

反义RNA对胃癌细胞MT1-MMP基因表达和侵袭性的抑制作用

胡楠, 周晓武, 付汉江, 邢瑞云, 孔维, 郑晓飞

■背景资料

膜型1-基质金属蛋白酶(MT1-MMP)与肿瘤侵袭转移关系密切, 他的基因高表达促进胃癌侵袭与转移, 其主要作用是激活明胶酶A, 同时还直接降解细胞外基质、调节黏附分子和促进肿瘤新生血管的形成。

胡楠, 周晓武, 中国人民解放军空军总医院普通外科 北京市 100036

付汉江, 邢瑞云, 郑晓飞, 军事医学科学院放射医学研究所 北京市 100850

胡楠, 孔维, 吉林大学生命科学学院 吉林省长春市 130023

胡楠, 在读硕士研究生, 主要进行基因治疗的研究。

空军“十一五”重点科研课题资助项目, No. KJZ20013022

通讯作者: 周晓武, 100036, 北京市海淀区阜成路30号, 中国人民解放军空军总医院普通外科. drzhouxiaowu@sina.com

电话: 010-68410099-6301

收稿日期: 2007-01-18 接受日期: 2007-02-13

Inhibitory effect of antisense RNA on the gene expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and invasiveness of human gastric carcinoma cells

Nan Hu, Xiao-Wu Zhou, Han-Jiang Fu, Rui-Yun Xing, Wei Kong, Xiao-Fei Zheng

Nan Hu, Xiao-Wu Zhou, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA Air Force, Beijing 100036, China

Han-Jiang Fu, Rui-Yun Xing, Xiao-Fei Zheng, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China

Nan Hu, Wei Kong, College of Life Science, Jilin University, Changchun 130023, Jilin Province, China

Supported by the Key Scientific Research Foundation of Chinese PLA Air Force during the 11th Five-Year Plan Period, No. KJZ20013022

Correspondence to: Xiao-Wu Zhou, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA Air Force, Beijing 100036, China. drzhouxiaowu@sina.com

Received: 2007-01-18 Accepted: 2007-02-13

Abstract

AIM: To investigate the influence on the gene expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and invasiveness of human gastric carcinoma cell line BGC823 by antisense RNA.

METHODS: The eukaryotic expression vector carrying MT1-MMP antisense RNA was constructed with recombinant technology and then transfected into human gastric cancer cell line BGC823. The changes of MT1-MMP mRNA ex-

pression, cell proliferation, activation of gelatinase A and cell invasion ability were examined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), MTT assay, zymography and Transwell invasion assay, respectively.

RESULTS: The eukaryotic expression vector (named pasMMP14) containing MT1-MMP antisense RNA was successfully constructed and transfected into BGC823 cells. The expression of MT1-MMP mRNA was down-regulated with an inhibitory rate of 36%, in comparison with that in negative control group. At the 48th hour after transfection with pasMMP14, the activity of gelatinase A was dramatically inhibited. After 72 hours, cell proliferation was significantly decreased as compared with that in pcDNA3.0 group and normal control group ($t = 2.358$, $P < 0.01$; $t = 2.727$, $P < 0.01$). Transwell invasion assay showed that the invasive property was greatly suppressed in pasMMP14-transfected group as compared with that in pcDNA3.0 group and normal control group ($t = 5.744$, $P < 0.01$; $t = 5.695$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Antisense RNA can evidently inhibit the gene expression of MT1-MMP and invasiveness of gastric cancer cells, suggesting that MT1-MMP gene may be a molecular target of anti-invasion therapy for gastric cancer.

Key Words: Membrane type-1 matrix metalloproteinase; Antisense RNA; Human gastric carcinoma cell; Reverse transcription-polymerase chain reaction; MTT assay; Zymography; Transwell invasion assay

Hu N, Zhou XW, Fu HJ, Xing RY, Kong W, Zheng XF. Inhibitory effect of antisense RNA on the gene expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and invasiveness of human gastric carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(13):1470-1474

摘要

目的: 膜研究膜型-1基质金属蛋白酶(MT1-MMP)反义RNA对人胃癌细胞BGC823靶基因

表达和侵袭特性的影响.

方法: 利用基因重组技术构建人MT1-MMP反义RNA真核表达载体, 转染人胃癌细胞BGC823, 应用RT-PCR、MTT、明胶酶谱和体外侵袭实验等方法观察人胃癌细胞BGC823转染前后, MT1-MMP mRNA表达水平、细胞生长、明胶酶A活性及细胞体外侵袭能力等指标的变化.

结果: 成功构建了MT1-MMP反义RNA真核表达载体pasMMP14, 将其转染胃癌细胞BGC823后, 与阴性对照组相比, 实验组MT1-MMP mRNA表达水平降低, 抑制率为36%. 转染48 h, 明胶酶A的活化受到了明显抑制. 转染72 h, 细胞增殖明显受抑($t = 2.358$, $P < 0.01$ vs 空白组; $t = 2.727$ $P < 0.01$ vs 阴性组). 实验组的穿膜细胞数明显低于空白对照组和阴性对照组($t = 5.744$, $P < 0.01$; $t = 5.695$, $P < 0.01$).

结论: 反义RNA对人胃癌细胞MT1-MMP基因表达和侵袭能力具有明显的抑制作用, MT1-MMP基因可作为胃癌抗侵袭治疗的分子靶点.

关键词: 膜型1-基质金属蛋白酶; 反义RNA; 人胃癌细胞; 逆转录-聚合酶链反应; MTT法; 明胶酶谱; 体外侵袭实验

胡楠, 周晓武, 付汉江, 邢瑞云, 孔维, 郑晓飞. 反义RNA对胃癌细胞MT1-MMP基因表达和侵袭性的抑制作用. 世界华人消化杂志 2007;15(13):1470-1474

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1470.asp>

0 引言

肿瘤侵袭与转移是一个多步骤、多环节的过程, 涉及肿瘤细胞与宿主之间复杂的相互作用, 多种基因及其产物参与这一过程的调控, 而细胞外基质和基底膜的降解是其中的关键环节. MT1-MMP是第一个鉴定出的膜型基质金属蛋白酶, 其功能是激活明胶酶A, 促进明胶酶A对基底膜成分如IV型胶原和层黏连蛋白的降解, 且其自身也发挥降解细胞外基质的作用^[1-2]. 目前的研究表明, MT1-MMP在胃癌组织中的高表达促进了胃癌的直接侵袭和远处转移^[3-4], 我们先前的研究也得出了类似的结论^[5-6]. 本实验通过构建抑制MT1-MMP表达的反义RNA真核表达载体, 脂质体导入人胃癌细胞系BGC823, 研究其对胃癌细胞MT1-MMP基因表达和侵袭能力的影响, 探讨MT1-MMP基因可否成为胃癌抗侵

袭治疗的分子靶点.

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞BGC823由本实验室保存; 真核表达载体pcDNA3.0购于Invitrogen; *EcoR* I和*Bam* H I限制性内切酶购于TaKaRa公司; RT-PCR试剂盒购于Invitrogen公司; DMEM、胎牛血清购于美国Gibco公司; 脂质体Lipofectmine2000购于Invitrogen公司; 四甲基偶氮唑蓝(MTT)购于Sigma公司; YM-30离心超滤管30KD购于Millipore公司; Transwell细胞培养小室购于Costar公司; Matrigel胶购于美国BD公司; 引物序列由上海生工生物技术有限公司合成.

1.2 方法

1.2.1 pasMMP14反义载体的构建 Trizol试剂抽提细胞总RNA, 操作按说明书进行. 取1 μ g RNA反转录合成cDNA. 以MT1-MMP的cDNA全长为模板, 参考文献中的引物F1: 5'CCGGAATTC AAGTTCAGTGCCTACCGAAG3' F2: 5'CGCGG ATCCCTTGTCTGGAACACCACATC3' (5'端含有*EcoR* I, *Bam* H I酶切位点)扩增407 bp MT1-MMP cDNA片段^[7]. 目的片段经琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收后, *EcoR* I, *Bam* H I双酶切, 反向连接到pcDNA3.0真核表达载体上, 转化JM109感受态. 对菌落PCR鉴定的阳性克隆进行双酶切和测序鉴定.

1.2.2 细胞培养与转染 胃癌细胞用含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基在37℃, 50 mL/L CO₂条件下培养. 待细胞长至对数生长期且80%融合时, 分别将载体pcDNA3.0和反义载体pasMMP14转染细胞. 操作按照Lipofectmine2000试剂的说明书进行转染.

1.2.3 RT-PCR检测MT1-MMP mRNA的表达 在6孔板中每孔接种 4×10^5 细胞, 培养24 h. 取2 μ g载体pcDNA3.0和反义载体pasMMP14转染细胞. 转染48 h后, TRIzol试剂提取细胞总RNA, 步骤按说明书. RNA沉淀于1 g/L DEPC处理水中, 紫外分光光度计测定浓度. 42℃恒温60 min进行逆转录反应后, 70℃加热15 min, 灭活逆转录酶活性. MT1-MMP引物: 5'CTTTTCCATCCCCTGACATACC 3'(上游), 5'CTGACTGAGCAACGAAGACCCT 3'(下游); 内参 β -actin的引物: 5'GAAGGTGAAGGTCGGAGTC 3'(上游), 5'GAAGATGGTGATGGGATTTC 3'(下游). PCR条件均为: 94℃, 5 min; 94℃, 30 s; 60℃,

■ 研发前沿

通过构建反义RNA载体来抑制肿瘤MT1-MMP基因表达并进而抑制肿瘤的侵袭性仅在卵巢癌研究中有报道, 但未见在胃癌研究的报道.

■创新盘点

成功构建真核表达的反义RNA载体, 转染胃癌细胞, 通过抑制MT1-MMP基因表达, 使明胶酶A活化受到抑制, 细胞增殖受抑, 最后细胞侵袭性受到抑制。即采用反向遗传学方法进一步阐明了MT1-MMP与胃癌侵袭和转移的关系, 同时为后续的以MT1-MMP为靶标进行胃癌的基因治疗奠定了良好的实验基础。

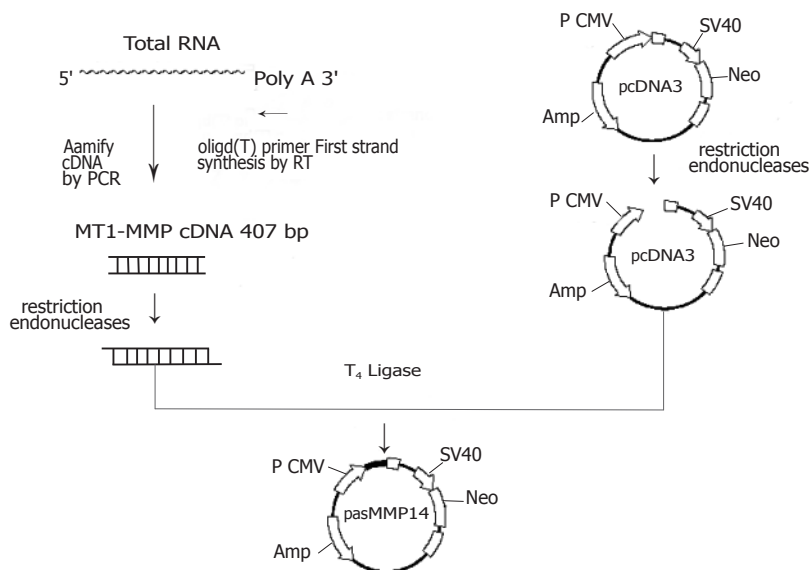


图1 pasMMP14反义载体的构建流程。

30 s; 72℃, 30 s(共30个循环); 72℃, 10 min. pcDNA3.0、paMMP14中MT1-MMP的扩增产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳和凝胶分析系统观察并照像。

1.2.4 明胶酶谱法分析明胶酶A的活性 将生长状态良好的细胞, 分散后制成单细胞悬液, 按每孔 1×10^5 个细胞的密度接种于24孔细胞培养板中, 培养12 h. 弃去培养液, PBS洗2次后, 换成1 mL无血清培养液继续培养, 12 h后转染. 分别收集转染后0, 12, 24, 36, 48 h的条件细胞培养液. 取1 mL此条件培养液用蛋白浓缩柱浓缩至约20 μ L, 与2 \times SDS样品缓冲液等体积混合. 上样50 μ g于100 g/L聚丙烯酰胺凝胶(含1 g/L明胶)在4℃、恒压120 V条件下电泳后, 凝胶置TritonX-100中漂洗30 min, 浸入反应缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl₂)37℃孵育18 h, 5 g/L考马斯亮蓝R250染色、脱色至蓝色背景下显现出清晰的白色条带为止, 在光密度扫描下扫描摄片。

1.2.5 MTT比色法测定细胞生长曲线 将生长状态良好的细胞, 分散后制成单细胞悬液, 按每孔 4×10^3 个细胞的密度接种于96孔细胞培养板中, 培养24 h后转染pasMMP14反义载体. 分别于不同时间点每孔加入20 μ L新配制的MTT(0.5 g/L). 于37℃继续孵育4 h后, 弃去MTT液, 加入150 μ L DMSO混合均匀, 用酶联免疫检测仪测定各孔在492 nm波长的A值, 并计算平均值。

1.2.6 细胞体外侵袭能力检测 将24孔板中的Transwell小室预冷至4℃. 取出Transwell培养板(膜孔径8.0 μ m)在下室加入500 μ L无血清NIH3T3细胞培养上清作趋化因子, Transwell杯

底部加入50 μ L无血清DMEM稀释的Matrigel, 37℃、30 min条件下风干, 使之在微孔滤膜上重组为基底膜结构. 上室加入正常细胞、转染pcDNA3.0及pasMMP14细胞的细胞悬液, 细胞数量为 1×10^5 mL, 50 mL/L CO₂, 37℃条件下, 培养24 h后轻轻拭去杯底部Matrigel和未浸润的细胞, 950 mL/L乙醇固定30 min, 结晶紫染色, 光镜下观察并随机选取4个视野, 计数穿膜细胞数并取其平均值, 以穿膜细胞的相对数目代表侵袭力。

统计学处理 数据用mean \pm SD表示, 采用SPSS11.0软件进行t检验统计分析, $P < 0.05$ 具有显著性差异。

2 结果

2.1 pasMMP14重组质粒的构建及酶切、测序鉴定 应用RT-PCR技术以BGC823细胞的cDNA为模板, 以含EcoR I BamH I 酶切位点的引物扩增出407 bp MT1-MMP片段. 目的片段经琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收后, EcoR I BamH I 双酶切, 反向连接到pcDNA3.0真核表达载体上, 转化JM109感受态, 得到阳性克隆(pasMMP14反义载体的构建流程如图1). 对菌落PCR鉴定的阳性克隆进行双酶切(图2)和测序鉴定. 结果表明, 成功构建了pasMMP14反义载体。

2.2 pasMMP14的转染对BGC823细胞MT1-MMP的影响 采用半定量RT-PCR技术检测MT1-MMP和内参 β -actin的mRNA的表达水平(图3). 结果显示, 与阴性对照组相比, 实验组的细胞MT1-MMP的mRNA表达明显受抑, 抑制率为36%。

2.3 pasMMP14的转染对BGC823细胞明胶酶A

表 1 pasMMP14的转染对BGC823细胞生长的影响(means \pm SD)

分组	A ₄₉₂			
	12 h	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0.17 \pm 0.01	0.24 \pm 0.01	0.60 \pm 0.01	0.70 \pm 0.02
阴性对照组	0.12 \pm 0.01	0.24 \pm 0.01	0.46 \pm 0.03	0.66 \pm 0.02
实验组	0.15 \pm 0.01	0.24 \pm 0.02	0.42 \pm 0.0	0.57 \pm 0.03 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs 空白对照组; ^d $P < 0.01$ vs 阴性对照组.

活性的影响 进行以明胶为底物的zymography分析, 结果显示, 在转染48 h的时候, pasMMP14的转染抑制了BGC823细胞中明胶酶A的活化(图4), 表明这种抑制作用是存在时间依赖性的.

2.4 pasMMP14的转染对BGC823细胞生长的影响 MTT比色法检测结果显示(表1), 与空白组和阴性对照组相比, 在转染后72 h时实验组细胞的生长得到明显抑制($t = 2.358$, $P < 0.01$; $t = 2.727$ $P < 0.01$). 空白组和阴性对照组相比较没有显著差异($P > 0.05$).

2.5 pasMMP14的转染对BGC823细胞侵袭能力的影响 如果图5所示, 通过计数转染前后穿过人工基底膜的细胞数并进行比较后, 发现实验组穿过人工基底膜的细胞数明显减少(89 ± 8.4), 与空白对照组(140 ± 15.6)和阴性对照组(130 ± 11.7)比较具有显著差异($t = 5.744$, $P < 0.01$; $t = 5.695$, $P < 0.01$). 而阴性对照组和实验组比较无显著差异($P > 0.05$).

3 讨论

现已知的膜型基质金属蛋白酶(membrane-type matrix metalloproteinase, MT-MMP)有6种, MT1-MMP是1994年Sato *et al*^[8]首次克隆鉴定的MT-MMP家族第一个成员, 该基因定位于14q11, 全长大于10 kb, 由10个外显子和9个内含子组成, 编码582个氨基酸^[9]. 目前, 被认为是基质金属蛋白酶家族中与肿瘤侵袭转移关系最密切的酶^[1-2]. 探讨MT1-MMP与胃癌侵袭与转移机制的关系成为近年来研究热点之一, 目前的研究可以得出如下结论: MT1-MMP基因及蛋白的高表达促进胃癌的局部侵袭和远处转移^[3-6], 且与明胶酶A的活性密切相关, 他主要是作为明胶酶A的激活物, 促进明胶酶A活化而发挥降解基底膜作用, 同时本身也参与细胞外基质的降解, 调节黏附分子的作用和促进肿瘤新生血管的生成^[1-2, 10-12].

反义RNA是一种能与靶基因mRNA特异互补结合, 并抑制靶基因功能的小片段RNA. 自

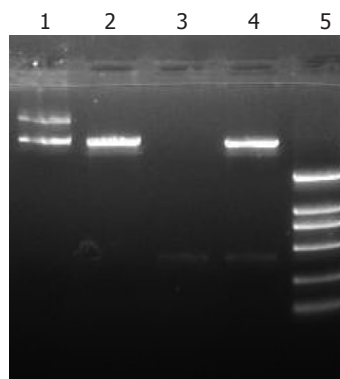


图 2 pasMMP14重组质粒的构建. 1: 重组质粒 pasMMP14; 2: *EcoR* I *Bam* H I 双酶切pcDNA3.0; 3: *EcoR* I *Bam* H I 双酶切MMP14目的片段; 4: *EcoR* I *Bam* H I 双酶切 pasMMP14; 5: DL2000 DNA Marker.

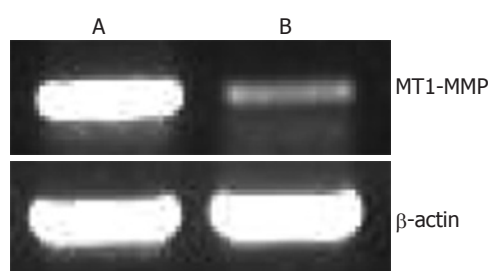


图 3 半定量RT-PCR方法检测BGC823细胞转染48 h后MT1-MMP mRNA的表达. A: 阴性对照组; B: 实验组.

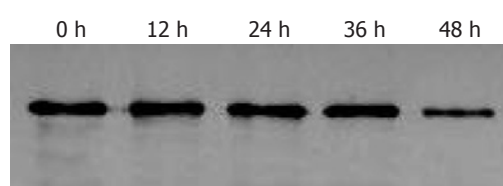


图 4 明胶酶谱法分析BGC823细胞转染后不同时间明胶酶A活性的变化.

从1980年代初发现反义RNA以来, 他被作为一种调控特定基因表达的手段, 进行了广泛的研究. 近年来, 反义技术被广泛应用于肿瘤基因的研究中. 通过构建反义RNA表达载体封闭肿瘤相关癌基因或细胞因子表达, 抑制肿瘤生长的反义基因治疗方案已进入临床实验阶段^[13]. 有关MT1-MMP反义RNA用于胃癌的侵袭研究尚未见报道, 为了寻找胃癌基因治疗的理想方案, 本实验中将MT1-MMP基因反义片段以定向克

同行评价

业已证实, MT1-MMP是胃癌侵袭转移过程中的关键因素, 但MT1-MMP反义RNA对胃癌细胞侵袭的影响尚不清楚. 该文应用基因重组技术、细胞转染、RT-PCR、MTT、明胶酶谱等诸多先进的分子生物学方法研究发现, 反义RNA对胃癌细胞MT1-MMP基因表达和侵袭具有显著的抑制作用. 该研究结论对于探讨从基因水平治疗胃癌提供了新的思路 and 依据, 具有很好的学术价值和一定的临床意义.

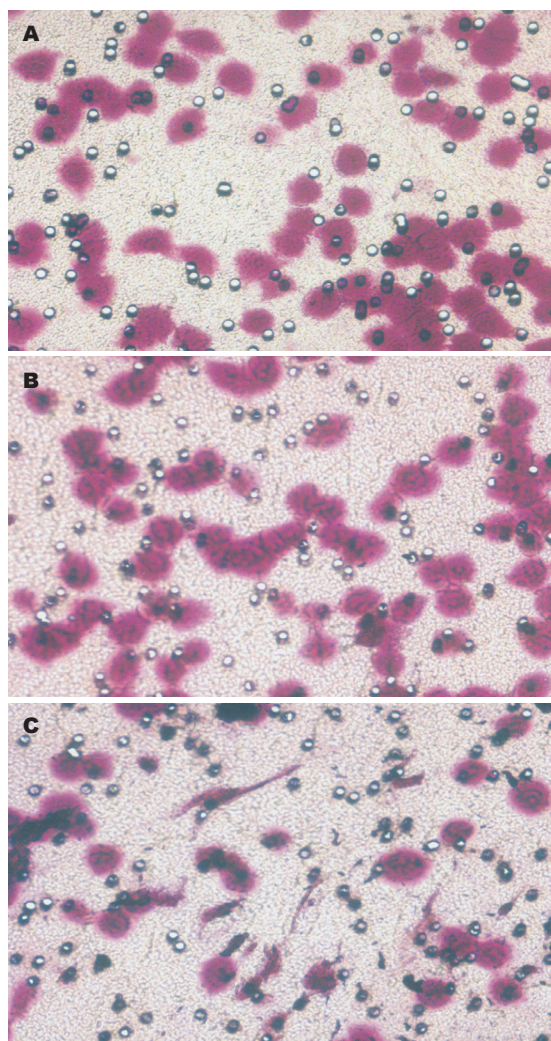


图 5 结晶紫染色观察反义载体pasMMP14对BGC823细胞侵袭能力的影响。A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: 实验组。

隆策略插入pcDNA3.0真核表达载体, 成功构建了pasMMP14反义真核表达载体。我们观察到反义载体转染胃癌细胞BGC823后, MT1-MMP mRNA的表达受到了抑制, 细胞转染后72 h其增殖能力显著降低, 同时发现明胶酶A的活化也受到了抑制, BGC823细胞的体外侵袭力也明显降低。综合本研究结果可以看出, MT1-MMP反义核酸抑制了胃癌细胞BGC823中MT1-MMP mRNA的表达, 进而抑制了细胞体外侵袭, 即MT1-MMP基因可以作为胃癌抗侵袭治疗的分子靶点, 而MT1-MMP反义RNA将来有可能成为一种新的、有效的抗肿瘤侵袭与转移药物。同时加深了我们对于胃癌侵袭转移调控机制的理解和认识, 我们推测, 在MT1-MMP-明胶酶A-基

底膜这一生物反应体系中, MT1-MMP既是明胶酶A活化的启动因素, 同时又是明胶酶A活性的控制因素, 二者同步发挥着促进胃癌侵袭与转移的作用。

4 参考文献

- Seiki M, Mori H, Kajita M, Uekita T, Itoh Y. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase and cell migration. *Biochem Soc Symp* 2003; 253-262
- Seiki M, Yana I. Roles of pericellular proteolysis by membrane type-1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis. *Cancer Sci* 2003; 94: 569-574
- Mori M, Mimori K, Shiraishi T, Fujie T, Baba K, Kusumoto H, Haraguchi M, Ueo H, Akiyoshi T. Analysis of MT1-MMP and MMP2 expression in human gastric cancers. *Int J Cancer* 1997; 74: 316-321
- Yonemura Y, Endo Y, Takino T, Sakamoto K, Bandou E, Kinoshita K, Fushida S, Miwa K, Sugiyama K, Sasaki T. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase enhances lymph node metastasis of gastric cancer. *Clin Exp Metastasis* 2000; 18: 321-327
- 周晓武, 王萍, 笪冀平, 欧阳莠玺, 朱晓全, 郑爱民. 膜型1基质金属蛋白酶在胃癌组织中的表达及其意义. *中华普通外科杂志* 2002; 17: 504-505
- 周晓武, 欧阳莠玺, 朱晓全, 王石林. 胃癌组织中膜型1-基质金属蛋白酶的基因表达. *中华腹部疾病杂志* 2002; 2: 99-102
- Wu M, Shi Y, Xi L, Li Q, Liao GN, Han ZQ, Lu YP, Ma D. Construction of antisense MT1-MMP vector and its inhibitory effects on invasion of human ovarian cancer cells. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2005; 25: 715-717
- Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 1994; 370: 61-65
- Lohi J, Lehti K, Valtanen H, Parks WC, Keski-Oja J. Structural analysis and promoter characterization of the human membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) gene. *Gene* 2000; 242: 75-86
- Genis L, Galvez BG, Gonzalo P, Arroyo AG. MT1-MMP: universal or particular player in angiogenesis? *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25: 77-86
- Takino T, Watanabe Y, Matsui M, Miyamori H, Kudo T, Seiki M, Sato H. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase modulates focal adhesion stability and cell migration. *Exp Cell Res* 2006; 312: 1381-1389
- Sounni NE, Roghi C, Chabottaux V, Janssen M, Munaut C, Maquoui E, Galvez BG, Gilles C, Franken F, Murphy G, Foidart JM, Noel A. Up-regulation of vascular endothelial growth factor-A by active membrane-type 1 matrix metalloproteinase through activation of Src-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 2004; 279: 13564-13574
- Stein CA, Cheng YC. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents--is the bullet really magical? *Science* 1993; 261: 1004-1012

电编 郭海丽 编辑 王晓瑜