维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)05-0503-03

PLCε siRNA 转染对膀胱癌细胞株 T24 侵袭能力的影响

欧俐苹,罗春丽,郭永灿,赵 懿

(重庆医科大学检验系实验诊断教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究磷脂酶 C-ε(Phospholipase C epsilon,PLC ε)siRNA 表达质粒的转染对人膀胱癌细胞系 T24 侵袭转移能力的影响。方法:分别将携有 PLC ε siRNA 基因的真核表达质粒两对 p11-PLC ε 和 p12-PLC ε 载体体外转染 T24 细胞,筛选稳定转染的细胞并扩增培养,用逆转录聚合酶链反应法(RT-PCR)检测 PLC ε mRNA 的表达情况,应用 Transwell 小室侵袭试验、明胶酶谱分析分别研究转染前、后膀胱癌细胞侵袭转移能力的变化,并以空载质粒 HK-A 转染和未转染细胞为对照。结果:RT-PCR 检测显示 p11-PLC ε,p12-PLC ε 转染成功后 T24 细胞 PLC ε mRNA 表达明显比空质粒 HK-A 转染和未转染细胞减弱;p12-PLC ε siRNA 转染细胞穿透侵袭小室滤膜的数目(26.8±5.8)和 p11-PLC ε siRNA 转染细胞穿透侵袭小室滤膜的数目(25.8±6.2)明显少于未转染细胞(34.8±6.9)和 HK-A 转染细胞(33.8±5.7)($P<0.01$);明胶酶谱分析显示转染 p11-PLC ε、p12-PLC ε 均使细胞分泌 MMP-2、MMP-9 明显低于未转染细胞和 HK-A 转染细胞。结论:推测转染外源性 PLC ε siRNA 基因能下调 PLC ε 基因的表达并能抑制膀胱癌细胞侵袭转移。

【关键词】PLC ε;siRNA;质粒;转染;膀胱移行细胞癌

【中国图书分类法分类号】R737 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-11-25

Efects of PLCepsilon siRNA gene transfection on invasive power of human bladder cancer cell lines T24

OU Liping,et al

(*Laboratory Diagnosis Section,Department of Laboratory Medicine,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To study the effects of PLCepsilon siRNA transfection on invasive power of human bladder cancer cell lines T24,and to bring a new method of gene therapy for bladder cancer.*Methods*:An eukaryotic expression vector containing PLCepsilon siRNA was transfected into T24 and positive cell clones were selected and amplified.Expression of PLCepsilon mRNA was detected by RT-PCR.invasive power of T24 were measured before and after transfection by the membrane invasion culture system (Transwell chamber)and gelatin enzymography (including 72 ku typeⅣ collagenase and 92 ku typeⅣcolagenase analyzed).*Results*:the result of RT-PCR display that the T24 transfected with p11-PLCepsilon and p12-PLCepsilon vectors had lower expressing of PLCepsilon mRNA than the control groups T24 transfected with HK-A and T24 without transfection. In the membrane invasion culture system the invasion number of T24 transfected with p12-PLCepsilon (26.8±5.8)and the number of T24 transfected with p11-PLCepsilon(25.8±6.2)are both lower than the the control groups T24 transfected with HK-A(33.8±5.7)and T24 without transfection (34.8±6.9)($P<0.01$);the T24 transfected with p11-PLCepsilon and p12-PLCepsilon vectors had lower gelatin enzymography expressing than the control groups T24 transfected with HK-A and T24 without transfection. *Conclusion*:Transfection of PLCepsilon siRNA might decrease invasive power of bladder cancer cells so as to inhibit the development of tumor.

【Key words】PLCepsilon;siRNA;Plasmid;Transfection;TCCB

膀胱癌是我国为最常见的泌尿系肿瘤,其病理类型以移行细胞癌(Transitional cell carcinoma of bladder,TCCB)为主[1],在膀胱癌的发生发展相关基因中,Ras 基因是最常见之一。现已证实 PLC-ε 是 Ras 蛋白的效应分子并以 GTP-依赖的方式被 Ras 调控[2]。本研究利用 RNA 干扰技术,通过对 TCCB 细胞进行 PLCεsiRNA 表达质粒的转染,观察 PLC-ε 基因及蛋白在 TCCB 细胞中表达的改变,同时观察转染前后对膀胱癌 T24 细胞转移侵袭力的影响,以探讨 PLC-ε 信号通路在调控 TCCB 细胞侵袭转移

作者介绍:欧俐苹(1979-),女,硕士,
主要研究方向:膀胱肿瘤侵袭转移。

维普资讯 http://www.cqvip.com

中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人膀胱癌 T24 细胞购自重庆医科大学传染病研究所；PLCε siRNA 表达质粒由本课题组根据 PLCε mRNA (GeneBank 编号 AF190642)序列，按照 siRNA 设计原则设计构建 PLCε siRNA 两对质粒，分别命名为 p11-PLCε 和 p12-PLCε，质粒载体购自武汉晶赛公司；Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司；质粒抽提纯化试剂盒购自北京 TIANGEN 公司；PLCε 一抗购自 Santa Cruz 公司；RT-PCR 试剂盒购自 Takara 生物技术有限公司；Transwell 小室及基质胶购自 B.D 公司。

1.2 质粒的抽提纯化和基因转染

氯化钙法制备感受态 DH5α，将 p11-PLCε、p12-PLCε 和空载质粒 HK-A 转化 DH5α，取转化菌液，按大量质粒抽提纯化试剂盒说明书步骤，提取并纯化 p11、p12 和空载质粒。*BamHI*+*HindIII* 双酶切后，1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。24 孔板接种 T24 细胞，培养 24h，细胞长满 90%~95% 孔底后按脂质体试剂盒说明书的步骤，分别将 p11、p12 和空载质粒(1μg/μl)导入 T24 细胞，质粒－脂质体复合物转染至 T24 细胞(质粒:脂质体 =1:2)后，37℃，5%CO_2 在无血清、无抗生素的培养液培养 6 h 后换新鲜 1640 培养基继续培养，以 G418 筛选并扩增培养。

1.3 RT-PCR 检测

按 RT-PCR 试剂盒说明书进行，PLCε 上游引物为 5'-CATGGA AGGATAAGCGTTGGT-3'，下游引物为 5'-CCCAAGTCCCGTGTTAAGA -3'，扩增片段为 395bp。β-actin 作内参照，其上游引物为 5-GTGGACATCCGCAAA-3 下游引物为 5'-AAAGGGTGTAACGC AATCAA-3'，扩增片段为 543bp。反应条件均为 94℃预变性 2min，94℃变性 30s，58℃退火 30s，72℃延伸 30s，38 个循环。实验共设立 4 组，分别为转染 p11 组、转染 p12 组、转染空载 HK-A 组以及未处理细胞组，将 4 组 PCR 产物分别经 1.5%琼脂糖凝胶电泳。

1.4 细胞侵袭实验

采用 Transwell 小室体外侵袭实验，8μm 孔径聚碳酸酯微孔滤膜上均匀涂布一层 1∶5 稀释的人工基底膜 Matrigel 约 40μl/室，小室的上室分别加入转染 p11 组、转染 p12 组、转染空载 HK-A 组以及未处理组细胞悬液 200μl，细胞浓度均为 5×10^5/ml，每组细胞设 3 个复孔，测定各组细胞的侵袭力。每孔随机计数 5 个视野(400 ×)，取平均值，以穿膜的肿瘤细胞数目多少作为评价其侵袭力的指标。

1.5 明胶酶谱分析

待转染 p11 组、转染 p12 组、转染空载 HK-A 组以及未处理组 T24 细胞均长满 80%瓶底时，去除含血清的培养液，用不含血清的培养液洗 3 遍后，加入 2ml 不含血清的 1640 培养液，继续培养 4h 后收集培养液并作活细胞计数，将收集的培养液 4℃离心并过滤，将各组细胞条件培养液上样 (按 10^6 个细胞量折算培养上清的电泳上样量) 于 8%SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (含 1mg/ml 的明胶，明胶是Ⅳ型胶原酶底物)，160V 冰浴下恒压电泳 2~3h，电泳后将凝胶于 2.5% Triton-X100 液内 37℃振摇 1h；然后置于酶缓冲液[50mmol/LTris,pH7.5,200mmol/L NaCl,5mmol/L $CaCl_2$,0.02% Brij-35(聚氧乙烯月季醚 -35)]内 37℃孵育 16h；0.5% 考马斯亮蓝染色，脱色至合适，72ku 和 92kuⅣ型胶原酶呈现为蓝色背景下的透明条带，分别位于 72ku 和 92ku 位置处。

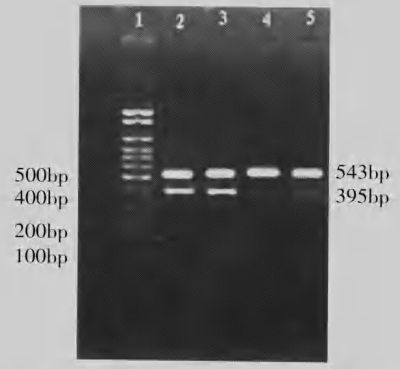
1.6 统计学处理

采用统计软件包 SPSS10.0 方法分析。计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示，采用 t 检验和方差分析，以 $P<0.05$ 为有显著性差异，$P>0.05$ 为差异没有显著性。

2 结 果

2.1 PLCε 基因表达

膀胱癌细胞 PLCεmRNA 的 RT-PCR 扩增产物为 395bp，转染 p11、p12、空载 HK-A 以及未处理组的 PCR 产物电泳结果说明 p11、p12 转染成功后细胞 PLCεmRNA 表达明显较转染空载和未处理组减弱(见图 1)。



1:marker;2:未处理;3:转染空载;4:转染 P11; 5:转染 P12

图 1 转染前后 T24 细胞 PLCεmRNA 的 RT-PCR 电泳结果

2.2 细胞侵袭实验

结果显示，转染 p11、转染 p12 细胞组较未处理组、转染空载 HK-A 组侵袭细胞数均明显减少，差别有统计学意义($P<0.01$)；未处理组与转染 HK-A 组之间侵袭细胞数差别无统计学意义 ($P>0.05$)(见表 1)，表明 PLCεsiRNA 基因转染能够降低膀胱癌 T24 细胞的侵袭性。

维普资讯 http://www.cqvip.com

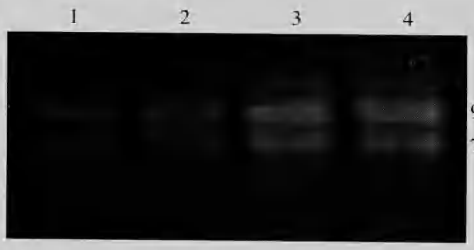
表 1 转染前后 T24 细胞侵袭实验结果（侵袭细胞数/视野）

组别	视野数	侵袭细胞数（$\bar{x}\pm s$）
未转染 T24 组	5	34.8±6.9△
HK-A 转染 T24 组	5	33.8±5.7△
p12 转染 T24 组	5	26.8±5.8*
p11 转染 T24 组	5	25.8±6.2*

注：p11、p12 转染组与未处理组和空载 HK-A 转染组比较，*$P<0.01$；未处理组与空载 HK-A 转染组比较，△$P>0.05$

2.3 明胶酶谱分析

未处理 T24 细胞可分泌 MMP-2 及 MMP-9；空载 HK-A 转染组分泌 MMP-2 及 MMP-9 的水平与未处理组相比未见明显改变；转染 p11、p12 组分泌 MMP-2、MMP-9 水平均明显低于未处理组和空载 HK-A 转染组（见图 2）。



1：转染 P11；2：转染 P12；3：转染空载；4：未处理

图 2 转染前后 T24 细胞分泌 MMP-2，MMP-9

3 讨 论

Ras 基因是 TCCB 相关基因中最常见之一。ras 基因家族包括 N-ras，K-ras 和 H-ras，H-ras 在 TCCB 中通过表达突变的蛋白产物致癌[3-4]。H-ras 编码的细胞膜蛋白是一个鸟嘌呤核苷酸结合蛋白（G 蛋白），在细胞分化增殖中参与信号转导。H-ras 突变后，其蛋白产物保留了 GTP 结合活性，但失去了 GTP 水解活性，故 G 蛋白持续激活，有丝分裂信号持续传入，导致细胞过度增殖。在 Ras 信号通路众多下游效应蛋白中，近年来发现磷脂酶 C 家族中一个新的亚型 PLC-ε，即 PLC210。PLC-ε 除具有与其他 PLC 典型催化结构域（X 和 Y）、C2 结构域外，其羧基端还具有特异性的 Ras 结合（Ras association，RA）结构域和氨基端鸟苷酸交换因子（Guanine nucleotide exchange factor，GEF）结构域-CDC25[2]。RA 结构域中的 RA2 能与富含 GTP 的 Ras 家族成员（如 Ras-，Rho-，and G alpha beta gamma-等）以 Ras-受体相互作用的方式结合，从而激活 PLCε；RasGEF 结构域能够作为 Ras 的调节因子与 Ras 结合，促进 Ras-GTP 的形成，从而激活 Ras。调节结构域（C2）能接受 G 蛋白以及其它因子的调节。PLC-ε 的催化结构域（X 和 Y）能够催化 4.5-二磷酸磷脂酰肌醇（PIP_2）水解为三磷酸肌醇（IP_3）和甘油二酯（DAG），IP_3 生成后从膜上扩散到胞浆中与内质网和肌浆网上的受体结合，因而促进这些钙储存库内 Ca^{2+} 的迅速释放，使胞浆内的 Ca^{2+} 浓度迅速升高。Ca^{2+} 能与胞浆内的蛋白激酶 C（Protein kinase C，PKC）结合并聚集到质膜，在 DAG 和膜磷脂的共同诱导下，激活某种 PKC 亚型（PKCa、PKCβ、PKCδ），故 PKC 为 DAG 下游效应分子。

PKC 是肿瘤细胞转化的重要信号分子，也是介导肿瘤细胞黏附、运动、侵袭及转移的关键因素。已有实验证明[5]，PKC 是促癌剂佛波酯（PMA）的细胞膜内受体，PMA 能充分活化 PKC，并能增加肿瘤转移和侵袭性，PKC 抑制剂在体内外的实验中表现出抗黏附和转移的特性，但 PKC 调节肿瘤细胞侵袭转移机制尚不明确。Koivunen[6]等观察了高分级膀胱癌细胞株（5637、T24）中各种 PKC 抑制剂的效果，发现 PKCα、β 的抑制剂 Go6976 诱导肿瘤细胞的聚集和形成细胞间桥粒及粘附接合的数量增多，因此推测不同 PKC 同工酶的活化平衡改变与膀胱肿瘤发展相关。Foda[7]等在研究 PMA 诱导人脐静脉内皮细胞（Human umbilical vein endothelial cell，HUVEC）72ku MMP-2 的激活机制时发现，PMA 诱导 HUVEC 72ku MMP-2 的激活是呈 PKC 依赖的；同时还发现 PMA 亦刺激 HUVEC 分泌并激活 92ku MMP-9。推测 PMA 激活 HUVEC 的 72ku MMP-2 的过程是一个发生于细胞膜上的事件，至少部分通过 PKC 依赖的机制来介导的。研究发现[8]，人神经胶质瘤的侵袭性主要与 MMP-2 活性有关，而后者则受 PKC 所调控。MMP-2 的活性可被 PKC 特异性抑制剂 calphostin C 所抑制，神经胶质瘤细胞经 calphostin C 处理后，其侵袭性降低，并呈剂量效应关系，同时伴随 MMP-2 活性的降低，而用佛波酯则可使肿瘤细胞的侵袭性和 MMP-2 的活性都相应的增加，表明 PKC 的激活可增强肿瘤细胞的移动性和侵袭性，PKC 活性一旦丧失，肿瘤细胞的转移活性亦随之消失。

PLCε 基因表达是否具有通过减弱 PKC 活性而抑制膀胱肿瘤细胞侵袭转移的作用及其作用的具体机制尚不完全清楚，本研究用脂质体介导的转染方法将 PLCεsiRNA 导入人膀胱癌 T24 细胞，降低 PLCε 基因表达，并且降低 MMP-2、MMP-9 的表达

（下转第 517 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

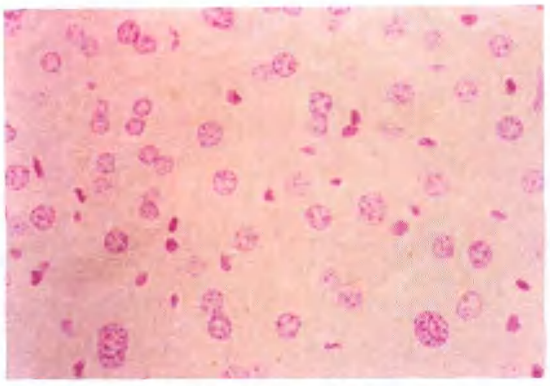


图 1 肝传统法染色,Carnoy 固定,40×

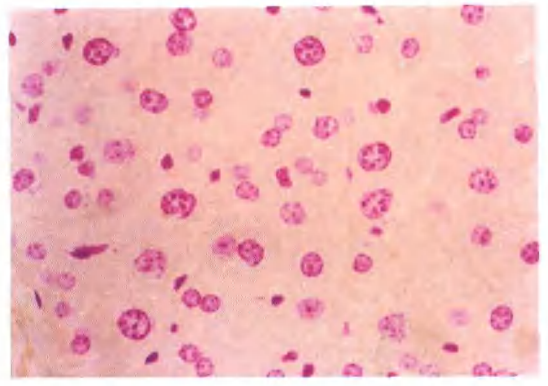


图 2 肝 Lyon's 方法染色,Carnoy 固定,40×

3 讨 论

本实验结果说明 Lyon's Feulgen 标准化方法对脱氧核糖核酸的显示比传统方法更明显,染色更强(图 1~2),其原因可能是组织切片在 Lyon's 标准法中水解更恰当,或雪夫试剂配制效果更好。Lyon's 法更稳定,重复性好,是由于步骤中都有严格的时间和温度规定,而传统法中如盐酸水解 6~8min(室温)及在雪夫试剂中 60~90min(室温)都存在一定范围,所以各个人做出的结果肯定不会完全一致,Lyon's 氏法还对各个试剂有严格的质量要求,我们认为这不太符合实际工作情况,只要做到用分析纯就足以了,本研究全部用的是 A.R 级试剂已足以说明标准化染色方法的优点,我们认为以 Lyon's 方法替代传统方法作为常规 Feulgen 方法更好。

参 考 文 献

[1] Lyon H,Schulte E,Bare M,et al.Standardized staining Methods: Feulgen-Rossenbeck reaction for desoxyribonucleic and periodic acid Schiff(PAS)Procedure[J].Biotechnic & Histochemistry,2002;77(3):121-125.

[2] 凌启波,主编.实用病理特殊染色和组化技术[M].广东:广东高等教育出版社,1989.190-192.

(上接第 505 页)

和活性,抑制膀胱肿瘤细胞侵袭转移能力。研究结果提示 PLCεsiRNA 可能通过使 PLCε 介导的 Ras 信号通路下游信号分子 PKC 失活的途径而达到抑制膀胱癌细胞侵袭转移能力。

PLCε 基因是与肿瘤发生、发展密切相关的一种基因,将其 siRNA 导入到该基因表达高的膀胱癌细胞系中,可明显抑制肿瘤细胞的侵袭力。这一发现为肿瘤的基因治疗提供了新的思路和理论依据。然而对于 PLCε 基因的研究,还有许多问题需要阐明,如 PLCεsiRNA 的具体作用途径及其相互关系;肿瘤中 PLCε 功能失活的基础、表达的调控等,因此 PLCε 的研究前景广阔。

(通讯作者:罗春丽,Tel:023-68485223,E-mail:luochunli79@hotmail.com)

参 考 文 献

[1] 张 睿,张建军,何祖根,等.膀胱癌相关基因研究进展[J].癌症,2003;22(1):104-107.

[2] Chunhua S,Chang-Deng H,Misa M,et al.Regulation of a Novel Human Phospholipase C, PLCe, through Membrane Targeting by Ras[J].The Journal Of Biological Chemistry,2001;276(4):2752-2757.

[3] Knowles MA.The genetics of transitional cell carcinoma:progress and potential clinical application[J].BJU Int,1999;84(4):412-427.

[4] Cordon-cardo C.Molecular alteration in bladder cancer[J].Cancer Sury,1998;32:115-131.

[5] 陈 宏,陈宇英,张振书,等.大肠癌细胞侵袭转移的 PKC 调节机制研究[J].实用癌症杂志,2004;19(4):361-364.

[6] Koivunen J,Aaltonen V,Koskela S,et al.Protein kinase C alpha/beta inhibitor Go6976 promotes formation of cell junctions and inhibits invasion of urinary bladder carcinoma cells[J].Cancer Res,2004;64(16):5693-5701.

[7] Foda HD,George S,Conner C,et al.Activation of human umbilical vein endothelial cell progelatinase A by phorbol myristate acetate:a protein kinase C dependent mech-anism involving a membrane-type matrix metalloproteinase[J].Lab Invest,1996;74(2):538.

[8] Uhm JH,Dooley NP,Villemure JG.Ghoma invasion in vitro:regulation by matrix metaloprotease-2 and protein kinase C[J].Clin Exp Metastasis,1996;14(5):421.