论著

文章编号:1000-5404(2010)14-1524-05

OPN基因沉默抑制MKN28细胞生长、侵袭及凋亡

王 霆[1],郭传勇[2] (200336 上海,上海市长宁区中心医院消化科[1];200072 上海,同济大学附属第十人民医院消化科[2])

[摘要] 目的 检测骨桥蛋白(osteopontin,OPN)对人胃癌细胞MKN28生长、侵袭及凋亡的影响。方法 利用脂质体转染的方法,进行胃癌转移相关基因骨桥蛋白(OPN)的siRNA,并通过荧光定量PCR以及免疫荧光的方法,进行siRNA效果鉴定。根据siRNA的抑制效果,将细胞分为正常对照组、非特异干扰组、特异干扰24 h组、特异干扰36 h组和特异干扰48 h组,比较对照组与不同siRNA作用时间组的细胞增殖、细胞凋亡、迁移黏附能力的改变。结果 siRNA作用48 h组,OPN的表达最低;相应地,其细胞活力降低,增殖抑制率达30.20%,迁移黏附能力降低,基质膜上的细胞数目明显减少[对照组与OPN干扰组比较:(42.0±9.4) *vs* (21.8±6.9),$P<0.01$],细胞对基底膜基质和纤维连接蛋白的黏附百分比明显降低[对照组与OPN干扰组比较:基底膜基质,(41.5±8.4)% *vs* (20.5±4.5)%;纤维连接蛋白,(25.3±4.5)% *vs* (14.6±2.5)%],凋亡增加。结论 OPN基因沉默能有效抑制人胃癌细胞MKN28的生长、侵袭,并促进凋亡的发生。

[关键词] 骨桥蛋白;人胃癌细胞MKN28;siRNA干扰;迁移;黏附;凋亡
[中图法分类号] R73-362;R730.23;R735.2 [文献标志码] A

Silencing of osteopontin suppresses invasion and apoptosis of human gastric cancer MKN28 cells

Wang Tin[1], Guo Chuanyong[2] ([1]Department of Gastroenterology, Central Hospital of Shanghai Changning District, Shanghai, 200336; [2]Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Shanghai Tongji University, Shanghai, 200072, China)

[Abstract] Objective To detect the effect of osteopontin (OPN) siRNA on the growth, invasion and apoptosis of human gastric cancer cell line MKN28. Methods The eukaryotic expression vector of siRNA specific for OPN was constructed by liposome transfection, and the silencing effect was identified by fluorescence quantitative PCR and immunofluorescence staining. According to the inhibitory effect of the siRNA vectors, the experiment was divided into control group, non-specific OPN siRNA group, 24-hour specific OPN siRNA group, 36-hour specific OPN siRNA group, and 48-hour specific OPN siRNA group. The cell proliferation, apoptosis, migration and adhesion was finally detected among control group and OPN siRNA groups at different time points. Results For 48-hour specific OPN siRNA group, the expression of OPN in MKN28 cells was the lowest. Accordingly, the cell viability was decreased and the cell proliferation inhibitory rate was reduced to 30.20%; the ability of migration and adhesion was decreased, the number of cells attached on stromal cell membrane was much lesser (21.8±6.9 *vs* 42.0±9.4 in control group), and the ratio of cell adhesion on basement membrane matrix and fibronectin was lower [basement membrane matrix: (41.5±8.4)% *vs* (20.5±4.5)%; fibronectin: (25.3±4.5)% *vs* (14.6±2.5)% in control group], as well as the cell apoptotic rate was increased compared with the control group. Conclusion OPN gene silencing can inhibit the growth and invasion, as well as accelerate apoptosis in human gastric cancer MKN28 cells.

[Key words] osteopontin; human gastric cancer cell MKN28; siRNA interference; migration; adhesion; apoptosis

Corresponding author: Guo Chuanyong, Tel: 86-21-62909911-2302, E-mail: guochuanyong@sina.com

[通信作者] 郭传勇,电话:(021)62909911-2302,E-mail:guochuanyong@sina.com

骨桥蛋白(osteopontin,OPN)是一种具有多种功能的分泌型钙结合磷酸化糖蛋白,它能与骨组织中的羟磷灰石紧密结合,参与调节骨钙的沉积。OPN 不仅与骨组织的矿化密切相关,而且与 Ca^{2+}、NO^- 等细胞信使、巨噬细胞趋化反应、平滑肌细胞增生及感染等多种生理、病理现象密切相关。1979 年 Senger 等首次报道一种转化特异性分泌蛋白与肿瘤的关系,称之为转化相关性磷酸蛋白。后来 Franzen 等从骨组织中分离出一种磷蛋白,其特性与 Senger 等发现的磷蛋白相似,正式命名为骨桥蛋白。它是一种与肿瘤细胞的转化、浸润和转移有关的蛋白质,甚至有人认为它是一种肿瘤标志物。OPN 可以作为一种判断预后及监测肿瘤复发或转移的指标,具有较高的临床意义[1]。大量的研究表明 OPN 与多种肿瘤细胞的发生、发展、浸润、转移有关。Furger 等[2] 认为 OPN 在人类多种肿瘤中都呈现高表达,并且在有些转移肿瘤患者血液中亦出现高水平表达。最近的临床研究也提示 OPN 不仅与多种类型的肿瘤相关,而且 OPN 在患者血液和肿瘤组织中的高表达有助于提示肿瘤的预后信息。Coppola 等[3] 采用免疫组织化学技术检测 350 例患者肿瘤组织和 113 例不同部位的正常组织,认为 OPN 的表达与肿瘤的分期有关,并且与肿瘤的特定部位相关。此外,OPN 能广泛表达在人体不同肿瘤组织中,参与肿瘤的形成。OPN 在多种肿瘤类型以及在不同阶段的肿瘤病理分型的不同表达程度,说明 OPN 在肿瘤的侵袭与转移中起到一定作用。OPN 可以抑制 NO 及 O_2^-、OH^- 等活性基团的产生,从而阻止炎症细胞的氧暴发,使得癌细胞在周围环境的生存率提高,促进转移细胞的生存。OPN 参与细胞与基底膜的黏附,形成酸性微环境,促进局部基底膜以及相邻的细胞基质的破坏,与整合素 αv β3 结合刺激细胞的信号转导,抑制激活动巨噬细胞和内皮细胞对肿瘤细胞的杀伤作用而促进肿瘤细胞的浸润及转移[4]。

本实验采用 siRNA 干扰的方法,观察其对胃癌细胞 MNK28 生长以及迁移黏附的影响,为临床干预提供思路。

1 材料与方法

1.1 脂质体的细胞株转染

OPN siRNA 由上海英为信设计合成,靶序列基因位于起始密码子下游 494 的核苷酸的开放读码框内(NM_000582)。其特异干扰序列如下:正义链 GAAACUCCUGUAAACUAAd TdT;反义链 UAAGUUUACAGGGAGUUUCdGdT。非特异干扰序列:非特异性 siRNA,正义链 UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT;反义链 ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT。

脂质体(Lipofectamine2000™)购于美国 Invitrogen 公司,人胃癌细胞 MNK28 购自中科院上海细胞所。MNK28 细胞培养于含 10% 胎牛血清(HyClone, USA)RPMI1640 培养液(Gibco, USA)中,置于 5% CO_2 的 37 ℃ 培养箱中。转染前 1 d,含 0.02% EDTA 的胰酶(HyClone, USA)消化、细胞计数(2×10^5/孔)、细胞铺板在 2 ml/孔的完全培养基中。转染前 4 h 换无血清无抗生素的新鲜培养基,加入含有 2 μg OPN 50 μl 和 10 μl 脂质体的混合液,分别培养 6、12、24 h。

1.2 实验分组

实验分 5 组:正常对照组,非特异干扰组(用非特异干扰序列进行 siRNA 干扰)和特异干扰(用非特异干扰序列进行siRNA 干扰)24、36、48 h 组。

1.3 免疫组化干扰效果的鉴定

将细胞接种到预先放置几张 6 mm×22 mm 盖玻片的培养瓶或培养皿中,置二氧化碳培养箱培养 4 h,待细胞和盖玻片表面完全吸附后,取出盖玻片,PBS(HyClone, USA)洗 2 次,然后用丙酮固定 10 min。将已经固定的细胞玻片 PBS 振洗 5 min 后,取出吹干,滴加 1∶2 000 的 OPN 单克隆抗体(Santa Cruz 公司,USA) 4 ℃过夜,然后 FITC 标记的二抗 37 ℃ 30 min,缓冲甘油封片。荧光显微镜下观察并进行荧光强度扫描。

1.4 荧光定量 PCR 法 OPN mRNA 表达的检测

$10^5\sim10^6$ 细胞加 1 ml Trizol (Invitrogen 公司,USA) 进行 RNA 抽提,去除基因组 DNA 后,逆转录为 cDNA,然后进行基因的扩增。引物在 BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) 进行查询比对,OPN 的引物序列(5′→3′):上游:CCACATG-GCTAA-ACCCTGACC;下游:CATGGCTTTCGTTGGACTTACTTG,126 bp;GAPDH 的引物序列(5′→3′):上游:ATGACCCCTTCATT-GACC;下游:GAAGATGGTGATGGGATTTC,131 bp。扩增条件为 95 ℃ 90 s;95 ℃ 5 s,58 ℃ 30 s;40 个循环。25 μl 的反应体系如下:5×R-PCR Buffer 5.0 μl;250 mmol/L Mg^{2+} 0.3 μl;10 mmol/L dNTP 0.75 μl;10 μmol/L 上游引物 0.5 μl;10 μmol/L 下游引物 0.5 μl;25×SYBR Green Ⅰ 1.0 μl;10^{-3}× Calibration 1.0 μl;5 U/μl HS-Ex-*Taq* 0.25 μl;ddH$_2$O 14.7 μl;模板(cDNA) 1.0 μl。

1.5 MTT 实验

细胞于 96 孔板中培养 48 h 后,各孔中加入 10 μl 的 MTT (凯基生物,中国)并继续培养 4 h。吸去上清,每孔加入 150 μl DMSO,轻轻振荡使甲臜溶解,用酶标仪检测 570 nm 处的光密度值[D(570)],并计算抑制率(inhibition rate,IC)。

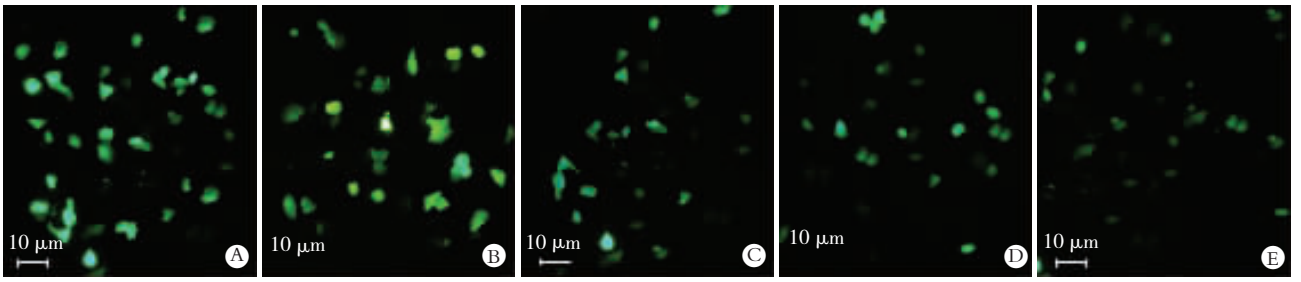
IC = 1 − [D(570)药物处理组/D(570)对照组] ×100%。

1.6 DNA ladder 检测细胞凋亡

收集细胞,加入细胞裂解液,13 000 r/min 离心 5 min 并收集上清。加入 1% SDS 和 RNAase(5 mg/ml)56 ℃,2 h;蛋白酶 K(2.5 mg/ml)37 ℃,2 h;1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠和 2.5 倍体积的冷无水乙醇沉淀 DNA,4 ℃ 过夜。14 000 r/min 离心 15 min,收集沉淀并进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳。

1.7 细胞核形态变化观察

收集细胞,滴加 0.5 mg/ml Hoechst 溶液染色 5 min;PBS 洗涤后,荧光显微镜观察并拍照。



A 正常对照组；B 非特异干扰组；C 特异干扰 24 h 组；D 特异干扰 36 h 组；E 特异干扰 48 h 组

图 1 荧光免疫条件下不同干扰时间点 OPN 表达的沉默

1.8 扫描电镜细胞超微结构的观察

收集细胞并离心，2.5% 戊二醛前固定 2 h，1% 四氧化锇后固定 2 h，梯度酒精脱水，CO_2 临界点干燥，铂金包被固定，扫描电镜 S-4500（Hitachi 公司，Japan）观察拍照。

1.9 Transwell 法细胞迁移检测

非特异 OPN 转染 48 h 后，收集约 15 000 个细胞，通过预先可溶性组织基底膜涂层的直径为 6.5 mm 的聚碳酸酯过滤器的 Transwell 小室（Corning 公司，USA）。培养 96 h 后，棉签拭去非透过细胞，固定粘在过滤器下聚碳酸酯表面的透过细胞，HE 染色，显微镜观察（5 个视野/孔，×400）。

1.10 黏附实验

50 μl 基底膜基质（1∶20 稀释）或 10 μg/ml 纤维连接蛋白涂层 96 孔培养板，过夜干燥。使用前，用含 10 mg/ml 牛血清白蛋白的 RPMI1640 孵育 96 孔板 1 h，接种转染 48 h 的悬浮细胞细胞 2×10^4/孔，孵化 1 h 后，洗板，黏附细胞胰蛋白酶消化，计数并进行百分比计算。

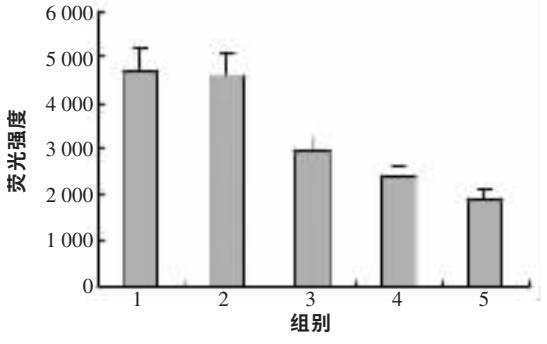
1.11 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 11.5 统计软件包进行统计学处理，组间差异采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 免疫组化观察细胞 OPN 的沉默效果

如图 1、2 所示，荧光免疫染色后，观察不同干扰时间下的 OPN 沉默效果，并进行荧光强度的计算。结果显示，特异干扰 24 h 组的效果比较理想。

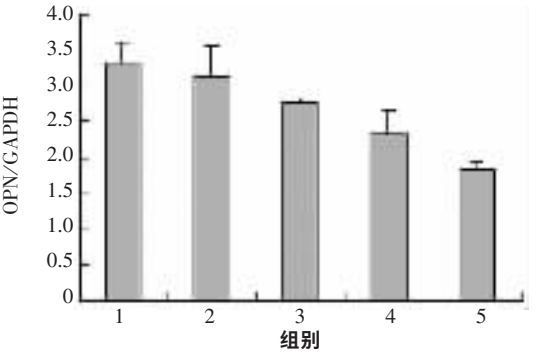


1 正常对照组；2 非特异干扰组；3 特异干扰 24 h 组；4 特异干扰 36 h 组；5 特异干扰 48 h 组

图 2 各组 OPN 的荧光强度比较

2.2 荧光定量 PCR 法检测 OPN mRNA 的表达

如图 3 所示，随着作用时间的延长，OPN 基因的表达呈现下降的趋势。



1 正常对照组；2 非特异干扰组；3 特异干扰 24 h 组；4 特异干扰 36 h 组；5 特异干扰 48 h 组

图 3 siRNA 作用不同时间后 OPN 的基因表达

2.3 MTT 细胞活力的检测

转染后细胞活力下降，程度随着转染时间增长而加强，48 h 后，与正常对照组比较，抑制率达到 30.2%，见表 1。

表 1 不同 OPN siRNA 时间点 MTT 细胞活力及抑制率

组别	细胞活力[D(570)]	IC（相对于对照组）
正常对照组	1.754±0.009	
非特异干扰组	1.758±0.052	−0.23%
特异干扰 24 h 组	1.564±0.029	10.83%
特异干扰 36 h 组	1.419±0.042	19.06%
特异干扰 48 h 组	1.224±0.093	30.20%

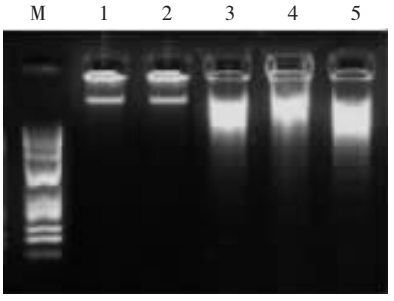
2.4 DNA ladder 法检测细胞凋亡

细胞凋亡过程，基因组 DNA 断裂为 180200 bp 的多条寡核小体片段。各组电泳结果见图 4。对照组和非特异干扰组表现为一个没有受到切割的高分子量条带，而特异性干扰组凋亡细胞则形成明显的梯状 DNA 片段。

2.5 Hoechst 染色观察凋亡细胞核形态的改变

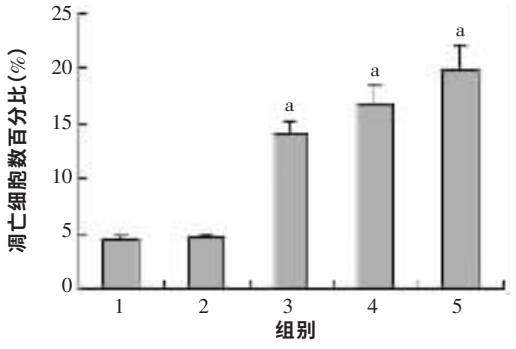
细胞凋亡过程中，染色质浓缩、边缘化，核膜裂解、染色质分割，形成均一的凋亡小体，通过 Hoechst 核染色，我们清楚地观察到了这种凋亡改变（图 5）。随着干预时间的延长，Hoechst

阳性细胞数也增多，特异干扰 24、36、48 h 组与正常对照组相比，差异有统计学意义（$P<0.01$）。



M：标准；1：正常对照组；2：非特异干扰组；3：特异干扰 24 h 组；4：特异干扰 36 h 组；5：特异干扰 48 h 组

图 4 各组细胞凋亡的电泳结果



a：$P<0.01$，与正常对照组比较

1：正常对照组；2：非特异干扰组；3：特异干扰 24 h 组；4：特异干扰 36 h 组；5：特异干扰 48 h 组

图 5 各组 Hoechst 阳性凋亡细胞百分比的改变

2.6 扫描电镜观察细胞超微结构

与正常对照组相比，干扰组细胞直径较短，细胞出现皱缩现象。特异干扰 24、36、48 h 组的细胞直径分别为 5.8、5.6 μm 和 5.4 μm，而正常对照组和非特异干扰组的细胞直径则分别为 7.5 μm 和 7.6 μm。结果见图 6。

2.7 Transwell 法检测细胞的迁移

通过定性定量测定 MKN28 细胞的数目，检测胃癌细胞 MKN28 的侵袭力。在特异性干扰 48 h 组，基质膜上的细胞数目明显减少（21.8 ± 6.9），与对照组（42.0 ± 9.4）相比，具有显著的统计学差异（$P<0.01$）。

2.8 细胞黏附检测

利用基底膜基质和纤维连接蛋白涂板，通过计算黏附细胞的百分比，检测 MKN28 细胞的黏附能力。如表 2 所示，在 OPN 特异干扰组，细胞对基底膜基质和纤维连接蛋白的黏附性均降低，黏附细胞的百分比显著下降，与对照组相比，有明显的统计学差异（$P<0.01$）。

表 2 MNK28 细胞对基底膜基质和纤维连接蛋白黏附性检测

[$n=3$，($\bar{x}\pm s$)%]

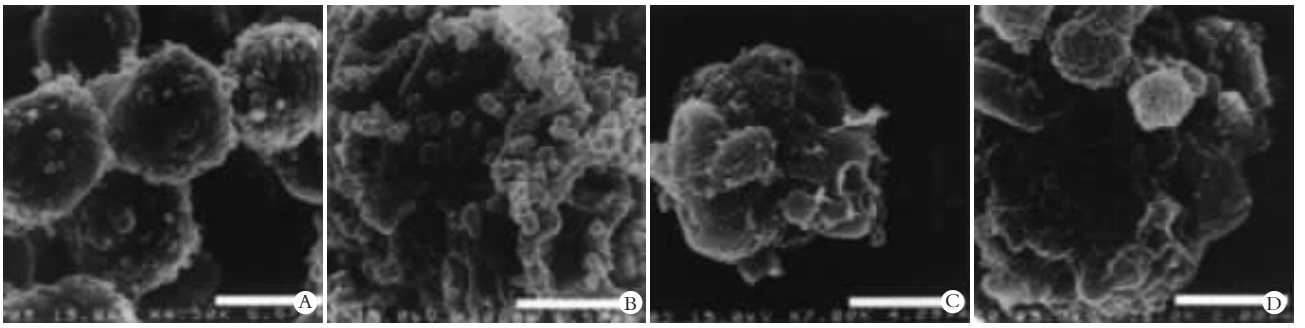
基质类型	对照组	非特异干扰组	OPN 干扰组
基底膜基质	41.5 ± 8.4	44.2 ± 6.2	20.5 ± 4.5[a]
纤维连接蛋白涂板	25.3 ± 4.5	23.2 ± 5.2	14.6 ± 2.5[a]

a：$P<0.01$，与对照组、非特异干扰组比较

3 讨论

近年来的研究显示，OPN 在许多肿瘤中高表达[3,5]，与肿瘤的发生、发展，肿瘤转移[6-9]，肿瘤血管形成[10,11]，抑制凋亡[12,13]等诸多方面关系非常密切，OPN 可作为肿瘤的诊断指标[14]。在胃癌、结肠癌、胰腺癌等肿瘤组织中，OPN 表达均增高，且与肿瘤分期相关。OPN 与 CD44v9 共表达与胃癌淋巴管道浸润和远处淋巴结转移呈正相关。目前，针对 OPN 的肿瘤治疗研究成为新热点。我们通过构建 OPN 特异性 siRNA，下调 OPN 蛋白，观察 OPN 对胃癌细胞株 MKN28 活力、凋亡、转移和黏附能力的影响，探索肿瘤治疗新方法。

siRNA 技术是一种新兴的基因治疗技术，能有效、特异地抑制细胞内基因的表达。它是通过 RNAi 机制在哺乳动物细胞中阻断特定基因的表达从而达到研究基因的功能或基因治疗的目的。与传统的基因治疗药物相比，siRNA 具有两大明显优势：高特异性和高抑制率。siRNA 抑制基因表达的效率极高，甚至可完全阻断基因表达，效果接近基因敲除技术[15,16]。



A：正常对照组（×4 500）；B：干预 24 h 组（×20 000）；C：干预 36 h 组（×7 000）；D：干预 48 h 组（×15 000）

图 6 扫描电镜下不同干预组细胞直径的改变

在本实验中,通过四甲基偶氮唑蓝法我们观察到,OPN siRNA 降低了细胞的活力,抑制其增殖。同时,OPN siRNA 也促进了细胞凋亡的发生。凋亡的发生是一系列的动态改变,前期结构尚无明显改变,细胞缩小,细胞间连接和微绒毛消失,细胞质凝缩,内质网变疏松并与胞膜融合,形成一个个空泡,核糖体与线粒体等细胞器聚集,之后,细胞核内的染色质逐渐凝聚成新月状附在核膜周边,细胞核固缩呈均一的致密物,进而断裂成碎块,此时细胞膜仍保持完整;然后,胞膜及核膜不断出芽、脱落,一个细胞变成数个大小不等的有膜包裹的凋亡小体。扫描电镜观察到了细胞凋亡初始细胞体积的缩小,Hoechst 染色则显示了核的改变,出现了数量不等的凋亡小体。

OPN 的中心结构中有 1 个 RGD 序列,与整合素、CD44 密切相关。后两者是肿瘤细胞黏附的重要物质。肿瘤细胞的侵袭和转移过程涉及生长因子介导的细胞外基质(ECM)降解,使原发部位的肿瘤细胞穿透血管内皮向远处播散,并最终形成新的转移病灶[17]。本研究通过检测不同干预时间 OPN 表达的变化,确定出 OPN siRNA 的最优干预效果。在实现 OPN siRNA 的最优干预效果时,我们观察到肿瘤细胞迁移黏附能力也降低了。如采用细胞穿膜实验体外模拟 ECM 的结果显示,OPN 下调后,穿膜细胞数明显减少,证实 OPN 可促进胃癌细胞侵袭。OPN siRNA 的最优干预时间点的确立,为以后体内外实验中干预时间的选择研究提供参考。

综上所述,本研究中设计的 OPN siRNA 可有效抑制胃癌细胞株中 OPN 的表达,而 OPN 干扰后肿瘤细胞活力下降,其形态发生了改变,凋亡增多,侵袭和黏附能力降低。

参考文献:

[1] Rangaswami H, Bulbule A, Kundu G C, *et al*. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression[J]. Trends Cell Biol, 2006, 16(2): 79-87.

[2] Furger K A, Menon R K, Tuck A B, *et al*. The functional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis[J]. Curr Mol Med, 2001, 1(5): 621-32.

[3] Coppola D, Szabo M, Boulware D, *et al*. Correlation of osteopontin protein expression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(1 Pt 1): 184-190.

[4] Zhang J, Talahashi K, Takahashi F, *et al*. Differential osteopontin expression in lung cancer. [J] Cancer Lett, 2001, 171(2): 215-222.

[5] Schorge J O, Drake R D, Lee H, *et al*. Osteopontin as an adjunct to CA125 in detecting recurrent ovarian cancer[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(10): 3474-3478.

[6] Christensen B, Kazanecki C C, Petersen T E, *et al*. Cell type-specific post-translational modifications of mouse osteopontin are associated with different adhesive properties[J]. J Biol Chem, 2007, 282(27): 19463-19472.

[7] Ye Q H, Qin L X, Forgues M, *et al*. Predicting hepatitis B virus-positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression profiling and supervised machine learning[J]. Nat Med, 2003, 9(4): 416-423.

[8] Wai P Y, Kuo P C. Osteopontin: regulation in tumor metastasis[J]. Cancer Metastasis Rev, 2008, 27(1): 103-118.

[9] Fong Y C, Liu S C, Huang C Y, *et al*. Osteopontin increases lung cancer cells migration *via* activation of the alphavbeta3 integrin/FAK/Akt and NF-kappaB-dependent pathway[J]. Lung Cancer, 2009, 64(3): 263-270.

[10] Takahashi F, Akutagawa S, Fukumoto H, *et al*. Osteopontin induces angiogenesis of murine neuroblastoma cells in mice[J]. Int J Cancer, 2002, 98(5): 707-712.

[11] Tang H, Wang J, Bai F, *et al*. Inhibition of osteopontin would suppress angiogenesis in gastric cancer[J]. Biochem Cell Biol, 2007, 85(1): 103-110.

[12] Zhao J, Dong L, Lu B, *et al*. Down-regulation of osteopontin suppresses growth and metastasis of hepatocellular carcinoma *via* induction of apoptosis[J]. Gastroenterology, 2008, 135(3): 956-968.

[13] Song G, Ming Y, Mao Y, *et al*. Osteopontin prevents curcumin-induced apoptosis and promotes survival through Akt activation *via* alpha v beta 3 integrins in human gastric cancer cells[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2008, 233(12): 1537-1545.

[14] Wu C Y, Wu M S, Chiang E P, *et al*. Elevated plasma osteopontin associated with gastric cancer development, invasion and survival[J]. Gut, 2007, 56(6): 782-789.

[15] Valencia-Sanchez M A, Liu J, Hannon G J, *et al*. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs[J]. Genes Dev, 2006, 20(5): 515-524.

[16] Gong M, Lu Z, Fang G, *et al*. A small interfering RNA targeting osteopontin as gastric cancer therapeutics[J]. Cancer Lett, 2008, 272(1): 148-159.

[17] Lee J L, Wang M J, Sudhir P R, *et al*. Osteopontin promotes integrin activation through outside-in and inside-out mechanisms: OPN-CD44V interaction enhances survival in gastrointestinal cancer cells[J]. Cancer Res, 2007, 67(5): 2089-2097.

(收稿:2010-04-28 修回:2010-06-11)

(编辑 汪勤俭)