

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01029

• 短篇论著 •

靶向 c-myc 基因小 RNA 干扰对胆囊癌细胞侵袭运动的影响

Influence of c-myc-targeted siRNA on migration and invasion abilities of gallbladder cancer cells

蔡 民, 李立波

浙江大学医学院附属邵逸夫医院普通外科, 杭州 310000

[摘要] **目的** 研究 c-myc 基因在胆囊癌侵袭和转移中的作用及其机制。**方法** 采用实时定量 PCR 和蛋白质印迹法检测亲代和高转移胆囊癌细胞系中 c-myc 基因表达, 设计靶向 c-myc 的干扰性小 RNA (siRNA) 转染高转移的胆囊癌细胞, 体外 Transwell 实验研究 c-myc siRNA 对胆囊癌高转移细胞迁移和侵袭能力的影响。通过蛋白质印迹法检测转染 c-myc siRNA 后 c-myc 下游部分信号通路的变化。**结果** 高转移细胞中 c-myc 基因表达高于亲代细胞, 转染 c-myc siRNA 后, c-myc 的表达在转录和翻译水平均降低。同时 GBC-SD/M3 细胞的转移和侵袭能力受到抑制。对 c-myc 下游信号通路的检测发现 LIN28 的表达下调。**结论** c-myc 在高转移的胆囊癌细胞中表达上调; 通过 siRNA 下调其表达后可以抑制胆囊癌细胞的转移和侵袭, 这种抑制作用可能与 LIN28 的下调有关。

[关键词] c-myc; 胆囊肿瘤; 肿瘤转移; RNA 干扰; LIN28; let-7

[中图分类号] R 735.8

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2010)09-1029-03

胆囊癌是最常见的胆道系统肿瘤, 预后极差, 5 年生存率只有 5%~10%, 平均生存时间为 3~6 个月^[1]。临床病理研究发现, 胆囊癌可在早期直接侵袭或通过淋巴、血行转移侵犯肝门结构和肝实质^[2], 导致胆囊癌手术根治率非常低。目前, 胆囊癌侵袭和转移的分子机制尚不清楚, 以手术为主的胆囊癌治疗效果一直难以有改善。c-myc 是一个癌基因^[3], 其异常表达与多种肿瘤的异常增殖、侵袭浸润和转移等有关。本研究利用 RNA 干扰技术, 特异性下调 c-myc 基因在胆囊癌细胞中的转录和表达, 观察 c-myc 对胆囊癌细胞运动和侵袭能力的影响, 以探讨 c-myc 在肿瘤侵袭和转移中的作用, 并为胆囊癌侵袭和转移干预提供可能的分子靶点。

1 材料和方法

1.1 实验材料 胆囊癌细胞系 GBC-SD 购自中国科学院细胞库, 高转移亚群细胞 GBC-SD/M3 由浙江省嘉兴市第一医院何小伟博士惠赠。c-myc 抗体购自 Cell Signal Technology 公司, LIN28 抗体购自 Abcam 公司; TRIzol 试剂、反转录试剂盒和 SYBR II 购自大连宝生物公司; LF2000 购自 Invitrogen 公司; Transwell 购自 BD 公司。

1.2 实时定量 PCR 检测 c-myc RNA 和 let-7a microRNA 的表达 细胞在 6 孔板中生长至 80% 融合后, TRIzol 法抽提 RNA, 将 RNA 溶于 DEPC 水。c-myc RNA 反转录反应体系: RNA 500 ng, 5×预混缓冲液 2 μl, 随机引物 0.5 μl, 反转录酶 0.5 μl, 总体积为 10 μl; 反应条件: 37℃ 42 min, 85℃ 30 s。实时定量 PCR 反应体系: SYBR II 10 μl, ROX 0.4 μl, cDNA 1 μl, 上下游引物各 1 μl, 去离子水 6.6 μl; 反应条件: 95℃ 10 s, 95℃ 5 s, 61℃ 31 s, 40 个循环。let-7a microRNA

的反转录使用 ABI 公司的反转录试剂盒, 参照说明书操作, 并加入针对 let-7a 和 U6 的特异探针; 实时定量 PCR 反应体系: 2×酶混合物 8 μl, cDNA 1 μl, 去离子水 7 μl。

1.3 蛋白质印迹法检测 c-myc 蛋白和 LIN28 蛋白的表达 蛋白溶液进行 SDS-PAGE 电泳后, 转膜, 用 5% 的脱脂奶封闭后, 加入一抗, 4℃ 孵育过夜。用 PBST 洗膜, 加入二抗, 室温孵育 1 h。用 PBST 洗膜 6 次, 之后用化学发光试剂盒检测蛋白。

1.4 siRNA 的转染 siRNA 由广州市锐博生物科技有限公司合成, 对照正义链序列为 5'-UUC UCC GGA CGU GUC ACG UTT-3', c-myc siRNA 正义链序列为 5'-GGU CAG AGU CUG GAU CAC C-3'。siRNA 的转染按照 LF2000 说明书进行: 100 pmol siRNA 和 5 μl LF2000 分别加入 250 μl RPMI 1640 培养液中, 室温孵育 5 min 后混合, 继续孵育 20 min 后加入细胞中。

1.5 体外 Transwell 实验 进行迁移实验时, Transwell 的下孔加入 800 μl 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 上孔加入 5×10⁴ 个细胞。8 h 后, 小心吸取上孔残留的细胞, 之后用结晶紫溶液染色。进行侵袭实验时, Transwell 的上孔预先铺入 150 μg 的 Matrigel, 上孔加入 1×10⁵ 个细胞。16 h 后小心吸出上孔残留细胞, 之后用结晶紫溶液染色。染色后, 用棉签擦去上层细胞, 在显微镜下观察迁移到下层细胞, 并计数。

2 结果

2.1 c-myc 在两株具有不同转移能力的细胞系中的表达 实时定量 PCR 检测 c-myc 在 GBC-SD 和 GBC-SD/M3 中的

表达,研究发现 *c-myc* 的 RNA 水平在 GBC-SD/M3 细胞是其在 GBC-SD 细胞中的 2.18 倍 ($P=0.0019$,图 1A)。与 RNA 水平一致,在蛋白水平上 *c-myc* 在 GBC-SD/M3 中的表达也高于其在 GBC-SD 中的表达(图 1B)。

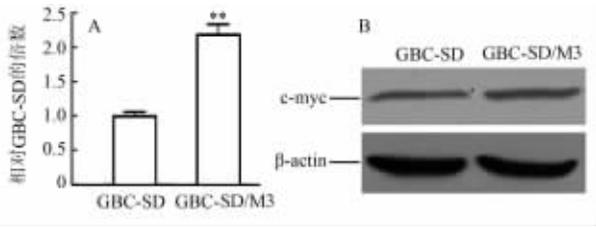


图 1 *c-myc* 在具有不同转移能力的胆囊癌细胞系中的表达 A: 定量 PCR 检测 *c-myc* RNA 在 GBC-SD 和 GBC-SD/M3 中的表达. * * $P<0.01$ vs GBC-SD. B: 蛋白质印迹法检测 *c-myc* 蛋白在 GBC-SD 和 GBC-SD/M3 中的表达. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

2.2 *c-myc* siRNA 抑制 GBC-SD/M3 的转移和侵袭 靶向 *c-myc* 的 siRNA 转染 GBC-SD/M3 细胞后,能有效抑制 *c-myc* 蛋白在细胞中的表达,与对照组相比差异有统计学意义 ($P<0.05$,图 2),证明本实验所合成的 *c-myc* siRNA 是有效的。细胞迁移和侵袭实验显示,*c-myc* siRNA 可以有效抑制 GBC-SD/M3 细胞的迁移和侵袭能力,与对照组相比差异有统计学意义 ($P=0.0168$,图 3A; $P=0.0005$,图 3B)。

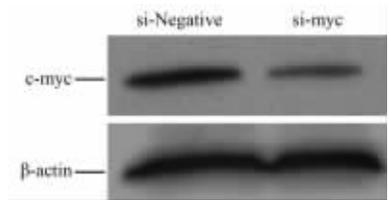


图 2 *c-myc* siRNA 转染 GBC-SD/M3 细胞后 *c-myc* 蛋白的表达

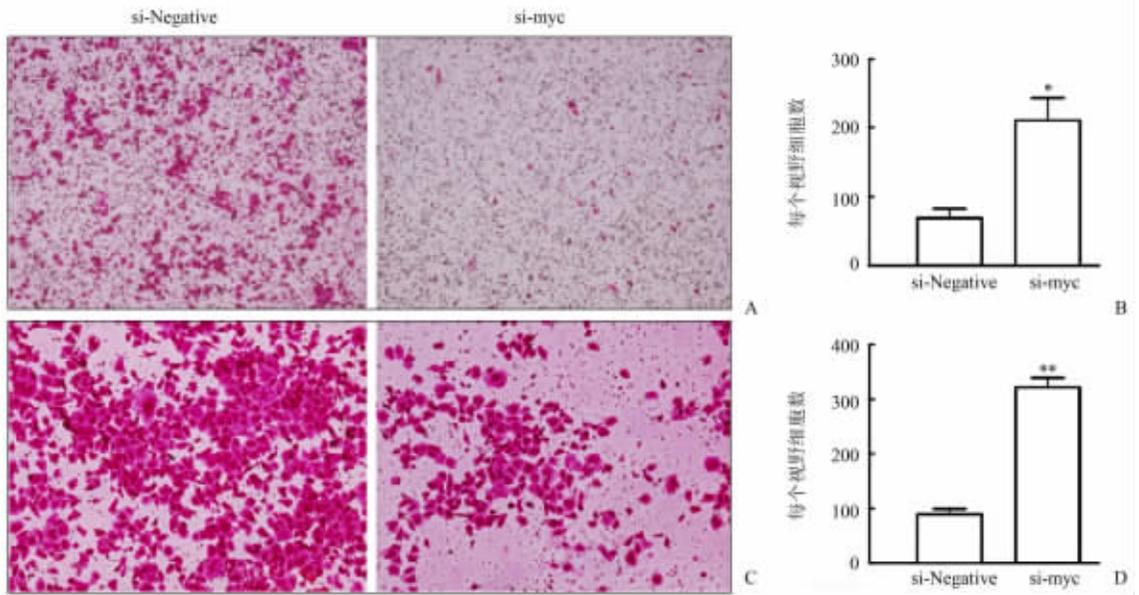


图 3 *c-myc* siRNA 抑制 GBC-SD/M3 细胞转移和侵袭

A, B: 对照和 *c-myc* siRNA 转染后 GBC-SD/M3 细胞的转移; C, D: 对照和 *c-myc* siRNA 转染后 GBC-SD/M3 细胞的侵袭. * $P<0.05$, * * $P<0.01$ vs si-Negative. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

2.3 *c-myc* 的下游分子 LIN28 和 let-7a 表达 为了检测 *c-myc* siRNA 抑制胆囊癌细胞转移的机制,本实验进一步检测了 *c-myc* siRNA 对 LIN28 蛋白水平的影响。图 4A 表明 *c-myc* siRNA 转染后, LIN28 的蛋白水平也相应下调。LIN28 可以调控 let-7a microRNA 的表达来促进肿瘤细胞的转移,因此本实验进一步检测了 *c-myc* siRNA 转染后 let-7a 的表达,并且发现干扰 *c-myc* 后,let-7a 的表达水平有所上升(图 4B)。

3 讨论

恶性肿瘤的转移是个复杂过程,涉及到细胞浸润原发灶周围组织,进入淋巴管或血管,到达新的器官进行生长形成新的瘤灶以及新血管生成。其中,肿瘤细胞的侵袭对转移发

生具有关键作用,包括细胞与基底膜黏附、细胞外基质的降解和细胞的迁移,这些步骤受相关基因调控和介导;*c-myc* 基因是定位于 8 号染色体,编码为 p62 的核内蛋白,是一个转录因子,参与细胞的生长和增殖等过程调控。研究发现 *c-myc* 基因异常激活出现在肿瘤细胞,如乳腺癌^[4]中,其异常激活进一步引起下游基因过表达,最终促进肿瘤的增殖。对胆囊癌临床标本检测发现,*c-myc* 基因异常扩增^[5],蛋白表达上调,且在发生转移的胆囊癌中表达更高^[6-7]。这些证据提示,*c-myc* 基因高表达可能参与或介导胆囊癌转移相关过程。

GBC-SD/M3 是通过动物转移模型中,从亲代 GBC-SD 细胞中筛选出来的经血行途径的高转移亚群细胞^[8]。本研究发现 *c-myc* 在高转移的 GBC-SD/M3 中的表达要高于其亲代细胞 GBC-SD,这一结果与临床检测结果相符,*c-myc* 在转

移能力高的胆囊癌细胞系中的表达也是增高的,说明 c-myc 异常激活与胆囊癌的转移有关。

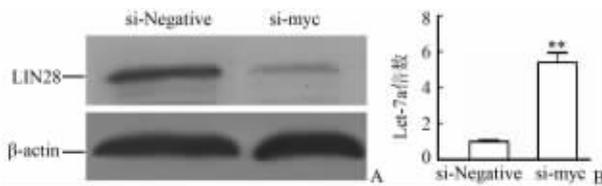


图 4 抑制 c-myc 后 LIN28 与 let-7a 的表达

A: c-myc 降低后, LIN28 蛋白的表达; B: c-myc 降低后, let-7a 的表达。* * $P < 0.01$ vs si-Negative. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

为进一步研究 c-myc 在胆囊癌转移中是否通过介导肿瘤细胞侵袭和运动, 在本实验中, 通过 siRNA 干扰 c-myc 的表达后, GBC-SD/M3 细胞的迁移和侵袭能力都被抑制, 提示 c-myc 可能通过促进胆囊癌细胞运动和侵袭能力介导胆囊癌转移发生。

近年来, 干细胞研究已成为了癌症研究中最热门的研究领域之一。作为一种 microRNAs, let-7 通过关闭致癌基因 Ras 和 HMG2A 来促使细胞分化, 使干细胞失去了自我更新的能力, 从而抑制肿瘤细胞的转移。最近有报道发现 c-myc 可以结合在 LIN28 的启动子区, 并诱导其转录升高, 抑制了 let-7 的表达, 这种调控能导致细胞的转移能力增加^[9]。为了检测 c-myc siRNA 抑制胆囊癌细胞转移的机制, 本实验进一步检测了 c-myc siRNA 对 LIN28 蛋白水平的影响, 结果发现 RNAi 抑制 c-myc 的表达后, LIN28 的表达也被降低, 说明 c-myc 可能通过诱导 LIN28 的表达来促进肿瘤细胞的转移, 而 LIN28 能够调控 let-7 microRNA 的合成, 从而调控下游基因 HMG2A 的表达^[10]。Let-7 在多个肿瘤中表达下调, 并可抑制肿瘤的成瘤能力和转移能力^[11-12]。本研究结果也发现 c-myc 下调以后, let-7 的表达上调。这些证据表明 c-myc 在胆囊癌中促进肿瘤细胞转移可能与 LIN28-let-7 通路有关。

众所周知, 最终对肿瘤治疗的突破很可能依赖于新药的开发和基因治疗的成熟, 而新药的开发和基因治疗的成熟又必将依赖于对肿瘤发病机制的认识。肿瘤转移是造成肿瘤患者死亡的重要原因之一, 因此针对肿瘤转移的靶点开发新的治疗手段是一种十分重要的治疗策略。本研究结果说明 c-myc 及其下游的信号 LIN28-let-7 对胆囊癌细胞在降解细胞外基质及其随后的迁移方面有着重要作用。因此, 靶向 c-myc 基因的 siRNA, 阻断了该蛋白质的翻译过程, 也阻断了其介导的一批下游调控侵袭和转移的基因, 可能是治疗胆囊癌的理想分子靶点。

[参考文献]

- [1] Reid K M, Ramos-De la Medina A, Donohue J H. Diagnosis and surgical management of gallbladder cancer: a review[J]. *J Gastrointest Surg*, 2007, 11: 671-681.
- [2] Shibata K, Uchida H, Iwaki K, Kai S, Ohta M, Kitano S. Lymphatic invasion: an important prognostic factor for stages T1b-T3 gallbladder cancer and an indication for additional radical resection of incidental gallbladder cancer[J]. *World J Surg*, 2009, 33: 1035-1041.
- [3] Meyer N, Penn L Z. Reflecting on 25 years with MYC[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8: 976-990.
- [4] Wolfer A, Wittner B S, Irimia D, Flavin R J, Lupien M, Gurnawardane R N, et al. MYC regulation of a "poor-prognosis" metastatic cancer cell state[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 3698-3703.
- [5] Ooi A, Suzuki S, Nakazawa K, Itakura J, Imoto I, Nakamura H, et al. Gene amplification of Myc and its coamplification with ERBB2 and EGFR in gallbladder adenocarcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2009, 29: 19-26.
- [6] Roa I, Araya J C, Shiraishi T, Yatani R, Wistuba I, Villaseca M, et al. Gallbladder carcinoma: expression of the c-myc and ras-p-21 oncogene products[J]. *Rev Med Chil*, 1994, 122: 754-759.
- [7] 刘智敏, 蒋莉莉, 阳 斌, 廖殿英. VEGF 和 C-myc 表达在胆囊癌形成、发展和转移中的作用[J]. *生物医学工程杂志*, 2003, 20: 68-70.
- [8] 刘颖斌, 何小伟, 王建伟, 李江涛, 李克强, 刘付宝, 等. 胆囊癌肝转移模型建立及高转移亚群细胞的筛选[J]. *中华医学杂志*, 2006, 86: 2117-2121.
- [9] Dangi-Garimella S, Yun J, Eves E M, Newman M, Erkeland S J, Hammond S M, et al. Raf kinase inhibitory protein suppresses a metastasis signalling cascade involving LIN28 and let-7[J]. *EMBO J*, 2009, 28: 347-358.
- [10] Klemke M, Meyer A, Hashemi Nezhad M, Belge G, Bartnitzke S, Bullerdiek J. Loss of let-7 binding sites resulting from truncations of the 3' untranslated region of HMG2A mRNA in uterine leiomyomas[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2010, 196: 119-123.
- [11] Rahman M M, Qian Z R, Wang E L, Sultana R, Kudo E, Nakasono M, et al. Frequent overexpression of HMG1 and 2 in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours and its relationship to let-7 downregulation[J]. *Br J Cancer*, 2009, 100: 501-510.
- [12] He X Y, Chen J X, Zhang Z, Li C L, Peng Q L, Peng H M. The let-7a microRNA protects from growth of lung carcinoma by suppression of k-Ras and c-Myc in nude mice[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136: 1023-1028.

[本文编辑] 孙 岩