

特异性下调葡萄糖调节蛋白 78 表达对肝细胞癌侵袭和转移能力的影响

苏荣健*^Δ 李 贞^{1Δ} 程留芳¹ 魏 嘉 李宏丹

(辽宁医学院实验中心, 锦州 121001; ¹ 解放军总医院消化科, 北京 100583)

摘要 为了研究特异性下调葡萄糖调节蛋白(Grp)78对肝细胞癌侵袭和转移能力的影响。通过小干扰RNA(siRNA)技术特异性下调人肝细胞癌细胞株 BEL7402 中 Grp78 的表达, 并应用 Transwell 法和划痕法对肝细胞癌侵袭、转移能力的改变进行分析, 应用免疫沉淀技术和 GST-pulldown 技术分别对黏着斑激酶(FAK)的磷酸化水平和小 GTPase RhoA 的活性进行研究, 应用免疫印迹技术检测 E-钙黏着蛋白、N-钙黏着蛋白和波形蛋白的表达。结果发现, Transwell 实验和划痕实验结果显示特异性下调 Grp78 表达可以抑制肝细胞癌的侵袭和转移, 免疫沉淀结果显示特异性下调 Grp78 表达可以降低 FAK 的磷酸化水平, GST-pulldown 实验结果表明特异性下调 Grp78 表达可以上调 RhoA 的活性。免疫印迹实验结果表明特异性下调 Grp78 可以下调 N-钙黏着蛋白、波形蛋白的表达, 上调 E-钙黏着蛋白的表达。结果表明特异性下调 Grp78 在体外可以抑制肝细胞癌的侵袭和转移, 这种抑制作用是通过 FAK 脱磷酸化和抑制肿瘤的上皮-间叶转化实现的。

关键词 肝细胞癌; 侵袭和转移; 黏着斑激酶; RhoA; 上皮-间叶转化

肝细胞癌是一种恶性程度极高的肿瘤, 早期即可发生门静脉侵袭和肝内转移, 这是肝癌病人手术后复发率高, 预后差的最重要原因之一, 因此探寻有效的抑制肝癌侵袭和转移的方法极为重要^[1]。肿瘤的侵袭和转移是一个十分复杂的过程, 包括肿瘤在原发部位的生长, 侵袭穿过血管壁/淋巴管壁发生血行或淋巴道转移, 在靶器官中的生长三个步骤, 其中肿瘤细胞侵袭血管壁/淋巴管壁是最关键的步骤之一, 抑制肿瘤细胞的血管壁/淋巴管壁的侵袭, 可以有效抑制肿瘤的侵袭和转移过程。

上皮-间叶转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在胚胎发育和肿瘤的侵袭和转移过程中具有关键的作用, 目前有研究认为上皮-间叶转化是大多数上皮型肿瘤发生侵袭和转移的基础, 上皮型肿瘤细胞必须首先发生上皮-间叶转化, 获得间叶细胞的表型才能发生侵袭和转移^[2]。

肿瘤的侵袭和转移是一个严格的受控过程, 目前已经发现了许多参与该过程调控的信号分子如小 GTPase(包括 Rac、RhoA 和 Cdc42)、黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)、整联蛋白连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)等。人们一

直尝试通过干预这些信号分子的表达和活性达到抑制肿瘤的侵袭和转移的目的, 但没有取得预期的效果, 这可能是由于靶蛋白的功能比较单一, 与其他的信号通路缺乏必要的通讯^[3]。

葡萄糖调节蛋白 78(glucose regulated protein 78, Grp78)是由内质网合成、分泌的一种蛋白质, 属于 Hsp70 家族。过去学者们一直认为 Grp78 是一种内质网驻留性蛋白质, 定位于内质网网腔起分子伴侣的作用^[4]。近年来随着研究的不断深入, 人们发现 Grp78 除了驻留在内质网腔中起到分子伴侣的作用外, 还可以转运至细胞膜, 细胞浆, 甚至分泌到细胞外, 参与细胞分化、细胞生存、血管形成等重要生物学过程的调控, 是一种多功能蛋白质^[5]。在肿瘤细胞中, Grp78 参与肿瘤的发生与进展, 肿瘤耐药性调节, 但 Grp78 对肿瘤的侵袭和转移过程是否有调节作用国内外报道较少^[6,7]。

本研究应用小干扰RNA(small interference RNA, siRNA)技术特异性下调人肝细胞癌细胞系中 Grp78 的表达, 分析其对肝细胞癌侵袭和转移能力的影响,

收稿日期: 2007-06-05 接受日期: 2007-08-30

辽宁省自然科学基金资助项目(No. 20061074)

^Δ 对本文有同等贡献

* 通讯作者。Tel: 0416-4673183, E-mail: rongjiansu@yahoo.com.cn

并对相应的分子机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

抗 GRP78、p-Tyr (山羊来源), FAK (鼠源) 购于 Santa Cruz 公司。抗 E-钙黏着蛋白、N-钙黏着蛋白、波形蛋白(兔源)购于 Cell signal 公司。细胞外基质混合物、蛋白酶抑制物混合物、BCIP、NBT 购于 Sigma 公司。Transwell 为 Costar 公司产品。Hochest 33258 购于碧云天公司。碱性磷酸酶标记的二抗购于北京中杉公司。GST 包被的 Rhotekin-RBD 琼脂糖颗粒由中国医科大学发育生物学教研室惠赠。

1.2 细胞培养

人肝细胞癌细胞系 BEL7402 (中国医科大学发育生物学教研室惠赠) 培养于含 10% 胎牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 的链霉素 DMEM 培养液中。

1.3 siRNA

根据 Grp78 基因序列 (GenBank 接受号 NM_005347), 应用 siRNA finder 软件设计 siRNA 分子, 采用 Kumiko Ui-Tei 的原则进行筛选^[8]。靶序列为 5'-CGAUCAGGGCAACCGCAUCTT-3', 经 Blast 软件进行序列相似性分析确定其特异性。Grp78 特异性 siRNA 分子由 TaKaRa 公司合成。非特异性 siRNA 购于 Cell signal 公司, 于转染前一天应用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 接种至 6 孔板中, 确保转染时细胞密度为 60%~80%, 瞬时转染按 Qiagen 公司的 Trans-Messenger™ 的操作说明进行, 2 μ g siRNA 与转染试剂 4 μ l 混合, 用稀释液稀释至 100 μ l, 室温作用 30 min, 加入 600 μ l 无血清、无抗生素培养液混匀。将细胞用 PBS 漂洗, 加入 siRNA-转染试剂复合物 37 $^{\circ}$ C 温育 4 h, 4 h 后弃去 siRNA-转染试剂复合物, 加入完全培养液继续培养。为了提高转染的效率, 按 Kumiko Ui-Tei 的方法采用 3 次转染, 每次转染时间间隔为 24 h。最后一次转染后, 加入完全培养液继续培养 72 h。

1.4 Transwell 法

siRNA 的方法如前所述, 最后一次转染后, 用胰蛋白酶消化细胞以 2×10^5 个/ml 的密度接种于 Transwell 中细胞外基质凝胶包被的聚碳酸酯膜上层, 继续培养 48 h。取出聚碳酸酯膜, 用细胞刮刀去除上层细胞, 翻转聚碳酸酯膜, 4% 甲醛固定 10 min, Hochest 33258 染色 15 min, 荧光显微镜下选取 10 个视野, 计数每视

野中的细胞数, 计算平均值, 结果以均值加减 1 倍标准差表示。

1.5 划痕法

siRNA 的方法如前所述, 最后一次转染后, 用胰蛋白酶消化细胞接种于 6 孔板中, 每孔 2×10^5 个, 待细胞汇合成细胞单层后, 用灭菌移液器头在细胞单层上小心的做一个划痕, 用 PBS 彻底漂洗 3 次, 洗去细胞碎片, 继续培养 24 h, 用相差显微镜观察划痕愈合程度, 计算平均值, 结果以均值加减 1 倍标准差表示。

1.6 免疫沉淀

siRNA 的方法如前所述, 应用 1% NP-40 缓冲液 (150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 1 mmol/L PMSF, 10 μ g/ml 亮抑蛋白酶肽, 1 mmol/L 抑蛋白酶肽, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4) 裂解细胞, 葡萄球菌 A 蛋白包被的琼脂糖颗粒漂洗两次, 考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度, 取 150 μ g 细胞裂解液加入 5 μ g 抗 FAK 多克隆抗体旋转混合仪上 4 $^{\circ}$ C 过夜, 12 000 g 离心收集沉淀, 加热变性, 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 以 p-Tyr 为检测抗体进行免疫印迹分析。

1.7 免疫印迹

siRNA 的方法如前所述, 最后一次转染后继续培养 72 h, 将细胞样品用 TBS 漂洗后加入 RIPA 缓冲液 (1% NP-40, 0.5% 脱氧胆酸钠, 1% SDS, 0.1% PMSF) 裂解细胞, 考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度。加热变性, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭过夜, 加入 1:1 000 倍稀释的一抗杂交 2 h, TBST 洗膜后加入二抗温育 1 h, TBST 洗膜后进行 BCIP/NBT 显色, 采用 Chemi-genius 凝胶成像系统分析目的蛋白的表达量。

1.8 GST pull-down 分析

siRNA 的方法如前所述, 最后一次转染后继续培养 72 h, 用 1% NP-40 缓冲液裂解细胞, 应用 GST 包被的琼脂糖凝胶漂洗两次, 考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度, 取 50 μ g 细胞裂解液加入 5 μ g GST 包被的 Rhotekin-RBD 琼脂糖凝胶旋转混合仪上 4 $^{\circ}$ C 过夜, 12 000 g 离心收集沉淀, 加热变性, 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 进行免疫印迹分析。

1.9 统计学分析

应用 SPSS11.0 统计软件对数据进行单因素方差分析和 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为存在显著性差异。

2 结果

2.1 特异性下调 Grp78 可以抑制肝细胞癌的侵袭

和转移

为了验证 Grp78-siRNA 下调 Grp78 表达的效率, 在末次转染后分别于 24、48、72 h 收集细胞, 检测 Grp78 的表达, 结果显示在不同时间点, Grp78 的表达均明显低于未转染细胞和非特异性 siRNA 转染细胞, 下调效率以转染后 72 h 最高(图 1)。为了验证 Grp78-siRNA 的特异性, 于转染后 72 h 收集细胞检测了 Grp94 的表达, 结果表明在 Grp78-siRNA 转染细胞、非特异性 siRNA 转染细胞和未转染细胞中, Grp94 的表达没有明显的差异(图 2)。

Transwell 实验的结果显示 Grp78-siRNA 转染细胞每个视野细胞数平均为 83 个, 明显低于未转染细胞(平均 210 个/低倍视野)和非特异性 siRNA 转染细胞

(平均 220 个/低倍视野)(图 3), 统计学分析表明差异具有显著性($P < 0.05$)。这表明特异性下调 Grp78 可以抑制肝细胞癌的侵袭。

划痕法实验结果显示 24 h 后, Grp78-siRNA 转染细胞的创口愈合较慢(53%), 而未转染细胞(92%)和

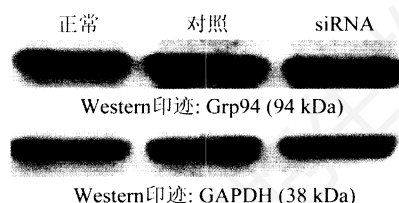


图 2 RNA 干扰实验的特异性验证

末次转染后 72 h 收集细胞 Western 印迹检测 Grp94 表达, 结果表明在转染细胞和未转染细胞中 Grp94 的表达没有差异, 经统计学单因素方差分析表明差异无统计学意义($P > 0.05$)。

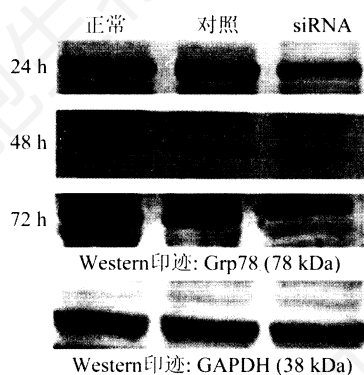


图 1 Grp78-siRNA 转染效率验证

末次转染后 24 h、48 h、72 h 收集细胞, Western 印迹检测 Grp78 表达, 结果表明在 Grp78-siRNA 转染细胞中 Grp78 表达明显低于未转染细胞和非特异性 siRNA 转染细胞($P < 0.05$)。

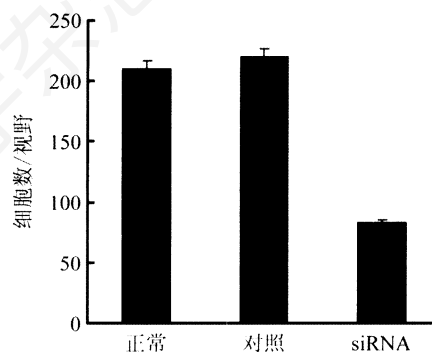


图 3 特异性下调 Grp78 对肝细胞癌细胞系 BEL7402 细胞侵袭能力的影响

数据以 3 次独立实验结果的平均值加减 1 倍标准差表示, 经统计学单因素方差分析表明差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

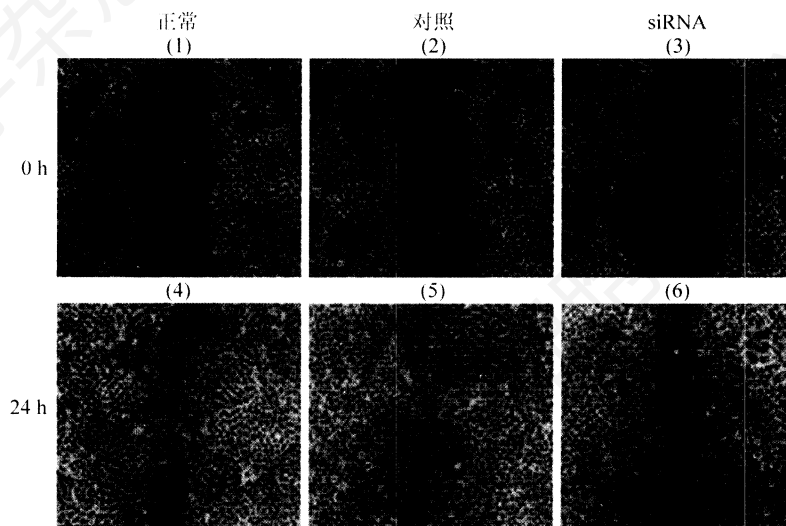


图 4 特异性下调 Grp78 对肝细胞癌细胞系 BEL7402 细胞转移能力的影响

划痕法结果显示 24 h 后, Grp78-siRNA 转染细胞的创口愈合较慢(6), 而未转染细胞和非特异性 siRNA 转染细胞创口愈合基本愈合(4, 5), 统计学分析表明差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

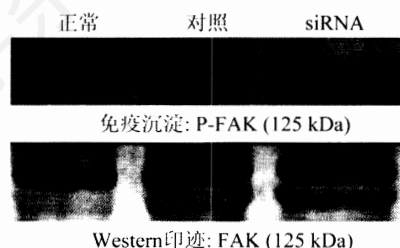


图5 特异性下调 Grp78 表达可以抑制 FAK 的磷酸化水平
在 Grp78-siRNA 转染细胞中 FAK 的磷酸化水平明显低于未转染细胞和非特异性 siRNA 转染细胞($P<0.05$), FAK 的表达水平没有变化($P>0.05$)。

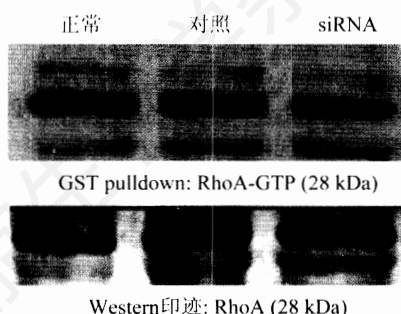


图6 特异性下调 Grp78 表达可以促进 RhoA 的活性
实验结果显示在 Grp78-siRNA 转染细胞中, RhoA-GTP 的水平明显高于未转染细胞和非特异性 siRNA 转染细胞($P<0.05$), 而 RhoA 的表达没有差异($P>0.05$)。

非特异性 siRNA 转染细胞(94%)创口愈合基本愈合(图4)。统计学分析 χ^2 表明差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 特异性下调 Grp78 表达可以抑制 FAK 的磷酸化水平, 对 FAK 的表达没有影响

免疫沉淀结果表明, 在 Grp78-siRNA 转染细胞中 FAK 的磷酸化水平明显低于未转染细胞和非特异性 siRNA 转染细胞, 经统计学分析表明, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 免疫印迹实验结果显示在 Grp78-siRNA 转染细胞、未转染细胞和非特异性 siRNA 转染细胞中, FAK 的表达水平没有差异($P>0.05$)(图5), 以上结果表明特异性下调 Grp78 表达可以抑制 FAK 的磷酸化。

2.3 特异性下调 Grp78 表达可以促进 RhoA 的活性, 而对 RhoA 的表达没有影响

GST pull-down 实验结果显示在 Grp78-siRNA 转染细胞中, RhoA-GTP(活性形式)的水平明显高于未转染细胞和非特异性 siRNA 转染细胞, 经统计学分析表明差异具有统计学意义($P<0.05$), 这表明特异性下调 Grp78 可以促进 RhoA 的活化。免疫印迹实验结果表

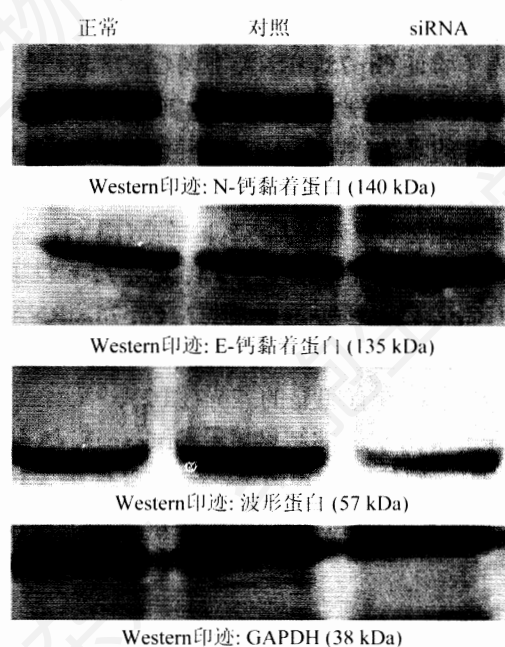


图7 特异性下调 Grp78 可以抑制肿瘤的上皮-间叶转化
结果显示在 Grp78-siRNA 转染细胞中 N-钙黏着蛋白、波形蛋白的表达明显低于未转染细胞和非特异性 siRNA 转染细胞, 而 E-钙黏着蛋白的表达明显高于未转染细胞和非特异性 siRNA 转染细胞($P<0.05$)。

明, 在 Grp78-siRNA 转染细胞、未转染细胞和非特异性 siRNA 转染细胞中, RhoA 的表达水平差异没有统计学意义(图6)($P>0.05$)。

2.4 特异性下调 Grp78 表达可以抑制肿瘤细胞上皮-间叶转化。

免疫印迹实验的结果显示在 Grp78-siRNA 转染细胞中 N-钙黏着蛋白、波形蛋白的表达明显低于未转染细胞和非特异性 siRNA 转染细胞, 而 E-钙黏着蛋白的表达明显高于未转染细胞和非特异性 siRNA 转染细胞, 经统计学分析表明差异具有统计学意义(图7)($P<0.05$)。

3 讨论

肝细胞癌的侵袭和转移是肝癌病人死亡的重要原因, 探寻一种有效的抑制肝癌侵袭和转移的方法一直是肿瘤防治领域研究的热点问题, 研究人员进行了尝试, 获得了大量有益的研究结果, 但仍然没有达到人们的预期。

目前已知, Grp78 定位于细胞膜、细胞浆和内质网, 甚至分泌到细胞外, 是一种多功能蛋白质, 参与许多重要的细胞活动, 如细胞分化、细胞生存、血管形成、肿瘤的发生、抗肿瘤免疫等。但 Grp78

对肿瘤的侵袭和转移过程中是否具有调节作用目前国内文献报道较少。

在本研究中,我们应用siRNA特异性下调肝细胞癌细胞系 BEL7402 中 Grp78 的表达,并观察肿瘤细胞侵袭和转移能力的变化,结果发现特异性下调 Grp78 表达可以抑制肝细胞癌的侵袭和转移,这些表明 Grp78 对肝癌的侵袭和转移具有一定的调节作用。

FAK 是一种酪氨酸蛋白激酶,当整联蛋白受体与相应的配体结合后 FAK 的 Tyr397 发生磷酸化反应被激活,与 Src 形成复合体,调节下游的效应分子的活性如 RhoA,对细胞黏附、迁移等过程产生调节作用。目前的研究表明 FAK 磷酸化水平的降低可以抑制细胞的迁移^[9]。本研究中我们应用免疫印迹技术对 FAK 的磷酸化水平进行了研究,结果发现 Grp78-siRNA 转染细胞中 FAK 的磷酸化水平明显低于未转染细胞和非特异性 siRNA 转染细胞,这些初步提示 Grp78 对肝细胞癌侵袭和转移能力的影响是通过 FAK 信号转导通路实现的。

为了进一步验证以上结论,我们对 FAK 的下游效应物 RhoA 的表达及活性进行了检测。RhoA 是一种小 GTPase,位于 FAK 信号通路的下游,RhoA 在细胞内有两种形式,即 GTP 结合的活性形式和 GDP 结合的非活性形式,活性形式与细胞膜结合,而非活性形式位于细胞浆。目前的研究表明 FAK 是 RhoA 的负调控物,FAK 的磷酸化水平与 RhoA 的活性负相关^[10]。GST-pulldown 结果显示在 Grp78 siRNA 转染细胞中 RhoA-GTP 水平明显高于未转染细胞和非特异性 siRNA 转染细胞。这些进一步证实 Grp78 对肝细胞癌侵袭和转移能力的影响是通过 FAK 信号转导通路实现的。

上皮-间叶转化是上皮性肿瘤细胞发生转移的必要条件,上皮性肿瘤发生上皮-间叶转化后获得间叶细胞的特性,细胞极性形成,侵袭肿瘤局部的血管壁和淋巴管壁,发生转移^[11]。为了探讨特异性下调 Grp78 抑制肿瘤细胞侵袭和转移的机制,我们对 Grp78-siRNA 转染细胞的 E-钙黏着蛋白(上皮细胞标志物)、N-钙黏着蛋白和波形蛋白(间叶细胞标志物)进行检测^[12,13]。免疫印迹实验结果表明在 Grp78 siRNA 转染细胞中 N-钙黏着蛋白、波形蛋白的表达明显低于未转染细胞和非特异性 siRNA 转染细胞,而 E-钙黏着蛋白的表达明显高于未转染细胞和非特异性 siRNA 转染细胞,这些表明特异性下调 Grp78 可以抑制肿瘤的上皮-间叶转化,从而抑制肝细胞癌的转移。

以上体外实验的结果表明,特异性下调 Grp78 表达可以抑制肝细胞的侵袭和转移,这种抑制作用是通过抑制肿瘤的上皮-间叶转化和参与 FAK 信号转导通路的调节实现的。但 Grp78 参与肝细胞癌侵袭和转移的调节作用的详细机制仍需进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Fujii T et al. *J Hepatology*, 2004, **41**: 104
- [2] Vincent-Salomon A et al. *Breast Cancer Res*, 2003, **5**: 101
- [3] Overall CM et al. *Nat Rev Cancer*, 2006, **6**: 227
- [4] Lee AS. *Trends Biochem Sci*, 2001, **26**: 504
- [5] Arap MA et al. *Cancer Cell*, 2004, **6**: 275
- [6] Shin BK et al. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 7607
- [7] Zhang J et al. *Clin Exp Metastasis*, 2006, **23**: 401
- [8] Ui-Tei K et al. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**: 936
- [9] Khyrul WA et al. *J Biol Chem*, 2004, **279**: 54131
- [10] Mitra SK et al. *Curr Opin Cell Biol*, 2006, **18**: 516
- [11] Schlaepfer DD et al. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1692**: 77
- [12] Christofori G. *Nature*, 2006, **441**: 444
- [13] Kokkinos MI et al. *Cells Tissues Organs*, 2007, **185**: 191

The Effects of Specific Down-regulation of Grp78 by siRNA on Invasion and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma

Rong-Jian Su^{*Δ}, Zhen Li^{1Δ}, Liu-Fang Cheng¹, Jia Wei, Hong-Dan Li

(Central Laboratory, Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, China; ¹Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese Liberation Army, Beijing 100583, China)

Abstract To investigate the roles of glucose-regulated protein 78 (Grp78) in invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma (HCC), we down-regulated the expression of Grp78 by small interfering RNA (siRNA) in human HCC cell lines BEL 7402, the invasion and metastasis behaviors of HCC in Grp78 knock-down cells was analyzed by Transwell assay and wound healing assay. Focal adhesion kinase (FAK) phosphorylation was analyzed by immunoprecipitation. The activity of RhoA was determined by GST-pulldown assay. The expression status of E-cadherin, N-cadherin and vimentin was examined by Western blot. We found that the invasion and metastasis capabilities of HCC in Grp78 knock-down cells were significantly decreased compared with parental cells. Phosphorylation of FAK was significantly inhibited and RhoA activity was promoted in Grp78 knock-down cells. The expression levels of N-cadherin, vimentin were significantly lower, while E-cadherin was higher in Grp78 knock-down cells than in normal cells. We concluded that Grp78 silencing may inhibit the invasion and metastasis of HCC. These data suggest that Grp78 may be a potential target for HCC gene therapy.

Key words hepatocellular carcinoma; invasion and metastasis; focal adhesion kinase; RhoA; epithelial-mesenchymal transition

Received: June 5, 2007 Accepted: August 30, 2007

This work was supported by the Natural Science Foundation of Liaoning Province (No.20061074)

^ΔContribute equally to this work

Corresponding author. Tel: 86-416-4673183, E-mail: rongjiansu@yahoo.com.cn