维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)05-0608-04

siRNA 沉默 PAR1 基因表达对大肠癌细胞侵袭力的影响

陆信仰,王继见,王亚旭

(重庆医科大学附属第二医院普外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究 RNA 干扰活性蛋白酶受体(Protease-activated receptors,PAR1)表达以及对人类大肠癌细胞侵袭力的影响。方法:体外化学合成 PAR1 基因序列特异性双链 RNA(dsRNA),在脂质体(Lipid)的介导下转染入人大肠癌 Lovo 细胞株,荧光倒置显微镜下观察转染效率,应用 RT-PCR 和 Western blot 检测 PAR1mRNA 和蛋白表达,体外实验测定肿瘤细胞穿透 matrigel 的能力。结果:干扰片段转染组的转染 Pgenesil-1-PAR1-siRNA 后大肠癌 Lovo 细胞株的 PAR1 基因和蛋白的表达被 PAR1-siRNA 有效沉默,与阴性对照组、空白质粒转染组相比 PAR1 mRNA 和蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。转染 48h 后测定大肠癌 Lovo 细胞的侵袭力明显降低($P<0.01$)。结论:PAR1-siRNA 能有效抑制人大肠癌细胞株 PAR1 基因和蛋白的表达,降低人大肠癌细胞的侵袭力。

【关键词】大肠癌;RNA 干扰;活性蛋白酶受体;侵袭

【中国图书分类法分类号】R735.34 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-25

Effbct of silencing PAR1 by RNA interference on invasive potential of human colon cancer cell lines

LU Xin-yang, et al

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

【Abstract】*Objective*: To study the effect of RNA interference(RNAi) on PAR1 gene mRNA expression and the invasive petential of human colon cancer cell lines. *Methods*: Chemically synthesizeddouble stranded RNA(dsRNA) targeting PAR1 was transfected into human colon cancer cell Lovo using SiPORT Lipid. The transfection eficiency was observed under fluorescence confocal microscopy. Expression of PAR1 mRNA and protein was detected by reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) and Western blot. Cell penetrate matrigel capacity were determined by invitro experiment. *Results*: PAR1-siRNA effectively inhibited PAR1 mRNA and protion expression($P<0.05$), and degraded invasion capability of Lovo cells($P<0.01$). *Conclusion*: PAR1-siRNA inhibits PAR1 mRNA and protein expression, degrades invasion of human colon cancer cell.

【Key words】Colon cancer; RNAi; Protease-activated receptors; Invasive

PARs 是 G 蛋白偶联受体的一个特殊系列,其可以被丝氨酸蛋白酶所活化[1]。Riewald 在研究发现其在肿瘤的转移及侵袭中也发挥了重要作用,并在多种肿瘤中都有表达[2]。本实验设计了针对 PAR1 的特异干扰序列,靶向沉默 PAR1,并构建质粒表达载体,应用脂质体介导法转染至大肠癌 Lovo 细胞株当中,荧光倒置显微镜下观察转染效率,逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)和 Western blot 法观察表达其干扰效果,并在体外实验观察其侵袭性的改变。

1 材料与方法

作者介绍:陆信仰(1981-),男,硕士,研究方向:胃肠肿瘤。

通讯作者:王继见,男,教授,E-mail:Wangjj1963@163.com。

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人类大肠癌 Lovo 细胞株购于重庆波尔生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂 质粒抽提试剂盒、RNA 提取试剂盒购于上海华舜公司;带有 U6 启动子的质粒 Pgenesil-1 购自武汉晶赛生物有限公司,脂质体、T4DNA 连接酶、*Hand*Ⅲ、*BamH*Ⅰ和 cDNA 合成试剂盒及 PCR 扩增试剂盒购于 TaKaRa 公司;RPMI1640 购自 Gibeo 公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;用于 Western blot 的鼠抗人 PAR1 单克隆抗体(一抗),辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(二抗)购自北京中杉公司。干扰 DNA 序列及引物由上海生工公司合成。

1.2 方法

1.2.1 目的基因干扰片段的设计合成 从基因库中查取 PAR1 基因编号(基因编号:AF019616),按 siRNA 序列设计原则,结合 Takara 公司提供的网上在线设计工具,选择 1 对

维普资讯 http://www.cqvip.com

21 个碱基的 siRNA,在基因库表达序列标签(EST)数据库中用 BLAST 检索,确认所设计 siRNA 序列的特异性,以排除非特异性基因的干扰。提交上海生工生物公司进行筛选、优化、纯化、合成一对有效 siRNA 的干粉制剂。合成 PAR1-dsRNA 正义链序列为 5'-GATCCAGAAATTGCGTCGTCAGGTTTCAAGAGAACCTGACGACGCAATTTCTTTTTTTA-3'反义链序列为 3'-GTCTTTAACGCAGCAGTCCAAAGTTCTC TTGGACTGCT-GCGTTAAAGAAAAAAATTCGA-5'。

1.2.2 Pgenesil-1-PAR1-siRNA 载体的构建与鉴定 ①寡核苷酸片段退火形成双链:2 条寡核苷酸各 2μg(4μl),退火 Buffer 46μl。95℃,5min,72℃ 10min,缓慢降至室温,4℃保存。②Pgenesil-1 质粒酶切过夜,胶回收线性化空载体。③用 DNA 连接酶将目的片段与线性化空载体连接。④将连接好的质粒转化大肠杆菌 DH-5α,用含卡那霉素的平板筛选,挑取阳性菌落提取质粒酶切鉴定并测序,并将重组质粒命名为 Pgenesil-1-PAR1-siRNA,测序结果提示质粒构建成功。

1.2.3 实验分组 实验分 3 组:阴性对照组、空白质粒转染组和干扰片段转染组。

1.2.4 细胞培养 细胞株复苏后接种于含 10%的小牛血清的 RPMI1640 (GibcoBRL)培养液中,置于 37℃、5%CO_2 孵箱中培养,观察细胞生长状态良好后 0.025%胰酶消化传代分瓶用于转染。

1.2.5 转染 大肠癌 Lovo 细胞经胰酶消化后,铺于 6 孔板,使其生长密度达到 10^5 个/孔,转染时细胞应 75%长满。240μl 无血清 DMEM 中加入 4μg 质粒,静置 5min 后,加入含有 16μl 脂质体的 250μl 的无血清 DMEM,轻轻颠倒混匀后静置 30min。将 500μl 的 DNA 脂质体混合物加入用无血清 DMEM 清洗 3 遍的 6 孔板中,加无 DMEM 至 2ml。以转染 pGensil-1 为空白质粒组,转染 Pgenesil-1-PAR1-siRNA 质粒为实验组,未转染质粒为对照组。5%CO_2、37℃条件下,4h 后换成 10%胎牛血清的 1640 培养液。筛选 24h 后观察荧光,G418(800μg/ml)筛选 2d。细胞核染色后在荧光共聚焦显微镜下摄片并与可视光同视野下照片对比观察转染效率。

1.2.6 RT-PCR 测定大肠癌 Lovo 细胞株基因的表达 观察细胞长满约瓶底 80%后倒掉培养基,PBS 清洗 3 次,加入细胞裂解液 1ml,冰浴裂解 40min,提取 mRNA,将提取的 mRNA 凝胶电泳鉴定后,进行 RT 反应。反应条件如下:37℃ 15min,85℃ 5s。将 CDNA -20℃保存。PCR 反应体系的反应体积为 25μl,cDNA2μl,引物浓度 50nmol/L,Taq 酶 1U。PAR1 基因 PCR 引物:(F)5'-CACAACCCCTTCCCATTCAG -3',(R)5'-GGACACAGCAAGACCACAATAAAG-3',扩增产物片断为 113 碱基对(Base pair,bp)。反应条件:94℃ 5min,94℃变性 30s,63℃退火 30s,72℃延伸 1min,共进行 35 个循环,最后 72℃延伸 7min。以 GAPDH 为内参,引物序列:(F)5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',(R)5'-TCCACC ACCCT-GTTGCTGTA-3',扩增片段长度 425bp,反应条件:94℃ 5min,94℃变性 1min,58℃退火 45s,72℃延伸 1min,共进行 35 个循环,最后 72℃延伸 10min。取 5μl PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,紫外照相并进行扫描分析,以 PAR1 与 GAPDH 平均光密度值的比值来半定量反映 PAR1 mRNA 的表达水平。

1.2.7 Western blot 检测 PAR1 蛋白表达 收集 Lovo 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,鼠抗人 PAR1 单克隆抗体及小鼠抗人 β-actin 抗体,4℃冰箱过夜;0.01mol/L PBST 洗涤 3 次,每次 5min;用辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗小鼠二抗室温孵育 1h,0.011mol/L PBST 洗涤 4 次,每次 5min,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。

1.2.8 肿瘤的体外侵袭实验 将 matrigel 胶按 1∶3 均匀地铺在 8μm PCF 细胞小室膜上成胶 30min,实验前 30min 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 400μl 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 个,并加入培养基 100μl,37℃、5%CO_2 孵育。48h 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 5min,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。

1.2.8 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 目的基因 PAR1 特异性干扰序列的质粒构建并测序

将目的基因的特异性干扰片段经退火链接并转化到大肠杆菌 DH-5α 中,提取质粒测序,目的基因的干扰序列成功插入到 pGensil-1 中,测序观察成功将目的干扰序列插入到质粒中。

2.2 大肠癌 Lovo 细胞株目的基因 siRNA 的转染及效率观察

取生长良好的大肠癌 Lovo 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%胎牛血清的 RPMI1640 培养基置于 37℃、5%CO_2 中孵养 24h,至细胞长满整个培养板。实验发现脂质体 16μl 和已构建的目的基因 siRNA 4μg 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%以上,荧光表达较强。

2.3 RT-PCR 检测 siRNA 对人大肠癌细胞侵袭力的影响

转染 48h 后,提取细胞 mRNA 并合成 cDNA 细

维普资讯 http://www.cqvip.com

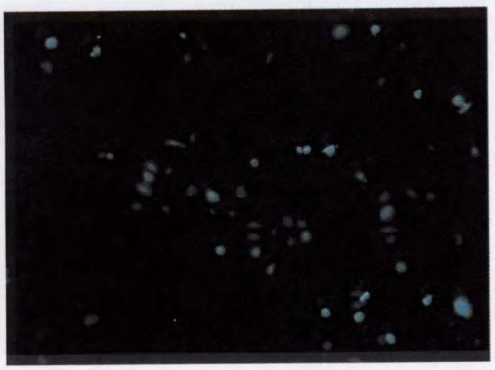
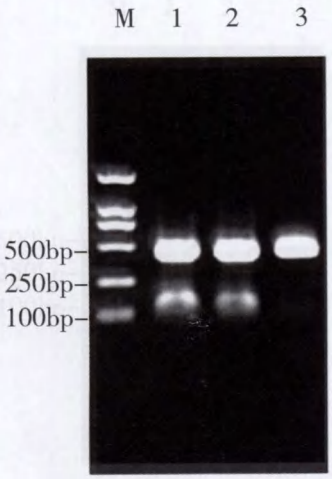


图 1 大肠癌 Lovo 细胞株转染图×200



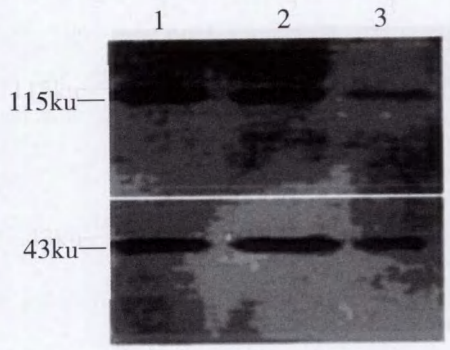
M 为 DL2 000Marker,1、2、3 的条带分别为阴性对照组、空白质粒转染组;干扰片段转染组 PCR 产物。

图 2 Rt-PCR 结果

胞空白质粒转染株的 PAR1 mRNA 表达水平PAR1(0.459 ± 0.021)较阴性对照组(0.397 ± 0.015)无明显差异(P>0.05),较阳性对照组(0.012 ± 0.003)显著下调,差异有显著性(P<0.05);见图 2。

2.4 Western blot 结果

转染后 Lovo 细胞 PAR1 蛋白和 β-actin 蛋白



43ku:β-actin 190ku:PAR1 蛋白

1. 阴性对照组; 2. 空白质粒转染组; 3. 干扰片段转染组

图 3 Western blot 结果

的表达水平与 Lovo 细胞转染 pGensil-1-siRNA-PAR1 后与对照组相比,PAR1 蛋白表达明显下降,表达量(与内对照 β-actin 的灰度值比值)由 0.631 ± 0.032 下降为 0.124 ± 0.045(P<0.05),β-actin 表达没有变化;而转染空白质粒组与对照组相比,蛋白 PAR1 表达无明显变化。如图 3。

2.5 细胞侵袭实验结果

转染 48h 后,Lovo 细胞阴性对照组穿膜细胞数(280.0 ± 4.690)与空白质粒转染对照组(262.2 ± 6.693)无名显差异,而干扰片段转染组细胞数(57.0 ± 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),见下图。

3 讨 论

PARs 是 G 蛋白偶联受体的一特异性系列,因 G 蛋白含有 7 个跨膜螺旋结构,又被称为 7 次跨膜受体,其中包括一个胞外 N- 端和胞内 C- 端,另外

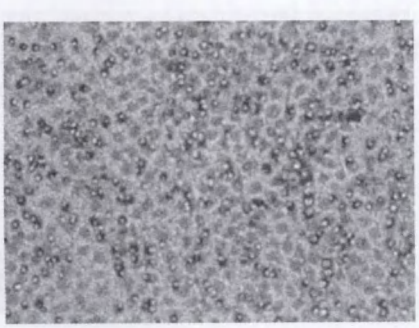


图 4 阴性对照组穿膜情况 HE 染色(×200)

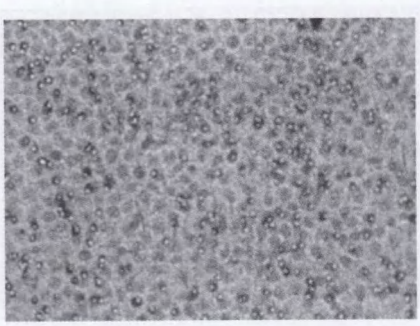


图 5 空白质粒转染组细胞穿膜情况 HE 染色(×200)

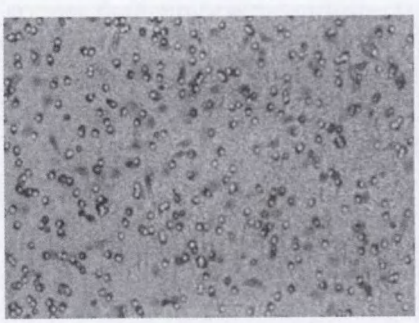


图 6 干扰片段转染组穿膜情况 HE 染色(×200)

维普资讯 http://www.cqvip.com

还有 3 个胞外和胞内环,现已经发现有 4 种 PARs(-1、-2、-3、-4)。PARs 不但具有 G 蛋白的相关结构和功能而且还具有它自身的特殊属性 - 带有活化配体,能被其特异性活化剂裂解,产生的 N- 端特异性配体又与自身胞外第三环结合形成配体受体复合物,使分子构型发生转变并引起一系列级连生物反应如:信号传导、粘附份子的衔接、细胞的粘附和转移、基因转录、有丝分裂等[3]。4 种 PARs 被蛋白酶活化后的 N- 端分子结构各不相同,分别具有不同的配体,不同的 PARs 具有各自的特异性阻断剂[4]。Riewald 等研究表明 PAR1 可以被丝氨酸蛋白酶所活化,其中包括凝血酶、纤维蛋白水解酶、Xa、活性蛋白酶 C,以凝血酶最为代表。凝血酶是在凝血的过程中由磷脂酶复合物和 Ca^{2+} 参与下从其酶原—凝血酶原的形式活化成凝血酶后才能发挥其活化 PAR1 的作用。Borire 和 Covic 在 2005 年研究乳腺癌的转移及侵袭时发现:锌离子依赖基质金属蛋白酶系列(Matrix metallopro teases,MMPs)可以直接活化 PARs, 以 MMP1 为代表[5]。MMPs 可以在 N- 端 R41-S、R34-S、K38-T、R47-G 之间水解 PAR1-4,产生一个相应的残端, 此残端又与自身结合从而使 G 蛋白偶连受体活化成活性形式并与胞内 G 蛋白结合使细胞分子的膜结构发生改变如: 离子通道的开放、细胞膜粘附性、活动性改变[6]。细胞膜生物学的改变使细胞内部的生物学信息相继发生改变,产生错误的基因转录和有丝分裂,从而诱导细胞产生新的分化。

本实验针对细胞膜蛋白 PAR1 基因在肿瘤细胞的侵袭中发挥着重要的作用,结合目前研究的热点问题 - 基因干扰,成功构建了 PAR1 的 siRNA 真核表达载体 Pgenesil-1-PAR1-siRNA,并稳定转染到大肠癌细胞 Lovo 株中,经 G418 筛选 48h 后,应用 RT-PCR 和法检测 PAR1 的基因和蛋白表达,结果显示阳性转染组的 PAR1mRNA 和蛋白表达量显著降低($P<0.05$),而空白质粒转染组与阴性对照组的 PAR1mRNA 和蛋白表达量无名显变化。肿瘤细胞侵袭到邻近组织首先是通过水解其周围的细胞基质,而细胞外基质中的成纤维细胞可以分泌多种促进细胞侵袭的趋化因子[7]。本实验在体外建造了细胞外基质的模型并证实大肠癌细胞 Lovo 细胞株的侵袭性也明显降低,未转染组细胞穿膜细胞数(280.0 ± 4.690)与空白质粒转染对照组(262.2 ± 6.693)无明显差异,而阳性干扰片段转染组细胞穿膜数(57.0 ± 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显著性;干扰起到明显效果。

本实验在基因和蛋白水平对 PAR1 的 RNA 干扰进行的验证,取得了明显得效果,为肿瘤的基因治疗提供了一定的实验依据。

参 考 文 献

[1] Misaki T,Satoh Y,Saino T,et al. The role of protease-activated receptors on the intracellular calcium ion dynamics of vascular smooth muscles,with special reference to cerebral arterioles[J]. Arch Histol Cytol,2006;69(1):49-60.

[2] Riewald M,Ruf W,Chem JB. Protease-activated receptor-1 signaling by activated protein C in cytokine-perturbed endothelial cells is distinct from thrombin signaling[J]. Biol Chem,2005;280(20):19808-19814.

[3] Seeley L,Covic SL,Jacques J,et al. Structural basis for thrombin activation of a protease-activated receptor:Inhibition of intramolecular liganding[J]. Chem. Biol,2003;10(11):1033-1041.

[4] Goerge T,Barg A,Schnaeker EM,et al. Tumor-derived matrix metalloproteinase-1 targets endothelial proteinase-activated receptor 1 promoting endothelial cell activation[J]. Cancer Res,2006;66(15):7766-7774.

[5] Borire A,Covic L,Agarwal A,et al. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells[J]. Cell,2005;120(3):303-313.

[6] Pei D. Matrix metalloproteinases target protease-activated receptors on the tumor cell surface[J]. Cancer cell,2005;7(3):207-208.

[7] Peng CY,Pan SL,Guh JH,et al. The indazole derivative YD-3 inhibits thrombin-induced vascular smooth muscle cell proliferation and attenuates intimal thickening after balloon injury[J]. Thromb Haemost,2004;92(6):1232-1239.

(责任编辑:关蕴良)