论著

文章编号:1000-5404(2014)05-0442-04

siRNA 干扰 MACC1 基因对食管癌细胞 TE-1 的生物学影响

吴 剑,张 敏,戴天阳,任德莲 (646000 四川 泸州,泸州医学院免疫学教研室)

[摘要] **目的** 通过 siRNA 干扰沉默结肠癌转移相关基因 1(metastasis-associated in colon cancer 1,MACC1),观察其对食管癌细胞株 TE-1 增殖、迁移及侵袭能力的影响。**方法** 通过化学合成的特异性 siRNA 与阳离子脂质体 Lipofectamine™ 2000 形成复合体,转染食管癌细胞株 TE-1,应用 qRT-PCR、Western blot 检测转染后 MACC1 基因和蛋白表达水平;MTT 法检测细胞生长增殖水平;划痕实验、Transwell 实验检测细胞株干扰前后迁移侵袭能力的改变。**结果** siRNA-MACC1 转染 TE-1 细胞后,与空白组比较,干扰组 MACC1 基因和蛋白的表达水平明显降低,分别降低 71% 和 87%;MTT 实验观察 1~7 d,干扰组较空白组、阴性对照组增殖速度明显降低($P<0.05$),第 4 天后效果更明显;划痕实验结果显示干扰组迁移划痕处的细胞(10.6±2.2)明显少于空白组(68.2±2.5),差异具有统计学意义($P<0.05$),各对照组间无统计学差异($P>0.05$);Transwell 实验结果显示干扰组穿过膜的 TE-1 细胞数目(4.2±1.9)较空白组(58.4±7.4)明显减少($P<0.05$),各对照组间无统计学差异($P>0.05$),表明干扰后 TE-1 细胞的迁移侵袭能力显著降低。**结论** siRNA-MACC1 干扰导致 TE-1 细胞 MACC1 基因及蛋白表达水平明显下调;MACC1 基因下调后,食管癌 TE-1 细胞的增殖、迁移、侵袭能力均明显降低,说明 MACC1 基因具有促进食管癌细胞增殖、迁移、侵袭的能力。

[关键词] 食管鳞癌;结肠癌转移相关基因 1;RNA,小分子干扰;细胞增殖;细胞迁移;肿瘤侵袭
[中图法分类号] R394.3; R730.23; R735.1 [文献标志码] A

Biological effects of MACC1 siRNA interference on esophageal carcinoma TE-1 cells

Wu Jian, Zhang Min, Dai Tianyang, Ren Delian (Department of Immunology, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan Province, 646000, China)

[**Abstract**] Objective To determine the effects of siRNA interfering metastasis-associated in colon cancer 1 (MACC1) on the extracorporeal proliferation, migration and invasion of the esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cell line TE-1. Methods The special MACC1-siRNA sequence was chemically synthesize, and then transfected into the TE-1 cells with lipofectamine™ 2000. RT-quantity PCR and Western blotting were used to detect the mRNA and protein level of MACC1 in untreated TE-1 cells, lipo2000-treated cells (mock), siRNA-nc transfected cells, and siRNA-MACC1 transfected cells. MTT assay was used to detect the proliferation of TE-1 cells. Scratching test and Transwell chamber assay were evaluated the migration of the cells. Results Compared with the untreated cell, mock, and siRNA-nc cells, the expression of MACC1 was obviously decreased by 71% at mRNA and 87% at protein levels. In 7 dafter transfection, MTT assay indicated that the proliferation of the transfected TE-1 cells was significantly inhibited compared with the other 3 types of cells ($P<0.05$), especially from the fourth day. Scratching test showed that there were obviously less migrated cells from the siRNA-MACC1 group than those from the control (10.6 ± 2.2 *vs* 68.2 ± 2.5, $P<0.05$). Transwell assay also showed the invasion ability of TE-1 cells transfected with siRNA-Macc1 was lesser than the control cells (4.2 ± 1.92 *vs* 58.4 ± 7.44, $P<0.05$). But no significant difference was seen among the untreated cell, mock, and siRNA-nc cells. Conclusion siRNA interference of MACC1 obviously down-regulates the molecule at mRNA and protein levels in TE-1 cells, and results in significant inhibition in the proliferation, migration and invasion of the cells. Therefore, MACC1 might be involved in the growth, migration and invasion of ESCC.

[**Key words**] esophageal squamous cell carcinoma; metastasis-associated in colon cancer 1; RNA, small interfering; cell proliferation; cell movement; neoplasm invasiveness

Supported by the Key Project Department of Education of Sichuan Provine (11ZA148). Corresponding author: Ren Delian, E-mail: rendelian5405@163.com

[基金项目] 四川省教育厅重点项目(11ZA148)
[通信作者] 任德莲,E-mail: rendelian5405@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131219.1916.007.html(2013-12-19)

食管癌是常见的消化道恶性肿瘤,其中 90% 为食管鳞状上皮细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC),临床上不易早期发现,发现时大多已处于中晚期,而转移和复发是食管癌死亡率居高不下最主要的原因。因此,寻找食管癌转移侵袭相关基因已成为近年来的研究热点[1]。结肠癌转移相关基因 1(metastasis-associated in colon cancer 1, MACC1)是 2009 年美国科学家 Stein 在结肠癌中发现的与结肠癌转移侵袭相关的调控基因[2-3],其表达水平高低可作为结肠癌是否发生远处转移的一个评价指标。现有研究显示,MACC1 可以作为结肠癌、肝癌、非小细胞肺癌等肿瘤预后的独立指标[4-5],而 MACC1 与食管癌侵袭转移的相关性尚不清楚。我们推测 MACC1 作为一个新的肿瘤转移相关基因很可能在食管癌的侵袭转移中扮演了重要的角色。本实验应用特异性较强的 siRNA 转染食管癌细胞降低 MACC1 的表达,以探讨 MACC1 基因对食管癌细胞 TE-1 增殖、迁移及侵袭能力的影响,为寻找食管癌侵袭、转移相关基因提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株与试剂

人 ESCC 细胞株 TE-1(中科院上海细胞库),FAM-siRNA-MACC1、FAM-siRNA-negative control 由上海吉玛制药技术有限公司合成。TRIzol、Lipofectamine™ 2000 (Invrotrogen 公司),RPMI1640(Hyclone 公司),逆转录试剂盒、逆转录试剂盒 Reverse Transcription System(成都博瑞克生物公司),小鼠抗人 GAPDH 单抗(Santa Cruz),兔抗人 MACC1 多抗(Abcam 公司),荧光定量 PCR 试剂(KAPA BIOSYSTEMS),Transwell 小室(Corning 公司)。

1.2 体外化学合成 FAM 标记的 siRNA

siRNA-MACC1 序列正义链:5′-AAGAUUGGACUUGUACACUGC-3′,反义链:5′-GCAGUGUACAAGUCCAAUCUU-3′;siRNA-negative control 正义链:5′-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3′,反义链:5′-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3′。

1.3 细胞转染

转染前 1 d 取对数生长期的细胞 1×10^5 种于 24 孔板,分为 4 组:空白组(未作处理的细胞)、干扰组(转染 siRNA-MACC1)、阴性对照组(转染 siRNA-negative control)和 Mock 组(Lipofectamine™ 2000 处理),均培养于不含抗生素的 10% FBS 1640 培养基,次日观察细胞达到 80% 融合即开始转染,取 20 pmol/μL siRNA 1.5 μL,Lipofectamine™ 2000 1 μL 分别加入含 50 μL opti memi 培养基的 EP 管中静置 5 min,随即混合为 1 管,室温下静置 20 min 后加入培养孔,6 h 后更换 10% FBS 1640 培养基,在倒置荧光显微镜下(×20)观察 FAM 蓝色荧光,初步判断转染效率,分别收集 48、72 h 细胞作基因和蛋白表达水平的鉴定。

1.4 SYBR Green 法荧光定量 PCR 检测 MACC1 的表达

培养 48 h 后,收集 4 组细胞,用 TRIzol 法提取总 RNA,再分别进行逆转录得到 cDNA,采用 SYBR Green 法进行定量 PCR,MACC1 引物上游:5′-GCAGACAAAGAATCAGAG-AAAG-3′,下游:5′-GATGAGACGTCGACTAACTC-3′;GAPDH 引物上游:5′-ATGCTGGCGCTGAGTACGTC-3′,下游:5′-GGTCAT-GAGTCCTTCCACGATA-3′。定量 PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 3 min,95 ℃变性 30 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 20 s,40 个循环,72 ℃延伸 1 min,结果采用 ΔΔCt 法进行计算。

1.5 Western blot 检测干扰效果

分别收集培养 72 h 后 4 组的细胞,预冷 PBS 漂洗细胞 2 次,加入裂解液提取总蛋白,加入 2×SDS 上样缓冲液,沸水浴 5 min 上样,每孔 10 μL,行 70 V 恒压 SDS-Page 电泳,300 mA 恒流 2 h 冰浴电转至 PVDF 膜,50 g/L 脱脂牛奶室温封闭 1 h,加入适当浓度一抗(MACC1 1∶1 000,GAPDH 1∶2 000)4 ℃摇床孵育过夜,次日用 PBST 漂洗 15 min×3 次,加入 HRP 标记的二抗(羊抗鼠 1∶3 000,羊抗兔 1∶1 000)室温孵育 1 h,PBST 漂洗 15 min × 3 次,ECL 发光液显影曝光。以目的蛋白与 GAPDH 灰度值比值作为目的蛋白相对表达量,并按公式计算抑制率。抑制率 =(1 − 干扰组 MACC1 蛋白相对表达量/空白组 MACC1 蛋白相对表达量)×100%

1.6 MTT 法检测 TE-1 细胞转染前后细胞增殖活性

按 1 000/孔将转染组和 3 组对照细胞分别种在 96 孔板上,每孔设 3 个复孔,连续 7 d 和 MTT 反应,每孔 20 μL MTT (5 g/L),最后 1 d 加入 150 μL DMSO 溶解紫色结晶,4 h 后在 490 nm 波长处测定各孔的光密度值[D(490)],根据 D(490)值绘制细胞增殖曲线。

1.7 划痕实验检测 TE-1 细胞转染前后细胞迁移能力

在 24 孔板上培养细胞 48 h 后,用无菌枪头沿孔纵轴划直线,用 PBS 漂洗干净后,每孔加入不含血清的培养基培养,于划痕后 24 h 在倒置显微镜下(×10)观察划痕处细胞的迁移情况,选取 3 个不同视野分别计数划痕处迁移细胞数目,取平均值后进行统计分析,评估各组细胞迁移能力。

1.8 Transwell 小室检测细胞迁移、侵袭能力

1.8.1 细胞迁移实验　采用 Corning 孔径为 8 μm 的 24 孔小室,上室分别加入各组细胞 1×10^5 个,300 μL 无血清 1640 培养基,下室加入 500 μL 含 10% FBS 的 1640 培养基,24 h 后取出小室,擦拭去上室的细胞,4% 甲醛固定 10 min,吉姆萨染色后显微镜下观察,200 倍光镜下随机取 5 个视野拍照,计算穿膜细胞数目,评定细胞迁移能力。

1.8.2 细胞侵袭实验　从 −20 ℃取出 Matrigel,在 −4 ℃过夜融化,用 RPMI1640 无血清培养基将原液按 1∶2 稀释后,取 100 μL 均匀涂抹上室,放入 37 ℃,60 min 待其凝固成胶,所有操作过程在冰上进行,枪头 4 ℃预冷,其他步骤同细胞迁移实验,48 h 后观察结果。

1.9 统计学处理

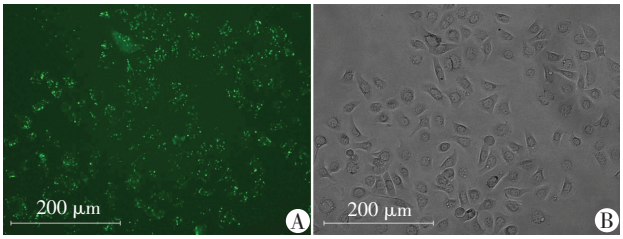
采用 SPSS 11.0 统计软件处理,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间数据比较采用成组 t 检验。

2 结果

2.1 siRNA 转染效率

转染 6 h 后,倒置相差荧光显微镜下观察发现 siRNA 片段

均匀地分布在细胞中,发光细胞分布面积广,密度高(图1)。选择5个不同视野计算同一视野下的荧光细胞数目,计算得出平均转染效率达90%以上,可以进行后续的实验。

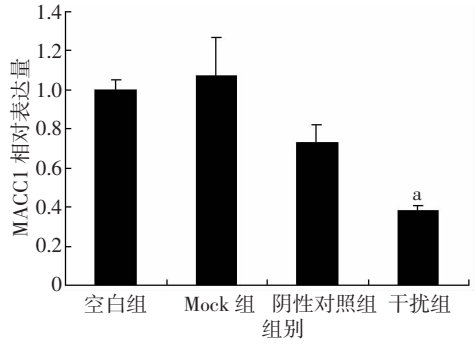


A:siRNA转染后;B:同一视野转染前

图1 荧光显微镜观察siRNA转染前后效率变化

2.2 荧光定量PCR检测siRNA干扰效果

空白组、Mock组、阴性对照组的MACC1表达量无统计学差异($P>0.05$),siRNA-MACC1干扰组MACC1基因表达量显著降低(0.29 ± 0.03),见图2。

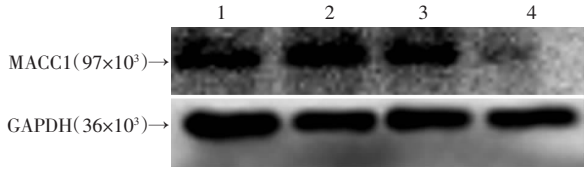


a:$P<0.05$,与其余3组比较

图2 荧光定量PCR检测各组siRNA干扰MACC1基因的表达

2.3 Western blot检测MACC1蛋白表达

提取干扰72 h后的细胞蛋白做免疫印迹实验,结果显示siRNA-MACC1干扰组(0.13 ± 0.04)与空白组相比,MACC1蛋白表达明显受到抑制,抑制率为87%,差异有统计学意义($P<0.05$),结果见图3。

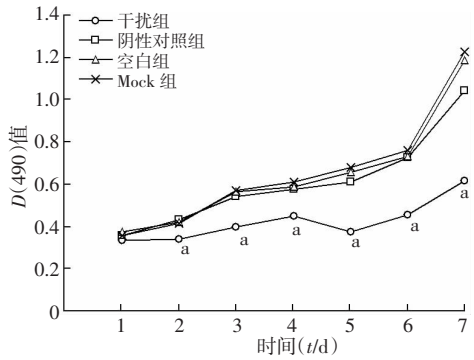


1:空白组;2:Mock组;3:阴性对照组;4:干扰组

图3 Western blot检测转染后72 h各组细胞的MACC1表达

2.4 MTT检测细胞增殖能力结果

siRNA-MACC1干扰组增殖能力相比空白组、阴性对照组有明显降低($P<0.05$),而空白组、阴性对照组、Mock组之间差异无统计学意义($P>0.05$,图4)。



a:$P<0.05$,与其余3组比较

图4 MTT法检测siRNA干扰后的TE-1细胞增殖能力

2.5 划痕实验结果

无血清培养24 h后,siRNA-MACC1干扰组细胞向划痕处运动的数目(10.6 ± 2.2)明显少于空白组(68.2 ± 2.5)、阴性对照组(45.8 ± 3.1)和Mock组(52.3 ± 1.5),差异有统计学意义($P<0.05$),提示干扰MACC1之后,TE-1细胞的运动迁移能力明显降低,其余3组间差异无统计学意义($P>0.05$,图5)。

2.6 Transwell实验结果

结果见图6。MACC1表达下调后,穿过小室膜的细胞数明显降低:干扰组(4.2 ± 1.9)明显少于空白组(58.4 ± 7.4)、阴性对照组(42.2 ± 3.4)和Mock组(44.4 ± 4.6),差异有统计学意义($P<0.05$)。

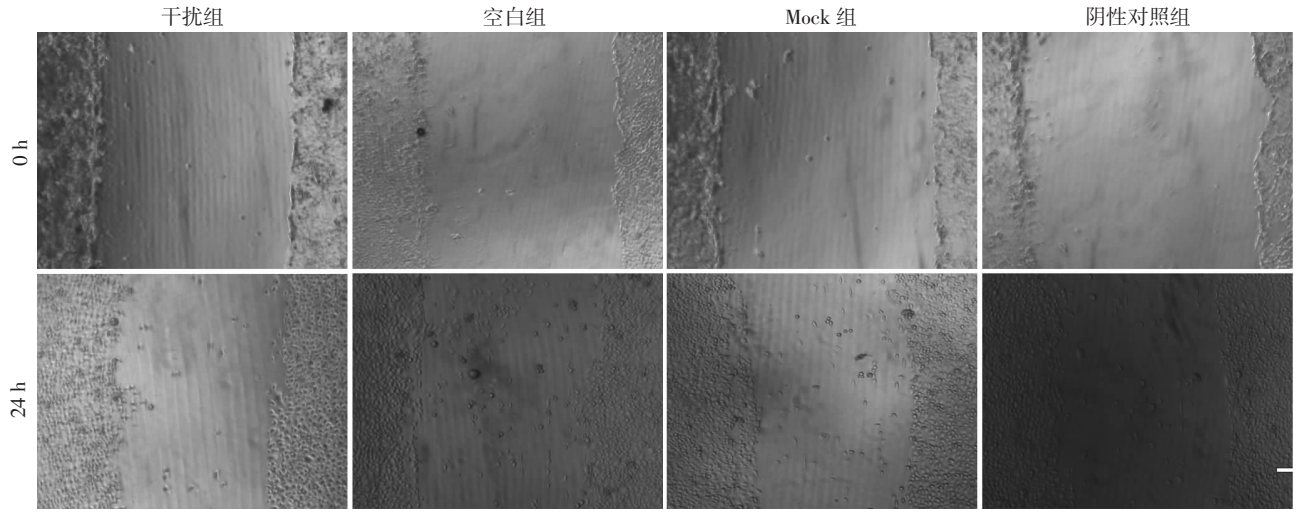
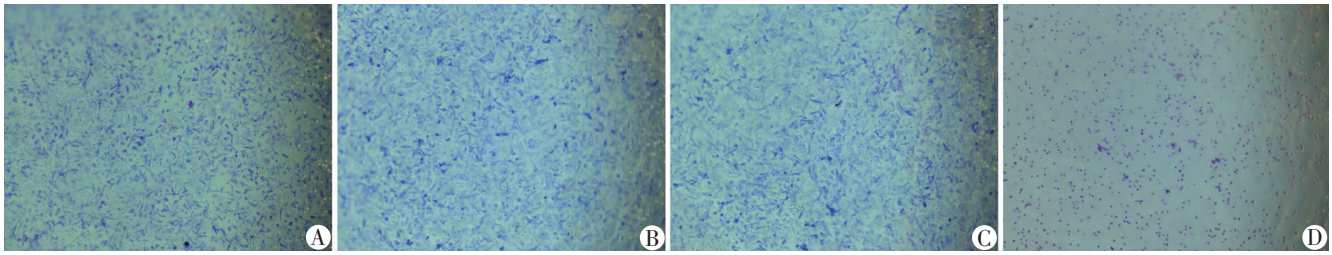


图5 倒置显微镜观察无血清培养24 h后各组细胞划痕处运动的数目变化 (×10)



A:空白组;B:Mock 组;C:阴性对照组;D:干扰组

图 6 吉姆萨染色观察各组细胞迁移能力 (×20)

3 讨论

复发与转移是造成食管癌患者 5 年生存率低的主要原因,早期诊断能够显著改善食管癌的预后,因此,寻找食管癌早期诊断和预后判断的生物学指标成为近年来研究热点。结肠癌转移相关基因(MACC1)是 2009 年 Stein 利用全基因组差异分析技术发现的新肿瘤标志物。研究显示 MACC1 是 HGF/C-MET 信号通路的重要调控因子[6],能促进肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭性和血管生成[7]。本课题组在前期工作中发现临床上有淋巴结转移的食管癌组织 MACC1 的表达高于癌旁组织,未有淋巴结转移的食管癌组织 MACC1 表达和癌旁组织无差异,提示 MACC1 与食管癌侵袭转移相关(将另文发表),因此,很有必要开展进一步的基因功能研究。

本研究采用小 RNA 干扰技术(small RNA interference,siRNA)以探索 MACC1 基因在食管癌细胞 TE-1 中的生物学功能。该技术具备基因抑制率高,对细胞毒性小等优点,是基因功能研究中不可缺少的技术手段[8]。同时,我们选择了 Stein 等[3]鉴定筛选出 MACC1 特异性较好的 siRNA 序列,一定程度上避免了脱靶效应(off-target effect)[9],使结果更加准确。TE-1 食管癌细胞株属于食管鳞癌,在 TE 系细胞株里,TE-1 侵袭力最强,HGF/C-MET 的表达最高[10-11]。因此,选择了 TE-1 食管癌细胞株用于 MACC1 基因在食管癌细胞中的功能研究。采用脂质体法将 siRNA-MACC1 转染食管癌细胞株 TE-1 后,转染效率高达 90% 以上,符合后续实验要求。本研究应用荧光定量 PCR 技术和蛋白免疫印迹技术分别检测食管癌细胞 MACC1 基因和蛋白的表达,结果显示 siRNA-MACC1 干扰组较空白组、阴性对照组 MACC1 基因和蛋白表达水平均显著降低,说明转染干扰模型构建成功;MTT 实验结果发现干扰组 1 ~ 7 d 内细胞 D(490)值均明显降低,与对照组相比具有统计学意义($P<0.05$),4 d 后降低更加明显,由此说明 MACC1 基因具有促进肿瘤增殖的活性;划痕实验、Transwell 实验结果显示,siRNA-MACC1 干扰组迁移、侵袭的细胞数目明显减少,与空白组、阴性对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$),表明 MACC1 基因具有促进食管癌细胞迁移、侵袭的功能。

综上所述,MACC1 基因具有促进食管癌细胞增殖、迁移、侵袭的功能,属于食管癌预后不良的生物学指标,可望成为食管癌前期诊断和临床治疗的一个潜在新靶点,为进一步研究 MACC1 基因在食管癌侵袭转移奠定了实验基础。在其他肿瘤研究中,已有报道 MACC1 通过 HGF/c-met 信号通路促进肿瘤侵袭转移,但也有其与 MAPK、PI3K/Akt 信号通路相关报道[12],MACC1 基因的作用机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Digklia A, Voutsadakis I A. Targeted treatments for metastatic esophageal squamous cell cancer[J]. World J Gastrointest Oncol, 2013, 5(5): 88-96.

[2] Arlt F, Stein U. Colon cancer metastasis: MACC1 and Met as metastatic pacemakers[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(12): 2356-2359.

[3] 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.

[4] Xie C, Wu J, Yun J, *et al*. MACC1 as a prognostic biomarker for early-stage and AFP-normal hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e64235.

[5] 胡兴胜, 付曦, 文世民, 等. MACC1 和 c-met 在非小细胞肺癌中的表达及其预后价值[J]. 中国肺癌杂志, 2012, 15(7): 399-403.

[6] 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.

[7] Goetsch L, Caussanel V, Corvaia N. Biological significance and targeting of c-Met tyrosine kinase receptor in cancer[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2013, 18: 454-473.

[8] Leung R K, Whittaker P A. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics[J]. Pharmacol Ther, 2005, 107(2): 222-239.

[9] Birmingham A, Anderson E M, Reynolds A, *et al*. 3′ UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets[J]. Nat Methods, 2006, 3(3): 199-204.

[10] Nishihira T, Kasai M, Mori S, *et al*. Characteristics of two cell lines (TE-1 and TE-2) derived from human squamous cell carcinoma of the esophagus[J]. Gann, 1979, 70(5): 575-584.

[11] Saeki H, Oda S, Kawaguchi H, *et al*. Concurrent overexpression of Ets-1 and c-Met correlates with a phenotype of high cellular motility in human esophageal cancer[J]. Int J Cancer, 2002, 98(1): 8-13.

[12] Matsumura A, Kubota T, Taiyoh H, *et al*. HGF regulates VEGF expression *via* the c-Met receptor downstream pathways, PI3K/Akt, MAPK and STAT3, in CT26 murine cells[J]. Int J Oncol, 2013, 42(2): 535-542.

(**收稿**:2013-10-15;**修回**:2013-11-20)

(编辑 王 红)