文章编号:1000-5404(2007)18-1779-04

论著

RhoC-siRNA表达载体对肝癌细胞生长速度及侵袭力的影响

郑文建,梁 平,赵弘智 (第三军医大学新桥医院肝胆外科,重庆 400037)

提 要: 目的 构建RhoC-siRNA表达载体,研究其对肝癌细胞生物学行为的影响。**方法** 构建RhoC-siRNA表达载体,以脂质体转染法将之稳定转染入SK-Hep1肝癌细胞株,Western blot法鉴定转染细胞中RhoC蛋白表达的抑制情况,观察转染前后肝癌细胞形态、生长曲线、黏附、运动及体外侵袭能力的改变。**结果** 酶切及测序证实RhoC-siRNA真核表达载体构建成功,将之转染入肝癌细胞后,细胞中RhoC蛋白表达水平降低达60%,细胞形态及生长速度无明显改变,但细胞黏附、运动能力及体外侵袭能力均降低。**结论** RhoC-siRNA表达载体对肝癌细胞的形态及生长曲线无显著影响,但可抑制其体外侵袭转移能力,可为肝癌的生物学治疗提供新的方法。

关键词: RhoC;siRNA;肝癌细胞;侵袭
中图法分类号: R394-33;R73-362;R735.7 **文献标识码**: A

Role of RhoC-siRNA expression vector on growth velocity and invasiveness of hepatoma carcinoma cells

ZHENG Wen-jian, LIANG Ping, ZHAO Hong-zhi (Department of Hepatobiliary Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To construct a RhoC-siRNA expression vector, and study its role on the biological behaviors of hepatoma carcinoma cells. **Methods** RhoC-siRNA gene was synthesized and cloned into the expression vector pSilencer2.1. The constructed RhoC-siRNA expression vector was stably transfected into hepatoma carcinoma cell line SK-Hep1. The inhibitory effect of RhoC-siRNA on the expression of RhoC in transfected cells was detected by Western blotting. The morphous, growth velocity and the ability of cell adhesion, cell migration, cell invasion before and after transfection was observed. **Results** Enzyme digestion and DNA sequencing confirmed that the RhoC specific siRNA expression vector was constructed successfully. After transfection, RhoC expression was inhibited by 60%, and no marked difference was observed in cellular morphous and growth curve, while the ability of cell adhesion, cell migration, and cell invasion were markedly decreased. **Conclusion** The RhoC-siRNA expression vector can effectively suppress RhoC expression in transfected hepatoma carcinoma cells. Although having no effect on the morphous and growth velocity of hepatoma carcinoma cells, it decreases the potentiality of cell invasion and cell metastasis, which may provide a novel applicable strategy for gene therapy on hepatocellular carcinoma.

Key words: RhoC; siRNA; hepatoma carcinoma cell; invasion

Rho (ras homologous)亚家族成员(RhoA、B、C)是一类与ras同源的小GTP结合蛋白,Rho亚家族蛋白的异常表达可能与恶性肿瘤的侵袭、转移有关。已有的资料表明,RhoC基因产物的过量表达与肝癌发展及侵袭、转移有密切关系[1]。本研究通过构建RhoC特异性siRNA真核表达载体,并将之稳定转染到肝癌细胞株SK-Hep1中,以探讨抑制RhoC蛋白表达对肝癌细胞侵袭、转移等生物学行为的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株、菌株及质粒 人肝癌细胞株SK-Hep1购自中国科学院上海细胞所,大肠杆菌DH5(感受态细胞由新桥医院中心实验室保存,质粒pSilencer2.1为Ambion公司产品。

1.1.2 酶和试剂 新生牛血清(PAA),RPMI1640(Hyclone),G418(BPI),DOTAP(Roche),羊抗人RhoC多克隆抗体(Santa Cruz),HRP标记的兔抗羊二抗(北京中杉公司),质粒小

作者简介:郑文建(1973-),男,安徽省芜湖市人,博士研究生,主治医师,主要从事肝癌微转移方面的研究。电话:13527309155, E-mail: chunsj@sohu.com
通讯作者:梁 平,电话:(023)68774306, E-mail: Liangp303@medmail.com.cn
收稿日期:2006-11-20;修回日期:2007-02-12

量抽提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒(中鼎公司),T_4 DNA Ligase、*Bam*H Ⅰ、*Hind* Ⅲ、*Sal* Ⅰ、λ-*Eco*T14 Ⅰ 标准(TaKaRa)。其他试剂均为分析纯。

1.1.3 模板DNA 利用Ambion公司在线程序设计RhoC的特异性siRNA靶序列(AAGGATCAGTTTCCGGAGGTC),其作用靶点为人RhoC mRNA第176~197位核苷酸(GenBank BC009177),该序列经Blast查询与人类其他基因无同源性。

设计能够插入质粒pSilencer2.1的双链寡核苷酸基因片段(*Bam*H Ⅰ + Sense + Loop + Antisense + 终止信号 + *Sal* Ⅰ + *Hind* Ⅲ,A:5′-GATCC GGATCAGTTTCCGGAGGTCTTCAAGACGGACCTCCGGAAACCTGATCTTTTTTGTCGAC A-3′,B:5′-G CCTAGTCAAAGGCCTCCAG AAGTTCTGCCTGGAGGCCTTTGACTAGG AAAAAA CAGCTG TTCGA-3′),由武汉晶赛生物公司合成。

通用阴性对照质粒pSilencer2.1-HK为武汉晶赛生物公司产品,其编码的siRNA为ACTACCGTTGTTATAGGTG;该序列经过BLAST比较,与人、鼠基因库无明显同源。

1.2 方法

1.2.1 pSilencer2.1真核表达载体的构建及鉴定 将2条目的基因寡核苷酸单链进行退火连接,质粒pSilencer2.1用*Bam*H Ⅰ和*Hind* Ⅲ行双酶切后经1%琼脂糖凝胶电泳并回收大片段,用T_4 DNA连接酶将双链寡核苷酸与pSilencer2.1线性载体定向连接后转化大肠杆菌DH5α,挑选氨苄青霉素抗性菌落扩增培养,然后用质粒小量抽提试剂盒快速提取质粒,用*Sal* Ⅰ做酶切鉴定,并送上海英骏公司进行DNA全长自动测序。

1.2.2 重组体转染SK-Hep1细胞及转染后细胞中RhoC表达的检测 1×10^5个SK-Hep1细胞接种于6孔板中,待细胞融合达70%时分别用pSilencer2.1-RhoC-siRNA和pSilencer2.1-HK进行转染,48 h后按1∶5稀释传代并在培养基中加入G418(300 μg/ml)筛选培养2周左右,将抗性细胞克隆转至培养瓶中培养并传代建系,分别命名为SK-Hep1/RhoC-siRNA和SK-Hep1/HK细胞。收集细胞,用RIPA液裂解,离心取上清行SDS-PAGE及Western blot(一抗1∶500;二抗1∶2 000),DAB法进行RhoC蛋白条带的显色。采用Bandscan 5.0软件测定目的蛋白条带的灰度值,以此衡量RhoC表达水平。

1.2.3 细胞形态观察 连续传代培养,细胞爬片HE染色观察SK-Hep1/RhoC-siRNA细胞与SK-Hep1、SK-Hep1/HK细胞在大小、形态、核浆比上的差别。

1.2.4 细胞生长曲线绘制 取对数生长期细胞,以1×10^4/ml密度接种于24孔板,连续培养7 d,每日取8孔细胞用台盼蓝拒染法进行活细胞计数,绘制细胞生长曲线。

1.2.5 细胞黏附及迁移能力的检测[2] 细胞接种于包被matrigel(1 mg/ml)的24孔板中常规培养:①1 h后按MTT比色法测各孔细胞在570 nm波长的吸光度,并计算黏附率(黏附率=黏附细胞吸光度/总细胞吸光度×100%);②待细胞基本长满后划痕,以无血清培养液培养48 h后观察细胞向划痕区的迁移能力。

1.2.6 细胞侵袭分析 Boyden小室法[3]。培养16 h后计数PET膜下表面5个400倍显微视野中的细胞数,以侵袭细胞的数目反映细胞的侵袭能力。每组平行设3个小室。

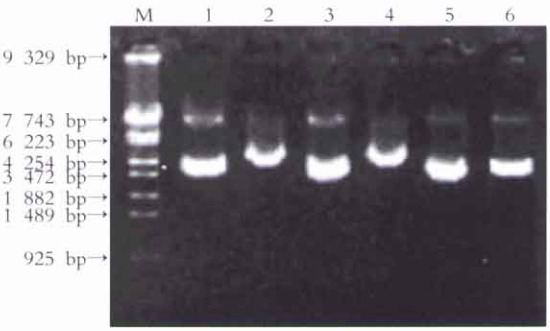
1.3 统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件对数据进行方差分析。

2 结果

2.1 pSilencer2.1真核表达载体的构建与鉴定

2.1.1 重组载体的酶切鉴定 将pSilencer2.1、pSilencer2.1-HK及重组的pSilencer2.1-RhoC-siRNA质粒分别进行*Sal* Ⅰ酶切电泳。质粒pSilence2.1的序列里没有*Sal* Ⅰ的酶切位点,不能被*Sal* Ⅰ所酶切,而在pSilencer2.1-RhoC-siRNA和pSilencer2.1-HK的插入序列里面设计了*Sal* Ⅰ的酶切位点,可被*Sal* Ⅰ所酶切,提示质粒重组成功。见图1。



M:λ-*Eco*T14 Ⅰ标准;1:pSilencer2.1-RhoC-siRNA;2:pSilencer2.1-RhoC-siRNA-*Sal* Ⅰ;3:pSilencer2.1-HK;4:pSilencer2.1-HK-*Sal* Ⅰ;5:pSilencer2.1;6:pSilencer2.1-*Sal* Ⅰ

图1 *Sal* Ⅰ酶切电泳图

2.1.2 重组载体的DNA序列测定 送pSilencer2.1-RhoC-siRNA重组质粒进行序列分析,测序结果正确,表明pSilencer2.1-RhoC-siRNA真核表达载体构建成功,见图2。

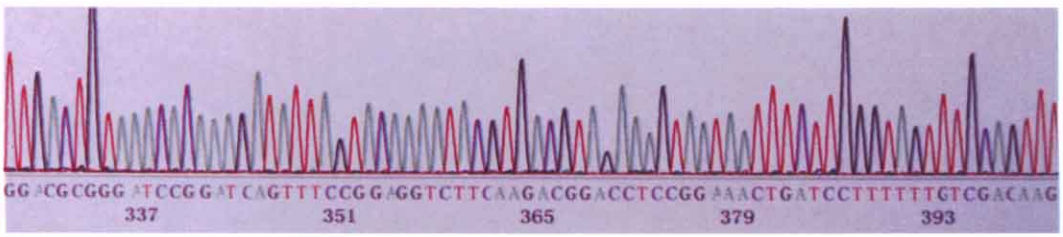


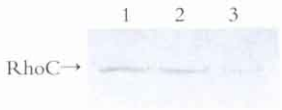
图2 pSilencer2.1-RhoC-siRNA测序结果

2.2　RhoC 蛋白表达的检测

Western blot 显示，与 SK-Hep1 细胞及 SK-Hep1/HK 细胞相比，SK-Hep1/RhoC-siRNA 细胞中 RhoC 蛋白表达水平明显减弱，bandscan 分析显示其蛋白条带灰度值较前两者降低约 60%（图 3）。

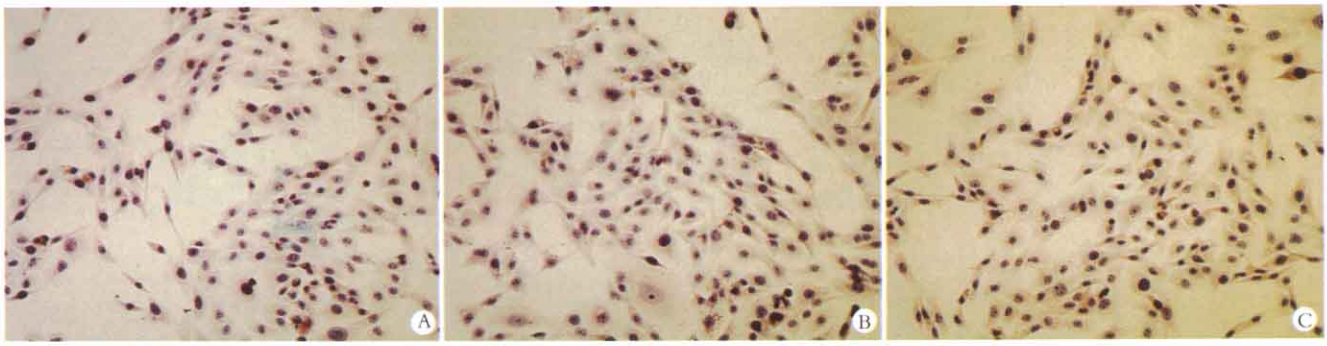
2.3　RhoC-siRNA 对肝癌细胞形态的影响

SK-Hep1 及 SK-Hep1/HK 细胞呈长梭形，大小不一，核大而深染，呈圆形或椭圆形，细胞极性消失，排列紊乱；SK-Hep1/RhoC-siRNA 细胞在大小、形态及生长方式上与之无明显差别（图 4）。



1：SK-Hep1；2：SK-Hep1/SK；3：SK-Hep1/RhoC-siRNA

图 3　RhoC 蛋白杂交结果



A：SK-Hep1；B：SK-Hep1/SK；C：SK-Hep1/RhoC-siRNA

图 4　细胞爬片观察　（HE×100）

2.4　RhoC-siRNA 对肝癌细胞生长曲线的影响

与 SK-Hep1 及 SK-Hep1/HK 细胞相比，SK-Hep1/RhoC-siRNA 细胞的生长曲线无显著变化（$P>0.05$）。

2.5　RhoC-siRNA 对肝癌细胞黏附性的影响

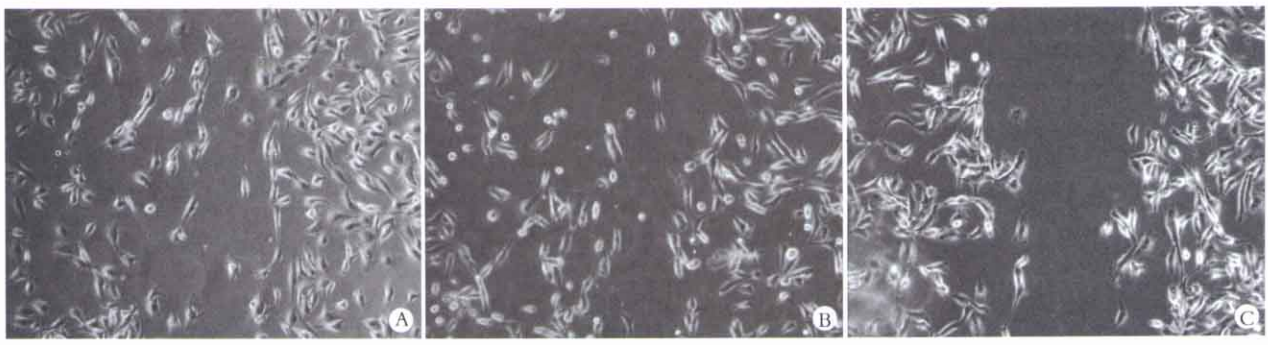
接种后 1 h，SK-Hep1 细胞及 SK-Hep1/HK 细胞在 matrigel 基质上的黏附率分别为（85.1±8.2）%、（80.6±9.4）%，两组无显著差异（$P>0.05$）；而 SK-Hep1/RhoC-siRNA 细胞的黏附率为（71.5±4.2）%，与前两组相比具有显著性差异（$P<0.05$）。

2.6　RhoC-siRNA 对肝癌细胞运动能力的影响

48 h 后，SK-Hep1 细胞组及 SK-Hep1/HK 细胞组划痕已基本长满，而 SK-Hep1/RhoC-siRNA 细胞组划痕依然明显（图 5），提示 RhoC-siRNA 可抑制 SK-Hep1 肝癌细胞的运动能力。

2.7　RhoC-siRNA 对肝癌细胞侵袭人工基底膜的影响

matrigel 经重建后能在聚碳酸滤膜表面形成类似天然基底膜的结构，上室中细胞穿越 matrigel 至滤膜下表面的细胞数可反映细胞的侵袭能力。SK-Hep1 细胞组及 SK-Hep1/HK 细胞组滤膜下表面的细胞数分别为（146±27）和（129±19），两组无显著性差异（$P>0.05$）。SK-Hep1/RhoC-siRNA 细胞组侵袭至滤膜下表面的细胞数明显降低，为（67±18）（$P<0.05$），表明 RhoC-siRNA 可明显降低 SK-Hep1 肝癌细胞的侵袭能力。



A：SK-Hep1；B：SK-Hep1/SK；C：SK-Hep1/RhoC-siRNA

图 5　倒置显微镜观察细胞向划痕中迁移运动结果　（×100）

3　讨论

新近发现 RhoC 的过量表达与人类多种恶性肿瘤的侵袭、转移密切相关，有望成为判断恶性肿瘤侵袭转移潜能及临床判断恶性肿瘤预后的新指标[4-7]，同时，由于 RhoC 极少发生基因突变，有望成为肿瘤基因治疗的新靶点[8]。目前有关 RhoC 在各肿瘤中的研究已迅速展开，但有关以 RhoC 为靶点的基因治疗在恶性

肿瘤侵袭、转移中意义尚不清楚。

3.1 RhoC-siRNA 的作用价值

siRNA 技术是一种新的基因治疗技术，能有效、特异地抑制细胞内基因的表达。在体外培养的细胞中，外源性 siRNA 能序列特异性地抑制同源基因的表达，其抑制效率极高，比反义寡核苷酸作用更强且更持久。我们在体外构建了 RhoC-siRNA 真核表达载体，转染 SK-Hep1 肝癌细胞后，在 G418 筛选压力下可建立稳定的 RhoC 基因敲弱细胞系，其 RhoC 蛋白表达抑制率达 60%。由于 RNA 二级结构及其他因素的影响，其他靶序列的 RhoC-siRNA 可能具有更强的抑制效力。

3.2 RhoC-siRNA 对肝癌细胞形态及生长曲线的影响

RhoA/ROCK 信号转导通路通过调节肌动蛋白微丝骨架的聚合，进而调控细胞的形态、极性、细胞骨架的重建以及细胞增殖、细胞转录、细胞迁移等多种生物学行为[9]。RhoC 与 RhoA 相似，可调节细胞肌动蛋白的聚离，但本研究表明，RhoC 在肝癌细胞形态及生长增殖中的调控意义不大。

3.3 RhoC-siRNA 对肝癌细胞运动、黏附及侵袭能力的影响

本研究表明，利用 RhoC-siRNA 降低细胞中 RhoC 的表达水平后，肝癌细胞向划痕损伤区迁移运动明显受抑，同时，肝癌细胞对细胞外基质间的黏附能力及其对人工重建基底膜的侵袭、穿透能力均明显下降。肿瘤的侵袭与转移主要依赖于细胞的迁移，Rho 蛋白通过调节肌动蛋白微丝骨架的聚合，在细胞迁移等过程中起重要作用[9]。RhoC 还可通过 Rho/ROCK 信号转导通路对肿瘤细胞-细胞间的连接起削弱作用，从而有利于细胞发生迁移。此外，RhoC 通过促使整合素聚集成簇并通过调节整合素的活性及内吞作用而促进细胞-胞外基质间黏着斑的形成，进而促进细胞与细胞外基质间的黏附[10]。

本研究提示，降低 RhoC 表达水平可抑制肝癌细胞的迁移运动，同时可抑制肝癌细胞对胞外基质发生黏附与侵袭，这对于肝癌外科治疗后防治复发与转移有重要意义，以 RhoC 为靶点的基因干预治疗可能具有一定的临床应用前景。

本实验结果建立在体外实验的基础上，而在体内情况下，RhoC-siRNA 是否也能同样效力地抑制肿瘤细胞中 RhoC 的表达，进而抑制肿瘤的侵袭与转移还需进一步证实。

参考文献：

[1] 王 伟，杨连粤，黄耿文，等. RhoC 基因的过量表达与肝细胞癌的侵袭转移[J]. 中华肿瘤杂志，2004，26(5)：279－282.

[2] 彭志红，唐 波，杨建民，等. KAI1 基因对 MHCC97-H 肝癌细胞粘附力的影响[J]. 第三军医大学学报，2005，27(23)：2311－2313.

[3] 万 锋，雷 霆，舒 凯，等. 垂体瘤的体外侵袭模型-Boyden 小室法的建立和特点[J]. 中华神经外科杂志，2005，21(3)：149－152.

[4] Kleer C G, Griffith K A, Sabel M S, *et al*. RhoC-GTPase is a novel tissue biomarker associated with biologically aggressive carcinomas of the breast[J]. Breast Cancer Res Treat, 2005, 93(2): 101－110.

[5] Wang W, Yang L Y, Huang G W, *et al*. Genomic analysis reveals RhoC as a potential marker in hepatocellular carcinoma with poor prognosis[J]. Br J Cancer, 2004, 90(12): 2349－2355.

[6] Wang Z N, Xu H M, Jiang L, *et al*. Positive association of RhoC gene overexpression with tumour invasion and lymphatic metastasis in gastric carcinoma[J]. Chin Med J (Engl), 2005, 118(6): 502－504.

[7] 王 东，张沁宏，李增鹏，等. 肝细胞肝癌 DNA 损伤修复基因 MGMT 的表达及其与 p53 的关系[J]. 消化外科，2005，4(6)：425－429.

[8] Pille J Y, Denovelle C, Varet J, *et al*. Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Mol Ther, 2005, 11(2): 267－274.

[9] Fiordalisi J J, Keller P J, Cox A D. PRL tyrosine phosphatases regulate rho family GTPases to promote invasion and motility[J]. Cancer Res, 2006, 66(6): 3153－3161.

[10] Ridley A J, Schwartz M A, Burridge K, *et al*. Cell migration: integrating signals from front to back[J]. Science, 2003, 302(5651): 1704－1709.

（编辑 陈聪连）

消 息

本刊被定于 2008 年第一季度实施上典"胃癌病一体非治疗"申点号，内容包括胃癌病治疗、血液净化、肝肿瘤的基础和临床研究最新进展一系列具有领先的论，欢迎广大作者投稿（截稿日期：2007 年 9 月 30 日），本刊将选择优秀稿件集中刊登。

本刊编辑部