文章编号:1000-5404(2014)02-0121-04

论著

抑制 Tiam1 基因表达促进 EC9706 细胞侵袭、转移和增强对 5-FU 化疗敏感性

张 松,刘兴安,单国用,王 磊,侯继院 (450002 郑州,郑州人民医院放疗科)

[摘要] **目的** 探讨抑制 T 淋巴瘤侵袭转移诱导因子 1(T lymphoma invasion and metastasis inducing factor 1,Tiam1)基因表达对食管癌 EC9706 细胞侵袭、转移及对 5-FU 化疗敏感性的影响。**方法** 靶向 Tiam1 的 3 对 siRNA 转染食管癌 EC9706 细胞,转染 48 h 后采用半定量 RT-PCR 和 Western blot 法检测各组细胞 Tiam1 mRNA 和蛋白表达水平的变化。Boyden chamber 侵袭小室和划痕实验检测 EC9706 细胞体外侵袭、转移能力的变化。Tiam1 siRNA 与不同浓度 5-FU 同时作用于 EC9706 细胞,CCK-8 实验检测对 EC9706 细胞增殖能力的影响;TUNEL 法检测对 EC9706 细胞凋亡能力的影响。**结果** 与对照组相比,转染靶向 Tiam1 基因的 siRNA2 和 siRNA3 能有效抑制 EC9706 细胞 Tiam1 mRNA 和蛋白的表达,差异有统计学意义($P<0.05$)。Boyden chamber 侵袭小室和划痕实验结果显示,与对照组相比,转染 Tiam1 siRNA3 48 h 后的 EC9706 细胞侵袭转移能力明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。Tiam1 siRNA3 与不同浓度 5-FU 联合作用均能抑制细胞增殖,与单独 5-FU 相比差异有统计学意义($P<0.05$)。Tiam1 siRNA3 与 10 μg/mL 5-FU 联合作用能显著抑制 EC9706 细胞的凋亡能力与 10 μg/mL 5-FU 单独作用组相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 抑制 Tiam1 基因表达能有效抑制食管癌细胞的侵袭、转移能力,且能提高 EC9706 细胞对 5-FU 的化疗敏感性。

[关键词] 食管鳞癌;T 淋巴瘤侵袭转移诱导因子 1;5-氟尿嘧啶;肿瘤侵袭;肿瘤转移
[中图法分类号] R394.3;R73-362;R735.1 [文献标志码] A

Tiam1 inhibition promotes invasion and metastasis in EC9706 cells and enhances their chemotherapeutic sensitivity to 5-fluorouracil

Zhang Song, Liu Xing'an, Shan Guoyong, Wang Lei, Hou Jiyuan (Department of Radiotherapy, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou, Henan Province, 450002, China)

[**Abstract**] Objective To determine the effects of silencing T lymphoma invasion and metastasis inducing factor 1 (Tiam1) on the invasion and metastasis capability of esophageal carcinoma cell line EC9706 *in vitro* and the chemotherapeutic sensitivity of EC9706 to 5-fluorouracil (5-FU). Methods EC9706 cells were transfected with Tiam1 siRNAs. In 48 h after transfection, Tiam1 mRNA and protein levels were evaluated by RT-PCR and Western blotting. The invasion and metastasis ability of EC9706 cells were checked by Boyden chamber assay and wound healing assay. CCK-8 assay was used to test the inhibitory actions on EC9706 cells after the cells were treated with different concentrations of 5-FU and Tiam1 siRNA together. The apoptosis of EC9706 cells was assayed by TUNEL. Results Tiam1 siRNA2 and siRNA3 could inhibit the mRNA and protein expression of Tiam1 efficiently in EC9706 cells compared with control groups after 48 h ($P<0.05$). The results of Boyden chamber assay and wound healing assay showed that the invasion and metastasis ability of EC9706 cells transfected with Tiam1 siRNA3 for 48 h decreased greatly compared with that in control groups ($P<0.05$). The growth inhibitory rates of EC9706 cells treated with different concentrations of 5-FU and Tiam1 siRNA3 together were much higher than those treated with different concentrations of 5-FU alone ($P<0.05$). The apoptotic rates of EC9706 cells treated with 10 μg/mL 5-FU and Tiam1 siRNA together were also higher than those in control groups ($P<0.05$). Conclusion Inhibiting the expression of Tiam1 decreases the invasion and metastasis abilities of EC9706 cells greatly and increases the chemotherapeutic sensitivity of EC9706 cells to 5-FU.

[**Key words**] esophageal carcinoma; Tiam1; 5-FU; neoplasm invasion; neoplasm metastasis

Corresponding author: Liu Xing'an, E-mail: 15890068878@163.com

[通信作者] 刘兴安,E-mail:15890068878@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131011.1728.005.html(2013-10-11)

食管癌是我国最常见的消化道恶性肿瘤之一,癌细胞的早期侵袭、转移仍是目前患者死亡的主要原因之一。T淋巴瘤侵袭转移诱导因子1(T lymphoma invasion and metastasis inducing factor 1,Tiam1)是近年来发现的与恶性肿瘤侵袭、转移密切相关的基因[1-2]。但Tiam1在食管癌侵袭、转移中的作用目前研究甚少[3]。5-氟尿嘧啶(5-Fluorouracil,5-FU)是一种常用的治疗食管癌的化疗药物,然而其毒性作用较大,食管癌患者常常因耐受不了高剂量5-FU引起的不良反应而被迫终止治疗[4-5]。因此,本研究旨在利用靶向Tiam1的siRNA抑制食管癌EC9706细胞Tiam1基因的表达,探讨Tiam1表达下降对EC9706细胞侵袭转移能力的影响,同时探讨Tiam1基因沉默后EC9706细胞对5-FU的化疗敏感性。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

食管癌EC9706细胞由中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室惠赠。在含有10%胎牛血清、100 μg/mL链霉素和100 U/mL青霉素的DMEM培养基中,37 ℃、5% CO_2条件下常规培养EC9706细胞。

1.2 主要试剂

DMEM培养基购自Gibco公司;Tiam1兔抗人多克隆抗体购自Sigma公司;PCR扩增试剂盒及cDNA第一链合成试剂盒均购自上海生工生物技术公司;Lipofectamine 2000购自上海碧云天生物技术有限公司;Boyden chamber侵袭小室购自BD公司;CCK-8试剂盒购自广州研创生物技术发展有限公司;TUNEL凋亡试剂盒购自Promega公司。

1.3 Tiam1 siRNA合成及转染

根据Tiam1基因在GenBank中的序列(Genbank accession No.: NM_003253.2)设计靶向Tiam1基因的siRNA序列:siRNA1,上游5′-UUUUAAGGAAUUCUACUUGAA-3′,下游5′-CAAGUAGAAUUCCUUAAAACU-3′,siRNA2,上游5′-AUCAGAAUCAAUGGUAAACCU-3′,下游5′-GUUUACCAUUGAUUCUGAUGC-3′。同时合成阴性对照siRNA。转染前24 h,EC9706细胞接种于24孔板(2×10^5/孔,以转染时细胞密度达到30% ~50%为宜)。根据Lipofectamine 2000试剂说明书转染,转染终浓度为40 nmol/L。继续培养6 h后,更换为完全培养基,至48 h收集细胞RT-PCR和Western blot检测转染效率。实验分5组:转染Tiam1 siRNA1组、转染Tiam1 siRNA2组、转染Tiam1 siRNA3组、转染阴性对照siRNA组和空白组。

1.4 RT-PCR检测EC9706细胞Tiam1 mRNA表达

收集转染之后的各组细胞,提取总RNA,电泳鉴定其完整性。cDNA第1链合成试剂盒逆转录总RNA,PCR扩增Tiam1 mRNA。扩增引物见表1。扩增条件为:94 ℃ 3 min,94 ℃ 45 s,55 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,72 ℃ 5 min,4 ℃保存,共进行35个循环。同时以β-actin为内参同步扩增。使用SYNGENE凝胶分析系统软件扫描各条带灰度值,分析Tiam1基因在各组的相对表达水平。实验重复3次。

表1 PCR引物序列

基因	引物序列	片段长度
Tiam1	上游5′-TTTGGGTTAGGCGTGAAGAC-3′	197 bp
	下游5′-GGCTTCAGAACCAAGTCAGC-3′	
β-actin	上游5′-AATATTAGCCAGGCGTGGTG-3′	392 bp
	下游5′-GCGTTCCATGGGTACAAAGT-3′	

1.5 Western blot检测EC9706细胞Tiam1蛋白表达

收集转染之后的各组细胞,提取细胞总蛋白。BCA法检测各组细胞蛋白浓度。SDS-PAGE电泳,每孔上样100 μg。电泳后转PVDF膜,封闭,与特异性一抗作用,4 ℃过夜。与二抗室温孵育2 h后,充分清洗,ECL化学发光剂于暗室中曝光和显影。测定蛋白条带的光密度值,以表示蛋白的相对表达水平。实验重复3次。

1.6 Boyden chamber检测EC9706细胞侵袭能力

25 μg Matrigal基质胶铺于侵袭小室上室,上室加入DMEM培养液悬浮的EC9706细胞,下室加含20%胎牛血清的DMEM培养液。实验分3组:转染Tiam1 siRNA3组、转染阴性对照siRNA组、空白组。37 ℃、5% CO_2条件下培养48 h。取出小室,用棉签将上室面的细胞拭去,乙醇固定滤膜,结晶紫染色,树胶封片观察。400倍显微镜下随机计数5个视野穿膜细胞数。以穿过滤膜的细胞数表示细胞的侵袭力。实验重复3次。

1.7 划痕实验检测EC9706细胞转移能力

6孔板每孔加入EC9706细胞(5×10^5/孔),过夜培养。枪头垂直划痕,PBS清洗。37 ℃、5% CO_2培养箱,培养48 h。测量并计算出相对迁移距离。实验分组同1.6。实验重复3次。

相对迁移距离 = 1 -(即时划痕的宽度/原始划痕的宽度)

1.8 CCK-8实验检测EC9706细胞增殖能力

EC9706细胞接种于96孔板中,每孔约种5×10^3个细胞。实验分为3组:5-FU +转染Tiam1 siRNA3组、5-FU +转染阴性对照siRNA组和5-FU +空白EC9706细胞组。5-FU使用浓度分别为0、5、10 μg/mL,各组设6个复乙孔。培养48 h后,每孔加入10 μL CCK-8试剂置于37 ℃、5% CO_2培养箱中继续培养2 h,酶标仪测定各孔的光密度值[$D(570)$]。实验重复3次。

1.9 TUNEL法检测EC9706细胞凋亡能力

EC9706细胞接种于96孔板中,每孔约种5×10^3个细胞。分组同上,5-FU使用浓度为10 μg/mL。培养48 h后,收获细胞,制备细胞爬片。滴加20 μL TUNEL反应混合液,在湿盒中37 ℃孵育60 min,冲洗后加入30 ~40 μL转化剂-POD,37 ℃孵育30 min,冲洗,加入DAB显色剂显色。TUNEL检测的结果判定:以背景无颜色,细胞核内着棕黄色颗粒为阳性。每张爬片随机取5个视野(10×40),观察分组500个细胞,计数TUNEL阳性细胞。

TUNEL阳性率 = 阳性细胞数/(100×5)×100%

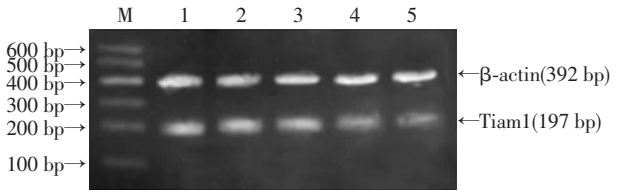
1.10 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,应用SPSS 11.0统计软件。两样本均数比较采用t检验,多个样本均数比较应用单因素方差分析。检验水准$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 Tiam1 siRNA 对 EC9706 细胞 Tiam1 mRNA 表达的影响

半定量 RT-PCR 结果(图 1)显示,与空白组(0.772 ± 0.083)相比,转染 Tiam1 siRNA2(0.442 ± 0.071)和 Tiam1 siRNA3(0.297 ± 0.065)组 Tiam1 mRNA 的表达受到抑制,差异具有统计学意义(P = 0.006、< 0.001),尤其是转染 Tiam1 siRNA3 组 Tiam1 mRNA 的表达抑制率与空白组相比达到 61.5%。而转染 Tiam1 siRNA1(0.742 ± 0.086)和转染阴性对照 siRNA 组(0.769 ± 0.061)的 Tiam1 mRNA 的表达与空白组相比差异没有统计学意义(P = 0.093、0.114)。

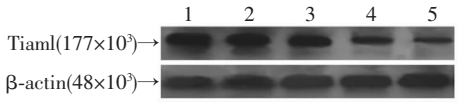


M:标准;1:空白组;2:转染阴性对照 siRNA 组;3:转染 Tiam1 siRNA1组;4:转染 Tiam1 siRNA2 组;5:转染 Tiam1 siRNA3 组

图 1 RT-PCR 检测各组细胞 Tiam1 mRNA 表达

2.2 Tiam1 siRNA 对 EC9706 细胞 Tiam1 蛋白表达的影响

Western blot 结果(图 2)显示,与空白组(0.663 ± 0.079)相比,转染 Tiam1 siRNA2(0.379 ± 0.091)和 Tiam1 siRNA3(0.153 ± 0.068)组 Tiam1 蛋白的表达受到明显抑制,差异具有统计学意义(P = 0.017、0.005),尤其是转染 Tiam1 siRNA3 组,Tiam1 蛋白的表达抑制更明显。而转染 Tiam1 siRNA1 组(0.649 ± 0.076)和转染阴性对照 siRNA 组(0.661 ± 0.082)的 Tiam1 蛋白的表达与空白组相比差异没有统计学意义(P = 0.132、0.168)。



1:空白组;2:转染阴性对照 siRNA 组;3:转染 Tiam1 siRNA1 组;4:转染 Tiam1 siRNA2 组;5:转染 Tiam1 siRNA3 组

图 2 Western blot 检测各组细胞 Tiam1 蛋白表达

2.3 Tiam1 siRNA3 对 EC9706 细胞侵袭和转移能力的影响

选择对 Tiam1 mRNA 和蛋白表达抑制能力最强的 Tiam1 siRNA3 再次转染 EC9706 细胞,检测转染 48 h 后对 EC9706 细胞侵袭能力的影响。同时以转染阴性对照 siRNA 和未转染 EC9706 细胞(空白组)作为对照。与空白组(114.51 ± 30.06)相比,转染 Tiam1 siRNA3 的 EC9706 细胞穿膜细胞数明显减少(45.26 ± 38.29),差异具有统计学意义(P < 0.001),而空白组与转染阴性对照 siRNA 组(109.34 ± 21.32)相比,差异没有统计学意义(P = 0.267)。说明抑制 Tiam1 的表达能明显抑制 EC706 细胞的侵袭能力。细胞划痕实验结果同样显示,EC9706 细胞转染 Tiam1 siRNA3(0.21 ± 0.08)后 48 h,细胞迁移能力明显短于空白组(0.43 ± 0.09),差异具有统计学意义(P = 0.004)。而空白组与转染阴性对照 siRNA 组(0.41 ± 0.07)相比差异没有统计学意义(P = 0.201)。说明抑制 Tiam1 的表达能明显抑制 EC9706 细胞的转移能力。见图 3。

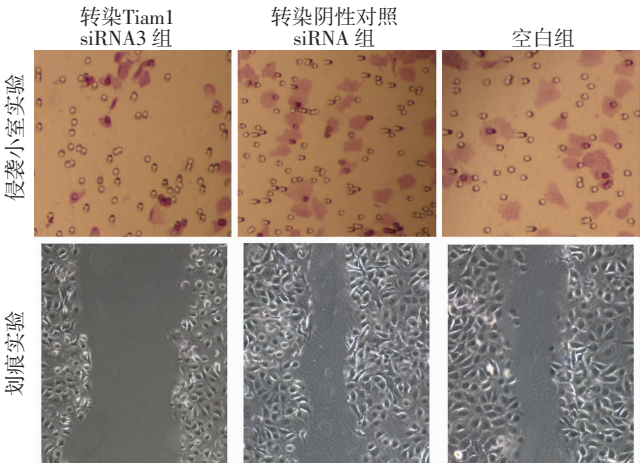
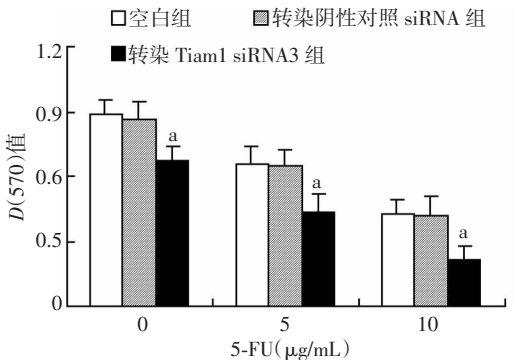


图 3 Tiam1 siRNA3 对 EC9706 细胞侵袭和转移能力的影响 (×200)

2.4 Tiam1 siRNA3 和 5-FU 同时使用对 EC9706 细胞增殖能力的影响

CCK-8 实验结果(图 4)显示,与 5 μg/mL 5-FU 单独作用组相比,转染 Tiam1 siRNA3 + 5 μg/mL 5-FU 组的细胞活力明显下降,差异有统计学意义(P < 0.01);而 5 μg/mL 5-FU 单独作用组与5 μg/mL 5-FU + 转染阴性对照 siRNA 组相比差异没有统计学意义(P = 0.152)。同样与 10 μg/mL 5-FU 单独作用组相比,转染 Tiam1 siRNA3 + 10 μg/mL 5-FU 组细胞的活性也同样明显降低,差异有统计学意义(P < 0.01);而 10 μg/mL 5-FU 单独作用组与 10 μg/mL 5-FU + 阴性对照 siRNA 组相比差异没有统计学意义(P = 0.126)。实验结果表明,抑制 Tiam1 基因的表达能提高食管癌细胞对 5-FU 的化疗敏感性。



a:P < 0.05 ,与空白组比较

图 4 Tiam1 siRNA3 与不同浓度 5-FU 合用对 EC-9706 细胞增殖能力的影响

2.5 Tiam1 siRNA3 和 5-FU 同时使用对 EC9706 细胞凋亡能力的影响

使用 TUNEL 法检测细胞凋亡结果显示,EC9706 细胞在 10 μg/mL 5-FU 作用下,凋亡细胞(98.5 ± 11.2)较空白组细胞(13.3 ± 6.7)增加(P = 0.027),当 10 μg/mL 5-FU 与 Tiam1 siRNA3联合应用时,可明显提高肿瘤细胞对化疗药的敏感性,

凋亡细胞数(178.2±17.8)较单独使用10 μg/mL 5-FU显著增加($P=0.002$)。而10 μg/mL 5-FU+转染阴性对照siRNA组细胞凋亡数(102.5±9.6)与单独应用组相比无明显差异($P=0.168$)。提示抑制Tiam1的表达能增加食管癌细胞的凋亡能力。

3 讨论

食管癌是我国最常见的消化道恶性肿瘤之一,尤其是我省食管癌的发生率居全国首位[6]。癌细胞侵袭、转移是多数食管癌患者死亡的主要原因之一[7],因此,探讨食管癌侵袭、转移的发生机制对于食管癌的治疗及改善预后至关重要。

T淋巴瘤侵袭转移诱导因子1(T lymphoma invasion and metastasis inducing factor 1,Tiam1)是Habets等[8]于1994发现并命名的,由于其激活后有致瘤活性,因此被定义为原癌基因。Tiam1广泛存在于多种肿瘤细胞,与肿瘤的发生、发展关系密切,而其在大多数正常组织中则持低水平表达甚至不表达[9-10]。进一步研究表明Tiam1是Ras癌基因诱导肿瘤形成过程中的重要调节因子之一[5,11-12]。Malliri等[13]研究显示,在Ras诱导皮肤癌发生、发展阶段,Tiam1都发挥了关键作用,且这一效应与Tiam1的表达量有明显关联。Tiam1还可作用于Rac或Rho蛋白,如Tiam1-Rac信号传递通路可通过影响细胞骨架、细胞黏附和运动,在多种肿瘤的侵袭转移及信号转导方面发挥重要作用[14]。最近有报道指出Tiam1在食管癌组织中表达增高[3,15],而Tiam1在食管癌侵袭转移中的作用国内外则报道较少。

本研究根据Tiam1在GenBank中的序列设计合成了3对靶向Tiam1的siRNA转染人食管鳞癌EC9706细胞,转染48 h后应用RT-PCR和Western blot法检测3对Tiam1 siRNA对Tiam1表达的抑制效率,结果显示,与空白对照组相比,靶向Tiam1的siRNA2和siRNA3能有效抑制Tiam1基因的表达,尤其是siRNA3能显著抑制EC9706细胞中Tiam1基因的表达。而靶向Tiam1的siRNA1与阴性对照siRNA对Tiam1表达的抑制作用则不明显,与空白对照相比没有统计学差异。进一步研究表明,转染靶向Tiam1 siRNA3 48 h后的EC9706细胞侵袭能力和转移能力较和空白对照明显下降,差异具有统计学意义。表明抑制Tiam1基因表达可以降低食管癌细胞的侵袭转移能力。

综上所述,抑制Tiam1基因的表达可有效降低人食管癌细胞的侵袭、转移能力,同时能增强食管癌细胞对化疗药物5-FU的敏感性,为下一步的体内试验提供实验依据,为食管鳞癌的基因治疗提供一定的理论基础和可能的基因治疗提供了有效靶点。

参考文献:

[1] Zhu J M, Yu P W. Downregulation of T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing factor 1 induces cytoskeletal rearrangement and inhibits the invasive capacity of gastric cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2013, 8(2): 425-433.

[2] 吴元清, 谢月英, 彭刚. T淋巴瘤侵袭转移诱导因子1促进乳腺癌侵袭转移的作用机制[J]. 中华肿瘤杂志, 2012, 34(11): 831-834.

[3] Liu H, Shi G, Liu X, *et al*. Overexpression of Tiam1 predicts poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncol Rep, 2011, 25(3): 841-848.

[4] 范小玲, 刘文其, 毛艳, 等. HIF-1α、Tiam1表达对食管癌侵袭、淋巴结转移以及放疗的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(7): 590-595.

[5] 叶香华. Tiam1基因在肝细胞癌侵袭转移中的功能研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2010.

[6] 黄丽艳, 王娜, 汤黎明, 等. PTEN基因表达对EC9706细胞增殖、侵袭、凋亡能力的影响[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2013, 48(1): 16-20.

[7] Wang F, He W, Fanghui P, *et al*. NF-κBP65 promotes invasion and metastasis of oesophageal squamous cell cancer by regulating matrix metalloproteinase-9 and epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Cell Biol Int, 2013, 37(8): 780-788.

[8] 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 protein[J]. Cell, 1994, 77(4): 537-549.

[9] 倪亚平, 庄建良. Tiam1与肿瘤侵袭转移的研究进展[J]. 医学综述, 2007, 13(14): 1061-1064.

[10] Shi Y L, Miao R Z, Cheng L, *et al*. Up-regulation of T-lymphoma and metastasis gene 1 in gastric cancer and its involvement in cell invasion and migration[J]. Chin Med J (Engl), 2013, 126(4): 640-645.

[11] Stebel A, Brachetti C, Kunkel M, *et al*. Progression of breast tumors is accompanied by a decrease in expression of the Rho guanine exchange factor Tiam1[J]. Oncol Rep, 2009, 21(1): 217-222.

[12] Lee S H, Kunz J, Lin S H, *et al*. 16-kDa prolactin inhibits endothelial cell migration by down-regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 signaling pathway[J]. Cancer Res, 2007, 67(22): 11045-11053.

[13] Malliri A, van-der-Kammen R A, Clark K, *et al*. Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours[J]. Nature, 2002, 417(6891): 867-871.

[14] Van-Leeuwen F N, Olivo C, Grivell S, *et al*. Rac activation by lysophosphatidic acid LPA1 receptors through the guanine nucleotide exchange factor Tiam1[J]. J Biol Chem, 2003, 278(1): 400-406.

[15] 王启船, 王青, 万里新, 等. 食管鳞癌中T淋巴瘤侵袭转移诱导基因1、血管内皮生长因子和CD31的表达及其相关性研究[J]. 中国医药导报, 2012, 9(23): 95-96.

(**收稿**:2013-08-07;**修回**:2013-09-09)

(编辑 汪勤俭)