

封闭 EFNA2 基因表达对肝癌细胞 HepG2 的转移和运动的抑制作用 *

刘冀龙¹ 李彦娟² 刘继光³ 李 岩³ 董新舒^{4△}

(1 北京市垂杨柳医院普外科 北京 100022 2 北京友谊医院超声科 北京 100050 ;

3 佳木斯大学 黑龙江 佳木斯 154007 ;4 哈尔滨医科大学附属第三临床医院腹部外科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的 构建 Ephrin-A2(EFNA2)基因的干扰 RNA 重组腺病毒 并观察其对肝癌细胞 HepG2 转移能力的影响。方法 合成 EFNA2 基因的干扰 RNA 片段 用基因重组技术构建于腺病毒载体 pAD-X 经 293 细胞包装得到高滴度重组腺病毒 pAEFNA2/siRNA 并用 real-time PCR 进行 EFNA2 基因表达的验证。将重组腺病毒 pAEFNA2/siRNA 感染 HepG2 细胞 48h 后用 transwell 小室法检测病毒对 HepG2 细胞侵袭和运动能力的影响。结果 经验证病毒正确构建 且 HepG2 细胞感染病毒 pAEFNA2/siRNA 后 48 小时的 real-time PCR 检测结果未见到有 EFNA2 基因的表达。病毒感染后 transwell 小室可见 HepG2 细胞的侵袭和运动能力均受到显著的抑制(分别为 105 ± 12 v.s. 21 ± 7 cells/孔和 194 ± 22 v.s. 39 ± 11 $P < 0.01$)。结论 成功构建了重组 EFNA2siRNA 腺病毒 并观察到封闭 EFNA2 对肝癌细胞 HepG2 的侵袭和运动均有抑制作用。

关键词 EFNA2 ;重组腺病毒 ;肝癌 HepG2 细胞 ;侵袭和运动

中图分类号 R735.7 文献标识码 A 文章编号 :1673-6273(2012)25-4841-04

Blocking EFNA2 Expression Inhibits Metastasis Ability of Human Liver Cancer Cell Line HepG2*

LIU Ji-long¹, LI Yan-juan², LIU Ji-guang³, LI Yan³, DONG Xin-shu^{4△}

(1 Department of General Surgery, Chuiyangliu Hospital Beijing 100022; 2 Department of Ultrasonography, Youyi Hospital, Beijing, 100050;

3 Jiamusi University, Hei Longjiang Jiamusi 154007; 4 Department of General Surgery, Third Hospital of Harbin Medical University, Harbin, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To reconstruct Ephrin-A2(EFNA2) siRNA adenovirus vector and to observe its effect on the metastasis ability of liver cancer cell line HepG2. **Methods:** EFNA2 siRNA was constructed into adenovirus vector pAD-X by gene recombination technique, which was transformed into 293 packaged cell for high titer adenovirus. Real-time PCR was applied to detect EFNA2 siRNA gene expression. Transwell cabin assay was used to observe changes of invasion and motor ability of HepG2 cells transfected with reconstruction adenovirus. **Results:** The finding of digestion was coincided with expected. No EFNA2 gene expression was detected in transfected HepG2 cells with real-time PCR. And the invasion and motor abilities of transfected HepG2 cells were significantly inhibited in transwell cabin assay (105 ± 12 v.s. 21 ± 7 cells/well, 194 ± 22 v.s. 39 ± 11 $P < 0.01$). **Conclusion:** Recombinant adenovirus was correctly reconstructed and it could inhibit invasion and motor abilities of transfected HepG2 cells.

Key words: EFNA2 siRNA; Reconstruction adenovirus; Liver cancer HepG2 cell; Invasion and motor

Chinese Library Classification: R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)25-4841-04

前言

研究表明 EFNA2 基因在肝癌组织中的表达明显高于癌旁组织 此外 侵犯肝门静脉的肝癌组织 其 EFNA2 基因表达增加更显著 表明该基因的表达很可能在肝癌的进展中发挥重要作用^[1]。为进一步研究 EFNA2 基因在肝癌的转移中的作用 本实验中构建了 EFNA2 siRNA 重组腺病毒 然后通过 transwell 小室法观察其对肝癌细胞 HepG2 侵袭和运动的影响 以探讨 EFNA2 基因在肝癌转移中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 基因与序列 在 Genbank 中 EFNA2 基因 ID 为 1943, mRNA 登录号为 NM_001405.3, 用专业软件 Turbo si-Designer 设计和确认有效、特异性强的 siRNA 序列 经 BLAST 筛选后得到最佳条件的 siRNA, 序列如下 5'-UCAGCCGU-UCAGGCAAUCA-3'。

1.1.2 细胞系 人胚肾 293T 细胞和肝癌细胞 HepG2 均购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

1.1.3 主要试剂 pDNR-CMV 和 pLP-Ade-X-CMV 载体(BD Clontech) 10xP-cre 重组系统(BD Clontech); 限制性内切酶(NEB); 脂质体 Lipofectamine2000(invitrogen); RPMI1640 细

* 基金项目 国家自然科学基金资助项目(30170828)

作者简介 刘冀龙(1968-) 男 医学硕士 副主任医师 专业方向 消化道肿瘤的外科治疗 电话 010-67718822-2095

△通讯作者 董新舒(1946-) 男 教授 博士生导师 专业方向 结直肠肿瘤的综合治疗 电话 0451-82576777

(收稿日期 2012-04-08 接受日期 2012-04-30)

胞培养基(Gibco) ;胎牛血清(FBS Hyclone) ,0.25%EDTA- 胰蛋白酶(Invitrogen) ,Transwell 小室(24 孔 ,孔径 5.0 μ m ,Corning)。

1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒载体 pLP-Ade-antiEFNA2 的构建 将 EFNA2 siRNA 片段连接于克隆载体 pDNR-CMV 构成 pDNR-EFNA2 siRNA , 然后应用 loxP/Cre 系统将其与腺病毒载体 pLP-Ade-X-CMV 连接 构成重组腺病毒 pLP-Ade-EFNA2/siRNA(pAEFNA2/siRNA)。通过质粒电泳、EFNA2siRNA 的 PCR 及 XhoI-EcoRI 双酶切方法进行鉴定。筛选阳性的重组腺病毒质粒用 PacI 酶切成线性 并纯化备用。

1.2.2 重组腺病毒 pAEFNA2/siRNA 的包装、扩增及滴度测定 用脂质体 Lipofectamine2000TM 把线性的 pAEFNA2/siRNA 载体转染 293 包装细胞 然后继续于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 约两周后收集病毒, 重复感染 293 包装细胞 1~2 次以扩增重组腺病毒。将最终收集到的病毒液采用 法测定滴度 并于 -80 $^{\circ}$ C 冻存。

1.2.3 Real-time PCR 检测重组腺病毒 EFNA2 基因的表达 将病毒液转染人肝癌 HepG2 细胞 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养 48h 后 提取细胞总 RNA 逆转录合成 cDNA , 以 real-time PCR 检测 EFNA2 的表达。

1.3 重组腺病毒 pAEFNA2/siRNA 对肝癌 HepG2 细胞转移和运动的影响

1.3.1 细胞培养 人肝癌细胞 HepG2 常规复苏后于 10%胎牛血清、100IU/ml 青霉素和 100IU/ml 链霉素的 RPMI 1640 完全培养液中 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 用 0.25%胰酶消化、传代 至对数生长期 将细胞消化、计数 以 3.0×10^5 个 / 孔接种于 6 孔板 24h 后待细胞 90%以上融合, 将重组腺病毒 pAEFNA2/siRNA 以 1.0×10^5 PFU/ 孔感染细胞 备用用于下一步试验。

1.3.2 细胞侵袭实验 将 Matrigel 均匀涂于孔径 8 μ m 的 24 孔 transwell 小室内表面上 , 体积为 50 μ L/ 孔 , 同时外表面均匀涂抹 10 μ L 的 LN。室温放置 30min 后成胶 然后置紫外灯下照射过夜。在实验前再次按照上面的方法成胶。

在病毒感染细胞 48h 后消化、计数 将细胞以 2.0×10^5 个 /mL 接种到 transwell 小室 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养 4h 后 甲醇固定 1min 后进行 HE 染色。在高倍镜下计数 5 个视野的穿膜细胞数 然后计算平均细胞数。

1.3.3 细胞运动能力实验 将 LN 以 10 μ L/ 孔均匀地铺在 transwell 小室下表面上 ; 将病毒感染 48h 后的细胞进行消化、计数 以 2.0×10^5 个接种到小室内 培养 4h 后取出 按照 1.3.2 的方法进行固定、染色和计数。

1.3.4 统计学分析 实验结果以平均值 $\pm$ 标准差表示 , 应用 SPSS13.0 进行统计分析 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 重组腺病毒 pAEFNA2/siRNA 的鉴定和检测

2.1.1 酶切与 PCR 法检测 以 pAEFNA2/siRNA 重组病毒载体为模板 PCR 扩增 EFNA2 siRNA 基因片段 用 3%的琼脂糖凝胶进行电泳 显示得到小于 500 bp 片断。SalI/HindIII 双酶切得到两条带 , 一条带约 5kb , 另一条带与 PCR 产物大小相同(图 1) 与预期相同。

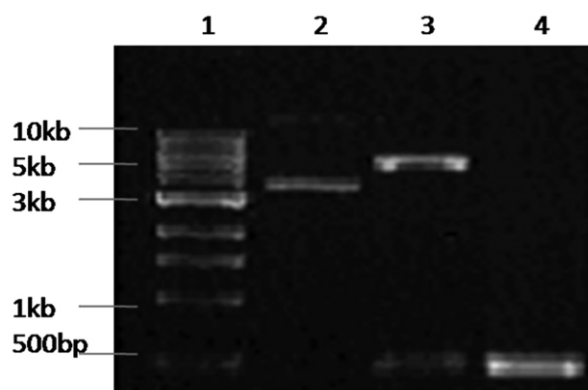


图 1 重组腺病毒 pAEFNA2/siRNA 的鉴定

其中 lane1 为 1kb DNA marker lane2 为 pAEFNA2/siRNA 质粒对照 , lane3 为质粒的 SalI/HindIII 双酶切 lane4 为质粒的 EFNA2/siRNA 的 PCR 结果

Fig.1 Identification of recombinant adenovirus pAEFNA2/siRNA

In the above figure, lane 1 is for 1kb DNA marker, lane 2 for pAEFNA2/siRNA plasmid control, lane 3 for SalI/HindIII digestion of pAEFNA2/siRNA plasmid, lane 4 for PCR result of pAEFNA2/siRNA plasmid

2.1.2 细胞的病理效应 (CPE) 的检测 在重组腺病毒 pAEFNA2/siRNA 首轮转染 10 天后 镜下可见 293T 细胞出现空斑、细胞呈球状肿大等现象 待重复感染后三天 镜下可见细胞表现出腺病毒感染典型病变(图 2)。

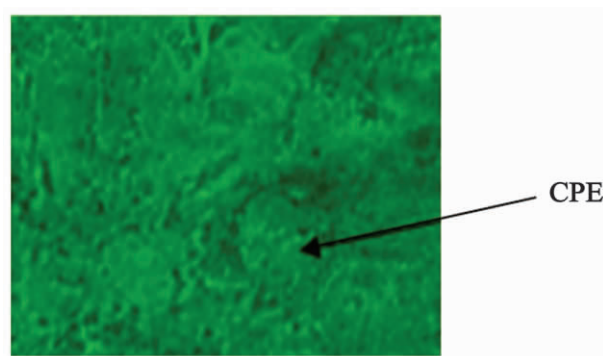


图 2 腺病毒包装过程中的 CPE 现象

Fig.2 CPE appearance during the packaging adenovirus

2.1.3 重组腺病毒滴度测定结果 采用 法 测得病毒滴度如下 : TC50=108.1pfu/mL= 1.3×10^8 pfu/mL

2.1.4 real-time PCR 检测 EFNA2 基因的表达 病毒感染 48h 后的 HepG2 细胞 消化、离心 裂解后进行逆转录 然后以逆转录合成的 cDNA 第一链作为模板 进行 real-time PCR 检测 EFNA2 基因的表达情况。结果可见空白对照组有 EFNA2 基因表达 , 而感染了重组腺病毒 pAEFNA2/siRNA 的细胞无 EFNA2 基因表达。

2.2 重组腺病毒对人肝癌细胞 HepG2 转移能力的影响

2.2.1 细胞侵袭能力的变化 小室经固定和 HE 染色后 高倍镜下可见病毒感染组穿过基底膜的细胞数明显少于空白对照组 (105 ± 12 v.s. 21 ± 7 cells/ 孔 $P < 0.01$ 图 3)。

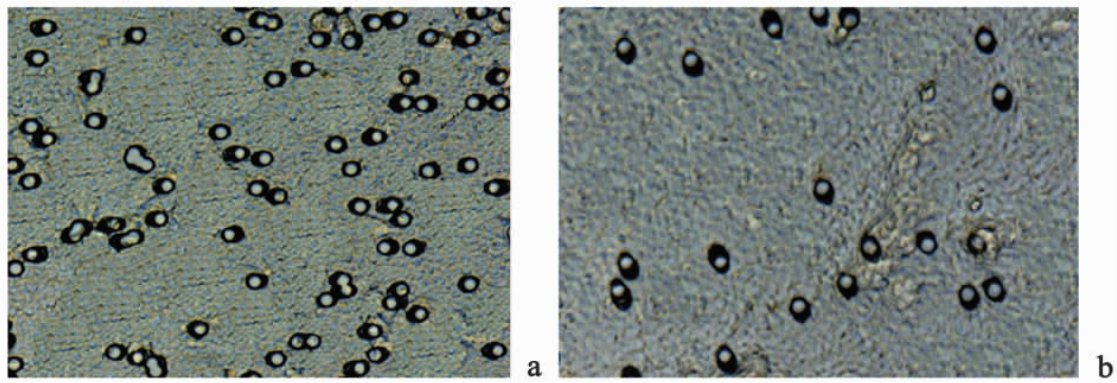


图3 重组腺病毒 pAEFNA2/siRNA 对 HepG2 细胞侵袭能力的影响(200 倍)

其中 a 为 HepG2 空白对照组 b 为腺病毒感染组

Fig.3 Effect of recombinant adenovirus pAEFNA2/siRNA on HepG2 invasion(200×)

In the above, a is for HepG2 control group, and b for adenovirus infection group

2.2.2 细胞运动能力的变化 染色后高倍镜下可见,转染组穿过小室浸润的细胞数明显少于空白对照组 (194± 22 v.s. 39± 11 $P<0.01$ 图4)。

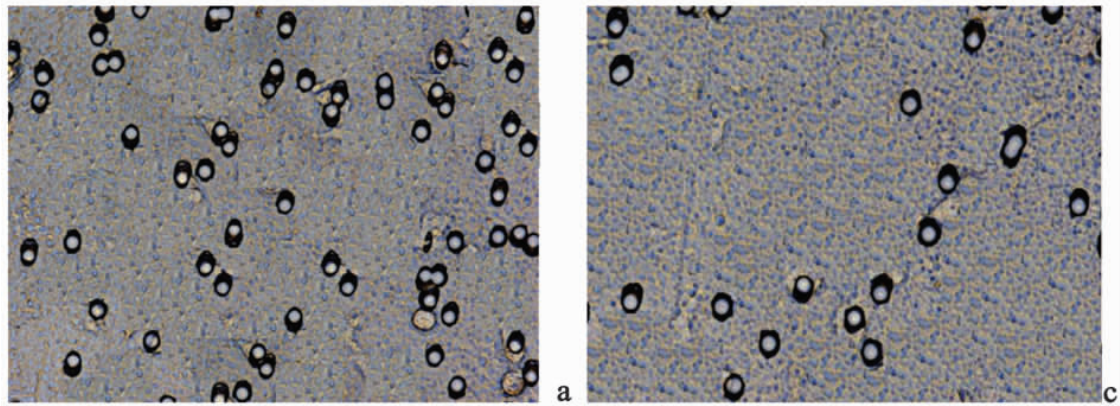


图4 重组腺病毒 pAEFNA2/siRNA 对 HepG2 细胞运动能力的影响(200 倍)其中 a 为空白对照组 b 为病毒感染组

Fig.4 Effect of recombinant adenovirus pAEFNA2/siRNA on HepG2 motion ability(200×)

In the above, a is for control group, and b for adenovirus infection group.

3 讨论

EFNA2(ephlin-A2)是我国科学家最近发现的一个新基因^[2]。研究发现,EFNA2 基因在肝癌组织中的表达明显高于癌旁组织,提示该基因的表达很可能在肝癌的病理进展中起到了重要作用^[3-6]。此外,在小鼠模型中 EFNA2 基因能通过抑制肝癌细胞的凋亡而提高肝癌细胞的致瘤性及远端转移的能力。此外,受 EFNA2 基因调控的蛋白激酶的活化及相关信号通路的激活,在肝癌细胞的凋亡中发挥重要作用^[7-13]。以上结果提示,EFNA2 基因在肝癌发生发展的病理过程中起重要作用,EFNA2 基因很可能成为治疗肝癌的一个潜在药物靶点^[14,15]。此外,RNA 干扰技术也是近年来生物学领域中应用越来越广泛的一种新的研究技术,通过对目标靶基因的封闭而阻止了其表达,从而阻断了靶基因的下游功能,对研究靶基因在相关信号通路及与其它基因或蛋白的相互作用关系提供了简便快捷的方法^[16]。但是如何把靶基因的干扰 RNA(siRNA)高效的导入活体细胞内而

不会影响细胞的正常生理代谢和功能,这一直是研究人员努力的重点。目前,将 siRNA 片段连接在病毒载体上,如腺病毒、腺相关病毒或逆转录病毒,然后将其感染细胞或动物,已经成为科研人员常用的一种研究手段。

虽然目前有越来越多的研究集中在 EFNA2 基因在肝癌中的功能,但是对于该基因在肝癌的转移过程中具体起到的作用,尚未得到广泛的认可,而目前的研究也多是以临床组织样本为研究对象。因此,为了进一步证实 EFNA2 基因在肿瘤转移中的作用,本研究构建了重组腺病毒 pAEFNA2/siRNA,同时选择了人肝癌细胞株 HepG2 作为研究对象,来观察在 HepG2 细胞内封闭了 EFNA2 基因后肿瘤细胞的侵袭和运动功能变化,以期为进一步的深入研究提供实验基础。

在本实验中构建的重组腺病毒 pAEFNA2/siRNA,经鉴定其构建正确并可以在真核细胞中发挥作用。腺病毒的构建成功,可以大大提高 EFNA2 siRNA 片段导入 HepG2 细胞的效率,为后期真核细胞中 EFNA2 基因功能的研究提供了坚实的

实验基础。重组腺病毒 pAEFNA2/siRNA 感染肝癌细胞 HepG2 后, 可以见到 EFNA2 基因表达明显减少甚至消失, 同时 HepG2 细胞的侵袭和运动能力显著受到抑制。表明封闭肝癌细胞 EFNA2 表达, 可抑制癌细胞的侵袭和转移, 这与其他研究中肝癌的 EFNA2 高表达与肝癌转移呈正相关的研究结果相一致。但是肿瘤的转移过程中有众多的细胞因子和蛋白酶类的参与, 那么封闭 EFNA2 基因的表达, 可能会影响到哪种抑制肿瘤转移的途径, 调节了哪个或哪些细胞因子或蛋白酶的活性, 进而影响肿瘤的转移, 这些问题都尚待进一步的研究证实, 也将是我们下一步研究的重点。

参考文献(References)

- [1] EphrinA2 是促进肝癌生长转移的相关基因 [J]. 生物医学工程与临床, 2010, (1): 26
EphrinA2 is the gene which can increase the growth and metastasis of liver carcinoma [J]. Biomedical Engineering and Clinical Medicine, 2010, (1): 26
- [2] 我国科研人员发现促进肝癌生长转移相关基因 [J]. 中国医药导报, 2009, (35): 74
Chinese scientist find the gene which can increase the growth and metastasis of liver carcinoma [J]. China Medical Herald, 2009, (35): 74
- [3] Van Geer MA, Brevoord D, Kuhlmann KF, et al. A fiber modified adenovirus vector that targets to the EphrinA2 receptor reveals enhanced gene transfer to ex vivo pancreatic cancer[J]. Int J Oncol, 2010, 35(1): 233-244
- [4] Feng YX, Zhao JS, Li JJ, et al. Liver cancer: EphrinA2 promotes tumorigenicity through Rac1/Akt/NF-kappaB signaling pathway 120[J]. Hepatology, 2010, 51(2):535-544
- [5] Bowden TA, Aricescu AR, Nettleship JE, et al. Structural plasticity of eph receptor A4 facilitates cross-class ephrin signaling[J]. Structure, 2009, 17(10): 1386-1397
- [6] Irie N, Takada Y, Watanabe Y, et al. Bidirectional signaling through ephrinA2-EphA2 enhances osteoclastogenesis and suppresses osteoblastogenesis[J]. J Biol Chem, 2009, 284(21): 14637-14644
- [7] Peuckert C, Wacker E, Rapus J, Levitt P. Adaptive changes in gene expression patterns in the somatosensory cortex after deletion of ephrinA5[J]. Bolz J. Mol Cell Neurosci, 2008, 39(1):21-31
- [8] Rapti M, Atkinson SJ, Lee MH, Trim A, Moss M, Murphy G. The isolated N-terminal domains of TIMP-1 and TIMP-3 are insufficient for ADAM10 inhibition[J]. Biochem J, 2008, 411(2):433-439
- [9] Kojima T, Chung TY, Chang JH, Sayegh R, Casanova FH, Azar DT. Comparison of EphA receptor tyrosine kinases and ephrinA ligand expression to EphB-ephrinB in vascularized corneas[J]. Cornea, 2007, 26(5):569-578
- [10] Kimura J, Katahira T, Araki I, Nakamura H. Possible role of Hes5 for the rostrocaudal polarity formation of the tectum[J]. Dev Growth Differ, 2004, 46(3):219-227
- [11] Fox BP, Kandpal RP. Invasiveness of breast carcinoma cells and transcript profile: Eph receptors and ephrin ligands as molecular markers of potential diagnostic and prognostic application [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 318(4):882-892
- [12] Nakamura H, Sugiyama S. Polarity and laminar formation of the optic tectum in relation to retinal projection [J]. J Neurobiol, 2004, 59(1):48-56
- [13] Sugiyama S, Funahashi J, Nakamura H. Antagonizing activity of chick Grg4 against tectum-organizing activity[J]. Dev Biol, 2000, 221(1):168-180
- [14] Dütting D, Handwerker C, Drescher U. Topographic targeting and pathfinding errors of retinal axons following overexpression of ephrinA ligands on retinal ganglion cell axons [J]. Dev Biol, 1999, 216(1): 297-311
- [15] Engrailed defines the position of dorsal di-mesencephalic boundary by repressing diencephalic fate. Araki I, Nakamura H[J]. Development, 1999, 126(22):5127-5135
- [16] Hornberger MR, Dütting D, Ciossek T, et al. Modulation of EphA receptor function by coexpressed ephrinA ligands on retinal ganglion cell axons[J]. Neuron, 1999, 22(4):731-742