

· 基础论著 ·

# 小干扰 RNA 下调 GLI1 基因的表达对 MKN28 细胞转移侵袭行为的影响

李晓伟 瞿颖 李建芳 蔡劬 计骏 刘炳亚

**【摘要】** 目的 利用 siRNA 技术下调 GLI1 基因的表达, 在体外研究 GLI1 对 MKN28 胃癌细胞侵袭转移能力的影响。方法 脂质体法将 GLI1 siRNA 转染 MKN28 胃癌细胞, 采用 RT-PCR 观察 GLI1 siRNA 转染前后 GLI1 在 mRNA 水平的变化情况。培养 MKN28 胃癌细胞, 将细胞分为转染 GLI1 siRNA 组、阴性 siRNA 组和对照组后, 分别采用 Transwell 小室法检测各组细胞的侵袭和转移能力。结果 转染 GLI1 siRNA 后 GLI1 基因表达在 24 h 和 48 h 明显下调。侵袭和转移实验显示: GLI1 siRNA 组侵袭和转移细胞数目均低于阴性 siRNA 组和对照组 ( $P < 0.05$ ), 而阴性 siRNA 组和对照组间的差异均无统计学意义。结论 转染 GLI1 siRNA 特异下调 GLI1 基因表达, 在体外抑制胃癌 MKN28 细胞的侵袭和转移, 可能是胃癌靶向治疗的靶点。

**【关键词】** 胃肿瘤; 肿瘤转移; 肿瘤浸润; 小干扰; GLI1

## Inhibition of GLI1 through siRNA affects metastasis and invasion of human gastric cancer cell line

MKN28 Li Xiaowei\*, Qu Ying, Li Jianfang, Cai Qu, Ji Jun, Liu Bingya. \*Department of Interventional Radiology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China

Corresponding author: Liu Bingya, Email: Liubyryj@yahoo.com.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the invasion and metastasis ability of GLI1 on MKN28 cells *in vitro* with siRNA-mediated inhibition of GLI1. **Methods** siRNA targeting GLI1 mRNA was transfected into MKN28 cells, and GLI1 expression was determined by RT-PCR. MKN28 cell were cultured *in vitro* and divided into GLI1 siRNA group, negative siRNA group and control group. Invasion and metastasis of MKN28 cells were assessed by transwell chamber assay. **Results** GLI1 siRNA significantly inhibited the expression of GLI1 in MKN28 cell line at mRNA levels. The number of invasion and metastasis cells of MKN28 cells in GLI1 siRNA group were significantly lower than those in negative siRNA group and control group (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Transfection of GLI1 can inhibit GLI1 expression, thus suppress cell invasion and metastasis of MKN28 cells. This may provide a new therapy target for gastric cancer.

**【Key words】** Stomach neoplasms; Neoplasm metastasis; Neoplasm invasiveness; Small interfering; GLI1

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 其主要致死原因是肿瘤细胞的转移<sup>[1]</sup>。因此, 抑制胃癌细胞的转移是最重要的治疗措施, 然而目前肿瘤细胞转移的机制并不十分清楚, 这成为制约胃癌治疗的瓶颈, 因此, 研究胃癌的浸润和转移机制有很重要的

临床意义。有研究表明Hedgehog (HH) 信号通路在胃癌的发生发展, 并且在胃癌的侵袭和转移中可能发挥重要作用, 而GLI1作为HH信号通路的转录因子激活并转录了HH信号通路大部分靶基因<sup>[2-3]</sup>, 并有可能参与了胃癌细胞的侵袭和转移, 因此, 本研究将对GLI1基因在胃癌侵袭和转移中的作用进行探讨。

## 材料和方法

### 一、主要试剂和材料

胃癌细胞系 NCI-N87 (ATCC: CRL-5822),

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.18.021

基金项目: 上海市科学技术委员会重点基金项目 (07jc14041); 上海市重点学科 (s30204); 国家自然科学基金 (30872476)

作者单位: 200438 上海, 东方肝胆外科医院放射介入二科 (李晓伟); 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科 上海消化外科研究所 (瞿颖、李建芳、蔡劬、计骏、刘炳亚)

通讯作者: 刘炳亚, Email: Liubyryj@yahoo.com.cn

SNU-1 (ATCC: CRL-5971)、AGS、SNU-16 (ATCC: CRL-5974) 购自美国 ATCC (Manassas, VA, USA)。BGC-823 购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库, 其余两种细胞系 SGC7901 和 MKN28 由上海消化外科研究所保存。细胞培养液为含 10% 小牛血清 (杭州四季青公司) 的 RPMI-1640 培养液 (Gibco 公司), RNA 抽提试剂盒 (Trizol) 和逆转录试剂盒分别购自美国 Invitrogen 和 Promega 公司。GLI1 siRNA 由上海吉玛制药技术有限公司化学合成, 脂质体 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司, PCR 引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。Transwell 侵袭转移小室 (Corning 公司), 基底膜基质胶 (BD 公司)。

## 二、方法

1. 细胞培养: 七种胃癌细胞系均使用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> (V/V) 条件下常规培养。抽提总 RNA 前 24 h 传代, 后取对数生长期细胞 1 × 10<sup>6</sup> 提取总 RNA。

2. RNA 抽提并行实时定量 PCR: GLI1 引物序列如下: 上游 5'-CGCTGCGAAAACATGTCAAG-3', 下游 5'-GGGCTCCACTGTAGAAATGGAT-3'。内参照 GAPDH 引物序列如下: 上游 5'-GACATCAAGAA GGTGGTGAA-3', 下游 5'-TGTCATACCAGGAAA TGAGC-3'。1 μg RNA 逆转录成 cDNA, 在定量 PCR (real-time PCR) 仪上进行扩增 (MJ Research 公司), 扩增条件为: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, 40 循环的 95 °C 15 s, 55 °C 60 s, 最后一个循环后, 得到溶解曲线。每个样品采用 3 复孔, 在 PCR 任意循环中, 当荧光强度值大于由仪器自带的软件计算出的阈值时, 样本被认为是阳性, GLI1 mRNA 表达量用 2<sup>-ΔCT</sup> 来表示 (ΔCT 由 GLI1 的 CT 值减去 GAPDH 的 CT 值), 实验重复测量 3 次, 取其平均值作为 GLI1 最后的表达水平。

3. GLI1 siRNA 合成与制备: 以 NCBI GenBank 中人 GLI1 基因序列为模板, 在上海吉玛制药技术有限公司合成针对 GLI1 的 siRNA, 其正义链: 5'-CCAGGAAUUUGACUCCCAATT-3'; 反义链: 5'-UUGGGAGUCAAAUCCUGGCT-3', 不针对任何基因 (non-silencing) 的 siRNA 为阴性对照, 其序列正义链: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'; 反义链: 5'-ACGUGACAAGUUCGGAGAATT-3'。

4. 筛选并行 GLI1 siRNA 转染: 将 MKN28 细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化传代后, 取对数生长期

MKN28 细胞接种于 6 孔板, 按实验设计分为三组。培养 24 h 后待细胞融合度达到 50% 时进行转染, 转染前 1 h 更换无血清培养基, 应用 OPTI-MEM 稀释约 3.0 μl siRNA 和 2.5 μl Lipofectamine 2000 转染试剂后轻轻混合静止, 6 孔板中加入包括 2 × 10<sup>5</sup> 细胞的无血清培养液 2.0 ml, 转染 siRNA 4 h 后重新更换为有血清培养液, 细胞转染后分别于 24、48 h 提取总 RNA, 随后以 GLI1 引物行 RT-PCR 检测, 筛选干扰效率最高的 siRNA。后面实验即以此序列进行。

5. 体外细胞侵袭实验: 取 Transwell 小室, 分三复孔, Matrigel 用 4 °C 无血清 RPMI-1640 稀释, 每个小室为 50 μl, 后置于 37 °C 静置 2 h, 待 Matrigel 呈胶状。使用前加入少量无血清培养基水化, 用无血清 RPMI-1640 调整 GLI1 siRNA 组, 阴性对照组和未处理组细胞浓度为 5 × 10<sup>5</sup>, 吸取 100 μl 加入到侵袭小室内。后将小室置于 24 孔板, 下室内加入含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液, 培养 36 h。取出小室用 PBS 冲洗培养液后风干, 固定后用结晶紫染色, 并用棉签擦净上室面的 Matrigel 胶和细胞, 固定封片后计数滤膜下室面的细胞数为侵袭指数 (取高倍镜下 10 个视野, 后取平均值)。

6. 体外细胞转移实验: 用没有 Matrigel 的 Transwell 小室, 分三复孔, 用无血清 RPMI-1640 调整 GLI1 siRNA 组, 阴性对照组和未处理组细胞浓度为 5 × 10<sup>5</sup>, 吸取 100 μl 加入到侵袭小室内。后将小室置于 24 孔板, 24 孔板内加入含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液, 培养 24 h。取出小室用 PBS 冲洗培养液后风干, 固定后用结晶紫染色, 并用棉签擦净上室面的细胞, 固定封片后计数滤膜下室面的细胞数为侵袭指数 (取高倍镜下 10 个视野, 后取平均值)。

## 三、统计学分析

所有数据用统计学软件 SPSS 17.0 进行分析, 试验数据用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 描述, 数据采用检验方法为 Student-Newman-Keuls (*q* 检验)。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、GLI1 在 7 株胃癌细胞株中的表达情况

分别通过 RT-PCR 对 7 株胃癌细胞 GLI1 进行检测 (图 1), 结果可见在胃癌细胞株中 GLI1 的表达情况存在差异, 其中 GLI1 基因在 SGC-7901 中表达最低而在 MKN28 细胞中表达程度最高。以下

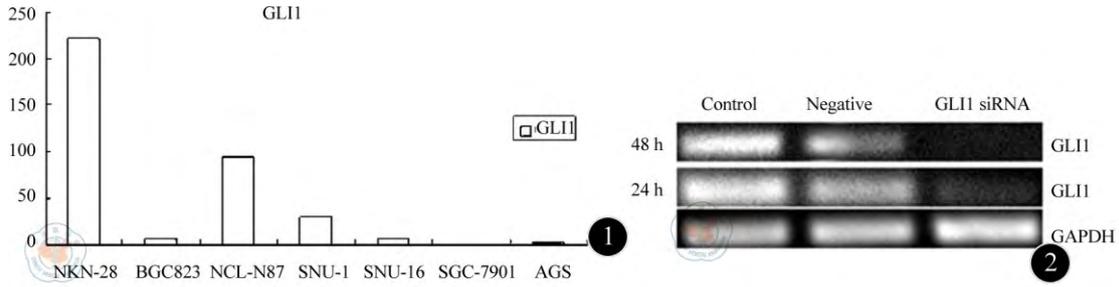


图1 GLI1 在七株胃癌细胞株中的表达情况

图2 GLI1 siRNA 下调胃癌MKN28细胞GLI mRNA的表达

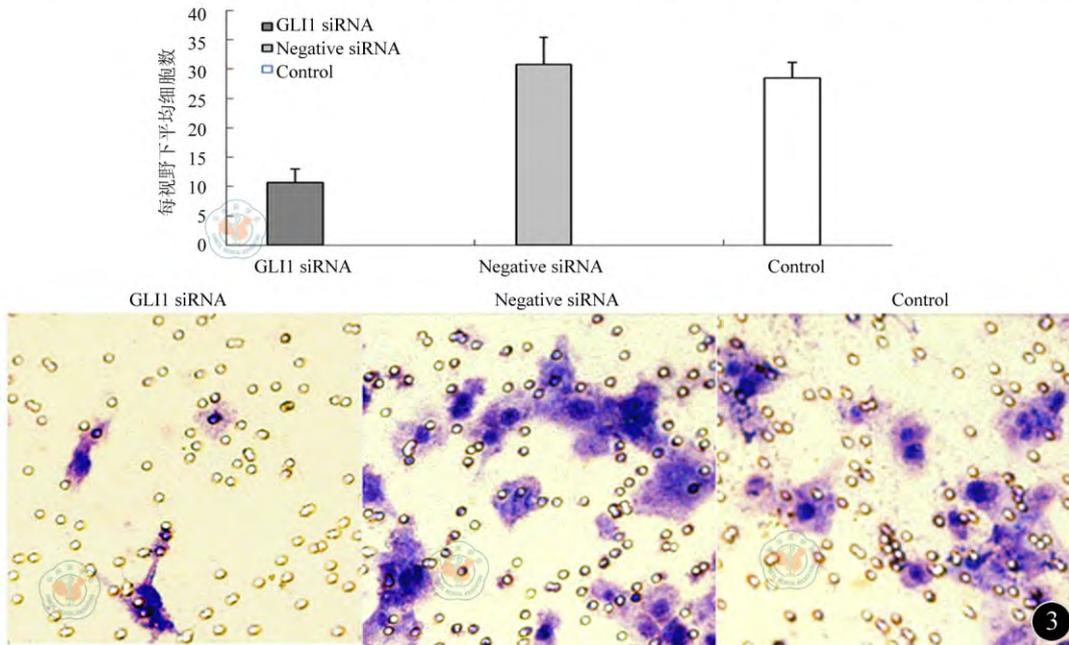


图3 转染GLI1 siRNA后对MKN28细胞侵袭力的影响(结晶紫染色 ×100)。体外侵袭实验结果显示下调GLI1表达后MKN28细胞侵袭能力下降 (P<0.05)

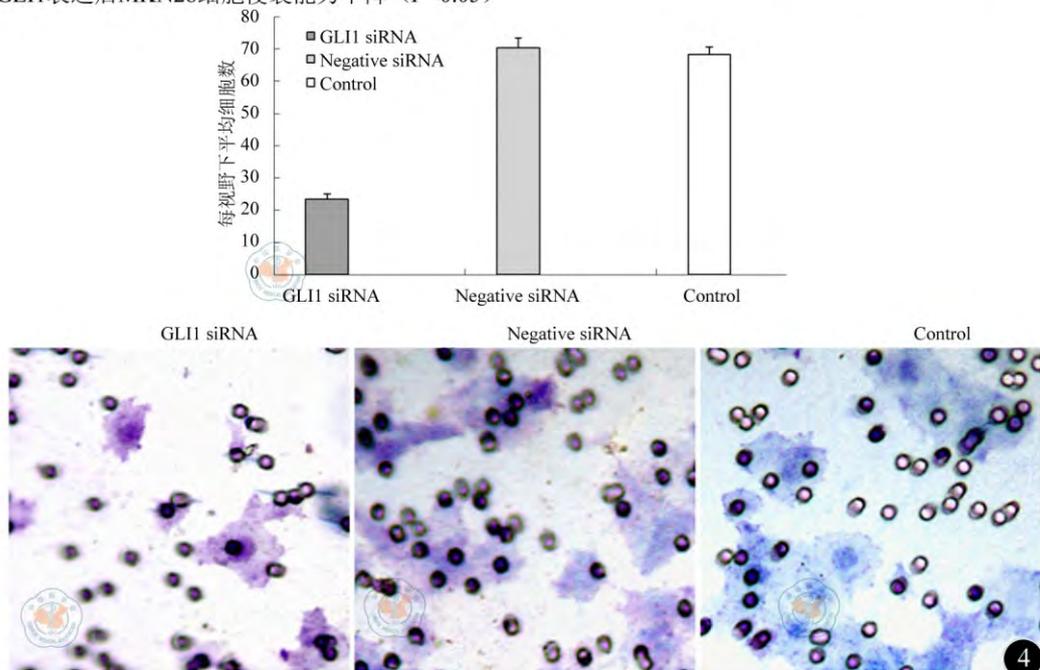


图4 转染GLI1 siRNA后对MKN28细胞转移力的影响(结晶紫染色 ×200)。体外转移实验结果显示下调GLI1表达后MKN28细胞转移能力下降 (P<0.05)

siRNA 干扰实验以 MKN28 胃癌细胞系来进行。

## 二、转染 GLI1 siRNA 下调胃癌 MKN28 细胞 GLI1 mRNA 的表达水平

将 GLI1 siRNA 转染胃癌 MKN28 细胞, 分别在 24 和 48 h 通过 RT-PCR 检测 GLI1 mRNA 的表达, 转染 24 h 后 GLI1 mRNA 水平开始下降, 转染 48 h 后 GLI1 mRNA 下降水平更为明显, 见图 2。

## 三、转染 GLI1 siRNA 后对 MKN28 细胞侵袭能力的影响

行 Transwell 小室侵袭试验后, 封片并计数 100 倍镜下 10 个视野, 后取其平均值, 各组穿膜细胞数分别为 GLI1 siRNA 组  $10.6 \pm 2.32$ 、Negative siRNA 组  $30.8 \pm 4.64$ 、Control siRNA 组  $28.4 \pm 2.72$ , 转染 GLI1 siRNA 组穿膜细胞数同另两组相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 而阴性对照和未处理组间差异无显著性。说明下调 GLI1 表达后, MKN28 细胞的侵袭能力降低, 见图 3。

## 四、转染 GLI1 siRNA 后对 MKN28 细胞转移能力的影响

行 Transwell 小室转移试验后, 封片并计数 200 倍镜下 10 个视野, 取其平均值。各组穿膜细胞数分别为 GLI1 siRNA 组  $23.4 \pm 1.52$ 、Negative siRNA 组  $70.2 \pm 3.04$ 、Control siRNA 组  $68.2 \pm 2.24$ 。转染 GLI1 siRNA 组穿膜细胞数同另两组相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 而阴性对照和未处理组间差异无显著性。说明下调 GLI1 表达后, MKN28 细胞的转移能力降低, 见图 4。

## 讨 论

肿瘤的侵袭转移是一个多阶段、多因素综合作用的发展过程, 是一系列转移相关基因和信号通路支配的结果。其中, HH 通路的激活使 GLI 家族蛋白表达、促进 GLI1 从复合物中脱离出来并定位于细胞核, 激活并转录包括 SHH、PTCH<sup>[4]</sup>等基因, 提高癌细胞的转移和侵袭能力<sup>[5-6]</sup>。因此, HH-GLI1 信号通路在胃癌侵袭和转移中可能发挥重要作用。针对信号通路的靶向药物是肿瘤治疗的热点之一, 然而, 干预信号通路的方式均为蛋白水平, 仍然存在局限<sup>[7]</sup>。RNA 干扰是有效果的基因调控手段<sup>[8]</sup>, 我们依据 GLI1 在 HH 信号通路中的核心作用而选择 GLI1 作为干扰的靶基因, 经 RNA 干扰后 GLI1 在 mRNA 水平的表达明显下调, 在此基础上的细胞侵袭能力和转移能力降低, 再次证实 HH-GLI1 信

号通路在胃癌侵袭和转移中发挥作用, 说明 RNA 干扰治疗可作为未来胃癌治疗的方法之一<sup>[9]</sup>。

肿瘤细胞对周围基质的降解和黏附力是肿瘤转移的两个重要方面。在采用了 Transwell 小室体外侵袭转移试验中, Matritel 模拟肿瘤局部细胞外基质, 肿瘤细胞须降解基质, 穿过基质膜, 而转移试验中细胞需变形后穿过膜上面的小孔。本研究中转染 GLI1 siRNA 细胞在侵袭和转移两个试验中穿膜能力明显降低, 提示 siRNA 沉默 GLI1 可以有效抑制胃癌细胞的侵袭转移能力。先前的研究认为 HH 信号通路的活化可以通过 GLI1 下调细胞黏附分子来诱导上皮细胞向间充质细胞转化, 从而使细胞侵袭能力增强<sup>[10-11]</sup>。我们的研究证实 HH-GLI1 与肿瘤细胞的侵袭和转移关系密切, 同时 GLI1 作为通路的核心分子可能是几种信号通路所共同整合交织的平台, 包括 Notch、TGF- $\beta$ 、WNT 和 HH<sup>[12]</sup>。因此在下调 GLI1 表达后对各个信号通路之间的平衡和联系以及下游侵袭和转移相关的靶基因的调控方面都造成了影响。

根据现有的实验结果, GLI1 在胃癌细胞的穿透基底膜阶段起促进作用, 而基质是肿瘤侵袭和转移的天然屏障, 我们推测这一过程可能是通过对金属基质蛋白酶类的调节有关。因此下一步我们将验证 GLI1 在肿瘤转移过程中是否通过影响金属基质蛋白酶而发挥作用。

## 参 考 文 献

- [1] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer[J]. Cell, 2000, 100: 57.
- [2] Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling in gastric cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2005, 4: 1050-1054.
- [3] Huang L, Walter V, Hayes DN, et al. Hedgehog-Gli signaling inhibition suppresses tumor growth in squamous lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(6): 1566-1575.
- [4] Hegde GV, Munger CM, Emanuel K, et al. Targeting of sonic hedgehog-Gli signaling: a potential strategy to improve therapy for mantle cell lymphoma[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7: 1450-1460.
- [5] Shahi MH, Holt R, Rebhun RB. Blocking signaling at the level of Gli regulates downstream gene expression and inhibits proliferation of canine osteosarcoma cells[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e96593.
- [6] 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(1): 34.
- [7] Cho HK, Kim SY, Kim KH, et al. Tumor suppressor protein VHL inhibits Hedgehog-Gli activation through suppression of Gli1 nuclear localization[J]. FEBS Lett, 2013, 587(7): 826-832.
- [8] Paul CP, Good PD, Winer I, et al. Effective expression of small interfering RNA in human cells[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20: 505-508.

- [9] Zhou BP, Hung MC. Wnt, hedgehog and snail: sister pathways that control by GSK-3h and h-Trcp in the regulation of metastasis[J]. Cell Cycle, 2005, 4: 772-776.
- [10] Aberger F, Ruiz I, Altaba A. Context-dependent signal integration by the GLI code: The oncogenic load, pathways, modifiers and implications for cancer therapy[J]. Semin Cell Dev Biol, 2014.
- [11] Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression[J]. Curr Opin Cell Biol, 2005, 17: 548-558.
- [12] Xie G, Karaca G, Swiderska-syn M, et al. Cross-talk between notch and hedgehog regulates hepatic stellate cell fate[J]. Hepatology, 2013, 58(5): 1801-1813.

(收稿日期: 2014-08-04)

(本文编辑: 戚红丹)

李晓伟, 瞿颖, 李建芳, 等. 小干扰RNA下调GLII1基因的表达对MKN28细胞转移侵袭行为的影响[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2014, 8(18): 3310-3314.

