

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.08.004
文章编号: 1005-8982 (2018) 08-0018-05

siRNA 下调 *Gli* 基因影响食管腺癌 OE33 细胞生长转移的实验研究 *

王雷¹, 杜媛鲲², 刘庆熠¹, 米源¹, 廖海江¹, 王林¹

(1. 河北医科大学第四医院 胸二科, 河北 石家庄 050011; 2. 河北医科大学 期刊社, 河北 石家庄 050017)

摘要: 目的 研究 *Gli* 表达下调对食管腺癌 OE33 细胞生长转移的影响, 并探讨其相关的分子机制。**方法** 将 *Gli1*、*Gli2* siRNA 和空白对照 siRNA 转染 OE33 细胞 48 h, 实时荧光定量聚合酶链反应检测 OE33 细胞 *Gli1* 和 *Gli2* mRNA 表达水平; 采用 Western blot 检测 OE33 细胞中 *Gli1*、*Gli2*、Cyclin D1、p27、E-cadherin 及 N-cadherin 蛋白的表达水平; 流式细胞术检测 OE33 细胞增殖和细胞周期分布; Transwell 实验检测细胞侵袭能力。**结果** 采用 *Gli1* 和 *Gli2* siRNA 抑制 *Gli1* 和 *Gli2* mRNA 及蛋白表达后, 可下调 Cyclin D1 和 N-cadherin 蛋白表达, 增加 E-cadherin 和 p27 蛋白表达, 同时抑制细胞增殖, 将细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期并降低细胞的侵袭能力, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** *Gli* 在食管腺癌的生长转移中具有重要作用, 敲掉 *Gli1* 和 *Gli2* 基因表达可抑制食管腺癌细胞周期分布和上皮-间质转化能力, 这可能与 Cyclin D1、p27、E-cadherin 及 N-cadherin 蛋白变化相关。

关键词: RNA 干扰; 食管腺癌; *Gli*; 细胞周期; 上皮-间质转化

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Silencing *Gli* gene with siRNA modulates growth and invasion of esophageal adenocarcinoma OE33 cells*

Lei Wang¹, Yuan-kun Du², Qing-yi Liu¹, Yuan Mi¹, Hai-jiang Liao¹, Lin Wang¹

(1. Department of Thoracic Surgery, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, China; 2. Periodical Press, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050017, China)

Abstract: Objective To explore the effect of down-regulation of *Gli* expression on growth and invasion of esophageal adenocarcinoma OE33 cells and to discuss the molecular mechanisms. **Methods** *Gli1* and *Gli2* siRNA and control siRNA were respectively transfected into OE33 cells for 48 h. Expressions of the *Gli1* and *Gli2* mRNA and protein were detected by real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot respectively. The expressions of cyclin D1, p27, E-cadherin and N-cadherin proteins were observed by Western blot. The cell cycle was determined by flow cytometry. In addition, invasion ability was detected by Transwell assay. **Results** After transfection of *Gli1* and *Gli2* siRNA, *Gli1* and *Gli2* expressions were inhibited, the expressions of cyclin D1 and N-cadherin proteins were downregulated, and E-cadherin and p27 expressions were increased ($P < 0.05$). After *Gli1* and *Gli2* were knocked down, cell cycle was arrested at G₀/G₁ phase and cell invasion ability was decreased compared with the control siRNA ($P < 0.05$). **Conclusions** *Gli* may play an important role in the growth and invasion of esophageal adenocarcinoma. *Gli1* and *Gli2* knockout can inhibit the cell cycle and epithelial-mesenchymal transition, which may be associated with cyclin D1, p27, E-cadherin and N-cadherin.

Keywords: RNA interference; esophageal adenocarcinoma; *Gli*; cell cycle; epithelial-mesenchymal transition

收稿日期: 2016-04-14

* 基金项目: 河北省科技计划项目 (No: 132077127D); 河北省卫生厅医学科学研究重点课题 (No: 20160177)

食管癌的发病率在全球所有恶性肿瘤中居第 8 位, 其中我国是食管癌高发区。食管癌的病理类型主要包括鳞癌和腺癌, 尽管近 30 年来鳞癌发病率呈下降趋势, 但食管腺癌发病率上升了 3 ~ 4 倍, 并且多数患者确诊时即为进展期, 即使采用根治性手术联合放化疗等综合措施, 5 年生存率任然 <20%^[1-2]。异常激活的 Hedgehog (以下简称 Hh) 信号传导通路在恶性胸膜间皮瘤、淋巴瘤、肺癌、前列腺癌的增殖、侵袭及迁移中发挥重要作用^[3-5]。既往针对食管腺癌 Hh 通路的研究多集中在上游靶点 Smo, 针对 Hh 通路下游核心靶点 Gli1、Gli2 的表达调控与食管腺癌生物学行为关系的研究极少, 所以本研究通过 siRNA 抑制 Gli1 和 Gli2 在食管腺癌 OE33 细胞中的表达, 探讨 Gli 表达下调对食管腺癌细胞生长和侵袭能力的影响, 以及可能的分子机制, 旨在为临床上食管腺癌的靶向治疗提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞系来源 人食管腺癌细胞系 OE33 购自英国 Sigma-Aldrich 公司,

1.1.2 主要试剂 胎牛血清 (美国 Gemini 公司), RPMI 1640 培养液 (美国 Corning 公司), Silencer™ Select Gli1、Gli2 和 Control siRNA 购自美国 Life Technologies 公司, Lipofectamine™ RNAiMAX 转染试剂 (美国 Invitrogen 公司), 总 RNA 提取试剂盒 (德国 Qiagen 公司), TaqMan® 基因表达预混液 (美国 Applied Biosystems 公司), iScript™ cDNA 合成试剂盒 (美国 Bio Rad 公司), TaqMan® Gli1 引物和探针 (Hs00171790)、TaqMan® Gli2 引物和探针 (Hs01119974_m1)、TaqMan® 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) (Hs02758991_g1) 购自美国 Life Technologies 公司, Pierce-BCA 蛋白分析试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司), Gli2 鼠抗人单克隆抗体、p27 鼠抗人单克隆抗体、GAPDH 鼠抗人单克隆抗体及 N-cadherin 兔抗人单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, Gli1 兔抗人多克隆抗体和 E-cadherin 鼠抗人单克隆抗体购自美国 abcam 公司, Cyclin D1 兔抗人单克隆抗体 (美国 Cell Signaling 公司), 增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司), Matrigel 胶和 Transwell 膜嵌套购自美

国 Corning 公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养和转染 食管腺癌 OE33 细胞培养于 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基。将呈对数生长期的 OE33 细胞以 3×10^5 个 / 孔接种于 6 孔板上, 第 2 天待细胞融合生长达 50% ~ 60% 时更换无血清培养基, 并按照 Lipofectamine™ RNAiMAX 转染试剂说明书进行 Gli1 和 Gli2 siRNA 干扰引物的转染, 同时设立对照组 (Control siRNA)。每组各设 3 个孔, 转染时每孔 Gli1 和 Gli2 siRNA, 以及对照组的浓度均为 100 nmol/L, 于转染 6 h 后更换新的培养基, 48 h 后 PBS 洗涤细胞 3 次, 提取各组样本的 mRNA 和蛋白, 实验重复 3 次。

1.2.2 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)

① 总 RNA 的提取: 按照总 RNA 提取试剂盒说明书提取各组样本 RNA, 并测定每组样本 RNA 浓度。② cDNA 合成: 按照 iScript™ cDNA 合成试剂盒说明书进行 cDNA 的逆转录, 每份样本的反应体系为 40 μ l, 包含 iScript 逆转录酶 2 μ l, iScript 反应混合液 8 μ l 和总 RNA 500 ng, 放置于 Veriti® 96-Well Thermal Cycler 仪器中进行 cDNA 的逆转录。逆转录条件: 25℃ 变性 5 min, 42℃ 退火 30 min, 85℃ 延伸 5 min。③ PCR 扩增: 将每份样本的 cDNA 用无 R-Nase 水稀释 10 倍, 在 384 孔板按照 10 μ l / 孔的反应体系将每组样本 Cdna 4.5 μ l、Taqman 基因表达预混液 5 μ l, 以及 TaqMan® Gli1、Gli2、GAPDH 各自的引物和探针 0.5 μ l 依次加在孔里, 2 000 r/min 离心 2 min, 置于 ABI 7900HT 高通量 qRT-PCR 仪中进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件: 95℃ 预变性 10 s, 60℃ 变性 10 s, 72℃ 退火 10 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 的 Ct 值作为内参, 采用 2^{-ΔCt} 法进行样本分析。

1.2.3 Western blot 检测 用 PBS 洗涤 3 次转染 48 h 细胞, 每个 6 孔板内加含有蛋白酶抑制剂的 M-PER 细胞总蛋白提取试剂 100 μ l, 收集每组样本的总蛋白提取液, 聚氰基丙烯酸正丁酯法测定样本的总蛋白浓度。聚丙烯酰胺凝胶电泳, 工作条件 200 V、50 min。冰浴下 100 V、1 h 转至聚偏氟乙烯膜。室温 5% 脱脂奶粉的 TBST 液封膜 1 h, 剪膜分别加入一抗 Gli-1 (1:1 000)、一抗 Gli2 (1:250)、一抗 Cyclin D1 (1:1 000)、一抗 N-cadherin (1:500)、一抗 p27 (1:250)、一抗 E-cadherin (1:10 000) 及一抗 GAPDH (1:10 000), 4℃

摇床孵育过夜。第 2 天 TBST 洗膜 3 次, 10 min/ 次, 分别加入羊抗鼠或羊抗兔二抗 (1:20 000) 室温孵育 1h, ECL 试剂发光 5 min 后暗室曝光显影, Image 软件检测蛋白条带的表达。设定 GAPDH 为内参, 每组样本的蛋白相对表达量 = 目的蛋白表达量 / 内参蛋白表达量。实验重复 3 次。

1.2.4 流式细胞术 流式细胞术检测细胞周期变化。将转染 48 h 后的 OE33 细胞制备成单细胞悬液, PBS 漂洗后置于 4℃、70% 冰乙醇固定 30 min。用冷 PBS 漂洗 3 次, 重悬细胞于含 40 μg 碘化丙啶和 100 μg RNaseA 的 PBS 中 37℃ 孵育 30 min。上机检测各组样品的 DNA 含量, 采用 Muticycle AV 分析软件对 DNA 细胞周期进行拟合分析。实验重复 3 次。

1.2.5 Transwell 侵袭实验 将铺好 Matrigel 基质胶的聚碳酸酯膜平铺于 Transwell 小室的下室。收集转染后的 OE33 细胞重悬于无血清培养液中, 吹打为单细胞悬液, 加入 Transwell 小室上室 (100 μl/ 室), 包含 7.5×10^4 个细胞。下室加入含 10% 血清的培养液 (500 μl/ 室), 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 培养 24 h, 用棉棒擦去上层基质胶和未迁移的细胞, 将聚碳酸酯膜用甲醇固定, 结晶紫染色。倒置显微镜下高倍视野 (400 倍) 观察穿膜细胞数。每张膜随机取 4 个视野并计算平均值。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Gli1 和 Gli2 基因的表达

Gli1 和 Gli2 siRNA 组 Gli1 mRNA 表达水平为

(0.18 ± 0.32), 与对照组 (1.00 ± 0.06) 比较, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 (*t* = 20.300, *P* = 0.000), Gli1 和 Gli2 siRNA 组较对照组降低。Gli1 和 Gli2 siRNA 组 Gli2 mRNA 表达水平为 (0.30 ± 0.03), 与对照组 (1.00 ± 0.05) 比较, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 (*t* = 20.590, *P* = 0.000), Gli1 和 Gli2 siRNA 组较对照组降低。见图 1。

2.2 Gli1、Gli2、Cyclin D1、p27、E-cadherin 及 N-cadherin 蛋白表达

Gli1 和 Gli2 siRNA 组 Gli1、Gli2、Cyclin D1 及 N-cadherin 蛋白表达与对照组比较, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 (*t* = 25.579、35.340、14.950 和 14.230, 均 *P* = 0.000), Gli1 和 Gli2 siRNA 组较对照组减少。Gli1 和 Gli2 siRNA 组 E-cadherin、p27 蛋白表达与对照组比较, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 (*t* = -75.714 和 -19.864, 均 *P* = 0.000), Gli1 和 Gli2 siRNA 组较对照组增加。见图 2。

2.3 Gli1 和 Gli2 siRNA 对细胞周期的影响

Gli1 和 Gli2 siRNA 组 G₀/G₁ 期细胞为 (64.47 ± 3.14)%, 对照组为 (39.07 ± 2.20)%, 经 *t* 检验,

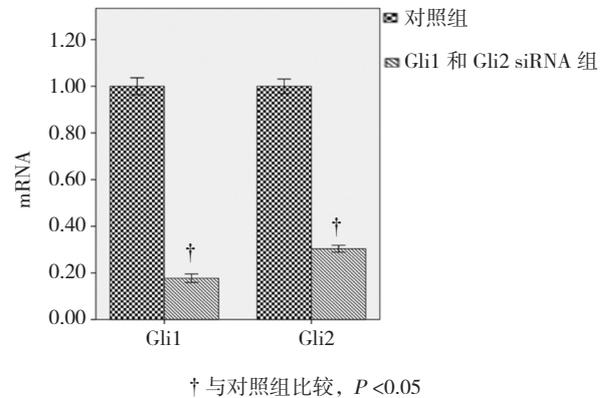


图 1 两组 Gli1 和 Gli2 mRNA 的表达比较

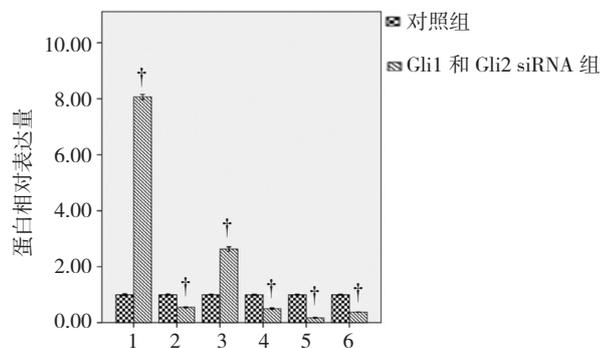
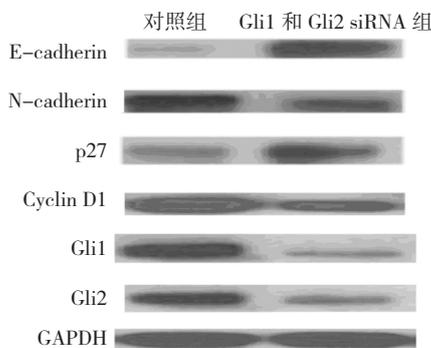


图 2 两组 Gli1、Gli2、Cyclin D1、p27、E-cadherin 及 N-cadherin 蛋白的表达

差异有统计学意义 ($t = -11.480$, $P = 0.000$), Gli1 和 Gli2 siRNA 组增高。Gli1 和 Gli2 siRNA 组 S 期细胞为 $(25.03 \pm 1.50)\%$, 对照组为 $(58.40 \pm 3.34)\%$, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 15.768$, $P = 0.000$), Gli1 和 Gli2 siRNA 组降低。见图 3。

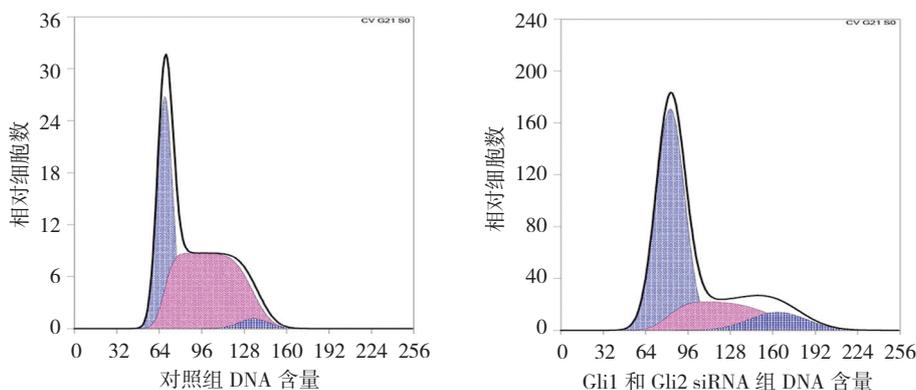
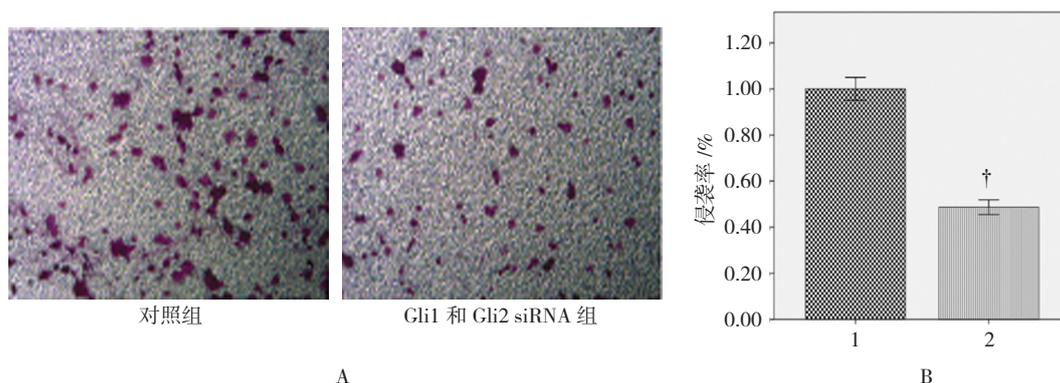


图 3 流式细胞术检测结果



A: Transwell 侵袭实验结果 ($\times 400$); B: 两组细胞侵袭能力比较。1: 对照组; 2: Gli1 和 Gli2 siRNA 组。† 与对照组比较, $P < 0.05$

图 4 Gli1 和 Gli2 siRNA 对细胞侵袭能力的影响

3 讨论

Hh 信号通路主要由 Hh 配体、跨膜蛋白受体 Ptch、Smo、核转录调控子 Gli 及下游靶基因等构成, 其通路的异常活化在肿瘤形成、侵袭及转移中发挥重要作用, 针对其通路的靶向抑制也成为抗肿瘤治疗的热点。目前针对 Hh 通路的调控多集中在 Smo, 由于存在不依赖 Smo 激活的非经典 Hh 通路、Hh 通路, 以及 TGF β 、EGFR 等通路存在交叉调控, 因此针对 Hh 信号通路的下游核转录因子 Gli 调控起到更好的抗肿瘤效果。Gli 包括 Gli1、Gli2 及 Gli3 3 种形式, 其中 Gli3 是转录抑制因子, 而 Gli1 和 Gli2 具有转录激活作用^[6]。活化的 Gli1 和 Gli2 进入细胞核与下游基因启动

2.4 Gli1 和 Gli2 siRNA 对细胞侵袭能力的影响

Gli1 和 Gli2 siRNA 组相对穿膜细胞数为 (0.49 ± 0.06) , 对照组为 (1.00 ± 0.09) , 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 8.622$, $P = 0.001$), Gli1 和 Gli2 siRNA 组穿膜细胞数减少。见图 4。

子区结合, 并调控靶基因的转录, 促进细胞增殖和上皮间质转化, 抑制细胞凋亡等, 从而导致肿瘤的发生、发展。近年来, 基因治疗作为一种全新的治疗模式显示出良好的应用前景, 其中 RNA 干扰被公认为是细胞调节基因表达的关键机制。本研究应用 siRNA 下调人食管腺癌细胞 OE33 的 Gli1 和 Gli2 表达, 观察其抗肿瘤效果。实验结果显示, 转染 Gli1 和 Gli2 siRNA 48 h 后, OE33 细胞中内源性 Gli1、Gli2 mRNA 和蛋白表达下调, 低于对照组, 提示特异性的 Gli1 和 Gli2 siRNA 能下调食管腺癌细胞中内源性 Gli1、Gli2 的表达。

细胞周期紊乱与肿瘤的发生密不可分, 当细胞的

增殖能力增强且对正常负性调节的刺激变弱,可导致肿瘤发生。本研究应用流式细胞术分析转染 Gli1 和 Gli2 siRNA 后,OE33 细胞的周期分布变化。结果显示,与对照组相比, Gli1 和 Gli2 siRNA 组可将更多细胞阻滞于 G₀/G₁ 期,从而控制肿瘤细胞的增殖。为进一步探讨食管腺癌细胞 Gli 表达和周期变化的可能机制,笔者对细胞周期相关蛋白的表达进行检测。*Cyclin D1* 是细胞周期的关键因子也是原癌基因,其可以和 CDK4、CDK6 形成 cyclin D/CDK 复合物,促进细胞由 G₁ 期进入 S 期,加速细胞的增殖,与多种肿瘤的发生、发展有关^[7-8]。此外 *Cyclin D1* 也被证实可作为 Hh 通路的靶基因,被活化的 Hh 通路所调节^[9]。p27 能够通过抑制 CDK 复合物,调节细胞周期,抑制细胞由 G 期进入 S 期,当 p27 表达下降或缺失时,可诱发细胞增殖失控,导致肿瘤发生^[10]。关于食管腺癌 Hh/Gli 信号通路与 *Cyclin D1*、p27 的关系未有明确报道。本研究发现, Gli1 和 Gli2 表达沉默后 *Cyclin D1* 蛋白的表达下降, p27 上调,表明 Hh/Gli 信号通路激活后,诱导细胞恶性转化的途径之一可能是通过调节 *Cyclin D1* 和 p27 表达对细胞周期进行调控。

上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是指上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程,以上皮表型标志 E-Cadherin 下调, N-Cadherin 和 Vimentin 等间质表型特征分子表达上调为特征,是肿瘤细胞获得侵袭与转移能力的有效方式之一^[11-12]。YUE 等^[13] 研究发现,活化 Hh 信号通路可以调控 EMT 过程,促进肺癌的侵袭、转移,而应用 Gli 抑制剂可以通过上调 E-Cadherin 表达来抑制肺癌细胞侵袭。本研究结果表明,抑制 Gli1 和 Gli2 表达后, E-Cadherin 表达上调, N-Cadherin 表达下调, Transwell 实验进一步表明, Gli1、Gli2 表达沉默后,穿膜细胞数减少,究其原因可能是 Hh/Gli 通路通过诱导食管腺癌细胞的 EMT 过程,促进侵袭、转移,而敲掉 *Gli1* 和 *Gli2* 基因可以通过抑制肿瘤细胞的 EMT 进程,从而降低肿瘤细胞的侵袭能力。

本研究结果提示, Gli 有可能在食管腺癌的发生、发展中发挥重要作用,下调 Gli 表达可以抑制食管腺癌细胞的生长、增殖及侵袭,针对 Hh/Gli 通路的抑制

剂有望成为临床上治疗食管癌的有效措施之一。

参 考 文 献:

- [1] BORGHESI S, HAWKINS M A, TAIT D. Oesophagectomy after definitive chemoradiation in patients with locally advanced oesophageal cancer[J]. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2008, 20: 221-226.
- [2] FAN Y J, SONG X, LI J L, et al. Esophageal and gastric cardia cancers on 4238 Chinese patients residing in municipal and rural regions: a histopathological comparison during 24-year period[J]. World J Surg, 2008, 32: 1980-1988.
- [3] LI H, LUI N, CHENG T, et al. Gli as a novel therapeutic target in malignant pleural mesothelioma[J]. PLoS One, 2013, 8, DOI: 10.1371/journal.pone.0057346.
- [4] BERMUDEZ O, HENNEN E, KOCH I, et al. Gli1 mediates lung cancer cell proliferation and Sonic Hedgehog-dependent mesenchymal cell activation[J]. PLoS One, 2013, 8, DOI: 10.1371/journal.pone.0063226.
- [5] GONNISEN A, ISEBAERT S, HAUSTERMANS K. Hedgehog signaling in prostate cancer and its therapeutic implication[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14: 13979-14007.
- [6] ATHAR M, LI C, KIM A L, et al. Sonic hedgehog signaling in Basal cell nevus syndrome[J]. Cancer Res, 2014, 74: 4967-4975.
- [7] YANG J, HUANG J, LUO L, et al. Significance of PRO2000/ANCCA expression, a novel proliferation-associated protein in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Cell Int, 2014, 14: 33.
- [8] SEILER R, THALMANN G N, ROTZER D, et al. CCND1/Cyclin D1 status in metastasizing bladder cancer: a prognosticator and predictor of chemotherapeutic response[J]. Mod Pathol, 2014, 27: 87-95.
- [9] DORMOY V, DANILIN S, LINDNER V, et al. The sonic hedgehog signaling pathway is reactivated in human renal cell carcinoma and plays orchestral role in tumor growth[J]. Mol Cancer, 2009, 8: 123.
- [10] ZHONG J, CHEN S, XUE M, et al. ZIC1 modulates cell-cycle distributions and cell migration through regulation of sonic hedgehog, PI(3)K and MAPK signaling pathways in gastric cancer[J]. BMC Cancer, 2012, 12: 290.
- [11] MOSNIER J F, KANDEL C, CAZALS-HATEM D, et al. N-cadherin serves as diagnostic biomarker in intrahepatic and perihilar cholangiocarcinomas[J]. Mod Pathol, 2009, 22: 182-190.
- [12] GONZALEZ D M, MEDICI D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition[J]. Sci Signal, 2014, 7, DOI: 10.1126/scisignal.2005189.
- [13] YUE D, LI H, CHE J, et al. Hedgehog/Gli promotes epithelial-mesenchymal transition in lung squamous cell carcinomas[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2014, 33: 34.

(童颖丹 编辑)