

RhoA 基因沉默对胃癌 MGC-803 细胞增殖和迁移能力的影响

Effect of RhoA Gene Silencing on Proliferation and Migration of Gastric Cancer Cell Line MGC-803

FANG Lei, WU Hai-bin, CHEN Xiao-gang

方 雷¹, 吴海滨², 陈晓岗¹

(1.宁波市第一医院, 浙江 宁波 315010; 2.宁波大学医学院, 浙江 宁波 315211)

摘 要: [目的] 通过沉默 RhoA 基因在胃癌 MGC-803 细胞中的表达, 探讨 RhoA 对细胞生长、细胞周期及肿瘤迁移等方面的作用。[方法] 设计及合成 RhoA 的 siRNA 序列, Lipofectamine™ 2000 转染 MGC-803 细胞。通过 RT-PCR、Western Blot 检测 RhoA 在干扰后的 mRNA 和蛋白的表达情况, 利用流式细胞仪检测细胞周期。CCK-8 增殖实验检测细胞增殖, 划痕愈合实验检测细胞的迁移能力。[结果] RhoA mRNA 和蛋白表达, 实验组较对照组和空白组显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。实验组细胞的生长速度明显减慢, 细胞周期被阻滞在 G₀/G₁ 期, S 期细胞数减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。划痕愈合实验显示, 实验组迁移能力显著下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。[结论] 特异性干扰 RhoA 基因表达可抑制胃癌 MGC-803 细胞的迁移能力, 并抑制肿瘤细胞增殖。RhoA 的 siRNA 序列可能成为治疗胃癌的有效靶点。

关键词: 胃肿瘤; RhoA; siRNA; 细胞增殖

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)02-0103-05

虽然化疗和新辅助化疗在胃癌的治疗中已得到了广泛的应用。但是胃癌的预后仍不十分理想, 尤其是已发生临床转移和肿瘤复发的患者。近年来发现 Rho 蛋白特别是 RhoA 在肿瘤发生、发展中发挥着重要的作用, RhoA 的异常表达可能与恶性肿瘤的增殖、转移有关^[1-3]。本研究通过 RNA 干扰技术沉默胃癌 MGC-803 细胞的 RhoA 基因, 探讨其对胃癌细胞生物学行为的影响, 为胃癌针对 RhoA 靶向的基因治疗提供了实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

MGC-803 细胞由本实验室提供; RPMI 1640 培养液、胰蛋白酶和胎牛血清均购自美国 Gibco 公司; TRIzol 和 Lipofectamine™ 2000 脂质体转染试剂购自美国 Invitrogen 公司; RT-PCR 两步法试剂盒 (北京赛百盛基因技术有限公司), AMV 逆转录试剂盒 (杭州博日); cDNA 合成试剂盒 (日本 TOYOBO 公司);

收稿日期: 2011-07-07; 修回日期 2011-09-30

siRNA 基因片段由珠海英平生物技术有限公司合成; G418 购自美国 Klontech 公司; CCK-8 (上海炎彬化工公司); RhoA 鼠抗人单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; HRP 标记的羊抗鼠二抗购自北京中杉公司; RIPA 蛋白裂解液及 BCA 蛋白定量试剂盒购自江苏碧云天公司; ECL 试剂盒购自美国 Thermo 公司。

1.2 siRNA 设计、合成及转染

用 NCBI 数据库查找人类 RhoA 基因 mRNA 序列 NM-001664, 根据 siRNA 设计原则来设计 RhoA siRNA。正义链为: 5'-TTPTCTAAACTATCACGGCTG-3'; 反义链为: 5'-GCCCTGATAGTATAGAAAAT-3'。阴性对照 siRNA 正义链为: 5'-CCAGAAGAG-CAATCTGTAC-3'; 反义链为: 5'-GTACA-GATTGCTC3TCTGG-3', 均由珠海英平生物技术有限公司合成。MGC-803 细胞培养于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 置于 37℃ 5%CO₂ 培养箱中, 每 2d 传代 1 次, 实验时取对数生长期的细胞。按 1×10⁵ 个/孔将胃癌 MGC-803 接种于 24 孔板中, 当融合率达 70% 时以脂质体法进行转染。转染时分为

3组:转染 pGenesil-1-RhoA-siRNA 载体者为 MGC-803/RhoA-siRNA 组(实验组),转染随机对照载体者为 MGC-803/control 组(对照组),未转染的胃癌 MGC-803 细胞为 MGC-803 组(空白组)。于转染后 48h 进行 RNA 干扰效应的检测。

1.3 半定量 RT-PCR 检测

弃培养液后 PBS 冲洗细胞 3 次,用 TRIzol 法提取总 RNA,通过 cDNA 合成试剂盒反转录合成 cDNA。分别扩增 RhoA 和内参 GAPDH。RhoA 上游引物:5'-CGGGAGCTAGCCAAGATGAAG-3',下游引物:5'-GCTTGCAGAGCAGCTCTCGTA-3',合成产物为 258 bp, GAPDH 上游引物为:5'-GAGTCAACG-GATTTGGTCGT-3',下游引物:5'-GACAAGCTTCC-CGTTCTCAG-3',合成产物为 185bp, PCR 反应条件:95℃预变性 10min, 95℃变性 30s, 55℃退火 30s, 72℃延伸 30s, 共 45 个循环。采用 2%的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物,使用凝胶图像分析系统进行吸光度扫描,用 RhoA 吸光度/GAPDH 吸光度比值作为 mRNA 表达的相对强度。

1.4 Western Blot 检测 RhoA 的表达

弃培养液后 PBS 冲洗细胞 3 次,加入预冷的 RIPA 裂解液 150μl, RIPA 裂解液预先加 PMSF 1.5μl 使其终浓度为 1 mmol/L。操作在冰上进行, 4℃下 10 000r/min(离心半径为 4cm)离心 5min, 取上清液, BCA 法测蛋白浓度后, 99℃变性 10min。取 50μg 蛋白行 10%SDS-PAGE 电泳,电转移印迹到 PVDF 膜上, 5%的脱脂奶粉封闭 2h 后, RhoA 单克隆抗体(1:200)4℃孵育过夜, TBS-T 洗涤,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗(1:5 000)室温孵育 2h, PBS 洗涤,并采用 ECL 法检测。

1.5 流式细胞仪检测细胞周期

0.25%胰蛋白酶消化细胞, 1 000r/min(离心半径为 17cm)离心 5min 去除培养液, PBS 洗涤 1 次,弃上清并收集细胞,用冰 PBS 洗 2 遍, 80%乙醇 4℃过夜, PBS 漂洗 3 次,固定后的细胞用 PBS 洗涤,并重悬于含 0.1mg/ml 碘化丙啶中室温避光染色 30 min, 采用流式细胞仪检测细胞周期。以上实验重复 3 次。

1.6 CCK-8 法检测细胞增殖

收集对数生长期细胞,调整细胞密度每孔达到 1×10^3 , 加入含 10%胎牛血清 DMEM/F12 培养基 200μl, 每组设 5 个复孔, 24h 后加入 CCK-8 验

20μl, 培养箱温育 4h 后在酶标仪上以 490nm 波长测定吸光度值(A 值),以细胞吸光度 A 值平均值为纵坐标,以时间 48、72、96 及 120h 为横坐标绘制生长曲线。

1.7 细胞划痕损伤实验

在对数生长期将上述 3 种细胞分别以 5×10^3 个/孔的密度接种于 6 孔板,待培养的各組细胞生长形成细胞单层后,用移液器滴头沿培养板底部呈“一”字形划痕, PBS 轻柔洗涤,每孔加入 2ml 不含血清的 RPMI 1640 培养液继续培养,于 48h 后观察划痕愈合情况。

1.8 统计学处理

数据由 SPSS 15.0 统计软件处理,结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较应用 *t* 检验和方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RhoA siRNA 抑制 RhoA mRNA 的表达

RT-PCR 检测 RhoA mRNA 表达,与对照组和空白组比较,实验组条带明显变窄,实验组和对照组以及实验组与空白组之间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1、表 1。

表 1 各组 MGC-803 细胞中 RhoA 蛋白/mRNA 的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	RhoA mRNA (RhoA /β-actin)	RhoA 蛋白 (RhoA /β-actin)
①空白组	0.71±0.08	0.76±0.09
②对照组	0.72±0.11	0.77±0.12
③实验组	0.49±0.05	0.52±0.07
t_{3vs1}	4.0391*	3.1168*
t_{3vs2}	3.2969*	3.6458*

*: $P < 0.05$ 。

2.2 siRNA 抑制 RhoA 蛋白的表达

Western Blot 检测显示, RhoA 蛋白表达与对照组和空白组比较,实验组条带明显变窄,其灰度值比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 2、表 1。

2.3 流式细胞仪检测细胞周期

流式细胞仪分析细胞周期,结果显示,在 G_0/G_1 期实验组较对照组和空白组略有增加, S 期略有减少。实验组与对照组、空白组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), M 期细胞无明显变化,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。说明有明显的 S 期阻滞(表 2)。

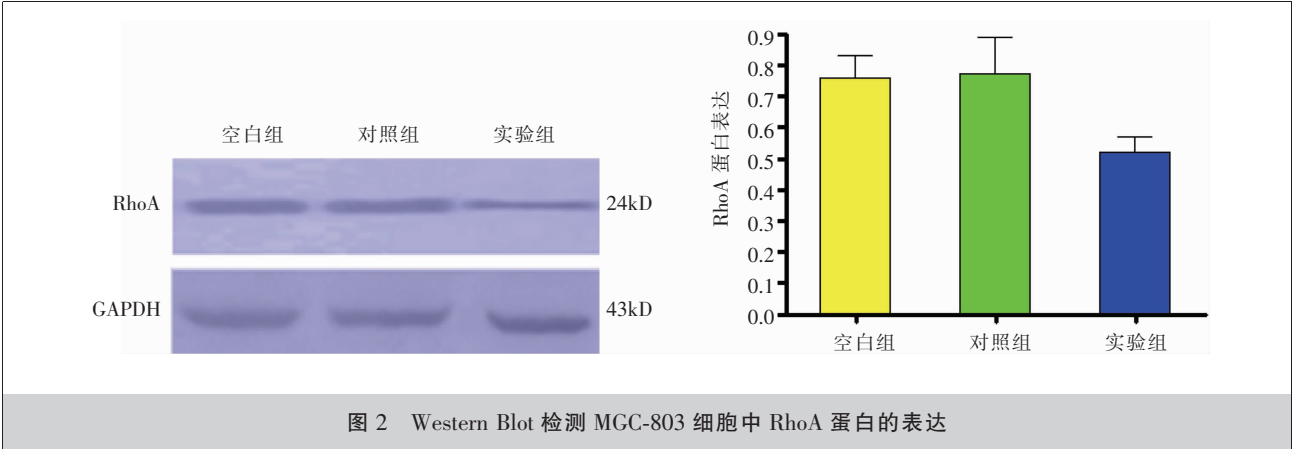
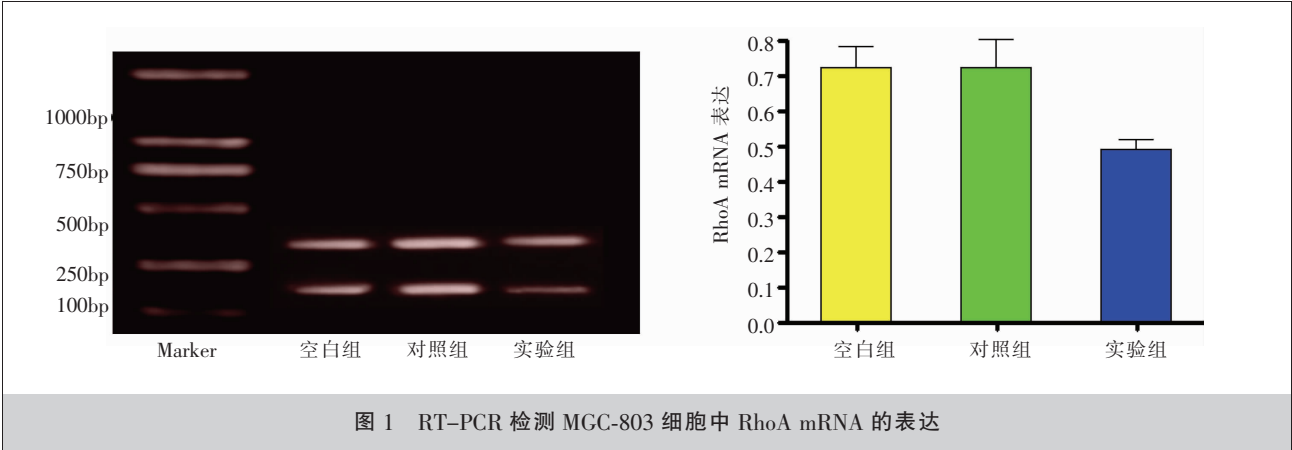


表 2 siRNA 抑制 RhoA 表达对 MGC-803 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	G ₀ / G ₁ 期	S 期	G ₂ / M 期
①空白组	56.4±3.8	35.1±1.3	8.7±0.8
②对照组	56.4±2.6	35.4±2.6	9.4±1.1
③实验组	68.4±3.4	21.9±1.3	10.0±1.2
t_{3vs1}	4.0761*	12.4350*	1.5612
t_{3vs2}	4.8560*	8.0438*	0.6384

*: $P < 0.05$ 。

表 3 490nm 处吸光度($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	48h	72h	96h	120h
①空白组	0.6±0.03	1.6±0.22	2.3±0.23	2.7±0.18
②对照组	0.6±0.07	1.6±0.20	2.3±0.28	2.7±0.19
③实验组	0.6±0.05	1.2±0.17	1.6±0.24	1.9±0.20
t_{3vs1}	0	3.2170	4.7087*	6.6482*
t_{3vs2}	0	3.4074	4.2443*	6.4845*

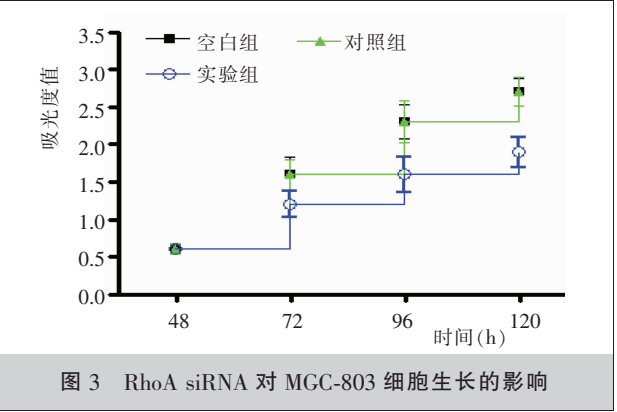
*: $P < 0.05$ 。

2.4 siRNA 对细胞增殖的影响

依 CCK-8 法检测结果绘制的生长曲线显示,实验组较对照组和空白组曲线明显降低(图 3),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 细胞划痕损伤实验结果

48h 后实验组细胞划痕愈合缓慢,而空白组和对照组细胞划痕已基本长满,说明实验组迁移能力显著下降,见图 4。



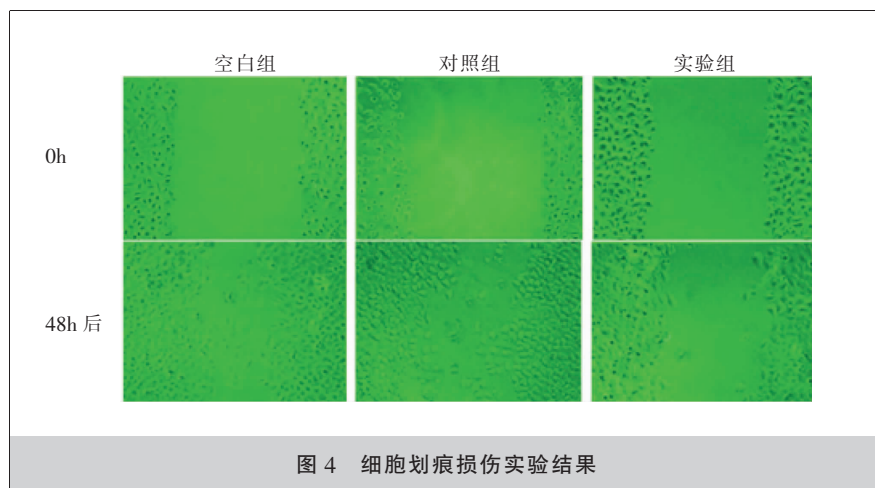


图4 细胞划痕损伤实验结果

3 讨论

Rho 家族是 Ras 超家族小分子 G 结合蛋白的成员之一,是细胞信号转导通路中的重要分子。近些年来研究发现 Rho 在肿瘤发生发展中起着极其重要的作用,其通过调节肌动蛋白细胞骨架重组,进而调节细胞形态、黏附、极性、细胞凋亡、胞质分裂等生物学行为,从而引起肿瘤的侵袭和转移^[4,5]。Rho 亚家族主要包括 RhoA、RhoB 和 RhoC 三个成员。其中 RhoA 基因定位于染色体 3p21.3,全长 582bp,编码包含 193 个氨基酸的 RhoA 蛋白。以前认为 RhoA 蛋白仅在细胞膜和细胞浆中表达,但近些年来研究表明 Rho 蛋白在细胞膜、浆和核均有不同程度表达^[6],而且处于 S 期的细胞 RhoA 蛋白的表达和活性升高,提示 RhoA 活化进入细胞核,可能参与了细胞的有丝分裂。研究显示,肝癌、乳腺癌、肺癌、肾癌、结肠癌等癌组织中 RhoA 蛋白及其 mRNA 表达水平都有明显增高^[7,8]。近年来研究表明胃癌组织中 RhoA 表达明显增高^[9]。Pan 等^[10]对 53 例胃癌组织及相应癌旁组织中的 RhoA 含量进行测定,结果胃癌组织中 RhoA mRNA 的水平显著高于癌旁组织,且 RhoA mRNA 的表达水平在低分化胃癌中高于高分化胃癌。Cai 等^[11]用免疫组化法检测 60 例胃癌组织和 10 例正常胃黏膜中 RhoA 的表达,结果显示胃癌组织中 RhoA 的表达明显高于正常胃黏膜组织。

RhoA 的主要生物学功能是改变细胞的骨架结构,参与肿瘤细胞的黏附、收缩、移动、黏附结合的解除、基质的降解以及对血管和淋巴管系统侵入过

程的调控等^[12],在肿瘤的研究中认为其具有增强肿瘤侵袭和转移作用^[13,14]。Lin 等^[15]在 IL-6 促进胃癌进展的研究中发现,IL-6 通过使丝氨酸位点磷酸化而激活下游信号,使 RhoA 增量表达,活化的 RhoA 使肌动蛋白细胞骨架重排,使胃癌细胞发生迁移。越来越多的证据表明,RhoA 与癌细胞生长调控和迁移侵袭密切相关。为探讨 RhoA 在胃癌细胞迁移中的作用,本研究用脂质体介导 RhoA 转染胃癌 MGC-803 细胞,通过

半定量逆转录聚合酶链反应和免疫蛋白印迹法检测胃癌 MGC-803 细胞 RhoA mRNA 及蛋白质表达水平,以流式细胞技术及划痕试验检测胃癌 MGC-803 细胞体外增殖和迁移能力,结果表明,沉默 RhoA mRNA 及蛋白质表达后实验组细胞的生长速度明显减慢,迁移能力显著下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。RhoA 基因沉默后细胞周期被阻滞在 G₀/G₁ 期。这表明特异性干扰 RhoA 基因表达可抑制胃癌 MGC-803 细胞的迁移能力,并抑制肿瘤细胞增殖。

总之,RhoA 基因不仅与肿瘤细胞的黏附性的改变密切相关,而且在促进肿瘤细胞增殖方面起着重要作用。特异性干扰 RhoA 基因表达可抑制胃癌 MGC-803 细胞的迁移能力,并抑制肿瘤细胞增殖,因此,RhoA 的 siRNA 序列可能成为治疗胃癌的有效靶点。

参考文献:

- [1] Li Y, Chen Y, Tao Y, et al. Fibronectin increases RhoA activity through inhibition of PKA in the human gastric cancer cell line SGC-7901 [J]. Mol Med Report, 2011, 4(1): 65-69.
- [2] Lee YC, Cheng TH, Lee JS, et al. Nobiletin, a citrus flavonoid, suppresses invasion and migration involving FAK/PI3K/Akt and small GTPase signals in human gastric adenocarcinoma AGS cells [J]. Mol Cell Biochem, 2011, 347(1-2): 103-115.
- [3] Li Y, Chen Y, Tao Y, et al. RhoA protein is generally distributed in the nuclei of cancer cells [J]. Oncol Rep, 2010, 24(4): 1005-1009.

- [4] De Smet F, Segura I, De Bock K, et al. Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cell lead the way [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(5):639–649.
- [5] 杨开焰, 陈道瑾, 李小荣, 等. RhoA 基因 shRNA 表达载体的构建及鉴定 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(7):707–708.
- [6] Tao Y, Chen YC, Li YY, et al. Localization and translocation of RhoA protein in the human gastric cancer cell line SGC-7901[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(8):1175–1181.
- [7] 董伟, 窦科峰, 杨薛康, 等. RhoA 基因沉默对肝癌 HepG2 细胞增殖和迁移能力的影响 [J]. *中华消化外科杂志*, 2010, 9(3):216–219.
- [8] Tsumuraya M, Kato H, Miyachi K, et al. Comprehensive analysis of genes involved in the malignancy of gastrointestinal stromal tumors [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(7):2705–2715.
- [9] 田小林, 蒋志庆, 罗庆伟. RhoA 和 Ezrin 蛋白在胃癌组织中的表达及临床意义 [J]. *实用临床医药杂志*, 2011, 15(1):111–114.
- [10] Pan Y, Bi F, Liu N, et al. Expression of seven main Rho family members in gastric carcinoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 315(3):686–691.
- [11] Cai J, Niu X, Chen Y, et al. Emodin-induced generation of reactive oxygen species inhibits RhoA activation to sensitize gastric carcinoma cells to anoikis [J]. *Neoplasia*, 2008, 10(1):41–45.
- [12] 孙玉清, 熊建新, 刘岩, 等. RhoA、Ki-67 的过表达促进胃癌的浸润转移[J]. *黑龙江医药科学*, 2009, 32(6):1–2.
- [13] Liu XP, Wang HB, Yang K, et al. Inhibitory effects of adenovirus mediated tandem expression of RhoA and RhoC shRNAs in HCT116 cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009, 28(1):52.
- [14] Zhao X, Lu L, Pokhriyal, et al. Overexpression of Rho induces preneoplastic transformation of primary mammary epithelial cells[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(2):483–491.
- [15] Lin MT, Lin BR, Chang CC, et al. IL-6 induces AGS gastric cancer cell invasion via activation of the c-Src/RhoA/ROCK signaling pathway [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(12):2600–2608.