基础研究 文章编号：0253-3626(2009)05-0554-04

siRNA 干扰对乳腺癌(MCF-7)ATX 表达和侵袭力的影响

顾海涛，王继见，李 洋，杨 成
（重庆医科大学附属第二医院普外科，重庆 400010）

【摘 要】目的：研究针对自分泌运动因子（Autotaxin，ATX）的小干扰 RNA（Small interfering RNA，siRNA）对人乳腺癌细胞 ATX 基因表达的影响，探讨 RNA 干扰技术治疗乳腺癌的前景。方法：参考人黑色素瘤 ENPP2 基因序列，设计合成 ATX-siRNA 及随机阴性对照。在阳离子脂质体的介导下转染人乳腺癌细胞 MCF-7，转染后 48 h 收集细胞，用半定量 RT-PCR 和 western blot 检测转染后 ATX mRNA 和 ATX 蛋白的表达，体外实验测定肿瘤细胞穿透 matrigel 的能力。结果：体外合成的 siRNA 在转染乳腺癌细胞 48 h 后 ATX mRNA 和蛋白表达降低，转染 48 h 后测定乳腺癌 MCF-7 细胞的侵袭力明显降低（$P<0.01$）。结论：ATX-siRNA 能有效抑制人乳腺癌细胞株 ATX 基因和蛋白的表达，降低人乳腺癌细胞的侵袭力。

【关键词】小干扰 RNA；人乳腺癌细胞 MCF-7；自分泌运动因子；乳腺肿瘤
【中国图书分类法分类号】R737.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-26

作者介绍：顾海涛（1982- ），男，硕士，
研究方向：乳腺肿瘤。
通讯作者：王继见，男，教授，E-mail:Wangjj1963@163.com。
基金项目：重庆市教委课题（KJ080305）。

升高也被抑制，且呈剂量依赖性。据此我们分析，在 GH 诱导睾酮分泌过程中，ATP50 可能通过作用于 GH 受体从而影响睾酮的分泌。ATP50 与间质细胞上的特异性受体结合后，在 G 蛋白的介导下激活腺苷酸环化酶，使 ATP 转变成 cAMP，cAMP 使无活性的 PKA 激活。当 PKA 的催化亚基进入细胞核内后，可催化 CREB 磷酸化，动员胆固醇进入线粒体内膜，启动呼吸链活动，线粒体通过氧化呼吸提供 Leydig 细胞代谢的能量，从而促进睾酮合成[11,12]；当 ATP50 缺乏时，特异性 GH 受体不能充分结合 ATP50，从而使 G 蛋白介导的腺苷酸环化酶激活过程受抑制，ATP 不能正常转变成 cAMP，引起 cAMP 缺乏，无活性 PKA 不能正常激活，CREB 磷酸化相应被抑制，胆固醇进入线粒体内膜活动受阻，最终使线粒体呼吸链被抑制，从而导致睾酮分泌减少。这些结果提示，ATP50 的表达可能是影响睾丸间质 Leydig 细胞睾酮分泌十分关键的环节之一，为后续老年男性雄激素部分缺乏综合征的研究提供了一定的理论基础，但在老年男性睾丸间质细胞中 ATP50 表达降低的原因与机制尚不清楚，有待于将来更进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Lunenfeld B. Aging men challenges ahead[J]. Asian J Androl, 2001, 3(3): 161-168.
[2] 刘 刚，辛钟成，田 龙，等. Atp50 和 coxⅤⅡa 在大鼠 Leydig 细胞钟的表达与鉴定[J]. 中华男科学杂志，2006，20(6)：9-12.
[3] Stocco, DM. Recent advances in the role of StAR[J]. Rev Reprod, 2003, 3(2): 82-85.
[4] Vickery LE. Molecular recognition and electron transfer in mitochondrial steroid hydroxylase systems[J]. Steroids, 2004, 6(2): 124-127.
[5] Hermann M, Berger P. Hormone replacement in the aging male[J]. Exp Fenrontol, 1999, 34(8): 923-933.
[6] 辛钟成，刘武江，田 龙，等.老年人睾丸组织退化的基因表达谱研究[J]. 北京大学学报：医学版，2003，35(4)：364-368.
[7] Neaver W B, Johnson L, Porter J C, et al. Leydig cell numbers, daily sperm production and serum gonadotrop in levels in aging men[J]. J clin Endocrinol Metab, 1984, 59(4): 963- 969.
[8] Chen H, Liu I, Luo L, et al. Dibutyryl cyclic adenosine monophosphate restores the ability of aged Leydig cells to produce testosterone at the high levels characteristic of young cells[J]. Endocrinology, 2004, 145(10): 4441-4446.
[9] 邓春华. 老年大鼠睾丸间质细胞结构和功能变化的实验研究[J]. 中华男科学，2005，11(10)：740-743.
[10] Hales D B. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis[J]. J Reprod Immunol, 2002, 57(1-2): 3-18.
[11] 章振保，蔡崇岳，田生平，等. 衰老雄性大鼠睾丸组织脂质过氧化与睾酮水平和 bcl-2 基因表达的研究[J]. 中华男科学杂志，2007，13(1)：46-49.
[12] Stocco D M. Starting to understand cholesterol transfer[J]. Nat Struct Biol, 2000, 7(6): 445-447.

（责任编辑：关蕴良）

Effect of silencing ATX by RNA interference on expression and invasive potential of human breast cancer cell lines

GU Hai-tao, et al

(*Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effect of RNA interference (RNAi) on ATX-mRNA expression and the invasive petential of human breast cancer cell lines. *Methods*: Chemically synthesizeddouble stranded RNA(dsRNA) targeting ATX was transfected into human breast cancer cell MCF-7 using SiPORT Lipid. The transfection efficiency was observed under fluorescence confocal microscope. Expression of ATX mRNA and protein was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. Cell penetrate matrigel capacity were determined by in vitro experiment. *Results*: ATX-siRNA effectively inhibited ATX- mRNA and protein expression ($P<0.05$), and degraded invasion capability of MCF-7 cells ($P<0.01$). *Conclusion*: ATX-siRNA inhibits ATX-mRNA and protein expression, and degrades invasion of human breast cancer cell.

【Key words】small interfering RNA(siRNA); MCF-7; Autotoxin(ATX); Breast cancer

肿瘤转移和侵袭的重要环节是细胞运动。癌细胞的转移是通过局部扩散、淋巴结转移、血运转移为主要途径进行的[1]。癌细胞自身分泌的物质大大促进其转移的进程,自分泌运动因子(Autotaxin,ATX)便是其中之一。有研究证实 ATX 在乳腺癌中有较高的表达水平[2]。RNA 干扰技术能高效、特异的阻断体内特定基因的表达,诱使细胞出现特异基因表型缺失。本研究旨在探讨体外合成的小干扰 RNA(Small interfering RNA,siRNA)对 ATX 表达的影响,进而探讨 siRNA 干扰ATX 在乳癌治疗中的前景。

1 材料与方法

1.1 材料

总 RNA 提取试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司;质粒购自武汉晶赛生物科技有限公司;人乳腺癌细胞株 MCF-7 由本实验室提供;脂质体转染剂 LipofectamineTM2000 购自上海 invitrogen 公司;G418、DNA marker 购自天根生化科技有限公司;RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物公司;总 RNA 提取试剂购自上海华舜生物工程有限公司;鼠抗兔单克隆抗体和兔抗人 autotaxin 单克隆抗体购自美国 SANTA CRUZ 生物技术有限公司;PCR 引物及内参(β-actin)引物由上海生物工程有限公司合成。

1.2 设计合成 siRNA 干扰序列

参考 Gene Back 人黑色素瘤 ATX mRNA(ENPP2/k35594 Gene ID:5168, HUGO Gene Nomenclature Committee),按 Elbashir 等[3]的 siRNA 设计原则设计出阻断 ATXmRNA 的 siRNA 序列 1 对,其正义链:5'-GGUCCUCCUACAGUGCUAUTT-3',反义链:5'-AUAGCACUGUAGGAGGACCTT-3';并随即设计 1 对阴性对照:其正义链:5'-GGUCUCCCAAACGGUCUAUTT-3',反义链:5'-AUGAGCCGUGAUGAGGACCTT-3'。

1.3 实验分组

将实验组分为 3 组:空白对照组,阴性对照组,ATX-iRNA 组。

1.4 细胞培养

MCF-7 人乳腺癌细胞株用含 10%小牛血清和 100 U/ml 卡那霉素的 RPMI1640 培养液,于 37℃、5%CO_2 的恒温培养箱中培养,常规换液传代至指数生长期用于本实验。

1.5 细胞转染

转染前 24 h,胰酶消化处于指数生长期的细胞并计数,用无抗生素 RPMI1640 新鲜生长培养基稀释细胞后,传代于 6 孔板,在无抗生素的生长培养基中培养 24 h 后,细胞生长达至 80%~90%时开始转染。操作按 Lipofectamine™ 2000 试剂说明书进行。

1.6 绿色荧光蛋白表达情况

转染 24 h 后,在荧光显微镜下观察,转染成功的 MCF-7 细胞有 EGFP 表达,发出特异性的绿色荧光。分别记录每个转染细胞培养孔四周和中央 5 个视野内明视野和暗视野所观察到的细胞数,按转染率 = 暗视野所见发强绿色荧光的细胞数/明视野所见细胞总数 × 100%。

1.7 半定量 RT-PCR 测定 ATX 基因 mRNA 水平的变化

对 ATX 进行 RT-PCR 分析,阴性对照组和未转染 ATX-siRNA 细胞作对照。按总 RNA 提取试剂盒说明书分别提取 3 种细胞总 mRNA 作为逆转录模板,进行 RT-PCR。根据 ATX 基因序列设计引物序列:上游引物:5'-ATTACAGCCACCAAGCAA -3',下游引物:5'-GAAGGCATAGACCGAAGG-3',扩增长度 213 kbp。内参(β-actin)上游引物:5'-GACTACCTCATGAAGATC-3',下游引物:5'-GATCCACATTTGCTGGAA-3',预计扩增长度为 325 kbp。PCR 反应条件为:94℃预变性 2 min 后,94℃变性 45 s,53℃退火 45 s,72℃延伸 90 s,循环 35 次;0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物大小。

1.8 Western blot 检测 ATX 蛋白表达

收集 MCF-7 细胞,用裂解液提取蛋白,以蛋白提取液样品做 SDS-PAGE 电泳后转膜,封闭,转至 PVDG 膜,兔抗人

ATX 单克隆抗体及小鼠抗人 β-actin 抗体，4℃冰箱过夜；0.01 mol/LPBST 洗涤 3 次，每次 5 min；用鼠抗兔单克隆抗体二抗室温孵育 1 h，0.01 mol/L PBST 洗涤 4 次，每次 5 min，DAB 显色。结果用美国 Quantity One 4.4.0 软件分析，所得灰度值与 β-actin 蛋白两者对应条带的灰度值之比，进行分析。

1.9　肿瘤细胞的体外侵袭实验

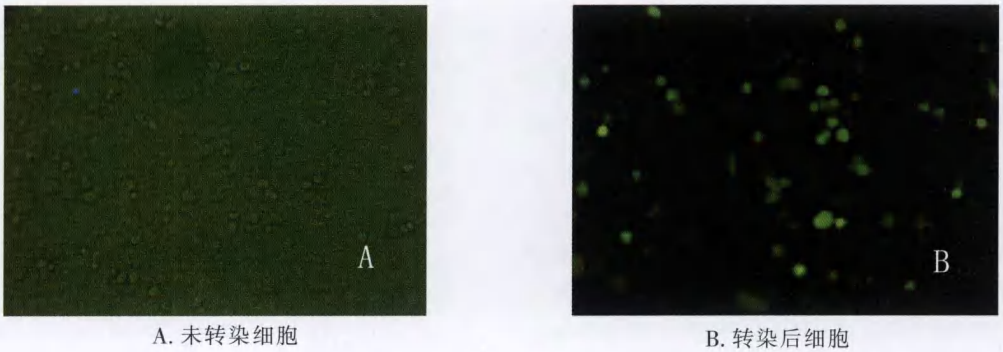
将 matrigel 胶按 1:3 均匀地铺在 8 μm PCF 细胞小室膜上成胶 30 min，实验前 30 min 再次成胶。将小室置于 24 孔板内，同时在 24 孔板内加入含有肿瘤细胞趋化因子的小鼠成纤维细胞 NIH-3T3 培养基上清液和 RPMI1640 培养基 400 μl 比例为 1:3，细胞计数池计数各组细胞加入到小室内，细胞数目约为 1×10^5，并加入培养基 100 μl，37℃、5%CO_2 孵育。48 h 后取出小室，撕取小室底层膜，用棉签擦去上层细胞，PBS 冲洗小室膜 3 次，95% 乙醇固定 5 min，HE 染色，倒置显微镜下计算 5 个视野的肿瘤细胞数，干扰片段转染组、空白质粒转染对照组、阴性对照组，每组实验重复 3 次。

1.1.0　统计学处理　所有检测实验均重复 3 次，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，使用 SPSS11.5 统计软件，对数据采用 t 检验。

2　结　果

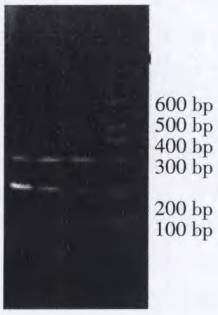
2.1　乳腺癌 MCF-7 细胞株目的基因 siRNA 的转染及效率观察

取生长良好的乳腺癌 MCF-7 细胞株，从细胞培养瓶中消化并转移至 6 孔板中，加入含有 10%胎



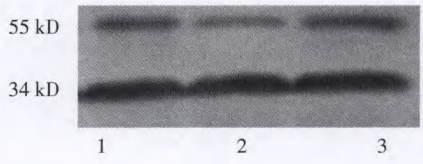
A. 未转染细胞　　B. 转染后细胞

图 1　乳腺癌 MCF-7 细胞株转染图（×200）



M. DL600Marker；1、2、3 的条带分别为：阴性对照组、空白质粒转染组、干扰片段转染组 PCR 产物

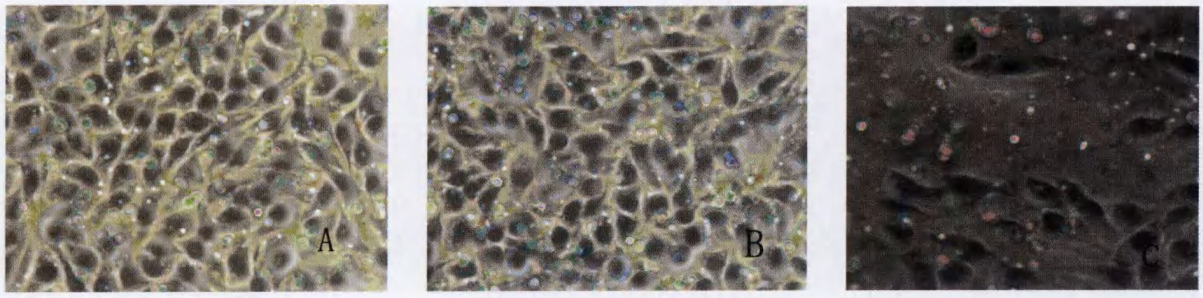
图 2　RT-PCR 检测各组 ATX 表达图



34 kD：β-actin　　55 kD：ATX 蛋白

1. 阴性对照组；2. 干扰片段转染组；3. 空白质粒转染组

图 3　Western blot 检测各组 ATX 蛋白表达图



A. 空白对照组　　B. 阴性对照组　　C. 干扰片段转染组

图 4　转染后乳腺癌细胞（MCF-7）穿膜情况（×200，HE 染色）

牛血清的 RPMI1640 培养基置于 37℃、5%CO_2 中孵养 24 h，至细胞长满整个培养板。实验发现脂质体 16 μl 和已构建的目的基因 siRNA 4 μg 配比细胞转染效率较高，如图 1 所示。荧光倒置显微镜观察，细胞转染效率达 60%，荧光表达较强。

2.2 RT-PCR 结果

转染 48 h 后，提取细胞 mRNA 并合成 cDNA 细胞空白质粒转染株的 ATX mRNA 表达水平 ATX（1.097±0.184）与阴性对照组（0.965±0.076）比较 $P>0.05$，无明显差异；与阳性对照组（0.746±0.721）比较 $P<0.05$，差异有显著性；见图 2。

2.3 Western blot 结果

转染 48 h 后，各组分别用 Western blot 分析，干扰组与空白对照组及阴性对照组分别比较，结果显示：干扰组 0.501±0.023 与空白组 0.680±0.052 比较 $P<0.05$，ATX/β-actin 蛋白表达有显著性差异；干扰组 0.501±0.023 与阴性对照组 0.713±0.027 比较 $P<0.05$，ATX/β-actin 蛋白表达有显著性差异；空白组与阴性对照组比较 $P>0.05$，ATX/β-actin 蛋白表达无差异；见图 3。

2.4 细胞侵袭实验结果

转染 48 h 后，MCF-7 细胞阴性对照组穿膜细胞数（130.0±4.690）与空白质粒转染对照组（141.2±6.693）无明显差异，而干扰片段转染组细胞数（26.0±1.532）明显减少，差异有显著性（$P<0.01$）；空白对照组穿膜细胞数与阴性对照组间差异无统计学意义（$P>0.05$）；见图 4。

3 讨 论

ATX 是一种肿瘤细胞运动刺激因子，最初是由人黑色素瘤细胞株 A2058 血清培养基中分离、纯化出的细胞因子，由肿瘤细胞产生分泌并能体外刺激细胞定向和随机运动。后来发现正常细胞和肿瘤细胞均表达 ATX 基因产物，但肿瘤细胞过度表达并伴有蛋白选择性分泌。该因子的分子量在还原状态为 60 kD，非还原状态为 55 kD，其结构与磷酸己糖异构酶（Phosphohexose isomerase，PHI）相同；其受体（Autocrine motility factor receptor，ATXR）为一种细胞表面糖蛋白，分子量为 78 kD[4,5]，当 ATX 和 ATXR 发生特异性结合，肿瘤细胞骨架就发生重排，同时释放组织蛋白酶等溶解酶，使肿瘤细胞对血管、淋巴管内皮细胞及周围正常细胞的粘附性、融合性增强，抗凋亡及活动能力提高，从而增强肿瘤细胞的侵犯性和转移能力[6]。

RNAi 现象自 1998 年由 Fire A 等发现以来[7]，RNAi 技术迅速发展。研究显示 RNAi 技术比同源重组、反义、核酶等生物学技术更为有效[8]。其基本原理是内源或外源双链 RNA（dsRNA）进入细胞后降解为 21~25 个核苷酸组成 siRNA，诱导同源特异性mRNA 降解，使特异性蛋白合成减少，从而导致特定基因沉默（Post transcriptional gene silencing，PTGS）[9]。本实验使用人工合成的 SiRNA 干扰 ATX 基因的表达，通过 RT-PCR 和 WEST-BLOT 测定，结果表明：SiRNA-AXT 链的 mRNA 和 ATX 蛋白水平较阴性对照组和空白对照组明显下降，差别具有显著性（$P<0.05$）。RNAi 抑制 MCF-7 细胞 ATX 基因后可使其侵袭力明显下降。体外侵袭实验验证，干扰组的穿膜细胞数与其他组比较，数量明显减少，具有显著差别。

综上所述，本研究表明体外合成的 ATX 基因特异性 siRNA，通过脂质体转染乳腺癌细胞后，可以特异性的抑制 ATX-mRNA 和蛋白的表达，从而抑制 ATX 刺激肿瘤细胞运动并降低肿瘤细胞的侵袭力。

参 考 文 献

[1] 刘 斌，寇昌华，谢应海，等.siRNA 对胆管癌细胞自分泌运动因子表达的影响[J]. 肝胆胰外科杂志，2006，18(5)：291-293.

[2] Noh J H，Rvu S Y，Eun J W，et al. Identification of large scale molecular changew of Autotaxin（ENPP2）knock-down by small interfering RNA in breast cancer cells[J]. Mol Cell Biochem，2006，288(1-2)：91-106.

[3] Elbashir S M，Harborth J，Weber K，et al. Analysis of gene function in somatic mammalian ce11s using a small interference RNAs[J]. Methods，2002，26(2)：199-213.

[4] Picford A S，Cogoni C. RNA mediated gene silencing[J]. Cell Mol Life Sci，2003，60(5)：871-882.

[5] 刘秀娟，迟晓丽，程肖蕊，等 自分泌运动因子受体及其配体系统的研究进展[J]. 军事医学科学院院刊，2007，31(5)：474-477.

[6] Kehlen A，Englert N，Seifert A，et al. Exppression，regulation and fuction of autotoxin in thyroid cacinomas[J]. Int J Cancer，2004，109(6)：833-838.

[7] Fire A，Xu S，Montgomery M K，et al. Potent and specific genetic interference bydouble-strand RNA inCaenorhabditis elegans[J]. Nature，1998，391：806-811.

[8] Wang E，Wagner G J. Elucidation of the functional of genes central to diterpenemetabolism in tobacco trichomesusing posttranscriptional gene silencing[J]. Planta，2003，216：686-691.

[9] Dimitri S，Ieigh F. Specificity of short interfering RNA determined throughgene expression signature[J]. Proc Natl Acad Sci USA，2003，100(11)：6347-6352.

（责任编辑：冉明会）