

. 实验研究 .

RNAi 对 U251 细胞 c-Met 基因表达水平的影响

汪超甲 王 辉 胡钧涛

【摘要】目的 探讨 RAN 干扰作用对人脑胶质瘤 U251 细胞 c-Met 基因表达的影响。方法 设计 3 对以 c-Met 为靶基因短发夹 RNA 片段, pGenesil-1 质粒为载体, 构建 pGenesil-1/c-Met-shRNA 重组质粒, 将其转染人脑胶质瘤 U251 细胞。采用 PCR 和免疫印迹法分别检测 c-Met 基因 mRNA 和蛋白的表达水平。结果 成功构建 pGenesil-1-c-Met shRNA 重组质粒, 并转染至 U251 细胞。转染重组质粒的 U251 细胞 c-Met 基因 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.05$)。结论 RNA 干扰能明显降低 U251 细胞 c-Met 基因 mRNA 和蛋白的表达水平。

【关键词】胶质瘤; U251 细胞; c-Met 基因; RNA 干扰

【文章编号】1009-153X(2015)02-0099-02 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41; Q 786

Effect of RNA interference on expression of c-Met gene in U251 cells

WANG Chao-jia, WANG Hui, HU Jun-tao. Department of Neurosurgery, Affiliated Taihe Hospital, Hubei Medicine College, Shiyan 442000, China

【Abstract】Objective To construct the shRNA expression vector which targeted c-Met gene and explore the effect of the vector on the expression levels of c-Met gene in the U251 cells. Methods Three pairs of pGenesil-1-c-Met-shRNA recombinant plasmids were constructed. The recombinant plasmids were transfected into the U251 cells. The c-Met mRNA and protein expression levels were determined respectively by the RT-PCR and Western blot methods. Results The pGenesil-1-c-Met shRNA recombinant plasmids were successfully constructed and transfected into U251 cells. The levels of c-Met mRNA expression and protein expression were significantly lower in the U251 cells transfected with pGengsil-1-c Met shRNA recombinant plasmids than those in the U251 cells untransfected with the recombinant plasmids ($P<0.05$). Conclusion RNA interference can significantly reduce c-Met mRNA and protein expression level in the U251 cells.

【Key words】U251 cells; C-Met genes; Transfection; RNA interference

目前,即使采用手术联合放化疗以及生物治疗等综合治疗,脑胶质瘤疗效仍不十分理想。研究证实 c-Met 基因在人脑胶质瘤细胞中呈高表达,而且与患者预后密切相关。本研究观察 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术对人脑胶质瘤 U251 细胞 c-Met 基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天公司;质粒提取试剂盒购自 QIAGEN 公司; Lipofectamine Reagent 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司;特异性 c-Met 短发夹 RNA(short hairpin RNA, ShRNA)干扰序列及阴性对照均由 Ambion 公司设计提供。

1.2 质粒载体的构建 从基因库中找到目的基因,依据 ShRNA 设计原则,设计 3 对引物,并将其退火连接,用 BSA1 酶切 PBsllencer1.1 质粒使其线性化,并与退火片段连接,转化 DH5a 后,提取质粒,分别用 SacI 做酶切鉴定经酶切分析。

1.3 细胞培养及转染 采用 DMEM 培养基+10%胎牛血清培养培养 U251 细胞。Lipofectamine Reagent 转染细胞,分为空白组、阴性对照组和观察组。

1.4 RT-PCR 检测 c-Met 基因 mRNA 表达 c-Met 基因上、下游引物序列分别为 5'-CAGGCAGTGCAG CATGTAGT-3' 和 5'-GATGATTCCCTCGGTCAGA A-3';内参 β -actin 上、下游引物序列分别为 5'-CACGATGGAGGGGCCGACTCATC-3' 和 5'-TA AAGACCTCTATGCCAACACAGT-3'。使用 Trizol 溶液提取总 RNA 进行逆转录合成 cDNA 后进行 PCR 扩增反应。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 的相对含量。

1.5 免疫印迹法检测 c-Met 蛋白表达水平 RIPA 裂解液匀浆细胞,测蛋白浓度后,各取 50 μ g 进行电泳。转聚偏氟乙烯膜,封闭 2 h 加一抗过夜,然后加

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2015.02.011
基金项目:湖北省教育厅青年人才项目(Q20112103)
作者单位:442000 湖北十堰,湖北医药学院附属太和医院神外科(汪超甲、王 辉、胡钧涛)
通讯作者:王 辉, E-mail: sjwk713@163.com

二抗。增强化学发光法显色。用甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 作为内参照。BandScan 分析胶片灰度值, c-Met 蛋白的表达水平以相对表达量即 c-Met/GAPDH 的比值计算。

2 结果

2.1 重组质粒载体的构建 质粒载体 pBSilence1.1 只有一个 SacI 酶切位点, 而重组质粒 c-Met 1~3 均能够被 SacI 酶切出一条约 900 bp DNA 条带, 见图 1。说明 3 对引物扩增得到的 3 条基因片段已经分别插入质粒载体。

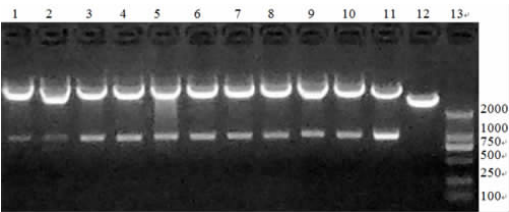


图 1 质粒载体凝胶电泳图
1~4 为 c-Met 1 重组质粒; 5~8 为 c-Met 2 重组质粒; 9~12 为 c-Met 3 重组质粒; 13 为 DL2000

2.2 c-Met 基因 mRNA 表达水平结果 RNAi 处理后, U251 细胞 c-Met 基因 mRNA 表达较前均明显下降 ($P<0.05$), 平均下降近 48%, 以重组质粒 c-Met 1 干预处理后 U251 细胞 (U251-1) 下降最为显著, 达 73%。

2.3 c-Met 蛋白表达水平结果 正常组 c-Met 蛋白表达水平 (0.506 ± 0.028) 与 U251 空质粒组 (0.509 ± 0.030) 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 而重组质粒组 (0.152 ± 0.012) 显著下降 ($P<0.05$)。

3 讨论

脑胶质瘤发病机制仍不清楚, 抑癌基因的灭活、缺失或癌基因的激活是肿瘤发生、发展的重要基础。肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 具有多种生物功能, c-Met 蛋白 HGF 受体, 介导其生物学活性。c-Met 蛋白具有酪氨酸激酶活性, 参与细胞内信号传导, 可调节细胞的生长与分化。研究发现 c-Met 基因在人脑胶质瘤中呈现高表达, 且与胶质瘤患者的预后密切相关^[1-5]。

本研究结果显示重组质粒 psilencer1.1c-Met 1 转染 U251 细胞后, U251 细胞 c-Met mRNA 和蛋白表达水平均显著下降。研究发现, 肿瘤细胞分泌的白细胞介素 1、血小板源性生长因子和成纤维细胞生长因子 2 等能够刺激相邻的成纤维细胞分泌 HGF

^[6]。肿瘤细胞具有的自分泌环可以自我调节, 导致 HGF 水平的不断升高。研究显示, 下调 c-Met 蛋白表达可以使细胞的增殖周期减慢甚至停止, 增加细胞凋亡, 减少细胞转化, 抑制机体在 HGF 刺激下的反应能力^[7]。c-Met 蛋白过度表达和缺乏 HGF 的参与有关, 存在着细胞接触抑制, 继而引发一系列生物学反应。c-Met 基因的变异也是导致细胞接触抑制的机制之一^[8]。

目前, 本实验只证实在 RNA 干扰作用下 U251 细胞 c-Met 基因 mRNA 及蛋白的表达水平明显下降, 并没有进一步证实其对细胞生物学行为的影响, 但为下一步检测细胞的增殖、侵袭能力提供了前提。

【参考文献】

[1] Li Y, Li A, Glas M, *et al.* c-Met signaling induces a reprogramming network and supports the glioblastoma stem-like phenotype [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(24): 9951-9956.

[2] Zhao P, Zhang Y, Sun M, *et al.* Reversion of multidrug resistance in human glioma by RNA interference [J]. Neurol Res, 2008, 30(6):562-526.

[3] Hendruschk S, Wiedemuth R, Aigner A, *et al.* RNA interference targeting survivin exerts antitumoral effects in vitro and in established glioma xenografts in vivo [J]. Neuro Oncol, 2011, 13(10): 1074-1089.

[4] Xie Q, Bradley R, Kang L, *et al.* Hepatocyte growth factor (HGF) autocrine activation predicts sensitivity to MET inhibition in glioblastoma [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(2): 570-575.

[5] Riker AI, Enkemann SA, Fodstad O, *et al.* The gene expression profiles of primary and metastatic melanoma yields a transition point of tumor progression and metastasis [J]. BMC Med Genomics, 2008, 1: 13.

[6] Xu DS, Yang C, Proescholdt M, *et al.* Neuronatin in a subset of glioblastoma multiforme tumor progenitor cells is associated with increased cell proliferation and shorter patient survival [J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37811.

[7] Hagemann C, Anacker J, Ernestus RI, *et al.* A complete compilation of matrix metalloproteinase expression in human malignant gliomas [J]. World J Clin Oncol, 2012, 3(5): 67-79.

[8] Ohka F, Natsume A, Wakabayashi T, *et al.* Current trends in targeted therapies for glioblastoma multiform [J]. Neurol Res Int, 2012, 88(25): 1-13.

(2014-04-11 收稿, 2014-08-28 修回)