文章编号:1000-5404(2008)06-0503-03

论著

RNAi 干扰食管癌 EC9706 细胞 MTA1 基因表达对侵袭和迁移的影响

杨松华,赵国强,郑 红,赵继敏,董子明 (郑州大学基础医学院病理生理教研室,郑州 450001)

摘 要:目的 采用RNAi抑制食管癌EC9706细胞株MTA1基因的表达,观察对食管癌细胞侵袭和迁移的影响。**方法** 用脂质体包裹转染沉默MTA1表达的siRNA表达载体入食管癌细胞EC9706。定量RT-PCR和免疫印迹分别检测MTA1 mRNA和蛋白表达情况;划痕损伤实验和细胞体外侵袭实验分别测定迁移和侵袭的影响。**结果** 定量RT-PCR检测显示,MTA1基因的表达水平明显降低;转染沉默MTA1的siRNA表达载体组的食管癌细胞划痕未愈合,穿透Matrigel的细胞数量明显减少,与未转染组、转染空载体组和转染无关序列siRNA载体组比较差异有显著性($P<0.05$)。**结论** RNA干扰介导的MTA1基因表达沉寂可有效降低食管癌细胞侵袭和迁移;MTA1基因可能成为肿瘤治疗上有前途的分子靶点。

关键词: MTA1;RNA干扰;侵袭;迁移
中图法分类号: R394.3;R73-37;R735.1 **文献标识码:** A

RNAi silencing MTA1 gene inhibits invasion and migration of esophageal carcinoma 9706 cells

YANG Song-hua, ZHAO Guo-qiang, ZHENG Hong, ZHAO Ji-min, DONG Zi-ming (College of Basic Medical Science, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Objective To observe the effect of RNAi that silences MTA1 gene on invasion and migration of esophageal carcinoma 9706 cells. **Methods** The siRNA expression vector that silences MTA1 gene was transfected into EC9706 cells by liposome. MTA1 mRNA and protein expressions were detected through quantitative RT-PCR and Western blot, respectively. The invasion and migration of EC9706 cells were evaluated by scrape wound healing assay and cell invasion assay *in vitro*. **Results** MTA1 gene expression significantly decreased. The scrape wound of EC9706 cells healed more slowly and the cell population that cut through Matrigel were less in the EC9706 cells transfected with siRNA expression vector than non-transfected EC9706 cells and the EC9706 cells transfected with blank vector ($P<0.05$). **Conclusion** RNAi silencing MTA1 gene inhibits the invasion and migration of esophageal carcinoma effectively. It is supposed that MTA1 gene may be a prospective molecule target in tumor therapy.

Key words: MTA1; RNA interference; invasion; migration

肿瘤转移相关基因1(metastasis associated gene 1, MTA1)是一个新的肿瘤转移相关候选基因,属于核小体重构和脱乙酰基复合物(NuRD)的组成成员之一,它通过促进组蛋白脱乙酰基,影响基因的转录和复制,与多种肿瘤组织,尤其是上皮源性恶性肿瘤组织的侵袭转移能力密切相关[1]。它的高表达与肿瘤的侵袭转移程度、病理分级密切相关,可作为评价预后的一个指标[2]。本研究在构建沉默MTA1表达的siRNA载体的基础上,通过抑制食管癌EC9706细胞株MTA1基因的表达,观察对食管癌细胞侵袭和迁移的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

沉默MTA1表达的siRNA载体pRNAT-U6.2-481和RNA无关序列siRNA载体pRNAT-U6.2-C由本课题组构建;脂质体Lipofectamine™2000购于Invitrogen公司;RPMI1640、胎牛血清(Hycolone公司);RNA提取试剂盒购于QIAGEN公司;dNTP,RNasin,AMV购于Promega公司;Real-time PCR试剂盒大连宝生物工程有限公司;MTA1 Forward Primer: 5′-AGCGTCACCCTGCTCAACGAGACCG-3′, MTA1 Reverse Primer: 5′-GGTTGGC-

基金项目:教育部"十五"211工程重点学科建设项目(教重办2002第2号) Supported by the "Tenth Five-Year Plan" Research Foundation for the Key Construction Project (211 Projects) by Ministry of Education of China (2002)
作者简介:杨松华,男,河南省濮阳市人,博士研究生,主要从事肿瘤基础方面研究。电话:(0371)67781959
通信作者:董子明,E-mail:dongzm@zzu.edu.cn
收稿日期:2007-06-13;修回日期:2008-01-09

CTCTGATGCAGACCACTC-3′; GAPDH Forward:5′-TGGCAAAT-TCCATGGCACCG-3′; GAPDH Reverse: 5′-CAGAGGGGGCAG-AGATGATG-3′上海生工公司合成。

1.2 分组和转染

实验分为 siRNA 组(转染 pRNAT-U6.2-481)、无关序列 siRNA 组(转染 pRNAT-U6.2-C)、空 siRNA 载体组(转染 pRNAT-U6.2)以及空白对照组。EC9706 细胞置于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,37℃、5% 的 CO_2 孵箱内培养至对数生长期。用 0.25% 胰酶消化并调节细胞浓度以每孔 1×10^6 个细胞接种于 6 孔板中,用转染试剂 Lipofectamine™2000 将各组需转染质粒转染 EC9706 细胞,方法按转染试剂说明书进行,G418 筛选 2 周后分别挑取单发绿色荧光的细胞,在 G418 药物压力下培养,得到上述 3 组稳定转染细胞克隆。

1.3 RNA 提取和逆转录

取稳定转染细胞,使用 Qiagen 小量 RNA 提取试剂盒提取总 RNA;然后逆转录 5 × Buffer 6 μl,4 × dNTP 2 μl,RNasin 80 U,通用引物 OLigo 六聚体 1 μl,AMV 5 U,总 RNA 5 μl,DEPC H_2O 补足 30 μl,42 ℃水浴逆转录 45 min,得到 cDNA。

1.4 荧光定量 PCR

采用嵌合荧光检测法,根据 Real time PCR 试剂盒(TAKARA 公司)与扩增仪(ABI5700 型)说明,采用 50 μl 反应体系(2 × SYBR Premix Ex Taq™ 25 μl, PCR Forward Primer 1 μl, PCR Reverse Primer 1 μl, 50 × ROX Reference Dye 1 μl, cDNA 溶液 4 μl, DEPC H_2O 18 μl) 95 ℃预变性 180 s;95 ℃ 20 s, 60 ℃ 60 s,40 个循环。用 pGEM-MTA1 质粒和 pGEM-GAPDH 质粒,系列稀释同时扩增,制作标准曲线。记录各管扩增 CT 值,换算出基因拷贝数。以 MTA1 基因拷贝数与 GAPDH 基因拷贝数的比值作为其相对表达水平。

1.5 免疫印迹(Western blot)

收集各组细胞,超声破碎细胞,Bradford[3] 测定蛋白的含量,取适量样品,进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳;电转到 PVDF 膜上用含 5% 脱脂奶粉 4 ℃封闭 6 h;加入 1∶200 山羊抗人(MTA1)抗体,4 ℃下孵育过夜;再用 1∶5 000 鼠抗山羊 IgG 二抗,孵育 1h。化学发光法分别检测 PVDF 膜上 MTA1 蛋白的表达量。

1.6 划痕损伤实验

将上述各组细胞分别以 1×10^5 个细胞接种于 6 孔板中,常规培养;待细胞长满单层,弃去培养基,用无血清培养基漂洗 1 次,用灭菌的 1 ml Tip 头在皿底划一直线,继续培养 24 h,Giemsa 染色,倒置显微镜下观察划痕处细胞生长情况。

1.7 细胞体外侵袭实验

采用 Boyden chamber Assay 方法[4],每组重复 3 次,每次设 3 个平行实验。

1.8 统计学分析

数据均以 SPSS 13.0 软件软件包处理,结果表示为 $\bar{x}\pm s$,采用单因素方差分析,组间比较使用 LSD 法。

2 结果

2.1 G418 筛选结果

实验的 siRNA 组、无关序列 siRNA 组和空 siRNA 载体组细胞经过筛选培养,荧光显微镜观察可见,siRNA 组、无关序列 siRNA 组和空 siRNA 载体组细胞,几乎 100% 都可发出绿色荧光,由于载体 pRNAT-U6.2 上带有 EGFP 绿色荧光基因标记,在 488 nm 蓝光照射下可激发出 507 nm 的绿色荧光,说明各组转染筛选成功(图 1)。

2.2 RT-PCR 检测结果

空白对照组、空 siRNA 载体组和无关序列 siRNA 组之间细胞 MTA1 mRNA 表达水平,差别无显著性($P>0.05$),MTA1 mRNA 的相对表达量都在(0.25 ± 0.08)。转染 siRNA 组细胞 MTA1 mRNA 表达显著降低,与空白对照组、空载体组和无关 siRNA 组比较,差异有显著性($P<0.05$),说明构建的 siRNA 载体可有效沉默 MTA1 mRNA 表达(表 1)。

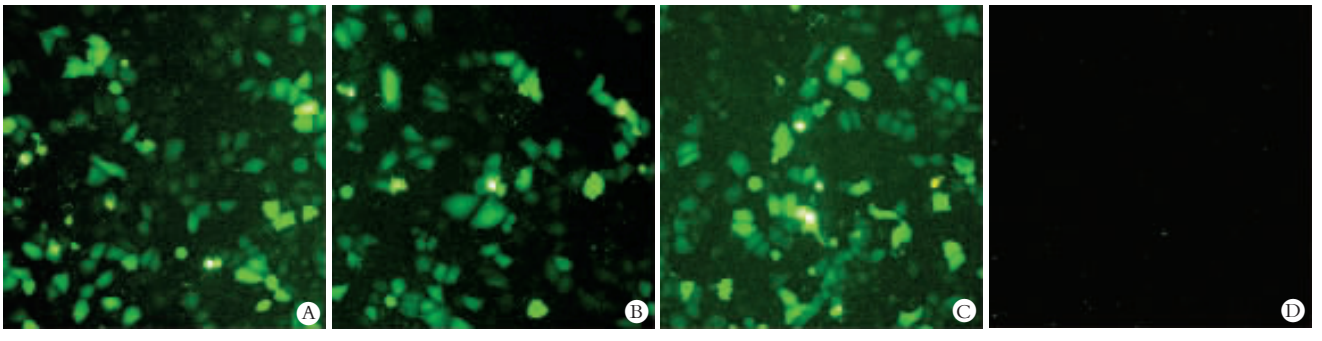
表 1 各组细胞 MTA1 mRNA 的表达及体外侵袭结果($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	MTA1 mRNA 的相对表达量	视野内细胞数(个)
空白对照组	0.25 ± 0.08[a]	73.6 ± 5.9[a]
空 siRNA 载体组	0.26 ± 0.09[a]	86.2 ± 6.4[a]
无关序列 siRNA 组	0.27 ± 0.07[a]	74.7 ± 6.1[a]
siRNA 组	0.05 ± 0.01	21.5 ± 3.1

a:$P<0.05$,与 siRNA 组比较

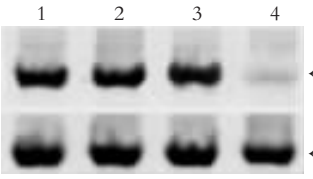
2.3 免疫印迹(Western blot)结果

空白对照组、空载体组和无关 siRNA 组细胞中 MTA1 蛋白都呈现高表达;而转染靶向 MTA1 siRNA(pRNAT-U6.2-481)的实验组食管癌细胞中,MTA1 蛋白被显著抑制,MTA1 蛋白几乎完全不表达(图 2)。



A:转染 siRNA 组;B:转染空 siRNA 载体组;C:转染无关序列 siRNA 组;D: 空白对照组

图 1 各组细胞荧光显微镜观察结果 (×200)

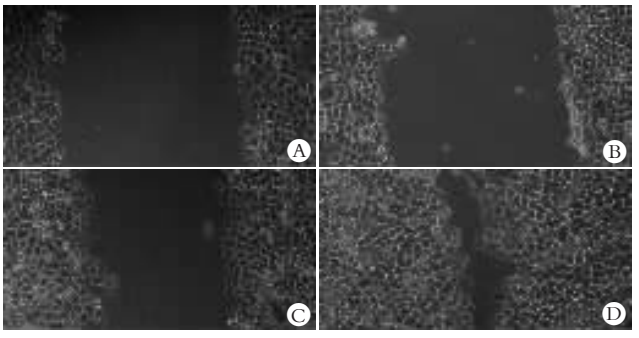


1:未转染的食管癌 EC9706 细胞; 2:转染 pRNAT-U6.2-C 的无关 siRNA 对照细胞; 3:转染 pRNAT-U6.2 空载体的细胞; 4:转染 pRNAT-U6.2-481 的细胞

图 2　MTA1 蛋白 Western blot 结果

2.4　划痕损伤实验结果

空白对照组、空载体组和无关 siRNA 组细胞划痕,经 24 h 培养逐渐愈合,划痕消失;而转染沉默 MTA1 的 siRNA 表达载体组细胞划痕,经 24 h 培养仍未愈合,划痕依然明显,见图 3。



A: 转染 siRNA 组; B: 转染无关序列 siRNA 组; C: 转染 siRNA 组细胞划痕培养 24 h; D: 转染无关序列 siRNA 组细胞划痕培养 24 h

图 3　各组细胞划痕损伤实验结果　(倒置显微镜×200)

2.5　细胞体外侵袭实验结果

转染 pRNAT-U6.2-481 的 siRNA 组侵袭和穿透 Matrigel 的能力较转染空 siRNA 载体、无关序列 siRNA 和未转染的空白对照组明显减弱,差异差异有显著性($P<0.01$),见表 1。

3　讨论

目前多数研究认为 MTA1 的高表达与一些上皮源性肿瘤的侵袭转移密切相关。MTA1 可能是通过参与信号传导与基因表达调控一系列有关浸润转移的蛋白而起重要作用。

Pencil 等[5]发现鼠具有转移能力的 MTLn3 细胞株中 MTA1 表达水平是无转移能力的 MTC4 细胞株的 4 倍。MTA1 基因的表达水平在人乳腺癌细胞株 MCF27(无转移):MCF27/LCC1(浸润型):MCF27/LCC2(转移型)为 1:2:4,这些研究表明在鼠和人乳腺癌细胞株中 MTA1 基因的 mRNA 水平与肿瘤的浸润或转移潜能有关。在非侵袭性的乳腺癌细胞 MCF27 中 MTA1 若出现过表达,则这些细胞在软琼脂中形成较大克隆的增生能力明显增强,克隆形成数目与对照组细胞相比增多,证明 MTA1 的表达水平与细胞转移潜能成正相关[6]。研究表明 38.9% 的结直肠癌、38.2% 的胃癌和 34.0% 的食管癌标本中癌组织中 MTA1 mRNA 过度表达。MTA1 过表达的结直肠癌患者其肠壁浸润的深度更深,淋巴结转移率更高,并多处于 Dukes 分期的晚期。MTA1 过表达的胃癌患者更多出现浆膜浸润、淋巴结转移及血管受累[7]。MTA1 过度表达的食管癌患者有 3/4 的病例浸润至外膜或邻近组织[8]。提示 MTA1 基因可能这些肿瘤的浸润和转移中起重要作用。同时,MTA1 mRNA 的表达水平可以用来评估结直肠、胃癌的病情进展程度。Hofer 等[9]研究发现,建立稳定表达 MTA1-绿色荧光蛋白(EGFP-MTA1)的胰腺癌细胞株 PANC-1,在 EGFP-MTA1 表达升高的同时伴有细胞运动及侵袭能力的显著增强。

本研究结果显示,转染沉默 MTA1 的 siRNA 表达载体组的食管癌细胞 MTA1 基因的表达水平明显降低,细胞划痕 24 h 不能够愈合,穿透 Matrigel 的细胞数量明显减少,与未转染组、转染空载体组和转染无关序列 siRNA 载体组比较差异有显著性($P<0.05$)。说明 RNA 干扰介导的 MTA1 基因表达沉寂可有效降低食管癌细胞侵袭和迁移能力,MTA1 基因可能成为肿瘤治疗上有前途的分子靶点。

参考文献:

[1] Nicolson G L, Nawa A, Toh Y, *et al*. Tumor metastasis-associated human MTA1 gene and its MTA1 protein product: role in epithelial cancer cell invasion, proliferation and nuclear regulation[J]. Clin Exp Metastasis, 2003, 20(1): 19-24.

[2] Kumar R, Wang R A, Bagheri-Yarmand R. Emerging roles of MTA family members in human cancers[J]. Semin Oncol, 2003, 30(5 Suppl 16): 30-37.

[3] Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. Science, 2002, 296(5567): 550-553.

[4] Polette M, Gilles C, Nawrocki-Raby B, *et al*. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression is regulated by zonula occludens-1 in human breast cancer cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(17): 7691-7698.

[5] Pencil S D, Toh Y, Nicolson G L. Candidate metastasis-associated genes of the rat 13762NF mammary adenocarcinoma[J]. Breast Cancer Res Treat, 1993, 25(2): 165-174.

[6] Kumar R, Wang R A, Mazumdar A, *et al*. A naturally occurring MTA1 variant sequesters oestrogen receptor-alpha in the cytoplasm[J]. Nature, 2002, 418(6898): 654-657.

[7] Sarris M, Lee C S. nm23 protein expression in colorectal carcinoma metastasis in regional lymph nodes and the liver[J]. Eur J Surg Oncol, 2001, 27(2): 170-174.

[8] Toh Y, Ohga T, Endo K, *et al*. Expression of the metastasis-associated MTA1 protein and its relationship to deacetylation of the histone H4 in esophageal squamous cell carcinomas[J]. Int J Cancer, 2004, 110(3): 362-367.

[9] Hofer M D, Menke A, Genze F, *et al*. Expression of MTA1 promotes motility and invasiveness of PANC-1 pancreatic carcinoma cells[J]. Br J Cancer, 2004, 90(2): 455-462.

(编辑　吴培红)