

· 基础研究 ·

Tjp-2 沉默增强胰腺癌细胞解离及侵袭能力*

王巍¹, 李晴², 曹志明³, 孙宏治¹, 丁峰¹, 李强¹, 李东升¹, 杨涛¹, 白光^{1△}

(1. 辽宁医学院附属第一医院普外科, 辽宁锦州 121001; 2. 辽宁医学院附属第三医院消化内科 121001; 3. 辽宁省锦州市紧急医疗救援中心 121001)

摘要:目的 采用 Tjp-2 siRNA 转染仓鼠胰腺癌细胞, 验证 Tjp-2 在胰腺癌细胞解离及侵袭中的作用。方法 利用脂质体介导法将 Tjp-2 siRNA 转染仓鼠胰腺癌低转移株 PC-1 细胞, 实验分为转染组、阴性对照组、对照组。RT-PCR 检测 3 组胰腺癌细胞中 Tjp-2 mRNA 及蛋白表达水平并分析转染效率, 用 Papanicolaou 'S 染色法观察细胞解离状态, Transwell 小室方法分析 Tjp-2 基因 siRNA 转染后胰腺癌细胞侵袭能力的变化。结果 经过 Tjp-2 基因特异性 siRNA 转染后, PC-1 细胞解离状态开始从岛样克隆生长改变为单个散在生长, 其侵袭能力明显增强。结论 Tjp-2 的表达与胰腺癌细胞解离状态及侵袭能力密切相关, Tjp-2 表达降低可增强胰腺癌细胞的侵袭能力。Tjp-2 可作为抗胰腺癌侵袭转移分子靶向治疗的新靶点。

关键词:胰腺癌; Tjp-2; siRNA

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.17.016

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)17-1713-03

TJP-2 silencing enhanced pancreatic cancer cell dissociation and invasion*

Wang Wei¹, Li Qing², Cao Zhiming³, Sun Hongzhi¹, Ding Feng¹, Li Qiang¹, Li Dongsheng¹, Yang Tao¹, Bai Guang^{1△}

(1. Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 2. Department of Gastroenterology, Third Affiliated Hospital, Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 3. Jinzhou Emergency Medical Rescue Center, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

Abstract: Objective To verify the role of Tjp-2 in pancreatic cancer cell dissociation and invasion by TJP-2-siRNA transfected hamster pancreatic cancer cells. **Methods** The lipofectamine mediated method was used to transfect TJP-2 siRNA to hamster low metastatic pancreatic cancer cells PC-1 line. The hamster pancreatic cancer cells were divided into TJP-2 siRNA, negative control siRNA and control group. RT-PCR was used to detect Tjp-2 mRNA and protein expression in pancreatic cancer cells. The transfection efficiency was analyzed. **Results** After TJP-2 gene-specific siRNA transfection, PC-1 cells were changed from the island-like ionization state to a single clonal scattered growth, the invasion ability was markedly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** The expression of TJP-2 in pancreatic cancer cells is closely related to the dissociation state and invasion ability. The reduce of TJP-2 expression could enhance the invasion ability of pancreatic cancer cells. Tjp-2 may serve as a new target for molecular targeted therapies to prevent the invasion and metastasis of pancreatic cancer.

Key words: pancreatic cancer; TJP-2; siRNA

胰腺癌是消化道常见的恶性肿瘤之一, 是恶性肿瘤中最常见的, 多发生于胰头部。其发病率虽只占各种肿瘤的 1%~2%, 占消化系统恶性肿瘤的 8%~16%, 呈逐年增长的趋势。由于胰腺癌发病隐匿, 早期多无明显症状, 或仅出现某些非特异性症状, 加之又缺乏简单、特异性的诊断方法, 因此, 多数患者就诊时已为中、晚期。胰腺癌的 5 年生存率小于 5%, 目前仍然是预后最差的实体肿瘤^[1]。目前手术仍是惟一可能治愈的方法, 但是大多数患者就诊时已属中、晚期, 手术切除率低^[2]。

在近期研究中, 应用 cDNA 微阵列分析检测发现 Tjp-2 (又名 zonula occludens-2, ZO-2) 是一种在解离型高转移株 PC-1.0 细胞和非解离型低转移株 PC-1 细胞中的表达不同且与侵袭转移关系密切的基因^[3]。紧密连接是连接复合物中最靠近顶点的成分, 通过在细胞间形成连续的带状结构隔离了顶点和侧质膜。紧密连接由不同的跨膜蛋白包括 occludin, claudin 和 JAMs 组成, 这些跨膜蛋白通过脚手架蛋白如 ZO 蛋白与细胞骨架相连。ZO 蛋白 (ZO-1, ZO-2, ZO-3) 属于膜相关的鸟苷酸激酶 (MAGUK) 家族, 这些蛋白含几个蛋白-蛋白相互作用的

结构域, 包括 3 个 PDZ 结构域、一个 SH3 结构域和一个 GK 结构域, 它们主要定位于连接复合物的膜下区, 把多个完整的膜蛋白交联到细胞质表面, 产生特殊的膜区域。Tjp 家族有 3 名成员, 分别为 Tjp-1 (ZO-1)、Tjp-2 (ZO-2) 和 Tjp-3 (ZO-3)。Tjps 属于膜相关 MAGUK 的同分异构体, 参与组成上皮和内皮细胞内结构。Tjp 与连接转膜蛋白的胞质侧 C 端绑定, 使其与细胞骨架肌动蛋白和信号转导通路成分连接^[4]。Paris 等^[5]已鉴定的一种跨膜蛋白 Occludin, 可能提供了这些结构的基础, 用来源于肌酐肝组织此连接的单克隆抗体鉴定通过免疫电子显微镜观察这种跨膜蛋白专一性地定位于许多不同类型细胞的紧密连接处。Occludin 的拓扑学结构表明它的氨基端 (-NH) 和羧基端 (-COOH) 处于胞质侧, 两个胞外环伸展向细胞间隙。目前, 认为 Occludin 功能广泛, 在细胞间黏附、移动及调节细胞的通透性等方面起作用。Occludin 也可直指参与脑微血管内细胞上的 Tjp 形成^[6]。但是 Tjp 参与肿瘤侵袭转移, 尤其是与细胞解离相关的机制尚未明确。

本实验通过分析 Tjp-2 基因 siRNA 转染后胰腺癌细胞解离状态和侵袭能力的变化, 拟证明 Tjp-2 表达与胰腺癌细胞解

离及侵袭能力密切相关,为临床上开发新的靶向治疗药物提供新的靶点。

1 材料与与方法

1.1 材料 本实验采用仓鼠胰腺癌细胞系 PC-1,低转移型 PC-1 细胞系是由利用 BOP 诱导的叙利亚仓鼠实验性胰腺癌模型建立,以 RPMI-1640 培养液培养,并加 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素 G 和 100 μ g/mL 链霉素,于含 5% CO₂ 37 °C 孵箱内培养。

1.2 方法

1.2.1 基因转染 TJP-2 siRNA(sc-29926) 由美国 Santa Cruz 公司设计并合成,选定 3 个针对不同位点的 TJP-2 siRNA 序列,均已有实验证明转染效率大于 75%。Control siRNA 为阴性对照,由美国 Santa Cruz 公司合成购买;脂质体 2000 和 Opti-MEN 培养基均购于 Invitrogen 公司。实验分组:对照组 (Opti-MEN 培养基+PC-1 细胞),阴性对照组 (Opti-MEN 培养基+control siRNA+PC-1 细胞),转染组 (Opti-MEN 培养基+TJP-2 siRNA+PC-1 细胞)。

1.2.2 总 RNA 的提取及 RT-PCR 测转染率 Trizol 购自 Invitrogen 公司,RT-PCR 试剂盒购于大连 TaKaRa 公司。转染 48 h 后提取总 RNA,TJP-2(245 bp):5'-GCA GAG CGA ACG AAG AGT ATG G(forward),5'-TGA CGG GAT GTT GAT GAG GGT(reverse); β -actin(664 bp):5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA(forward),5'-CTC CTT AAG TCA CGC ACG ATT CC(reverse)。PCR 反应条件如下,95 °C 变性 5 min,然后 94 °C 30 个循环 20 s,接着 63 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,最后 72 °C 7 min 延伸。PCR 产物经过 1.5% 含有溴化乙锭的琼脂糖凝胶电泳并显影,电压为 120 V,电泳时间为 40 min,凝胶成像系统对条带进行扫描分析,计算灰度,以目的条带与 β -actin 灰度的比值表示目的条带的表达水平,转染抑制率=(转染前表达水平-转染后表达水平)/转染前表达水平 \times 100%。

1.2.3 Westernblot 检测 实验以免多克隆抗体作用于人 Tjp-2 氨基酸序列及 β -actin(Santa Cruz,CA)作为一抗,利用辣根过氧化物酶结合的抗体和 FITC 标记的荧光抗体(Santa Cruz,CA)作为第二抗体。裂解各组细胞制备蛋白样本后,取 20 g 裂解提取物用聚丙烯酰胺平板凝胶电泳,再将蛋白质转印到 PVDF 膜上,然后将 PVDF 膜与 0.1% Tween-20/PBS 稀释的一抗共同于 4 °C 下孵育过夜,一抗孵育后的膜与辣根过氧化物酶标记的二抗以 1:2 000 比例再加 0.1% Tween-20/PBS 稀释共同孵育,利用 Kodak scientific imaging film(eastman kodak company,rochester,NY),加入增强型化学发光剂(Santa Cruz,CA)以探测收集蛋白条带光信号。

1.2.4 细胞解离状态 6 孔板中的细胞达到 70%~80% 融合时,用 Papanicolaou 'S 染色法对各组细胞进行染色,镜下观察细胞解离状态。

1.2.5 侵袭能力 Transwell 小室分析侵袭能力 Transwell 小室(costar,camb ridge,MA,USA)放入 24 孔细胞培养板中,另将含有 25.6 μ g Matrigel 的 50 μ L RPMI-1640 培养基加到上层小室的微孔滤膜上(直径为 8 μ m),37 °C 放置 2 h 使其形成凝胶状。各组细胞用无血清的 RPMI-1640 培养液洗涤后,用吸管吹打悬浮、计数、离心。按 1×10^6 /mL 将细胞重悬于含 0.1% 牛血清清蛋白的 RPMI-1640 培养液中,取 100 μ L 细胞悬液加到小室的基底膜上,小室下层加 800 μ L 含 0.1% 牛血清清蛋白的 RPM I-1640 培养液,37 °C,5% CO₂ 培养 20 h。取出小室,吸弃小室内的培养液,并用棉签仔细拭出小室内的

细胞和人工基底膜,进行 Diff-Quik 染色。显微镜下观察侵袭移动到多孔滤膜外侧面上的细胞,随机计数 5 个视野内的细胞数,计算平均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件,利用非配对 Student's *t* 检验分析数据,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 转染 48 h 后,siRNA 组的 mRNA 表达水平显著降低,与阴性对照组相比下降了 84.37%,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 1。

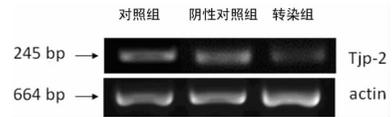


图 1 TJP-2 siRNA 转染后的 mRNA 结果

2.2 Westernblot 结果显示 Tjp-2 蛋白表达在对照组和阴性对照组胰腺癌细胞中高表达,而在转染组胰腺癌细胞中低表达,与阴性对照组比较下降了 92.32%,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 2。

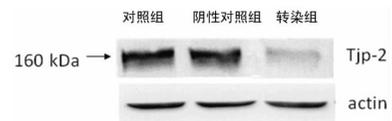


图 2 TJP-2 siRNA 转染后的蛋白表达结果

2.3 细胞解离状态 Papanicolaou'S 染色,镜下观察细胞解离状态,发现对照组及阴性对照组胰腺癌细胞 PC-1 均呈岛样克隆细胞生长,对照组及阴性对照组每个视野解离细胞数分别为 2 个、2 个,而 siRNA 转染后 48 h 每个视野的细胞解离状态发生变化开始呈散在单个细胞生长,转染组为每个视野 6 个解离细胞,转染后解离细胞数明显增多,见图 3。

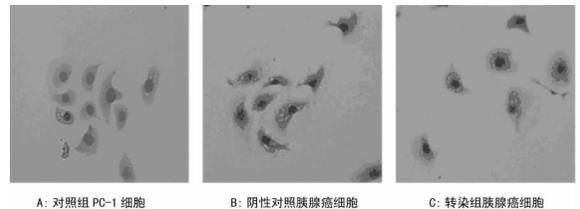


图 3 各组胰腺癌细胞的解离状态

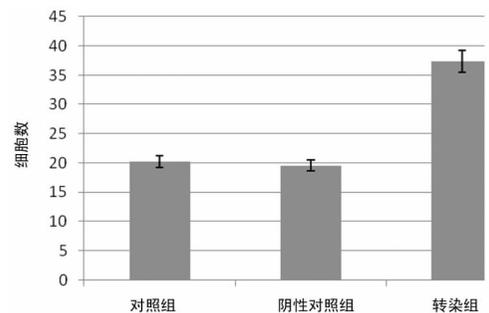


图 4 胰腺癌侵袭能力比较

2.4 Transwell 小室方法分析侵袭能力 将细胞加入含 Matrigel 的 Transwell 上室培养 24 h,Diff-Quik 染色后镜下观察细胞并计数随机 5 个视野($\times 200$)内细胞数,发现对照组、阴性对照侵袭细胞数分别为 (20.2 ± 2.59) 、 (19.6 ± 1.14) 个,而转染 TJP-2 siRNA 后为 (37.4 ± 1.14) 个,侵袭细胞数明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1、图 4。

表 1 各组胰腺癌细胞侵袭细胞数比较(n)

分组	上	下	左	右	中	均数	标准差
对照组	21	22	17	23	18	20.2	2.59
阴性对照组	20	21	18	19	20	19.60	1.14
转染组	37	36	37	39	38	37.40	1.14

3 讨 论

近年来,随着对胰腺癌发生的分子机制研究的不断深入,分子靶向治疗成为研究的热点。新生的靶向药物由于成功治疗了慢性白血病和乳腺癌、结肠癌,点燃了胰腺癌治疗的新希望。为改善胰腺癌预后,针对胰腺癌高度的侵袭转移特性,开发抑制胰腺癌侵袭转移的新型靶向治疗药物是当务之急。通过抑制胰腺癌的侵袭转移,使肿瘤限定于局部,再配合手术切除局部肿瘤,可能是根治胰腺癌值得探索的一条新途径。最近,紧密连接在细胞生物学方面的进展,揭示了紧密连接的屏障功能和防御功能,表明以紧密连接蛋白作为药物开发的靶标有着广阔的前景。

与紧密连接相关的几个胞质蛋白中,ZO-1、Tjp-2 最具特征性。1986 年通过用紧密连接片段免疫鼠肝细胞形成的特异性单克隆抗体鉴定了 ZO-1。ZO-1 在紧密连接、肾小球表皮细胞过滤孔和一些钙粘素连接中均有发现。由于 ZO-1、Tjp-2 的多种异构体形式的存在不同细胞类型的紧密连接意义不同。ZO-1 和 Tjp-2 之间相互作用,ZO-1 结合于 Occludin 的羧基端(-COOH)。ZO-1 和 Tjp-2 均属于膜连接 MAGUK 家族。此蛋白质家族成员多数位于细胞之间的连接处并且与细胞骨架通过胞外信号转导途径相互作用,Tjp-2 可能与 MEK 信号转导通路密切相关^[7]。近来研究表明 ZO-1 与乳腺癌的发生密切相关^[8],ZO-2 是急性白血病的致癌因子^[9]。有研究表明 ZO 可能与血瘤屏障有关^[10],ZO-1 在黏膜屏障中具有重要作用^[11]。而研究表明 Tjp-2 在胰腺癌和乳腺癌中表达失调^[12]。

本研究表明,转染前后光镜下细胞的解离状态也有差异,转染处理后的 PC-1 细胞 Tjp-2 表达明显降低,胰腺癌细胞的解离状态也相应改变,从原来的岛样克隆式生长变为单个散在方式生长。证明 Tjp-2 表达与仓鼠的胰腺癌细胞的细胞解离状态密切相关。当 siRNA 转染处理 PC-1 后,在细胞膜细胞间连接处的 Tjp-2 表达明显减弱,从而导致胰腺癌细胞解离,Transwell 实验结果证明其侵袭能力相应增强。所以,在仓鼠的胰腺癌细胞中 Tjp-2 的表达变化与胰腺癌细胞的侵袭转移能力密切相关,且成负相关,基因沉默 Tjp-2 后胰腺癌细胞开始解离且侵袭转移能力增强。且有研究证明 Tjp-2 蛋白可被磷酸化,Tjp-2 磷酸化状态的改变可能调控其细胞内定位^[13-15]。所以笔者推测 Tjp-2 的磷酸化状态变化可通过 MEK/ERK 信号转导通路进行调控,Tjp-2 磷酸化在胰腺癌调控机制中的作用需进一步更深入的研究。

综上所述,通过 siRNA 转染 PC-1 细胞后对 Tjp-2 表达和细胞解离、侵袭能力的研究证明 Tjp-2 的表达与胰腺癌细胞解离状态密切相关,并且可以调控胰腺癌细胞的侵袭及转移能力。Tjp-2 作为胰腺癌重要的肿瘤标记物,为开发新的抗胰腺癌侵袭转移的分子靶向治疗方法提供了重要的理论依据。

参考文献:

[1] Jemal A,Siegel R,Ward E,et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin,2007,57(1):43.

- [2] Loos M,Kleeff J,Friess H,et al. Surgical treatment of pancreatic cancer[J]. Ann N Y Acad Sci,2008,9(1138):169.
- [3] Tan X,Zhou L,Wang W,et al. Genomic analysis of invasion-metastasis related factors in pancreatic cancer cells [J]. Exp Ther Med,2010,1(1):211.
- [4] Lapierre LA. The molecular structure of the tight junction [J]. Adv Drug Deliv Rev,2000,41(3):255.
- [5] Paris L,Tonutti L,Vannini C,et al. Structural organization of the tight junctions [J]. Biochim Biophys Acta,2008,1778(3):646-659.
- [6] Dimitrijevic OB,Stamatovic SM,Keep RF,et al. Effects of the chemokine CCL2 on blood-brain barrier permeability during ischemia-reperfusion [J]. J Cereb Blood Flow Metab,2006,26(6):797-810.
- [7] Patibandla PK,Tyagi N,Dean WL,et al. Fibrinogen Induces Alterations of Endothelial Cell Tight Junction Proteins [J]. J Cell Physiol,2009,221(1):195-203.
- [8] Hoover KB,Liao SY,Bryant PJ. Loss of the Tight Junction MAGUK ZO-1 in Breast Cancer Relationship to Glandular Differentiation and Loss of Heterozygosity [J]. Am J Pathol,1998,153(6):1767-1773.
- [9] Prasad R,Gu Y,Alder H,et al. Cloning of the ALL-1 fusion partner,the AF-6 gene,involved in acute myeloid leukemias with thet(6;11) chromosome translocation [J]. Cancer Res,1993,53(23):5624-5628.
- [10] Xie H,Xue YX,Liu LB,et al. Endothelial-monocyte-activating polypeptide II increases blood-tumor barrier permeability by down-regulating the expression levels of tight junction associated proteins [J]. Rain Res,2010,10(1319):13-20.
- [11] Huang XH,Zhang L,Gao ZM,et al. Expression of occludin and zona occluden-1 and their morphologic changes in vagina mucosal cells in patients undergoing vaginal construction by using sigmoid colon [J]. Zhong Hua Fu Chan Ke Za Zhi,2009,44(8):588-592.
- [12] Chlenski A,Ketels KV,Korovaitseva GI,et al. Organization and expression of the human zo-2 gene(tjp-2) in normal and neoplastic tissues [J]. Biochim Biophys Acta,2000,1493(3):319-324.
- [13] Sabath E,Negoro H,Beaudry S,et al. Galphal2 regulates protein interactions within the MDCK cell tight junction and inhibits tight-junction assembly [J]. J Cell Sci,2008,121(6):814-824.
- [14] Tsukamoto T,Nigam SK. Role of tyrosine phosphorylation in the reassembly of occluding and other tight junction proteins [J]. Am J Physiol,1999,276(5):F737-750.
- [15] Adachi M,Inoko A,Hata M,et al. Normal establishment of epithelial tight junctions in mice and cultured cells lacking expression of ZO-3, a tight-junction MAGUK protein [J]. Mol Cell Biol,2006,26(23):9003-9015.