论著

DOI: 10.16016/j.1000-5404.201409187

RNAI沉默Grp94基因对人食管癌ECA109细胞迁移及侵袭能力的影响

樊建军[1],武家艳[1],李海玉[1],李 韵[1],高 月[1],曾 帆[1],刘革力[1,2],宋方洲[1,2] (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院:分子医学与肿瘤研究中心[1],生物化学与分子生物学教研室[2])

[摘要] **目的** 探讨RNAI沉默Grp94基因表达对人食管癌ECA109细胞迁移及侵袭能力的影响和可能机制。**方法** 设计、合成靶向Grp94基因的siRNA基因片段,应用脂质体包埋转染食管癌ECA109细胞,采用Real-time PCR和Western blot法分别检测转染后的细胞内Grp94、基质金属蛋白酶MMP2及MMP9的表达,采用Transwell实验检测沉默Grp94基因对细胞迁移及侵袭能力的影响。**结果** SiGrp94组中Grp94mRNA和蛋白水平显著下调($P<0.01$),MMP2、MMP9表达明显下调($P<0.05$);SiGrp94组细胞迁移及侵袭能力明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 沉默Grp94基因可明显抑制ECA109细胞的迁移及侵袭能力,Grp94可能通过影响MMP2、MMP9参与其中。

[关键词] Grp94;ECA109;迁移与侵袭;MMPs

[中图法分类号] R394.3;R730.23;R735.1 [文献标志码] A

Effect of RNAi-mediated Grp94 gene silencing on migration and invasion of human esophageal cancer ECA109 cells

Fan Jianjun[1], Wu Jiayan[1], Li Haiyu[1], Li Yun[1], Gao Yue[1], Zeng Fan[1], Liu Geli[1,2], Song Fangzhou[1,2] ([1]Research Center of Molecular Medicine and Cancer, [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Science, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of RNAi-mediated glucose regulated protein 94 (Grp94) gene silencing on migration and invasion of human esophageal cancer ECA109 cells and the possible mechanism. **Methods** Chemically synthesized siRNA targeting Grp94 gene was transferred into ECA109 cells by Liopfectamine RNAIMAX, and ECA109 cells transfected with negative control siRNA were used as controls. The mRNA and protein expressions of Grp94, matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and matrix metalloproteinase 9 (MMP9) were evaluated by real-time PCR and Western blot, respectively. The effect of Grp94 silencing on the migration and invasion of ECA109 cells was evaluate by Transwell migration assay and Matrigel invasion assay. **Results** The expressions of Grp94 mRNA and protein were significantly down-regulated in ECA109 cells transfected with Grp94-targeting siRNA as compared with the control group ($P<0.01$), as well as the expressions of MMP2 and MMP9 mRNA and protein ($P<0.05$). The migration and invasion of ECA109 cells transfected with Grp94-targeting siRNA were lower than those of ECA109 cells transfected with negative control siRNA ($P<0.05$). **Conclusion** Grp94 gene silencing can significantly inhibit the migration and invasion of ECA109 cells through influencing the expressions of MMP2 and MMP9.

[**Key words**] Grp94; ECA109; migration and invasion; MMPs

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30800410). Corresponding author: Song Fangzhou, E-mail: fzsongcq@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30800410)

[通信作者] 宋方洲,E-mail:fzsongcq@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141210.1640.011.html(2014-12-10)

食管癌是常见的消化道肿瘤,我国是世界上食管癌高发地区之一,每年平均有15万人死于食管癌。主要原因是缺乏针对其有效的早期诊断及治疗手段。葡萄糖调节蛋白94(glucose regulated protein,Grp94)是热休克蛋白90(HSP90)中家族成员之一,主要贮存在内质网,参与内质网的应激反应,是内质网应激反应中的重要因子。目前已证实Grp94基因在多种癌组织中高表达,下调Grp94基因可引起癌细胞走向凋亡[1]。本研究将设计、合成好的靶向Grp94基因的siRNA片段转染人食管癌细胞ECA109中,以探讨沉默Grp94基因表达对ECA109细胞迁移和侵袭能力的影响,为探讨Grp94在食管癌侵袭迁移中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

人食管癌细胞株ECA109由本实验室保存;脂质体转染试剂LipofectamineRNAIMAX购自美国Invitrogen公司;蛋白提取试剂盒和ECL发光试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;兔抗人Grp94单克隆抗体、兔抗人MMP2单克隆抗体和兔抗人MMP9单克隆抗体均购自英国Abcam;Matrigel稀释液购自Bio-Rad公司,抗人β-actin单克隆抗体购自鼎国公司,HRP标记的羊抗兔IgG购自CST公司,Transwell小室购自Millipore公司。

1.2 方法

1.2.1 Grp94 siRNA的合成 根据Grp94基因在GenBank中的序列(Genbank accession NO: NM-003299.2设计靶向Grp94基因的siRNA序列:siGrp94(UGAUGUGGAUGGUACAGUA),同时合成阴性对照siRNA,干粉siRNA用DEPC水稀释成20 μmol/L,-20 ℃保存。

1.2.2 细胞培养及转染 用含10%胎牛血清的RPMI1640完全培养液,37 ℃,5%孵箱中培养ECA109细胞,转染收集对数期生长细胞5×10^3个/孔接种于6孔培养板中,参照LiopfectamineRNAIMAX产品说明书,分别将siRNA-control和siRNA-Grp94转染至6孔培养板中,转染6 h后更换新鲜培养基。实验分组为:对照组(siRNA-control组)和实验组(siRNA-Grp94组)。

1.2.3 Real-time PCR检测转染细胞中Grp94基因mRNA表达水平 消化收集转染48 h的各组细胞,抽提各组细胞总RNA,核酸浓度测定仪测定其浓度和纯度,按TaKaRa逆转录反应说明书合成cDNA。用于扩增Grp94 cDNA的上游引物为:5′-GGGAGGTCACCTTCAAGTCG-3′,下游引物为5′-GGGTGTAGACGTGGAGCTC-3′;β-actin的上游引物为:5′-AGCGAGCATCCCCCAAAGTT-3′,下游引物5′-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3′,将cDNA产物10倍稀释后,以β-actin为内参进行Real-time PCR,反应条件为95 ℃预变性5 min;95 ℃ 5 s,60 ℃ 15 s,72 ℃ 15 s(39个循环);反应结束建立溶解曲线。同一实验重复3次,实验数据分析采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算。

1.2.4 Western blot检测转染细胞中Grp94蛋白表达水平 消化收集转染72 h后的各组,提取总蛋白,采用BCA法测定浓度。取适量细胞裂解液,加入SDS上样缓冲液,100 ℃加热变性处理5 min。取50 μg/孔蛋白样品上样,经8% SDS-PAGE电泳后,将目的蛋白转移到PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭2 h,与一抗(Grp94、β-actin)4 ℃摇床孵育过夜,TBST洗3次,每次10 min,再分别与相应HRP标记的二抗室温孵育2 h,采用ECL化学发光法进行检测。

1.2.5 沉默Grp94基因对细胞迁移及侵袭能力影响的检测 Transwell实验不铺Matrigel胶,37 ℃、5% CO_2培养24 h后取出小室,其余步骤参照侵袭实验。

将Matrigel胶4 ℃过夜,用预冷的无血清RPMI1640培养基按1∶8稀释后,每孔均匀铺入60 μL Transwell小室上室中,小室置于24孔培养板中,37 ℃孵箱过夜。收集转染24 h后的各组细胞。按1×10^4个细胞/孔接种于上室,并加入100 μL RPMI1640无血清培养基,下室加入600 μL含10% FBS的RPMI1640培养基。37 ℃孵箱培养24 h,甲醇固定30 min,0.1%结晶紫染色,光镜下随机选取3个视野计数。

1.2.6 沉默Grp94基因后分别使用Real-time PCR法和Western blot法在mRNA水平、蛋白水平对基质金属蛋白酶MMP2和MMP9基因的检测 将cDNA产物10倍稀释后,以β-actin为内参进行Real-time PCR,用于扩增MMP2 cDNA的上游引物为5′-CGCAGTGACGGAAAGATGTGGT-3′,下游引物为5′-AGAGCTCCTGAATGCCCTTGATGT-3′;MMP9的上游引物为5′-ACGCAGACATCGTCATCC-3′,下游引物为5′-AACCGAGTTGAACCACG-3′,反应条件为95 ℃预变性5 min;95 ℃ 5 s,58 ℃ 15 s,72 ℃ 15 s(39个循环);反应结束建立溶解曲线。同一实验重复3次,实验数据分析采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算Western blot实验步骤参照方法1.2.4。

1.3 统计学分析

采用SPSS 18.0统计软件,各组实验数据均以$\bar{x}\pm s$表示,配对组间采用t检验。

2 结果

2.1 沉默 Grp94 基因在 ECA109 细胞中的鉴定结果

Real-time PCR 检测结果显示:实验组 Grp94 基因 mRNA 表达水平(0.06 ±0.02)明显低于对照组(1.02 ± 0.25),差异具有统计学意义($P<0.01$,图 1)。Western blot 检测发现 Grp94 蛋白表达也明显减少,提示实验组 Grp94 基因被有效沉默。

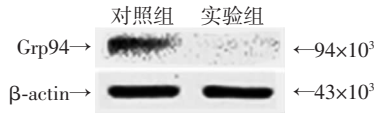
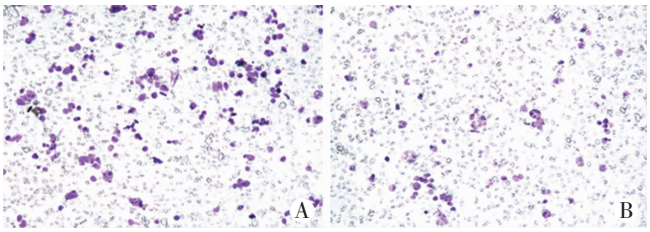


图 1 Western blot 检测蛋白水平 Grp94siRNA 干扰效率

2.2 沉默 Grp94 基因对细胞迁移及侵袭能力的影响

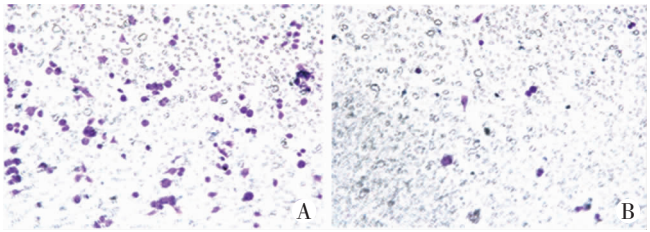
显微镜下计数各组穿过基底膜的细胞数,统计分析结果显示,实验组的迁移细胞数(53.67 ±8.76)明显少于对照组(111.67 ±6.89),差异均有统计学意义($P<0.05$,图 2)。提示实验组细胞迁移能力明显降低。



A:对照组;B:实验组

图 2 Transwell 实验检测 siGrp94 干扰后各组细胞迁移能力 (×100)

显微镜下计数各组穿过基底膜的细胞数,统计分析结果显示,实验组侵袭细胞数量(8.00 ±0.58)明显少于对照组(98.67 ±5.21),差异均有统计学意义($P<0.01$,图 3)。提示实验组细胞侵袭能力明显降低。

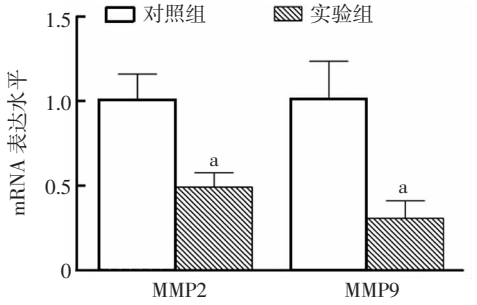


A:对照组;B:实验组

图 3 Transwell 实验检测 siGrp94 干扰后各组细胞侵袭能力 (×100)

2.3 沉默 Grp94 基因对 ECA109 细胞 MMP2 和 MMP9 mRNA 及蛋白表达的影响

Real-Time PCR、Western blot 检测结果显示,实验组 MMP2 和 MMP9 基因表达水平明显低于阴性对照组($P<0.05$,图 4、5),说明抑制 Grp94 基因表达的同时能从 mRNA 和蛋白水平抑制 MMP2 和 MMP9 的表达。



a:$P<0.05$,与对照组比较

图 4 Real-time PCR mRNA 水平检测沉默 Grp94 表达对 MMP2、MMP9 的影响



图 5 Western blot 蛋白水平检测沉默 Grp94 表达对 MMP2、MMP9 的影响

3 讨论

食管癌是威胁人类健康最常见的消化道恶性肿瘤之一,虽然近年来针对食管癌的综合治疗方法在不断地改进和完善,但其 5 年生存率并没有显著提高,由微转移灶而引起的复发、转移,仍是导致食管癌患者预后不良的重要原因,因此研究食管癌浸润转移因素并阐明其机制,对于提高食管癌患者的生存率是至关重要的[2-5]。

基质金属蛋白酶家族(matrix metallo-proteinases, MMPs)在肿瘤侵袭转移中起关键性作用,是 wnt/β-catenin 通路下游的重要调控因子[6-7],可降解细胞外基质中的各种蛋白成分,其高表达与肿瘤侵袭、转移、血管生成密切相关,从而在肿瘤浸润转移中的作用日益受到重视[8-9]。有研究表明,MMPs 可能促进转录生长因子-α(transforming growth factor-α,TGF-α)释放,介导表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)的激活和磷酸化,活化细胞外信号调节激酶 ERK1/2,促进肿瘤细胞增殖和侵袭转移[10]。食管癌细胞的侵袭迁移能力与 MMPs 家族成员 MMP2、MMP9 表达水平密切相关[11-12]。同时抑制 MMP2、MMP9 的表达可以抑制前列腺癌发生转移[13],而活化

的MMP2、MMP9通过降解及重塑细胞外基质促进肿瘤细胞穿过细胞基质、基底膜、血管及淋巴管而向远处侵袭。

内质网分子伴侣Grp94是肿瘤细胞生存的重要因子,在肺癌、乳腺癌、结肠癌等肿瘤中有较高的表达水平,目前已证实在多种肿瘤细胞中呈增高趋势,参与肿瘤细胞的新陈代谢使其正常的生长。实验表明,食管癌患者Grp94基因的表达水平显著高于相应的癌旁组织[14],Grp94在早期浸润性癌呈极显著过度表达,表达增强率62.0%[15],本研究进一步在细胞水平上研究下调Grp94基因表达后对食管癌侵袭转移的影响,及其可能的作用机制。本研究中Transwell迁移与侵袭实验结果显示敲降Grp94基因后,食管癌ECA109细胞的体外侵袭迁移能力明显降低,证实了下调Grp94表达可抑制食管癌ECA109细胞的体外侵袭迁移能力;同时,Grp94表达下调能使食管癌细胞ECA109中MMP2、MMP9表达下调,提示高表达的Grp94可能通过调控MMPs的表达,从而影响细胞的侵袭转移能力。同时Hua等[16]研究发现,在多发性骨髓瘤细胞中下调Grp94可以阻断wnt/β-catenin信号通路抑制细胞增殖促进凋亡,由此提示我们,在食管癌细胞ECA109中,下调Grp94可能通过阻断wnt/β-catenin信号通路抑制MMPs的表达,进而促进食管癌浸润转移及恶性发展,这将是我们今后工作的重点,为食管癌的基因靶向治疗提供一定的理论依据。

综上,本研究发现Grp94在食管癌的恶性发展中起着重要作用。Grp94有望作为一种新的肿瘤预后标志物,我们相信本研究将为临床上恶性肿瘤的诊断,预后以及个体化治疗方案上提供新的策略。

参考文献:

[1] Marzec M, Eletto D, Argon Y. GRP94: an HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1823(3): 774-787.

[2] Tachimori Y, Nagai Y, Kanamori N, *et al*. Pattern of lymph node metastases of esophageal squamous cell carcinoma based on the anatomical lymphatic drainage system[J]. Dis Esophagus, 2011, 24(1): 33-38.

[3] Kim T, Grobmyer S R, Smith R, *et al*. Esophageal cancer — the five year survivors[J]. J Surg Oncol, 2011, 103(2): 179-183.

[4] Shin H R, Carlos M C, Varghese C. Cancer control in the Asia Pacific region: current status and concerns[J]. Jpn J Clin Oncol, 2012, 42(10): 867-881.

[5] Bharat A, Crabtree T. Management of advanced-stage operable esophageal cancer[J]. Surg Clin North Am, 2012, 92(5): 1179-1197.

[6] Planutiene M, Planutis K, Holcombe R F. Lymphoid enhancer-binding factor 1, a representative of vertebrate-specific Lef1/Tcf1 sub-family, is a Wnt-beta-catenin pathway target gene in human endothelial cells which regulates matrix metalloproteinase-2 expression and promotes endothelial cell invasion[J]. Vasc Cell, 2011, 3: 28.

[7] Kwon M, Lee S J, Wang Y, *et al*. FilaminA interacting protein 1-like inhibits WNT signaling and MMP expression to suppress cancer cell invasion and metastasis[J]. Int J Cancer, 2014, 135(1): 48-60.

[8] Groblewska M, Siewko M, Mroczko B, *et al*. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of esophageal cancer[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2012, 50(1): 12-19.

[9] Merdad A, Karim S, Schulten H J, *et al*. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer: MMP-9 as a potential biomarker for cancer invasion and metastasis[J]. Anticancer Res, 2014, 34(3): 1355-1366.

[10] Khasigov P Z, Podobed O V, Gracheva T S, *et al*. Role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor invasion and metastasis[J]. Biochemistry (Mosc), 2003, 68(7): 711-717.

[11] Jing S W, Wang Y D, Chen L Q, *et al*. Hypoxia suppresses E-cadherin and enhances matrix metalloproteinase-2 expression favoring esophageal carcinoma migration and invasion via hypoxia inducible factor-1 alpha activation[J]. Dis Esophagus, 2013, 26(1): 75-83.

[12] Shen H, Yang Y, Xia S, *et al*. Blockage of Nrf2 suppresses the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells in hypoxic microenvironment[J]. Dis Esophagus, 2014, 27(7): 685-692.

[13] Shen K H, Liao A C, Hung J H, *et al*. α-Solanine inhibits invasion of human prostate cancer cell by suppressing epithelial-mesenchymal transition and MMPs expression[J]. Molecules, 2014, 19(8): 11896-11914.

[14] 李海燕, 王小平, 陈瑞芬, 等. 人食管癌组织中热休克蛋白70和糖调节蛋白94的表达[J]. 首都医科大学学报, 2004, 25(2): 183-185,

[15] 侯艳芳. 食管鳞癌中多肿瘤标记物表达的临床意义[D]. 开封: 河南大学, 2012.

[16] Hua Y, White-Gilbertson S, Kellner J, *et al*. Molecular chaperone gp96 is a novel therapeutic target of multiple myeloma[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(22): 6242-6251.

(**收稿**:2014-09-27;**修回**:2014-11-18)

(编辑 黄 超)