

Rac1shRNA 对卵巢癌细胞 Skov3 侵袭能力的影响

王虹^{1,2}, 张菊青², 崔满华¹, 张红梅³

(1. 吉林大学第二医院, 吉林 长春 130041; 2. 北华大学附属医院, 吉林 吉林 132011;

3. 吉林大学中日联医院, 吉林 长春 130033)

摘要: [目的] 通过观察 Rac1shRNA 对卵巢癌细胞 Skov3 侵袭能力的影响。[方法] Rac1shRNA 载体 pGPU6/GFP/Rac1-524 以脂质体 Lipofectamine™ 2000 介导转染卵巢癌细胞株 Skov3, Transwell 侵袭实验检验转染细胞的迁移侵袭能力; 扫描电镜观察转染 Skov3 细胞的超微结构变化。[结果] pGPU6/GFP/Rac1-524 转染组细胞迁移距离最短, 板状伪足消失, 侵袭能力下降, 与 pGPU6/GFP/NC 转染组和未转染组比, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。[结论] Rac1shRNA 载体 pGPU6/GFP/Rac1-524 通过使细胞伪足消失, 可有效抑制卵巢癌细胞 Skov3 的迁移侵袭。

关键词: Rac1; shRNA; Skov3; 侵袭; 卵巢肿瘤

中图分类号: R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)01-0005-04

The Influence of Rac1shRNA on Invasive Ability of Ovarian Cancer Cell Skov3

WANG Hong^{1,2}, ZHANG Ju-qing¹, CUI Man-hua¹, et al.

(1. the Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China; 2. the Affiliated Hospital of Beihua University, Jilin 132011, China)

Abstract: [Purpose] To observe the influence of Rac1shRNA on invasive ability of ovarian cancer cell Skov3. [Methods] Rac1shRNA vector pGPU6/GFP/Rac1-524 mediated by liposome Lipofectamine™ 2000 was transfected to human ovarian cancer cell lines Skov3. Migration and invasion ability of transfected cell were detected by Transwell invasion test, and ultrastructural changes of Skov3 cells were observed by scanning electron microscopy. [Results] In pGPU6/GFP/Rac1-524 transfection group, the shortest migration distance of transfected cell, lamellipodia disappeared, invasive ability of transfected cell declined were found, those were significantly different between pGPU6/GFP/NC transfection group and the untransfection group. [Conclusion] Rac1shRNA vector pGPU6/GFP/Rac1-524 might effectively inhibit the migration and invasion of ovarian cancer cell Skov3 by making the cell pseudopod disappeared,

Subject words: Rac1; shRNA; Skov3; invasion; ovarian neoplasms

卵巢因其位于盆腔深部, 致使卵巢癌发病隐匿, 易转移, 因此大部分患者在确诊时已发生转移。转移是卵巢癌最重要的特点, 也是死亡的主要原因。研究发现, Rho GTPases 在多种恶性肿瘤中高表达, 参与肿瘤细胞的侵袭和转移, 调控细胞骨架、细胞与基质的粘附^[1]。在其超家族成员中, Rac1 诱导质膜突起形成板层状伪足, Cdc42 诱导丝状伪足的形成。板层状伪足与周围基质粘附连接, 形成新的细胞向前运动

的锚着点, 丝状伪足有助于细胞适应周围环境、确定细胞迁移的方向^[2]。细胞伪足的形成和细胞形态的改变是肿瘤细胞侵袭和转移的起始步骤^[3]。为此, 本文构建、筛选有效的 Rac1 RNA 干扰载体, 以 Rac1 为切入点, 应用 RNA 干扰技术, 将其转染卵巢癌细胞株 Skov3, 观察其对卵巢癌细胞侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

Rac1shRNA 载体 pGPU6/GFP/Rac1-524 由本实

基金项目: 国家自然科学基金 (30973187)

通讯作者: 崔满华, 教授, 主任医师, 博士; 吉林大学第二医院, 吉林省长春市自强街 218 号 (130041); E-mail: cuimanhua@126.com.

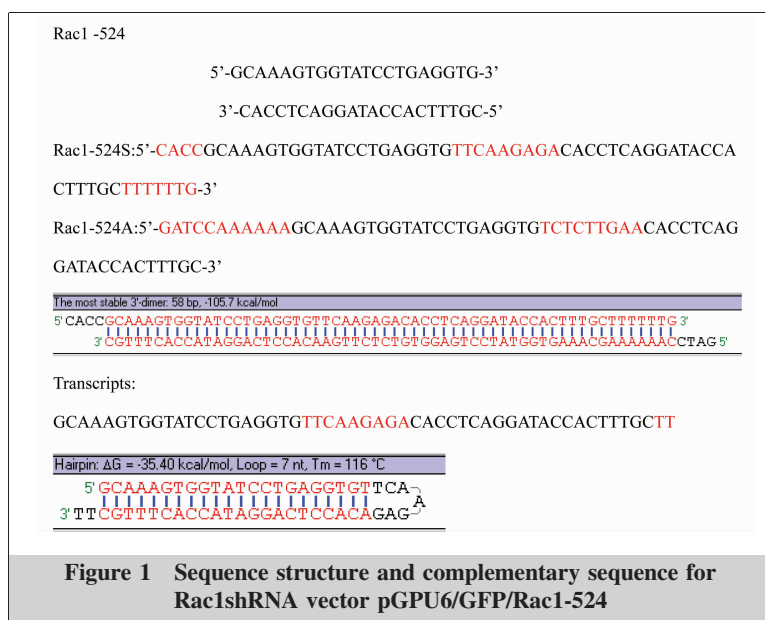
收稿日期: 2012-07-06; **修回日期:** 2012-08-30

实验室构建并筛选、DMEM 培养基 (Invitrogen 公司)、胎牛血清 (Hyclon 公司)、质粒小量提取试剂盒 (Axygen 公司)、胰蛋白酶 (GIBCO 公司)、脂质体 Lipofectamine™2000 (Invitrogen 公司)、Anti-human-Rac1 (Ebioscience 公司)、Anti-human β -actin (Ebioscience 公司)、Millicell (Millipore 公司)、免疫组化显色试剂盒 (福州迈新生物技术开发有限公司)、全蛋白提取试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司)、激光共聚焦电子显微镜 (Olympus, 日本)、倒置荧光显微镜 (Olympus, 日本)、NanoDrop ND-2000 超微量核酸蛋白测定仪 (NanoDrop, 美国)、HERAcell CO₂ 培养箱 (Thermo Scientific, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 Rac1shRNA 载体构建及筛选

Rac1shRNA 载体 pGPU6/GFP/Rac1-524 由本实验室构建并筛选, 附序列结构图及其互补序列 (Figure 1):



1.2.2 Rac1shRNA 载体 pGPU6/GFP/Rac1-524 转染 Skov3 卵巢癌细胞株

转染前 1d, 0.25% 胰蛋白酶消化、收集 Skov3 细胞, 取 3×10^5 个细胞接种于 6 孔培养板中, 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养过夜, 使细胞达 80% 融合时转染 Rac1shRNA 载体 pGPU6/GFP/Rac1-524。取 2μg 质粒 DNA, 加无血清且不含抗生素的培养基至 250ml; 取脂质体 Lipofectamine™ 2000 5ml 加入无血清且不含抗生素的培养基至 250ml, 将质粒稀释液和脂质体稀释液混合, 室温孵育 20min, 将此混和物加到已

加无血清且不含抗生素的培养基的细胞上, 缓慢混和。37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 24h, 分别收集 Skov3 卵巢癌细胞, 进行后续实验。Skov3 卵巢癌细胞以转染 pGPU6/GFP/NC 作为对照组。

1.2.3 重组质粒转染 Skov3 细胞的 Transwell 侵袭实验

0.25% 胰蛋白酶消化、Rac1shRNA 载体 pGPU6/GFP/Rac1-524 的 Skov3 细胞, 重悬于 2% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 取 200ml 含 5×10^4 个细胞的细胞悬液接种于 Transwell 的 Matrigel 上室, 下室加 100ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 4~6h 时终止培养, 激光共聚焦显微镜下观察细胞侵袭情况。

1.2.4 扫描电镜观察重组质粒转染 Skov3 细胞的超微结构

0.25% 的胰酶消化细胞, 计数, 调整细胞浓度, 将无菌盖玻片放在 6 孔板中, 滴加细胞悬液, 使每孔细胞数为 3×10^5 个, 使细胞均匀分布于玻片上, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养、细胞固定、脱水置换乙醇、样品的干燥、镀膜。

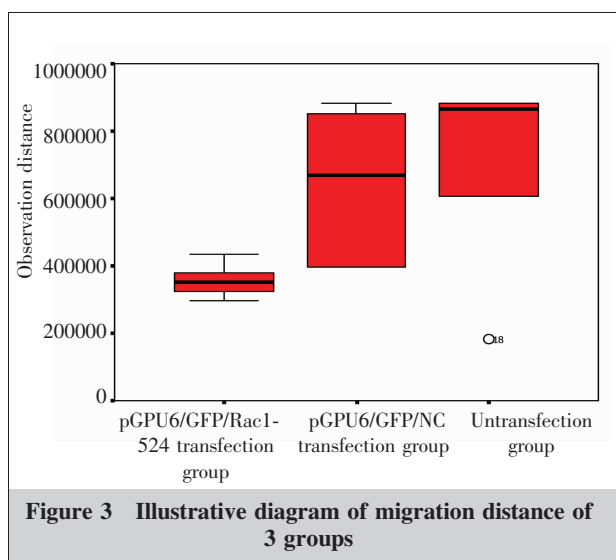
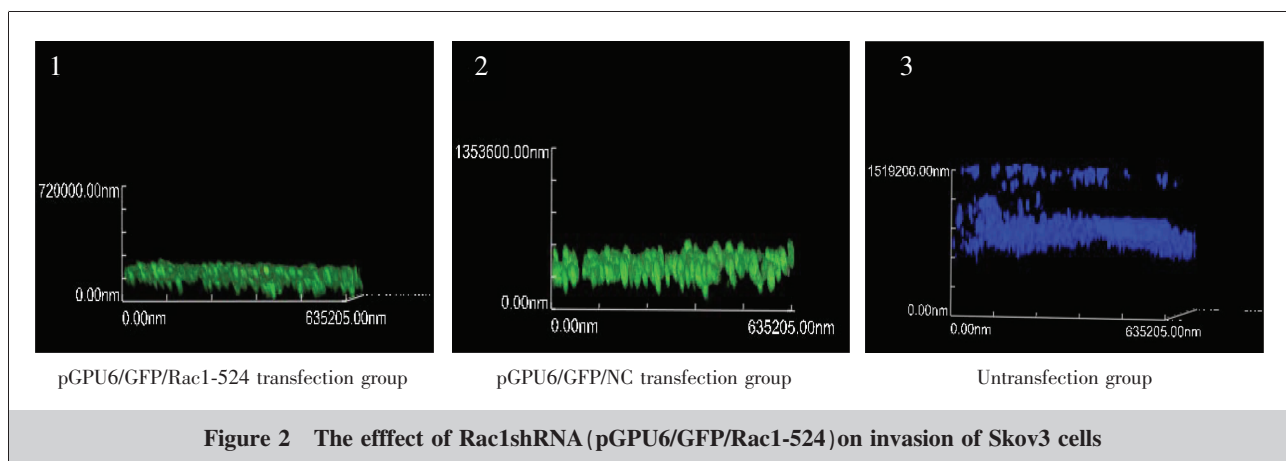
1.3 统计学处理

所有数据用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。显著性检验采用 SPSS13.0 软件, 多组间差异用方差分析或秩和检验进行统计学检验。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Rac1 载体 pGPU6/GFP/Rac1-524 对 Skov3 细胞 Transwell 侵袭的影响

Rac1shRNA 转染 Skov3 细胞 24h 后, 收集细胞, 进行肿瘤细胞 Transwell 侵袭实验, 激光共聚焦显微镜下观察、测算。结果显示, 转染组的细胞发绿色荧光, 在各转染组中, pGPU6/GFP/Rac1-524 转染组荧光显示的条带宽度 (迁移距离) 明显小于转染 pGPU6/GFP/NC 组及未转染组 (Figure 2)。pGPU6/GFP/Rac1-524 转染组与 pGPU6/GFP/NC 转染组及未转染组经过统计学分析, 差异具有显著性 (P<0.05), 而 pGPU6/GFP/NC 转染组与未转染组经过统计学分析, 差异无显著性 (P>0.05) (Figure 3)。



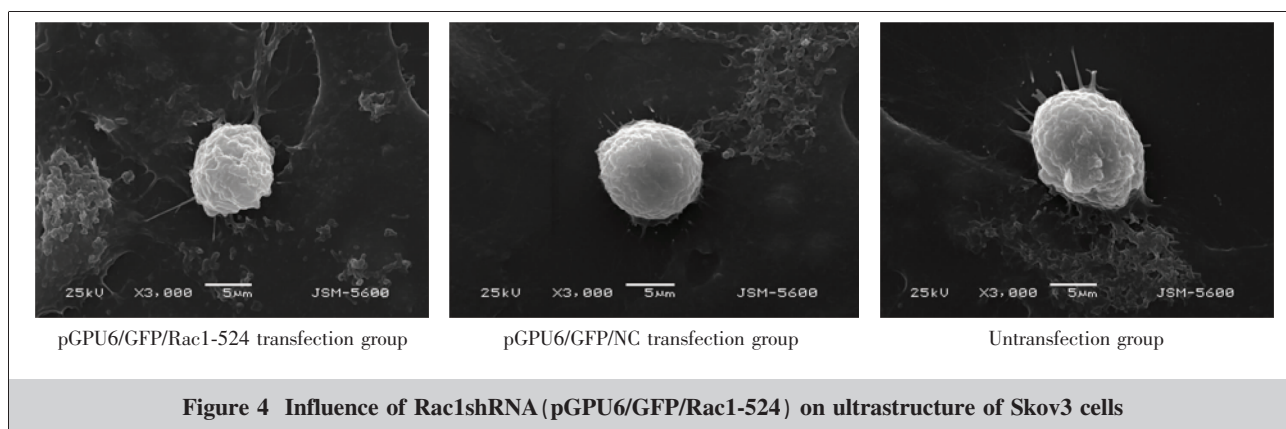
2.2 Rac1shRNA 对 Skov3 细胞超微结构的影响

扫描电子显微镜下观察, 未转染组 Skov3 细胞近圆形, 体积较大, 表面散在一定数量的丝状伪足及少量板状伪足; 转染 pGPU6/GFP/NC 组 Skov3 细胞略小, 形态与未转染组细胞相近, 表面散在的丝

状伪足较未转染组小而少, 板状伪足少见或消失; 而 Rac1 干扰 RNA 转染组 Skov3 细胞细胞体积较前述两组明显缩小, 呈小圆形, 表面未见丝状伪足, 板状伪足少见或消失 (Figure 4)。

3 讨 论

肿瘤的生长有赖于肿瘤细胞的生存、生长和增殖, 恶性肿瘤的最主要特征是侵袭、迁移、复发。癌细胞的侵袭、迁移过程不仅包括肿瘤细胞间、肿瘤细胞与其周围的基质间的相互作用, 还涉及许多生物分子间的相互作用, 肿瘤细胞迁移是由细胞伸出伪足并与周围基质粘附而启动的, 在此过程中, 小 G 蛋白 Rho GTPases 尤其是 Rac1 参与调控细胞板状伪足的形成, 诱导质膜突起形成板状伪足, Cdc42 诱导丝状伪足的形成。大量研究表明, Rac1 具有 GTPase 活性, Rac1 蛋白与 GDP 结合时处于失活状态, 与 GTP 结合时处于激活状态, Rac1 功能的发挥依赖于激活和失活两种活性形式间的转换^[4], 其功能



包括调节细胞骨架重组,调节蛋白质激酶活力,促进板状伪足形成,促进细胞运动与迁移,促进血管生成的作用,抑制细胞凋亡等。

对于肿瘤迁移和侵袭的研究方法除了通过扫描电镜下观察伪足的超微结构外,还可对 Rac1 干扰载体转染卵巢癌细胞 Skov3 进行 Transwell 侵袭实验。

Transwell 是一类有通透性的杯状装置,其外形为一个可放置在孔板里的小杯子,杯子底层为具有通透性的膜,此膜带有微孔,孔径大小为 0.1~12.0 μm ,膜一般常用的是聚碳酸酯膜。将 Transwell 小室放入培养板中,Transwell 小室内称为上室,培养板内称为下室,上室内盛上层培养液,下室内盛下层培养液,上下层培养液以聚碳酸酯膜相隔,将细胞种植在上室内,由于聚碳酸酯膜有通透性,下层的培养液中的成分可以影响上室内细胞,从而可以研究下层培养液中的成分对细胞的生长及运动影响。

由于本实验构建的干扰载体(基因沉默)携带报告基因 GFP(生物发光蛋白),利用紫外激发后就可自发地发射荧光。故本实验利用激光共聚焦显微镜下观察细胞下室内迁移距离,间接反映肿瘤细胞侵袭能力。对 Rac1 干扰载体转染卵巢癌细胞 Skov3 进行 Transwell 侵袭实验,在激光共聚焦显微镜下观察,结果显示:经过转染的 Skov3 荧光条带宽度较对照组明显变窄,表明 Rac1shRNA 转染 Skov3 细胞后,细胞迁移距离最短,迁移能力被抑制;在扫描电镜下观察发现,经过 Rac1 干扰载体转染后,Skov3 细胞体积明显缩小,呈小圆形,膜皱褶较稀疏,板状伪足少见或消失,表面丝状伪足减少,说明 Rac1 沉默抑制了伪足的形成,降低了肿瘤细胞的侵袭能力。两种观察结果相符,进一步证实 Rac1 沉默通过控制伪足的形成而导致肿瘤细胞侵袭能力下降。这一结果与 Collins 等^[5]报道相一致。但 Collins 等应用的是 siRNA,siRNA 是体外制备的,对 Rac1 的“敲低”作用是瞬时的,本文应用的 shRNA 是通过载体将发夹结构 RNA 运送到细胞,在 III 型 RNA 聚合酶作用下表达 shRNA,shRNA 的发卡结构可被细胞机制切割成 siRNA,然后 siRNA 结合到 RNA 诱导沉默复合物上(RNA-induced silencing complex, RISC),该复合物能够结合到目的 mRNAs 并将其降解。该载体中的 U6 启动子确保 shRNA 总是表达;并使 shRNA 传递到子代细胞中去,从而使基因的沉默

可被遗传^[6]。因此本文所构建的 Rac1 干扰载体 pGPU6/GFP/Rac1-524 可持久“敲低”,有利于卵巢癌细胞侵袭机制的更进一步研究及卵巢癌基因治疗提供更多的治疗靶点。

在肿瘤组织中肿瘤细胞的迁移导致肿瘤从发源地向其他部位的播散转移。肿瘤细胞之所以能够迁移,除了受增殖、分化调控以外,细胞运动能力的改变、粘附性丧失、细胞极性改变也是其根本原因。有学者^[7]提出了迁移的肿瘤干细胞的学说,认为并证明肿瘤干细胞除具备干细胞标志外,还具备了迁移行为相关的分子标志。RhoGTP 酶超家族尤其是 Rac1 在肿瘤细胞的侵袭、转移过程中起关键作用的调控因子,它不仅参与细胞伪足的形成、细胞形态的改变,而且还参与细胞与周围基质的粘附、细胞骨架的重组,当 Rac1 基因沉默时,其板状伪足减少消失、细胞迁移侵袭功能减弱、丧失。

总之,肿瘤细胞的迁移侵袭需要在复杂的微环境中进行,而这种迁移结构基础是伪足,迁移过程需要相关因子调控。因此,我们在成功构建并筛选出 Rac1 RNA 干扰载体基础上,证实 Rac1 可影响卵巢癌细胞 Skov3 的迁移和侵袭,沉默 Rac1 可阻断 Skov3 细胞的侵袭,拟进一步对 Rac1 对卵巢癌细胞 Skov3 迁移与侵袭的机制进行研究,为卵巢癌的基因治疗另辟一条新的途径。

参考文献:

- [1] Behlke MA. Progress towards in vivo use of siRNAs[J]. Mol Ther, 2006, 13(4):644-670.
- [2] Zhang Y, Han G, Fan B, et al. Green tea epigallocatechin-3-gallate down regulates VASP expression and inhibits breast cancer cell migration and invasion by attenuating Rac1 activity[J]. Eur J Pharmacol, 2009, 606(1-3):172-179.
- [3] Wang Y, Dong H, Zhu M, et al. Icariin exerts negative effects on human gastric cancer cell invasion and migration by vasodilator-stimulated phosphoprotein via Rac1 pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 635(1-3):40-48.
- [4] Côté JF, Vuori K. GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways [J]. Trends Cell Biol, 2007, 17(8):383-393.
- [5] Collins CS, Vielh P, Camonis J, et al. Mutation status of genes encoding RhoA, Rac1 and Cdc42 GTPases in a panel of invasive human colorectal and breast tumors[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2001, 127(12):733-738.
- [6] Bosco EE, Mulloy JC, Zheng Y. Rac1 GTPase: a “Rac” of all trades[J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(3):370-374.
- [7] Wang L, Kuang L, Pan X, et al. Isoalvaxanthone inhibits colon cancer cell proliferation, migration and invasion through inactivating Rac1 and AP-1 [J]. Int J Cancer, 2010, 127(5):1220-1229.