论著

文章编号:1000-5404(2009)23-2330-04

siRNA干扰骨形态发生蛋白2对肝癌SMMC7721细胞迁移和侵袭能力的抑制作用

吴建兵,傅华群,黄龙璋,刘安文,张吉翔 (南昌大学第二附属医院肿瘤科,江西省重点医学分子实验室,南昌 330006)

摘 要:目的 设计并化学合成针对骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic proteins,BMP-2)的siRNA分子片段,转染人肝癌SMMC7721细胞,观察其对SMMC7721细胞迁移和侵袭能力的影响。**方法** 设计并化学合成针对BMP-2的3个siRNA分子序列,阳离子脂质体法瞬间转染SMMC7721细胞,运用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和Western印迹法检测细胞中BMP-2在mRNA水平和蛋白水平的变化,体外侵袭实验检测转染后细胞侵袭能力的变化。实验共分6组,①正常对照组;②空白对照组;③阴性对照组;④~⑥分别为BMP-2-siRNA-A、BMP-2-siRNA-B、BMP-2-siRNA-C转染组。**结果** RT-PCR和Western blot显示3对特异性BMP-2-siRNA转染肝癌细胞SMMC7721之后,其BMP-2的基因和蛋白表达均受到抑制,以siRNA-B抑制效果最明显[(0.32±0.07) *vs* (0.92±0.14),(0.37±0.10)*vs*(0.89±0.17),$P<0.01$]。体外侵袭实验显示转染后肝癌细胞数明显低于未转染组和阴性对照组[分别为(6.48±3.62)、(23.72±3.24)、(22.38±3.84),$P<0.05$]。**结论** BMP-2与肝癌的侵袭转移潜能相关,siRNA-BMP-2能明显抑制肝癌细胞SMMC7721的BMP-2表达,从而抑制肝癌细胞的迁移和侵袭能力。

关键词:肝肿瘤;骨形态发生蛋白;RNA干扰;迁移;侵袭

中图法分类号:R394;R73-37;R735.7 **文献标识码**:A

siRNA-BMP-2 inhibits migration and invasion of human hepatoma cell line SMMC7721

WU Jian-bing, FU Hua-qun, HUANG Long-zhang, LIU An-wen, ZHANG Ji-xiang (Department of Oncology, Key Medical Molecular Laboratory of Jiangxi Province, Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

Abstract: Objective To design and prepare siRNAs targeting bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) gene and to observe its effect on the migration and invasion of SMMC7721 cells. **Methods** Three specific siRNAs targeting BMP-2 were designed and synthesized, and then transiently transfected into SMMC7721 cells via cathodolyte liposome transfection method. Reverse transcriptase PCR and Western blotting were used to detect BMP-2 expression at mRNA and protein levels. The migration and invasion ability of cancer cell were assessed by cell scratch assay and *in vitro* invasion assay respectively. There are 6 groups, Group Ⅰ: Normal control group; Group Ⅱ: Control group; Group Ⅲ: Negative control group; Group Ⅳ, Ⅴ, Ⅵ: transfected with BMP-2-siRNA-A, BMP-2-siRNA-B, BMP-2-siRNA-C, respectively. **Results** After all the 3 specific BMP-2-siRNA (A, B, C) were transfected into SMMC7721 cells, the expression of BMP-2 mRNA and protein were significantly inhibited, with BMP-2-siRNA-B having the highest inhibitory rate [(0.32±0.07) *vs* (0.92±0.14), (0.37±0.10) *vs* (0.89±0.17), $P<0.01$]. The invasion assay demonstrated that the number of hepatoma cancer cells in transfection group was significantly lower than that in untransfected group, blank control group and negative control group [(6.48±3.62) *vs* (23.72±3.24), (22.38±3.84), $P<0.05$], which suggested that silencing BMP-2 gene obviously decreased the migration and invasion ability of hepatoma cancer cells. **Conclusion** BMP-2 is correlated with the migration and invasion potential of hepatoma cells. The siRNA of BMP-2 gene effectively inhibits the mRNA and protein expression of BMP-2, and then restrain the migration and invasion ability of the cells.

Key words: liver neoplasms; bone morphogenetic proteins; RNA interference; migration; invasion

基金项目:江西省卫生厅资助基金(20081017)

Supported by the Foundation of Health Department of Jiangxi Province(20081017)

作者简介:吴建兵,男,江西省丰城市人,硕士,副主任医师,副教授,主要从事肝癌的基础与临床方面的研究,发表论文11篇。电话:(0791)6292596,E-mail:wujianbing2000@sina.com

收稿日期:2009-05-25;**修回日期**:2009-06-10

肝癌具有的高度侵袭和转移能力是其临床治疗颇为棘手的难题,也是影响其疗效和预后的关键因素。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins,BMPs)是一组能广泛参与调节多种细胞增殖、分化和凋亡的生物学过程的功能蛋白,除了可以诱导间充质干细胞向骨形成细胞分化外,还可诱导各种血管活性因子形成并刺激内皮细胞的迁移和新生血管形成[1]。细胞迁移是器官形成和肿瘤发生的生物学基础,在肿瘤的侵袭、转移中,BMPs 扮演了十分重要的角色。近期研究认为 BMPs 的高表达与肿瘤疾病的形成和发展密切相关,其中 BMP-2 与肿瘤的关系最为重要,BMP-2 基因有可能成为肿瘤治疗的新型靶点[2]。因此,本研究旨在采用 RNA 干扰技术,主要观察 BMP-2-siRNA 抑制 SMMC7721 细胞中 BMP-2 基因表达及其对 SMMC7721 细胞迁移和侵袭能力的影响,为进一步深入研究 BMPs 在人肝癌发生、发展及生物学特性中所起的作用提供理论和实验依据。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

人肝癌细胞株 SMMC7721 购自上海麦莎生物科技有限公司,Borden 小室(BD 公司),RPMI1640 培养基(美国 HyClone 公司),二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司),胰蛋白酶(北京 Solarbio公司),胎牛血清(杭州四季青公司),Trizol 试剂(北京天更公司),Lipofectamine2000(Invitrogen 公司),逆转录试剂盒(Fermentas 公司),BMP-2 鼠抗人单克隆抗体、Actin 兔抗人多克隆抗体(Santa Cruz 公司),山羊抗鼠二抗、山羊抗兔二抗(北京中杉金桥生物公司),免疫印迹配胶、电泳、电转装置(Bio-Rad 公司),流式细胞仪(BD 公司)。

1.2　细胞复苏与培养

液氮中取出 SMMC7721 细胞,37 ℃水浴化冻,快速放入含 10% 胎牛血清、RPMI1640 培养基中,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育,生长至 90% 密度时无菌条件下 0.25% 胰酶 37 ℃消化传代。

1.3　BMP-2-siRNA 靶序列的设计与合成

根据 GenBank 公布的 hBMP-2 mRNA(NM_001200),根据人 BMP-2 基因序列及其二级结构特征,依据 Tuschl 等设计 siRNA 原则,使用 Ambion 公司提供的网上设计软件设计 3 对 hBMP-2-siRNA 序列,分别命名为 BMP-2-siRNA-A、BMP-2-siRNA-B 及 BMP-2-siRNA-C 并设计阴性对照。siRNA 转录模板由广州博锐生工生物工程公司合成,序列见表 1。

表 1　特异性 BMP-2-siRNA 序列

名称	序列
BMP-2-siRNA-A	正义链:5′-GCAGGUCUUUGCACCAAGAdTdT-3′
	反义链:5′-UCUUGGUGCAAAGACCUGCdTdT-3′
BMP-2-siRNA-B	正义链:5′-GCAACAGCCAACUCGAAAUdTdT-3′
	反义链:5′-AUUUCGAGUUGGCUGUUGCdTdT-3′
BMP-2-siRNA-C	正义链:5′-GCUGUACCUUGACGAGAAUdTdT-3′
	反义链:5′-AUUCUCGUCAAGGUACAGCdTdT-3′

1.4　分组及转染

细胞转染时常规分为以下 6 组:①正常对照组(未经转染的细胞);②空白对照组(只转染脂质体,无特异性 siRNA);③阴性对照组(转染非特异性 siRNA);④～⑥分别为 BMP-2-siRNA-A、BMP-2-siRNA-B、BMP-2-siRNA-C 转染组。调节细胞数为 2×10^5/ml,接种于 6 孔板内,孵箱培养 24 h,细胞密度达 40%～50% 融合时用于转染。转染前细胞用无血清 RPMI1640 培养基 3 ml 培养 2 h。按转染试剂盒说明书转染。转染后 6 h,换成常规含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基继续培养至 48 h。每组细胞设 5 个平行复孔实验($n=5$)。

1.5　半定量 PCR 检测 BMP-2 mRNA 水平的表达

采用一步法提取总 RNA。BMP-2 及 GAPDH 内参引物由广州锐博生物工程有限公司合成。BMP-2 引物上游:5′-AACCTGCAACAGCCAACT-3′,下游:5′-GGAGCCACAATCCAGTCAT-3′,PCR 产物长度 418 bp。内参 GAPDH 引物上游:5′-GAAGGTCGGAGTCAACGG-3′,下游:5′-GCTCAGTGTAGCCCAGGAT-3′,PCR 产物长度为 825 bp。PCR 扩增条件:94 ℃预变性 2 min,然后 94 ℃变性 45 s,52 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 30 s,共 30 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后观察结果。

1.6　Western 印迹检测 BMP-2 蛋白水平的表达

蛋白质的提取:将预冷至 4 ℃的 5 倍体积的裂解缓冲液加入到经 PBS 漂洗的各培养组细胞中,冰上作用 20 min,于 4 ℃,12 000 × g 离心 2 min 后取上清液 - 20 ℃保存备用。采用 Bradford 法测定蛋白质浓度,以 50 μg/孔上样,在非还原的条件下经 12% 的 SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离后,转移至硝酸纤维素膜上,在含 5% 脱脂奶粉的 PBS 中 4 ℃封闭过夜,加入 1∶200 稀释的鼠抗人 BMP-2 抗体,室温下反应 2 h,经 0.05% Tween-PBS 洗涤 3 次后,再与 1∶2 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 作用 2 h,0.05% Tween-PBS 洗涤 3 次,每次 10 min。最后,ECL 显影,压片,观察结果。以 β-actin 为内参照,目的蛋白量 = 目的蛋白条带光密度/β-actin 条带光密度,实验重复 3 次。

1.7　细胞划痕实验

接种细胞于 6 孔细胞培养板,细胞生长达 80% 满后,进行转染。于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 6 h 后,采用细胞刮刀在各观察组(未转染组、阴性对照组、BMP-2-siRNA 组)细胞培养表面对细胞作长约 2 cm 的划痕。加入无抗生素含 10% 胎牛血清 RPMI1640 的培养液继续培养 24 h 后在 200 倍相差显微镜下测量细胞划痕宽度(width of cells scratch,WCS),宽度较小者表示肝癌 SMMC7721 细胞相对迁移能力较强,每组细胞设 5 个平行复孔实验($n=5$)。

1.8　体外侵袭实验

采用孔径为 8 μm 的 24 孔 Borden 小室进行实验。先用无血清 RPMI1640 培养液冲洗小室上室 2 次,然后加入 1∶3 稀释的 Matrigel 胶 50 μl,37 ℃孵育 30 min,制作人工基底膜。于上室分别加入各组(未转染组、阴性对照组、BMP-2-siRN 组)1×10^5 细胞,总体积 200 μl,下室加入 600 μl 0.1% BSA-无血清

RPMI1640 液，置 37 ℃、5% CO_2 中培养 24 h。取出小室，弃除上室液体，用棉签擦尽上室膜面未穿膜的细胞，室温下用甲醇固定 5 min，常规 Gimsa 染色，中性树胶封片，200 倍光镜下计数 5 个视野的侵袭细胞数，取其平均值；以侵袭细胞的相对数目表示肿瘤细胞的侵袭能力，每组设 3 个复孔，实验重复 3 次。

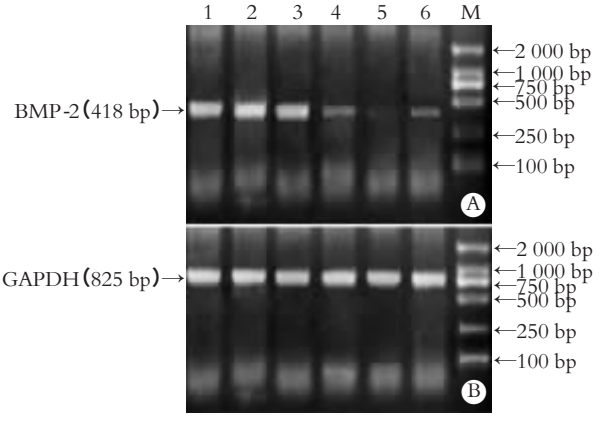
1.9 统计学处理

实验数据均应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析，各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 t 检验。

2 结果

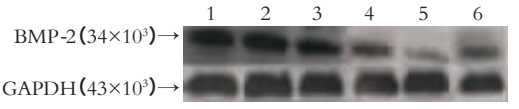
2.1 BMP-2 基因沉默对 SMMC7721 细胞中 BMP-2 mRNA 和蛋白表达的影响

脂质体法转染 SMMC7721 细胞后 48 h，经半定量 RT-PCR 结果显示各组样品在 825bp 处有 GAPDH 基因条带，BMP-2 基因条带在约 418 bp 处（图 1）。正常对照组、空白对照组、阴性对照组以及 BMP-2-siRNA-A 转染组、BMP-2-siRNA-B 转染组、BMP-2-siRNA-C 转染组条带经光密度测定、计算 BMP-2/GAPDH 比值分别为（0.89 ± 0.11）、（0.93 ± 0.12）、（0.92 ± 0.14）、（0.65 ± 0.08）、（0.32 ± 0.07）、（0.55 ± 0.07），各组进行比较，可见 3 个转染组细胞 BMP-2 表达均明显低于其他对照组（$P < 0.05$）。其中，BMP-2-siRNA-B 转染组干扰效果最好，mRNA 表达最低，其表达的相对值由（0.92 ± 0.14）降至（0.32 ± 0.07）（$P < 0.01$），而正常对照组、空白对照组和阴性对照组间差异无统计学意义（$P > 0.05$）。Western 印迹法检测结果显示 BMP-2-siRNA-B 组转染后干扰效果最好，BMP-2 蛋白的表达量明显下调，其表达的相对值由（0.89 ± 0.17）降至（0.37 ± 0.10）（$P < 0.01$），而正常对照组、空白对照组和阴性对照组间差异无统计学意义（图 2）。Western blot 检测结果与 RT-PCR 一致。



A：BMP-2；B：GAPDH　　M：DNA 标准（DL 2000）；1：正常对照组；2：空白对照组；3：阴性对照组；4：BMP-2-siRNA-A 转染组；5：BMP-2-siRNA-B 转染组；6：BMP-2-siRNA-C 转染组

图 1　半定量 RT-PCR 方法检测 SMMC7721 细胞中 BMP-2 mRNA 的表达

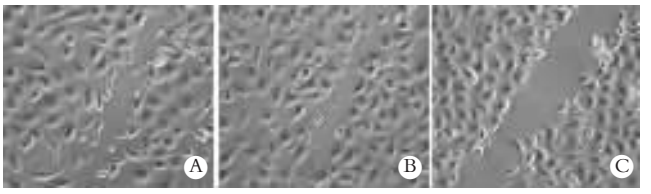


1：正常对照组；2：空白对照组；3：阴性对照组；4：BMP-2-siRNA-A 转染组；5：BMP-2-siRNA-B 转染组；6：BMP-2-siRNA-C 转染组

图 2　Western blot 检测各组 BMP-2 蛋白表达水平

2.2 细胞划痕实验结果

为观察 RNA 干扰靶向抑制 BMP-2 基因对肝癌 SMMC7721 细胞迁移能力的影响，我们以干扰效果最明显的 BMP-2-siRNA-B 组做为干扰组与未转染组、阴性对照组进行了细胞划痕实验做对比观察。24 h 后测量细胞划痕宽度显示，BMP-2-siRNA 组肝癌 SMMC7721 细胞迁移能力显著降低［（65.8 ± 5.3）μm *vs*（36.6 ± 4.0）、（34.1 ± 5.1）μm，$P < 0.01$，图 3］。

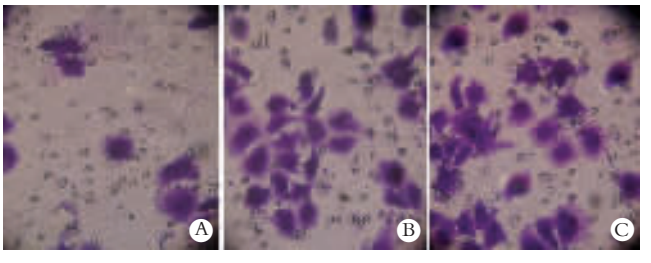


A：未转染组；B：阴性对照组；C：BMP-2-siRNA 组

图 3　肝癌 SMMC7721 细胞迁移实验结果　（LM ×200）

2.3 Transwell 小室体外侵袭实验

Transwell 小室上室细胞穿过膜上 matrigel 到膜的下室面，其数量反映了细胞侵袭能力的大小。在镜下观察扫描全膜，随即取 5 个视野的 BMP-2-siRNA 组、未转染组、阴性对照组细胞，检测各组细胞穿透数分别为（11.0 ± 2.0）、（33.0 ± 3.1）、（35.0 ± 3.4），提示 BMP-2-siRNA 沉默 BMP-2 基因后，肝癌 SMMC7721 细胞细胞的穿透数明显降低即细胞侵袭能力降低，与未转染组、阴性对照组细胞比较差异有统计学意义（$P < 0.01$，图 4）。



A：BMP-2-siRNA 组；B：未转染组；C：阴性对照组

图 4　细胞侵袭实验中各组 SMMC7721 细胞的侵袭细胞数　（Gimsa ×200）

3 讨论

骨形态发生蛋白（BMPs）是一组能广泛参与调节多种细胞的增殖、分化和凋亡的生物学过程的功能蛋白，能诱导前体细胞的迁移和分化，调节细胞的生长、增殖、迁移和胚胎干细胞的自我更新。近年来，BMP-2 作为生物体重要的基因调控分子，与疾病的关系尤其是与肿瘤的关系成为生物医学领域研究的热点。BMPs 除了可以诱导间充质干细胞向骨形成细胞分化

外,还可诱导各种血管活性因子形成并刺激内皮细胞的迁移和新生血管形成[1]。在肿瘤的侵袭、转移中,BMPs 扮演了十分重要的角色,众多的研究一致显示 BMPs 可以显著增加细胞的迁移和侵袭性。Langenfeld 等[3]研究 BMP-2 在肺癌 A549 细胞中高表达并显著地增加了其迁移和侵袭性。Busch 等[4]发现 BMP-2 可以增加黑素瘤 B16-F1 细胞的侵袭性,而用 BMPs 的天然拮抗剂 noggin 预处理细胞后则可以阻断该细胞的侵袭力和肿瘤形成的能力。Rothhammer 等[5]报道 BMP-4 显著地促进黑色素瘤细胞的迁移和侵袭。Montesano 等[6]发现 BMP-4 可促进乳房上皮细胞侵袭性生长,在 1 ~ 10 ng/ml 的溶度时,BMP4 诱导乳房上皮细胞向外侵袭性生长,在较高的溶度 20 ~ 100 ng/ml 时,BMP4 可导致细胞与细胞之间粘连的断裂,使细胞分散,并促使个体细胞进入周围的胶原基质中,从而增加细胞的侵袭性,促使乳腺癌的形成。Deng 等[7]研究认为过表达 BMP-4 可以对抗血清饥饿诱导的细胞凋亡和增加其迁移和侵袭性。Langenfeld 等[8]发现 BMP-2 能显著地增加裸鼠中 A549 细胞形成的肿瘤中的血管生成,证明 BMP-2 通过刺激血管生成来促进肿瘤生长。Darby 等[9]报道 BMP-6 对前列腺癌 PC3M 和 DU145 细胞的增殖无明显增强作用,但显著增加了细胞的迁移和侵袭性,同时也观察到 BMP-6 可以诱导金属蛋白酶 MMP-2 和 MMP-9mRNA 以及 MAPK(促分裂原活化蛋白激酶)磷酸化水平的升高。Piccirillo 等[10]报道 BMP-BMPR 信号系统控制正常脑干细胞的活动,在恶性胶质瘤形成初期起关键的抑制作用,BMPs 可以作为人恶性胶质瘤一个非细胞毒治疗的新的靶点[4]。但迄今为止,有关 BMP-2 对于肝癌细胞迁移和侵袭性的影响尚待研究。在前期的研究中,我们应用应用半定量逆转录聚合酶链反应和 Western blot 方法检测了正常肝脏组织和肝癌组织的 BMP-2 的表达水平,发现肝癌组 BMP-2mRNA 水平和蛋白水平的相对表达量显著高于正常肝脏组织,提示 BMP-2 与肝癌具有密切的关系[11],但其具体的生物学功能还不清楚。siRNA 干扰技术是一种高效、特异的基因沉默手段。本实验设计并在体外化学合成 3 对 BMP-2-siRNA 序列,利用阳离子脂质体转染法转入人肝癌 SMMC7721 细胞中,通过 RT-PCR 和 Western 印迹技术检测转染后 BMP-2 基因 mRNA 水平和蛋白水平的表达。实验数据证实这 3 对序列均可产生干扰作用,其中以 B 序列的效果最强,用于后续实验。为进一步研究 BMP-2 基因在肝癌细胞侵袭、转移过程中作用,我们又进行了细胞划痕实验和 Transwell 体外侵袭实验。前者是测定细胞迁移能力的经典方法之一,后者可在体外环境中较理想地模拟并反映肿瘤细胞的侵袭行为和能力。实验结果表明,靶向抑制 BMP-2 基因的 RNA 干扰使得实验组细胞的体外迁移和穿膜能力较对照组细胞出现了明显的降低,从而进一步证实了 BMP-2 基因在肝癌细胞侵袭和转移过程中的重要作用,但其具体的作用机制尚待进一步研究。

总之,我们初步的研究结果表明 BMP-2 基因在肝癌侵袭转移过程中扮演了不容忽视的角色,BMP-2 基因很可能会成为肝癌分子靶向治疗的一个重要靶点。进一步的基础和临床研究将为此提供更多的证据,并有助于评估其可行性。

参考文献:

[1] Langenfeld E M, Langenfeld J. Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors[J]. Mol Cancer Res,2004,2(3):141 - 149.

[2] Davies S R, Watkins G, Douglas-Jones A, *et al*. Bone morphogenetic proteins 1 to 7 in human breast cancer, expression pattern and clinical/prognostic relevance[J]. J Exp Ther Oncol, 2008, 7(4): 327 - 338.

[3] Langenfeld E M, Calvano S E, Abou-Nukta F, *et al*. The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells[J]. Carcinogenesis, 2003,24(9):1445 - 1454.

[4] Busch C, Drews U, Eisele S R, *et al*. Noggin blocks invasive growth of murine B16-F1 melanoma cells in the optic cup of the chick embryo [J]. Int J Cancer, 2008,122(3):526 - 533.

[5] Rothhammer T, Poser I, Soncin F, *et al*. Bone morphogenic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration[J]. Cancer Res,2005,65(2):448 - 456.

[6] Montesano R. Bone morphogenetic protein-4 abrogates lumen formation by mammary epithelial cells and promotes invasive growth[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007,353(3):817 - 822.

[7] Deng H, Makizumi R, Ravikumar T S, *et al*. Bone morphogenetic protein-4 is overexpressed in colonic adenocarcinomas and promotes migration and invasion of HCT116 cells[J]. Exp Cell Res, 2007,313(5): 1033 - 1044.

[8] Langenfeld E M, Bojnowski J, Perone J, *et al*. Expression of bone morphogenetic proteins in human lung carcinomas[J]. Ann Thorac Surg,2005,80(3):1028 - 1032.

[9] Darby S, Cross S S, Brown N J, *et al*. BMP-6 over-expression in prostate cancer is associated with increased Id-1 protein and a more invasive phenotype[J]. J Pathol, 2008,214(3):394 - 404.

[10] Piccirillo S G, Reynolds B A, Zanetti N, *et al*. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells[J]. Nature, 2006, 444(7120): 761 - 765.

[11] 吴建兵,傅华群,黄龙璋,等. 骨形态发生蛋白 2、6 在肝癌中的表达及意义[J]. 世界华人消化杂志,2009,17(8): 834 - 837.

(编辑　张　维)