论著

文章编号:1000-5404(2013)18-1928-04

RNAi 沉默 MACC1 基因表达抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和迁移

蒋国燕[1],李 瑾[2],施 露[1],曹 进[1],张献全[1] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院肿瘤科[1];400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病重点实验室[2])

[摘要] **目的** 探讨 RNAi 沉默 MACC1 基因表达对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及迁移的影响及相关的分子机制。**方法** 化学合成针对 MACC1 基因的荧光标记的 siRNA-FAM,利用 siRNA 转染试剂将 MACC1 特异性 siRNA-FAM 转染至乳腺癌 MCF-7 细胞;采用 RT-PCR 检测 siRNA 对 MACC1 mRNA 表达的影响,Western blot 检测 siRNA 对 MACC1 蛋白合成的影响;MTT 实验检测沉默 MACC1 基因后对 MCF-7 细胞增殖活性的影响;Transwell 迁移实验检测沉默 MACC1 基因后对 MCF-7 细胞迁移能力的影响;Western blot 检测干扰 MACC1 对 S100A4 及 vimentin 蛋白合成的影响。**结果** MACC1 基因在乳腺癌 MCF-7 细胞高表达;针对 MACC1 基因的 siRNA 转染 MCF-7 细胞 48 h 后,siRNA 组与空白对照组比较,能够显著抑制 MACC1 基因表达和蛋白合成,抑制效率分别为 81% 和 75%;MACC1 特异性 siRNA 转染 MCF-7 细胞 24、48、72 h 后,MMT 结果显示与空白对照组比较,siRNA 组能够抑制细胞生长,并随着时间延长抑制明显($P<0.05$);转染 MCF-7 细胞 48 h 后,Transwell 迁移实验结果显示 siRNA 组与空白对照组比较,穿过小室细胞数明显降低,其能有效抑制 MCF-7 细胞迁移($P<0.05$);siRNA 组与空白对照组相比,S100A4 和 vimentin 表达降低($P<0.05$)。以上实验阴性对照组和空白对照组之间差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 利用特异性 siRNA 干扰 MACC1 基因表达,可显著抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和迁移能力,且这一过程可能与 S100A4 和 Vimentin 的表达下调有关。

[关键词] 结肠癌转移相关基因 1;小干扰 RNA;MCF-7;细胞增殖;细胞迁移
[中图法分类号] R394.3;R730.23;R737.9 [文献标志码] A

RNAi-mediated silencing of MACC1 suppresses proliferation and migration in breast cancer cells MCF-7

Jiang Guoyan[1], Li Jin[2], Shi Lu[1], Cao Jin[1], Zhang Xianquan[1] ([1]Department of Oncology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of metastasis associated in colon cancer 1 (MACC1) knockdown by RNA interference (RNAi) on the proliferation and migration in breast cancer cells. **Methods** The fluorescently-labeled siRNA-FAM targeting MACC1 gene was chemically synthesized, and then transfected into human breast cancer cell line MCF-7 by siRNA transfection reagent. Inhibitory efficiency of MACC1 expression at mRNA and protein levels was examined by RT-PCR and Western blotting respectively. Moreover, MTT assay was applied to assess the influence of specific MACC1 siRNA on the cell growth. Transwell chamber test was used to observe the cell migration ability. Furthermore, downstream migration-related targets of MACC1, S100A4 and vimentin were measured in MCF-7 cells by Western blot analysis. **Results** MACC1 was strongly expressed in MCF-7 cells. Transfection of specific MACC1 siRNA-FAM resulted in a highly-efficient declined expression of MACC1, accounting for 81% at mRNA and 75% at protein levels respectively after 48 hours' transfection. Specific siRNA-FAM of MACC1 also suppressed cell proliferation in a time-dependent manner, with significant differences for the cells after transfection for 24, 48 and 72 h compared with the cells without transfection ($P<0.05$). Transwell chamber test showed that there were less cells migrated through the membrane in the transfected cells than in the control ($P<0.05$), indicating specific MACC1 siRNA-FAM decreasing migration ability in MCF-7 cells. But, no difference was found in migration ability in the blank control and negative control cells ($P>0.05$). Knockdown of MACC1 expression inhibited the expression of S100A4 and vimentin protein in MCF-7 cells ($P<0.05$). **Conclusion** Specific siRNA targeting MACC1 efficiently inhibits the proliferation and migration in MCF-7 cells, which might be through down-regulating

[通信作者] 张献全,E-mail:xqzhng@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130516.1137.002.html(2013-05-16)

S100A4 and vimentin.

[**Key words**] metastasis associated in colon cancer 1; siRNA; MCF-7 cells; cell proliferation; cell migration

Corresponding author: Zhang Xianquan, E-mail: xqzhng@hotmail.com

乳腺癌是影响女性生命健康的最常见的恶性肿瘤[1],2008年全球女性乳腺癌发病率为38.9/10万,死亡率为12.4/10万。中国女性乳腺癌年龄标化发病率为21.6/10万,位居女性癌症第1位;死亡率为5.7/10万,位居女性癌症第6位[2]。乳腺癌的转移和复发是影响患者预后的重要因素之一[3-4],近年发现的结肠癌转移相关基因1(metastasis associated in colon cancer 1, MACC1)在结肠癌等肿瘤转移中起重要作用[5-7],但其在乳腺癌MCF-7增殖和迁移中的作用尚不清楚。本研究拟化学合成MACC1基因特异性siRNA-FAM,转染乳腺癌MCF-7细胞,沉默MACC1基因在MCF-7细胞中的表达,初步探讨MACC1基因对乳腺癌MCF-7细胞增殖和迁移的影响及相关的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株与试剂

MCF-7细胞购于中科院上海分院细胞库。Total RNA提取试剂RNAiso Plus,逆转录试剂盒PrimeScript® RT reagent Kit、Premix *Taq*® Version 2.0 (TaKaRa公司);DNA Marker(Bioer公司);PCR引物(上海生工);DMEM培养液(HyClone公司);胎牛血清(Gibco公司);转染试剂X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent(Roche公司);兔抗人MACC1多克隆抗体、兔抗人S100A4多克隆抗体、兔抗人vimentin多克隆抗体(Abcam公司);兔抗人GAPDH多克隆抗体(赛诺博公司),(H+L)/HRP辣根酶标记山羊抗兔IgG(H+L)(北京中杉金桥公司);MTT(Sigma公司);Transwell小室(Corning公司)。

1.2 化学合成siRNA-FAM

siRNA-MACC1序列:正义链:5′-GCCCAUCAGAGUAUACAUATT-3′,反义链:5′-UAUGUAUACUCUGAUGGGCTT-3′。siRNA-negative control序列:正义链:5′-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3′,反义链:5′-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3′。由上海吉玛制药技术有限公司合成以上siRNA序列。

1.3 细胞培养、转染及分组

MCF-7细胞在含10%胎牛血清的DMEM高糖培养液常规培养。细胞于转染前换液铺板,转染方法按照X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent说明书操作。转染6 h后,换成含10%胎牛血清的完全培养液,5% CO_2、37 ℃饱和湿度培养箱中培养48 h。实验分组:MCF-7细胞转染MACC1基因特异性siRNA为MACC1 siRNA组,转染阴性对照siRNA为MACC1阴性对照组,正常培养的MCF-7细胞为MACC1空白对照组。

1.4 RT-PCR检测MCF-7细胞MACC1 mRNA表达

转染48 h收集3组细胞,按照RNAiso Plus说明书提取细胞总RNA,按照逆转录试剂盒说明书把总RNA反转录为cDNA第1条链,以cDNA为模板在聚合酶的作用下扩增。MACC1基因引物序列如下,上游:5′-AACCCCAAACCTAAAAAGACTC-3′,下游:5′-ACCCAGGACATCAGCTAAAACT-3′,片段大小496 bp。以GAPDH为内参,上游:5′-AGCCACATCGCTCAGACA-3′,下游:5′-TGGACTCCACGACGTACT-3′,片段大小314 bp。PCR反应条件为:94 ℃预变性3 min;94 ℃变性30 s,57 ℃退火30 s,72℃延伸30 s,35个循环;72 ℃总延伸10 min。取5 μL扩增产物,用1.5%琼脂糖凝胶跑电泳。按照以下公式计算siRNA组的抑制效率:抑制率=[1-(MCF-7 MACC1 siRNA组条带灰度值/MCF-7 GAPDH siRNA组条带灰度值)/(MCF-7 MACC1空白对照组条带灰度值/MCF-7 GAPDH空白对照组条带灰度值)]×100%。

1.5 Transwell迁移实验检测MCF-7细胞迁移

实验前1 d行细胞转染,转染24 h后消化细胞,无血清DMEM培养液制成单细胞悬液,1×10^5个细胞接种于Transwell小室上室;下室加入含10%胎牛血清的DMEM培养液培养24 h。取出Transwell小室,吸净培养液,棉签擦净上室面细胞,PBS缓冲液清洗细胞2次,4%多聚甲醛固定滤膜下室面细胞30 min,1%结晶紫染色30 min,PBS缓冲液冲洗干净,倒置显微镜100倍取5个视野。33%醋酸完全洗脱结晶紫,洗脱液在酶标仪570 nm测吸光密度值[$D(570)$][8]。实验重复3次。

1.6 MTT检测各组细胞增殖活性

胰酶消化各组细胞,每孔2 000个细胞接种于96孔板中,每组设5个复孔,另设无细胞对照组(不加细胞,只加培养液),转染6 h后换成完全培养液。分别于24、48、72 h加入20 μL MTT(5 mg/mL)/孔,37 ℃孵育4 h后去上清,各孔加入二甲基亚砜150 μL,振荡15 min至紫色结晶完全溶解,酶标仪490 nm波长测各孔的光密度值[$D(490)$],实验重复3次。

1.7 Western blot检测MCF-7细胞MACC1、S100A4及vimentin蛋白的表达

转染48 h收集3组细胞,M-PER裂解液提取细胞总蛋白,12 000 r/min离心15 min,转移上清至新离心管中,调蛋白浓度一致,按比例加入上样缓冲液沸煮7 min,在电泳缓冲液中行聚丙烯酰胺凝胶电泳后,将蛋白质转移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭1 h,兔抗人MACC1多克隆抗体(1∶1 000)、兔抗人S100A4多克隆抗体(1∶1 000)、兔抗人vimentin多克隆抗体(1∶1 000)和兔抗人GAPDH多克隆抗体(1∶10 000)4 ℃孵育过夜,TBST洗涤5 min×6次;山羊抗兔(1∶10 000)室温孵育1 h,TBST洗涤5 min×6次;加入化学发光试剂显影。GAPDH作为内参。抑制率计算公式同上。

1.8 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,多组均数比较采用单因素方差分析,组间进一步比较采用SNK法。

2 结果

2.1 特异性siRNA-FAM成功转染MCF-7细胞

siRNA-FAM转染乳腺癌MCF-7细胞后,荧光显微镜下显

示:siRNA-FAM 均匀分布在细胞质内,转染效率达到 85% 以上(图 1)。

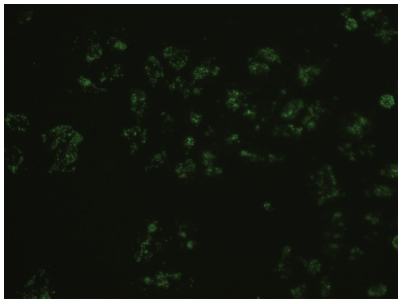
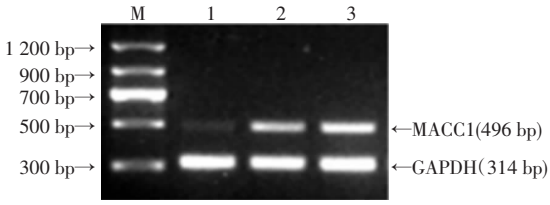


图 1 荧光显微镜下观察转染后的 MCF-7 细胞 (×100)

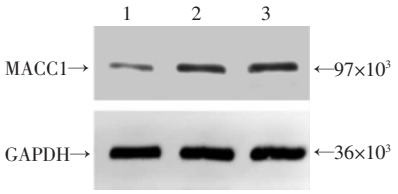
2.2 siRNA 显著抑制 MCF-7 细胞中 MACC1 基因的表达

RT-PCR 和 Western blot 检测 MACC1 mRNA 和蛋白的表达情况,如图 2 所示,siRNA 组、阴性对照组和空白对照组的相对灰度值分别为(0.190±0.022)、(0.926±0.031)、(0.965±0.036),与空白对照组比较,siRNA 组 MACC1 基因 mRNA 表达水平降低明显,抑制率为 81%($P<0.05$)。而阴性对照组与空白对照组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。如图 3 所示:siRNA 组、阴性对照组和空白对照组的相对灰度值分别为(0.207±0.031)、(0.796±0.032)、(0.830±0.038),与空白对照组比较,siRNA 组 MACC1 蛋白表达受到明显抑制,抑制率约 75%($P<0.05$),而阴性对照组与空白对照组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。



M:标准;1:siRNA 组;2:阴性对照组;3:空白对照组

图 2 RT-PCR 检测各组细胞 MACC1 mRNA 的表达



1:siRNA 组;2:阴性对照组;3:空白对照组

图 3 Western blot 检测各组细胞 MACC1 蛋白的表达

2.3 细胞增殖活性

MTT 结果显示:化学合成的 siRNA 分别转染 MCF-7 细胞 24、48、72 h 后,siRNA 组与阴性对照组、空白对照组比较,其光密度值明显降低($P<0.05$),而阴性对照组与空白对照组之间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。提示 siRNA 沉默 MACC1 基因表达后可以显著抑制 MCF-7 细胞的体外增殖能力(表 1)。

表 1 MTT 检测沉默 MACC1 基因后对 MCF-7 细胞增殖活性的影响 ($n=15$, $\bar{x}\pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0.447±0.023[a]	0.616±0.018[a]	0.724±0.032[a]
阴性对照组	0.433±0.020[a]	0.600±0.018[a]	0.705±0.024[a]
siRNA 组	0.380±0.036	0.250±0.031	0.215±0.025

a: $P<0.05$,与同时间点 siRNA 组比较

2.4 Transwell 实验检测 MCF-7 细胞的迁移能力

Transwell 迁移实验结果显示:转染 MCF-7 细胞 48 h 后,空白对照组、阴性对照组和 siRNA 组 D(570)值分别为(0.254±0.023)、(0.227±0.026)、(0.159±0.032),siRNA 组与阴性对照组、空白对照组比较,穿过小室细胞数明显降低($P<0.05$)。而阴性对照组与空白对照组之间比较,穿过小室细胞数无明显差别($P>0.05$)。提示 siRNA 沉默 MACC1 基因表达后可以显著抑制 MCF-7 迁移能力(图 4)。

2.5 siRNA-MACC1 下调 S100A4 和 vimentin 的表达

如图 5 和表 2 所示,siRNA 组分别与空白对照组和阴性对照组比较,S100A4、Vimentin 蛋白的表达明显降低($P<0.05$),而空白对照组与阴性对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

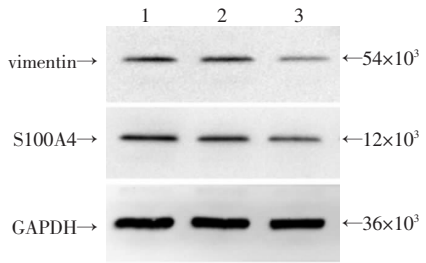
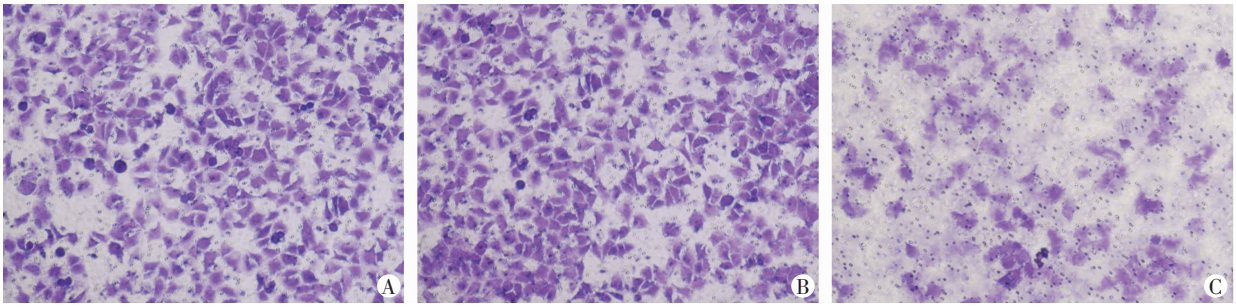


图 5 Western blot 检测各组细胞 S100A4 和 vimentin 蛋白表达

表 2 各组 S100A4 和 vimentin 蛋白表达 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	S100A4	Vimentin
空白对照组	0.082±0.004[a]	0.061±0.004[a]
阴性对照组	0.081±0.005[a]	0.057±0.003[a]
siRNA 组	0.062±0.004	0.042±0.003

a: $P<0.05$,与 siRNA 组比较



A:空白对照组;B:阴性对照组;C:siRNA 组

图 4 Transwell 迁移实验检测各组细胞迁移能力 (结晶紫 ×100)

3 讨论

MACC1是2009年由Stein等[5-6]在结肠癌组织中发现并命名的一个新基因,它是肝细胞生长因子HGF/Met信号通路的一个关键调节因子[4],已被证实与结肠癌患者的进程、转移、生存及疗效监测密切相关。在其他肿瘤,如胃癌[9]、肺癌[10-11]、肝细胞癌[12-13]、卵巢癌[14]等MACC1的表达与细胞的恶性生物学行为及患者的预后密切相关。检测患者血浆中MACC1基因的转录产物可能为临床诊断、预测以及疗效监测提供重要的实验依据[7]。

本研究发现MACC1基因在MCF-7细胞高表达,提示MACC1可能参与了MCF-7细胞的恶性生物学行为。化学合成MACC1特异性siRNA-FAM,转染乳腺癌MCF-7细胞后,空白对照组与siRNA组比较,MACC1蛋白相对灰度值下降($P<0.05$),而阴性对照组与空白对照组比较无统计学意义($P>0.05$),说明化学合成的siRNA能够特异地抑制MACC1的表达,干扰效率为75%。研究还发现siRNA组MCF-7细胞的增殖能力与阴性对照组和空白对照组比较明显降低($P<0.05$),穿过小室的细胞明显减少($P<0.05$),表明沉默MACC1的表达,可有效降低MCF-7细胞的迁移能力。

基于以上现象,我们通过查询国内外最新的文献,发现MACC1不仅是HGF/Met信号通路的一个关键调节因子,还可能参与了Wnt/β-catenin信号通路,于是我们检测了Wnt/β-catenin信号通路中关键的转录位点S100A4的表达。发现siRNA组S100A4表达与空白对照组、阴性对照组比较显著降低($P<0.05$),细胞间质标志物vimentin的表达量亦显著降低($P<0.05$),而阴性对照组与空白对照组比较无统计学差异($P>0.05$)。上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在生理状况下与胚胎发育有关,近些年因其在肿瘤转移方面的作用及其相关机制的研究,逐渐受到大家的重视,成为研究有关肿瘤转移方向的热点之一[15]。EMT以上皮标志物E-钙粘蛋白下调,同时伴发间质标志物波形蛋白上调为特征,可增加肿瘤细胞的迁移和侵袭能力,诱导干细胞特性,参与抗凋亡及免疫抑制等生物效应[16]。本研究中,通过干扰MACC1基因,S100A4的表达显著降低,另外vimentin表达亦降低明显。提示MACC1-siRNA可能是通过下调S100A4及vimentin的表达以降低MCF-7细胞的迁移能力。我们推测MACC1可能成为逆转EMT的潜在靶点。

本研究初步探讨了RNAi沉默MACC1基因表达对乳腺癌MCF-7细胞增殖及迁移的影响及相关的分子机制,并且最新的1篇临床研究[7]提示:结肠癌患者血浆中循环的MACC1转录产物与S100A4联合运用,可能提高对早期结肠癌患者出现转移或不良预后的预测能力。我们从细胞水平的研究结果显示MACC1特异性siRNA可下调S100A4的表达,提示MACC1与S100A4存在表达调控关系。后续工作中,我们将从体内试验及裸鼠转移模型等方面进行深入研究。

参考文献:

[1] Ferlay J, Shin H R, Bray F, *et al*. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. Int J Cancer, 2010, 127(12): 2893-2917.

[2] 黄哲宙, 陈万青, 吴春晓, 等. 中国女性乳腺癌的发病和死亡现况——全国32个肿瘤登记点2003-2007年资料分析报告[J]. 肿瘤, 2012, 32(6): 435-439.

[3] 郑科, 厉红元, 苏新良, 等. CXCR7/CXCL12对人乳腺癌细胞侵袭和黏附能力的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(1): 63-66.

[4] Qi X W, Zhang F, Yang X H, *et al*. High Wilms' tumor 1 mRNA expression correlates with basal-like and ERBB2 molecular subtypes and poor prognosis of breast cancer[J]. Oncol Rep, 2012, 28(4): 1231-1236.

[5] Stein U, Walther W, Arlt F, *et al*. MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis[J]. Nat Med, 2009, 15(1): 59-67.

[6] Stein U, Dahlmann M, Walther W. MACC1: more than metastasis? Facts and predictions about a novel gene[J]. J Mol Med (Berl), 2010, 88(1): 11-18.

[7] Stein U, Burock S, Herrmann P, *et al*. Circulating MACC1 Transcripts in Colorectal Cancer Patient Plasma Predict Metastasis and Prognosis[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e49249.

[8] Tang F, Zhang R, He Y, *et al*. MicroRNA-125b induces metastasis by targeting STARD13 in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e35435.

[9] Shirahata A, Sakata M, Kitamura Y, *et al*. MACC 1 as a marker for peritoneal-disseminated gastric carcinoma[J]. Anticancer Res, 2010, 30(9): 3441-3444.

[10] Shimokawa H, Uramoto H, Onitsuka T, *et al*. Overexpression of MACC1 mRNA in lung adenocarcinoma is associated with postoperative recurrence[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2011, 141(4): 895-898.

[11] Chundong G, Uramoto H, Onitsuka T, *et al*. Molecular diagnosis of MACC1 status in lung adenocarcinoma by immunohistochemical analysis[J]. Anticancer Res, 2011, 31(4): 1141-1145.

[12] Shirahata A, Fan W, Sakuraba K, *et al*. MACC 1 as a marker for vascular invasive hepatocellular carcinoma[J]. Anticancer Res, 2011, 31(3): 777-780.

[13] Qiu J, Huang P, Liu Q, *et al*. Identification of MACC1 as a novel prognostic marker in hepatocellular carcinoma[J]. J Transl Med, 2011, 9: 166.

[14] Zhang R, Shi H, Chen Z, *et al*. Effects of metastasis-associated in colon cancer 1 inhibition by small hairpin RNA on ovarian carcinoma OVCAR-3 cells[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30: 83.

[15] Micalizzi D S, Farabaugh S M, Ford H L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010, 15(2): 117-134.

[16] Thiery J P, Acloque H, Huang R Y, *et al*. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. Cell, 2009, 139(5): 871-890.

(**收稿**:2013-04-14;**修回**:2013-05-03)

(编辑 王 红)