

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.35.005

RNAi 对胃癌 SGC-7901 细胞侵袭及迁移能力的影响*

裴波¹, 寸英丽^{2△}, 姚乾³, 张凯恋¹, 覃向南¹, 代佑果², 查勇²

(1. 昆明医科大学研究生院, 昆明 650500; 2. 昆明医科大学附属第三医院腹部外科, 昆明 650118;

3. 云南省肿瘤医院肿瘤研究所, 昆明 650118)

[摘要] 目的 运用 RNA 干扰(RNAi)技术抑制 HER2 基因的表达, 探讨其对胃癌 SGC-7901 细胞侵袭及迁移能力的影响。

方法 设计、构建 RNAi 片段靶向抑制 HER2 高表达的胃癌细胞株(HER2-RNAi 组), 以转染阴性对照系列(阴性对照组)及未转染的 SGC-7901 细胞(空白对照组)为对照组。利用 RT-PCR 和 Western blot 法检测各组胃癌 SGC-7901 细胞中 HER2 的表达情况; 采用 Transwell 小室模型及划痕实验检测 RNAi 对胃癌细胞体外的侵袭和迁移能力的影响。结果 RNAi 片段转染后 SGC-7901 细胞的 HER2 mRNA 和蛋白表达水平明显下降($P < 0.05$); 侵袭实验结果显示, HER2-RNAi 组的穿膜细胞数[(31.5±3.8)个/视野]显著低于未转染组[(103.6±4.5)个/视野]; 迁移实验结果显示, HER2-RNAi 组的穿膜细胞数[(63.6±5.1)个/视野]显著低于未转染组[(193.5±6.2)个/视野], 各组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 RNAi 沉默 HER2 基因可以抑制胃癌 SGC-7901 细胞的侵袭和迁移能力, 提示 RNAi 基因沉默技术有可能成为进展期胃癌治疗的新方法。

[关键词] 胃肿瘤; RNA 干扰; 肿瘤转移; HER2 基因

[中图分类号] R735.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)35-4910-03

The influence of RNAi on invasion and migration of gastric cancer cell line SGC-7901*

Pei Bo¹, Cun Yingli^{2△}, Yao Qian³, Zhang Kailian¹, Qin Xiangnan¹, Dai Youguo², Zha Yong²

(1. Graduate School of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650500, China; 2. Department of Abdominal Surgery, the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650118, China; 3. Yunnan Tumor Institute, Tumor Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650118, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of RNA interference(RNAi) on gastric cancer cell line SGC-7901 invasion and migration by inhibiting HER2 expression. **Methods** The RNAi segments targeting HER2 were designed and transfected into cell lines with high level of HER2(HER2-RNAi group), SGC-7901 cells transfected with negative control series(the negative control group) and vacant SGC-7901 cells(the blank control group) were used as controls. The mRNA and protein expression of HER2 were detected by real-time PCR and Western blot. The invasive and migration ability of transfected tumor cells by Transwell assay and scratch assay. **Results** The expression of HER2 was significantly reduced after the transfection($P < 0.05$). In invasion test, the number of cells crossing through chambers in HER2-RNAi group[(31.5±3.8)/view] was significantly lower than that in the control group[(103.6±4.5)/view]($P < 0.05$); in migration test, the number of cells crossing through chamber in HER2-RNAi group[(63.6±5.1)/view] was significantly lower than that in the control group[(193.5±6.2)/view]($P < 0.05$). **Conclusion** HER2 silencing by RNAi suppresses the capacities of invasion and migration of human gastric cancer SGC-7901 cells, suggesting that RNAi gene silencing technique might be a new method in the treatment of advance gastric cancer.

[Key words] gastric neoplasms; RNA interference; neoplasm metastasis; HER-2 gene

胃癌在全球最常见的恶性肿瘤中排名第 4 位, 同时也是世界范围内第 2 位致死性肿瘤^[1]。目前, 尽管有手术、化疗和放疗等多种治疗手段综合治疗胃癌, 但对于进展期胃癌患者总体疗效欠佳, 其 5 年生存率仍低于 30%^[2]。随着分子生物学的发展及对胃癌发病机制研究的深入, 目前, 已认识到胃癌的发生、发展是一个多阶段、多步骤、多因素参与的过程, 在基因水平研究胃癌的治疗成为近年研究热点。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是近年来发展起来的一种从基因的角度治疗疾病的新技术, RNA 中极少量的 siRNA 就能特异有效地抑制相应基因的表达^[3]。本研究采用 RNA 干扰技术下调胃癌 SGC-7901 细胞中 HER2 基因的表达, 观察其对胃癌细胞株

SGC-7901 侵袭迁移能力的影响, 旨在为胃癌转移的基因靶向治疗提供新的思路和途径。

1 材料与方法

1.1 材料 人胃癌细胞株 SGC-7901(云南省肿瘤医院常规保存); 质粒 pGPU6/GFP/Neo-HER2 和阴性质粒(pGPU6/GFP/Neo-shNC, 上海吉玛公司); RPMI-1640 培养液、胎牛血清(美国 Hyclone 公司); 脂质体 Lipofectamine2000、TRIzol 试剂、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒、Matrigel 胶(日本 TAKARA 公司); Transwell 小室(美国 Coning 公司); RIPA 裂解液(索莱宝); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司); 兔抗人 HER2 单克隆抗体(Bioss antibody 公司);

* 基金项目: 云南省自然科学基金应用基础研究基金资助项目(2010CD179、2012FB065、2014FZ034)。 作者简介: 裴波(1987-), 医师, 硕士, 主要从事胃肠道肿瘤的基础与临床研究。 △ 通讯作者, Tel:(0871)8185656; E-mail:kunmingcunyingli@163.com。

β -actin、山羊抗兔 IgG-HRP(signalway antibody 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与转染 (1)细胞培养:将存在 HER2 蛋白表达^[4]的胃癌 SGC-7901 细胞株用含 10%小牛血清的 RPMI-1640 培养液,置于 37 °C、5%CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。

(2)细胞转染:根据 HER2(NM_001005862)基因信息利用 siRNA 设计原则与方法设计 siRNA 序列^[5],送上海吉玛公司合成,选取含有干扰 HER2 效果最佳的靶点序列 pGPU6/GFP/Neo-HER2 (5'-GGG CAG TTA CCA GTG CCA AT-3'),以及阴性对照组的 pGPU6/GFP/Neo-shNC 序列 (5'-GTT CTC CGA ACG TGT CAC GT-3'),按照转染手册转染至 SGC-7901 细胞中,制备成稳定转染 HER2-RNAi 的 SGC-7901 细胞 (HER2-RNAi 组)及阴性对照细胞 (阴性对照组);并收集同期未转染的 SGC-7901 细胞设为空白对照组。转染后 24 h 观察细胞。

1.2.2 RT-PCR 检测 HER2 mRNA 的表达 应用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,按 TaKaRa 公司提供的反转录试剂盒和荧光定量试剂盒进行操作,并以 GAPDH 为内参照。HER2 上游引物为 5'-TCC GTT TCC TGC AGC AGT C-3',下游引物为 5'-AGA GAG CCA GCC CTC TGA CGT CCA T-3';内参基因 GAPDH 上游引物为 5'-GGT CTC CTC TGA CTT CAA CA-3',下游引物为 5'-AGC CAA ATT CGT TGT-3'。反应体系 20 μ L,反应条件:95 °C 预变性 30 s,95 °C 20 s,58 °C 30 s,72 °C 30 s,40 个循环。

1.2.3 Western blot 检测 HER2 蛋白的表达 提取各组细胞蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,每组取 20 μ L 蛋白上样,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),电泳产物以 250 mA 恒流电转至 PVDF 膜,用 3%BSA 封闭液室温于摇床上摇动封闭 2 h,用磷酸盐吐温缓冲液 (PBST)漂洗后置于稀

释的 I 抗 (HER2 为 1 : 500; β -actin 为 1 : 3 000)中 4 °C 孵育过夜,再次 PBST 漂洗后加入稀释的山羊抗兔 II 抗 (1 : 5 000),室温置于摇床上孵育 2 h,洗膜后进行显影、定影,行图像分析。

1.2.4 细胞侵袭和迁移实验 应用无血清的冷 DMEM 按 1 : 6 稀释 Matrigel 基质胶,在 24 孔板的细胞培养孔中置入 Transwell 小室,在上室覆盖 100 μ L 稀释胶,室温干燥过夜。HER2-RNAi 转染组细胞及未转染组细胞培养 48 h 后,应用无血清的 DMEM 调整细胞密度至 5×10^5 /mL,转移至 Matrigel 包被的 Transwell 小室中,小室下层加入含 10% 血清的 DMEM。37 °C 培养 24 h 后,用棉签拭去非侵袭性细胞,然后用结晶紫固定并染色,在 100 倍荧光显微镜下计数细胞。细胞迁移实验步骤除 Transwell 小室不铺胶外,其余方法同侵袭实验。

1.2.5 细胞划痕实验 以 6 孔细胞培养皿培养 HER2-RNAi 转染组细胞及未转染组细胞,生长 24 h 后用移液枪头在培养皿中划痕,加入无血清培养基。放入 5%CO₂ 培养箱,37 °C 培养 24 h 取样,拍照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料的比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),多组间两两比较采用最小显著差异法 (LSD) 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 载体成功转染并获得 HER2 稳定表达的 SGC-7901 细胞 转染 24 h 后,在激光共聚焦荧光显微镜下观察细胞,HER2-RNAi 组与阴性对照组中大多数细胞都荧光着色,与背景形成明显反差,表明 pGPU6/GFP/Neo-HER2 与 pGPU6/GFP/Neo-shNC 载体成功转染进入 SGC-7901 细胞株并获得稳定表达 HER2 蛋白,见图 1。

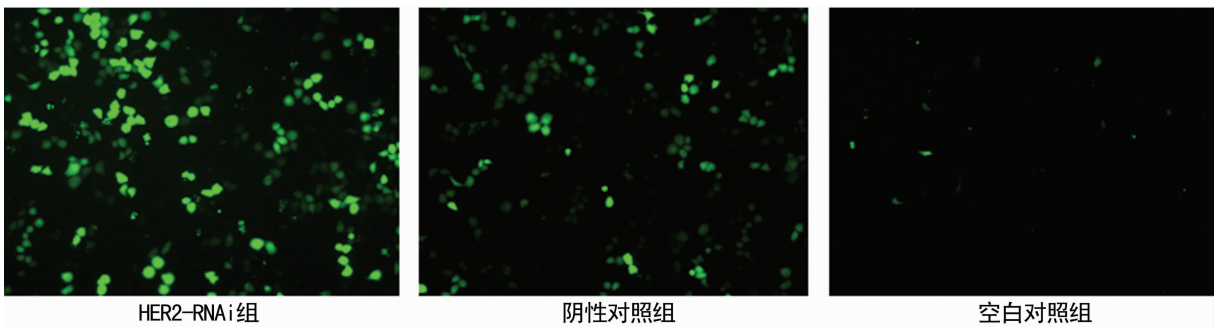


图 1 荧光显微镜观察载体转染 SGC-7901 细胞后影像表现 (×100)

表 1 RT-PCR 检测各组细胞中 HER2 mRNA 的相对表达量

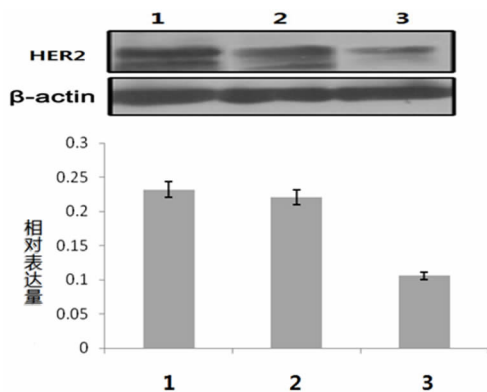
组别	HER2 Ct Mean	GAPDH Ct Mean	Δ Ct Mean	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
空白对照组	27.143	18.065	8.109	0.523	0.702
阴性对照组	27.223	18.751	8.545	0.712	0.611
HER2-RNAi 组	27.909	19.362	9.763	1.930	0.262

2.2 RT-PCR 检测各组胃癌 SGC-7901 细胞中 HER2 mRNA

的表达 结果显示,干扰组细胞 HER2 的 mRNA 表达水平相对于阴性对照组及空白对照组明显下降,干扰效率为 73.8%,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),而阴性对照组较空白对照组细胞 HER2 的 mRNA 表达则无明显改变 ($P > 0.05$),提示本实验设计的 siRNA 能有效地沉默 HER2 基因,见表 1。

2.3 Western blot 检测各组胃癌 SGC-7901 细胞中 HER2 蛋白的表达 HER2-RNAi 组与阴性对照组及空白对照组比较,细胞内 HER2 蛋白的表达下调,HER2-RNAi 组的 HER2 蛋白相对表达量降低了 53.9% 和 52.2%,差异有统计学意义 ($P < 0.01$). 阴性对照组和空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$). 各组间内参 β -actin 表达水平比较差异无统计学

意义($P>0.05$),见图 2。



1:空白对照组;2:阴性对照组;3:HER2-RNAi 组。

图 2 Western blot 检测各组细胞中 HER2 蛋白的表达

2.4 RNAi 对胃癌 SGC-7901 细胞体外侵袭和迁移能力的影响 在倒置显微镜下观察,穿膜细胞被染成紫蓝色。Transwell 小室模型法检测结果显示,HER2-RNAi 组细胞侵袭穿膜细胞的数量为 (31.5 ± 3.8) 个/视野,与未转染的阴性对照组 $[(103.6 \pm 4.5)$ 个/视野]比较,差异有统计学意义($P<0.05$,图 3);HER2-RNAi 组细胞迁移穿膜细胞的数量为 $[(63.6 \pm 5.1)$ 个/视野],与阴性对照组 $[(193.5 \pm 6.2)$ 个/视野]比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。细胞划痕实验显示,与阴性对照组 SGC-7901 细胞比较,HER2-RNAi 组细胞的迁移能力明显下降,见图 4。

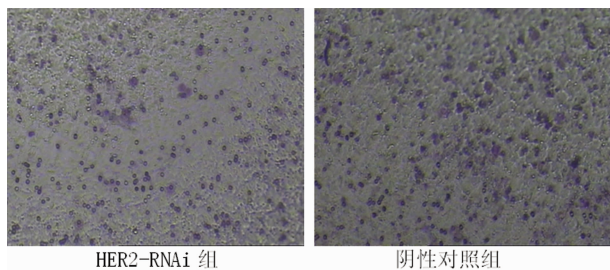


图 3 沉默 HER2 基因对细胞侵袭能力的影响($\times 100$)

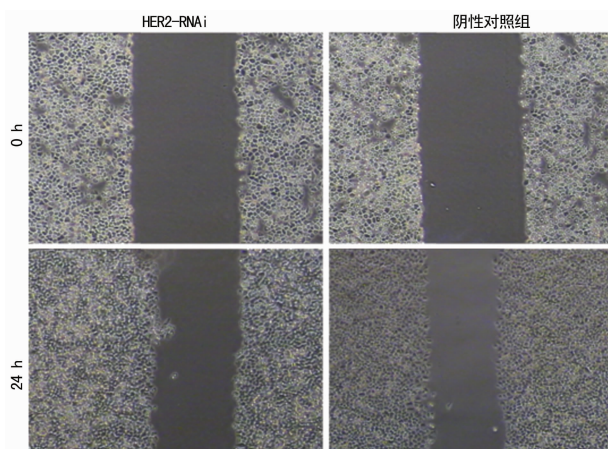


图 4 HER2-RNAi 组和阴性对照组细胞划痕实验结果表现($\times 100$)

3 讨 论

侵袭转移是进展期胃癌预后差的最主要原因,也是进展期胃癌治疗难以突破瓶颈的关键因素。故研究胃癌侵袭转移相关因素及其机制并找到抑制这些因素的策略对胃癌的治疗具

有十分重要的意义。胃癌的侵袭转移机制尚不清楚,许多肿瘤的侵袭转移都和癌基因或受体基因过度表达有关,其中,HER2 基因已被证实是多种肿瘤发生侵袭转移的密切相关因子,它在细胞信号转导中发挥重要作用,是细胞分化、增殖、黏附、移动的重要调节因子。Boku^[6]研究证实,HER2 在胃癌组织中高表达,并与胃癌的转移及预后密切相关。故本研究以 HER2 基因为研究对象,探讨 RNAi 基因沉默技术对胃癌侵袭转移能力的影响。

RNA 干扰是近年来被证实能在体内外沉默基因均十分有效的技术手段,具有高效性、低毒性和特异性,目前已广泛应用于许多人类基因相关疾病的诊治与研究,尤其是在恶性肿瘤、感染性疾病上取得了重大进展^[7]。由于 RNAi 技术能够选择性抑制胃癌相关基因的表达,因此它成为胃癌治疗非常有前景的可选方法^[8]。本实验中,作者采用 RNAi 下调胃癌 SGC-7901 细胞中 HER2 的表达,并采用实时定量 PCR 和 Western blot 方法在 mRNA 及蛋白表达水平上进行验证。结果证实,RNA 干扰片段能有效沉默 HER2 基因,与阴性对照组和空白对照组比较均有显著差异。

侵袭与转移能力是癌细胞区别于正常细胞的最基本的特征。Transwell 小室实验和细胞划痕实验已被国内外众多学者运用于肿瘤细胞侵袭和迁移的研究^[9],本研究亦采用 Transwell 小室实验和细胞划痕实验来检测 RNA 干扰 HER2 基因的表达对胃癌细胞侵袭和迁移能力的影响。结果显示,侵袭和迁移实验中,与未转染阴性对照组比较,HER2-RNAi 组穿膜进入下室的细胞数量均明显减少,提示下调 HER2 基因的表达可以使胃癌 SGC-7901 细胞的运动能力明显降低;细胞划痕实验结果显示,与未转染的对照组比较,HER2-RNAi 组细胞的迁移能力明显下降。本研究结果表明,RNAi 基因沉默能够降低胃癌的侵袭与转移能力,这与李增军等^[10]利用 RNAi 沉默高迁移蛋白 B1 基因可抑制胃癌的侵袭转移的研究结果是一致的。此外,RNAi 在抑制胃癌细胞的生长、促进细胞凋亡^[11],抑制胃癌血管、淋巴管的生成^[12-13],提高放疗敏感性^[14],以及逆转胃癌化疗多药耐药性^[15]等方面的研究已取得了初步的成功,这为 RNAi 基因沉默技术在胃癌治疗上的应用奠定了良好的基础。

综上所述,RNAi 沉默 HER2 基因可以有效抑制胃癌 SGC-7901 细胞的侵袭与转移,提示 RNAi 基因沉默技术能够产生抗侵袭转移效应,有望成为进展期胃癌治疗的新方法。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Ajani JA, Bentrem DJ, Besh S, et al. Gastric cancer, version 2. 2013: featured updates to the NCCN guidelines [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2013, 11(5): 531-546.
- [3] Vengut-Climent E, Terrazas M, Lucas R, et al. Synthesis, RNAi activity and nuclease-resistant properties of apolar carbohydrates siRNA conjugates [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2013, 23(14): 4048-4051.
- [4] 左强, 罗宇玲, 谢剑明, 等. Her-2 阳性胃癌细胞株对曲妥珠单抗药物敏感性的实验研究[J]. 热带医学杂志, 2013, 13(8): 936-938, 947.

之间的免疫平衡,促进效应 T 淋巴细胞的扩增而导致了动脉粥样硬化的发生^[15]。他汀类药物能够纠正粥样斑块组织内免疫平衡紊乱,逆转 Treg 与 DCs、效应 T 淋巴细胞间的比例失衡,从而达到抑制斑块内免疫反应、稳定斑块的目的。关于 DCs、Treg 在动脉粥样硬化过程中的作用及与效应 T 淋巴细胞之间的关系还有许多问题需要深入研究,并为临床中他汀类药物的作用靶点提供新的思路。

参考文献

- [1] Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, et al. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice [J]. *Nat Med*, 2006, 12(2): 178-180.
- [2] Bobryshev YV, Moisenovich MM, Pustovalova OL, et al. Widespread distribution of HLA-DR-expressing cells in macroscopically undiseased intima of the human aorta: a possible role in surveillance and maintenance of vascular homeostasis [J]. *Immunobiology*, 2012, 217(5): 558-568.
- [3] Wick G, Knoflach M, Xu QB. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis [J]. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22(19): 361-403.
- [4] Jongstra-Bilen J, Haidari M, Zhu SN, et al. Low-grade chronic inflammation in regions of the normal mouse arterial intima predisposed to atherosclerosis [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(9): 2073-2083.
- [5] Llodra J, Angeli V, Liu J, et al. Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(32): 11779-11784.
- [6] Veillard NR, Steffens S, Pelli G, et al. Differential influence of chemokine receptors CCR2 and CXCR3 in development of atherosclerosis in vivo [J]. *Circulation*, 2005, 112(6): 870-878.

- [7] Maganto-Garcia E, Tarrío ML, Grabié N, et al. Dynamic changes in regulatory T cells are linked to levels of diet-induced hypercholesterolemia [J]. *Circulation*, 2011, 124(2): 185-195.
- [8] Liu K, Victora GD, Schwickert TA, et al. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis [J]. *Science*, 2009, 324(5925): 392-397.
- [9] Maria B, Piotr K, Mike S, et al. Effectiveness of lipid-lowering therapy with statins for secondary prevention of atherosclerosis—guidelines vs. Reality [J]. *Pharmacological Reports*, 2012, 64(12): 377-385.
- [10] Greenwood J, Steinman L, Zamvil SS. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(5): 358-370.
- [11] Rasmussen LM, Hansen PR, Nabipour MT, et al. Diverse effects of inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase on the expression of VCAM-1 and E-selectin in endothelial cells [J]. *Biochem J*, 2001, 360(Pt 2): 363-370.
- [12] Tabas I, Williams KJ, Borén J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications [J]. *Circulation*, 2007, 116(16): 1832-1844.
- [13] Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(3): 204-212.
- [14] Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(2): 191-197.
- [15] Mallat Z, Tedgui A. Immunomodulation to combat atherosclerosis: the potential role of immune regulatory cells [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2004, 4(9): 1387-1393.

(收稿日期: 2015-05-08 修回日期: 2015-07-23)

(上接第 4912 页)

- [5] Vert JP, Foveau N, Lajaunie C, et al. An accurate and interpretable model for siRNA efficacy prediction [J]. *BMC Bioinformatics*, 2006, 7: 520.
- [6] Boku N. HER2-positive gastric cancer [J]. *Gastric Cancer*, 2014, 17(1): 1-12.
- [7] Singh S, Narang AS, Mahato RI. Subcellular fate and off-target effects of siRNA, shRNA, and miRNA [J]. *Pharm Res*, 2011, 28(12): 2996-3015.
- [8] Felipe AV, Oliveira J, Chang PY, et al. RNA interference: a promising therapy for gastric cancer [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(14): 5509-5515.
- [9] 施小宇, 陶思丰, 陈力, 等. 小干扰 RNA 抑制 CD97 的表达及其对胃癌细胞迁移和侵袭能力的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(7): 1285-1289.
- [10] 李增军, 宋宝, 刘杰, 等. 沉默高迁移族蛋白 B1 基因抑制胃癌 MGC-803 细胞的侵袭转移 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2013, 35(4): 244-248.

- [11] Liu Q, Chen Q, You Q, et al. The siRNA cocktail targeting VEGF and HER2 inhibition on the proliferation and induced apoptosis of gastric cancer cell [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 386(1/2): 117-124.
- [12] Lei T, Han S, Guo XY, et al. The potential role of Id1 in COX-2 mediated angiogenesis in gastric cancer [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2007, 87(22): 1570-1575.
- [13] 郭梅梅, 王永, 韩方海. siRNA 干扰胃癌细胞内源性 VEGF-C 的基因和蛋白表达的实验研究 [J]. *四川大学学报: 医学版*, 2013, 44(5): 740-743.
- [14] 陈枚, 卢先州, 张树友. RNA 干扰 DNA 修复提高肿瘤细胞的放疗敏感性 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2014, 21(2): 227-230.
- [15] 廉超, 杨杰, 王晓通, 等. E2F-1 基因沉默对人胃癌耐药细胞株 SGC-7901/顺铂多药耐药性的逆转 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2014, 36(3): 171-176.

(收稿日期: 2015-05-14 修回日期: 2015-07-04)