,60 °C 60 s,共 40 个循环。利用 SYBE Green 荧光染料定量检测在细胞中的表达情况,重复实验 3 次。

**1.5.2 Western blot** 收集干扰后各组的 SO-RB<sub>50</sub> 细胞蛋白,聚丙烯酰胺凝胶电泳 (120 V,1 h) 分离,恒流 250 mA 2 h 电转移蛋白至 PVDF 膜 (Millipore) 上,50 mg/L 脱脂奶粉 (广州威佳) 封闭 1 h,鼠抗人 *Bmi-1* 单克隆抗体 (1:1 000,abcam, ab14389) 4 °C 孵育过夜,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗 (1:2 000,中杉金桥) 室温孵育 1 h,在暗室内浸泡于化学发光显色底物 1 min,曝光 2~10 min,底片依次放入显影液、定影液,图像分析系统分析,重复实验 3 次。

## 1.6 *Bmi-1* 基因干扰后 SO-RB<sub>50</sub> 瘤细胞增殖的改变

分为 3 组:干扰组 (根据荧光定量 PCR 和 western-blot 的结果筛选出干扰效率高的 *Bmi-1* siRNA 双链做为干扰链)、阴性链组和正常细胞组。收集 SO-RB<sub>50</sub> 细胞接种并转染于 96 孔板,每孔终体积为 200 μL,分别于转染 1、2、3、4、5 d 后行 MTT 检测。每孔加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT,继续孵育 4 h,小心吸出大部分培养液,加入 DMSO 200 μL,微量振荡器振荡 10 min,酶标仪 490 nm 波长下测定各孔吸光度值 *A*。重复实验 3 次。抑制率 =  $(1 - A_{\text{干扰组或阴性组}} / A_{\text{正常值}}) \times 100\%$ 。

## 1.7 *Bmi-1* 基因干扰后 SO-RB<sub>50</sub> 瘤细胞凋亡的检测

试剂盒购自南京凯基生物公司。离心收集各组 SO-RB<sub>50</sub> 细胞,用 PBS 洗 2 次,各加入 500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀,再加入 5 μL Propidium Iodide,混匀。室温避光反应 5~15 min,用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率。重复实验 3 次。

## 1.8 统计学方法

应用 SPSS 16.0 统计软件。资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组均数比较用 *t* 检验,两组以上均数用单因素方差分析。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结 果

### 2.1 *Bmi-1* 在人视网膜母细胞瘤组织和 SO-RB<sub>50</sub> 瘤细胞中的表达

免疫组化染色显示人视网膜母细胞瘤组织和 SO-RB<sub>50</sub> 瘤细胞表达 *Bmi-1* 蛋白,主要定位于细胞核部位,呈浅黄色至褐色,阴性对照片无阳性细胞 (图 1)。抽提人 SO-RB<sub>50</sub> 细胞总 RNA 行 RT-PCR 后,琼脂糖凝胶电泳结果显示 368 bp 大小的条带为靶基因 *Bmi-1* mRNA 的扩增产物条带 (图 2)。

### 2.2 阴性 siRNA 成功转染入 SO-RB<sub>50</sub> 细胞

阴性 siRNA 转染人 SO-RB<sub>50</sub> 细胞 24 h 后荧光显微镜观察,成功转染的细胞细胞质中有绿色荧光分布,转染效率达  $(47.46 \pm 4.48)\%$  (图 3)。

### 2.3 靶向 *Bmi-1* 的 siRNA 干扰后 *Bmi-1* 表达降低

分别提取经阴性 siRNA 和 *Bmi-1* siRNA 处理过的 SO-RB<sub>50</sub> 瘤细胞总 RNA 行荧光定量 RT-PCR。与阴性组相比,1 链组 *Bmi-1* mRNA 表达抑制率为  $(83.9 \pm 3.2)\%$ ,2 链组 *Bmi-1* mRNA 表达抑制率为  $(64.0 \pm 3.6)\%$ ,经比较有统计学差异 ( $P < 0.05$ ) (图 4A)。Western-blot 显示 RNA 干扰 48 h 后,与阴性组相比,1 链组 *Bmi-1* 蛋白表达抑制率为  $(82.8 \pm 1.1)\%$ ,2 链组 *Bmi-1* 蛋白表达抑制率为  $(39.7 \pm 2.5)\%$ ,经比较有统计学差异 ( $P < 0.05$ ) (图 4B、C)。由荧光定量 RT-PCR 和 Western-blot 结果可知,*Bmi-1* 第一干扰链的沉默效率较高,故下游实验均选择第一干扰链行相关检测。

### 2.4 *Bmi-1* 基因沉默后 SO-RB<sub>50</sub> 细胞增殖速度改变

转染 1 d 后,与正常对照组相比,干扰组细胞增殖抑制率为  $(15.6 \pm 3.8)\%$ ,第 3 天达高峰,抑制率为  $(52.5 \pm 1.9)\%$ ,第 4 天抑制作用减弱 (图 5),各时间点抑制率与相应时间点的正常对照组相比,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),而阴性链组对细胞增殖无明显抑制作用。

### 2.5 *Bmi-1* 沉默后凋亡率升高

*Bmi-1* siRNA 干扰组和阴性组的 SO-RB<sub>50</sub> 细胞经过 48 h 的处理并行流式细胞仪细胞凋亡分析。干扰组的 SO-RB<sub>50</sub> 细胞凋亡率为  $(20.7 \pm 1.1)\%$ ,阴性组 SO-RB<sub>50</sub> 细胞凋亡率为  $(1.9 \pm 0.2)\%$ ,经比较有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。

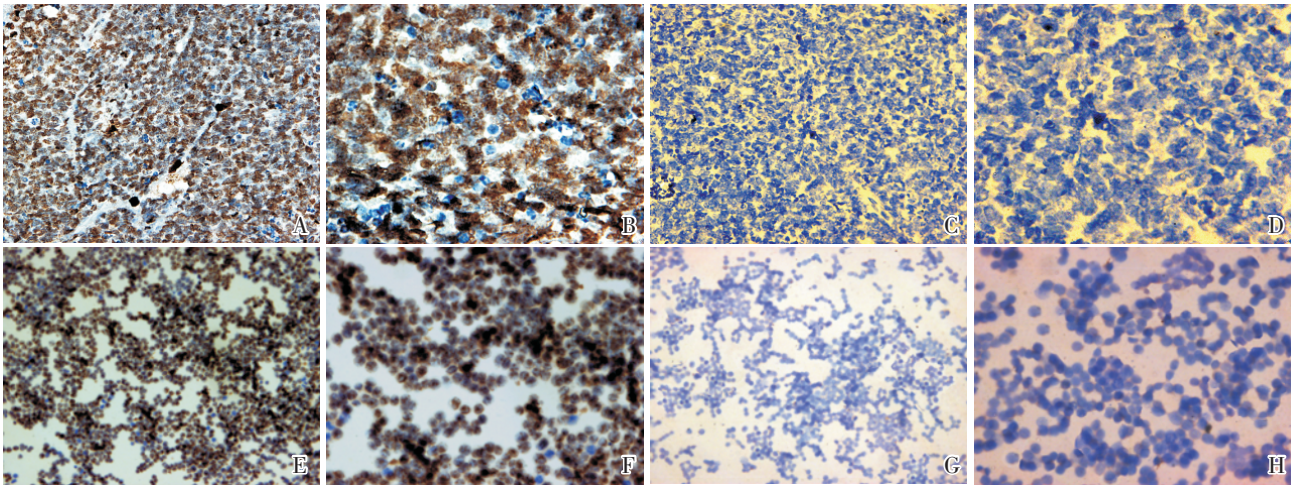


图 1 人视网膜母细胞瘤组织和 SO-RB<sub>50</sub> 瘤细胞 Bmi-1 免疫组化图片

Fig.1 Immunohistochemistry of Bmi-1 in human retinoblastoma tissues and SO-RB<sub>50</sub> cells

A, E; human retinoblastoma tissues and SO-RB<sub>50</sub> cells were positive for Bmi-1, × 100. B, F: immunoreactivity of Bmi-1 was localized mainly in the nucleus, × 200. C, G: No Bmi-1 was detected in negative control retinoblastoma tissues and SO-RB<sub>50</sub> cells, × 100. D, H: No immunoreactivity of Bmi-1 in the nucleus of the negative control retinoblastoma tissues and SO-RB<sub>50</sub> cells, × 200.

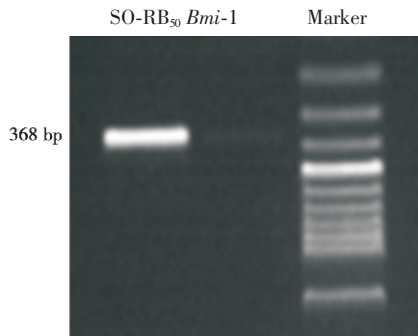


图 2 SO-RB<sub>50</sub> Bmi-1 mRNA 表达

Fig.2 Expression of Bmi-1 mRNA in SO-RB<sub>50</sub> cells

Reverse transcription-polymerase chain reaction of Bmi-1 mRNA in SO-RB<sub>50</sub> cells. Agarose gel electrophoresis showed a 368 bp electrophoretic strip.

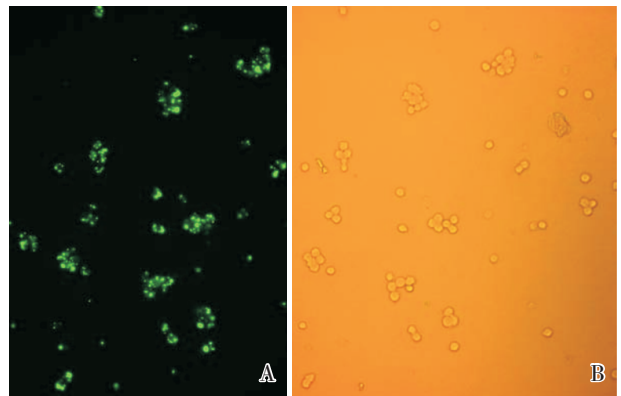


图 3 Alexa Fluor 488 标记的阴性 siRNA 转染 SO-RB<sub>50</sub> 细胞

Fig.3 Alexa Fluor 488 labeled siRNA transfection into SO-RB<sub>50</sub> cells

A: Fluorescence microscopy of transfected SO-RB<sub>50</sub> cells, × 100. B: Light microscopy of transfected SO-RB<sub>50</sub> cells, × 100.

### 3 讨论

原癌基因 *Bmi-1* 于鼠淋巴瘤细胞中首次发现, 其在鼠淋巴瘤细胞中与 *c-myc* 基因协同调节细胞衰老和增殖<sup>[4]</sup>。Reuben 将外源性的 *Bmi-1* 基因导入人正常口腔上皮细胞中, 发现其与 HPV-16 E6 协同延长细胞生命周期<sup>[5]</sup>。*Bmi-1* 基因在表皮的基底层和基底上层表达, 上调 *Bmi-1* 基因的表达时能够显著提高表皮细胞的增殖能力, 而且能够提高细胞对药物诱导凋亡的耐受能力, 从而认为 *Bmi-1* 可以使细胞在面临外界威胁时的生存能力增强<sup>[6]</sup>。另外, *Bmi-1* 在维持正常干细胞池, 保

证正常组织的发育, 保持肿瘤干细胞的功能中扮演重要角色<sup>[2]</sup>。*Bmi-1* 在神经系统<sup>[7]</sup>、血液系统<sup>[8]</sup>及人体其他部位的实体瘤<sup>[8-11]</sup>中表达已有报道, 并和肿瘤临床分期, 分级以及生存率相关, 因此被广泛认为是癌症诊断的标记之一及有可能成为肿瘤治疗新靶点。

已有报道, 应用 RNA 干扰技术在某些肿瘤细胞中下调 *Bmi-1* 基因的表达, 观察其对细胞所产生的生物学变化。在对食管癌细胞 EC9706 细胞的

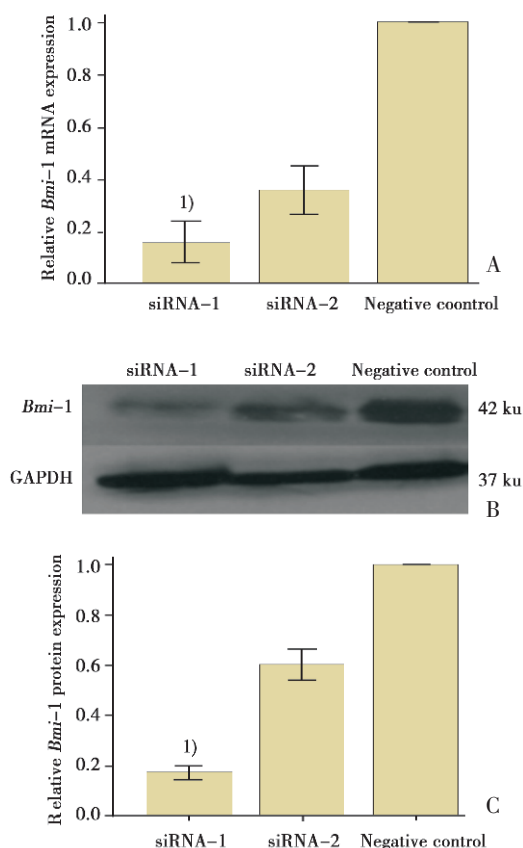


图 4 *Bmi-1* siRNA 对 SO-RB<sub>50</sub> 细胞的 mRNA 水平和蛋白水平的影响

Fig.4 Effects of B-cell-specific Moloney murine leukemia virus insertion site 1 (*Bmi-1*) siRNA on *Bmi-1* expression and protein translation in human SO-RB<sub>50</sub> cells

A: Relative signal intensities of *Bmi-1* mRNA Levels in SO-RB<sub>50</sub> cells were shown against  $\beta$ -actin. B: Western blotting of *Bmi-1* protein from the two siRNA treated groups and the negative group (upper panel). C: Relative signal intensities of *Bmi-1* protein levels in SO-RB<sub>50</sub> cells were shown against GAPDH, 1)  $P < 0.05$ .

研究中, Wang 等<sup>[12]</sup>发现 *Bmi-1* 下调可以阻滞细胞周期, 增加细胞的凋亡, 抑制细胞增殖; Cui 等<sup>[13]</sup>应用软琼脂实验和 NOD/SCID 鼠皮下成瘤实验研究发现, 下调神经母细胞瘤细胞中的 *Bmi-1* 基因后, 其体内外成瘤能力明显减弱; Qin 等<sup>[14]</sup>在其研究中发现, 下调 *Bmi-1* 的表达能够增强化疗药物 5-氟尿嘧啶对鼻咽癌细胞所产生的细胞凋亡作用, 从而增强其对 5-氟尿嘧啶的敏感度, 提高化疗药物对肿瘤的杀伤力。这些研究结果表明, *Bmi-1* 在某些肿瘤细胞的生长, 成瘤能力和耐药性方面都扮演着重要角色。

肿瘤发生发展与细胞凋亡失衡相关, 诱导肿

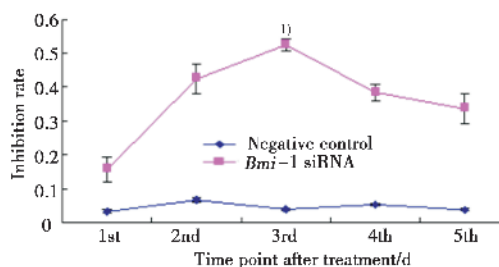


图 5 *Bmi-1* siRNA 对 SO-RB<sub>50</sub> 瘤细胞的生长抑制作用  
Fig.5 Effects of *Bmi-1* siRNA on the proliferation of human SO-RB<sub>50</sub> cells

Growth curves of SO-RB<sub>50</sub> cells were analyzed by MTT assay. The inhibition rate reached peak on day 3 after siRNA transfection. Each value is the mean  $\pm$  SD of triplicate cultures. 1)  $P < 0.05$

瘤细胞凋亡成为目前临床应用的肿瘤治疗手段之一。探讨凋亡在肿瘤防治中的作用, 有助于采取相应措施以提高肿瘤治疗效果。已有学者报道, *Bmi-1* 基因能够影响某些正常细胞和肿瘤细胞的增殖和凋亡<sup>[12, 15-16]</sup>。而 *Bmi-1* 基因影响细胞增殖凋亡的机制涉及其对 Ink4a-ARF 位点的负调节作用<sup>[17]</sup>。

*Bmi-1* 在神经系统肿瘤及眼部肿瘤中的研究并不多, Leung 等<sup>[18]</sup>研究显示髓母细胞瘤中 *Bmi-1* 的存在, Cui 等揭示 *Bmi-1* 在神经母细胞瘤细胞增殖和自我更新方面的作用<sup>[13]</sup>, Godlewski 等<sup>[19]</sup>揭示了 *Bmi-1* 在胶质瘤中增殖中的作用。此外, *Bmi-1* 基因对细胞凋亡的调节具有细胞特异性。Cui 等报道在人神经母细胞瘤 BE(2)-C 细胞的凋亡率不受影响<sup>[18]</sup>, *Bmi-1* 基因敲除对 A549 细胞凋亡率也无明显改变。可能是因为 *Bmi-1* 基因通过细胞周期等机制调节细胞的增殖, 而绕开凋亡途径<sup>[20]</sup>。

*Bmi-1* 基因和视网膜母细胞瘤的关系未见报道, 本研究采用稳定传代培养的 SO-RB<sub>50</sub> 细胞株, 以 *Bmi-1* siRNA 转染 SO-RB<sub>50</sub> 细胞, 使 *Bmi-1* 基因被干扰沉默, 检测 48 h 后凋亡率并描绘细胞生长曲线, 结果显示 *Bmi-1* 基因干扰后, 细胞增殖抑制, 在细胞凋亡方面, 我们的结果显示干扰后的 SO-RB<sub>50</sub> 细胞凋亡率明显比阴性组的细胞高。凋亡是细胞新陈代谢中的一种程序性死亡, 它是细胞从分裂到死亡的正常过程, 受机体诸多因素调节, 维持着新陈代谢。肿瘤中细胞增殖和凋亡失衡, 使细胞不受限制地生长, 表现为额外地长出组织团块。在本实验中视网膜母细胞瘤细胞基因被干扰, 增加了细胞凋亡, 使细胞减少过度生长, 也就抑制

或减慢了视网膜母细胞瘤细胞的生长。

综上所述,本研究揭示 *Bmi-1* 基因在人视网膜母细胞瘤细胞 SO-RB<sub>50</sub> 细胞中的表达,*Bmi-1* 基因表达下调对人 SO-RB<sub>50</sub> 细胞生长有抑制作用,其可能是通过增加细胞凋亡而作用。本实验对 *bmi-1* 基因对视网膜母细胞瘤的生长作用关系的探讨,有助于进一步深入揭示 *Bmi-1* 基因在视网膜母细胞瘤中扮演的角色,也预示 *Bmi-1* 基因可能成为 RB 治疗新靶点的潜在可能。

#### 参考文献:

- [1] Scheffler AC, Ciciarelli N, Feuer W, et al. Macular retinoblastoma: evaluation of tumor control, local complications, and visual outcomes for eyes treated with chemotherapy and repetitive foveal laser ablation [J]. *Ophthalmology*, 2007, 114(1): 162-169.
- [2] Jiang LL, Li J, Song LB. *Bmi-1*, stem cells and cancer [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2009, 41(7): 527-534.
- [3] 郑健樑, 易玉珍. 视网膜母细胞瘤细胞的体外培养及建系[J]. *眼科学报*, 1991, 7(4): 176-180.
- [4] van Lohuizen M, Frasch M, Wientjens E, et al. Sequence similarity between the mammalian *Bmi-1* proto-oncogene and the *Drosophila* regulatory genes *Psc* and *Su(z)* [J]. *Nature*, 1991, 353(6): 342-353.
- [5] Kim RH, Kang MK, Shin KH, et al. *Bmi-1* cooperates with human papillomavirus type-16 E6 to immortalize normal human oral keratinocytes [J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313(3): 462-472.
- [6] Lee K, Adhikary G, Balasubramanian S, et al. Expression of *Bmi-1* in epidermis enhances cell survival by altering cell cycle regulatory protein expression and inhibiting apoptosis [J]. *Invest Dermatol*, 2008, 128(1): 9-17.
- [7] Shakhova O, Leung C, Marino S, et al. *Bmi-1* in development and tumorigenesis of the central nervous system [J]. *Mol Med*, 2005, 83(8): 596-600.
- [8] Bhattacharyya J, Mihara K, Yasunaga S, et al. *BMI-1* expression is enhanced through transcriptional and posttranscriptional regulation during the progression of chronic myeloid leukemia [J]. *Ann Hematol*, 2009, 88(4): 333-340.
- [9] Kim JH, Yoon SY, Kim CN, et al. The *Bmi-1* oncoprotein is overexpressed in human colorectal cancer and correlates with the reduced p16INK4a/p14ARF proteins [J]. *Cancer Lett*, 2004, 203(2): 217-224.
- [10] Zhang FB, Sui LH, Xin T. Correlation of *Bmi-1* expression and telomerase activity in human ovarian cancer [J]. *Br J Biomed Sci*, 2008, 65(4): 172-177.
- [11] Qin ZK, Yang JA, Ye YL, et al. Expression of *Bmi-1* is a prognostic marker in bladder cancer [J]. *BMC Cancer*, 2009, 9(1): 61-66.
- [12] Wang JF, Liu Y, Liu WJ, et al. Expression of *Bmi-1* gene in esophageal carcinoma cell EC9706 and its effect on cell cycle, apoptosis and migration [J]. *Chin J Cancer*, 2010, 29(7): 689-696.
- [13] Cui H, Ma J, Ding J, Li T, et al. *Bmi-1* regulates the differentiation and clonogenic self-renewal of I-type neuroblastoma cells in a concentration-dependent manner [J]. *Biol Chem*, 2006, 281(45): 696-704.
- [14] Qin L, Zhang X, Zhang L, et al. Downregulation of *BMI-1* enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 371(3): 531-535.
- [15] Dovey JS, Kim CF, Lees JA, et al. *Bmi-1* is critical for lung tumorigenesis and bronchioalveolar stem cell expansion [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(33): 11857-11862.
- [16] Liu L, Andrews LG, Tollefsbol TO. Loss of the human polycomb group protein *BMI-1* promotes cancer-specific cell death [J]. *Oncogene*, 2006, 25(31): 4370-4375.
- [17] Park IK, Morrison J, Clarke MF, et al. *Bmi1*, stem cells, and senescence regulation [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(2): 175-179.
- [18] Leung C, Lingbeek M, Shakhova O, et al. *Bmi1* is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas [J]. *Nature*, 2004, 428(6980): 337-341.
- [19] Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, et al. Targeting of the *Bmi-1* oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(22): 9125-9130.
- [20] Yu Q, Su B, Liu D, et al. Antisense RNA-mediated suppression of *Bmi-1* gene expression inhibits the proliferation of lung cancer cell line A549 [J]. *Oligonucleotides*, 2007, 17(3): 327-335.

(编辑 刘清海)