

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00496

· 论 著 ·

RNA 干扰靶向抑制 PI3K p85 α 蛋白对大肠癌细胞侵袭与转移的影响

孙 嫣, 田 华, 谢晓云, 肖法嫒, 宋于刚*

南方医科大学南方医院消化疾病研究所, 广州 510515

[摘要] **目的:**探讨 RNA 干扰靶向抑制 PI3K p85 α 蛋白表达对大肠癌细胞侵袭与转移的影响。**方法:**设计 4 条 shRNA 干扰载体及 1 条阴性对照载体, 分别稳定转染大肠癌 LoVo 细胞。用蛋白质印迹法筛选出一组抑制效率最高的细胞进行细胞划痕实验和 Transwell 实验。**结果:**转染 shRNA/324 干扰载体的 LoVo 细胞 PI3K p85 α 蛋白表达降低最明显, 抑制率达 77%, 选择该组细胞作为有效干扰组进行后续实验。细胞划痕实验显示, 干扰组细胞的划痕愈合能力明显低于对照组细胞 ($P < 0.05$)。Transwell 实验显示, 干扰组细胞的穿膜细胞数明显少于对照组细胞 ($P < 0.05$)。**结论:**PI3K p85 α 蛋白表达缺失可明显降低大肠癌 LoVo 细胞的迁移运动能力, PI3K p85 α 可能成为治疗大肠癌转移的新靶点。

[关键词] 结直肠肿瘤; 磷脂酰肌醇 3-激酶 p85 α 亚单位; RNA 干扰; 肿瘤转移

[中图分类号] R 735.34 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)05-0496-04

Influence of RNA interference targeting PI3K p85 α expression on invasion and metastasis of colorectal cancer cells

SUN Yan, TIAN Hua, XIE Xiao-yun, XIAO Fa-man, SONG Yu-gang*

Institute of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the influence of RNA interference targeting PI3K p85 α on the invasion and metastasis of colorectal cancer cells. **Methods:** Four shRNA vectors and one negative control vector were designed and stably transfected into LoVo cells. Western blotting analysis was used to screen for the group which had the highest inhibitory rate; the cells were subjected to wound closure assay and transwell assay to determine the migration of LoVo cells after stable transfection. **Results:** Western blotting analysis showed that cells transfected with shRNA/324 vector had the strongest inhibition of PI3K p85 α protein, with the inhibition rate being 77%, and cells in this group were used for wound closure assay and transwell assay. Wound closure assay showed that the healing ability of PI3K p85 α -depleted cells was significantly lower than that of the control cells ($P < 0.05$). Transwell assay showed that the cells passing the polycarbonate membranes was significantly less in PI3K p85 α -knockdown cells than in the control cells ($P < 0.05$). **Conclusion:** Depletion of PI3K p85 α protein can obviously inhibit the migration of LoVo cells. PI3K p85 α may be a new therapeutic target for treatment of colorectal cancer metastasis.

[KEY WORDS] colorectal neoplasms; PI3K p85 α ; RNA interference; neoplasm metastasis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(5): 496-499]

大肠癌是常见的消化道恶性肿瘤, 严重威胁人类的生命健康。大肠癌患者常出现早期转移, 这是其死亡的主要原因^[1]。大肠癌的浸润转移是一个十分复杂、多步骤的过程, 有关其机制的研究远远落后于癌症研究的其他领域。近几年研究发现, 生长因子的细胞内信号转导通路同肿瘤转移密切相关。其中, 对磷脂酰肌醇-3 激酶 (phosphatidylinositol-3-kinases, PI3Ks) 信号转导通路的研究取得了一定的成果。细胞在一系列内外因素的作用下, 通过启动

PI3K/Akt 信号转导通路, 诱导细胞的增殖、分化、侵袭与转移^[2]。在 PI3K 家族中, 研究最广泛的是能被细胞表面酪氨酸激酶连接受体所激活的 IA 型 PI3K, IA 型 PI3K 由 p85 调节亚基和 p110 催化亚基组成, p85 α 是 PI3K 家族中表达量最多的调节亚基, 由 PIK3R1 基因编码, p85 α 基因的突变或扩增能导致 PI3K 的激活^[3]。

关于 PI3K p85 α 蛋白对大肠癌细胞侵袭与转移的影响, 目前国内外均未见报道。本研究通过 RNA

[收稿日期] 2009-02-13 **[接受日期]** 2009-04-14

[基金项目] 国家自然科学基金(30300159). Supported by National Natural Science Foundation of China(30300159).

[作者简介] 孙 嫣, 博士生. E-mail: hilary1107@yahoo.com.cn

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 020-61642381, E-mail: songyg@fimmu.com

干扰技术下调 PI3K p85 α 蛋白在大肠癌细胞系 LoVo 中的表达,并检测干扰后大肠癌细胞侵袭与转移的变化,为发现大肠癌基因治疗新的靶点提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 短发夹状 RNA (shorthairpin RNA, shRNA) 的设计与制备 从 GenBank 中选定人类 PI3K p85 α 亚单位编码基因 PIK3R1 mRNA 序列 (NM_181504), 依照 shRNA 的设计原则^[4], 设计 4 条 shRNA, 靶序列分别为: GGG AGA TAT CTC GAG GGA AGA; GCT CAG TAT AAT CCC AAA TTG; GGA CGG CGA AGT AAA GCA TTG; GCT TTG CCG AGC CCT ATA ACT, 分别命名为: shRNA/89, shRNA/324, shRNA/1073, shRNA/1123。阴性对照靶序列为: GTT CTC CGA ACG TGT CAC GT, 命名为: shRNA/N。利用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 在 EST 数据库中查询, 均未发现与另外任何基因同源。shRNA 的发卡状结构为 TTCAAGAGA, 转录终止子为 TTTTT。pGPU6/Neo shRNA 表达载体的制备由上海吉玛制药技术有限公司完成。

1.2 细胞培养和转染 人大肠癌细胞株 LoVo 购自美国 ATCC 公司, 由本研究所保存, 用含有 10% 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司) 的 RPMI 1640 (Gibco 公司) 常规培养传代。转染实验参照 LipofectamineTM 2000 (Invitrogen 公司) 产品说明书, 转染前一天将细胞以 5×10^4 个/孔接种于 24 孔培养板, 细胞融合达 90%~95% 时进行转染, 用 Opti-MEM 培养液 (Gibco 公司) 稀释质粒载体和脂质体。转染后 24 h 在培养液中加入 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 (Merck 公司) 进行筛选。形成阳性单细胞克隆群落后, 用尖吸管吸取单克隆阳性细胞培养, 连续培养 4 周后以含 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 的培养液维持培养。细胞分为 5 组: 转染 shRNA/N 的阴性对照组, 转染 shRNA/89 的 LoVo 细胞, 转染 shRNA/324 的 LoVo 细胞, 转染 shRNA/1073 的 LoVo 细胞, 转染 shRNA/1123 的 LoVo 细胞。

1.3 蛋白质印迹法检测 PI3K p85 α 蛋白的表达 采用 RIPA 裂解液 (碧云天生物技术研究所) 提取细胞总蛋白, 每孔上样 50 μg 进行 8% SDS-PAGE, 半干电转 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温 (15~25 $^{\circ}\text{C}$) 封闭 2 h。小鼠抗人 PI3K p85 α (B-9) 单克隆抗体 (1:200) 及小鼠抗人 β -actin (1:1 000) 单克隆抗体购自

Santa Cruz 公司, 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 二抗为辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (1:2 000, 购自 Jackson 公司), 37 $^{\circ}\text{C}$ 与膜共孵育 1 h, ECL (Pierce 公司) 显色。Image-Pro Plus 6.0 软件进行灰度扫描分析蛋白表达的相对值。

1.4 细胞划痕实验 用含 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Collagen IV 的 PBS 包被 6 孔板过夜。用 0.25% 胰酶消化细胞, 将细胞重悬于含 10% FBS 的 RPMI 1640 中, 调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。按 5×10^5 /孔接种细胞, 培养 3 h, 使细胞呈现出单层贴壁生长状态。用 200 μl 的吸头给 6 孔板中的细胞划痕, 在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中继续培养 24 h。分别于划痕后 0、12、24 h 每个孔取 4 个视野拍照, 观察划痕愈合能力。

1.5 Transwell 小室测定细胞运动能力 细胞达到对数生长期后, 用 0.25% 胰酶消化, 用无血清 RPMI 1640 培养液调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。在 transwell 各上室加入细胞悬液 200 μl , 下室每室加 500 μl 含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液。在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中继续培养 24 h 后, 取出滤膜, 4% 多聚甲醛固定 15 min 后结晶紫染色 10 min, 每个滤膜随即在显微镜下选取 5 个视野, 计数和分析穿膜细胞。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染后细胞 PI3K p85 α 蛋白表达的变化 各转染组细胞建立稳定克隆后, 用蛋白质印迹法检测 RNA 干扰效果。结果显示, 与转染阴性对照的 LoVo 细胞相比, 转染干扰载体的 LoVo 细胞 PI3K p85 α 蛋白相对表达量分别下调了 36% (shRNA/89)、77% (shRNA/324)、24% (shRNA/1073)、19% (shRNA/1123), shRNA/89 转染组和 shRNA/324 转染组与阴性对照组相比均有显著性差异 ($P < 0.05$, 图 1)。shRNA/324 转染组 PI3K p85 α 蛋白相对表达量下调程度最大, 因此选取 shRNA/324 转染组作为有效干扰组进行后续实验。

2.2 PI3K p85 α 蛋白下调后细胞迁移能力的变化 通过对转染细胞 24 h 体外划痕实验的观察, 转染 shRNA/324 载体的干扰组 LoVo 细胞与阴性对照组细胞相比, 从 12 h 开始迁移能力显著降低 ($P < 0.05$), 24 h 时阴性对照组细胞已有部分“伤口”接近愈合, 与干扰组细胞相比愈合能力具有显著性差异 ($P < 0.05$), 见图 2。

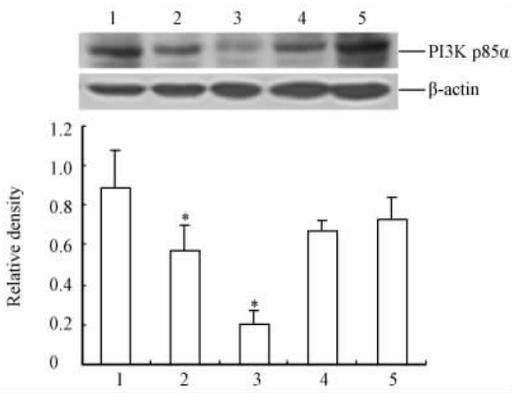


图1 RNA干扰载体转染后PI3K p85α蛋白表达变化
Fig 1 Effect of RNA interference on PI3K p85α protein expression

1: shRNA/N transfection group; 2: shRNA/89 transfection group; 3: shRNA/324 transfection group; 4: shRNA/1073 transfection group; 5: shRNA/1123 transfection group. The corresponding β-actin levels were shown as loading control. * $P < 0.05$ vs group 1; $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.3 PI3K p85α蛋白下调后细胞运动能力的变化 通过对转染细胞Transwell板运动实验的观察,转染shRNA/324载体的干扰组LoVo细胞与阴性对照组细胞相比,24 h时的穿膜细胞数显著降低($P < 0.05$),见图3。

3 讨论

迁移和侵袭表型的获得是肿瘤发展和转移的关键步骤,也是一个极其复杂的病理过程,与肿瘤患者病情的发展和预后有密切的关系^[5]。肿瘤转移的机制极为复杂,近年来的研究发现,在人类多种肿瘤中如卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、非小细胞肺癌和口腔鳞癌等,PI3K/Akt通路成分常显示过表达^[6-8]。PI3K/Akt信号转导通路激活促进恶性肿瘤转移的机制包括以下几个方面^[9]:(1)PI3K/Akt信号转导通路的激活能增加肿瘤细胞的运动能力;

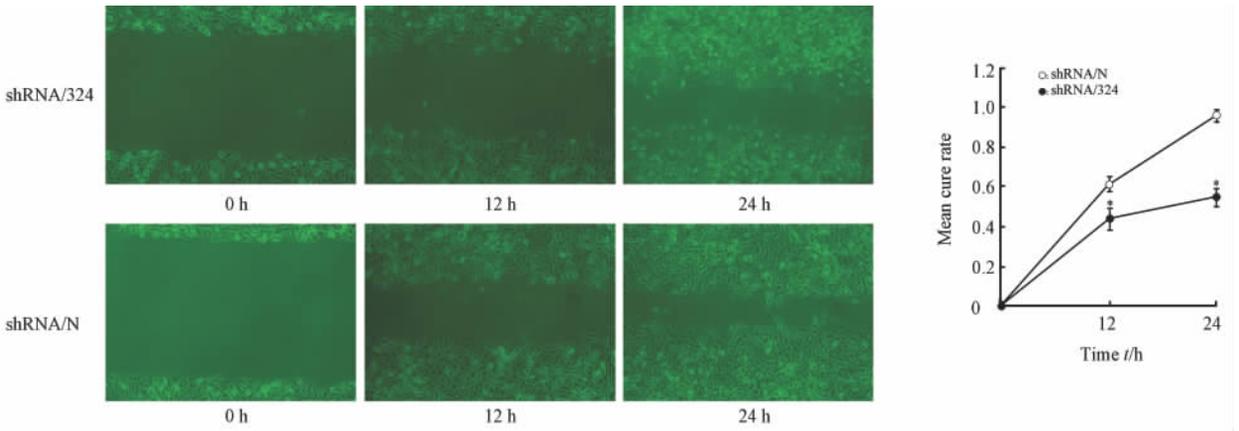


图2 PI3K p85α蛋白表达降低对细胞划痕愈合能力的影响

Fig 2 Effect of PI3K p85α depletion on wound closure of LoVo cells

Original magnification: $\times 100$; * $P < 0.05$ vs shRNA/N; $n = 6, \bar{x} \pm s$

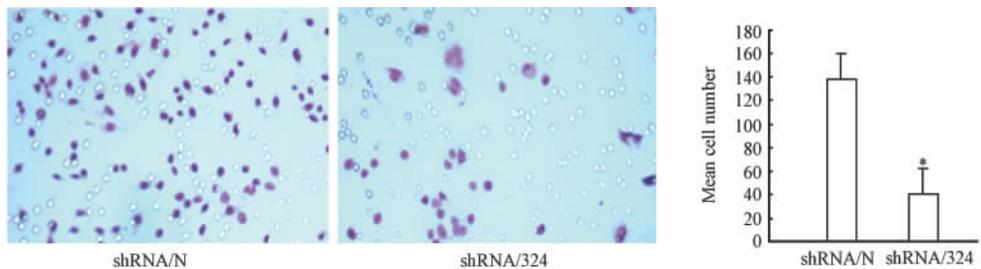


图3 PI3K p85α蛋白表达降低对细胞Transwell板运动能力的影响

Fig 3 Effect of PI3K p85α depletion on transwell migration of LoVo cells

Original magnification: $\times 100$; * $P < 0.05$ vs shRNA/N; $n = 10, \bar{x} \pm s$

(2)PI3K/Akt信号转导通路通过对生长因子受体的调节来促进肿瘤细胞的转移;(3)PI3K/Ak信号转导通路通过降低细胞间的黏附力来促进肿瘤细胞

的转移;(4)PI3K/Akt信号转导通路通过对细胞外基质的影响促进肿瘤细胞的转移;(5)PI3K/Akt信号转导通路通过增加核转录因子的活性促进肿瘤细

胞转移;(6)PI3K/Akt 信号转导通路通过对转移相关的酶的磷酸化促进肿瘤细胞的转移;(7)PI3K/Akt 信号转导通路的活化具有细胞膜转位的能力,由此促进侵袭。因此,直接抑制 PI3K/Akt 信号转导通路或干扰其上游物质的作用,有望抑制恶性肿瘤的侵袭和转移,成为抗癌治疗的新措施。

PI3K p85 α 蛋白是 PI3K 家族中表达量最多的调节亚单位,我们通过免疫组织化学方法发现其在大肠黏膜正常组织中低表达或不表达,在大肠腺瘤组织中表达量开始升高,而在大肠癌组织中过表达^[10],这与 Rychahou 等^[11]的研究结果相似,说明 PI3K p85 α 蛋白的表达在大肠癌的发生发展中起重要作用。但是 PI3K p85 α 蛋白对大肠癌细胞转移的影响目前知之甚少。由于 RNA 干扰技术可以特异性剔除或关闭特定基因的表达,可用于探索特定基因的功能。因此,本实验构建了 PI3K p85 α 蛋白的 4 个 RNA 干扰载体,通过转染及稳定筛选获得了稳定表达 4 种干扰载体的 LoVo 细胞株。经蛋白质印迹法检测,结果提示,转染 shRNA/324 干扰载体的 LoVo 细胞中 PI3K p85 α 蛋白表达受抑制最为明显,可用于后续实验,说明 RNA 干扰技术可有效降低 PI3K p85 α 蛋白的表达。

许多研究证实,肿瘤细胞运动性的强弱与其侵袭能力呈正相关^[12]。在 RNA 干扰的基础上,本实验采用细胞划痕实验,研究 PI3K p85 α 表达水平与大肠癌细胞迁移能力之间的相关性。结果发现,抑制 PI3K p85 α 的表达可显著降低 LoVo 细胞的划痕愈合能力。与阴性对照组细胞相比,从划痕后 12 h 开始干扰组细胞的迁移能力显著降低,24 h 时阴性对照组细胞已有部分“伤口”接近愈合,而干扰组细胞仍然留有明显的划痕存在。显然,PI3K p85 α 蛋白表达缺失使 LoVo 细胞侵袭能力明显降低,从而降低了恶性肿瘤细胞的生物学行为。本实验进一步采用 Transwell 板运动实验研究 PI3K p85 α 蛋白表达缺失对大肠癌细胞运动能力的影响,结果发现,与阴性对照组细胞相比,24 h 时干扰组的穿膜细胞数显著降低,进一步提示因 PI3K p85 α 异常所导致的肿瘤细胞运动能力提高可能是促进大肠癌转移的机制之一。最近的一项研究表明^[13],经过 RNA 干扰同时抑制 PI3K p85 α 和 Akt1 的表达,可以抑制胃癌细胞的增殖,降低胃癌细胞的侵袭能力,进一步说明针对 PI3K p85 α 的干预治疗有可能成为抑制肿瘤侵袭与转移的一个新的治疗靶点。

总之,本实验从多方面证明了 PI3K p85 α 蛋白缺失可降低大肠癌细胞的运动能力,深入研究其影

响肿瘤转移能力的分子生物学机制,不仅有利于阐明大肠癌转移的分子机制,还能加深对 PI3K p85 α 功能的了解,为临床预测转移、基因治疗和预后判断寻找新的有效靶点。

[参考文献]

- [1] Cercek A, Saltz L B. First-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: an overview of recent data on chemotherapy plus targeted agents[J]. Clin Colorectal Cancer, 2008, 7 (Suppl 2): S47-S51.
- [2] Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer[J]. Apoptosis, 2004, 9: 667-676.
- [3] Philp A J, Campbell I G, Leet C, Vincan E, Rockman S P, Whitehead R H, et al. The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors[J]. Cancer Res, 2001, 61: 7426-7429.
- [4] Tuschl T. Expanding small RNA interference[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20: 446-448.
- [5] Hu M, Polyak K. Molecular characterisation of the tumour microenvironment in breast cancer[J]. Eur J Cancer, 2008, 44: 2760-2765.
- [6] Bellacosa A, de Feo D, Godwin A K, Bell D W, Cheng J Q, Altomare D A, et al. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas[J]. Int J Cancer, 1995, 64: 280-285.
- [7] Cheng J Q, Ruggeri B, Klein W M, Sonoda G, Altomare D A, Watson D K, et al. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 3636-3641.
- [8] Ringel M D, Hayre N, Saito J, Saunier B, Schuppert F, Burch H, et al. Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma[J]. Cancer Res, 2001, 61: 6105-6111.
- [9] 胡 蕾, 姜汉国. PI3K/AKT 信号转导通路与肿瘤转移及其机制的研究进展[J]. 医学综述, 2006, 12: 1375-1377.
- [10] 孙 嫣, 田 华, 肖法嫚, 谢晓云, 宋于刚. PI3K p85 α 在大肠癌癌变过程中的表达及意义[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29: 416-418.
- [11] Rychahou P G, Jackson L N, Silva S R, Rajaraman S, Evers B M. Targeted molecular therapy of the PI3K pathway: therapeutic significance of PI3K subunit targeting in colorectal carcinoma[J]. Ann Surg, 2006, 243: 833-842.
- [12] Kedrin D, van Rheenen J, Hernandez L, Condeelis J, Segall J E. Cell motility and cytoskeletal regulation in invasion and metastasis[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2007, 12(2-3): 143-152.
- [13] Fu Y, Zhang Q, Kang C, Zhang J, Zhang K, Pu P, et al. Inhibitory effects of adenovirus mediated Akt1 and PIK3R1 shRNA on the growth of malignant tumor cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Cancer Biol Ther, 2009, 8. [Epub ahead of print]