

骨桥蛋白 shRNA 表达载体介导的 RNA 干扰 对前列腺癌 PC-3 细胞生长和侵袭的影响

柳 昊, 陈安民, 郭风劲, 廖 晖, 胡伟华, 解 杰

Effect of short-hairpin RNA expression vector-mediated osteopontin RNA interference on proliferation and invasion of prostate cancer PC-3 cells

Hao Liu, An-Min Chen, Feng-Jing Guo, Hui Liao, Wei-Hua Hu and Jie Xie

华中科技大学同济医学院
附属同济医院骨科,
湖北 武汉 430030

Department of Orthopedics,
Tongji Hospital,
Tongji Medical College,
Huazhong University of Science and
Technology,
Wuhan, 430030, Hubei,
P. R. China

通讯作者: 郭风劲

Correspondence to: Feng-Jing Guo
Tel.: 86.27.86708550
Fax: 86.27.83646605
Email: anguo_liu@yahoo.cn

基金项目: 国家“973”重点基础研
究发展规划资助项目 (No.
2002CB513100)

Grant: Major State Basic Research
Development Program of China
(973 Program) (No.
2002CB513100).

收稿日期: 2009-09-10

接受日期: 2009-10-02

[Abstract] **Background and Objective:** Studies showed that osteopontin (OPN) regulates cell migration and invasion in a variety of cancers, which associates with the activities of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9. This study was to investigate the role of OPN in the proliferation and invasion of human prostate cancer PC-3 cells and the possible functions of I- κ B kinase (IKK) in nuclear factor kappa B (NF- κ B)-mediated signaling pathways. **Methods:** OPN short-hairpin RNA (shRNA) recombinant plasmids (PCs) were transfected into PC-3 cells and the different concentrations of IKK inhibitors were used to inhibit the activities of IKK α and IKK β . The mRNA and protein expression levels of OPN, MMP-2, and MMP-9 were detected by real-time PCR and Western blot. The different cell cycles, cell proliferation, and invasion abilities of PC-3 cells were detected by flow cytometry, MTT, and Transwell chamber assays, respectively. **Results:** Compared with untreated cells, the protein expression levels of OPN, MMP-2, and MMP-9 in PC-3 cells transfected with PCs were decreased by 55.22%, 51.71%, and 28.35%, respectively, and the abilities of migration and invasion of PCs were decreased by 45.48% and 51.96%, respectively ($P < 0.05$). Moreover, the inhibition of IKK β activity reduced the expressions of MMP-2 and MMP-9. **Conclusions:** A shRNA expression vector-mediated OPN gene silencing can inhibit the malignant physiological behaviors of PC-3 cells. IKK α may play a crucial role in the OPN-induced activation of MMP-2 and MMP-9 via NF- κ B-mediated I- κ B/IKK β pathway.

Key words: prostate tumor, PC-3 cell, short-hairpin RNA, osteopontin, matrix metalloproteinase, RNA interference, nuclear factor κ B

【摘 要】 背景与目的: 骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 诱导多种恶性肿瘤细胞的浸润和转移与基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)-2 和 MMP-9 的活化密切相关。本研究旨在探讨 OPN 在人前列腺癌 PC-3 细胞的增殖和侵袭过程中的作用以及 I κ B 激酶 (I kappa B kinase, IKK) 在 NF- κ B 介导的信号通道中可能的功能。方法: 将 OPN 短发夹 RNA (short-hairpin RNA, shRNA) 重组质粒转染 PC-3 细胞并应用不同浓度的 IKK 抑制剂分别抑制 IKK α 和 IKK β 的活性, 然后采用实时 PCR 和 Western blot 分别检测 OPN、MMP-2 和 MMP-9 三种 mRNA 和蛋白的表达水平, 流式细胞术、MTT 法和 Transwell 实验分别检测细胞生长周期变化、细胞增殖和侵袭能力。结果: 与对照组相比, 转染重组质粒的细胞中 OPN、MMP-2 和 MMP-9 三种蛋白的表达量分别下降了 55.22%、51.71% 和 28.35% ($P < 0.05$), 凋亡二倍体数目显著增加, 细胞的迁移能力和侵袭能力分别下降了 45.48% 和 51.96% ($P < 0.05$)。此外, 特异性地抑制 IKK β 酶的活性能显著降低 MMP-2 和 MMP-9 的表达水平。结论: shRNA 表达载体介导的 OPN 基因沉默能明显抑制

PC-3 细胞的恶性生物学行为; 在 OPN 诱导 MMP-2 和 MMP-9 活化的过程中,IKK β 酶的活性可能发挥了重要的作用。
 关键词:前列腺肿瘤; PC-3 细胞; 短发夹 RNA; 骨桥蛋白; 基质金属蛋白酶; RNA 干扰; 核因子 κ B
 中图分类号:R737.25;R730.5 文献标识码:A
 文章编号:1000-467X(2010)01-0043-09

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)的过度表达与多种癌症的发生、发展、侵袭和转移密切相关^[1-4]。研究表明在高转移性的人前列腺癌 PC-3 细胞中,OPN 的表达明显升高^[4-7]。OPN 可能通过调节一些降解细胞外基质成分的酶[如 Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 和 MMP-9]的活性来增强细胞的移动和化学侵袭力,为肿瘤细胞的组织浸润及转移提供有利条件^[8-10]。Philip 等^[8]报道 OPN 通过 I κ B α /IKK 信号通路诱导 NF- κ B 介导的 MMP-2 前体的活化。Rangaswami 等^[9]证实 OPN 通过 NF- κ B 介导的信号通道并依赖 MAPK/IKK 来诱导 MMP-9 活化,从而加快 VI 型胶原等细胞外基质的降解,增强鼠类黑色素瘤细胞的迁移力和侵袭力。最近的研究表明在人类前列腺癌 PC-3 细胞中 OPN 调节 MMP-9 的分泌与细胞表面黏性糖蛋白 CD44 信号通道密切相关^[4,10],然而,在 PC-3 细胞的增殖和侵袭过程中,OPN 所扮演的角色以及依赖 NF- κ B 信号通道激活 MMP-2 和 MMP-9 的分子学机制尚未完全阐明。本研究旨在探讨 OPN shRNA (short-hairpin RNA)表达载体介导的体外 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 抑制 OPN、

MMP-2 和 MMP-9 的表达对人前列腺癌 PC-3 细胞生物学行为的影响以及在 NF- κ B 介导的 MMP-2 和 MMP-9 活化过程中 I κ B 激酶(I κ B kinase, IKK)可能的功能,为人类前列腺癌的基因治疗提供潜在的靶点和初步的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人前列腺癌 PC-3 细胞株由武汉大学中国典型培养物保藏中心(CCTCC)引入。Trizol 试剂购于 Invitrogen 公司,RIPA 总蛋白提取液购于 ProMab 公司,逆转录试剂盒购于 Toyobo 公司,DNA 聚合酶为 Fermentas 公司产品,Transwell 购于 Corning 公司,Matrigel 胶购于 BD 公司。DMEM/F12 培养基为 Hyclone 公司产品,IKK 抑制剂Ⅶ为 Merck 公司产品,Lipofectamine 2000 转染试剂盒、胎牛血清购于 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 OPN shRNA 的设计及表达载体的构建
 以人 OPN 的 mRNA 序列(GenBank: J04765.1)为参照设计合成 4 对针对 OPN 基因转录区的 shRNA 序列(表 1),该发夹结构中包含 21 对互补碱基和由 9 个寡核苷酸构成的环以及终止序列。所有序列经 Blast 分析和人类已知的基因序列无同源性。重组质粒(PGPU6/GFP/Neo-OPN)的合成和纯化由上海吉玛制药技术有限公司完成。将 4 种 OPN shRNA 重组质粒分别转染 PC-3 细胞,经 RT-PCR 检测 OPN 的表达量,筛选转染效率较高的重组质粒(PGPU6/GFP/Neo-OPN2)用于后面的实验。

表 1 实验中使用的骨桥蛋白 shRNA 序列

Table 1 Sequences of osteopontin (OPN) short-hairpin RNA (shRNA)

OPN shRNA notation	Targeted OPN mRNA sequence	Loop	Reverse complement sequence	Termination signal	Position in GenBank (J04765.1)
OPN1	CACCGCCATACCACTTAAACAGGCT	TTCAAGAGA	AGCCTGTTTAACTGCTATGCC	TTTTTTG	154
OPN2	CACCGCAGCTTTACAACAAATACCC	TTCAAGAGA	GGGTATTTGTGTAAAGCTGC	TTTTTTG	198
OPN3	CACCGAGCAATGAGCATTCGATGT	TTCAAGAGA	ACATCGGAATGCTCATGCTC	TTTTTTG	825
OPN4	CACCGCCATGAAGATATGCTGTTG	TTCAAGAGA	CAACGCATATCTTCATGCC	TTTTTTG	906

The OPN shRNAs were cloned into eukaryotic expression plasmid PGPU6/GFP/Neo to evaluate the efficiency of OPN gene silencing.

1.2.2 细胞培养和转染 以含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 (1:1)培养基,在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 PC-3 细胞。细胞传代培养 48 h 后在培养基中加入不同浓度的 IKK 抑制剂Ⅶ分别抑制 IKK α 和 IKK β 酶的活性。IKK 抑制剂Ⅶ能渗透细胞膜对

IKK 的活性产生选择性和竞争性抑制 (40 nmol/L 和 200 nmol/L 的 IKK 抑制剂能分别选择性地抑制 IKK β 酶和 IKK α 酶的活性)。细胞转染参照 Lipofectamine 2000 说明书,将重组质粒(PGPU6/GFP/Neo-OPN)和空质粒(PGPU6/GFP/Neo)分别

转染 PC-3 细胞。倒置的荧光显微镜下观察转染的效率超过 75%，培养 48 h 后加入最终浓度为 600 μg/mL 的 G418 筛选获得稳定转染的克隆后,采用有限稀释法挑选转染成功的单个细胞，继续培养传代 15 次后荧光无丢失，表明 PC-3 细胞已经获得 OPN shRNA 重组质粒的稳定转染,命名为 PCs，稳定转染空质粒的细胞命名为 PC0。

1.2.3 实时 PCR 检测 OPN、MMP-2 和 MMP-9 mRNA 的相对表达量 提取对数生长期的细胞总 RNA，去除基因组 DNA，然后行实时荧光定量 PCR 检测。所用引物见表 2。PCR 反应条件:50℃ 2 min，95℃ 10 min,40 个循环 (95℃ 15 s,60℃ 45 s)，然后从 60℃ 10 s 开始,每个循环增加 0.5℃,共 70 个循环。根据扩增曲线和融解曲线,确定平行孔间

误差较小,没有非特异性的扩增时,采用相对荧光 PCR 定量法计算 ΔCt 和 ΔΔCt 值，用 $RQ=2^{\Delta\Delta C_t}$ 表示各组中特定 mRNA 的相对表达量。

1.2.4 Western blot 检测 OPN、MMP-2/MMP-9 和 IKKα/IKKβ 的表达量 分别收集处于对数生长中期的等量各组细胞,使用 RIPA 总蛋白提取液裂解细胞,4℃下 12 000 r/min 离心 5 min (Sigma 3K18 型冷冻离心机),收集上清液,用 BCA 法检测蛋白浓度。取 20~40 μg 蛋白在 300 mA 电流下进行 10% SDS-PAGE 电泳 20 min,转 PVDF 膜,5%无脂牛奶室温封闭 2 h 后，加入一抗 4℃孵育过夜,再添二抗室温孵育 1 h,显色、定影后图像经 UVP 软件采集,Gelwords ID Advanced V 4.01 软件处理。实验中使用的抗体及滴度见表 2。

表 2 实时 PCR 反应中所使用的引物和 Western blot 实验中使用的抗体及滴度
Table 2 Primers used in real-time polymerase chain reaction and antibodies used in Western blot assays

Notation	Primer sequence	Amplification (bp)	Primary antibody titre	Corporation and batch number	Secondary antibody and titre	Target protein (ku)
OPN	Forward, 5'-GTTAAACAGGCTGATTCTGG-3'	193	Rabbit OPN antibody (1:400)	SANTA, SC-20788	Goat anti-rabbit IgG/HRP (1:40 000)	66
	Reverse, 5'-CATGGTCATCATCTTCA-3'					
MMP-2	Forward, 5'-TACACCAAGAACTTCCTCT-3'	153	Mouse MMP-2 antibody (1:300)	ZYMED, 35-1300Z	Goat anti-mouse IgG/HRP (1:30 000)	72
	Reverse, 5'-GCCATCAAATACAATGTCCT-3'					
MMP-9	Forward, 5'-GCAGAGGAATACCTGTACCGC-3'	196	Rabbit MMP-9 antibody (1:500)	SANTA, SC-10737	Goat anti-rabbit IgG/HRP (1:50 000)	92
	Reverse, 5'-AGGTTTGAATCTGCCCAGGT-3'					
GAPDH	Forward, 5'-ACGACCACTTTGTCAAGCTC-3'	210	Mouse GAPDH antibody (1:800)	ProMab, Mab-2005079	Goat anti-mouse IgG/HRP (1:80 000)	37
	Reverse, 5'-GTGAGGAGGGGAGATTCAGT-3'					

MMP, matrix metalloproteinase.

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期变化 取对数生长期细胞,制备单细胞悬液,75%乙醇过夜,PBS 漂洗 3 次后加入 RNaseA (10 mg/L),37℃保温 30 min,碘化丙啶(30 mg/L)避光染色 30 min,流式细胞仪测定细胞各生长周期 G₀/G₁、S、G₂/M 期中 DNA 的含量和凋亡二倍体比率，每组检测 3 个平行样本,取其均数。

1.2.6 MTT 比色法绘制细胞生长曲线 取对数生长期细胞,0.25%胰酶消化,在 96 孔板中每孔加入单细胞悬液 100 μL(约 1×10³ 个细胞),置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。每组设 3 个复孔,同时设立空白组,连续 8 d,每天取样。培养 24 h 后向取样孔中每孔加入浓度为 5 mg/mL 的 MTT 200 μL,继续孵育 4 h,弃上清,每孔加 DMSO 150 μL,振荡 20 min,使结晶充分溶解,在 450 nm 波长的酶联仪上检测各组的吸光度(A)值,实验重复 3 次,计算

各组 A 值的平均值及标准差，再计算细胞生长抑制率,抑制率=(1-实验组平均 A 值/空白组平均 A 值)×100%，细胞生长抑制率均与空白组 PC3 比较,绘制生长曲线。

1.2.7 Transwell 实验 迁移实验:用 6 μg/mL 的明胶包被孔径为 8 μm 的聚碳酸酯滤膜,然后在小室中加入 200 μL 无血清培养基，室温下放置 60 min,待滤膜充分浸润后,将小室置于 24 孔培养板中，每孔中先加入 0.5 mL 含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 (1:1)培养基和 0.5 mL 无血清培养基。将细胞浓度为 5×10⁴/mL 的单细胞悬液 1 mL 加入 Transwell 小室中，在 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 24 h，取出小室用棉签擦去基质胶和上室内的细胞，用 95%乙醇固定 15~20 min，苏木精染色 15 min。于倒置显微镜下计数,每组设 3 个复孔,计算均值和标准差。侵袭实验:用 50 mg/L Matrigel 胶稀释

液(1:8)包被灭菌的 Transwell 小室聚碳酸酯膜上室面,4℃风干。在上室中加入 0.5 mL 含 5×10^4 个 PC-3 细胞的无血清 DMEM/F12 (1:1)培养基。6 孔板下室加入 1 mL 含 10 μ g 纤维连接蛋白的 DMEM 培养基作为化学诱导剂,将培养板置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 48 h。染色和计数方法同迁移实验。

1.3 统计学处理

全部数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据经 SPSS11.0 统计软件处理,组间的比较采用 *t* 检验和方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 OPN shRNA 表达载体下调 OPN、MMP-2 和 MMP-9 的表达

为了验证 OPN shRNA 表达载体是否能下调 OPN 的表达,应用 real-time PCR 检测转染重组质粒的 PC-3 细胞(PCs)中 OPN mRNA 的相对表达量,未转染的前列腺癌 PC-3 细胞(PC3)和转染空质粒的细胞(PC0)作为对照组。结果如图 1A、1B 所示,扩增曲线和融解曲线表明平行孔间误差较小,扩增具有特异性。图 1C 显示,与 PC3 细胞相比,PCs 细胞中 OPN mRNA 表达量下降了 77.82%,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 PC0 细胞和 PC3 细胞之间差异没有统计学意义($P > 0.05$)。为进一步验证 OPN shRNA 是否下调 MMP-2 和 MMP-9 的表达,使用 Western blot 分别检测三组细胞中 OPN、MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达量。结果如图 2 所示,与 PC3 细胞相比,PCs 细胞中 OPN、MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达量分别下降了 55.22%、51.71%和 28.35%,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 PC0 组和 PC3 组细胞之间三种蛋白的表达量差异没有统计学意义($P > 0.05$)。以上结果表明,OPN shRNA 表达载体介导的 OPN 基因沉默在下调 OPN 表达的同时,也能抑制 MMP-2 和 MMP-9 的表达。

2.2 不同浓度的 IKK 抑制剂对 IKK α 和 IKK β 活性及 OPN、MMP-2 和 MMP-9 表达的影响

为了验证 40 nmol/L 和 200 nmol/L 两种不同浓度的 IKK 抑制剂是否能分别抑制 PC-3 细胞中 IKK β 和 IKK α 的活性,实验分为 3 组:(1)使用 200 nmol/L 的 IKK 抑制剂处理的 PC-3 细胞;(2)使用 40 nmol/L 的抑制剂处理的 PC-3 细胞;(3)未处理的 PC-3 细胞。使用 Western blot 检测各组细

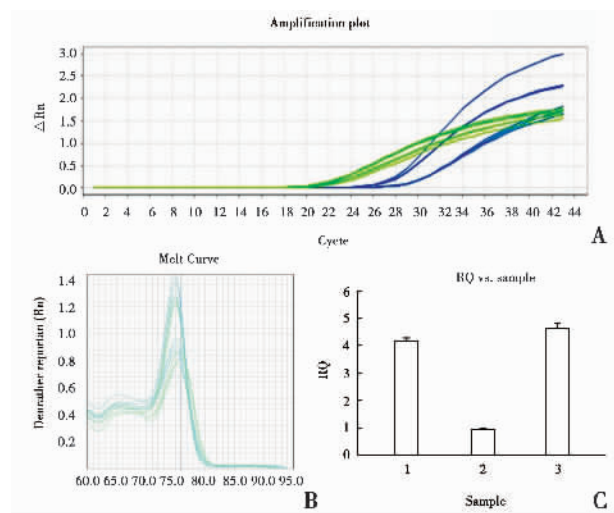


图 1 实时 PCR 检测 PC-3 细胞 OPN mRNA 表达

Figure 1 Osteopontin mRNA expression detected by real-time polymerase chain reaction (PCR)

A, amplification plots; B, melt curves; C, OPN mRNA relative expressions in three groups.

Sample 1, PC3 group; Sample 2, PC0 group; Sample 3, PC0 group.

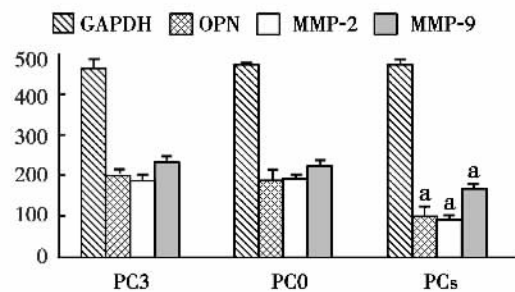
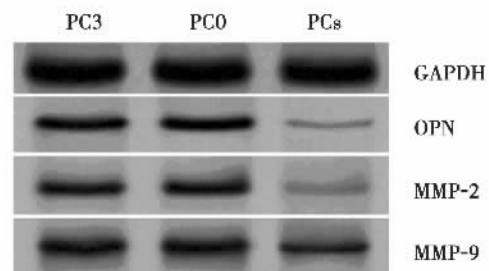


图 2 Western blot 检测 PC-3 细胞 OPN、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达

Figure 2 Expressions of OPN, MMP-2, and MMP-9 proteins detected by Western blot

* $P < 0.05$, vs. PC3 group and PC0 group, respectively.

胞中 IKK α 和 IKK β 的相对表达量,结果显示(图 3),与未处理的 PC-3 细胞相比,200 nmol/L 浓度的 IKK 抑制剂培养的细胞中 IKK α 的表达量减少了 57.89%,而 40 nmol/L 浓度的 IKK 抑制剂

培养的细胞中 IKK β 的表达量减少了 62.24% ($P<0.05$)。

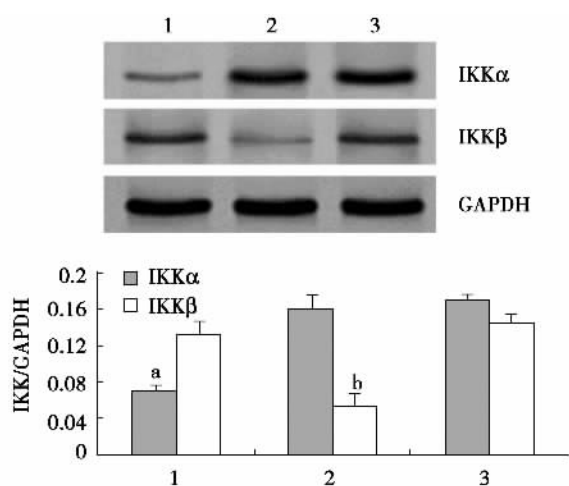


图3 Western blot 检测 PC-3 细胞 IKK α 和 IKK β 的表达
Figure 3 Expressions of IKK α and IKK β proteins detected by Western blot

Group 1, PC-3 cells pretreated with 200 nmol/L IKK inhibitor VII;
Group 2, PC-3 cells pretreated with 40 nmol/L IKK inhibitor VII;
Group 3, untreated PC-3 cells.

^a $P<0.05$, vs. Group 2 and Group 3; ^b $P<0.05$, vs. Group 1 and Group 3.

为了验证 PC-3 细胞中 OPN 调节 MMP-2 和 MMP-9 的活化与 IKK 酶的关系,实验分为 7 组(图 4)。采用实时 PCR 检测各组细胞中 OPN、MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 相对表达量,结果显示见图 4,与未处理的细胞 PC3(第 1 组)相比,特异性地抑制 IKK α 的活性(第 5 组),OPN、MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 表达量的差异没有统计学意义($P>0.05$),而特异性地抑制 IKK β 的活性(第 2 组)虽然对 OPN 的表达也没有明显影响,却导致 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 的相对表达量分别减少了 56.52% 和 44.26% ($P<0.01$),表明特异性地抑制 IKK β 酶的活性能下调 MMP-2 和 MMP-9 的表达。第 4 组与第 2、3 组,第 7 组与第 5、6 组分别进行比较,差异均具有统计学意义($P<0.05$),提示 OPN shRNA 表达载体能下调 OPN、MMP-2 和 MMP-9 的表达,而且抑制 IKK β 酶的活性能增强 OPN shRNA 表达载体对 MMP-2 和 MMP-9 的抑制效应。

Western blot 检测各组细胞中三种蛋白表达量情况和实时 PCR 的检测结果具有相似性(图 5)。特异性地抑制 IKK α 酶的活性(第 5 组与第 1 组比较),三种蛋白的表达量的差异没有统计学意义

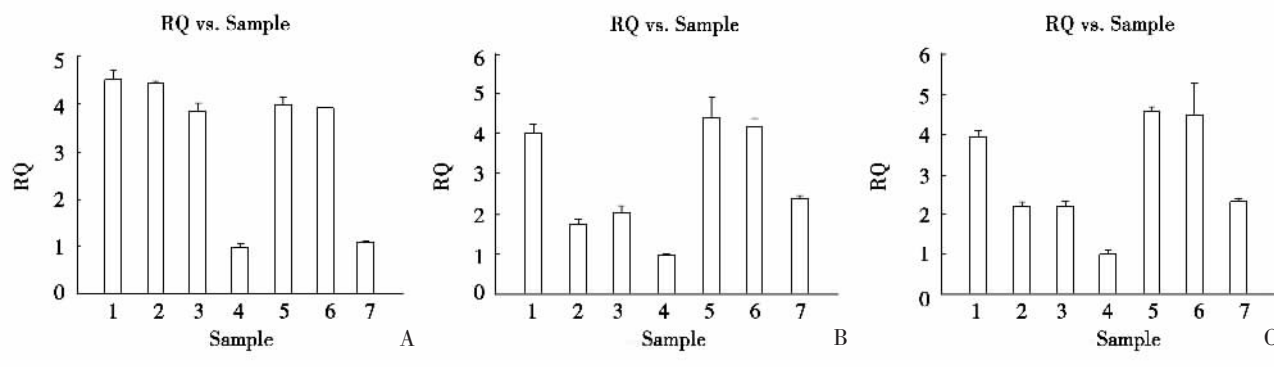


图4 实时 PCR 检测各组细胞中 OPN、MMP-2 和 MMP-9 mRNA 的相对表达量

Figure 4 Relative expressions of OPN, MMP-2, and MMP-9 mRNA in different groups detected by real-time PCR

A, OPN mRNA relative expression; B, MMP-2 mRNA relative expression; C, MMP-9 mRNA relative expression. The experimental groups are as follows: Group 1, PC3 cells; Group 2, PC3 cells treated with 40 nmol/L IKK inhibitor VII; Group 3, PC0 cells pretreated with 40 nmol/L IKK inhibitor VII; Group 4, PCs cells pretreated with 40 nmol/L IKK inhibitor VII; Group 5, PC3 cells treated with 200 nmol/L IKK inhibitor VII; Group 6, PC0 cells pretreated with 200 nmol/L IKK inhibitor VII; Group 7, PCs cells pretreated with 200 nmol/L IKK inhibitor VII.

($P>0.05$), 而特异性地抑制 IKK β 酶的活性(第 2 组与第 1 组比较)虽然对 OPN 蛋白的表达没有影响,却能使 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达分别下调 19.72% 和 25.75% ($P<0.05$)。在抑制 IKK β 酶的活性的同时使用 OPN shRNA 行 RNAi(第 4 组与第 1、2、3 组比较),可见 MMP-2 和 MMP-9 两种蛋白

的表达量分别下降了 55.62% 和 51.47%,差异具有统计学意义($P<0.01$)。

2.3 流式细胞术检测细胞周期变化

选择 PC3、PC0 和 PCs 三组细胞行流式细胞术检测,结果如图 6 和表 3 所示,和 PC3 组比较,PCs 组细胞中凋亡二倍体的 DNA 含量明显高于 PC3 组

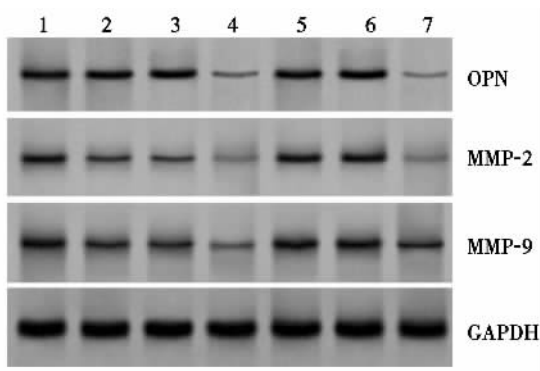


图 5 Western blot 检测各组细胞中 OPN、MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达

Figure 5 Expressions of OPN, MMP-2, and MMP-9 proteins in PC-3 cells detected by Western blot

和 PC0 组,差异有统计学意义 ($P<0.05$),而 G_2/M 期 DNA 含量则显著低于 PC3 组和 PC0 组,差异有统计学意义 ($P<0.05$),PC3 组和 PC0 组相比,两者差异均无统计学意义 ($P>0.05$),表明 OPN shRNA 表达载体抑制了 PC-3 细胞的增殖,细胞分裂周期出现 S 期阻滞,凋亡二倍体数量增加。

2.4 OPN shRNA 表达载体对 PC-3 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

从细胞的生长曲线(图 7)可以看出,培养 48 h 后,PCs 细胞的增殖抑制率明显大于 PC3 和 PC0 细胞,PC0 细胞的生长出现了轻微的抑制现象。实验结果表明 OPN shRNA 对 PC-3 细胞的生长和增殖具有抑制作用。Transwell 结果见表 4 和

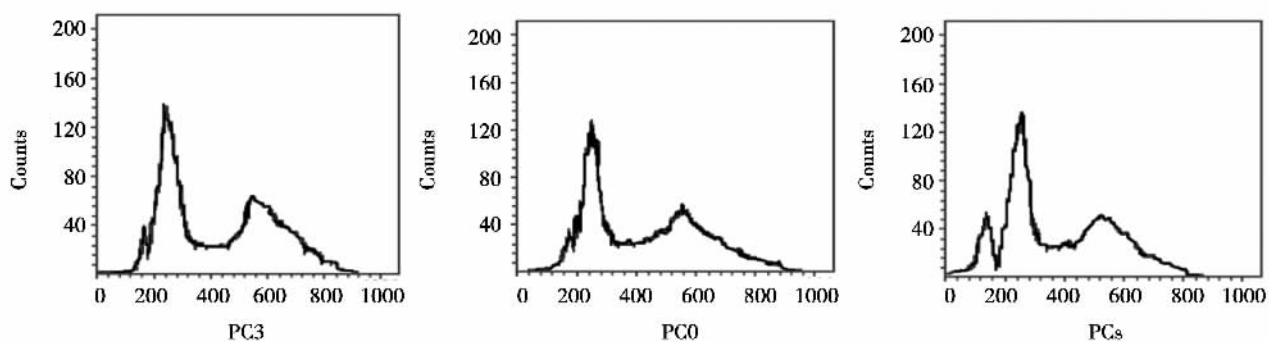


图 6 流式细胞术检测细胞生长周期变化

Figure 6 Cell cycle distribution of PC-3 cells detected by flow cytometry

表 3 流式细胞术检测不同周期 DNA 含量的比率 (%)

Table 3 Analyses of DNA quantities in different cell cycles by flow cytometry (%)

Group	Hypodiploid DNA	G_0/G_1 phase	S phase	G_2/M phase
PC3	3.61 ± 0.83	40.23 ± 0.54	14.26 ± 1.16	41.90 ± 2.52
PC0	3.40 ± 0.76	37.83 ± 1.71	18.80 ± 1.56	39.97 ± 0.91
PCs	8.52 ± 1.04^a	43.40 ± 1.07	15.76 ± 1.28	32.33 ± 0.83^a

^a $P<0.05$, vs. PC3 group. Each group was assayed in triplicate experiments.

图 8,与 PC3 细胞相比,PCs 细胞的迁移能力和侵袭能力分别下降了 45.48%和 51.96% ($P<0.05$),而 PC0 细胞与 PC3 细胞之间差异没有统计学意义 ($P>0.05$)。实验结果表明 OPN shRNA 重组质粒能抑制 PC-3 细胞中 OPN、MMP-2 和 MMP-9 的表达,导致细胞的增殖、迁移和侵袭能力减弱。

3 讨论

前列腺癌是容易发生骨转移的恶性肿瘤之一,

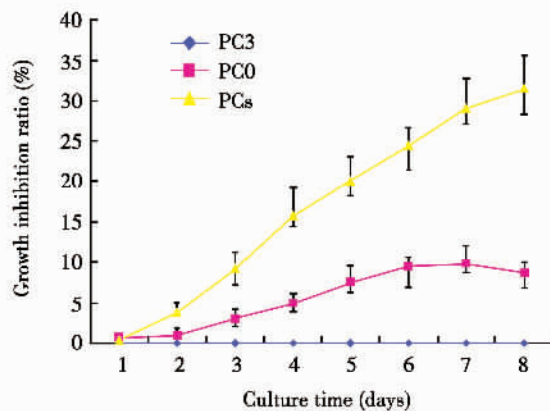


图 7 三组细胞生长曲线

Figure 7 Growth curves of PC-3 cells in three groups

因此识别和确定与其进展有关的靶基因对提高前列腺癌的治愈率是很有必要的。OPN 是首先在骨基质中发现的一种分泌型糖基化磷蛋白,它具有趋化因子和细胞因子的双重作用^[11]。OPN 含有的 N 基端是由 9 个连续的天门冬氨酸组成的高度酸

表 4 三组之间的增殖、迁移和侵袭力比较
Table 4 Comparision of cell proliferation, migration, and invasion of three groups

Group	Proliferation		Migration		Invasion	
	Culture for 5 days ($\bar{x}\pm s$)	Inhibition rate of proliferation (%)	The number of transmembrane ($\bar{x}\pm s$)	Inhibition rate of migration (%)	The number of transmembrane ($\bar{x}\pm s$)	Inhibition rate of invasion (%)
PC3	3.31±0.02	0	151.0 ± 2.16	0	127.67±7.12	0
PC0	3.06±0.75	7.50	143.67±10.98	4.85	125.67±8.52	1.57
PCs	2.65±2.04	20.24 ^a	82.33± 6.38	45.48 ^a	61.33±7.52	51.96 ^a

^a*P*<0.05, vs. PC3 group.

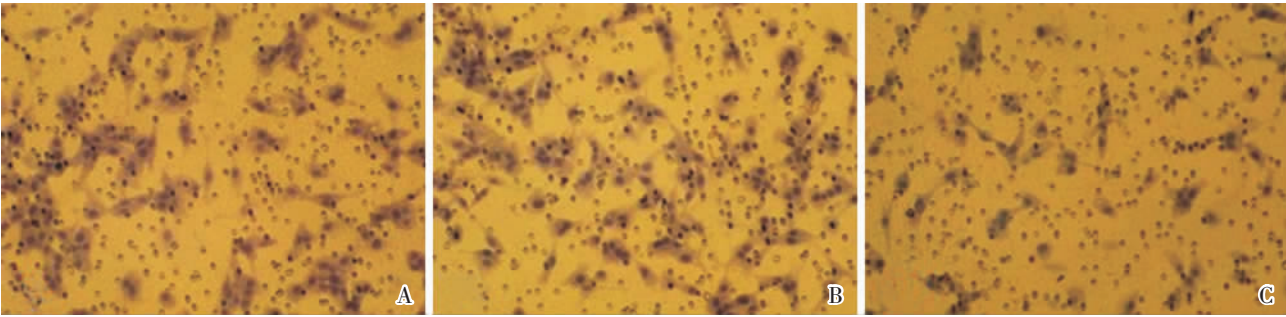


图 8 Transwell 实验检测三组细胞的侵袭能力

Figure 8 Invasion abilities of PC-3 cells in three groups detected by Transwell assays (×400)

After stained with hematoxylin, the PC-3 cells are presented as irregular fusiform shape. The number of cells in picture A, B, and C are 114, 124, and 72, respectively. A, PC3 group; B, PC0 group; C, PCs group.

性区和一个 β -片层结构修饰的 GRGDS 细胞黏性序列构成, 该基团与骨骼中的羟基磷灰石具有较高的亲和力^[12]。OPN 对肿瘤细胞的生长和转移的调控作用是很复杂的, 有些机制目前还不完全清楚。研究发现 OPN 通过激活 PI3K/AKT 和 ERK1/2 促进肿瘤细胞的血管生成, 从而增强瘤细胞的增殖和侵袭能力^[13]。近年的研究表明 OPN 表达水平高低与多种癌症的转移和复发率密切相关^[1,14], OPN 的过度表达能使良性的乳腺上皮细胞发生恶性变趋势^[15], 而 OPN 表达的下调能减少裸鼠结肠瘤的形成和溶骨性转移的概率^[16], 反义 OPN 基因则能抑制鼠类成纤维细胞中 OPN 的合成并防止其转化成肿瘤细胞^[10]。为了进一步探讨 OPN 对人前列腺癌 PC-3 细胞生物学行为的影响及其作用机制, 本实验利用 OPN shRNA 重组质粒对人前列腺癌 PC-3 细胞成功实施 RNAi, 显著下调了 PC-3 细胞中 OPN 的表达水平。

RNAi 技术是将与目的基因的转录产物 mRNA 具有同源互补序列的双链 RNA (double strand RNA, dsRNA) 导入细胞内, 特异性地降解该 mRNA, 从而抑制相应的功能蛋白的表达。它是一种转录后基因沉默, 是肿瘤基因治疗的重要手段

之一^[17]。目前应用于哺乳类动物的 RNAi 技术主要有两种: 一种是体外转录或化学合成干扰性小 RNA (small interfering RNA, siRNA) 后, 再经脂质体或病毒等载体转染细胞从而介导 RNAi; 另一种是通过 shRNA 表达载体转染细胞后形成的发夹式 siRNA 诱导 RNAi^[18]。ShRNA 不仅成本低, 而且不易受 RNA 酶污染, 它导入细胞后在 RNA 酶的作用下能持续稳定地表达发夹式 siRNA, 因此延长了在细胞内的 RNA 干扰作用时间^[19]。本实验中使用的真核表达质粒 pGPU6/GFP/Neo 中包含有人类 U6 RNA 聚合酶 III 启动子, 在单一启动子和终止序列作用下能产生大量的 siRNA 干扰片段, 而位于启动子下游的 shRNA 在 RNAi 质粒进入宿主表达后, 与单链的 RNA 配对形成短的 dsRNA, 引发 RNAi。该质粒含有 GFP 基因和 Neo 基因, 前者在细胞内表达绿色荧光蛋白, 借此能方便判断载体的转染效率, 而利用后者则可以经 G418 筛选出阳性克隆重组子。

本实验首次在体外培养的前列腺癌 PC-3 细胞中, 利用 OPN shRNA 重组载体成功实施 RNAi。实验结果显示转染 OPN shRNA 重组质粒的细胞中 OPN、MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 和蛋

白表达水平明显低于对照组,而空载体转染组与空白对照组之间没有显著性差异,表明 OPN shRNA 介导的基因沉默不仅能下调 OPN 的表达,而且能抑制 MMP-2 和 MMP-9 的表达。流式细胞术、MTT 比色法以及 Transwell 实验结果显示转染重组质粒后 PC-3 细胞生长出现 S 期停滞,凋亡二倍体数量显著增加,细胞增殖、迁移和侵袭能力明显减弱,而且其降低程度和三种蛋白的表达量密切相关。本实验证实 OPN shRNA 表达载体能成功抑制 PC-3 细胞的恶性表型,该方法为人类前列腺癌的基因治疗提供了初步的实验依据。

转录因子 NF- κ B 家族是基因转录的重要调控因子,其中 IKK 是由两个催化亚基 IKK α 和 IKK β 构成的高分子复合蛋白,它是调节 I κ B 的磷酸化和 NF- κ B 活化的重要功能性激酶^[20]。基质金属蛋白酶家族是细胞外基质的降解酶,它在胚胎的发生、组织的重塑性、炎症和血管的形成中起关键性作用,其中 MMP-2 和 MMP-9 涉及肿瘤细胞的侵袭、肿瘤生长和转移等重要过程^[7,9,21]。Philip 等^[7,8]报道在鼠类的黑色素瘤细胞中 OPN 诱导 MMP-2 和 MMP-9 的活化与 NF- κ B 介导的 I κ B α /IKK 信号通道以及 MAPK/IKK α 信号通道密切相关。然而早些时候 Mercurio 等^[20]在人类宫颈癌细胞的研究中发现,IKK α 影响 NF- κ B 依赖的受体激活,表现为其功能与 IKK 激酶在 NF- κ B 信号通路中的重要功能相一致。我们利用人类前列腺癌 PC-3 细胞研究显示,抑制 IKK α 酶的活性对 OPN、MMP-2 和 MMP-9 的表达没有明显影响,而抑制 IKK β 酶的性能显著降低 MMP-2 和 MMP-9 的表达,而且 OPN shRNA 和 IKK β 抑制剂联合应用能更为显著地下调 MMP-2 和 MMP-9 的表达,因此,我们认为在 NF- κ B 介导 OPN 下调 MMP-2 和 MMP-9 的过程中,IKK β 酶的活性起到了关键性的作用。这一结论与 Philip^[8]和 Rangaswami 等^[9]的报道不完全一致,而与 Mercurio 等^[20]的报道相符合。此外,我们发现虽然抑制 OPN 的表达能下调 MMP-2 和 MMP-9 的表达,然而两者下调的幅度却明显不同,由此我们推测 OPN 诱导 MMP-2 和 MMP-9 的表达是由多个信号通道共同作用的结果,其中既有共同的通道也有独立的通道,进一步明确两者的调控机制是我们实验室继续研究的课题之一。

综上所述,本研究利用人类前列腺癌 PC-3 细胞探讨 OPN shRNA 表达载体介导 OPN 基因沉默

的可行性,并且成功建立稳定转染 PGPU6/GFP/Neo-OPN2 重组质粒的前列腺癌细胞系 PCs。本实验证实 shRNA 表达载体介导的 OPN 基因沉默不仅能下调人前列腺癌 PC-3 细胞 OPN、MMP-2 和 MMP-9 的表达水平,而且显著地抑制了 PC-3 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。此外,本实验利用 PC-3 细胞初步揭示在 NF- κ B 介导的 MMP-2 和 MMP-9 的活化过程中 IKK β 酶的活性起到了关键的作用。

[参 考 文 献]

- [1] Rittling SR, Chambers AF. Role of osteopontin in tumour progression [J]. Br J Cancer, 2004,90(10):1877-1881.
- [2] Rudland PS, Platt-Higgins A, El-Tanani M, et al. Prognostic significance of the metastasis-associated protein osteopontin in human breast cancer [J]. Cancer Res, 2002,62(12):3417-3427.
- [3] Shimada Y, Watanabe G, Kawamura J, et al. Clinical significance of osteopontin in esophageal squamous cell carcinoma: comparison with common tumor markers [J]. Oncology, 2005,68(2-3):285-292.
- [4] Desai B, Rogers MJ, Chellaiah MA. Mechanisms of osteopontin and CD44 as metastatic principles in prostate cancer cells [J]. Mol Cancer, 2007,6:18.
- [5] Jain A, McKnight DA, Fisher LW, et al. Small integrin-binding proteins as serum markers for prostate cancer detection [J]. Clin Cancer Res, 2009,15(16):5199-5207.
- [6] Castellano G, Malaponte G, Mazzarino MC, et al. Activation of the osteopontin/matrix metalloproteinase-9 pathway correlates with prostate cancer progression [J]. Clin Cancer Res, 2008,14(22):7470-7480.
- [7] Thalmann GN, Sikes RA, Devoll RE, et al. Osteopontin: possible role in prostate cancer progression [J]. Clin Cancer Res, 1999,5(8):2271-2277.
- [8] Philip S, Kundu GC. Osteopontin induces nuclear factor kappa B-mediated promatrix metalloproteinase2 activation through I kappa B alpha /IKK signaling pathways, and curcumin (diferulolylmethane) down-regulates these pathways [J]. J Biol Chem, 2003,278(16):14487-14497.
- [9] Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Nuclear factor-inducing kinase plays a crucial role in osteopontin-induced MAPK/I kappa B alpha kinase-dependent nuclear factor kappa B-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation [J]. J Biol Chem, 2004,279(37):38921-38935.
- [10] Desai B, Ma T, Zhu J, et al. Characterization of the expression of variant and standard CD44 in prostate cancer cells: identification of the possible molecular mechanism of CD44/MMP9 complex formation on the cell surface [J]. J Cell Biochem, 2009,108(1):272-284.
- [11] Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse

- functions [J]. FASEB J, 1993,7(15):1475-1482.
- [12] Prince, CW. Secondary structure predictions for rat osteopontin [J]. Connect Tissue Res, 1989,21(1-4):15-20.
- [13] Dai J, Peng L, Fan K, et al. Osteopontin induces angiogenesis through activation of PI3K/AKT and ERK1/2 in endothelial cells [J]. Oncogene, 2009,28(38):3412-3422.
- [14] 崔伯康, 张昌卿, 张 颖, 等. 骨桥蛋白检测对预测肝细胞癌转移复发的意义 [J]. 癌症, 2006,25(7):876-978.
- [15] Coppola D, Szabo M, Boulware D, et al. Correlation of osteopontin protein expression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(1 Pt 1):184-190.
- [16] Gardner HA, Berse B, Senger DR. Specific reduction in osteopontin synthesis by antisense RNA inhibits the tumorigenicity of transformed Rat 1 fibroblasts [J]. Oncogene, 1994,9(8):2321-2326.
- [17] Paul CP, Good PD, Winer I, et al. Effective expression of small interfering RNA in human cells [J]. Nat Biotechnol, 2002,20(5):505-508.
- [18] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells [J]. Science, 2002,296(5567):550-553.
- [19] Wadhwa R, Kaul SC, Miyagishi M, et al. Know-how of RNA interference and its applications in research and therapy [J]. Mutat Res, 2004,567(1):71-84.
- [20] Mercurio F, Zhu H, Murray BW, et al. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I kappa B kinases essential for NF-kappa B activation [J]. Science, 1997,278(5339):860-866.
- [21] Scorilas A, Karameris A, Arnogiannaki N, et al. Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients [J]. Br J Cancer, 2001,84(11):1488-1496.

[编辑:张 菊;校对:杨允贵]