

葡萄糖调节蛋白 78 反义核酸对 HEK293 细胞粘附和迁移的影响

苏荣健^{1*} 李宏丹¹ 宋慧娟 魏 嘉

(辽宁医学院科学实验中心, 辽宁省教育厅细胞分子生物学与新药开发重点实验室, 锦州 121001)

摘要 为了研究葡萄糖调节蛋白 78 (Grp78)对细胞迁移和粘附的影响,应用 Grp78 反义寡核苷酸(Grp78 AS-ODN)处理人胚肾细胞 HEK293,对细胞的迁移和粘附特性进行分析。结果发现应用 Grp78 反义核酸处理细胞可以抑制 HEK293 细胞的迁移,促进细胞与底物间的粘附。进一步研究发现,应用 Grp78 反义核酸处理细胞可以促进粘着斑的形成,并引起小 GTPase RhoA 在细胞膜和细胞浆中的重新分布。上述结果表明,特异性下调 Grp78 的表达可以抑制细胞迁移,促进细胞与底物间的粘附。

关键词 葡萄糖调节蛋白 78; HEK293; 细胞迁移; 细胞粘附

葡萄糖调节蛋白 78 (Grp78)是内质网合成的一种分子伴侣,属于热休克蛋白 70 (Hsp70)家族,由 44 kDa 的氨基端 ATPase 结构域和 20 kDa 的羧基端多肽结合结构域组成。Grp78 驻留在内质网网腔中,与未折叠或错误折叠的蛋白质结合^[1],在蛋白质的折叠过程中发挥重要作用^[2]。大量研究表明 Grp78 是一种多功能蛋白质,参与细胞生长、细胞分化、细胞生存等许多重要的细胞活动^[3,4]。

细胞粘附和细胞迁移是细胞重要的生命活动,在肿瘤细胞的侵袭和转移^[5]、胚胎发育的器官建成过程中具有重要的作用^[6]。在肿瘤细胞中,细胞粘附和细胞迁移表现为肿瘤细胞的侵袭和转移,目前已有报道指出 Grp78 参与肿瘤的侵袭和转移的调控,特异性下调 Grp78 的表达可以抑制肿瘤的侵袭和转移^[7]。在胚胎发育过程中,细胞粘附和细胞迁移的异常可以导致胚胎发育和器官建成的异常,甚至胚胎死亡^[6]。

为了探讨 Grp78 对细胞粘附和细胞运动的影响,我们在人胚肾细胞 HEK293 细胞中应用反义寡核苷酸技术特异性下调 Grp78 的表达,研究 Grp78 对人胚肾细胞 HEK293 粘附和迁移的影响。

1 材料与方法

1.1 Grp78 反义寡核苷酸(AS-ODN)的合成

Grp78 反义寡核苷酸和对照序列由上海生工生物公司合成,序列与人 Grp78 翻译起始位点互补。序列如下: Grp78 AS-ODN: CAC CAG GGA GAG CTT CAT (CAC、CAT 硫代磷酸化修饰);对照: CAC CAG GGA

GAG GTT GAT (CAC、GAT 硫代磷酸化修饰)^[8]。

1.2 细胞培养与 Grp78 AS-ODN 转染

人胚肾细胞系 HEK-293 由中国医科大学发育生物学教研室馈赠,培养于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养液中;为下调 Grp78 的表达,采用阳离子脂质体转染试剂转染 Grp78 AS-ODN,每孔在 EP 管中加入 300 μl 无血清培养基 DMEM,转染试剂 20 μl,轻弹混匀。加入对照的 DNA 和 Grp78 AS-ODN,终浓度为 1 μmol/L,轻轻混匀,室温静置 30 min,吸去六孔板的培养基,加入 450 μl DMEM,将转染复合物逐滴加入六孔板中混匀。37 °C,5% CO₂ 培养 4~6 h,再加入 750 μl 含血清 20% 的 DMEM,温育过夜,作用 24 h^[8]。

1.3 细胞粘附实验

Grp78 AS-ODN 转染如上所述,转染后 24 h,胰蛋白酶消化细胞,PBS 漂洗 3 次,用无血清培养液稀释至 2×10⁵ 个/ml,接种于 10 μg/ml 纤粘连蛋白包被、1% BSA 封闭的 96 孔板中,每孔 100 μl,37 °C 温育 1 h。取出培养板,PBS 漂洗 3 次,10% 甲醛固定 15 min,1% 结晶紫染色 20 min,0.4% Tween-20 溶解过夜,与酶标仪上与 595 nm 测定吸光度值,计算平均值,结果以均值加减 1 倍标准差表示。

收稿日期: 2009-01-08 接受日期: 2009-04-07

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

¹ 对本文有同等贡献

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

1.4 Shake-off 实验

Grp78 AS-ODN 转染如上所述, 转染后 24 h, 胰蛋白酶消化细胞, PBS 漂洗 3 次, 用无血清培养液稀释至 2×10^5 个/ml, 接种于 $10 \mu\text{g/ml}$ 纤粘连蛋白包被、1% BSA 封闭的 96 孔板中, 每孔 $100 \mu\text{l}$, 37°C 温育 1 h。取出培养板, 至于震荡器上 300 r/min 震荡 3 次, 每次 10 s, PBS 漂洗 3 次, 10% 甲醛固定 15 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, 计算平均值, 结果以均值加减 1 倍标准差表示。

1.5 划痕法

在 35 mm 的培养皿中接种 2×10^5 个 HEK293 细胞, 待细胞汇合成细胞单层后, Grp78 AS-ODN 转染, 24 h 后用灭菌移液器 ($10 \mu\text{l}$) 头在细胞单层上小心的做一个划痕, 用 PBS 彻底漂洗 3 次, 加入无血清培养液继续培养, 于 24 h 后观察并比较划痕愈合情况^[9]。

1.6 Transwell 法

Grp78 AS-ODN 转染如上所述, 转染后 24 h, 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 24 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, 10% 甲醛固定 10 min, Hoechst 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。

1.7 荧光法观察微丝

Grp78 AS-ODN 转染如上所述, 转染后 24 h, 胰蛋白酶消化细胞, PBS 漂洗 3 次, 用无血清培养液稀释至 2×10^5 个/ml, 接种于用 $50 \mu\text{g/ml}$ 多聚左旋赖氨酸处理过的盖玻片上, 继续培养 12 h, 取出盖玻片, PBS 漂洗, 10% 甲醛固定 30 min, 0.2% Triton-X-100 透 5 min, 10% BSA 室温封闭 30 min, 罗丹明标记的毒伞素室温染色 1 h, PBS 漂洗, 95% 甘油封片, 荧光显微镜下观察。

1.8 免疫荧光技术

Grp78 AS-ODN 转染如上所述, 转染后 24 h, 胰蛋白酶消化细胞, PBS 漂洗 3 次, 用无血清培养液稀释至 2×10^5 个/ml, 接种于用 $10 \mu\text{g/ml}$ 的纤粘连蛋白包被的盖玻片上, 继续培养 12 h, 取出盖玻片, PBS 漂洗, 10% 甲醛固定 30 min, 0.2% Triton-X-100 通透 5 min, 10% BSA 封闭 30 min, 加一抗[小鼠抗人粘着斑蛋白(vinculin), Santa Cruz 公司]室温温育 1 h, PBS 漂洗, 二抗(FITC 标记的羊抗小鼠 IgG, 中山公司)室

温温育 1 h, PBS 漂洗, 95% 甘油封片, 荧光显微镜下观察。

1.9 细胞膜的分离及细胞浆蛋白的提取

Grp78 AS-ODN 转染如上所述, 转染后 24 h, 用冰预冷的 PBS 漂洗 3 次, 用细胞刮刀收获细胞, $2\ 000 \text{ g}$ 离心 15 min 收集细胞, 为了提取细胞膜蛋白, 向沉淀中加入 $500 \mu\text{l}$ 匀浆介质, 冰上匀浆 35~40 次, 将液体转移到一个干净的 EP 管中, $1\ 700 \text{ g}$, 4°C 离心 30 min, 将上清液移入另一个离心管中, 向沉淀中加入 $20 \mu\text{l}$ SDS 上样缓冲液, 吹打混匀, 作为细胞膜样品。上清液中加入 2 倍体积用冰预冷的无水乙醇, 4°C 过夜, $12\ 000 \text{ g}$ 4°C 离心 30 min, 向沉淀中加入 SDS 上样缓冲液, 作为细胞浆样品^[10]。

1.10 Western 印迹

BCA 法测定蛋白质含量, 取上述细胞膜样品与细胞浆蛋白样品各 $20 \mu\text{g}$ 上样于 10% 的 SDS-PAGE 至溴酚蓝出胶, 用 Bio-Rad 半干转印仪 25 V 转膜 30 min, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗 ($1:1\ 000$ 稀释兔抗人 RhoA、羊抗人 Grp78, Santa Cruz 公司) 杂交 2 h, 二抗 ($1:5\ 000$ 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG, 兔抗羊 IgG, 中山公司) 温育 1 h, ECL (Pierce 公司) 显色, Chemi-genius 凝胶分析系统分析灰度值。

1.11 统计学分析

应用 Spss 11.0 统计学分析软件, 进行 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为存在显著性差异。

2 结果

2.1 Grp78 AS-ODN 转染效果及特异性分析

为了验证 Grp78 AS-ODN 对 Grp78 表达的影响, 检测了 Grp78 AS-ODN 转染细胞中 Grp78 的表达水平, 结果表明 Grp78 AS-ODN 转染可以下调 Grp78 的表达; 为验证 Grp78 AS-ODN 的特异性, 我们同时检测了 Grp94 的表达, 结果表明 Grp78 AS-ODN 转染对 Grp94 的表达没有影响(图 1)。

2.2 特异性下调 Grp78 的表达可以促进细胞与底物间粘附的形成

为了研究 Grp78 对细胞粘附能力的影响, 应用细胞粘附实验和 Shake-off 实验对细胞与底物粘附形成情况及粘附强度进行研究。细胞粘附实验的结果显示 Grp78 AS-ODN 转染细胞 A_{595} 值为 0.71, 对照细胞 A_{595} 值为 0.38, 明显低于 Grp78 AS-ODN 处理的细胞。Shake-off 实验的结果显示 Grp78 AS-ODN 转染细胞 A_{595} 值为 0.53, 而对照细胞 A_{595} 值为 0.12, 这些

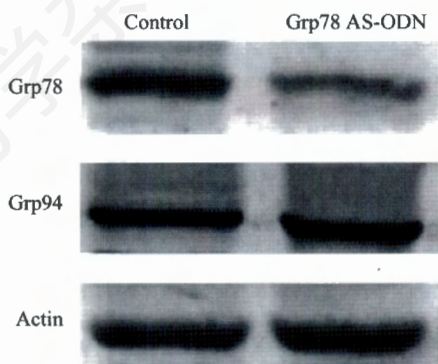


Fig.1 Transfection of Grp78 AS-ODN specifically down-regulates Grp78 expression in HEK293 cells

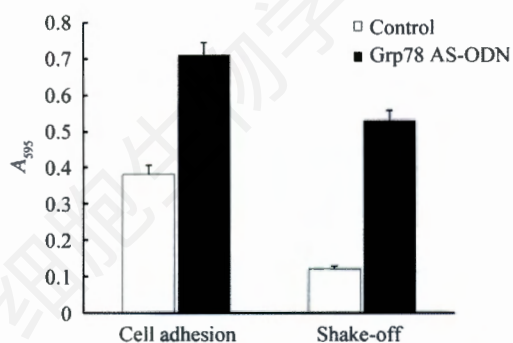


Fig.2 Transfection of Grp78 AS-ODN promotes the formation of cell adhesions and enhances the intensity of cell-substrate interaction

表明特异性下调 Grp78 可以促进细胞与底物粘附的形成和粘附的强度(图 2)。

2.3 特异性下调 Grp78 的表达可以抑制 HEK293 细胞的迁移

为了研究 Grp78 对细胞迁移的影响,应用细胞划痕法和 Transwell 法检测 Grp78 AS-ODN 转染细胞的迁移能力,划痕法结果显示划痕 24 h 后, Grp78 AS-ODN 转染细胞创口愈合速度明显低于对照细胞(图 3)。Tranwell 实验的结果显示接种后 24 h, Grp78 AS-ODN 转染细胞每低倍视野(100×)为 16 个,明显低于对照细胞(每低倍视野 35 个)(图 4)。这些表明特异性下调 Grp78 表达可以抑制 HEK293 细胞的迁移。

2.4 特异性下调 Grp78 的表达可以促进 HEK293 应力纤维的形成

为了观察 Grp78 对细胞骨架的影响,应用毒伞素染色观察 Grp78 AS-ODN 转染细胞微丝的排列。结果显示 Grp78 AS-ODN 处理的细胞皮质部位观察到明显的应力纤维,而对照细胞微丝主要分布于细胞边缘(图 5)。这表明特异性下调 Grp78 的表达可以促进

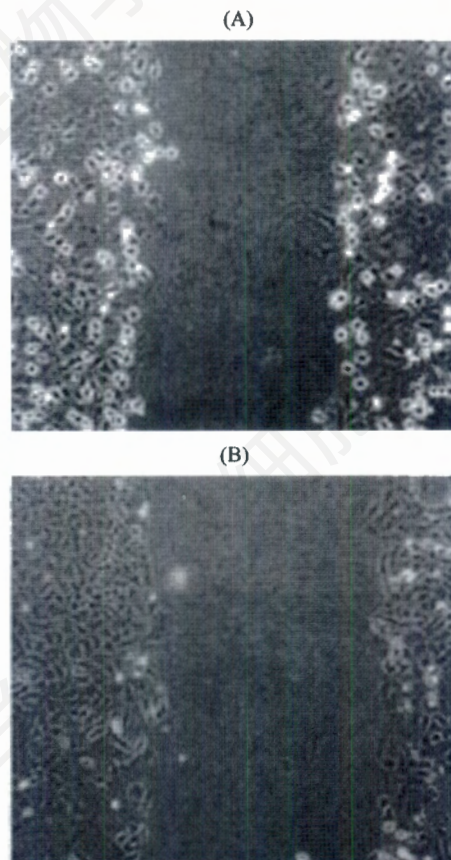


Fig.3 Transfection of Grp78 AS-ODN inhibits the motility of HEK293 cells by wound healing assay

A: control cells; B: Grp78 AS-ODN transfected cells.

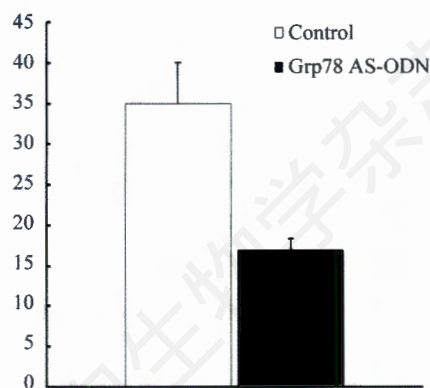


Fig.4 Transfection of Grp78 AS-ODN inhibits the motility of HEK293 cells by Transwell assay

HEK293 应力纤维的形成。

2.5 特异性下调 Grp78 的表达可以导致粘着斑蛋白分布的改变

为了研究 Grp78 对粘着复合体形成的影响,应用免疫荧光技术检测了粘着斑蛋白在 Grp78 AS-ODN 转染细胞中的分布,免疫荧光实验的结果显示在

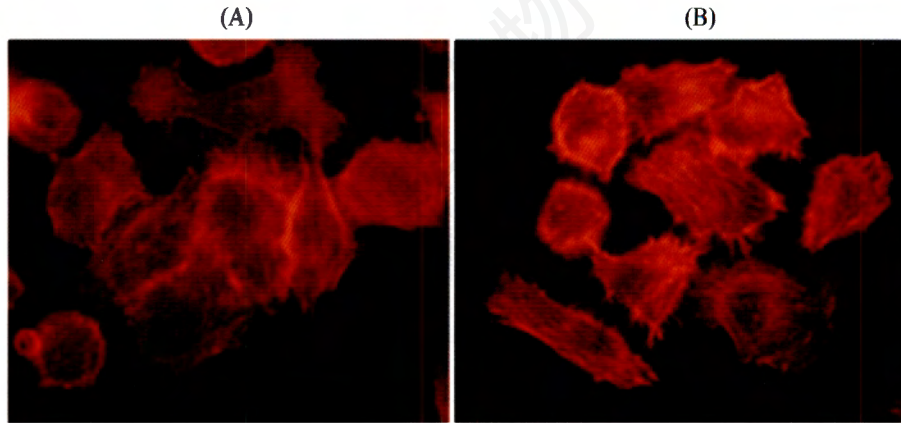


Fig.5 Transfection of Grp78 AS-ODN promotes stress fibers formation in HEK293 cells
A: control cells; B: Grp78 AS-ODN transfected cells.

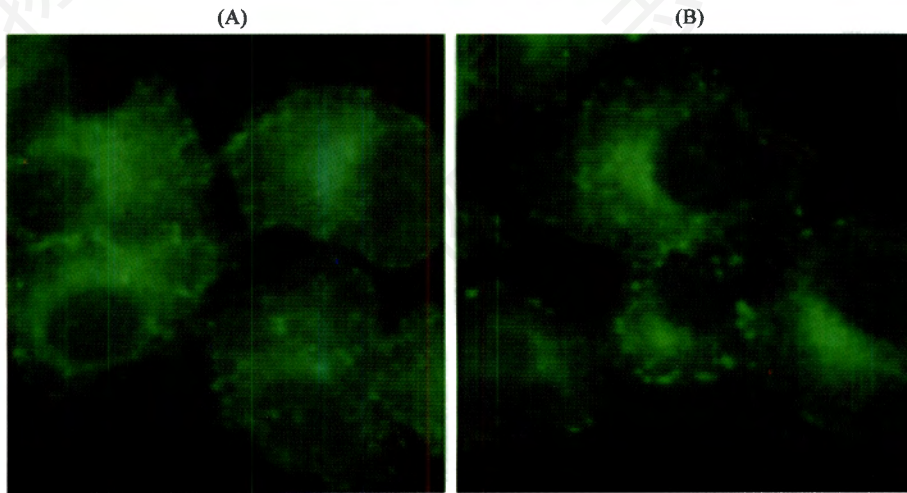


Fig.6 Transfection of Grp78 AS-ODN causes the redistribution of vinculin
A: control cells; B: Grp78 AS-ODN transfected cells.

Grp78 AS-ODN转染细胞中粘着斑蛋白在细胞边缘成簇状分布(图6)。这提示特异性下调Grp78表达可以促进细胞与底物间粘着复合体的形成。

2.6 Grp78 AS-ODN 转染导致 Grp78 在细胞膜和细胞浆的重新分布

为了检测膜蛋白分离的效果,应用Western印迹检测了膜蛋白样品和细胞浆蛋白样品中Grp78的表达,结果发现在细胞浆蛋白样品中Grp78的表达水平较高,而在细胞膜蛋白样品中,Grp78的表达水平很低(图7)。为了检测Grp78对RhoA分布的影响,应用免疫印迹技术检测了Grp78 AS-ODN转染细胞膜蛋白样品和细胞浆蛋白样品中RhoA的分布。结果显示,RhoA在Grp78 AS-ODN处理细胞中RhoA在细胞膜样品中的含量明显高于对照细胞(图7A)。对RhoA在细胞膜和细胞浆表达的分析结果显示,对照

组细胞中 $m/c=0.53$,而在Grp78AS-ODN处理细胞中 $m/c=1.08$,明显高于对照组细胞(图7B)。这表明,特异性下调Grp78的表达可以引起RhoA在细胞中分布的改变。

3 讨论

为了探讨Grp78对细胞粘附和细胞迁移的影响,应用与Grp78 mRNA的翻译起始序列互补的反义寡核苷酸序列处理细胞,特异性的下调Grp78的表达,并对下调后HEK293细胞的迁移与粘附特性进行研究。

本实验应用细胞粘附实验、shake-off实验对HEK293细胞的粘附特性进行研究,结果表明特异性下调Grp78可以促进HEK293细胞与底物的粘附形成,增加粘附的强度。这说明特异性下调Grp78不仅可以促进细胞与底物的粘附,而且还可以促进粘着复合

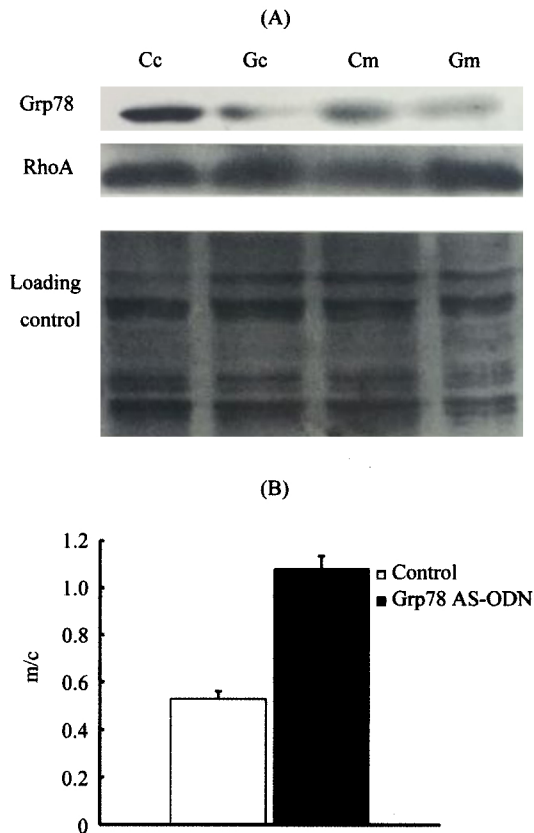


Fig.7 Transfection of Grp78 AS-ODN causes the redistribution of RhoA from cytoplasm to membrane

A: the expression status of RhoA in the cytoplasm and membrane sample in control cells and Grp78 AS-ODN transfected cells. The membrane was stained with Ponceau S as loading control. Cc: the cytoplasm sample of control cells. Gc: the cytoplasm sample of Grp78 AS-ODN transfected cells. Cm: the membrane sample of control cells. Gm: the membrane sample of Grp78 AS-ODN transfected cells. B: diagram show of RhoA expression in the cytoplasm and membrane sample in control cells and Grp78 AS-ODN transfected cells.

体的成熟。还应用划痕法和 Transwell 法检测了特异性下调 Grp78 对 HEK293 细胞迁移的影响。结果表明特异性下调 Grp78 可以抑制 HEK293 细胞的迁移。

对细胞骨架的研究发现 Grp78 AS-ODN 转染细胞在细胞皮质可见明显的应力纤维, 以上结果表明, 特异性下调 Grp78 可以促进应力纤维的形成。应用免疫荧光技术发现粘着斑蛋白在 Grp78 AS-ODN 转染细胞边缘呈簇状分布, 这些结果进一步说明特异性下调 Grp78 可以促进细胞与底物间粘着复合体的形成。

RhoA 是一种小 GTPase, 可以调节应力纤维的形成^[11]。其在细胞内有两种形式, 即与 GTP 结合的活性形式和与 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内^[12]。为了研

究特异性下调 Grp78 是否可以影响 RhoA 在细胞的分布, 我们分离细胞膜样品, 并应用 Western 印迹技术对细胞膜样品 RhoA 进行半定量研究, 结果发现在 Grp78 AS-ODN 处理细胞的膜样品中 RhoA 的表达量明显高于对照细胞, 而对细胞浆样品的检测结果显示 RhoA 的表达量少于对照细胞。故而, 特异性下调 Grp78 可以引起 RhoA 的分布改变。

综上所述, 特异性下调 Grp78 可以促进 HEK293 细胞与底物的粘附, 抑制细胞迁移, RhoA 在该过程中可能具有重要的作用。我们后续的研究将进一步探讨 Grp78 影响 RhoA 活性的分子机制, 以期阐明 Grp78 促进细胞与底物相互作用, 抑制细胞迁移的分子机制。

参考文献(References)

- [1] Lass A, Kujawa M, McConnell E, *et al.* Decreased ER-associated degradation of α -TCR induced by Grp78 depletion with the SubAB cytotoxin, *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(12): 2865-2879
- [2] Feaver RE, Hastings NE, Pryor A *et al.* GRP78 upregulation by atheroprone shear stress via p38-, α 2 β 1-dependent mechanism in endothelial cells, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(8): 1534-1541
- [3] Luo S, Mao C, Lee B, *et al.* GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development, *Mol Cell Biol*, 2006, 26(15): 5688-5697
- [4] 苏荣健, 陈誉华, 宋今丹. 非折叠蛋白质应答对人胚肾细胞 293A 迁移特性的影响, *细胞生物学杂志*, 2003, 25(6): 380-384
- [5] Pyrko P, Schönthal AH, Hofman FM, *et al.* The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas, *Cancer Res*, 2007, 67(20): 9809-9816
- [6] Hao L, Vassena R, Wu G, *et al.* The unfolded protein response contributes to preimplantation mouse embryo death in the DDK syndrome, *Biol Reprod*, 2009, 80(5): 944-953
- [7] 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
- [8] Miyake H, Hara I, Arakawa S *et al.* Stress protein Grp78 prevents apoptosis induced by calcium ionospheres, ionomycin, but not by glycosylation inhibitor, tunicamycin, in human cancer cells, *J Cell Biochem*, 2000, 77(3): 396-408
- [9] Yarrow JC, Perlman ZE, Westwood NJ *et al.* A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods, *BMC Biotechnol*, 2004, 4: 21
- [10] Parfenova H, Robert A, Neff III *et al.* Cerebral vascular endothelial heme oxygenases: Expression, Localization, and Activation by glutamate, *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 281 (6): C1954-C1963
- [11] Watarai M, Kamata Y, Kozaki S *et al.* rho, a small GTP-binding protein, is essential for Shigella invasion of epithelial cells, *J*

Exp Med, 1997, 185(2): 281-292
[12] Houssa B, de Widt J, Kranenburg O, *et al.* Diacylglycerol

kinase θ binds to and is negatively regulated by active RhoA, *J Biol Chem*, 1999, 274(11): 6820-6822

The Effects of Grp78 AS-ODN on the Adhesion and Migration of HEK 293 Cells

Rong-Jian Su^{1*}, Hong-Dan Li¹, Hui-Juan Song, Jia Wei

(Central Laboratory of Liaoning Medical College, Key Lab of Cell and Molecular Biology & Drug Development of the Education Department of Liaoning Province, Jinzhou 121001, China)

Abstract To explore the effect of Grp78 on cell migration and adhesion, we treated HEK239 cells with Grp78 AS-ODN to knock down the expression of Grp78, and analyzed the status of cell migration and cell adhesion. We found that Grp78 knockdown inhibits the migration of HEK293, and enhances the adhesion between cells and substrate. Further study revealed Grp78 AS-ODN treatment promotes the formation of adhesion plaque, and causes the redistribution of GTPase RhoA on cellular membrane and in cytoplasm. Taken together, specific down-regulation of Grp78 could inhibit cell migration and enhance adhesion between cell and substrate in HEK293 cells.

Key words Grp78; HEK293; migration; adhesion

Received: January 8, 2009 Accepted: April 7, 2009

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

¹Contribute equally to this article

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