

EGFR 基因 knockdown 对肝癌细胞 MHCC-97H 侵袭迁移能力的影响

张传海¹, 桂 阳¹, 郭凤林², 马金良¹, 余继海¹

摘要 目的 探讨 RNA 干扰表皮生长因子受体(EGFR)基因对肝癌细胞株 MHCC-97H 侵袭和迁移能力的影响。方法 构建 EGFR 基因 shRNA, 使用 Lipofectamine 2000 转染 MHCC-97H 细胞, Real-time PCR 和 Western blot 检测 EGFR 和 p-EGFR 的表达; 细胞划痕、Transwell 检测 MHCC-97H 细胞侵袭和迁移能力的变化。结果 与正常组相比, 转染 EGFR shRNA 组 EGFR 和 p-EGFR 均显著降低($P < 0.05$); 同时, 细胞的侵袭、迁移能力均明显减弱($P < 0.05$)。结论 干扰 EGFR 可降低 MHCC-97H 细胞侵袭、迁移能力, 降低其远处转移能力。

关键词 EGFR; p-EGFR; MHCC-97 细胞; RNA 干扰; 侵袭迁移能力

中图分类号 R 392.11; R 329.25

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)08-1133-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.08.008

肝癌以其恶性程度高、转移能力强成为临床治疗当中的难题, 因此, 如何有效降低其侵袭迁移能力已成为临床急需解决的问题。该课题旨在通过干扰表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)研究 MHCC-97H 细胞侵袭迁移能力的改变, 以期为进一步探讨其在肝癌中的作用奠定基础, 为进一步阐明肝癌的转移机制及临床治疗提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 材料 肝癌细胞株 MHCC-97, 购自中国科学院上海细胞库; RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、Real-time PCR 试剂, 购自北京天根生化科技有限公司; RPMI1640 细胞培养基、胎牛血清, 购自美国 Gibco 公司; RIPA 细胞裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒,

购自上海碧云天生物技术研究所; β -actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; EGFR、p-EGFR 抗体购自美国 Bioworld 公司; PCR 引物购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 MHCC-97H 细胞快速复苏后, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 使用完全培养基制成单细胞悬液, 接种于细胞培养瓶, 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养。隔天换液、观察细胞生长状况, 当细胞汇合度约为 90% 时, 进行消化、传代、种板, 按 1×10^5 /孔接种于 6 孔细胞培养板。继续培养细胞至汇合度为 80% 时, 将培养基更换为无血清 RPMI1640 培养基, 进行后续实验。

1.2.2 载体构建 空白质粒(GV248)以及 EGFR shRNA 序列设计、构建、合成均由上海吉凯基因化学技术有限公司提供, 名称分别标记为 GV248/EGFR shRNA-I、GV248/EGFR shRNA-II、GV248/EGFR shRNA-III, 均进行 PCR、双酶切和测序三重检测鉴定, 均证实构建成功。3 条 EGFR shRNA 序列见表 1。

1.2.3 细胞转染 当细胞汇合度约为 90% 时, 进行消化、计数, 按 1×10^5 /孔接种于 24 孔细胞培养板。继续培养细胞至汇合度为 80% 时, 更换培养基为无血清、无抗生素培养基, 使用 Lipofectamine 2000 并参照其说明书将 3 条 EGFR shRNA 及 GV248 分别单独转染至 MHCC-97H 细胞。

1.2.4 Real-time PCR 预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次, 按 1 ml/孔的量加入细胞裂解液、提取细胞总 RNA。以总 RNA 为模板, 参照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA 第一链。以 cDNA 为模板, 使用 ABI7500 Real-time PCR 仪检测相关基因的表达。引物序列分别如下: EGFR, 上游引物: 5'-CGAATGGGCCTAAGATCCCG-3', 下游引物: 5'-AGCTTGTTGGGAGCTTCTC-3'; GAPDH, 上游引物: 5'-GCCGCATCTTCTTTGCGTC-3', 下游引物: 5'-TACGACCAAATCCGTTGACTCC-3'。Real-time PCR 反应程序为: 95 °C、15 s, 60 °C、1min, 40 个循环。以 GAPDH 作为内参,

2017-04-10 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金项目资助项目(编号: 1608085MH198)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院¹ 普外科、² 麻醉科, 合肥 230001

作者简介: 张传海, 男, 副主任医师, 博士, 责任作者, E-mail: zhangch3788@126.com

表1 EGFR shRNA 序列

shRNA 名称	正义链	茎环结构	反义链
GV248/EGFR shRNA-I	5'-CACAAAGCAGTGAATTTAT-3'	CTCGAG	5'-ATAAATTCAGTCTTTGTGGC-3'
GV248/EGFR shRNA-II	5'-CAAGCCAAATGGCATCTTT-3'	CTCGAG	5'-AAAGATGCCATTTGGCCTTGGC-3'
GV248/EGFR shRNA-III	5'-TGGATGATAGACCCAGATA-3'	CTCGAG	5'-TATCTGCCTCTATCATCCAGC-3'

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法比较分析各基因表达。

1.2.5 Western blot RIPA 细胞裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法定量后,按 50 μg /孔的量加样、电泳、转膜。转膜结束后,5% 脱脂奶粉室温封闭 1.5 h, TBST 洗膜 3 min。各蛋白抗体分别参考抗体说明书进行操作,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。相应二抗室温孵育 1.5 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min; ECL 发光、显影,以 GAPDH 为内参,分析各指标的相对表达量。

1.2.6 细胞划痕 取处于对数生长期的细胞,胰酶消化后,加入 RPMI 1640 培养基重悬为单细胞悬液。细胞计数板计数,以 1×10^6 /孔种入 12 孔细胞培养板,培养箱中过夜培养。待细胞长成单层即弃去培养液,用 $\phi 1.0 \mu\text{m}$ 的划痕器在每孔中央划出一划痕,无菌 PBS 洗去脱落细胞,100 倍光学显微镜下拍照,即为 0 h。然后将细胞置于培养箱中分别继续培养 24、48 h 后,在同一观察点处进行拍照、记录细胞生长情况。利用 Image Pro Plus 6.0 软件测量每孔多个点划痕间距,取平均值,计算迁移率,即细胞迁移率(%) = (划痕宽度 0 h - 划痕宽度 24 h/48 h) / 划痕宽度 0 h $\times 100\%$ 。

1.2.7 Transwell 实验 胰酶消化细胞后,用无血清 RPMI1640 培养基重悬、调整细胞浓度,以每孔 1×10^4 个的细胞密度加入到预铺好 Matrigel 基质胶的 Transwell 小室的上室内,下室加入 500 ml 完全培养液,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。取出上室,4% 多聚甲醛固定 15 min,结晶紫染色 1 min,蒸馏水清洗 3 次,每次 3 min。以正常组作为对照,200 倍光学显微镜下观察、计数穿膜细胞数,随机选取 5 个视野。

1.3 统计学处理 每组实验均重复 3 次,采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析,结果以表示,组间比较采用 F 检验和 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 干扰 EGFR 对 EGFR、p-EGFR 表达的影响

2.1.1 EGFR shRNA 有效序列筛选 将 3 条 EGFR shRNA 及 GV248 分别转染 MHCC-97H 细胞,Real-time PCR 和 Western blot 分别检测 EGFR 的表达,与正常组相比,GV248/EGFR shRNA-I 和 GV248/EGFR shRNA-III 差异有统计学意义 ($F = 28.210$ 、 16.460 , $P = 0.000$),其对 EGFR 的抑制率分别为 $(92.41 \pm 2.31)\%$ 和 $(94.18 \pm 3.02)\%$ 。同时,与正常组相比,GV248/EGFR shRNA-II 和 GV248 差异无统计学意义 ($F = 4.721$ 、 1.999 , $P = 0.151$ 、 0.341),表明两者对 EGFR 表达均无影响。见图 1。

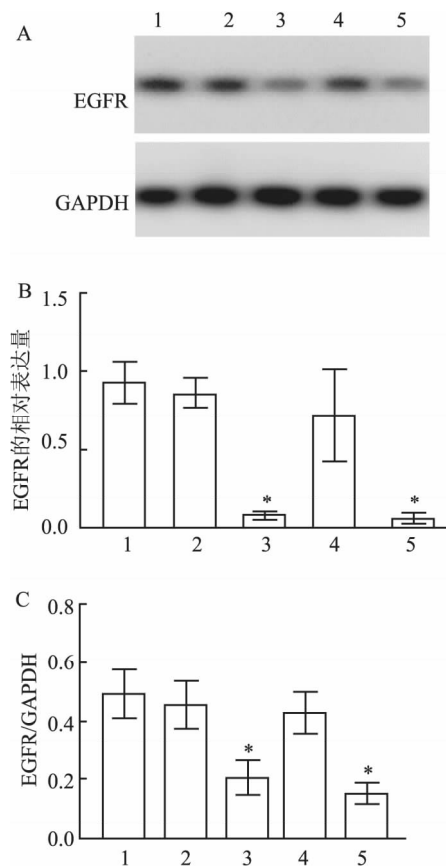


图1 不同 EGFR shRNA 对 EGFR 表达的影响

A: 不同组别 EGFR 和 GAPDH 蛋白表达; B: 不同组别 EGFR mRNA 表达分析结果; C: 不同组别 EGFR 蛋白表达分析结果; 1: 正常组; 2: 转染 GV248 组; 3: 转染 GV248/EGFR shRNA-I 组; 4: 转染 GV248/EGFR shRNA-II 组; 5: 转染 GV248/EGFR shRNA-III 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

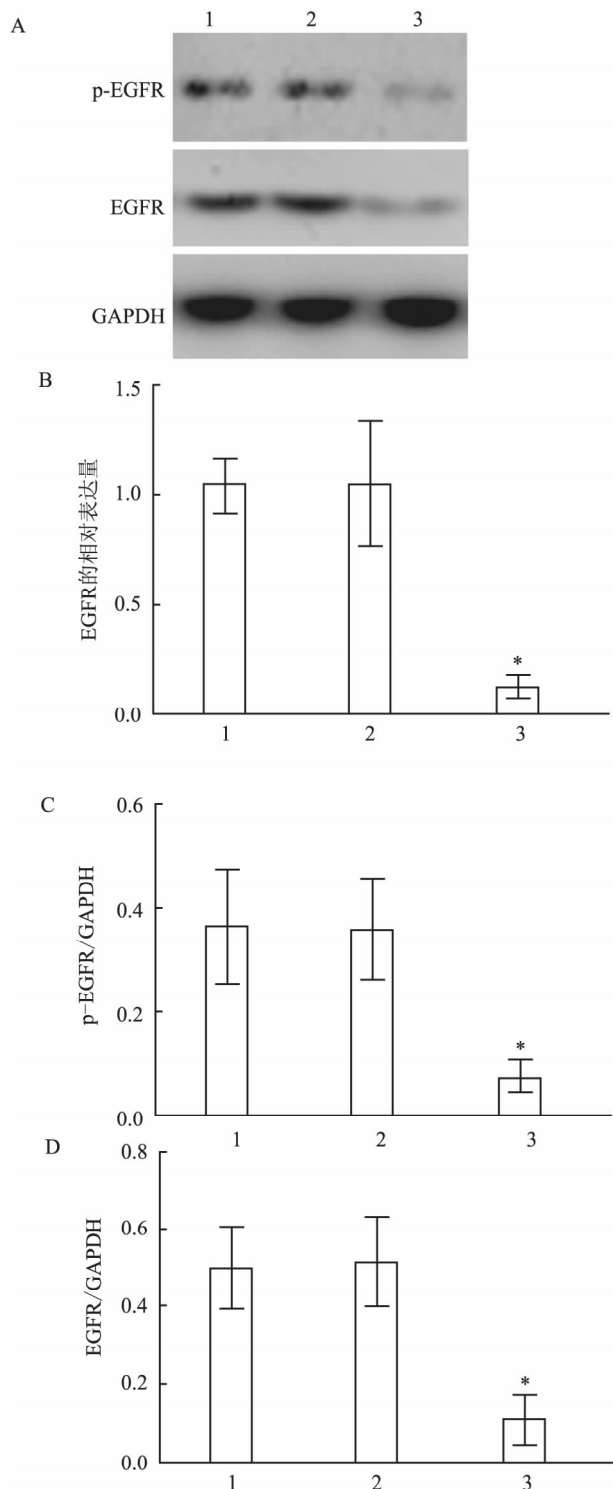


图2 干扰EGFR对EGFR、p-EGFR表达的影响

A: 不同组别 p-EGFR、EGFR 和 GAPDH 蛋白表达; B: 不同组别 EGFR mRNA 表达分析结果; C: 不同组别 p-EGFR 蛋白表达分析结果; D: 不同组别 EGFR 蛋白表达分析结果; 1: 正常组; 2: 转染 GV248 组; 3: 转染 GV248/EGFR shRNA-III 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

2.1.2 干扰 EGFR 对 EGFR、p-EGFR 表达的影响

选取 GV248/EGFR shRNA-III 转染 MHCC-97H 细胞, 24 h 后分别提取细胞总 RNA 和总蛋白, Real-time PCR 和 Western blot 分析结果与正常组相比, 不但 EGFR 的 mRNA 和蛋白水平均发生显著下降, 差异有统计学意义 ($F = 5.537, 7.993, P = 0.000, 0.027$), 而且其磷酸化表达水平也显著降低, 差异有统计学意义 ($F = 15.760, P = 0.000$)。见图 2。

2.2 干扰 EGFR 对 MHCC-97 细胞侵袭、迁移能力的影响

将 GV248/EGFR shRNA-III 转染 MHCC-97H 细胞, Transwell、细胞划痕分别检测细胞侵袭、迁移能力变化。Transwell 实验分析结果表明, 与正常组相比, GV248/EGFR shRNA-III 组细胞形态呈多边形、不规则状且细胞状态变差, 侵袭、穿过 Matrigel 基质胶的细胞数量明显减少, 侵袭能力显著下降, 差异有统计学意义 ($F = 3.254, P = 0.000$); 细胞划痕实验显示, 与正常组相比, GV248/EGFR shRNA-III 组 24 h 和 48 h 细胞增殖数量和迁移率均明显降低, 差异有统计学意义 ($F = 6.516, 7.897, P = 0.000$)。见图 3。

3 讨论

肝癌是全球最常见的恶性肿瘤之一, 以恶性程度高、转移能力强、预后差成为了临床治疗的难题, 而如何降低肝癌转移能力成为急需解决的问题。肝细胞癌变的分子机制复杂, 肝癌的发生发展与肝细胞中生长因子的过表达密切相关^[1-2]。本研究利用 RNA 干扰技术, 通过诱导 EGFR 基因沉默的 shRNA 转染 MHCC-97H 细胞, 探讨其对肝癌细胞侵袭、迁移能力的影响, 以期对肝癌基因治疗拓展新思路。

EGFR 具有酪氨酸激酶受体家族的基本生物学功能, 包括调控细胞活性、增殖、迁移和分化等。EGFR 突变或过表达与肿瘤的发生发展有着密切联系^[3]。近年来研究^[4-6]结果显示 EGFR 信号通路的异常激活或过表达与多种肿瘤的发展相关, 抑制 EGFR 已成为治疗肿瘤的潜在方法之一。

综上所述, 本研究通过 RNA 干扰沉默 EGFR 基因, 证明了肝癌细胞的侵袭、迁移能力明显降低, 从而降低了肝癌细胞的转移能力。为深入研究肝癌的转移机制奠定了基础。

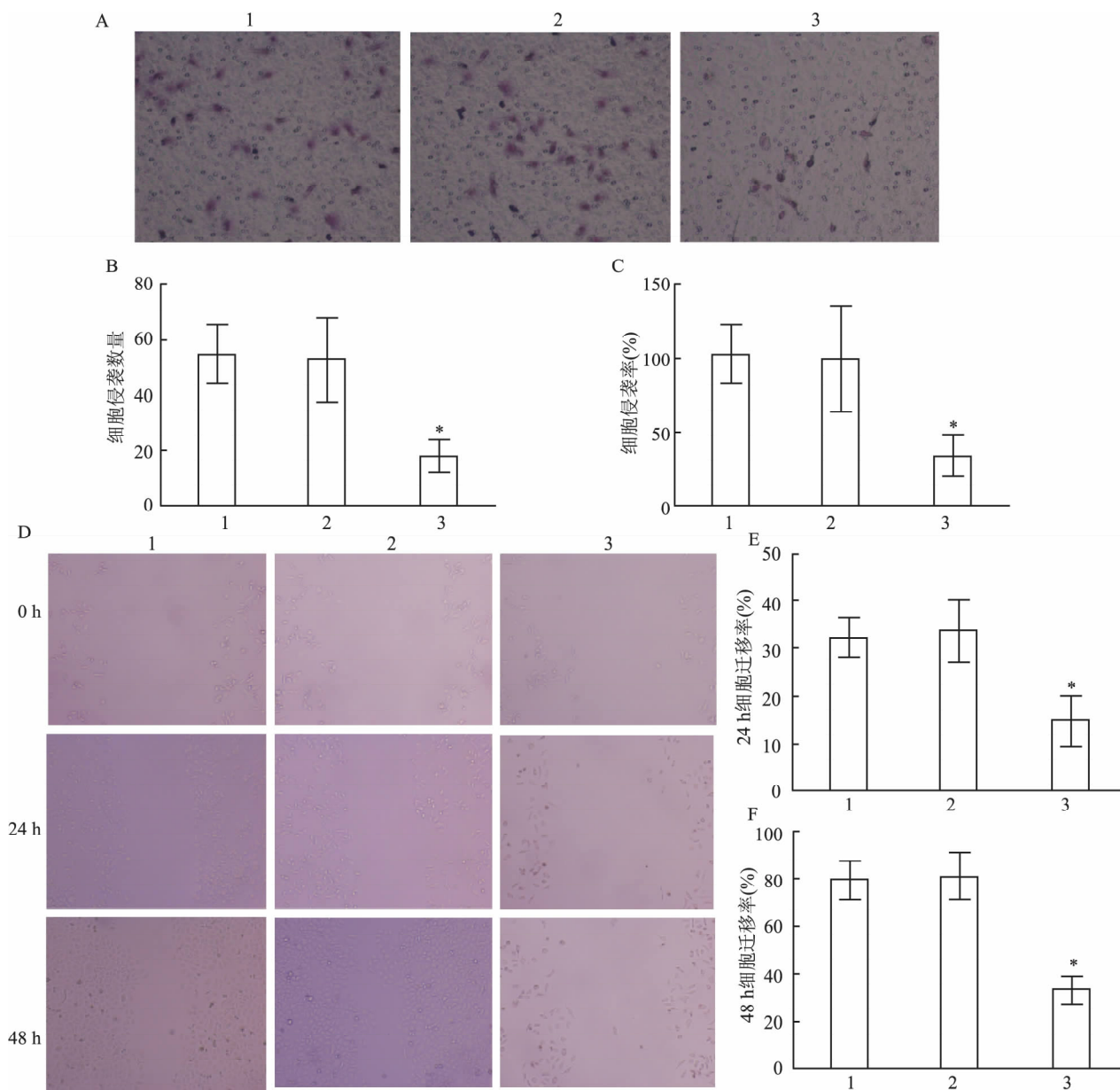


图3 干扰EGFR对MHCC-97细胞侵袭、迁移能力的影响

A: 不同组别 Transwell 图 ×200; B: 不同组别细胞侵袭数量分析; C: 不同组别细胞侵袭能力分析; D: 不同组别细胞划痕图 ×100; E: 不同组别 24 h 细胞迁移率分析; F: 不同组别细胞 48 h 细胞迁移率分析; 1: 正常组; 2: 转染 GV248 组; 3: 转染 GV248/EGFR shRNA-III 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

参考文献

[1] 方文敏, 周绪红, 杨双, 等. 肝癌 HepG2 细胞株胰岛素样生长因子 1 和表皮生长因子受体基因沉默后放疗增敏及机制 [J]. 解剖学杂志, 2012, 35(3): 309-13.

[2] 陈罡, 党裔武, 罗殿中. 介导 EGFR siRNA 转染肝癌 HepG2 细胞的试剂筛选及条件优化 [J]. 山东医药, 2011, 51(18): 18-20.

[3] 王代宏, 刘志苏, 王芳元. 小分子 RNA 干扰同时沉默表皮生长因子受体和胰岛素样生长因子-1 受体基因对肝癌细胞周期和凋亡的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(10): 1665

-7.

[4] 牛坚, 刘斌, 潘晴, 等. 慢病毒介导的双干扰 RNA 同时沉默 IGF1R 和 EGFR 蛋白治疗肝癌的实验研究 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2009, 16(9): 734-9.

[5] 叶鑫, 陈俊花, 何迎盈, 等. 沉默 IGF1 和 EGF 二受体基因的肝癌 HepG2 细胞株的抗瘤放疗增敏及机制 [J]. 广东医学, 2016, 37(12): 1799-802.

[6] 廖玉华, 袁玉林, 周绪红. 同时沉默 IGF-1R 和 EGFR 基因对肝癌 HepG2 细胞株生长抑制的作用机理 [J]. 武汉大学学报 (医学版), 2011, 32(3): 303-7.

钙库操纵钙内流和钠钙交换体 在卡巴胆碱引起的气管平滑肌收缩中的作用

闫德俊¹, 尹胜¹, 丁圣刚², 沈兵¹, 杜鹃¹

摘要 目的 探讨钙库操纵钙内流(SOCE)和钠钙交换体(NCX)在卡巴胆碱引起的气管平滑肌收缩中的作用。方法 采用小鼠离体气管实验,观察NCX特异性阻断剂KB-R7943、电压依赖型钙通道阻断剂尼非地平、Orai1阻断剂BTP2对卡巴胆碱引起的气管收缩的抑制效应。结果 KB-R7943和BTP2显著阻断了累积浓度卡巴胆碱引起的小鼠气管收缩和卡巴胆碱引起的SOCE介导的气管收缩,而尼非地平未显著阻断卡巴胆碱引起的气管收缩。结论 NCX和Orai1都参与介导卡巴胆碱引起的气管平滑肌收缩,Orai1主要参与卡巴胆碱引起的起始阶段的瞬时收缩,NCX主要参与后期的持续收缩,而起始阶段的Orai1介导的钙内流可能是激活NCX的前提条件,阻断Orai1的同时也会导致后期NCX引起的收缩阻断,两者共同参与介导卡巴胆碱引起的收缩。

关键词 气管平滑肌; 钠钙交换体; 钙库操纵的钙内流; 卡巴胆碱

中图分类号 Q 412

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)08-1137-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.08.009

Ca²⁺作为细胞内重要的第二信使,在很多情况下发挥着重要的作用^[1],静息状态下,细胞质中Ca²⁺浓度通常维持在约10⁻⁷ mol/L,细胞受到各种刺激后可引起胞内Ca²⁺浓度升高,诱发Ca²⁺信号介导的一系列生理反应。而钙库操纵钙内流(store-operated calcium entry,SOCE)是介导Ca²⁺内流的一种重要方式,Orai1和基质相互作用蛋白分子1(stromal-interacting molecular 1,STIM1)是SOCE的两个重要组成成分^[2]。钠钙交换体(sodium calcium exchanger,NCX)是广泛分布于细胞质膜、线粒体膜、内质网、分泌小泡膜等膜性结构上的一种阳离子转运蛋白。NCX可以对胞质内Ca²⁺浓度进行快速精确的调节,从而影响细胞内信号转导、细胞生长发育等一系列生理活动。

2017-04-01 接收

基金项目: 安徽省高校优秀青年人才支持计划

作者单位: ¹安徽医科大学基础医学院生理学教研室,合肥 230032

²安徽医科大学第一附属医院儿科,合肥 230022

作者简介: 闫德俊,男,硕士研究生;

杜鹃,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: dujuan@ahmu.edu.cn

Effect of EGFR gene knockdown on invasion and migration of hepatocellular carcinoma MHCC-97H cell line

Zhang Chuanhai¹, Gui Yang¹, Guo Fenglin², et al

(¹Dept of General Surgery, ²Dept of Anesthesiology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the effect of RNA interference on the invasion and migration of hepatocellular carcinoma cell by epidermal growth factor receptor gene. **Methods** The expression of EGFR and p-EGFR was detected by Real-time PCR and Western blot. Cell scratch and Transwell were used to detect the invasion and migration of MHCC-97H cells. Lipofectamine 2000 was used to transfect MHCC-97H cells. **Results** EGFR and p-EGFR were significantly decreased in EGFR siRNA group compared with the normal group ($P < 0.05$). Meanwhile, the invasion and migration of EGFR siRNA group were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Interfering with EGFR can reduce the ability of invasion and migration of MHCC-97H cells and reduce the distant metastasis ability of MHCC-97H cells.

Key words EGFR; p-EGFR; MHCC97 cells; RNA interference; invasion and migration