

沉默乙酰肝素酶基因对腺样囊性癌细胞侵袭和迁移能力的影响

王 新, 龚中坚, 於 俊

(南京医科大学附属无锡市人民医院口腔科, 江苏 无锡 214023)

[摘要] 目的:探讨 siRNA 干扰沉默乙酰肝素酶(heparanase, HPA)基因对人腺样囊性癌 SACC-M 细胞侵袭和迁移能力的影响。方法:根据人 HPA 基因序列设计并合成质粒表达载体转染至人涎腺腺样囊性癌(salivary adenoid cystic carcinoma, SACC)细胞,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和 Western blot 检测转染前后 HPA mRNA 和蛋白的表达变化,选出对 HPA 沉默效果最佳的质粒,获得稳定表达细胞株。通过划痕损伤实验和 Transwell 小室细胞侵袭实验检测 RNA 干扰沉默 HPA 表达后对 SACC-M 细胞侵袭和迁移能力的影响。结果:重组质粒 pGPH1/GFP/Neo/HPA-siRNA 显著降低 HPA mRNA 和蛋白的表达水平,干扰组中穿透 Transwell 小室基质的 SACC-M 细胞数明显低于对照组($P < 0.05$),划痕损伤实验结果显示,干扰组与对照组细胞迁移距离比较,24、48 h 内差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:沉默人 SACC-M 细胞中 HPA 的 mRNA 和蛋白表达,可抑制 SACC-M 细胞的侵袭和迁移能力。HPA 可能是治疗人类涎腺腺样囊性癌的一个新靶点。

[关键词] 腺样囊性癌;基因沉默;乙酰肝素酶;侵袭;转移

[中图分类号] R739.8

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)10-1383-05

doi:10.7655/NYDXBNS20131010

Role of heparanase gene silence on the invasion and migration of human salivary adenoid cystic carcinoma cells

Wang Xin, Gong Zhongjian, Yu Jun

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Wuxi People's Hospital Affiliated to NJMU, Wuxi 214023, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of heparanase(HPA) gene silencing by miRNA interference on invasion and migration of SACC-M cells. **Methods:** Expression vectors of recombinant plasmids expressing artificial HPA miRNA were constructed and transfected to knockdown HPA expression in SACC-M cells. Expressions of HPA mRNA and protein were detected by RT-PCR and Western blot, respectively. Matrigel invasion assay and scratch-wound assay were performed to examine the invasive and migration ability of the SACC-M cells. **Results:** Transfection of recombinant plasmid of pGPH1/GFP/Neo/HPA-siRNA significantly suppressed the HPA mRNA and protein levels. This knockdown significantly inhibited the invasion and migration of SACC-M cells as compared with controls. **Conclusion:** HPA may play an important role in invasion and migration in human salivary adenoid cystic carcinoma cells and should be considered as a potential small molecule inhibitor therapeutic targeting strategy for the future.

[Key words] salivary adenoid cystic carcinoma; gene silence; heparanase; invasion; migration

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(10): 1383-1387]

涎腺腺样囊性癌(salivary adenoid cystic carcinoma, SACC)是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤之一,具有高度的侵袭和转移特性,易发生局部神经和血管侵袭,局部复发率高,可通过血行转移导致肺部等远处转移。癌细胞的侵袭和转移必须穿过细胞层以及环绕在细胞层外的稠密基质。乙酰肝素酶(heparanase, HPA)是一种能降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和基底膜(basement membrane, BM)的酶,在肿瘤侵袭和转移中发挥重要作用^[1]。而

关于 HPA 在腺样囊性癌组织中的表达与腺样囊性癌侵袭和转移的关系,国内外报道较少。本研究通过 RNA 干扰技术沉默乙酰肝素酶基因的表达,观察其对人腺样囊性癌 SACC-M 细胞侵袭、迁移的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人涎腺腺样囊性癌细胞株 SACC-M 由上海交通大学第九人民医院惠赠。RPMI1640 培养基、胎牛血

清、胰蛋白酶、DMEM、Opti-MEM (Gibco 公司, 美国); 总 RNA 提取液 TRIzol (Invitrogen 公司, 美国); G418 (Sigma 公司, 美国); 100 bp DNA Ladder 试剂盒、割胶回收试剂盒、小量质粒抽提试剂盒、感受态细胞 DH-5 α (上海闪晶生物); Lipofectamine2000 (Roch 公司, 美国); pcDNA3.1/Neo 载体 (GenScript 公司, 美国); pGPH1/GFP/Neo 载体 (Gene-Pharma 公司, 美国); 限制性内切酶 *Xba* I 和 *Hind* III (Amersco 公司, 美国); TaqDNA 酶、dNTPs、DNA Marker、质粒抽提试剂盒 (上海生工); 二抗 goat-anti-rabbit IgG、goat anti-mouse IgG (广东中山公司); Transwell 小室 (Costar 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

SACC-M 用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 高糖型培养基 (不加抗生素) 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 饱和湿度细胞培养箱培养, 细胞 2~3 d 传代 1 次, 用 0.2% 胰蛋白酶消化传代 (不加 EDTA), 取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 设计并构建质粒表达载体

根据人 HPA 基因序列 (GenBank ID: 10855) 转录 RNA 的位置及小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 设计原则, 本文设计了 3 对 siRNA 序列, 其中 1 对为阴性对照, 另外 2 对 HPA-591、HPA-507 经过验证后, 发现 HPA-591 的干扰效率较高, 后续就以此作为构建载体的干扰片段 (表 1), 克隆至 PGPH1/GFP/Neo/载体, 使用载体多克隆位点两端的引物进行 PCR 扩增检测阳性菌落。引物序列为上游: 5'-TACGATACAAGGCTGTTAGAGAG-3', 下游: 5'-TAGAAGGCACAGTCCGAGG-3'。使用质粒抽提试剂盒提取质粒, 送上海生工生物工程有限公司测序, 与设计靶向 HPA 的寡核苷酸序列比较结果完全一致。将克隆成功的质粒命名为 pGPH1/GFP/Neo/HPA-siRNA。同时重组阴性对照载体 pGPH1/GFP/Neo/Negative-siRNA。

表 1 3 对乙酰肝素酶 RNA 干扰序列

Table 1 The heparanase interference subsequences		
名称		序列 (5'→3')
negative control	sense	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	antisense	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
HPA-591	sense	CCGAGAACACUACCAGAAATT
	antisense	UUUCUGGUAGUGUUCUCGGAG
HPA-507	sense	GGAUAUUUGCAAAUAUGGATT
	antisense	UCCAUAUUUGCAAAUAUCCTG

1.2.3 RNA 干扰建立 HPA 低表达 SACC-M 细胞系

使用德国 QIAGEN plasmid mini kit 进行不含内毒素质粒的提取。待 SACC-M 细胞生长至约 80% 融合时, 使用 Lipofectamine2000 进行转染, 转染重组质粒为干扰组, 转染空载体为阴性对照组, 同时设空白对照组 (仅加 Opti-MEM) 和 Lipofectamine2000 组 (仅加 Opti-MEM + Lipofectamine2000), 各组复 6 孔。转染 48 h 后观察细胞形态, 通过荧光显微镜观察转染效率。G418 抗性筛选获得阳性克隆并扩增培养, 即 SACC-M-SH-NC (阴性对照组) 和 SACC-M-shRNA (干扰组)。

1.2.4 RT-PCR 法检测 HPA mRNA 表达

在 6 孔板内培养稳定转染后的细胞, 待生长到 80%, 以 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计定量 RNA, 琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 完整性。采用 RT-PCR 两步法进行目的基因的扩增, β -actin 作为内参。HPA 引物序列: 上游 5'-TTCGATCCC-AAGAAGGAATCAAC-3'; 下游 5'-GTAGTGATGCC-ATGTAAGTGAATC-3'; β -actin 引物序列: 上游 5'-A-TCTGGCACCACACCTTCTACATTGAGCTGCG-3'; 下游 5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTG-C-3'; 反转录条件: 42 $^{\circ}$ C 45 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 冰浴 5 min; PCR 条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s、55 $^{\circ}$ C 退火 45 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 40 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min; 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 凝胶扫描仪行 DNA 电泳条带扫描, 实验重复 3 次。

1.2.5 Western 印迹法检测 HPA 蛋白表达

在 6 孔板内培养稳定转染后的细胞, 待生长到 80% 时, 用预冷的 PBS 漂洗 3 次, 立即加入 300 μ l 细胞裂解液, 反复抽吸, 使细胞呈蛋清状, 4 $^{\circ}$ C 14 000 g 离心 5 min, 取上清液用紫外分光光度法测定总蛋白浓度。取 40 μ g 蛋白行 PAGE 分离后, 电转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭非特异性抗原, 加入 1:200 稀释的兔抗人 HPA 抗体, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 用含 0.1% Tween-20 的 TBS 洗膜, 加入 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温下作用 1 h, 洗膜后 DAB 显色, 将条带结果进行扫描。

1.2.6 Transwell 细胞侵袭实验

取 matrigel 胶, 在冰上融化, 用不完全 DMEM 按 1:8 稀释, 取 50 μ l 在 Transwell 上室制备人工基底膜, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 细胞培养箱 4 h 后备用, 各组细胞均用无血清高糖 DMEM 培养基洗 2 次后, 稀释成密度为 1 \times 10 6 个/ml 的细胞悬液, 100 μ l 细胞悬液加入 Transwell 上室, 下室加 600 μ l 含 10% FBS

的 DMEM 高糖型培养基,37°C 5%CO₂ 培养箱培养 42 h。取出 Transwell 小室,吸弃液体,以棉签小心擦除滤膜上面的细胞,侵袭并黏附到膜下的细胞以甲醇固定,苏木精-伊红染色计数,倒置显微镜下观察,因细胞数目多,无法计数,用 10%乙酸抽提,用分光光度计测吸光值,波长 570 nm,与对照组相比,每组设 3 个复孔,实验重复 3 次,计算平均值。

1.2.7 划痕损伤实验

取对数生长期的 2 组待测细胞,置入 24 孔板,细胞密度 8×10^4 个/孔,每组设 3 个复孔。待细胞呈现单层贴壁生长状态时用 10 μ l 的消毒枪头在 24 孔板内垂直划痕,并划好标记,然后用无血清 DMEM 培养基洗细胞 2~3 次,尽量将划掉细胞清洗出,换无血清培养基,37°C、5%CO₂ 培养箱继续培养,于 0、24、48 h 在相差显微镜下随机选择 5 个低倍视野,测量划痕内面垂直距离。图像分析软件 Scion Imagev4.0.2 计算划痕两侧细胞迁移距离,实验重复 3 次。计算公式:细胞迁移率(%)=[(修复前划痕内面垂直距离-修复后划痕内面垂直距离)/修复前划痕内面垂直距离]×100%。

1.3 统计学方法

所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS16.0 软件进行统计学处理。多组间比较采用单因素方差分析,两两比较用 SNK 法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 质粒转染效果

将目的质粒表达载体通过脂质体介导转染人涎腺腺样囊性癌 SACC-M 细胞 48 h 后,经荧光显微镜观察细胞形态较好,贴壁密度达 90%,计数成功转染的细胞,转染效率大约为 65%(图 1)。

2.2 转染前后 HPA mRNA 基因表达的变化

经 RT-PCR 扩增后的内标基因 β -actin 为 300 bp,所有细胞中均有稳定表达,扩增后的 HPA 为 585 bp,HPA mRNA 在 SACC-M-shRNA 中转录水平最低,明显低于空白对照组 SACC-M 细胞及阴性对照组 SACC-M-SH-NC 细胞(图 2)。

2.3 Western blot 检测转染前后 HPA 蛋白的表达

Western blot 检测 SACC-M、SACC-M-SH-NC、SACC-M-shRNA 中 HPA 蛋白的表达水平,观察到 HPA 蛋白在 3 种细胞均有表达。HPA 蛋白在 SACC-M-shRNA 中表达水平最低,明显低于空白对照组 SACC-M 细胞及阴性对照组 SACC-M-SH-NC 细胞

(图 3)。

2.4 沉默 HPA 基因表达对 SACC-M 细胞侵袭能力的影响

Transwell 小室中的细胞常规培养 24 h,每组 24 份,3 种细胞均有细胞穿过铺有 Matrigel 胶的微孔膜到达微孔膜下层,倒置显微镜下观察可见细胞核蓝染,呈梭形(图 4A)。经 10%乙酸抽提,分光光度计测定 570 nm 处吸光值,SACC-M-shRNA 细胞数明显低于阴性对照组和空白对照组,差异有统计学意义($P = 0.023$),而阴性对照组与空白对照组之间差异无统计学意义($P = 0.17$,图 4B)。

2.5 沉默 HPA 基因表达对细胞迁移能力的影响

空白对照组与干扰组每组样本各 24 份,划痕损伤实验结果显示,两组细胞迁移距离比较 24、48 h 内差异有统计学意义($P = 0.032、0.001$,图 5)。

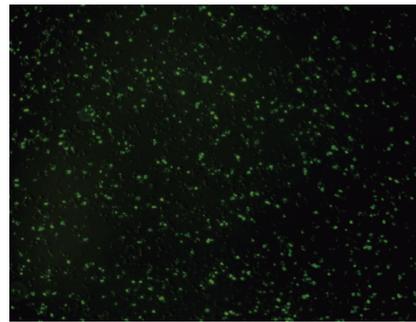


图 1 转染 48 h 后荧光显微镜下观察($\times 100$)

Figure 1 Observation in fluorescence microscope after transfection for 48 h($\times 100$)

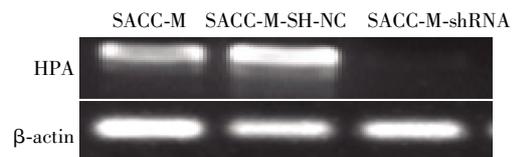


图 2 RT-PCR 检测 HPA 在 SACC-M、SACC-M-SH-NC、SACC-M-shRNA 细胞中的表达

Figure 2 The HPA mRNA expression in SACC-M,SACC-M-SH-NC,SACC-M-shRNA cells

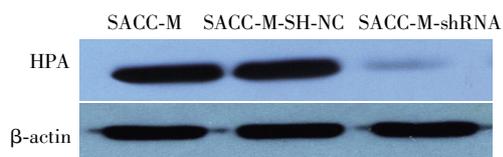
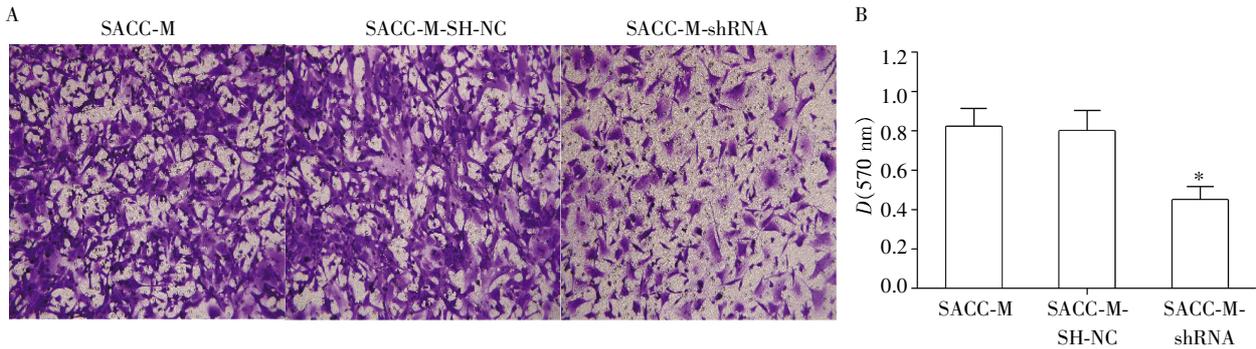


图 3 HPA 蛋白在 SACC-M、SACC-M-SH-NC、SACC-M-shRNA 细胞中的表达

Figure 3 Expression of HPA protein in SACC-M,SACC-M-SH-NC,SACC-M-shRNA cells



与其他两组比较, * $P < 0.05$ 。

图4 SACC-M、SACC-M-SH-NC、SACC-M-shRNA 细胞 transwell 侵袭($\times 400$)
Figure 4 Invasion assay of SACC-M, SACC-M-SH-NC, SACC-M-shRNA cells($\times 400$)

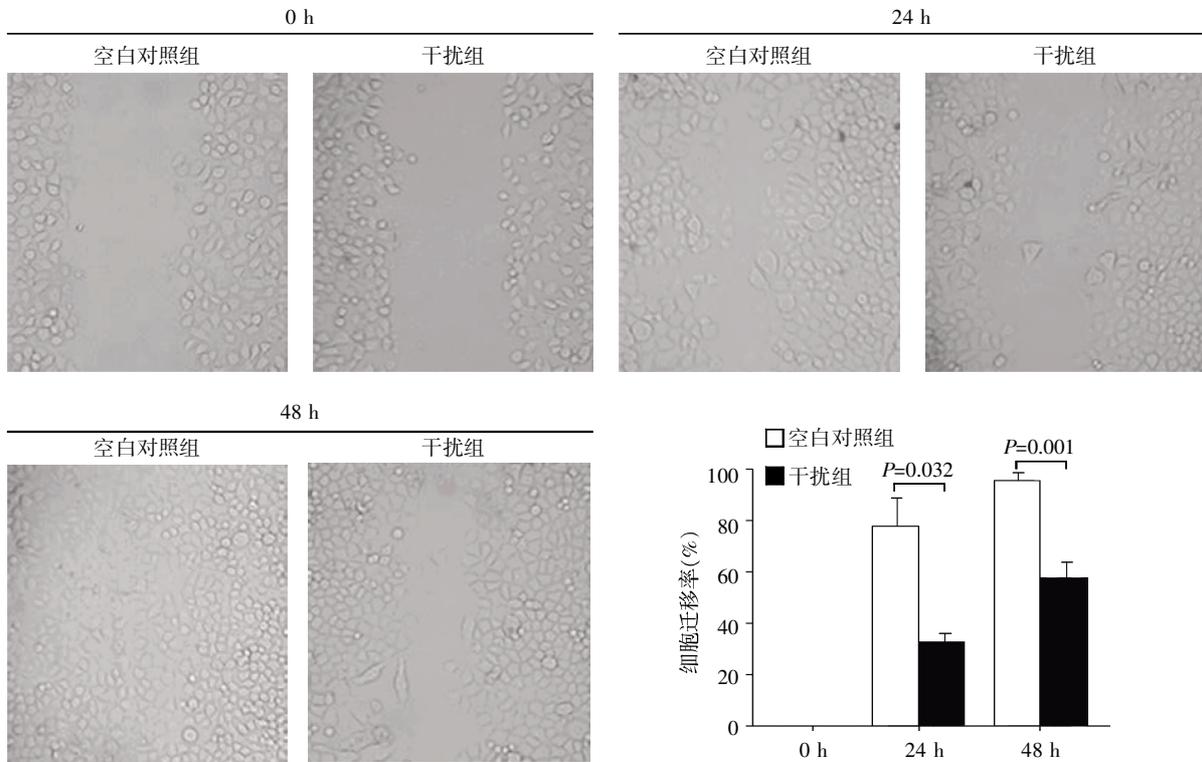


图5 划痕损伤实验后空白对照组与干扰组细胞在不同时间点的迁移率
Figure 5 Migration assay of SACC-M, SACC-M-shRNA cells

3 讨论

HPA 又称类肝素酶, 为内源性 β -葡萄糖醛酸酯酶, 是一种能降解 ECM 和 BM 中多糖的酶^[2]。HPA 通过降解 ECM 中的硫酸乙酰肝素、释放其结合的生长因子及各种酶等促进肿瘤的侵袭和转移, 有研究显示在多种人类肿瘤中均发现了 HPA 的存在, 并证实其与癌细胞的浸润和转移正相关, 与患者的总体生存率负相关^[3-4]。在口腔癌、宫颈癌、头颈鳞癌、胃癌前列腺癌等多种人类肿瘤中均发现了 HPA

的存在, 并均与癌细胞的侵袭和转移有关, 这些资料提供了 HPA 参与癌细胞侵袭和转移的直接证据^[5-10]。

腺样囊性癌是涎腺恶性肿瘤中发病率最高的肿瘤, 它的发展较为缓慢, 但具有很强的侵袭性, 极易侵袭神经并循神经扩散, 因确切定位神经的受侵部位尚无客观手段, 从而给临床手术切除肿瘤的准确范围带来较大困难^[11-12]。另外腺样囊性癌远处转移发生率较高, 且对于放疗、化疗均不敏感, 术后复发率高^[13-14]。由于对 SACC 生物学性质认识上的局限性, 目前尚无很有效的治疗措施, 即使进

行了广泛的手术切除及放射治疗,大多数患者最终还是出现复发和转移,临床上急需寻求治疗 SACC 的新方法^[15]。

本研究成功构建出靶向 HPA 的 siRNA 表达载体,建立了 HPA 低表达的细胞株 SACC-M-shRNA。通过 RT-PCR 和 Western blot 的结果鉴定,SACC-M-shRNA 在 mRNA 和蛋白质水平都表现出 HPA 表达水平的明显下调。与文献报道的相一致,在本研究中,SACC-M 细胞、SACC-M-SH-NC 细胞、SACC-M-shRNA 细胞在 Transwell 小室中常规培养 24 h,均有细胞穿过铺有 Matrigel 胶的微孔膜到达下层,计数结果表明,SACC-M-shRNA 侵袭细胞数明显低于阴性对照组和空白对照组,差异有统计学意义,而阴性对照组与空白对照组之间差异无统计学意义。划痕损伤实验结果显示,空白对照组与干扰组细胞迁移距离比较 24、48 h 内差异有统计学意义。结果表明 siRNA 沉默 HPA 表达可减弱腺样囊性癌侵袭、迁移能力。恶性肿瘤细胞要实现局部侵袭和转移,必须穿过 ECM 及 BM 进入细胞外和循环系统,在这个过程中 ECM 各种成分的降解必不可少,而 HPA 的降解作用促进了肿瘤细胞的局部侵袭和转移。结合本研究结果,本文认为,HPA 能促进 SACC-M 细胞的体外侵袭转移能力,因此推测 HPA 在 SACC 的恶性进展中可能起着相当重要的作用,可能会成为预防和治疗腺样囊性癌侵袭、转移的新靶点,但癌细胞的侵袭转移是一个复杂的过程,涉及到多种基因或信号的变化,HPA 影响 SACC 侵袭转移的具体机制仍有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Nakajima M,Irimura T,Di Ferrante D,et al. Heparan sulfate degradation: relation to tumor invasive and metastatic properties of mouse B16 melanoma sublines [J]. *Science*, 1983,220(4597):611-613
- [2] Arvatz G,Shafat I,Levy-Adam F,et al. The heparanase system and tumor metastasis: is heparanase the seed and soil? [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2011,30(2):253-268
- [3] Lerner I,Hermano E,Zcharia E,et al. Heparanase powers a chronic inflammatory circuit that promotes colitis-associated tumorigenesis in mice[J]. *J Clin Invest*, 2011,121(5):1709-1721
- [4] Vlodavsky I,Beckhove P,Lerner I,et al. Significance of Heparanase in Cancer and Inflammation [J]. *Cancer Microenviron*, 2012,5(2):115-132
- [5] Leiser Y,Abu-El-Naaj I,Sabo E,et al. Prognostic value of heparanase expression and cellular localization in oral cancer[J]. *Head Neck*, 2011,33(6):871-877
- [6] Zeng C,Ke ZF,Luo WR,et al. Heparanase overexpression participates in tumor growth of cervical cancer *in vitro* and *in vivo*[J]. *Med Oncol*, 2013,30(1):403
- [7] 肖大江,朱国臣,郑晓彬,等. 乙酰肝素酶与头颈部鳞状细胞癌侵袭、转移和血管生成的关系[J]. *中华实验外科杂志*, 2009,26(10):1373-1375
- [8] Zhang J,Yang J,Han X,et al. Overexpression of heparanase multiple antigenic peptide 2 is associated with poor prognosis in gastric cancer: Potential for therapy[J]. *Oncol Lett*, 2012,4(1):178-182
- [9] Kutsenko OS,Kovner AV,Mostovich LA,et al. Expression of heparanase-1 in prostate gland tumors [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2012,152(3):344-347
- [10] Liu X,Fang H,Chen H,et al. An artificial miRNA against HPSE suppresses melanoma invasion properties, correlating with a down-regulation of chemokines and MAPK phosphorylation[J]. *PLoS One*, 2012,7(6):e38659
- [11] Al-Mamgani A,van Rooij P,Sewnaik A,et al. Adenoid cystic carcinoma of parotid gland treated with surgery and radiotherapy: long-term outcomes, QoL assessment and review of the literature [J]. *Oral Oncol*, 2012,48(3):278-283
- [12] Zhang CY,Xia RH,Han J,et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: Clinicopathologic analysis of 218 cases in a Chinese population[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2013,115(3):368-375
- [13] Laurie SA,Ho AL,Fury MG,Sherman E,et al. Systemic therapy in the management of metastatic or locally recurrent adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: a systematic review [J]. *Lancet Oncol*, 2011,12(8):815-824
- [14] Ellington CL,Goodman M,Kono SA,et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: Incidence and survival trends based on 1973-2007 surveillance, epidemiology, and end results data[J]. *Cancer*, 2012,118(18):4444-4451
- [15] Moskaluk CA. Adenoid cystic carcinoma: clinical and molecular features [J]. *Head Neck Pathol*, 2013,7(1):17-22

[收稿日期] 2013-04-14