文章编号:1000-5404(2008)17-1607-04

论著

Tiam1 基因沉默降低结肠癌细胞 VEGF-C/-D 的表达

钟大平,李 焱,周进明,周 琪,姜友昭,杨启红,梁后杰 (第三军医大学西南医院肿瘤科,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨 T 淋巴瘤侵袭转移诱导因子 1(Tiam1)的表达与结肠癌淋巴管生成的关系。方法 将实验细胞分为 3 组,分别为未干扰组(HCT116)、空质粒载体对照组(HCT116/CN)和干扰组(HCT116/siRNA-Tiam1)。应用 siRNA 使 Tiam1 基因表达下调,通过 RT-PCR 检测 Tiam1 mRNA 表达抑制率,并用 RT-PCR 和 Western blot 方法检测 Tiam1 基因干扰前后 VEGF-C/-D mRNA 和蛋白的表达情况。结果 通过筛选后稳定表达的情况下,siRNA 组的 Tiam1、VEGF-C/-D mRNA 和蛋白的表达明显低于未干扰组。结论 Tiam1 参与了 VEGF-C/-D 表达的调节,推测 Tiam1 可能通过诱导 VEGF-C/-D 的表达影响结肠癌淋巴管的生成。Tiam1 可作为结肠癌淋巴转移过程中一个有价值的指标。

关键词:结肠癌;Tiam1;VEGF-C/-D
中图法分类号:R394.3;R73-362;R735.35 文献标识码:A

Silenced Tiam1 gene inhibits the expressions of VEGF-C/-D in colorectal cancer cells

ZHONG Da-ping, LI Yan, ZHOU Jin-ming, ZHOU Qi, JIANG You-zhao, YANG Qi-hong, LIANG Hou-jie (Department of Oncology, Southwest Hospital, Third military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the relationship between Tiam1 gene and lymphangiogenesis in colorectal cancer. Methods Tiam1 was silenced by siRNA, then linked with pGenesil-EGFP1, finally transfected into the colorectal cancer cells HCT116. The cells without transfection and transfected with blank vector served as controls. The Tiam1 mRNA expressions were detected by RT-PCR. The expressions of VEGF-C/-D mRNA and protein were detected by RT-PCR and Western blot. Results The expressions of Tiam1 and VEGF-C/-D in HCT116 cells with Tiam1 gene silenced were lower than those in control groups. Conclusion Tiam1 can affect lymphangiogensis in colon cancer by its effect on VEGF-C/-D. It may be a useful marker for lymphatic metastasis in colorectal cancer.

Key words: colorectal cancer; Tiam1; VEGF-C/-D

淋巴瘤侵袭转移诱导因子 1(T lymphoma invasion and metastasis,Tiam1)是荷兰癌症研究所 Habets 等[1]从小鼠 T 淋巴瘤细胞中分离鉴定的,定位于人染色体 21q22.11,表达产物为 Tiam1 蛋白,是鸟苷酸转换因子(guanine nucleotide exchange factor,GEF),在体内外均可以特异性地激活 Rho GTPase 家族中的 Rac1,对内皮细胞的功能发挥着重要的调节作用。研究表明 Tiam1 与肿瘤侵袭和转移有关[2],而其在肿瘤转移中的机制主要归于其对肿瘤细胞黏附和运动的影响,但少见 Tiam1 基因对肿瘤淋巴管生成影响的报道。因此我们以 Tiam1 基因为研究对象,应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法、Western blot 方法检测结肠癌细胞株中 Tiam1 干扰前后 VEGF-C/-D 的表达情况,初步探讨 Tiam1 基因在肿瘤淋巴管生成中的作用。

基金项目:重庆市自然科学基金(2006BB5099)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2006BB5099)
作者简介:钟大平,女,重庆市人,博士,主治医师,主要从事肿瘤淋巴管生成机制及白血病诊治方面的研究,现在第三军医大学西南医院血液科。电话(023)68765198,E-mail:zhongdap@21cn.com
通信作者:梁后杰,电话:(023)68754128,E-mail:lianghoujie@sina.com
收稿日期:2007-12-13;修回日期:2008-01-08

1 材料与方法

1.1 材料

人结直肠癌细胞株 SW480、HCT116、HT29 为本科室保存,LoVo 细胞株为重庆医科大学汤为学教授馈赠。Trizol 和 Lipofectamine™ 2000 试剂购自 Invitrogen 生物公司。DNase Ⅰ、Reverse Transcription System 和 PCR 试剂盒购自上海生工生物公司。Tiam1、VEGF-C/-D、Rac1 和 GAPDH 引物用 Primer 5 软件自行设计,由上海生工生物公司合成。G418 购自 Merck 公司。Tiam1 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。β-actin 单克隆抗体购自 DAKO 公司。限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ、*Hind* Ⅲ、*Bam*H Ⅰ 和

DNA 分子量标准购自 TaKaRa 公司。PageRuler™蛋白预染标准购自 Fermentas 公司。RIPA 购自上海申能博彩生物科技有限公司。

主要试剂为浓缩型兔抗人 Tiam1 多克隆抗体(sc-872,1∶100)、羊抗人 VEGF-C 多克隆抗体(sc-1881,1∶100)、兔抗人 VEGF-D 多克隆抗体(sc-13085,1∶100)均购自 Santa Cruz 生物技术有限公司,鼠抗人 podoplanin 单克隆抗体(11-003,1∶200)购自 Angiobio 公司,即用型 S-P 超敏试剂盒(S-P-9000 和 9003)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 细胞培养

人结直肠癌细胞株 LoVo 和 HT29、SW480、HCT116 采用含 10% 小牛血清的 DMEM 高糖培养液培养,置 37℃、5% CO_2 培养箱内培养,取生长状态良好的细胞备用。

1.3 RT-PCR 检测 Tiam1、Rac1、VEGF-C/-D 基因的表达

待细胞长至状态良好,铺满瓶壁后,用冰预冷的 PBS 洗 2 遍,参照试剂说明书,用 Trizol 试剂常规提取细胞总 RNA,初步提取的总 RNA 用 DNase Ⅰ去除残存的基因组 DNA,并用 GAPDH引物进行 PCR 扩增检测有无基因组 DNA 污染。按照逆转录试剂盒操作程序进行逆转录反应,反应条件为 70 ℃ 5 min、0 ℃ 5 min;25 ℃ 5 min、42℃ 60 min、70℃ 5min。取1 μl 的 cDNA 为模板,行 PCR 反应。Tiam1(GenBank, NM_003253)引物上游:5′-GAGCCTTCCCTCATCCCAG-3′,下游:5′-GGCAAAGTCTTCACGCCTAAC-3′,扩增片段 529 bp;Rac1(GenBank,NM_006908)引物为上游:5′- GGTGAATCTGGGCTTATGGG -3′,下游:5′-CAAAGGTTCCAAGGGACAGG -3′,扩增产物 474 bp;VEGF-C(Gen Bank,NM_005429)引物上游:5′-CACTTGCTGGGCTTCTTCTC-3′,下游:5′-GAGGTAGCTCGTGCTGGT-3′,扩增产物 540 bp;VEGF-D(GenBank, NM_004469)引物上游:5′-AGTACCTGAATTAGTGCCTGTT-3′,下游:5′ AGGTGTCTGGGTGAAATAGC-3′,扩增产物 413 bp;以看家基因 GAPDH 为内对照,引物上游:5′-CAAATTCCATGGCACCGTCA-3′,下游:5′-GGAGTGGGTGTCGCTGTTGA-3′,扩增产物 715 bp。PCR 反应以水代替 cDNA 为阴性对照。反应条件为 94℃5 min(94℃ 45 s,退火温度 45 s 72℃ 45 s)(35 个循环,然后 72℃延伸 10 min 终止。Tiam1、Rac1、VEGF-C、VEGF-D、GAPDH 的退火温度分别为 60、58、49、54、53℃。用 1-D Advanced 软件分析 RT-PCR 结果。

1.4 siRNA 质粒构建及鉴定

根据文献[3]合成 Tiam1 RNAi 序列,正义链序列为:5′-GATCCCCGCGAAGGAGCAGGTTTTCTTTCAAGAGAAGAAAACCTGCTCCTTCGCTTTTTGGAAA-3′;反义链序列为 5′-AGCTTTTCCAAAAAGCGAAGGAGCAGGTTTTCTTCTCTTGAAAGAAAACCTGCTCCTTCGCGGG-3′;将引物退火形成寡核苷酸链对,与线性载体 pGenesil-EGFP1 用 T4 DNA 连接酶反应形成重组的 pGenesil-EGFP1/siRNA-Tiam1 质粒,用 *Eco*R Ⅰ和 *Hind* Ⅲ以及 *Eco*R Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ对质粒进行两次双酶切鉴定,并对质粒进行测序验证。

1.5 转染及筛选鉴定

1.5.1 转染 转染前 1 d 将 HCT116 细胞接种至 6 孔板中,1×10^5/孔,使细胞融合至 90% ~95%,用 100 μl 的无血清 DMEM 稀释质粒 DNA,轻轻混合,取 5 μl Lipofectamine™ 2000 用 100 μl 的无血清 DMEM 稀释,轻轻混合,室温孵育 5 min,将 100 μl 的 Lipofectamine 混合物加入质粒 DNA 中,总体积为 200μl,轻轻混合,室温孵育 15 min,将 200 μl 的 DNA-Lipofectamine™ 2000 混合物加入 6 孔板中,轻轻混匀,37 ℃培养 5 h 后更换培养液。以 pGenesil-EGFP1 空载体质粒为转染对照(CN)。

1.5.2 转染后筛选 细胞转染后 24 h,在荧光显微镜下观察,确定有部分细胞内有绿色荧光后,予换含 G418(浓度为 400 μg/ml)的培养液,进行抗性克隆筛选。1 周后在荧光显微镜下挑选最亮的克隆,进一步在 96 孔板中进行稳定克隆筛选。

1.5.3 鉴定 免疫组织化学鉴定:制作 HCT116、HCT116/CN 和 HCT116/siRNA Tiam1 的细胞爬片,4% 多聚甲醛固定,固定好的细胞片用 S-P 免疫组化法按照试剂盒要求操作,DAB 显色。按 1∶100 稀释兔抗人 Tiam1 多克隆抗体,以细胞质显现棕黄色为阳性,以 PBS 代替一抗为阴性对照。RT-PCR 鉴定:HCT116、HCT116/CN 和 HCT116/siRNA-Tiam1 细胞长至状态良好,铺满瓶壁后,用冰预冷的 PBS 洗 2 遍,用 TRIzol 试剂常规提取细胞总 RNA,然后进行 RT-PCR,步骤同 1.3,检测 Tiam1 mRNA 表达。用 1-D Advanced 软件分析 RT-PCR 结果。

1.6 VEGF-C/-D、Rac1 mRNA 和蛋白的检测

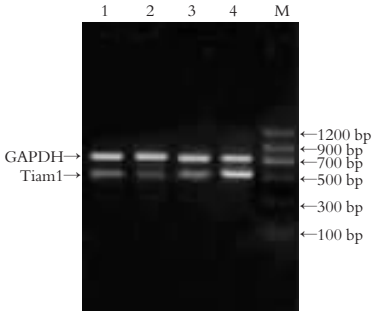
1.6.1 RT-PCR 法检测 VEGF-C/-D、Rac1 的表达 RT-PCR 步骤同 1.3。

1.6.2 Western blot 法检测 VEGF-C/-D、Rac1、Tiam1 的表达 提取 HCT116、HCT116/CN 和 HCT116/siRNA-Tiam1 细胞质蛋白样品,按比例与 5 × SDS 上样缓冲液(1 mol/L Tris-HCl 1.25 ml pH = 6.8,SDS 0.5 g,甘油 2.5 ml,10% β-巯基乙醇 1.4 ml,2% 溴酚蓝 1 ml,加三蒸水至 10 ml)混合,煮沸 5 min 后进行 8% 或 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳完毕后,聚丙烯酰胺凝胶上的蛋白质用蛋白电转膜槽于冰浴 100 V、80 min 电转移蛋白质至 PVDF 膜上。PVDF 膜在平缓摇动的摇床上以 3% 牛血清白蛋白封闭液 5 ml 室温封闭 3 h,25 ml TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。加入兔抗人 Tiam1(或 Rac1、VEGF-D)和羊抗人 VEGF-C 多克隆抗体(1∶1 000 稀释),4℃过夜孵育,TBST 洗膜 3 次,25 ml × 5 min。加入 HRP 标记的抗兔或羊二抗(125 μl/cm^2,1∶2 500 稀释),在室温孵育 1 h(平缓摇动),TBST 洗膜 3 次,25 ml × 5 min。DAB 染色 5 ~ 15 min 出现清晰条带时终止显色,照相存档。

2 结果

2.1 RT-PCR 及免疫组化法检测 Tiam1 基因的表达

按照 Trizol 试剂盒的说明分别提取 4 种细胞株总 RNA,用紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测质量。$D(260)/D(280)$ 值为 1.8 ~ 2.0,电泳检测有 3 条清晰的带:28S、18S 和 5S,说明无降解,质量较好。应用 RT-PCR 检测 4 种细胞株 Tiam1 基因的表达,采用 1-D Advanced 软件进行区带的灰度分析。分别以 Tiam1 和 GAPDH 扩增带的灰度比值表示各细胞株的表达水平(SW480、HT29、LOVO、HCT116 依次为 0.783、0.582、0.823、1.058),结果表明 HCT116 细胞中Tiam1的表达最强(图 1)。

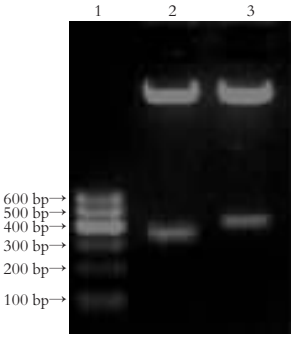


1：SW480；2：HT29；3：LOVO；4：HCT116；M：标准

图 1　4 种肿瘤细胞 Tiam1 mRNA 表达

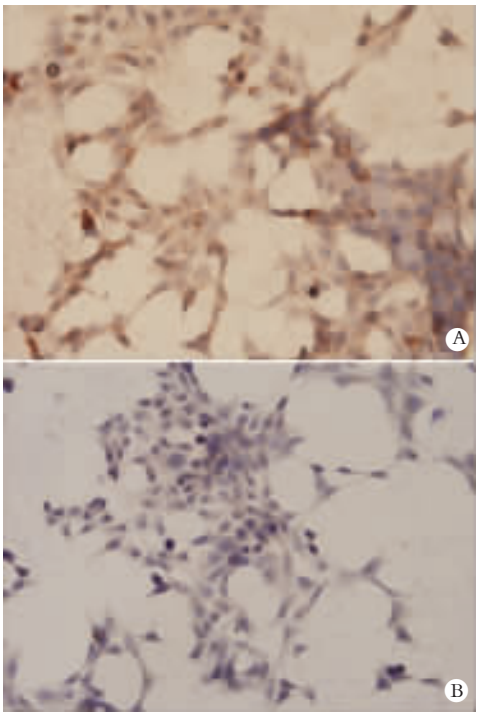
2.2　质粒鉴定及转染后鉴定

用 *Eco*R Ⅰ和 *Hind* Ⅲ以及 *Eco*R Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ对 pGenesil-EGFP1/Tiam1-RNAi 质粒进行 2 次双酶切鉴定，并对质粒进行测序验证（图 2）。S-P 免疫组化法的染色结果提示 siRNA-HCT116 细胞质 Tiam1 表达减弱（图 3）。RT-PCR 结果提示 Tiam1 表达明显减弱（图 4）。



1：标准；2：*Bam*H Ⅰ/*Eco*R Ⅰ酶切；3：*Hind* Ⅲ/*EcoR* Ⅰ酶切

图 2　pGenesil-EGFP1/Tiam1-RNAi 质粒酶切图

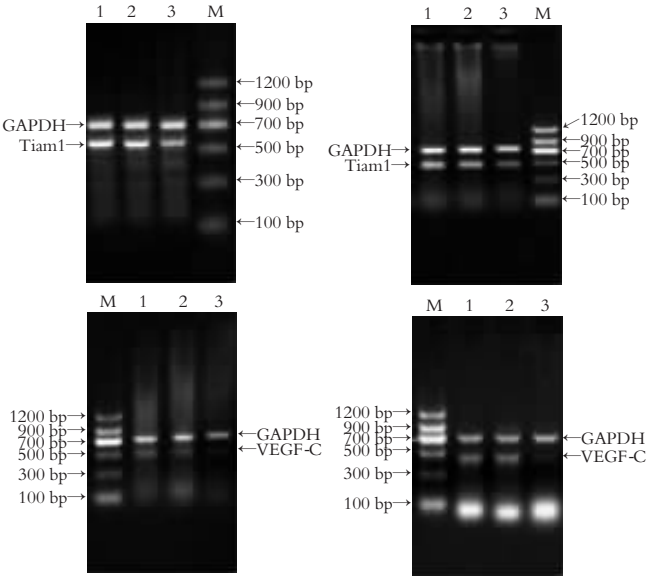


A：干扰前；B：干扰后

图 3　Tiam1 蛋白在 HCT116 细胞中的表达　（S-P ×400）

2.3　siRNA 对 HCT116 细胞 Rac1、VEGF-C/-D mRNA 表达影响

按照 Trizol 试剂盒的说明分别提取 HCT116、HCT116/CN 和 HCT116/siRNA-Tiam1 细胞的总 RNA，用紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度，并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测质量。*D*(260)/*D*(280)均在 1.8～2.0，电泳检测有 3 条清晰的带：28S、18S 和 5S，说明无降解，质量较好。应用 RT-PCR 检测 Tiam1、Rac1、VEGF-C、VEGF-D 基因的表达，采用 1-D Advanced 软件进行区带的灰度分析，分别以各基因和 GAPDH 扩增带的灰度比值表示各基因的表达水平，结果表明干扰后细胞中的 Tiam1、Rac1、VEGF-C、VEGF-D 基因表达减弱（图 4）。

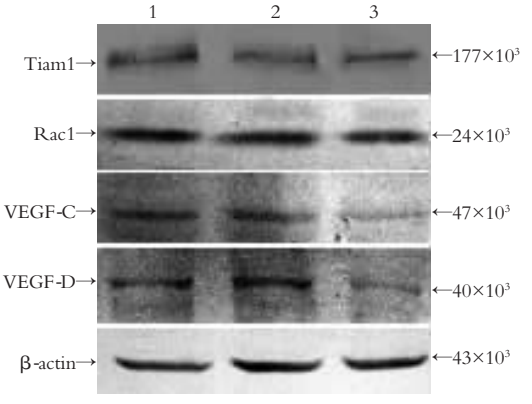


1：HCT116；2：HCT116/NC；3：HCT116/siRNA-Tiam1；M：标准

图 4　结肠癌细胞 HCT116 中的 Tiam1、Rac1、VEGF-C/-D mRNA 表达

2.4　siRNA 对 Tiam1、Rac1、VEGF-C/-D 蛋白表达的影响

用免疫印迹法将蛋白样品变性后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭，加一抗、二抗后 DAB 显色至出现清晰条带。采用 1-D Advanced 软件进行区带的灰度分析，分别以内参 GAPDH 和各蛋白的灰度比值表示各蛋白的表达水平，结果表明干扰后细胞中的 Tiam1、Rac1、VEGF-C/-D 蛋白表达减弱（图 5）。



1：HCT116；2：HCT116/CN；3：HCT116/siRNA-Tiam1

图 5　结肠癌细胞中 Tiam1、Rac1、VEGF-C/-D 蛋白表达

3 讨论

肿瘤转移是癌症患者死亡的重要原因。许多研究认为肿瘤血管生成对肿瘤细胞转移起重要的作用。但是在临床工作中大多数癌症早期播散是通过淋巴管向局部淋巴结转移。最常见恶性肿瘤大肠癌的早期局部淋巴结转移十分常见。虽然目前肿瘤淋巴道转移的分子机制并不清楚,但普遍认为肿瘤淋巴管生成有助于肿瘤细胞的转移。

被誉为淋巴管生成因子的 VEGF-C/-D 在肿瘤淋巴转移中的作用引起越来越多的重视。在成人受体 VEGFR-3 主要表达于淋巴管内皮细胞,是淋巴管生成的特异性调节因子,VEGF-C/-D 与 VEGFR-3 结合后,通过 MEK/ERK 和 PI3K/Akt 途径引起淋巴管内皮细胞增生[4,5]。许多实体瘤均能合成 VEGF-C/-D,不同类型的肿瘤表达能力不同,且其表达强度与肿瘤发生淋巴转移的程度有关。目前普遍认为 VEGF-C 促进肿瘤淋巴结转移的机制是通过激活淋巴管内皮刺激淋巴管增生或扩张,这些新生或扩张的淋巴管为肿瘤细胞的淋巴转移增加了机会。

Tiam1 是荷兰 Habets 等[1]从小鼠 T 淋巴瘤细胞中分离鉴定的,在体内外均可以特异性地激活 Rho GTPase 家族中的 Rac1,对内皮细胞的功能发挥着重要的调节作用。近年来认为 Tiam1 与肿瘤的侵袭转移高度相关[6-8]。我们前期研究发现其与结肠癌淋巴结转移高度相关,与文献[9]报道一致。作为肿瘤转移基因的代表,Tiam1 有多个重要的结构区域,其中参与 GDP/GTP 交换的 DH 功能区和参与蛋白质相互作用的 PH 功能区在多种肿瘤的侵袭转移及信号转导方面都具有重要的作用[10,11]。

已有研究报道 Tiam1 基因的下游分子 Rac1 可能与缺氧诱导的肿瘤血管生成相关[12],而 Tiam1 在淋巴管生成方面的研究少见报道。从文献报道中推断 Tiam1可能与肿瘤淋巴管生成有关。在肾小球膜细胞中小 G 蛋白酶(Rho/ Rac/Cdc42)抑制剂 toxinB 可以抑制 LPA 介导的 COX-2 的表达,换句话说 Rac 可以促进 COX-2 表达;而在人肺腺癌中已经证实 COX-2 经 EP_1/Src/HER-2/Neu 信号途径可上调 VEGF-C 并促进淋巴管生成[13]。因此推测 Tiam1 可能通过 Rac1/COX-2/VEGF-C 信号途径促进肿瘤淋巴管生成。有文献报道[14]认为 Tiam1 可以上调 HMGB1、Fascin-1、HSP27 和 GSTO1 等蛋白的表达。而 HMGB1 可以通过活化 NF-KB 途径诱导 VEGF-C/D 的表达[15]。因此 Tiam1 可能通过 Rac1/NF-KB/VEGF-C 信号途径促进肿瘤淋巴管生成。

在本研究中,我们通过脂质体介导转染法将 siRNA干扰质粒导入内源性高表达 Tiam1 基因的结肠癌 HCT116 细胞中,结果显示 Tiam1 被干扰后结肠癌细胞的 Rac1、VEGF-C/D 表达减弱。由此推测 Tiam1 通过催化 Rac1 的活性诱导 VEGF-C/D 的表达,进而影响肿瘤淋巴管的生成,对肿瘤的淋巴道转移具有一定作用。本研究通过 RT-PCR、蛋白印迹实验证明 Tiam1 参与了 VEGF-C/-D 表达的调节,可能与结肠癌淋巴管生成有关,Tiam1 可作为结癌淋巴转移过程中一个有价值的指标。有关 Tiam1 对肿瘤淋巴管生成影响的机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Habets G G, Scholtes E H, Zuydgeest D, *et al*. Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins[J]. Cell, 1994, 77(4): 537-549.

[2] 黄仲曦, 孙 青, 丁彦青, 等. 用文献轮廓挖掘大肠癌转移芯片表达谱[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(11): 1195-1197.

[3] Malliri A, van-Es S, Huveneers S, *et al*. The Rac exchange factor Tiam1 is required for the establishment and maintenance of cadherin-based adhesions[J]. J Biol Chem, 2004, 279(29): 30092-30098.

[4] Amioka T, Kitadai Y, Tanaka S, *et al*. Vascular endothelial growth factor-C expression predicts lymph node metastasis of human gastric carcinomas invading the submucosa[J]. Eur J Cancer, 2002, 38(10): 1413-1419.

[5] Skobe M, Hawighorst T, Jackson D G, *et al*. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis[J]. Nat Med, 2001, 7(2): 192-198.

[6] 朱金明, 余佩武. T 淋巴瘤侵袭转移诱导因子 1 在胃癌组织中的表达及其临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2005, 13(3): 320-323.

[7] 吴明富, 史艳燕, 韩志强, 等. 人卵巢癌组织中 Tiam1 和 Rac1 的表达与肿瘤侵袭转移的关系[J]. 中国肿瘤临床, 2005, 32(16): 910-914.

[8] 王会河, 黄光武, 林 玲, 等. Tiam1 基因在喉癌中的表达和意义[J]. 临床检验杂志, 2006, 24(1): 49-51.

[9] Liu L, Wu D H, Ding Y Q. Tiam1 gene expression and its significance in colorectal carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(5): 705-707.

[10] Habets G G, van-Der-Kammen R A, Stam J C, *et al*. Sequence of the human invasion-inducing TIAM1 gene, its conservation in evolution and its expression in tumor cell lines of different tissue origin[J]. Oncogene, 1995, 10(7): 1371-1376.

[11] Michiels F, Collard J G. Rho-like GTPases: their role in cell adhesion and invasion[J]. Biochem Soc Symp, 1999, 65: 125-146.

[12] 薛 妍, 毕 锋, 刘文超, 等. 缺氧状况下 Rho GTPases 的表达和活性变化及其与肿瘤血管生成关系的研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2004, 26(9): 517-520.

[13] Su J L, Shih J Y, Yen M L, *et al*. Cyclooxygenase-2 induces EP1- and HER-2/Neu-Dependent vascular endothelial growth factor-C up-regulation: a novel mechanism of lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma[J]. Cancer Res, 2004, 64(2): 554-564.

[14] Liu L, Zhao L, Zhang Y, *et al*. Proteomic analysis of Tiam1-mediated metastasis in colorectal cancer[J]. Cell Biol Int, 2007, 31(8): 805-814.

[15] 李 焱, 蒋 勇, 史立群, 等. HMGB1 和 VEGF-C/D 在结肠癌组织中的表达及与淋巴结转移之间的关系[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(11): 1237-1239.

(编辑 龙 亮)