

· 论 著 ·

RNA 干扰 Slug 基因表达抑制胰腺癌侵袭转移的实验研究*

柳湘洁¹, 宋彩霞², 张群声³, 王启全³

(1. 贵州省电力医院干医科, 贵阳 550002; 2. 山东省胶南市人民医院内科 266400;

3. 海南省海口市人民医院 消化内科 517010)

摘要:目的 探讨 RNA 干扰 Slug 基因表达对胰腺癌转移的抑制作用。方法 用脂质体转染法将表达 siRNA-Slug 的真核表达载体 pGenesil-1-Slug-siRNA (pSlug-siRNA) 和空载体 pGenesil-1-Neg-siRNA (pNeg-siRNA) 导入 PANC-1 细胞, G418 筛选阳性细胞, 获得稳定转染的阳性克隆。观察 siRNA-Slug 对 Slug 表达的沉默及对胰腺癌细胞体外侵袭转移的抑制作用, 采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测不同处理组细胞中 Slug mRNA 的表达水平, Western-blot 测定蛋白表达水平。建立不同组裸鼠原位胰腺癌模型, 观察 Slug 沉默对裸鼠原位胰腺癌转移的抑制作用。结果 pSlug-siRNA 组细胞内 Slug mRNA 及 Slug 蛋白的表达被有效沉默。重组细胞基底膜(Matrigel)侵袭实验显示, pSlug-siRNA 组、空白对照组、pNeg-siRNA 组穿透基底膜细胞数分别为(35±10)、(228±71)、(219±72)个/高倍镜(×200), pSlug-siRNA 组明显低于空白对照组和 pNeg-siRNA 组, 差异分别有统计学意义($P<0.05$)。裸鼠体内实验表明, pSlug-siRNA 组的肿瘤转移结节、肝脏转移结节、腹水明显减少。结论 RNA 干扰 Slug 基因表达对胰腺癌细胞侵袭转移有抑制作用, Slug 可能成为胰腺癌基因治疗的新靶点。

关键词:胰腺肿瘤; Slug; RNA 干扰; 转染; 肿瘤转移**中图分类号:** R735.9; R73-37**文献标识码:** A**文章编号:** 1671-8348(2010)05-0513-03

Experimental study of inhibitory effects of anti-Slug on invasion and migration of pancreatic carcinoma cells*

LIU Xiang-jie¹, SONG Cai-xia², ZHANG Qun-sheng³, et al.

(1. Department of Gastroenterology, Guizhou Electric Power Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China;

2. Department of Internal Medicine, Jiaonan Municipal People's Hospital, Jiaonan, Shandong 266400, China;

3. Department of Gastroenterology, Haikou Municipal People's Hospital, Haikou, Hainan 517010, China)

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory effects of slug-a zinc finger transcription factor anti-sense plasmid on the invasion of pancreatic cancer cell lines in vitro. **Methods** pGenesil-1-Slug-siRNA (pSlug-siRNA) and pGenesil-1-Neg-siRNA (pNeg-siRNA) were transfected into PANC-1 cells by Lipofectamine 2000 methods, stable transfected clony was chosen through G418. PANC-1 cells were divided into three groups; transfected pSlug-siRNA, transfected pNeg-siRNA and control group without transfection. The inhibitory effects of anti-sense Slug were also detected by Transwell motility assay and Matrigel invasion assay. RT-PCR and Western-blot were used to observe slug protein and mRNA in cells in vitro and in vivo. **Results** Slug was inhibited in PANC-1 cells in pSlug-siRNA groups. The invasion activity (35±10), (219±72) and (228±71) of antisense Slug transfectant cells were significantly decreased compared with those of control cells ($P<0.05$) respectively. The number of tumour nodules, metastasis nodules in liver was less than that of controls, and less abdominal dropsy was seen in pSlug-siRNA groups. **Conclusion** Slug is possibly a potential target for cancer gene therapy blocking invasion and metastasis in human pancreatic cancer.

Key words: pancreatic carcinoma; slug; transfection; metastasis

胰腺癌具有隐匿性和高度侵袭性特点, 因此早期即可发生转移。传统的治疗方法效果差, 且不能控制胰腺癌肿瘤的生长和浸润转移, 也不能显著延长患者的中位生存时间, 因此需要探索新的胰腺癌治疗方法, 而基因治疗被寄予厚望。

多个研究报道, Slug 基因在多种恶性肿瘤中存在明显上调, Slug 上调的肿瘤容易出现远处转移、较深的肿瘤浸润深度和较差的预后^[1-7]。Hotz 等^[8]新近发现, 胰腺癌组织及高转移潜能的胰腺癌细胞株存在 Slug 的明显上调。本研究推测干扰 Slug 能抗胰腺癌转移作用。基于上述理论, 本课题旨在研究 Slug 干扰对胰腺癌侵袭、转移的影响, 为抗胰腺癌转移提供新的基因靶点。

1 材料与方法

1.1 试剂

 RPMI1640 购于 Hyclon 公司, 小牛血清购于杭州

四季青公司, 胰酶为国产。质粒提取试剂盒购于 AXYGEn, 连接试剂盒 RNA 提取试剂、cDNA 合成及 PCR 扩增试剂、G3PDH 购于 TaKaRa; Lipofectamine 购于 INVITROGEN, 质粒提取试剂盒购于 AXYGEn, Millicell(小室)由 MilliPore 公司生产, Matrigel 和 6 孔板购于美国 BD 公司。Slug-shRNA-1 和 shRNA-1 质粒由海口市人民医院王齐全教授惠送, 兔抗人多克隆抗体 Slug 购于 SANTACRAUZ 公司。

1.2 细胞株和裸鼠

 PANC-1 胰腺癌细胞株购于中国科学院上海生物研究所细胞库, 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养, 细胞培养条件为 37℃ 恒温, 饱和湿度为 5% CO₂, 指数生长的细胞为实验对象。取 4 周龄健康纯种 BALB/c-nu/nu 雌性裸鼠, 体质量 18~22 g, 在海南医学院动物实验中心 SPF 级饲养, 称重, 编号。实验对象共分为 3 个

* 基金项目: 海南省自然科学基金资助(809043)。

组:pSlug-siRNA 组、空白对照组和 pNeg-siRNA 组。

1.3 方法

1.3.1 基因转染及稳定表达细胞株的筛选 PANC-1 细胞在含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。用 0.25% 的胰酶消化细胞后, 按每孔 4×10^4 个细胞均匀加入 96 孔板中, 培养至细胞 85%~90% 汇合后, 分别转染 pSlug-siRNA 和 pNeg-siRNA 质粒, 具体操作按照脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 说明书进行。转染 24 h 后将细胞以 1:10 比例传代, 次日开始用含有 500 μ g/mL G418 的培养基进行筛选培养, 每 3 天更换一次培养基, 连续筛选 3 周, 然后将获得的细胞克隆, 扩大培养。

1.3.2 RT-PCR 测定 Slug-shRNA-1 作用 PANC-1 细胞后 Slug mRNA 表达 按 TRizol 试剂盒 (Invitrogen 公司) 说明书操作提取稳定转染 pSlug-siRNA、pNeg-siRNA 的细胞和空白对照组细胞总 RNA, 取 1 μ g RNA 模按 RT 试剂盒说明书反转录得到 cDNA。引物序列 Slug (156 bp), R: 5'-GCA GAC GAC GGG TCA GAT-3', F: 5'-GAC TGA CCC GTC GTG ACG-3'; 反应条件: 50 °C 30 min, 94 °C 2 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 72 °C 延伸 7 min, 28 个循环。取 5 μ L 反应产物在含 EB 的 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 用 SYNGENE 型凝胶成像系统照像, 以目的基因条带和内参 G3PDH 条带扫描峰下面积之比作为目的基因的相对表达量。试验重复 3 次, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.3.3 Western-blot 测定 Slug 蛋白表达 提取细胞总蛋白进行 Western-blot 检测: 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离胶浓度为 12%, 积层胶浓度为 5%, 上样量为 15 μ g/L; SDS 电泳: 恒流, 每块板 20~40 mA, 电泳时间约 2 h; 转膜: 恒流, 每张膜 42 mA, 时间 3.5 h。

1.3.4 体外侵袭实验 将 matrigel 按每孔 40 μ L 均匀地铺在 millicell 膜上, 37 °C 成胶 30 min, 置紫外灯照射过夜, 实验前再次成胶 30 min。待培养的肿瘤细胞达 80% 饱和度时, 消化、计数, 取不同处理组细胞 2.0×10^4 个, 分别接种到成胶的 millicell 内, 将 millicell 小室置于 24 孔板内, 用含 10% BS 的 RPMI1640 培养液培养 48 h。培养 48 h 后, 取出 millicell 用棉头擦掉 matrigel, 少量磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 次, 95% 的乙醇固定 15 min, HE 染色, 揭下 millicell 膜反贴在载玻片上。结果判定: 在 200 倍光镜下, 每个滤膜分别计数 5 个视野的穿膜细胞数, 并计算每个视野的平均穿膜细胞数。

1.3.5 建立模型 取处于对数生长期的 3 个组细胞, 经 0.25% 胰蛋白酶消化, 离心去上清液后用 PBS 重悬细胞, 以 MTT 测定细胞活力在 95% 以上, 调整细胞浓度为 5×10^6 /mL。用带有 6 号针头的注射器吸取 100 μ L 细胞悬液, 接种于裸鼠右背皮下, 常规饲养。待 3 周后肿瘤形成并长至一定体积时, 无菌条件下切取肿瘤组织, 剪成 10 mm³ 大小的组织块, 生理盐水漂洗后接种在裸鼠脾窝或胰腺表面, 固定。每只 3 块, 观察 8 周, 每组 10 只。

1.3.6 观察指标 观察裸鼠的一般情况, 摄食, 活动能力。8 周后 CO₂ 吸入法处死裸鼠, 观察腹腔肿瘤的转移情况以及肿瘤的生长情况。

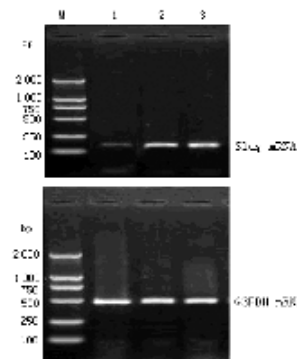
1.4 统计学方法 应用 SPSS10.10 软件进行统计学分析, 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 稳定转染后细胞中 Slug mRNA 表达的变化 空白对照

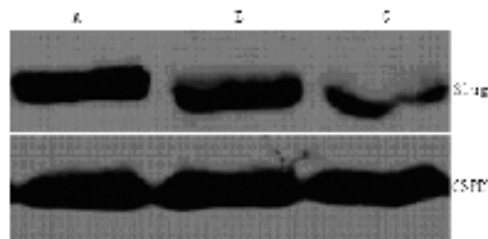
组、pNeg-siRNA、pSlug-siRNA 组细胞 Slug mRNA 表达水平分别为 0.826 ± 0.040 、 0.812 ± 0.042 、 0.147 ± 0.010 , 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明 pSlug-siRNA 组细胞 Slug mRNA 表达被有效沉默, 见图 1。

2.2 Western-blot 检测 空白对照、pNeg-siRNA、pSlug-siRNA 组细胞 Slug 蛋白表达水平分别为 0.742 ± 0.035 、 0.710 ± 0.038 、 0.103 ± 0.000 , 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明 pSlug-siRNA 组细胞 Slug 表达被有效沉默 (图 2)。



M: 对照物; 1. pSlug-siRNA 组; 2. 空白对照组; 3. pNeg-siRNA 组。

图 1 稳定转染后不同组细胞中 Slug mRNA 表达的变化



A: 空白对照组; B: pNeg-siRNA; C: pSlug-siRNA。

图 2 Western-blot 检测 Slug 表达

2.3 细胞侵袭实验检测 pSlug-siRNA 组穿透基底膜细胞数 (35 ± 10) 明显少于空白对照组穿膜细胞数 (228 ± 71) 及 pNeg-siRNA 组穿膜细胞数 (219 ± 72), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 空白对照组穿膜细胞数与 pNeg-siRNA 组穿膜细胞数差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3。

2.4 Slug 干扰抑制腹腔种植瘤生长和转移 3 个组裸鼠建立自发转移模型后 2 周, 可以在裸鼠腹部逐渐扣及肿块, 开始时肿块小、约 1 mm 大小, 质地硬, 活动度大。随着时间延长, pNeg-siRNA 组和空白对照组裸鼠腹部肿块逐渐增大增多, 部分肿块融合成块而固定不动, 向腹腔外突出。从第 5 周开始, 腹腔逐渐出现腹水, 并逐渐增多, 晚期表现为大量腹水。第 8 周开始, 裸鼠出现摄食减少、进行性消瘦、行动迟缓、反应迟钝及嗜睡的表现。相对而言, pSlug-siRNA 组裸鼠腹部肿块增长速度缓于空白对照组和 pNeg-siRNA 组, 腹部触摸肿块数目较少, 融合肿块较少, 部分裸鼠处死时没有出现腹水, 消瘦程度也较轻。开腹后可见 pNeg-siRNA 组有 4 只裸鼠发生肝转移, 空白对照组有 3 只裸鼠发生肝转移, pSlug-siRNA 组裸鼠无肝转移发生。在腹膜、网膜、肠系膜、肠管、胃壁上有大小不一的灰白色结节, 质硬, 小于 2 mm 的结节为圆形, 大于 3 mm 的结节形状不规则, 或呈融合状, 与周围的组织器官浸润粘连固定, 并可见腹水, 量不等。3 组裸鼠腹腔种植瘤的数目 (图 4), pSlug-siRNA 组裸鼠腹腔种植瘤数目明显少于 pNeg-siRNA 组和空

白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 pNeg-siRNA 组和空白对照组裸鼠腹腔种植瘤数目差异无统计学意义($P > 0.05$)。3 个组裸鼠腹腔种植瘤的腹部外观、肝脏标本、肝转移及消化道标本(封 2 图 5~7,封 3 图 8~9)。3 个组裸鼠原位移植瘤重量比较,见图 10。

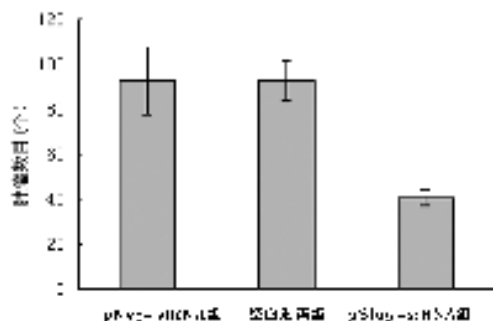


图 4 3 个组裸鼠自发转移型腹腔种植瘤数目对比

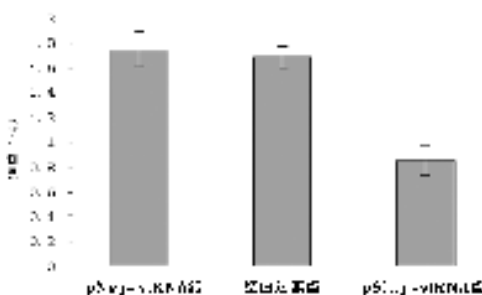


图 10 3 个组裸鼠原位移植瘤重量对比

3 讨论

胰腺癌具有隐匿性和高度侵袭性特点,因此早期即可发生转移,而胰腺癌早期症状不典型,确诊时大多已处于晚期,且大多数患者是外科手术不能治愈的,3 年生存率不足 10%,5 年生存率低于 5%,迄今为止,胰腺癌仍然是临床治疗最为困难的消化道恶性肿瘤之一。胰腺癌对目前使用的化疗和放疗等治疗方法具有高度的抵抗性,新的药物如 Gemcitabine,虽然已经成为中晚期胰腺癌治疗的首选用药,但最终会产生耐药性,上述方法除了能达到减压和减轻疼痛症状的目的外,却不能控制胰腺癌肿瘤的生长和浸润转移,也不能显著延长患者的中位生存时间,因此需要探索新的胰腺癌治疗方法。

肿瘤的基因治疗是针对肿瘤发生的遗传学背景,将外源性目的基因引入肿瘤细胞或其他体细胞内以纠正过度活化或补偿缺陷的基因,从而达到治疗肿瘤的目的,因此,寻找理想的靶基因是肿瘤基因治疗的前提。Slug 是转录因子 SNAIL 家族中编码锌指蛋白的基因,Slug 既能下调肿瘤细胞内 E-cadherin 表达,又能上调细胞内 VEGF 蛋白表达,因此,Slug 与恶性肿瘤血管生成有关。多个研究报道,Slug 在多种恶性肿瘤中存在明显上调,Slug 上调的肿瘤容易出现远处转移,较深的肿瘤浸润深度和较差的预后^[1-8]。尽管某些肿瘤 Slug 上调不显著,如结直肠癌,但 Slug 阳性表达与 Dukes 分期、远处转移和患者预后明显相关^[9]。因此,干扰 Slug 可能具有抗胰腺癌血管生成和转移作用。

本研究将 pSlug-siRNA 作用于 PANC-1 细胞后,Slug 的

蛋白水平和基因水平都受到明显的抑制,说明 Slug 基因被有效沉默。本研究用 Matrigel 模拟基底膜建立体外侵袭模型,通过 pSlug-siRNA 干扰 PANC-1 细胞 Slug 基因后,研究其侵袭和转移能力影响。结果发现,pSlug-siRNA 组穿膜细胞数明显低于空白对照组及 pNeg-siRNA 组,而空白对照组及 pNeg-siRNA 组间差异无统计学意义($P > 0.05$),提示 RNA 干扰 Slug 基因可降低胰腺癌细胞的侵袭潜力。

通过体内实验证实,pSlug-siRNA 干扰 PANC-1 细胞 Slug 基因表达后,实体肿瘤的生长和转移被明显抑制。因此认为 Slug 与肿瘤的侵袭、转移存在相关性。通过 RNA 干扰抑制 Slug 基因的表达可降低人胰腺癌细胞的侵袭转移潜能,抑制胰腺癌肿瘤生长,为胰腺癌基因治疗提供一定的理论基础。

参考文献:

- [1] Yang AD, Camp ER, Fan F, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(1): 46.
- [2] Hajra KM, Chen DY, Fearon ER. The SLUG zinc-finger protein in represses E-cadherin in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(6): 1613.
- [3] Kajita M, McClintic KN, Wade PA. Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(17): 7559.
- [4] Tripathi MK, Misra S, Chaudhuri G. Negative regulation of the expressions of cytokeratins 8 and 19 by SLUG repressor protein in human breast cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 329(2): 508.
- [5] Martin TA, Goyal A, Watkins G, et al. Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2005, 12(6): 488.
- [6] Castro Alves C, Rosivatz E, Schott C, et al. Slug is overexpressed in gastric carcinomas and may act synergistically with SIP1 and Snail in the down-regulation of E-cadherin[J]. *J Pathol*, 2007, 211(5): 507.
- [7] Uchikado Y, Natsugoe S, Okumura H, et al. Slug expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(3): 1174.
- [8] Hotz B, Arndt M, Dullat S, et al. Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, Slug, and twist in pancreatic cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(16): 4769.
- [9] Shioiri M, Shida T, Koda K, et al. Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients[J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(12): 1816.