

特异性下调葡萄糖调节蛋白 78 对肝细胞癌粘附特性和细胞外基质降解的影响

苏荣健^{*△} 李 贞^{1△} 李宏丹 宋慧娟 程留芳^{1*}

(辽宁医学院科学实验中心, 辽宁省教育厅细胞分子生物学和新药开发重点实验室, 锦州 121001; ¹解放军总医院消化科, 北京 100583)

摘要 我们以前的研究表明特异性下调葡萄糖调节蛋白 78 (Grp78) 可以抑制肝细胞癌细胞系 BEL7402 的侵袭和转移。为了进一步研究该抑制作用的分子机制, 我们应用小干扰 RNA (siRNA) 技术特异性下调肝细胞癌细胞系 BEL7402 中 Grp78 的表达, 并对细胞的粘附、伸展和细胞外基质降解情况进行研究, 结果发现特异性下调 Grp78 可以促进细胞与细胞外基质的粘附, 抑制细胞伸展。我们的研究还显示特异性下调 Grp78 的表达可以抑制基质金属蛋白酶-2 和基质金属蛋白酶-9 的表达及分泌, 这些说明特异性下调 Grp78 可以抑制细胞外基质的降解。对机制的研究发现特异性下调 Grp78 表达可以抑制 c-jun 的磷酸化。这些结果表明特异性下调 Grp78 可以抑制肝细胞癌细胞系 BEL7402 的侵袭和转移, 这种抑制作用可能是通过促进细胞与细胞外基质的粘附, 抑制细胞伸展和细胞外基质的降解实现的。

关键词 葡萄糖调节蛋白 78; 肝细胞癌; 细胞粘附; 细胞伸展; 细胞外基质降解

我们此前的研究表明特异性下调分子伴侣葡萄糖调节蛋白 78 (Grp78) 的表达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^[1]。为了进一步探讨特异性下调 Grp78 抑制肝细胞癌侵袭和转移的可能分子机制, 我们应用 siRNA 技术特异性下调肝细胞癌细胞系 BEL7402 中 Grp78 的表达, 并对细胞粘附、细胞伸展以及细胞外基质重构相关蛋白基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 和基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 的表达及活性进行研究, 以期进一步探寻 Grp78 抑制肝细胞癌侵袭和转移的可能分子机制, 为肝细胞癌的治疗提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

anti-Grp78、anti-Grp94、MMP-2、MMP-9、c-jun 及 p-c-jun 购于 Santa Cruz 公司, 桩蛋白(paxillin)、粘着斑蛋白(vinculin)购于 Cell Signal 公司。明胶、纤粘连蛋白、蛋白酶抑制物混合物、罗丹明标记的毒伞素、BCIP/NBT 购于 Sigma 公司。FITC、TRITC、AP 标记的二抗购于北京中杉公司。

1.2 细胞培养

人肝细胞癌细胞系 BEL7402 由中国医科大学发

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 µg/ml 的链霉素 DMEM 培养液中。

1.3 RNA 干扰

根据 Grp78 基因序列(GenBank accession number NM_005347), 应用 siRNA finder 软件设计小干扰 RNA 分子, 采用 Kumiko Ui-Tei 的原则进行筛选^[2]。靶序列为 5'-CGAUCAGGGCAACCGCAUUCTT-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。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 TransMessenger™ 的操作说明进行, 2 µg siRNA 与 4 µl 转染试剂混合, 用稀释液稀释至 100 µl, 室温作用 30 min, 加入 600 µl 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 °C 温育 4 h, 4 h 后弃去 siRNA-转染试剂复合物, 加入完

收稿日期: 2009-08-07 接受日期: 2009-11-11

辽宁省博士启动基金(No. 20061074)和辽宁省教育厅重点实验室项目(No.2008S142)资助

[△] 对本文有同等贡献

^{*} 通讯作者。苏荣健: Tel: 0416-4673183, E-mail: rongjiansu@yahoo.com.cn; 程留芳: Tel: 010-66937706, E-mail: liufang_chen@yahoo.com.cn

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 细胞粘附实验

RNA 干扰的方法如前所述,最后一次转染后 72 h,用 0.25% 胰蛋白酶、0.02% EDTA 消化细胞,用无血清培养液稀释至 2×10^5 个/ml,接种于纤粘连蛋白 (10 $\mu\text{g/ml}$) 包被、1% BSA 封闭的 96 孔板中,每孔接种 100 μl ,继续培养 1 h, PBS 漂洗, 4% 甲醛固定 20 min, 1% 结晶紫染色 20 min, 0.4% Tween 20 溶解过夜,酶标仪上于 595 nm 测定吸光度值。

1.5 免疫荧光实验

RNA 干扰的方法如前所述,最后一次转染后 72 h, 0.25% 胰蛋白酶、0.02% EDTA 消化细胞,以 1×10^5 个/ml 的密度接种于 10 $\mu\text{g/ml}$ 纤粘连蛋白预包被的盖玻片上,待细胞充分伸展后取出盖玻片, PBS 漂洗, 3.7% 甲醛固定 30 min, 0.2% Triton-X-100 透化 5 min, 1% BSA 封闭 30 min, 一抗(粘着斑蛋白, 桩蛋白)室温温育 1 h, PBS 漂洗, 二抗(罗丹明标记的山羊抗小鼠 IgG、FITC 标记的羊抗兔 IgG)室温温育 1 h, 95% 甘油封片, 荧光显微镜下观察粘着斑的分布。

1.6 细胞伸展实验

RNA 干扰的方法如前所述,最后一次转染后 72 h, 0.25% 胰蛋白酶、0.02% EDTA 消化细胞,以 1×10^5 个/ml 的密度接种于 10 $\mu\text{g/ml}$ 纤粘连蛋白预包被的盖玻片上,分别于 30 min 和 90 min 后取出盖玻片, PBS 漂洗, 3.7% 甲醛固定 30 min, 0.2% Triton-X-100 透化 5 min, 1% BSA 封闭 30 min, 罗丹明标记的毒伞素室温染色 30 min, PBS 漂洗, 95% 甘油封片, 荧光显微镜下观察细胞伸展情况并评分, 圆形对称伸展为 0 分, 不对称伸展为 1 分^[3]。

1.7 明胶酶谱分析

RNA 干扰的方法如前所述,最后一次转染后 72 h, 0.25% 胰蛋白酶、0.02% EDTA 消化细胞,用无血清培养液稀释至 2×10^5 个/ml,接种于 96 孔板中,每孔 100 μl 继续培养 24 h, 收集培养液, BCA 法测定蛋白质含量。SDS 聚丙烯酰胺凝胶(含 1 g/L 明胶)电泳,以复性缓冲液(25 g/L Triton-X 100)于室温下洗胶 2 次,每次 30 min。凝胶置于温育缓冲液(含 50 mol/L Tris-HCl、1 mmol/L ZnCl_2 、0.5 g/L 叠氮钠, pH 7.6)中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床缓慢摇动 12 h。考马斯亮蓝(10 g/L 考马斯亮蓝 R250、100 ml/L 乙酸、100 g/L 异丙醇)染色 30 min, 脱色(100 ml/L 乙酸、100 g/L 异

丙醇)至蓝色背景下出现透明条带,应用 Chemi-genius 凝胶成像系统测定各条带的吸光度值,以电泳条带的积分吸光度值代表酶活性进行定量分析。

1.8 免疫印迹实验

RNA 干扰的方法如前所述,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。

1.9 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 可以促进细胞与细胞外基质的粘附

为了验证 Grp78-siRNA 下调 Grp78 表达的效率,我们在末次转染后 72 h 收集细胞,检测 Grp78 的表达,结果显示 Grp78-siRNA 转染细胞中 Grp78 的表达明显低于未转染细胞和非特异性 siRNA 转染细胞。为了验证 Grp78-siRNA 的特异性,我们于转染后 72 h 收集细胞检测分子伴侣 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 1)。

为了研究特异性下调 Grp78 对肝细胞癌细胞系 BEL7402 粘附特性的影响,我们应用细胞粘附实验对细胞与细胞外基质的粘附能力进行了研究。结果显示 Grp78-siRNA 转染细胞 A_{595} 为 0.67,明显高于未转染细胞($A_{595}=0.38$)和非特异性 siRNA 转染细胞

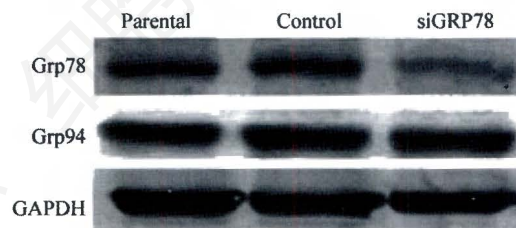


Fig.1 The effect of Grp78 knockdown in BEL7402 cells on the expression of Grp78 and Grp94

Parental: BEL7402 cells; Control: control siRNA transfected cells; siGRP78: siRNA against Grp78 transfected cells.

($A_{595}=0.4$), 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 可以促进细胞与细胞外基质的粘附(图 2)。

为了观察粘着斑形成的情况, 我们应用免疫荧光技术对粘着斑蛋白和桩蛋白进行标记, 结果发现在肝细胞癌细胞系 BEL7402 中特异性下调 Grp78 可以导致粘着斑蛋白和桩蛋白的重新分布。在 Grp78-siRNA 转染细胞中, 粘着斑蛋白和桩蛋白在细胞中呈点状分布, 而在对照细胞中, 粘着斑蛋白和桩蛋白主要分布于细胞边缘, 这进一步证实了特异性下调 Grp78 可以促进 BEL7402 细胞与细胞外基质的粘附(图 3)。

2.2 特异性下调 Grp78 可以抑制细胞极性形成

为了观察特异性下调 Grp78 对 BEL7402 细胞细胞极性的影响, 我们应用细胞伸展实验对 Grp78-

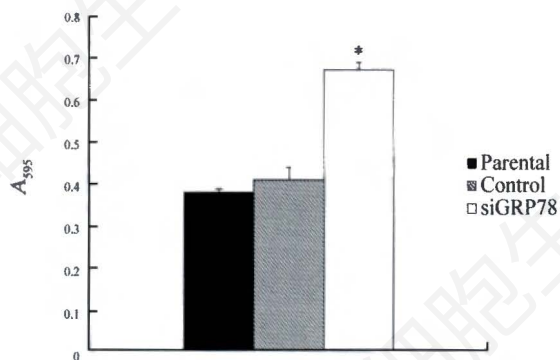


Fig.2 Grp78 knockdown in BEL7402 cells increases cell adhesion on fibronectin-coated surface

Parental: BEL7402 cells; Control: control siRNA transfected cells; siGRP78: siRNA against Grp78 transfected cells. *: compared with control siRNA transfected cells and parental cells, the difference is significant ($P<0.05$).

siRNA 转染细胞的极性形成情况进行了研究, 结果表明重新接种后 30 min, 未转染细胞和非特异性 siRNA 转染细胞伸展良好, 形成明显的前后极性(front-rear polarity), Grp78-siRNA 转染细胞无明显极性形成, 呈圆形。90 min 时未转染细胞和非特异性 siRNA 转染细胞细胞极性形成明显, Grp78-siRNA 转染细胞仅有小部分细胞形成明显的前后极性(图 4)。

2.3 特异性下调 Grp78 可以抑制基质金属蛋白酶的活性及表达

为了研究特异性下调 Grp78 对 BEL7402 细胞

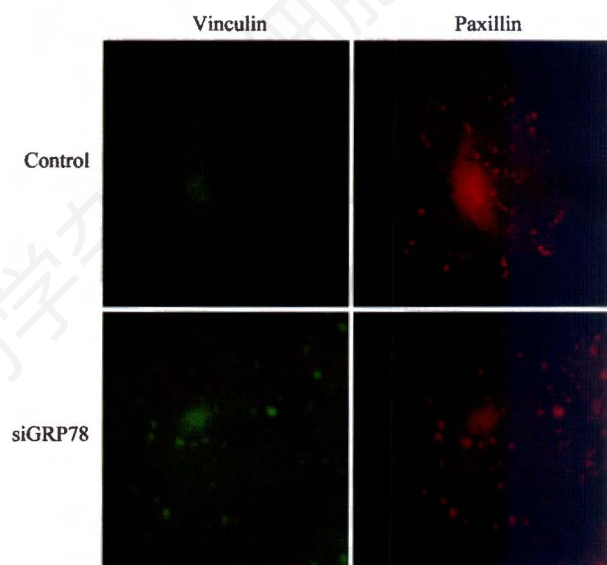


Fig.3 Grp78 knockdown in BEL7402 cells promotes the formation of focal adhesion

Focal adhesion distributed throughout the cytosol in Grp78 siRNA transfected cells. Control: control siRNA transfected cells; siGRP78: siRNA against Grp78 transfected cells.

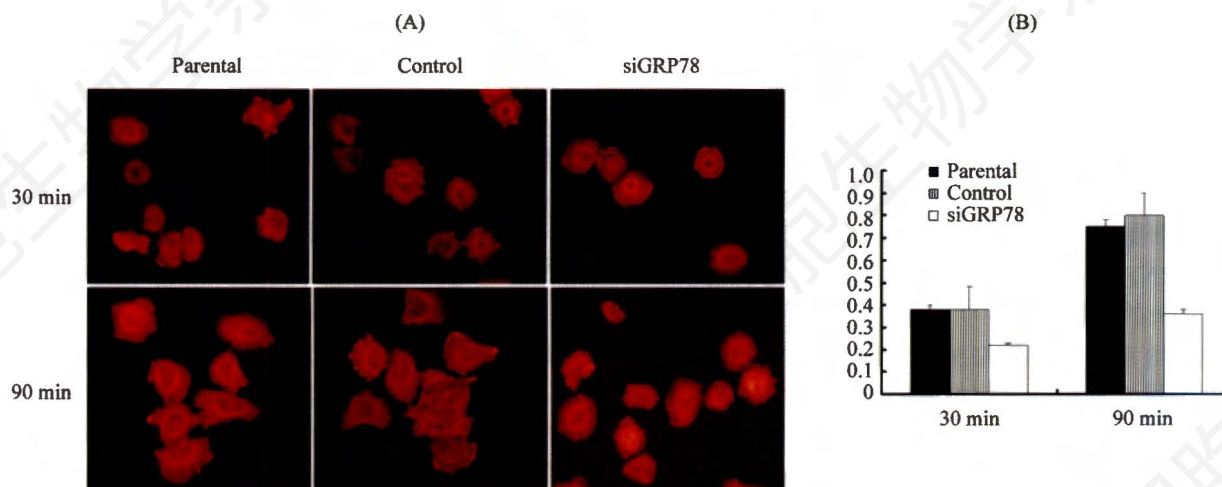


Fig.4 Grp78 knockdown inhibits the spreading of BEL7402 cells

A: cell spreading status of Grp78 knockdown BEL7402 cells. B: diagram show of cell spreading status of Grp78 knockdown BEL7402 cells. Parental: BEL7402 cells; Control: control siRNA transfected cells; siGRP78: siRNA against Grp78 transfected cells.

MMP-2、MMP-9 的表达与活性的影响, 我们应用明胶酶谱技术和免疫印迹技术对 Grp78-siRNA 转染细胞中 MMP-2、MMP-9 的表达与活性进行了检测。明胶酶谱的实验结果显示 Grp78-siRNA 转染细胞 MMP-2、MMP-9 的活性明显低于非特异性 RNA 转染细胞和未转染细胞(图 5A)。免疫印迹实验结果表明 Grp78-siRNA 转染细胞中 MMP-2、MMP-9 的表达明显低于非特异性 RNA 转染细胞和未转染细胞(图 5B)。这些表明特异性下调 BEL7402 细胞中 Grp78 可以抑制 MMP-2、MMP-9 的活性及表达。

2.4 特异性下调 Grp78 抑制 c-jun 的磷酸化

c-jun 的表达及磷酸化对 MMP-2、MMP-9 的表达及分泌具有重要调节作用。为了研究特异性下调 Grp78 对转录因子 c-jun 的表达及磷酸化的影响, 我们应用免疫印迹技术检测了 c-jun 的表达及磷酸化水平, 结果发现在 Grp78-siRNA 转染细胞中, c-jun 的磷酸化水平明显降低, 而 c-jun 的表达没有差异, 这些说明在 BEL7402 细胞中特异性下调 Grp78 可以抑制 c-jun 的磷酸化(图 6)。

3 讨论

肝细胞癌是一种恶性肿瘤, 具有早期诊断困难和难以治疗的特点, 肝细胞癌的侵袭和转移是肝癌病人的最重要死亡原因^[4]。我们以前的研究结果表明特异性下调 Grp78 可以抑制肝细胞癌 BEL7402 的侵袭和转移, 并初步证实这种抑制作用是通过下调粘着斑激酶的活性和抑制肿瘤细胞的上皮-间叶转化实现的^[1]。

为了进一步研究特异性下调 Grp78 抑制肝细胞癌侵袭和转移的分子机制, 我们应用 siRNA 特异性下调肝细胞癌细胞系 BEL7402 中 Grp78 的表达, 并对其对粘附特性、极性形成以及基质金属蛋白酶的表达与活性的影响进行研究。

粘着斑转换(focal adhesion turnover)对于细胞的粘附和迁移具有重要的调节作用^[5]。本研究中我们应用免疫荧光技术和细胞粘附实验对 Grp78-siRNA 转染的肝细胞癌细胞的粘附特性进行研究, 结果发现 Grp78-siRNA 转染细胞与细胞外基质的粘附能力增强、粘着斑的数量和大小明显增加, 这些表明特异性下调 Grp78 可以抑制肝细胞癌细胞的粘着斑转换。

细胞极性形成是肿瘤细胞侵袭和转移的必要条件^[6]。为了探求特异性下调 Grp78 对肝细胞癌细胞极性形成的影响, 我们对 Grp78-siRNA 转染细胞的伸展情况进行了研究, 结果发现 Grp78-siRNA 转染细胞大多呈现对称的非极性伸展, 而未转染细胞和无关 RNA 转染细胞呈现明显的非对称极性伸展, 这些表明

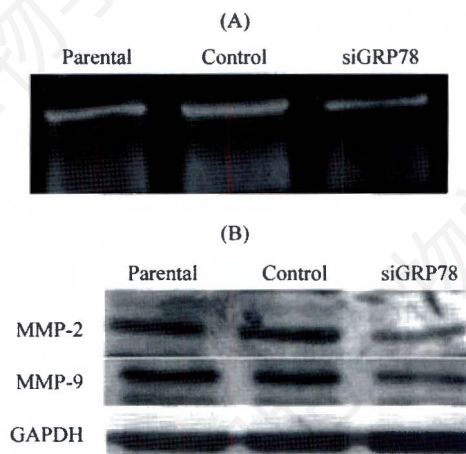


Fig.5 Grp78 knockdown in BEL7402 cells decreases the activity and expression of MMP-2 and MMP-9

A: Grp78 knockdown in BEL7402 cells inhibits the activity of MMP-2 and MMP-9. B: Grp78 knockdown in BEL7402 cells down-regulates the expression of MMP-2 and MMP-9. Parental: BEL7402 cells; Control: control siRNA transfected cells; siGRP78: siRNA against Grp78 transfected cells.

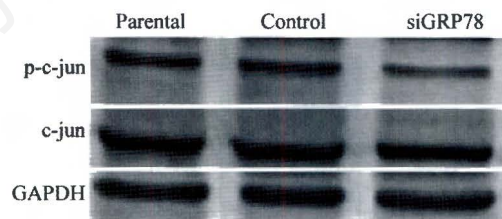


Fig.6 Grp78 knockdown decreases c-jun phosphorylation in BEL7402 cells

Parental: BEL7402 cells; Control: control siRNA transfected cells; siGRP78: siRNA against Grp78 transfected cells.

特异性下调 Grp78 可以抑制肝细胞癌细胞的极性形成, 这与以前的研究结果是一致的^[1]。

细胞外基质的降解是肿瘤细胞侵袭血管壁, 发生血行转移和淋巴道转移的基础, MMP-2 和 MMP-9 在该过程中具有重要调节的作用^[7]。为了研究特异性下调 Grp78 对细胞外基质降解的影响, 我们对 Grp78-siRNA 转染细胞中 MMP-2、MMP-9 表达及活性进行了研究, 结果表明 Grp78-siRNA 转染细胞 MMP-2、MMP-9 的表达及活性明显低于未转染细胞和对照 RNA 转染细胞, 这些结果表明特异性下调 Grp78 可以抑制 MMP-2、MMP-9 表达及活性。这些提示我们特异性下调 Grp78 的表达可以通过抑制 MMP-2、MMP-9 的表达及活性抑制肝细胞癌对血管壁的侵袭。

转录因子 c-jun 在 MMP-2、MMP-9 的表达具有

重要的调节作用, 研究表明 c-jun 的表达及磷酸化水平的降低可以抑制 MMP-2、MMP-9 的表达^[8]。为了进一步验证特异性下调 Grp78 对 MMP-2、MMP-9 表达及活性的影响, 我们对 c-jun 的磷酸化及表达进行了检测, 结果发现 Grp78-siRNA 转染细胞中 c-jun 的磷酸化水平明显低于未转染细胞和无关 RNA 转染细胞, 这些说明特异性下调 Grp78 可以通过抑制 c-jun 的磷酸化来下调 MMP-2、MMP-9 表达。

综上所述, 我们的研究结果说明了 Grp78 对肝细胞癌的侵袭和转移具有调节作用, 为了进一步证明我们的结论, 我们将在肝细胞癌其他细胞系和肝细胞癌动物模型中进一步验证, 但我们的研究结果仍可提示 Grp78 可能是抑制肝细胞癌侵袭和转移的一个有效靶点。

参考文献(References)

- [1] 苏荣健, 李 贞, 程留芳, 等. 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, *细胞生物学杂志*, 2007, 29(6): 889-894
- [2] Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, *et al.* Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference, *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(3): 936-948
- [3] Khyrul WA, LaLonde DP, Brown MC, *et al.* The integrin-linked kinase regulates cell morphology and motility in a rho-associated kinase-dependent manner, *J Biol Chem*, 2004, 279(52): 54131-54139
- [4] Zhang Y, Li L, Wang Y, *et al.* Downregulating the expression of heparanase inhibits the invasion, angiogenesis and metastasis of human hepatocellular carcinoma, *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 358(1): 124-129
- [5] Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, *et al.* FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly, *Nat Cell Biol*, 2004, 6(2): 154-161
- [6] Kokkinos MI, Wafai R, Wong MK, *et al.* Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer — observations *in vitro* and *in vivo*, *Cells Tissues Organs*, 2007, 185(1-3): 191-203
- [7] Overall CM, Kleinfeld O. Tumour microenvironment-opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy, *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(3): 227-239
- [8] Mitra SK, Schlaepfer DD. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells, *Curr Opin Cell Biol*, 2006, 18(5): 516-523

Effects of Grp78 Knockdown on the Adhesion and Extracellular Matrix Degradation in Hepatocellular Carcinoma

Rong-Jian Su*^Δ, Zhen Li^{1Δ}, Hong-Dan Li, Hui-Juan Song, Liu-Fang Cheng^{1*}

(Key Lab of Cell and Molecular Biology Drug & Development of the Education Department of Liaoning Province, the Central Laboratory of Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, China; ¹Department of Gastroenterology of the General Hospital of Chinese Liberation Army, Beijing 100583, China)

Abstract To investigate the roles of Grp78 in the invasion of hepatocellular carcinoma, Grp78 level in human HCC cell line BEL7402 was down-regulated by siRNA, the status of cell adhesion, cell spreading, and extracellular matrix degradation was explored. The results showed that Grp78 knockdown in BEL7402 cells promoted tumor cell adhesion and inhibited the spreading of tumor cells. We also explored whether Grp78 knockdown in BEL7402 cells affected extracellular matrix degradation by examining the expressions and activities of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). The results revealed that Grp78 knockdown decreased the expressions and activities of MMPs. Furthermore, We also found that Grp78 knockdown in BEL7402 cells down-regulated the phosphorylation levels of c-jun, a MMP-2 and MMP-9 specific transcription factor. Thus, we concluded that Grp78 knockdown in BEL7402 cells inhibited tumor cell invasion by promoting the adhesion of tumor cells to extracellular matrix and inhibition of the degradation of extracellular matrix.

Key words Grp78; hepatocellular carcinoma; cell adhesion; cell spreading; extracellular matrix degradation

Received: August 7, 2009 Accepted: November 11, 2009

This work was supported by the Doctoral Initiation Foundation of Liaoning Province (No.20061074) and the Key Lab Research Project of the Education Department of Liaoning Province (No.2008S142)

^ΔThese two authors contributed equally to this work

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

Liu-Fang Cheng: Tel: 86-10-666937706, E-mail: liufang_cheng@yahoo.com.cn