

. 实验研究 .

RNAi 沉默 c-Met 基因对人脑胶质瘤 U251 细胞增殖及侵袭能力的影响

汪超甲 王 辉 胡钧涛 胡胜利 张 涛

【摘要】目的 探讨 RNA 干扰技术沉默 c-Met 基因表达对人脑胶质瘤 U251 细胞生长活力及体外侵袭能力的影响。**方法** 将设计好的 c-Met 基因干扰载体转染至 U251 细胞中,根据转染质粒不同分为空白对照组(不转染任何质粒)、空载体组(转染空载体)和干扰组(转染重组质粒)。采用四唑盐比色法(MTT)检测细胞的生长活力的变化;采用 Transwell 小室法检测细胞侵袭能力的变化。**结果** MTT 检测结果显示干扰组光密度值(0.156 ± 0.164)显著低于空白对照组(0.21 ± 0.146 ; $P<0.05$)和空质粒组(0.191 ± 0.138 ; $P<0.05$),而空质粒组和空白对照组无显著差异($P>0.05$)。细胞体外侵袭能力检测结果显示,干扰组穿膜细胞数[(13.60 ± 3.34)个]显著低于空白对照组[(32.90 ± 6.49)个; $P<0.05$]和空质粒组[(23.10 ± 2.77)个; $P<0.05$],而空质粒组和空白对照组无统计学差异($P>0.05$)。**结论** 沉默 c-Met 基因表达能明显抑制 U251 细胞的生长活力及其侵袭能力。

【关键词】 胶质瘤; U251 细胞; c-Met 基因; RNA 干扰; 生长活力; 侵袭能力

【文章编号】 1009-153X(2015)05-0290-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 789

Effect of RNAi silencing c-Met genes on proliferation and invasiveness of human brain U251 glioma cells

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

【Abstract】 Objective To explore the effects of RNA interference (RNAi) c-Met gene on the proliferation and invasiveness of the brain U251 glioma cells. **Methods** The c-Met interference carrier was transfected into U251 cells in the interference group. The empty plasmid was transfected into the U251 cells in the control group. The changes in the proliferation and invasiveness of U251 cells were determined respectively by MTT and transwell small chamber methods in all the groups. **Results** MTT method showed that the proliferation of U251 cells in the interference group decreased to 77.34% of the normal group ($P<0.05$). The transwell chamber method showed that the number of the traswell chamber cells [(13.60 ± 3.34) cells] was significantly less in the interference group than those in the normal group [(32.90 ± 6.49) cells] and empty plasmid group [(23.10 ± 2.77) cells] ($P<0.05$). **Conclusions** The in vitro proliferation and invasiveness of U251 cells may be significantly inhibited by pGenesil-1-c-Met shRNA through inhibiting the U251 cells c-Met mRNA and protein expressions.

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

脑胶质瘤侵袭性强、恶性程度高、易复发,手术是其首选治疗方法,术后结合放化疗等综合治疗,仍不能从根本上彻底治愈。研究证实 c-Met 基因在人脑胶质瘤细胞中呈现高表达,且与其预后密切相关^[1]。本研究采用 RNA 干扰技术沉默 U251 细胞 c-Met 基因表达,探讨其对细胞增殖及侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 Lipofectamine2000 转染试剂盒购自美国

Invitrogen 公司; RNA 干扰目标序列由美国 Ambion 公司提供; 细胞侵袭能力检测试剂盒购于南京凯基生物公司; Transwell 小室购于美国 Biosciences 公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体杭州贤至生物公司。

1.2 质粒载体的构建 PBsllencer1.1 质粒表达载体的构建是在 RNA 聚合酶类启动子下游插入短发夹状 RNA 对应的引物 DNA 序列,构建 RNA 干扰重组质粒,对重组的质粒进行酶切分析。

1.3 细胞培养及转染 用 DMEM+10% 胎牛血清培养基于 37 ℃、5% CO₂ 孵箱内培养。阳离子脂质体转染细胞,分为干扰组、空白对照组、空质粒组。

1.4 四唑盐比色法 (mosmann tetrazolium test, MTT) 检测细胞生长活力 以 3×10^4 个/ml 密度将 100 μl 细胞悬液接种于 96 孔板中,37 ℃ 培养 12 h。每组设置 5

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2015.05.011

基金项目:湖北省教育厅青年人才项目(Q20112103)

作者单位:442000 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、胡胜利、张 涛)

通讯作者:王 辉,E-mail:Sunny6910@163.com

个复孔,37℃,5% CO₂继续培养 72 h;移出孔内培养液,将 100 μl DMEM 培养基稀释 10 倍的 MTT 试剂加入各孔,继续孵育 4 h,移出孔液,加入二甲基亚砷 150 μl,振荡 10~15 min,让结晶充分溶解,酶标仪 560 nm 测定光密度(optical density, OD)值绘制曲线计算抑制率。重复实验三次并求平均值。

1.5 Transwell 小室法检测转染后细胞的体外侵袭能力 将细胞密度调整为 3×10⁴个/ml 备用。含 10%胎牛血清 DMEM 培养基预先加入 24 孔板中,并将 transwell 小室置入其中,加入 200 μl 细胞悬液 37℃、5% CO₂培养 18 h,取出小室, PBS 小心清洗一遍,将未迁移的细胞用干净的棉球擦干净,并用 10%甲醇溶液将细胞固定 30 s。切膜,5%结晶紫染色,再用 PBS 清洗,显微镜下(×100)观察并计数 10 个视野中的细胞数并求平均值,重复实验三次。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异显著。

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定 经酶切分析,挑取经酶切鉴定为正确的质粒转化菌液进行测序。经测序结果分析:PB1.1-c-Met-1-1; PB1.1-c-Met-2-1; PB1.1-c-Met-3-1 均为具有与目的序列相同的克隆质粒,而且质量均符合设计要求。

2.2 U251 细胞生长活力变化 我们之前研究结果显示 PBSilencer1.1 c-Met1-shRNA 干扰效果最为显著^[2],所以本实验应用此质粒进行研究。干扰组 OD 值(0.16±0.16)显著低于空白对照组(0.21±0.15; *P* < 0.05)和空质粒组(0.19±0.14; *P* < 0.05),而空质粒组和空白对照组无显著差异(*P* > 0.05)。这提示 U251 细胞转染重组质粒后,细胞活力显著下降。

2.3 U251 细胞体外侵袭能力变化 干扰组穿膜细胞数[(13.60±3.34)个]显著低于空白对照组[(32.90±6.49)个; *P* < 0.05]和空质粒组[(23.10±2.77)个; *P* <

0.05],而空质粒组和空白对照组无统计学差异(*P* > 0.05)。见图 1。这提示 U251 细胞转染重组质粒后,细胞侵袭能力显著下降。

3 讨论

脑胶质瘤是最常见的颅内肿瘤,发病机制复杂。目前主要采用手术结合放疗、化疗等综合治疗,但效果仍不理想。肿瘤的侵袭程度是决定治疗方案及其疗效的主要因素。近年来,研究发现 c-Met 基因编码的蛋白产物在人脑胶质瘤细胞高表达,与胶质瘤增殖、侵袭密切相关,并且在调控肿瘤细胞运动性和侵袭能力上起关键作用。肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)受体是 c-Met 基因的编码产物,与其受体结合后,导致 c-Met 酪氨酸发生自身磷酸化,激活 c-Met 受体酪氨酸激酶活性,进一步活化细胞内的信号分子,经磷酸化反应,将外界信号逐步放大,最终传至细胞核内,诱导细胞发生一系列反应,包括细胞增殖、运动和迁移、形态改变等^[3-8]。

研究证明, HGF/c-Met 信号可以提高上皮细胞的运动性^[9]。其促进肿瘤细胞的侵袭和转移的主要机制包括基质金属蛋白酶、上调肿瘤细胞中的尿激酶型纤溶酶原激活物、纤溶酶原激活因子抑制因子-1^[10]。它们通过使改变肿瘤细胞骨架和加快肿瘤细胞的扩散来促进细胞的运动和迁移^[11]。研究显示血管内皮细胞可以表达 c-Met,从而刺激细胞的生长、运动和侵袭;还可以通过上调血管平滑肌细胞和肿瘤细胞表达其它促血管生成的因子^[12]。研究还发现,肿瘤细胞分泌的白细胞介素 1、血小板衍生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;另外,肿瘤细胞具有的自分泌还可以自我调节,导致 HGF 水平的不断升高^[13-15]。缺乏 HGF 的参与或 c-Met 蛋白过度表达,都将使细胞存在接触抑制,导致后续很多生物学行为的发生^[16]。

在之前研究中,我们成功构建 RNA 干扰重组质

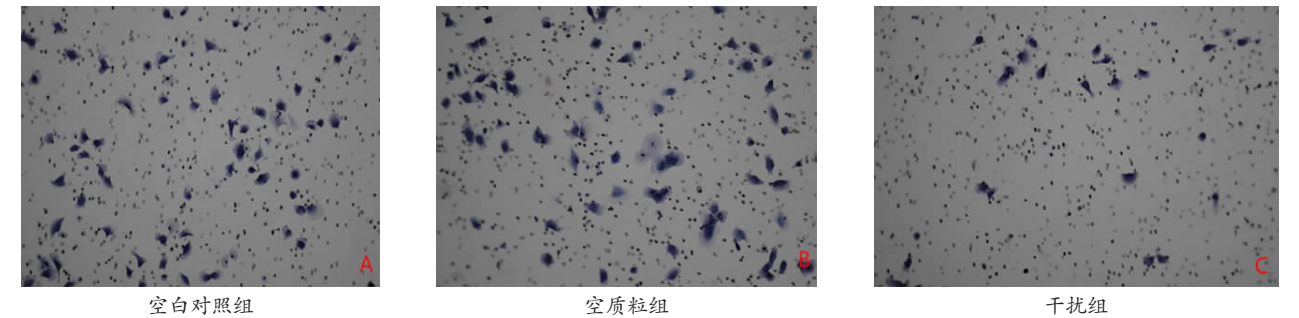


图 1 Transwell 检测 U251 细胞侵袭能力显微镜下图(×100)

粒并验证其对目的基因 mRNA 水平及蛋白表达水平的沉默作用^[2]。本实验结果显示 pSilencer1.1c-Met shRNA 能显著抑制 U251 细胞的生长活力,显著降低 U251 细胞的侵袭能力。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^[17-19]。这提示特异性的抑制 HGF/c-Met 通路在胶质瘤的治疗上有着重要的作用。

但本实验只从单基因的水平验证 RNA 干扰的沉默作用,且 RNA 干扰只是降低这种作用并没有消除该作用。脑胶质瘤受多基因的共同影响,要想彻底治愈胶质瘤,需同时作用多个基因。基因敲除技术尤其是 CRISPR-Cas 技术的发现及发展,可能从两个或者更多的基因入手,利用基因敲除技术,针对胶质瘤的特点为其临床治疗提供帮助。

【参考文献】

- [1] Puri N, Ahmed S, Janamanchi V, *et al.* C-Met is a potentially new therapeutic target for treatment of human melanoma [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(7): 2246-2253.
- [2] 汪超甲,王辉,胡钧涛. RNAi 对 U251 细胞 c-Met 基因表达水平的影响[J]. 中国临床神经外科杂志, 2015, 20: 99-100.
- [3] 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.
- [4] 蔡博文,吴波,游潮,等. SF/HGF 受体 c-Met 在人脑胶质瘤中的表达与肿瘤恶性表型及预后的关系[J]. 四川医学, 2004, 25(8): 838-862.
- [5] Greenall SA, Gherardi E, Liu Z, *et al.* Non-agonistic bivalent antibodies that promote c-met degradation and inhibit tumor growth and others specific for tumor related c-met [J]. PLoS One, 2012, 7(4): e34658.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 蔡明俊,谢蕊繁,韩林,等. LRIG3 特异性 RNA 干扰真核表达载体的构建及稳定株筛选[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2009, 8(2): 122-126.
- [9] Hendrusch 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.
- [10] Guessous F, Zhang Y, diPierro C, *et al.* An orally bioavailable c-Met kinase inhibitor potently inhibits brain tumor malignancy and growth [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2010, 10(1): 28-35.
- [11] Lorenzato A, Olivero M, Patanè S, *et al.* Novel somatic mutation of the met oncogene in human carcinoma metastases activating cell motility and invasion [J]. Cancer Res, 2002, 62: 7025-7030.
- [12] 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: 13-20.
- [13] Novina CD, Sharp PA. The RNAi revolution [J]. Nature, 2004, 430: 161-164.
- [14] Li G, Schaidler H, Satyamoorthy K, *et al.* Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development [J]. Oncogene, 2001, 20: 8125-8135.
- [15] 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.
- [16] 孙卫东,于如同,马衍刚,等. 短发夹 RNA 沉默 hTERT 基因抑制裸鼠皮下人脑胶质瘤生长的实验研究[J]. 徐州医学院学报, 2007, 27(5): 290-294.
- [17] Hagemann C1, 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.
- [18] 费帆,何永生. 脑胶质瘤分子靶向与优化治疗[J]. 实用医院临床杂志, 2011, 8(2): 199-201.
- [19] Ohka F, Natsume A, Wakabayashi T. Current trends in targeted therapies for glioblastoma multiforme [J]. Neurol Res Int, 2012, 2012: 878425.

(2014-08-28 收稿, 2015-02-04 修回)