

促肝细胞再生磷酸酶-3 基因对大肠癌细胞侵袭和失巢凋亡的调控

范钰¹ 钟锡明¹ 陈坚² 林庚金²

(¹江苏大学附属人民医院肿瘤研究所 江苏 镇江 212002; ²复旦大学附属华山医院消化科 上海 200040)

【摘要】 目的 探讨促肝细胞再生磷酸酶(phosphatase of regenerating liver cell-3, PRL-3)基因对大肠癌细胞侵袭的影响及可能机制。方法 应用 PRL-3 基因小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)转染处理人大肠癌 HCT116 细胞后,分别采用荧光实时定量 RT-PCR 和 Western blot 检测 PRL-3 mRNA 和蛋白水平,分别采用软琼脂集落培养试验和 Boyden 小室模型试验检测癌细胞的锚着不依赖性增殖和侵袭能力,采用琼脂糖凝胶电泳和 TUNEL 检测癌细胞失巢凋亡情况。结果 转染组癌细胞 PRL-3 mRNA 和蛋白水平明显被抑制,且与时间和浓度相关。与对照组比较,转染组细胞所形成的软琼脂集落数和穿膜细胞数明显减少,且呈时间和浓度依赖性。琼脂糖凝胶电泳和 TUNEL 结果显示,转染组细胞出现明显的凋亡现象:凋亡指数增加,出现明显的 DNA 条带。结论 PRL-3 基因 siRNA 转染可明显抑制大肠癌细胞的锚着不依赖性增殖和恶性侵袭,其机制可能与诱导失巢凋亡有关。

【关键词】 大肠肿瘤; 促肝细胞再生磷酸酶-3; 侵袭; 失巢凋亡

【中图分类号】 R 735.3⁺4 **【文献标志码】** A

Effects of phosphatase of regenerating liver cell -3 gene on invasion and anoikis of human colon cancer cell

FAN Yu¹△, ZHONG Xi-ming¹, CHEN Jian², LIN Geng-jin²

(¹Cancer Institute, People's of Hospital, Jiangsu University, Zhenjiang 212002, Jiangsu Province, China;

²Department of Gastroenterology, Fudan University, Shanghai 200040, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the effects of phosphatase of regenerating liver cell-3(PRL-3) gene on human colon cancer cell. **Methods** After human colon cancer HCT116 cells were transfected by PRL-3 small interfering RNA(siRNA), we detected the expression of PRL-3 mRNA and protein by using real-time PCR and Western blot assays, respectively. Anchorage-independent growth of the cancer cells was measured using clony forming in soft agar. Invasion of the cancer cells was measured using boyden chamber model. And Anoikis was measured using DNA fragmentation assay and terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay. **Results** The PRL-3 mRNA and protein level in HCT116 cells decreased markedly in a time-and dose-dependent manner, so did the colonies formed in soft agar and cells traversed membrane, compared with those not transfected cells. The results from agarose gel electrophoresis and TUNEL showed significant increasing apoptosis index and DNA ladder in a dose-dependent manner. **Conclusions** Knock-downing PRL-3 with siRNA might inhibit growth and invasion ability of colon cancer through induing anoikis.

【Key words】 colon carcinoma; phosphatase of regenerating liver cell-3; invasion; anoikis

促肝细胞再生磷酸酶(phosphatase of regenerating liver cell, PRLs)是新发现的一种蛋白酪氨酸磷酸酶

(protein tyrosine phosphatase, PTP), 可通过酪氨酸的去磷酸化和磷酸化调节细胞的生长、分化、细胞周期、细胞间信息传递和其他活动^[1]。PRLs 基因家族主要有 3 个成员, PRL-1, PRL-2 和 PRL-3, 彼此之间的同源性高达 76%~85%^[1]。许多研究发现, PRL-3 基因与肝癌、大肠癌、乳腺癌等实体瘤侵袭有关^[2-5]。晚近研究发现, PRL-3 基因过表达与大肠癌细胞转移密切相关^[6,7], 但目前不清楚 PRL-3 调控大肠癌细胞侵袭的可能机制。

本研究借助于 RNA 干扰(RNA interference, RNAi) 技术, 以合成的 PRL-3 基因小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 转染处理大肠癌 HCT116 细胞, 观察了对大肠癌细胞侵袭的影响, 并从失巢凋亡(anoikis) 方面探讨了可能的机制。

材料和方法

材料 人大肠癌 HCT116 细胞购自中国科学院上海生物化学和细胞生物学研究所。PRL-3 基因 siRNA 序列: 5'-AAGCAUUCGUCCGGUUGC-GCU-3', 由 Dharmacon 公司合成。PRL-3 抗体, 购自 Santa Cruz 公司。TRIzol, RNase inhibitor, 逆转录酶 SSRT II、Taq 酶和转染试剂 Oligofectamine 购自 Invitrogen 公司。荧光实时定量 PCR PRL-3 引物序列为: 上游: 5'-GGGACTTCTCAGGTC-GTGTC-3'; 下游: 5'-AGCCCCGTACTTCTTC-AGGT-3'。FAM 探针: 5'-CCGCTTCTCGTCG-ATGTAGGTCACG-3'-TAMRA。以 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(GAPDH)为内参。多聚羟乙基甲基丙烯酸树脂(polyhydroxyethylmethacrylate, Poly-HEMA), 购自 Sigma 公司。60 mm 细菌有盖培养皿(petri-dish), 购自美国 Grainer 公司。DNA 抽提试剂盒, 购自上海申能博彩公司。

细胞培养及转染处理 大肠癌 HCT116 细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 37℃、5% CO₂、饱和湿度环境的条件下连续培养。转染前 1 d, 将浓度为 1.0×10⁵/mL 的细胞接种于 24 或 6 孔培养板, 培养过夜。次日进行转染。细胞分组: (1) 空白对照组(Con-A): 未经任何处理的大肠癌细胞; (2) 脂质体对照组(Con-B); (3) 错配 siRNA 体对照组(Con-C); (4) 不同浓度的 siRNA 组: 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 中含不同浓度(3.125、6.25、12.5 nmol/L) 的已用脂质体包裹的 siRNA。转染后于不同时间采用胰酶消化收取细胞, 进行以下试验。

PRL-3 基因检测

mRNA 水平检测 根据文献[8], 采用荧光实

时定量 PCR 检测 PRL-3 基因 mRNA 水平。实时荧光定量 PCR 反应完成后, 调整基线, 计算目的基因相对于 GAPDH 的^ΔCt(^ΔCt = Ct_{GAPDH} - Ct_{PRL-3})。每份标本取 3 次检测的平均^ΔCt 用于后续数据分析。采用^{ΔΔ}Ct 法^[9], 计算 PRL-3 在处理组与 Con-A 组的相对表达量。对处理组与 Con-A 组的^ΔCt 值进行 *F* 检验, 分析 PRL-3 基因在各处理组与 Con-A 组中的表达差异。

蛋白水平检测 提取对照组和各实验组细胞总蛋白, 蛋白定量后, 以 β-actin 为内参照, 进行常规 Western blot 检测 PRL-3 蛋白水平。利用 Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software (Eastman Kodak Company, USA) 测定 Western blot 条带净灰度值, 并与内参照 β-actin 的测定结果相比较, 计算其比值。

软琼脂集落形成试验 常规进行软琼脂集落培养试验, 观测 PRL-3 siRNA 对大肠癌细胞锚着不依赖性增殖的影响。

体外侵袭试验 该试验在改良的 Boyden 小室中进行, 具体步骤参照文献[10]的方法。400 倍光镜下计数穿过聚碳酸酯膜的细胞数, 以侵袭细胞的数目表示肿瘤细胞侵袭能力。随机计数 10 个视野内的细胞数, 取平均值进行统计处理, 每组计数 3 份样本。

细胞失巢凋亡检测

失巢凋亡模型制备 以铺有多聚-HEMA 的培养皿作为失巢凋亡模型。按照文献[10]制备该模型。简述如下, 将多聚-HEMA 溶于无水乙醇, 制备成 10 mg/mL 的多聚-HEMA 溶液。将培养皿用 PBS 洗 3 遍, 然后加上 2 mL 多聚-HEMA 溶液包被。

细胞处理 收集转染 48 h 的细胞, 吹打均匀, 制成 5×10⁵ cells/mL 的单细胞悬液。将 2 mL 细胞接种于多聚-HEMA 的培养皿中, 放入培养箱中继续培养。12 h 后, 收集细胞, 分别采用琼脂糖凝胶电泳和 TUNEL 检测细胞失巢凋亡。

琼脂糖凝胶电泳 收集细胞, 采用 DNA 抽提试剂盒按照说明书操作提取 DNA, 无水乙醇沉淀。25℃ 琼脂糖凝胶电泳, 电压 60 V, 1.5 h。

TUNEL 检测 将 100 μL 细胞悬浮液加入覆盖有细胞加样槽的玻璃片上, 4℃, 800 r/min 离心 2 min。3.7% 甲醛固定 30 s。余操作参照 TUNEL 试剂盒说明书。凋亡指数(apoptosis index, AI) 计算: 凋亡细胞数/总细胞数×100%。

统计方法 数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS 10.0 软件对数据进行处理。组间比较采

用单因素分析法。 $P < 0.05$ 表示差别有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差别有高度统计学意义。

结 果

siRNA 对 PRL-3 基因的影响 为敲除 PRL-3

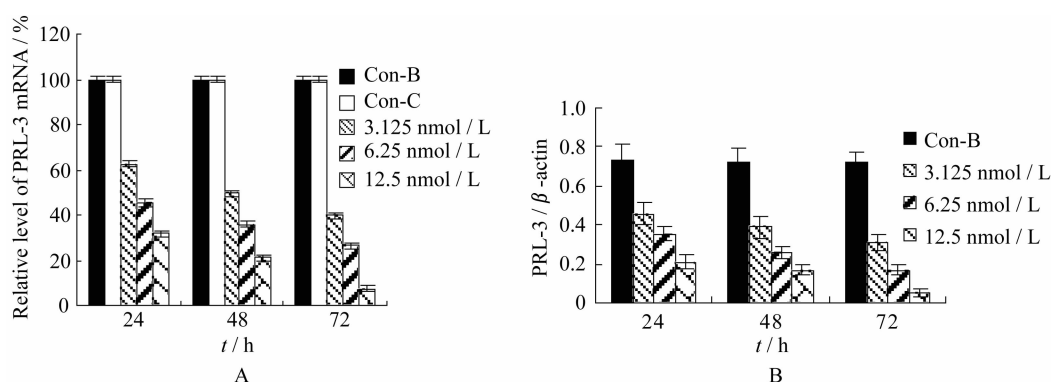


图 1 PRL-3 siRNA 处理对大肠癌 HCT116 细胞 PRL-3 mRNA 和蛋白水平的影响

Fig 1 Effects of PRL-3 siRNA on PRL-3 mRNA and protein level of colon cancer HCT116 cells

A: Real time RT-PCR assay; B: Western blot assay

软琼脂集落形成试验 接着,我们观察 PRL-3 表达下调对癌细胞锚着不依赖性增殖和穿越基质能力的影响。结果显示,大肠癌 HCT116 细胞在体外半固体培养体系中可以自发地形成集落,而经 siRNA 转染的细胞集落生长呈剂量依赖性减少 ($P < 0.05$) (图 2)。

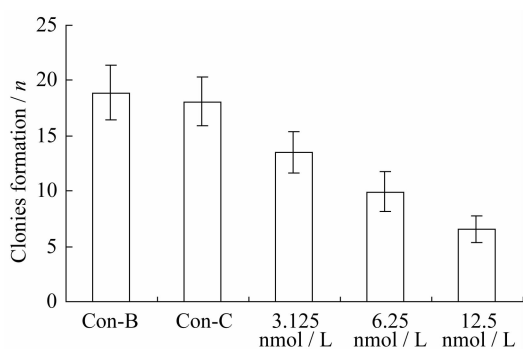


图 2 PRL-3 siRNA 转染对大肠癌细胞锚着不依赖性增殖的影响

Fig 2 Effects of PRL-3 siRNA on anchorage-independent growth of colon cancer cell

PRL-3 siRNA 对大肠癌细胞侵袭的影响 Boyden 小室上室细胞穿过膜上 matrigel 到膜的下室面,其数量反映了细胞侵袭能力的大小。收集转染 48 h 的细胞,采用 Boyden 小室检测癌细胞侵袭情况。结果发现,与对照组集落数比较,siRNA 组

mRNA 表达,本研究采用 PRL-3 siRNA 转染大肠癌 HCT116 细胞,分别采用定量 PCR 和 Western blot 检测 PRL-3 基因 mRNA 和蛋白水平。结果发现,与对照组细胞比较,siRNA 组 mRNA 和蛋白水平明显降低(图 1A,B)。

穿过滤膜的细胞数明显下降 ($P < 0.05$) (图 3)。

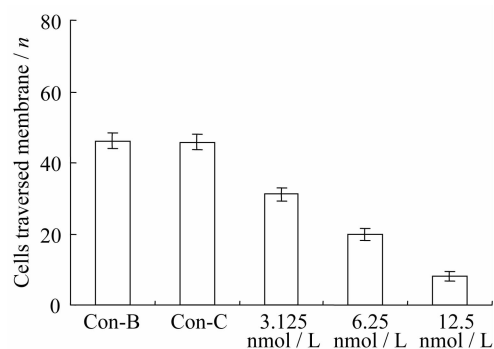


图 3 PRL-3 siRNA 转染对大肠癌细胞侵袭的影响

Fig 3 Effects of PRL-3 siRNA on invasion of colon cancer cell

siRNA 对大肠癌细胞抗失巢凋亡的影响 转染 48 h 后,将转染组细胞和对照组细胞转到多聚-HEMA 培养皿上,12 h 后收集细胞,分别采用琼脂糖凝胶电泳和 TUNEL 检测。发现,未经转染处理的对照组 HCT116 细胞无论是贴壁培养还是悬浮培养均未见明显的凋亡现象,即表现为抗失巢凋亡。而转染组癌细胞有如下表现:如图 4 所示,DNA 凝胶电泳显现明显的梯状图谱,且与浓度相关 ($P < 0.05$)。TUNEL 检测发现,经转染处理的大肠癌细胞凋亡指数明显高于对照组,且呈浓度依赖性 ($P < 0.05$) (图 5)。



图4 琼脂糖电泳检测 HCT116 细胞凋亡结果

Fig 4 Results of agarose electrophoresis on apoptosis of HCT116 cells

Lane 1: Con-B; Lane 2,3,4: siRNA, 3.125, 6.25, 12.5 nmol/L

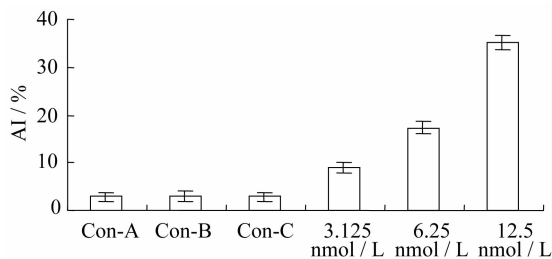


图5 TUNEL 检测 HCT116 细胞凋亡结果

Fig 5 Results of TUNEL assay on apoptosis of HCT116 cells

讨 论

RNAi 是近年来发现的一种调节 mRNA 的生物学现象,能够使基因的 mRNA 被相应的双链 RNA 分子敲除,其效果要远强于正义和反义 RNA^[11]。RNAi 最主要的功能在于可以调节和关闭基因的表达,进而调控细胞的各种高级生命活动。而 siRNA 是指 RNAi 过程中在细胞内产生的长约 21~25 核苷酸(nt)的小双链 RNA 分子,是 RNAi 作用机制的重要中间效应分子。而且已有人工合成的 siRNA,具有明显的敲除相应基因 mRNA 的效果^[12]。由于 siRNA 具有高效敲除基因表达的工具,已被广大科学工作者用来研究基因功能和基因治疗的工具。

本研究针对 PRL-3 基因特点,设计合成 siRNA,转染处理大肠癌细胞后,分别采用实时定量 PCR 和 Western blot 检测该基因表达,发现癌细胞 PRL-3 mRNA 和蛋白水平明显被抑制。说明该 siRNA 可作为研究 PRL-3 在大肠癌侵袭作用中的有力工具。

正常真核细胞,除成熟血细胞外,大多须黏附于特定的细胞外基质上才能存活,称为锚着依赖性

(anchorage dependence)。肿瘤细胞可以锚着不依赖性生长。肿瘤细胞在软琼脂形成集落的多少可反映肿瘤细胞锚着依赖性的特性,且与其恶性程度呈正相关。癌细胞侵袭能力强,则在软琼脂上形成的集落数目多^[13,14]。本研究发现,经不同浓度的 PRL-3 siRNA 转染处理后,癌细胞软琼脂形成集落数明显减少,且呈剂量依赖性。Boyden 小室模型检测发现,经 siRNA 转染处理后的大肠癌细胞穿膜细胞数显著减少,且呈浓度依赖性。说明,敲除 PRL-3 基因表达可抑制大肠癌细胞的锚着不依赖性增殖和侵袭能力。

癌细胞侵袭是一个复杂的过程,涉及到很多机制。近年来,失巢凋亡引起人们重视。细胞与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)脱离黏附接触或者是接触不完全后出现的凋亡现象,被称为失巢凋亡(anoikis)。“anoikis”为希腊语“无家可归者(homelessness)”^[10,15,16]。失巢凋亡的意义在于防止这些脱落的细胞种植于其他不适当的地方继续生长。然而很多肿瘤细胞从瘤体上脱落后并不会发生凋亡,尤其是容易发生转移的恶性肿瘤细胞,可以迁徙到其他部位再次生长。因此,抗失巢凋亡是肿瘤转移发生的重要原因之一^[15]。同样地,大肠癌细胞在体内增殖转移亦可能是失巢凋亡失败的结果。

研究失巢凋亡现象一般在包被有多聚-HEMA 的 petri-dish 培养皿上进行。多聚-HEMA 是一种阴离子聚合物,具有均匀的非离子特性,铺在容器的底部可阻止细胞接触和 ECM 的沉淀,可阻止细胞贴壁,细胞呈悬浮状态,从而诱发失巢凋亡。本研究用多聚-HEMA 包被 petri-dish 培养皿以复制失巢凋亡模型,然后将转染 48 h 的癌细胞转移到该模型上,分别采用琼脂糖凝胶电泳和 TUNEL 方法检测。结果发现,琼脂糖凝胶电泳显示出明显的梯状图谱。TUNEL 检测发现,凋亡指数增加,且呈浓度依赖性。而未经转染处理的 HCT116 细胞无论是处于是贴壁培养还是在悬浮培养的失巢凋亡模型中均未见明显的凋亡现象,即表现为抗失巢凋亡。由此提示,PRL-3 基因表达下调可诱导结肠癌细胞失巢凋亡,即增强了对失巢凋亡的敏感性。

本研究提示,PRL-3 基因对大肠癌细胞侵袭转移具有重要的正调控作用,其机制可能与失巢凋亡失控有关。

参 考 文 献

- [1] Peng Y, Genin A, Spinner NB, *et al.* The gene encoding human nuclear protein tyrosine phosphatase, PRL-1,

- cloning, chromosomal localization, and identification of an intronenhancer[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273 (27): 17 286 - 17 295.
- [2] Bardelli A, Saha S, Sager JA, *et al.* PRL-3 expression in metastatic cancers[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(15): 5 607 - 5 615.
- [3] 范钰,张尤历,张炜,等. RNAi 沉默促肝细胞再生磷酸酶-3 基因抑制肝癌细胞侵袭[J]. *中华肝脏病杂志*, 2008, 16(3): 227 - 229.
- [4] Radke I, Götte M, Kersting C, *et al.* Expression and prognostic impact of the protein tyrosine phosphatases PRL-1, PRL-2, and PRL-3 in breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2006, 95(3): 347 - 354.
- [5] 赵高平,周总光,雷文章,等. 促肝细胞再生磷酸酶-3 基因在结直肠癌组织中的表达及其临床意义[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2005, 8(3): 237 - 240.
- [6] Peng L, Ning J, Meng L, *et al.* The association of the expression level of protein tyrosine phosphatase PRL-3 protein with liver metastasis and prognosis of patients with colorectal cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2004, 130(9): 521 - 526.
- [7] Wang Y, Li ZF, He J, *et al.* Expression of the human phosphatases of regenerating liver (PRLs) in colonic adenocarcinoma and its correlation with lymph node metastasis[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2007, 22(10): 1 179 - 1 184.
- [8] 范钰,郑树,丁佳逸. 脂质体介导的 cripto 反义寡核苷酸抑制结肠癌细胞端粒酶活性[J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(4): 761 - 765.
- [9] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C (T)) Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402 - 408.
- [10] Fan Y, Zhang YL, Wu Y, *et al.* Inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 expression by RNA interference suppresses invasion through inducing anoikis in human colon cancer cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(3): 428 - 434.
- [11] Masiero M, Nardo G, Indraccolo S, *et al.* RNA interference: implications for cancer treatment[J]. *Mol Aspects Med*, 2007, 28(1): 143 - 166.
- [12] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. *Nature*, 2001, 411(6836): 494 - 498.
- [13] Danen EH, Yamada KM. Fibronectin, integrins, and growth control[J]. *J Cell Physiol*, 2001, 189(1): 1 - 13.
- [14] Thullberg M, Strömblad S. Anchorage-independent cytokinesis as part of oncogenic transformation[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(8): 984 - 988.
- [15] Frisch SM, Screaton RA. Anoikis mechanisms[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13(5): 555 - 562.
- [16] Zhu Z, Sanchez-Sweatman O, Huang X, *et al.* Anoikis and metastatic potential of cloudman S91 melanoma cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(4): 1 707 - 1 716.

(收稿日期: 2008 - 09 - 11; 编辑: 张秀峰)

(上接第 316 页)

- [6] Lecka-Czernik B, Ackert-Bicknell C, Adamo ML, *et al.* Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) by rosiglitazone suppresses components of the insulin-like growth factor regulatory system *in vitro* and *in vivo* [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(2): 903 - 911.
- [7] Gonnerman KN, Brown LS, Chu TM. Effects of growth factors on cell migration and alkaline phosphatase release[J]. *Biomed Sci Instrum*, 2006, 42: 60 - 65.
- [8] Hench LL, Xynos ID, Polak JM. Bioactive glasses for *in situ* tissue regeneration [J]. *J Biomedical Science Polymer Edition*, 2004, 15(4): 543 - 562.
- [9] Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, *et al.* Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 276(2): 461 - 465.
- [10] Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, *et al.* Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution [J]. *J Biomed Mater Res*, 2001, 55(2): 151 - 157.
- [11] Silver IA, Deas J, Erecinska M. Interactions of bioactive glasses with osteoblasts *in vitro*: effects of 45S5 Bioglass, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability [J]. *Biomaterials*, 2001, 22(2): 175 - 185.
- [12] Christodoulou I, Buttery LD, Tai G, *et al.* Characterization of human fetal osteoblasts by microarray analysis following stimulation with 58S bioactive gel-glass ionic dissolution products[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2006, 77(2): 431 - 446.

(收稿日期: 2008 - 10 - 16; 编辑: 王蔚)