

MTA1影响子宫内膜癌细胞侵袭迁移的体外研究

张山岭^{①②} 郝权^① 孙和熙^① 冯慧^① 鞠宝辉^① 田菁^①

摘要 目的:通过 siRNA(小干扰RNA)抑制 MTA1(metastasis associated gene 1)在子宫内膜癌细胞系 HEC-1-A 中的表达,研究 MTA1 对子宫内膜癌侵袭转移能力的影响,并探索抑制子宫内膜癌侵袭转移的潜在靶点。**方法:**通过脂质体介导方法,将特异性 siRNA 表达载体 psilencer2.0-MTA1-siRNA 转染入人子宫内膜癌细胞系 HEC-1-A,以转染无关序列组 psilencer2.0-neg 及 non-transfected 组做对照,采用 RT-PCR 以及 Western blot 检测特异性 siRNA 对 MTA1 mRNA 及蛋白表达的抑制效果。应用划痕损伤实验及 Transwell 实验检测 MTA1 对子宫内膜癌细胞侵袭转移能力的影响,以及体外实验验证应用 RNA 干扰技术以 MTA1 为靶点抑制子宫内膜癌细胞侵袭及转移的可行性。**结果:**RT-PCR 及 Western blot 结果显示,siRNA 成功抑制子宫内膜癌细胞系 HEC-1-A 中 MTA1 的表达。划痕损伤实验显示转染后划痕损伤愈合明显减慢,迁移率明显降低,Transwell 体外侵袭实验结果显示,转染后穿膜细胞百分率显著降低($P < 0.05$)。**结论:**体外实验显示,应用脂质体介导的 RNA 干扰技术,可有效抑制 MTA1 在子宫内膜癌细胞中的表达,使之生长、侵袭及转移能力均受到抑制,提示 MTA1 在子宫内膜癌的侵袭转移过程中发挥重要作用,可能成为子宫内膜癌基因治疗的潜在靶点。

关键词 转移相关基因-1 子宫内膜癌 siRNA 侵袭转移

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.10.003

Effects of MTA1 on Invasion and Migration of Endometrial Carcinoma Cells

Shanling ZHANG, Quan HAO, He-xi SUN, Hui FENG, Baohui JU, Jing TIAN

Correspondence to: Jing TIAN; E-mail: Tianjing1980doctor@126.com

¹Department of Gynecology, ²Central Lab, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China

Abstract Objectives: This study investigates the effects of MTA1 (metastasis-associated gene 1) on the invasion and migration of endometrial carcinoma cell line HEC-1-A by depressing the expression of MTA1 using specific small interfering RNA (siRNA)-targeting MTA1. In addition, this study explores the potential target inhibition in the invasion and migration of endometrial carcinoma. **Methods:** The specific siRNA expression vector psilencer 2.0-MTA1-siRNA was transfected into the HEC-1-A cells through liposome. The groups of unrelated-sequence expression vector psilencer2.0-neg and non-transfected cells were considered as controls. The expression of mRNA and protein of MTA1 were detected using RT-PCR and Western blot assay, respectively. Invasion and migration abilities were evaluated using the scrape wound healing assay and transwell assay. The feasibility of inhibiting the invasion and migration of endometrial carcinoma was verified using RNA interference-targeting MTA1 *in vitro*. **Results:** The RT-PCR and Western blot analysis showed that the expression of mRNA and protein of MTA1 were depressed effectively. The scrape wound healed more slowly and the relative percentage of HEC-1-A cells invading into Matrigel decreased in the siRNA-transfected group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The *in vitro* experiments have shown that siRNA targeting MTA1 can depress the expression of MTA1 mRNA and protein. Hence, the ability of invasion and migration in HEC-1-A cells can be inhibited. MTA1 plays an important role in the invasion and migration of endometrial carcinoma and may become a new potential target in endometrial carcinoma therapy.

Keywords MTA1; Endometrial carcinoma; siRNA; Invasion and migration

恶性肿瘤的发生及侵袭转移过程是一个多步骤、多个基因参与的复杂演进过程,目前已发现许多基因与肿瘤转移有关,其中肿瘤转移相关基因(metastasis associated gene 1, MTA1)是近年来发现的与许多恶性肿瘤侵袭转移密切相关的基因,但其对子宫内膜癌细胞的侵袭转移的影响目前尚未见阐明。本课题组前期研究^[1]已经证实 MTA1 在子宫内膜癌

组织中过表达,且与子宫内膜癌的分期及肌层浸润深度呈正相关,与肿瘤细胞分化程度呈负相关。本研究通过 siRNA 靶向抑制子宫内膜癌细胞系 HEC-1-A 中 MTA1 基因的表达,进一步观察 MTA1 对子宫内膜癌侵袭转移能力的影响,以及以 MTA1 为靶点体外实验验证应用 RNA 干扰技术抑制子宫内膜癌细胞侵袭及转移的可行性。

作者单位:①天津医科大学附属肿瘤医院妇科肿瘤科,天津市肿瘤防治重点实验室;②中心实验室(天津市 300060)

通信作者:田菁 tianjingdoctor1980@126.com

1 材料与方法

1.1 主要试剂与抗体

胎牛血清及DMEM培养基、脂质体Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司); 总RNA提取试剂盒购、RT-PCR试剂盒; MTA1鼠单克隆抗体(Abcam公司); β -actin鼠单克隆抗体及兔抗鼠二抗(北京中杉金桥生物技术公司); 抑制MTA1表达的特异性siRNA靶序列为5'-GACCCTGCTGGCAGATAAA-3', 表达载体psilencer2.0-MTA1-siRNA及用于对照的无关序列siRNA表达载体psilencer2.0-neg由本课题组构建。MTA1正向引物: 5'-AGCGTCACCCTGCTCAACGAGACCG-3', MTA1反向引物: 5'-GGTTGGCCTCTGATCAGACCCTC-3', β -actin正向引物: 5'-CCTGGGCA TGGAGTCCTGTG-3', β -actin反向引物: 5'-AGGGCC CGGACTCGTCATAC-3'均由上海吉玛生物技术公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与转染 实验分为3组: 转染psilencer2.0-MTA1-siRNA组、阴性对照组psilencer2.0-neg(与特异性的MTA1-siRNA序列有相同的组成, 但与mRNA无明显的同源性, 以排除非特异性影响), 以及non-transfected组。HEC-1-A细胞系置于含10%胎牛血清的DMEM培养基中, 37℃、5%CO₂孵箱中培养至转染前一天, 细胞生长状态良好, 达80%~90%后, 用0.1%胰酶消化后按照细胞 5×10^5 个/孔, 接种于6孔板中, 每组3个复孔。待细胞贴壁良好, 细胞铺展面积达30%~40%时进行转染。转染48 h后收取细胞。

1.2.2 RT-PCR检验转染前后各组细胞MTA1基因mRNA表达水平的变化 总RNA提取试剂盒提取各组细胞中的mRNA, 琼脂糖凝胶电泳检测mRNA提取质量, 紫外分光光度计检测mRNA浓度, 合成cDNA, 按照试剂盒说明书进行RT-PCR, 同时以 β -actin cDNA作为对照。RT-PCR产物电泳结果经凝胶成像系统分析。重复3次。

1.2.3 Western blot检验转染前后各组细胞蛋白水平的变化 提取细胞总蛋白, 测定蛋白含量后, 取样品进行凝胶电泳, 电转到PVDF膜上用5%脱脂奶粉封闭; TBST洗膜4次, 5 min/次; 加入MTA1鼠单克隆抗体(用TBST按1:1 000稀释), 4℃摇床轻摇过夜; TBST洗膜4次, 5 min/次; 加入1:3 000稀释的二抗, 室温孵育2 h; TBST洗膜4次, 5 min/次, 加入增强化学发光试剂, 作用3 min, 曝光。重复3次。

1.2.4 Transwell体外侵袭实验 将30 μ L Matrigel (1.0 mg/mL) 铺于Transwell小室的上室内, 调节各组细胞浓度到 1×10^6 /mL, 各取200 μ L加入上室内, 下层小室内加入含3 μ L/孔FN(纤维粘连蛋白)的600 μ L

完全培养液, 常规培养24 h, 结晶紫染色10 min, 清水漂洗3次, 风干; 将滤膜取下, 铺于载玻片上, 封片, 计数穿膜细胞, 以穿过无Matrigel覆盖滤膜细胞数为100%, 各实验组穿过膜的细胞数与其相比得出相对百分率, 用此百分率表示各组细胞体外侵袭能力。每组设3个平行实验, 重复3次。

1.2.5 划痕损伤实验 将各组细胞转染后接种到6孔板, 常规培养; 待细胞长满单层, 弃去培养基, 用灭菌的移液枪头在皿底划一直线, PBS洗细胞3次, 常规培养48 h, 显微镜下观察划痕处细胞生长情况, 并计算细胞迁移率=(1-48 h划痕宽度/初始划痕宽度) \times 100%。

1.3 统计学处理

数据均采用SPSS 13.0进行处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验和方差分析比较组间差异, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

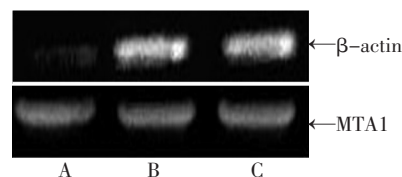
2 结果

2.1 RT-PCR检测结果

MTA1 mRNA表达水平 non-transfected组(0.39 ± 0.05)和转染psilencer2.0-neg组(0.36 ± 0.07)无显著性差异($P > 0.05$), 转染psilencer2.0-MTA1-siRNA组(0.06 ± 0.01)与non-transfected组, mRNA表达水平有显著性差异($P < 0.05$); 转染psilencer2.0-MTA1-siRNA组与转染psilencer2.0-neg组, mRNA表达水平有显著性差异($P < 0.05$), 说明siRNA有效抑制了子宫内膜癌细胞MTA1 mRNA的表达(图1)。

2.2 Western blot检测结果

MTA1蛋白表达水平 non-transfected组(2.73 ± 0.32)和转染psilencer2.0-neg组(1.82 ± 0.53)无显著性差异($P > 0.05$), 转染psilencer2.0-MTA1-siRNA组(0.11 ± 0.33)与non-transfected组, 蛋白表达水平有显著性差异($P < 0.05$); 转染psilencer2.0-MTA1-siRNA组与转染psilencer2.0-neg组, 蛋白表达水平有显著性差异($P < 0.05$), 说明siRNA有效抑制子宫内膜癌细胞MTA1蛋白的表达(图2)。



A: psilencer2.0-MTA1-siRNA组; B: psilencer2.0-neg组; C: non-transfected组

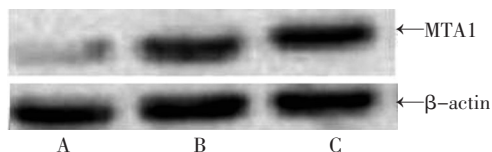
图1 各组细胞中MTA1 mRNA的表达

Figure 1 MTA1 mRNA expression in the 3 groups

2.3 Transwell体外侵袭实验结果

转染psilencer2.0-MTA1-siRNA组(26.34 ± 3.33)%

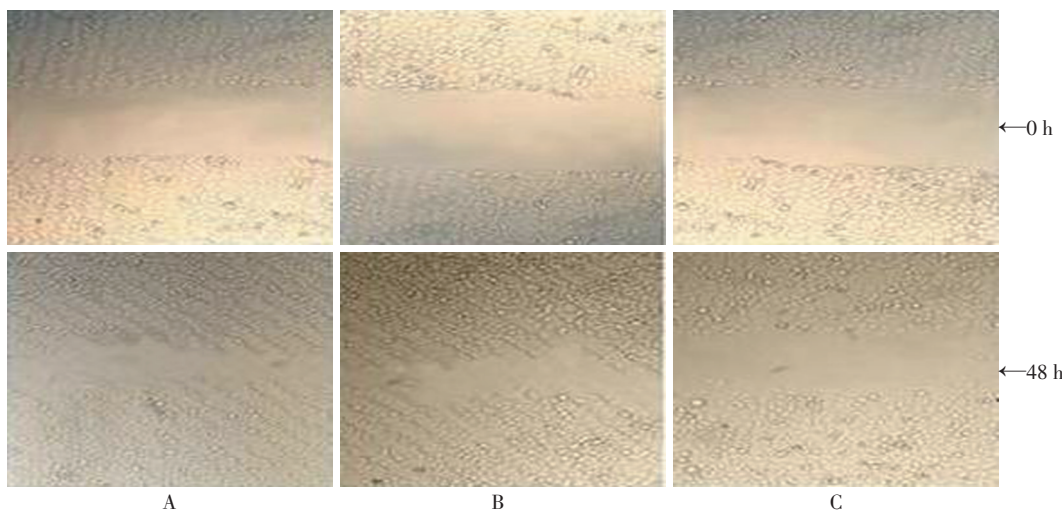
较 non-transfected 组 (51.74 ± 9.63)% 和转染 psilencer2.0-neg 组 (53.27 ± 4.65)% 的穿膜相对百分率明显降低,且有显著性差异 ($P < 0.05$),有效干扰 MTA1 表达后,细胞侵袭能力降低(表1)。



A: psilencer2.0-MTA1-siRNA 组; B: psilencer2.0-neg 组; C: non-transfected 组

图2 各组细胞中 MTA1 蛋白表达

Figure 2 MTA1 protein expression in the 3 groups



A: non-transfected 组; B: psilencer2.0-neg 组; C: psilencer2.0-MTA1-siRNA 组

图3 划痕损伤实验结果($\times 200$)

Figure 3 Results of scrape wound healing assay in the groups with psilencer2.0-MTA1-siRNA, psilencer2.0-neg, and non-transfected cells ($\times 200$)

3 讨论

子宫内膜癌是妇女最常见的三大恶性肿瘤之一,近年来子宫内膜癌的发病率呈上升趋势。目前的诊疗手段不能完全控制该病的进展,侵袭转移是造成患者死亡的重要因素,因此研究子宫内膜癌的侵袭转移机制,在分子水平控制其侵袭转移延缓疾病进展,对子宫内膜癌的治疗具有重要意义。

本课题组前期研究^[1]发现 MTA1 在正常子宫内膜、不典型增生子宫内膜及子宫内膜癌组织中的表达水平存在明显差异,在癌组织中呈现显著的过表达,且与子宫内膜癌不同的组织学分级呈负相关,与不同的肌层浸润深度及临床分期呈正相关。Toh 等^[2]用免疫组织化学方法检测正常食管及食管癌组织标本中 MTA1 蛋白表达,发现食管癌组织中 MTA1 表达高于正常食管上皮,且 MTA1 过表达的食管癌组织

2.4 划痕损伤实验结果

划痕损伤培养 48 h 后划痕依然明显,转染 psilencer2.0-MTA1-siRNA 组 (24.2 ± 0.2)% 较 non-transfected 组 (69.5 ± 0.5)% 和转染 psilencer2.0-neg 组 (67.7 ± 0.4)%, 细胞迁移率显著降低 ($P < 0.05$),有效干扰 MTA1 表达后,细胞迁移能力降低(图3)。

表1 三组细胞中穿膜相对百分率 $\bar{x} \pm s$

Table 1 The relative percentage of cells invading into Matrigel in the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞穿膜相对百分率/%
psilencer2.0-MTA1-siRNA	26.34 ± 3.33
psilencer2.0-neg	$53.27 \pm 4.65^*$
未转染	$51.74 \pm 9.63^*$

中,癌细胞往往已经侵及到食管壁,且具有淋巴结转移,与本研究前期结果相似,初步表明 MTA1 可能促进子宫内膜癌的发生及发展过程。

本研究应用 siRNA 可以特异抑制 MTA1 的 mRNA 及蛋白表达,本研究 RT-PCR 及 Western blot 结果显示,应用 siRNA 干扰技术显著降低 MTA1 mRNA 表达后,进一步抑制了 MTA1 蛋白表达,从而为通过抑制 MTA1 进一步抑制子宫内膜癌细胞的侵袭和转移提供了可应用的手段。

研究发现,MTA1 与多种肿瘤如胰腺癌^[3]、卵巢癌^[4]、非小细胞肺癌^[5]、乳腺癌^[6]、前列腺癌^[7]等肿瘤的侵袭转移密切相关,但关于其促进肿瘤侵袭转移的具体机制目前尚不清楚,仍在探讨阶段。人 MTA1 基因定位于染色体 14q32.3^[8],编码的蛋白质存在于核染色体重构和组蛋白去乙酰化酶(NuRD)复合物中,通过

组蛋白的乙酰化影响基因的表达^[9],含715个氨基酸残基,相对分子质量为82 kD,具有9个蛋白激酶C、2个酪氨酸激酶、7个酪蛋白激酶II的磷酸化位点以及4个N-糖基化位点^[10],推测MTA1可能通过这些特殊位点参与调控与细胞信号转导、凋亡等相关基因蛋白的表达,进而参与了肿瘤细胞浸润转移的过程。有研究^[11]发现MTA1可以改变细胞角蛋白丝系统的组装及细胞骨架蛋白的定位,从而使细胞的表型更具侵袭性及转移性,MTA1能使抑癌基因p53失活,从而影响肿瘤细胞的增殖和凋亡;能使HIF-1 α 更稳定,增强其活性,从而参与促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[11]。hereglutin/HER-2信号转导通路的激活可刺激ER(雌激素受体)阳性的乳腺癌细胞上调MTA1的表达^[12]。MTA1与ER的一个配体结合位点AF2结合,同时还与HDAC2结合,将HDAC2招募于含雌激素受体反应元件的启动子附近,而抑制细胞周期蛋白依赖性激酶激活激酶(CAK)诱导的雌激素受体ER的转激活功能,使雌激素受体作用元件激活的基因转录受到抑制,使乳腺癌发展成更具侵袭特性的表型^[13]。本研究中划痕损伤实验结果显示,在转染psilencer2.0-MTA1-siRNA后,细胞愈合能力较psilencer2.0-neg组及non-transfected组降低,Transwell体外侵袭实验结果也显示,psilencer2.0-MTA1-siRNA组的HEC-1-A细胞穿透膜的相对百分率较psilencer2.0-neg组及non-transfected组显著降低,说明有效抑制MTA1表达后,子宫内膜癌细胞HEC-1-A的生长减慢,侵袭转移能力降低,MTA1可能在子宫内膜癌的侵袭转移过程中发挥了重要作用。

本研究通过RNA干扰技术,有效降低了子宫内膜癌细胞系HEC-1-A中MTA1的表达,进而通过Transwell体外侵袭实验及划痕损伤实验观察到其侵袭及迁移能力,MTA1与子宫内膜癌侵袭迁移密切相关,可能是促进其侵袭及转移的重要因素。

综上所述,本实验拓宽了子宫内膜癌治疗的思路,为子宫内膜癌的治疗提供了一种新方法,随着研究的进一步深入,MTA1的作用机制会更加明确,作为基因治疗的新靶点,并有望成为控制子宫内膜癌侵袭转移的重要工具。

参考文献

- 1 张山岭,郝 权,孙和熙,等.MTA1表达与子宫内膜癌相关性研究[J]. 中国肿瘤临床,2012,39(4):208-211.
- 2 Toh Y, Ohga T, Endo K, et al. Expression of the metastasis-associated MTA1 protein and its relationship to deacetylation of the histone H4 in esophageal squamous cell carcinomas[J]. Int J Cancer, 2004, 110(3): 362-367.
- 3 Hofer MD, Chang MC, Hirko KA, et al. Immunohistochemical and clinicopathological correlation of the metastasis-associated

- gene 1(MTA1) expression in benign and malignant pancreatic endocrine tumors[J]. Mod Pathol, 2009, 22(7): 933-939.
- 4 Murakami M, Kaul R, Robertson ES. MTA1 expression is linked to ovarian cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7(9): 1468-1470.
- 5 Li SH, Tian H, Yue WM, et al. Overexpression of metastasis-associated protein 1 is significantly correlated with tumorangiogenesis and poor survival in patients with early-stage non-small cell lung cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2011, 18(7):2048-2056.
- 6 Kumar R, Balasenthil S, Pakala SB, et al. Metastasis-associated protein 1 short form stimulates Wnt1 pathway in mammary epithelial and cancer cells[J]. Cancer Res, 2010, 70(16): 6598-6608.
- 7 Kai L, Wang J, Ivanovic M, Chung YT, et al. Targeting prostate cancer angiogenesis through metastasis-associated protein 1 (MTA1)[J]. Prostate, 2011, 71(3): 268-280.
- 8 Cui Q, Takiguchi S, Matsusue K, et al. Assignment of the human metastasis-associated gene 1 (MTA1) to human chromosome band14q32.3 by fluorescence in situ hybridization[J]. Cytogenet Cell Genet, 2001, 93(1-2): 139-140.
- 9 Molli PR, Singh RR, Lee SW, et al. MTA1-mediated transcriptional repression of BRCA1 tumor suppressor gene[J]. Oncogene, 2008, 27(14): 1971-1980.
- 10 Nawa A, Nishimori K, Lin P, et al. Tumor metastasis-associated human MTA1 gene: its deduced protein sequence, localization, and association with breast cancer cell proliferation using antisense phosphorothioate oligonucleotides[J]. J Cell Biochem, 2000, 79(2): 202-212.
- 11 Toh Y, Nicolson GL. The role of the MTA family and their encoded proteins in human cancers: molecular functions and clinical implications[J]. Clin Exp Metastasis, 2009, 26(3): 215-227.
- 12 Azumdar A, Wang RA, Mishra SK, et al. Transcriptional repression of oestrogen receptor by metastasis-associated protein 1 corepressor[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(1): 30-37.
- 13 Talukder AH, Mishra SK, Mandal M. MTA1 interacts with MAT1, a cyclin-dependent kinase-activating kinase complex ring finger factor, and regulates estrogen receptor transactivation functions[J]. J Biol Chem, 2003, 278(13): 11676-11685.

(2012-01-17收稿)

(2012-05-04修回)

(本文编辑:邢颖)