

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.07.004

小 RNA 干扰降低 COX-2 表达对乳腺癌细胞趋化和侵袭能力的影响

赵 云¹, 李媛媛², 张宝刚¹, 刘秀静¹, 徐 滨¹, 赵一诺¹, 刘雨清¹, 王 琳¹

Influences of Disruption of Cyclooxygenase-2 by Using RNA Interference on Invasiveness and Chemotaxis of Breast Cancer Cells

ZHAO Yun¹, LI Yuan-yuan², ZHANG Bao-gang¹, LIU Xiu-jing¹, XU Bin¹, ZHAO Yi-nuo¹, LIU Yu-qing¹, WANG Lin¹

1. Department of Pathology, Weifang Medical University, Weifang 261053, China, 2. Laboratory of Morphology

Corresponding Author: LIU Yu-qing, E-mail: yuqingliu89@hotmail.com

Abstract: Objective To investigate the role of COX-2 in invasiveness and chemotaxis of the highly malignant breast cancer cell line MDA-MB-231 using RNA interference. **Methods** MDA-MB-231 cells were transfected with small RNA interference plasmids to disrupt COX-2 expression. COX-2 mRNA level was detected using RT-PCR. The *in vitro* invasion ability of MDA-MB-231 cells was examined using matrigel invasion assay. **Results** The results of restriction endonuclease digestion electrophoresis and DNA sequencing showed that the interferenced plasmid pSUPER-siCOX-2 was constructed successfully. The transfectants were named as MDA-MB-231/pSUPER-basic and MDA-MB-231/pSUPER-siCOX-2, respectively. The results of RT-PCR showed that the levels of COX-2 mRNA of MDA-MB-231/pSUPER-siCOX-2 was obviously reduced at 48 hours after transfection, compared to MDA-MB-231/pSUPER-basic cells. The COX-2-reduced MDA-MB-231 cells showed decreased chemotaxis ability compared with the control cells ($P < 0.01$). The invasion assay showed prominent differences between the COX-2-reduced MDA-MB-231 cells and the control cells ($P < 0.01$). **Conclusion** Using RNA interference, the reduction of COX-2 expression can obviously inhibit the invasion and chemotaxis of the highly malignant breast cancer cell line MDA-MB-231.

Key words: Cyclooxygenase-2; Breast neoplasms; Neoplasm invasiveness; Chemotaxis; RNA interference

摘要:目的 探讨利用小 RNA 干扰技术降低 COX-2 表达对高度恶性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞趋化和侵袭能力的影响。**方法** 应用合成的小 RNA 干扰质粒转染 MDA-MB-231 细胞株,采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 COX-2 mRNA 的表达。通过趋化运动实验检测细胞的运动能力;体外侵袭实验检测细胞的侵袭能力。**结果** 限制性内切酶的酶切结果和 DNA 测序结果显示成功构建了干扰质粒 pSUPER-siCOX-2,转染后的细胞株分别命名为 MDA-MB-231/pSUPER-basic(对照组)和 MDA-MB-231/pSUPER-siCOX-2(实验组)。转染后 48 h,与 MDA-MB-231/pSUPER-basic 细胞相比,MDA-MB-231/pSUPER-siCOX-2 细胞的 COX-2 mRNA 表达水平下降($P < 0.01$);COX-2 减低的乳腺癌细胞的趋化运动能力比对照组细胞降低($P < 0.01$);COX-2 减低的乳腺癌细胞侵袭并穿透 Matrigel 膜基质的细胞数量比对照组细胞少($P < 0.01$)。**结论** 利用 siRNA 干扰技术降低 COX-2 表达对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株的趋化和侵袭能力具有明显的抑制作用。

关键词: 环氧合酶-2; 乳腺肿瘤; 侵袭; 趋化性运动; RNA 干扰

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)07-0745-04

收稿日期:2010-09-28; 修回日期:2011-01-25

基金项目:山东省医药卫生科技发展计划资助项目(2009HW106)

作者单位:1. 261053 山东潍坊,潍坊医学院病理学教研室,2. 形态学实验室

通信作者:刘雨清, E-mail: yuqingliu89@hotmail.com

作者简介:赵云(1984-),女,硕士,主要从事肿瘤病理学研究

0 引言

环氧合酶-2(Cyclooxygenase-2, COX-2)是一种诱导性前列腺素生物合成酶,属环氧合酶系,是前列腺素合成过程中的重要限速酶。目前国内外研究表明:COX-2 可以通过多种途径促进乳腺癌的趋化、侵袭和转移;而抑制 COX-2 表达可以抑制肿瘤

细胞生长、浸润和转移^[1]。本实验选用乳腺癌高表达 COX-2 的 MDA-MB-231 细胞株,通过小 RNA 干扰技术成功构建干扰 COX-2 表达的大肠杆菌质粒载体,转染 MDA-MB-231 细胞,通过趋化运动实验和体外侵袭等实验探讨降低 COX-2 表达与乳腺癌细胞趋化和侵袭能力的关系,从而为临床预防和控制乳腺癌的侵袭和转移提供准确靶点和时机。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 限制性核酸内切酶 *Bgl* II 和 *Hind* III、T4 DNA 连接酶等购自大连宝生物有限公司;AMV 一步法 RT-PCR 扩增试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司 BBI 产品;细胞培养产品购自美国 Hyclone 公司;lipofectamin2000 购自 invitrogen 公司;细胞培养板和 Transwell 小室购自 BD Bioscience 公司;Matrigel 膜基质购自北京威格拉斯生物技术有限公司;0.1% fibronectin、HEPES 和 BSA 购自美国 Sigma 公司;人 EGF 购自美国 R&D systems 公司。

1.1.2 序列特异性 COX-2 引物及内参照 β -actin 的设计与合成 COX-2 引物的正向引物:5'-CGA GGT GTA TGT ATG AGT GT-3',反向引物:5'-AGT GGG TAA GTA TGT AGT GC-3',产物长度为 157 bp;内参照 β -actin 的正向引物:5'-GTA AAG ACC TCT ATG CCA ACA-3',反向引物:5'-CTG GAA GGT GGA CAG TGA G-3',产物长度为 314 bp。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.2 质粒的构建

根据 GeneBank(access number: NM000963) 人 COX-2 基因的已知序列,寻找符合特征的靶序列,化学合成 DNA 寡核苷酸链。设计的 shRNA DNA 模板链如下:

5'-GATCCCCAACTGCTCAACACCGGAAT TAGAGCATTCCGGTGTGAGCAGTTTTTTT GAA-3'; 5'-AGCTTTCAAAAAAAGTCTCAACACCGGAATGCTCTAATTCCGGTGTGAGCA GTTGGG-3'。shRNA 模板链通过寡核苷酸的磷酸化、配对退火后形成双链 DNA,与 pSUPER-basic 质粒连接转化 *E. coli* DH5 α ,挑取单菌落提取质粒,经酶切、测序鉴定插入片段序列,重组的质粒命名为 pSUPER-siCOX-2。

1.3 细胞培养、转染及转染细胞株的建立

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株购于美国 ATCC 细胞库(American type culture collection);

所用培养液为 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液。取对数生长期的细胞接种于六孔细胞培养板中,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 24 h,当细胞达到 90%~95%融合时,分别转染 pSUPER-basic 质粒和 pSUPER-siCOX-2 质粒,按需要每孔加入 4 μ g 质粒和 10 μ l lipofectamine 2000,转染所用培养液不含胎牛血清及双抗,转染 6 h,换 10%血清 RPMI1640 培养液,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中继续培养。转染细胞株分别为对照组细胞 MDA-MB-231/pSUPER-basic 和实验组细胞 MDA-MB-231/pSUPER-siCOX-2。

1.4 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测

分别提取 MDA-MB-231/pSUPER-basic 细胞和 MDA-MB-231/pSUPER-siCOX-2 细胞的总 RNA,反应条件为:40℃ 30 min, 94℃ 2 min; 94℃ 15 s, 58℃ 30 s, 72℃ 90 s, 40 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶电泳,于凝胶成像分析系统中分析,取 COX-2/ β -actin 的比值作为 mRNA 的相对表达量。

1.5 趋化运动实验

将对照组细胞和实验组细胞分别重悬于 BM (RPMI1640, 0.1BSA, 25 mM HEPES)中,细胞终浓度为 0.5 \times 10⁶/ml。Transwell 小室 8 μ m 滤膜先用 fibronectin 包被,之后在 24 孔 Transwell 小室下室中加入不同浓度趋化因子,每孔 800 μ l。再将细胞悬液加入 Transwell 小室中,每孔 250 μ l。然后将 Transwell 小室放入 37℃、5%CO₂ 培养箱,3 h 后,将滤膜上层细胞刮去,洗涤并染色,400 \times 显微镜视野下观察计数。每孔随机取三个视野,其和作为该孔细胞数。趋化指数是指不同趋化因子 EGF 浓度孔的趋化细胞数与相应的无 EGF 孔趋化细胞数的比值。结果用 3 个复孔的平均趋化指数 \pm 标准差来表示。

1.6 体外癌细胞侵袭能力检测

应用 8 μ m 滤膜 Transwell 小室,用前铺上 Matrigel 膜基质并干燥,将 COX-2 减低的乳腺癌细胞和对照细胞 250 μ l 细胞悬液(5 \times 10⁵ cells/ml)加入小室上室。下室加入 800 μ l BM。5% CO₂, 37℃ 培养 28 h。然后取出培养板用棉签擦净小室上室面的人工基底胶和细胞,下室面用甲醇固定 10 min,苏木精染色,置 400 倍光学显微镜下观察,5 个高倍镜视野,计数小室下室面的细胞数即为穿透人工基底的细胞数,每个实验重复 3 次,取平均数作为实验结果。

1.7 统计学方法

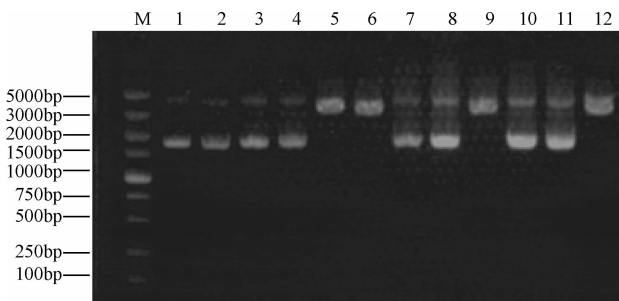
实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据资料用 SPSS 13.0

软件进行方差分析或 *t* 检验分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pSUPER-siCOX-2 真核表达载体的构建及鉴定

化学合成的双链 DNA 连接到 pSUPER 载体的 H1 启动子下游的 *Bgl* II 和 *Hind* III 位点之间, H1 启动子启动下游的序列转录形成 siRNA。对重组质粒进行 *Bgl* II 和 *Hind* III 单酶切鉴定, 由于未重组的质粒含有 *Bgl* II 酶切位点, 因此能够被 *Bgl* II 酶切, 而插入目的基因片段后, *Bgl* II 酶切位点被取代, 无法被 *Bgl* II 酶切, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分析显示, 重组成功的质粒 pSUPER-siCOX-2 无法被 *Bgl* II 酶切, 但可被 *Hind* III 酶切, 说明该重组质粒完全符合设计要求, 见图 1。同时测序结果也证实目的序列已成功插入到预计位点, 重组质粒构建成功。



M: marker; 1,4,7,10; recombinant plasmids; 2,5,8,11; pSUPER-COX-2 cut with *Bgl* II; 3,6,9,12; pSUPER-COX-2 cut with *Hind* III; 7,10; two positive pSUPER-siCOX-2 clones

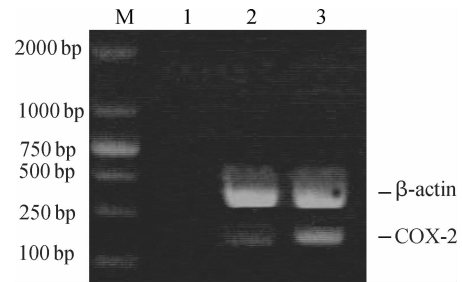
图 1 pSUPER-siCOX-2 经 *Bgl* II 和 *Hind* III 酶切后鉴定结果

Figure 1 Results of identification of pSUPER-siCOX-2 with *Bgl* II and *Hind* III

2.2 实验组细胞 COX-2 mRNA 表达的变化

将 COX-2 及内参 β -actin 的 RT-PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 与 DNA Marker D 进行比较。COX-2 目的基因产物长度为 157 bp, 内参 β -actin 目的基因产物长度为 314 bp, 见图 2。经凝胶图像分析仪对条带进行分析, 读取其吸光度 OD 值, 以 COX-2 平均 OD 值/ β -actin 平均 OD 值表示 COX-2 mRNA 的相对表达量, 从而对 COX-2 mRNA 的表达强度作半定量分析。MDA-MB-231/pSUPER-siCOX-2 细胞和 MDA-MB-231/pSUPER-basic 细胞 COX-2 mRNA 的相对表达量分别为 (0.346 ± 0.064) 和 (0.895 ± 0.087) , 差异具有统计学意义 (P

< 0.05)。



M: marker; 1: blank; 2: MDA-MB-231/ pSUPER-siCOX-2 cells; 3: MDA-MB-231/pSUPER-basic cells

图 2 RT-PCR 检测 COX-2 mRNA 的表达情况
Figure 2 The levels of COX-2 mRNA detected by RT-PCR

2.3 降低 COX-2 表达抑制了 MDA-MB-231 细胞的迁移能力

我们应用 24 孔的 Transwell 小室趋化运动模型, 检测了 MDA-MB-231、MDA-MB-231/pSUPER-basic、MDA-MB-231/pSUPER-siCOX-2 细胞的趋化运动能力。在 EGF 诱导 3 h 后, MDA-MB-231 和 MDA-MB-231/pSUPER-basic 细胞具有很强的趋化运动能力, 并且呈典型的“钟形”曲线 (趋化运动具有最适趋化因子 EGF 浓度), EGF 浓度增高或降低, 细胞的趋化指数均降低, 见图 3。趋化运动实验显示: MDA-MB-231 和 MDA-MB-231/pSUPER-basic 细胞具有相似的趋化运动能力, MDA-MB-231/pSUPER-siCOX-2 细胞趋化运动能力比对照组细胞明显降低 ($P < 0.01$)。总之, 实验结果清楚的显示: 应用小 RNA 干扰技术减低 COX-2 的表达降低了 EGF 诱导的 MDA-MB-231 细胞的定向迁移能力。

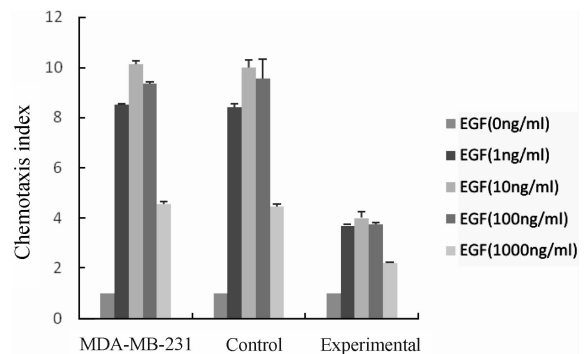


图 3 MDA-MB-231、对照组细胞和实验组细胞不同 EGF 浓度趋化指数图

Figure 3 Comparison of EGF-induced chemotaxis of parental MDA-MB-231, MDA-MB-231/pSUPER-basic and MDA-MB-231/pSUPER-siCOX-2 cells

2.4 降低 COX-2 表达减弱了细胞的侵袭能力

本实验利用 Transwell 侵袭实验模拟体内细胞分泌基质金属蛋白酶(MMPs)降解基质胶,计数进入 Transwell 小室的细胞量可反映肿瘤细胞的侵袭能力,用 10 ng/ml 的 EGF 作为趋化因子吸引细胞穿透基质胶和滤膜。该侵袭实验的结果显示:以 EGF 作为趋化因子,MDA-MB-231/pSUPER-siCOX-2 细胞的侵袭能力比对照细胞的侵袭能力显著降低($P < 0.01$),见图 4。

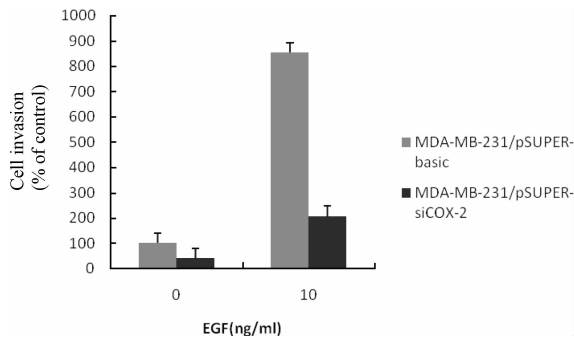


图 4 实验组细胞与对照组细胞侵袭能力比较

Figure 4 Comparison of disruption of COX-2 by the siRNA impaired invasion into matrigel in the MDA-MB-231/pSUPER-basic and MDA-MB-231/pSUPER-siCOX-2 cells

3 讨论

近来研究表明,COX-2 不仅与乳腺癌的发生和发展有关,而且参与了乳腺癌的趋化和侵袭。

趋化运动可引起肿瘤细胞的扩散,在乳腺癌的转移机制中起着非常关键的作用。Ma 等^[2]发现 COX-2 产物 PGE2 通过 EP 受体介导细胞趋化作用,EP2 和 EP4 与腺苷酸活化酶激活 cAMP 水平升高有关,进而作用于下游 PKA 和 Akt。另外 EP4 与 PGE2 结合可直接作用于 PI3K 并促进 ERK1/2 生成,进而促进肿瘤侵袭和转移。

转染成功后,通过细胞趋化运动实验、体外癌细胞侵袭能力检测等实验,验证了 COX-2 在介导乳腺癌细胞趋化、侵袭和转移中的作用。其中细胞趋化运动实验验证了 COX-2 减低的乳腺癌细胞的趋化运动能力比对照组细胞降低($P < 0.01$);体外癌细胞侵袭能力检测说明 COX-2 减低的乳腺癌细胞侵袭并穿透 Matrigel 膜基质的细胞数量比对照组细胞少($P < 0.01$)。以上实验结果显示:COX-2 的减低严重影响了乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力。

用 siRNA 技术干扰 MDA-MB-231 细胞株使之缺乏 COX-2,结果其减少了几个致癌标志基因 mRNA 表达,包括 IL-11、JAG1、CXCR4 和 MMP-1 等,

进而减少了乳腺癌的侵袭和转移,其中 IL-11 为乳腺癌骨转移的标志物^[3];JAG1 的表达与乳腺癌的预后差有关^[4];CXCR4 是一种与肿瘤微环境调控有关的趋化因子受体^[5];MMP-1 是乳腺癌细胞侵袭中负责基质降解的酶。这与我们的研究结果相一致,正因为缺乏了这些因子,所以 COX-2 减低的乳腺癌细胞趋化和侵袭能力明显下降。Stasinopoulos 等^[6]通过 siRNA 技术降低 MDA-MB-231 细胞株 COX-2 表达,发现抑制了低分化转移性乳腺癌的转移并且拖延了肿瘤的发生。Pan 等^[7]通过培养乳腺癌 MCF-7 与 MDA-MB-231 细胞株,利用小 RNA 干扰技术和免疫印迹等技术证明 COX-2 通过 EP2/EP4 信号通路上调 CCR7 表达进而促进乳腺癌淋巴结转移。近来研究表明,选择性 COX-2 抑制剂(如塞来昔布)^[8]、EP4 药理拮抗剂^[2]等抑制乳腺癌侵袭和转移效果明显。随着 COX-2 调控作用机制的进一步探索和研究,将进一步明确其结构和功能。本实验进一步证实 COX-2 在介导乳腺癌细胞侵袭和转移方面的作用,为转移性乳腺癌的预防和治疗提供有力的依据。

参考文献:

- [1] Nieves-Alicea R, Colburn NH, Simeone AM, et al. Programmed cell death 4 inhibits breast cancer cell invasion by increasing tissue inhibitor of metalloproteinases-2 expression[J]. Breast Cancer Res Treat, 2009, 114(2): 203-209.
- [2] Ma X, Kundu N, Rifat S, et al. Prostaglandin E receptor EP4 antagonism inhibits breast cancer metastasis[J]. Cancer Res, 2006, 66(6):2923-2927.
- [3] Kang Y, He W, Tulley S, et al. Breast cancer bone metastasis mediated by the Smad tumor suppressor pathway[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(39):13909-13914.
- [4] Reedijk M, Odorcic S, Chang L, et al. High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival[J]. Cancer Res, 2005, 65(18):8530-8537.
- [5] Orimo A, Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumorpromoting cell type[J]. Cell Cycle, 2006, 5(15): 1597-1601.
- [6] Stasinopoulos I, O'Brien DR, Wildes F, et al. Silencing of cyclooxygenase-2 inhibits metastasis and delays tumor onset of poorly differentiated metastatic breast cancer cells[J]. Mol Cancer Res, 2007, 5(5):435-442.
- [7] Pan MR, Hou MF, Chang HC, et al. Cyclooxygenase-2 Up-regulates CCR7 via EP2/EP4 Receptor Signaling Pathways to Enhance Lymphatic Invasion of Breast Cancer Cells[J]. J Biol Chem, 2008, 283(17): 11155-11163.
- [8] Farooqui M, Li Y, Rogers T, et al. COX-2 inhibitor celecoxib prevents chronic morphine-induced promotion of angiogenesis, tumour growth, metastasis and mortality, without compromising analgesia[J]. Br J Cancer, 2007, 97(11):1523-1531.

[编辑:刘红武;校对:贺文]