

靶向糖基转移酶 shRNA 表达质粒对 LoVo 细胞侵袭和增殖能力的抑制作用*

贺富丽¹⁾ 马强²⁾ 张健^{1)**}

(¹⁾南方医科大学珠江医院肿瘤中心, 广州 510282; ²⁾南方医科大学生物技术学院抗体工程研究所, 广州 510515)

摘要 通过构建针对 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 V (GnT-V) 的小片段发夹状 RNA (shRNA) 干扰表达质粒, 研究了 shRNA 表达质粒沉默 GnT-V 基因后对 LoVo 细胞增殖、黏附以及迁移、侵袭能力的影响。设计了靶向 GnT-V 基因的小干扰 RNA (siRNA) 靶序列, 构建 shRNA 表达载体并转染人结肠癌 LoVo 细胞, 通过 G418 筛选建立稳定低表达 GnT-V 基因的细胞株。分别采用半定量逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 和蛋白质印迹 (Western blot) 检测 shRNA 对 GnT-V 基因 mRNA 及蛋白质表达的影响。并通过 CCK-8 增殖实验、异质黏附实验、划痕愈合实验、趋化运动实验、细胞侵袭实验评价 pGPU6/GFP/Neo GnT-V shRNA 对人结肠癌 LoVo 细胞增殖、黏附以及迁移、侵袭能力的影响。实验成功地构建了 GnT-V shRNA 表达质粒, 并且该质粒明显下调 GnT-V 的表达, LoVo GnT-V/1564 和 LoVo GnT-V/2224 的 mRNA 水平的抑制率分别为 82% 和 71.5%, 蛋白质水平的抑制率分别为 68% 和 56%。选择干扰效率较高的 LoVo GnT-V/1564 进行进一步实验。CCK-8 增殖实验显示, 与阴性对照组相比, LoVo GnT-V/1564 的增殖受到明显抑制 ($P < 0.001$), 尤以 72 h 为著; 下调 GnT-V 表达可增强 LoVo 细胞的黏附能力 ($t = -3.357$, $P < 0.01$), 而显著抑制 LoVo 细胞的趋化运动能力 ($t = 44.051$, $P < 0.001$); 划痕实验结果也显示抑制 GnT-V 表达延长 LoVo 细胞的愈合时间; 用 Matrigel 胶介导的细胞侵袭实验结果显示, LoVo GnT-V/1564 和 LoVo GnT-V/NC 的穿膜细胞数分别为 (5.10 ± 1.25) 个和 (39.55 ± 2.16) 个, GnT-V/1564 组较阴性对照组明显减少 ($t = 61.626$, $P < 0.001$)。结果表明, 靶向 GnT-V 的 shRNA 真核表达质粒可以显著降低 GnT-V 的表达, 从而抑制 LoVo 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 因此, 该 GnT-V 的 siRNA 序列可能成为治疗结直肠癌的有效靶点。

关键词 GnT-V, RNAi, 结直肠癌, 侵袭能力

学科分类号 Q2, Q7, R73

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00041

生物体内的大多数蛋白质都以糖蛋白的形式存在, 糖蛋白中的糖链直接影响着糖蛋白生物功能的发挥。N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 V (N-acetylglucosaminyltransferase V, GnT-V) 催化 N-乙酰氨基葡萄糖转移至 N-糖链三甘露糖核心 α -甘露糖上, 形成 $\beta 1, 6$ 分支结构, $\beta 1, 6$ -N-乙酰氨基葡萄糖分支在肿瘤组织含量丰富, 与细胞癌变、癌细胞增殖和转移密切相关^[1, 2]。

RNA 干扰 (RNAi) 是近年迅速发展起来的一项新的基因功能研究手段, 它是利用与靶基因同源的小片段双链 RNA (dsRNA), 即 siRNA, 转染靶细胞, 促进靶基因 mRNA 降解, 从而特异性诱导转录后基因沉默 (PTGS)。将 siRNA 所对应的模板 DNA 双链序列克隆入质粒转染细胞, DNA 模板在细胞内转录成 shRNA, 与化学合成的 siRNA 具有

相同的基因封闭作用, 但作用时间可以长达 2 个月^[3]。

目前, 关于 GnT-V 表达与结直肠癌关系的相关研究较少, 尚未见 RNA 干扰方面的研究, 因此在本研究中, 我们首次采用 RNA 干扰技术抑制 GnT-V 的表达, 构建了针对结直肠癌中高表达基因 GnT-V 的 shRNA 表达质粒, 将其转染高转移潜能的人结肠癌 LoVo 细胞, 观察 GnT-V 的表达变化对 LoVo 细胞增殖及转移能力的影响, 为结直

* 广东省科技计划项目 (0054)。

** 通讯联系人。

Tel: 13925091863, E-mail: 13925091863@139.com

收稿日期: 2009-01-16, 接受日期: 2009-03-25

肠癌分子靶向治疗研究中新靶标的确定提供客观依据.

1 材料与方法

1.1 材料

LoVo 人结直肠癌细胞株(ATCC); pGPU6/GFP/Neo 质粒(上海吉玛公司); 质粒提取试剂盒、DNA 凝胶纯化回收试剂盒(北京天根公司); 脂质体转染试剂 Lipofectamine2000™、RNA 提取试剂 Trizol(美国 Invitrogen 公司); DNA marker、T4 DNA 连接酶、*Bbs* I、*Bam*H I 限制性内切酶(日本 Takara 公司); RPMI1640, Opti-MEM, G418, 胰酶(美国 GIBCO 公司); GnT-V 多克隆抗体、HRP 标记的羊抗鼠 IgG(美国 Santa Cruz 公司); 鼠抗 GAPDH 单克隆抗体(Sofar Technology 公司); HRP 标记的兔抗羊 IgG(北京博奥森公司); PVDF 膜(美国 Bio-Rad 公司); ECL 化学发光试剂盒(美国 PS 公司); Transwell 双层细胞培养板(美国 Corning 公司); Matrigel gel(美国 B. D. 公司); RNA 干扰序列(上海吉玛公司化学合成); PCR 引物序列(Invitrogen 公司化学合成); 测序工作由上海吉玛公司完成.

1.2 方法

1.2.1 GnT-V siRNA 序列的设计. 按照 siRNA 设计原则^[4], 利用 Ambion 公司提供的“siRNA Target Finder and Design Tools”, 根据 NCBI 数据库中 GnT-V 基因(NM_002410.3)cDNA, 设计针对 GnT-V cDNA 1 564~1 584 位置碱基序列 21 nt 的 RNA 片段, 以及针对 2 224~2 242 位置碱基序列的 19nt 的 RNA 片段, 经 Blast Search 检索确认与 GnT-V 以外的人类已知基因序列无同源性. 序列分别如下: 正义 5' GGAAGTGCATGCAACTGTTTA 3', 正义 5' CTCCTTTGACCCTAAGAAT 3'. 分别命名为 GnT-V/1564 和 GnT-V/2224. 将其中一对的序列打乱排列, 经 Blast 比对, 无任何同源性超过 70% 的序列, 作为阴性对照干扰序列, 序列如下: 正义 5' GTTCTCCGAACGTGTACAGT 3', 命名为 GnT-V/NC.

1.2.2 GnT-V shRNA 载体的构建.

a. shRNA 转录模板 DNA 的设计. 根据前面设计的 siRNA 序列, 设计模板 DNA 链 6 条, 其顺序分别为 *Bbs* I 酶切位点、正义序列、9 nt loop 连接序列、反义序列、RNA 聚合酶 III 终止子(6 个 T)、*Bam*H I 酶切位点. 序列信息见表 1.

Table 1 Information of GnT-V shRNA sequence

Sequence information		
GnT-V/1564	Sense	5' CACCGGAAGTGCATGCAACTGTTTATTCAAGAGATAAACAGTTGCATGCACTTCCTTTTTTTG 3'
	Antisense	3' CCTTCACGTACGTTGACAAATAAGTTCTCTATTTGTCAACGTACGTGAAGGAAAAAACCTAG 5'
GnT-V/2224	Sense	5' CACCGCTCCTTTGACCCTAAGAATTTCAAGAGAATTCTTAGGGTCAAAGGAGTTTTTTG 3'
	Antisense	3' CGAGGAACTGGGATTCTTAAAGTTCTCTTAAGAATCCAGTTTCCTCAAAAAACCTAG 5'
GnT-V/NC	Sense	5' CACCGTTCTCCGAACGTGTACAGTCA AGAGATTACGTGACACGTCGGAGAATTTTTTG 3'
	Antisense	3' CAAGAGGCTTGACAGTGCAGTTCTCTAATGCACTGTGCAAGCCTCTAAAAAACCTAG 5'

b. 质粒 pGPU6/GFP/Neo GnT-V 的构建. pGPU6/GFP/Neo 质粒, 其 RNA 聚合酶 III 启动子为 U6 启动子, 抗性标记为卡那霉素和新霉素. 先将各组 2 条模板单链退火处理, 2 条 oligonucleotides 各稀释至 1 g/L, 各取 5 μ l, 加入 10 $\times$ 退火缓冲液 5 μ l, 加去离子水至 50 μ l, 95 $^{\circ}$ C 反应 3 min, 然后缓慢降至室温. 用限制性内切酶 *Bbs* I 和 *Bam*H I 双酶切 pGPU6/GFP/Neo 质粒后电泳, 胶回收线性化质粒, 利用 T4 DNA 连接酶把退火的 shRNA 模板 DNA 定向克隆至 pGPU6/GFP/Neo 质粒 U6 启动子之后, 构建成重组体质粒. 将重组体转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选卡那霉素抗性克隆, 大量扩增摇菌后, 抽提质粒纯化, 分别命名为 pGPU6/GFP/Neo

GnT-V/1564、pGPU6/GFP/Neo GnT-V/2224 和 pGPU6/GFP/Neo GnT-V/NC.

c. 质粒 pGPU6/GFP/Neo GnT-V 的鉴定. 利用限制性内切酶 *Bbs* I 和 *Bam*H I 将质粒 pGPU6/GFP/Neo GnT-V 双酶切成 2 条片段, 电泳观察插入子及载体片段的分子质量. 重组质粒序列测定由上海吉玛公司完成.

1.2.3 细胞培养与转染.

a. 细胞培养. 人结肠癌细胞株 LoVo 在 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 条件下, 培养于含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 中, 每周传代 2~3 次.

b. 细胞转染. 参照 Invitrogen 公司 Lipofectamine2000™ 产品说明书, 用

Lipofectamine2000™ 将质粒导入 LoVo 细胞. LoVo 细胞培养至对数生长期, 用 0.25%胰酶将 LoVo 细胞从培养瓶的瓶底上消化下来, 按 1×10^5 /孔细胞接种于 24 孔板, 继续培养 24 h 至细胞的融合率达到 80%~90%, 撤去原培养液, $1 \times$ PBS 轻轻冲洗 2 次, 按 500 μ l/孔加入 Opti-MEM. 各质粒浓度为 0.5 g/L, 每孔按质粒: 脂质体 = 1 μ g : 2 μ l 转染细胞. 用 Opti-MEM 48 μ l 稀释 Lipofectamine2000™ 2 μ l, 室温静置 5 min. 质粒各 2 μ l 用 Opti-MEM 稀释至终体积为 50 μ l, 室温静置 5 min. 混合上述两种液体(总体积 100 μ l), 室温静置 20 min. 每孔对应加入 100 μ l 转染混合液, 轻摇混匀. 置于 37℃ 5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养 24 h 后, 更换含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养液, 48 h 后用含 500 mg/L G418 的 10% 新生牛血清 RPMI-1640 培养液筛选. 待形成阳性单细胞克隆群落后, 用尖吸管吸取单克隆阳性细胞培养.

1.2.4 RT-PCR 测定 GnT-V mRNA. 用 Trizol 提取对数生长期的单层培养细胞总 RNA, 采用 AMV 逆转录合成 cDNA. GnT-V 上游引物为 5' AACT-CTTGACCATCCTGGGTTC 3', 下游引物为 5' TTGCTGCTTTTGGGTGGGT 3'^[9]. 反应条件: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 36 个循环; 最后 72℃ 再延伸 10 min. 使用 β -actin 作为内参, 上游引物为 5' GAAACTACCTTCAACTCCATC 3', 下游引物为 5' CGAGGCCAGGATGGAGCCGCC 3'. GnT-V 扩增产物长度为 555 bp, β -actin 长度为 219 bp. 以扩增产物 3 μ l 在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 紫外灯下观察电泳结果, UVI 凝胶成像系统摄像, Image-Pro Plus 6.0 软件分析条带灰度值, 用 GnT-V/ β -actin 代表 GnT-V 的相对表达量.

1.2.5 Western blot 检测 GnT-V 蛋白表达. 每组收集 1×10^7 个细胞, 提取总蛋白, 用 Bradford 法测定蛋白质浓度, 吸取 50 μ g 总蛋白, 去离子水补至 20 μ l, 加入等体积 2 $\times$ 上样缓冲液煮沸 7 min, 离心后吸取 30 μ l 上样, 经不连续 SDS-PAGE 分离后, 用半干法电转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉 37℃ 封闭 2 h, TBST 洗膜 5 次, 每次 5 min, 然后用羊抗人 GnT-V 蛋白多克隆抗体(1:200)、鼠抗人 GAPDH 蛋白单克隆抗体(1:1000) 4℃ 孵育过夜, 洗膜后分别加入 HRP 标记的兔抗羊 IgG (1:500)、HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:500), 室温下摇动 1 h, 洗膜后用 ECL 化学发光系统检测, 暗

室曝光 X 光片, 冲洗胶片, UVI 凝胶成像系统摄像, Image-Pro Plus 6.0 软件分析条带灰度值, 用 GnT-V/GAPDH 代表 GnT-V 的相对表达量.

1.2.6 CCK-8 检测细胞增殖性. 取对数生长期的待测细胞, 分为 LoVo GnT-V/NC 组和 LoVo GnT-V/1564 组, 接种于 96 孔板中(2×10^3 /孔), 37℃ 5% CO₂ 培养, CCK-8 法分析不同时间点(0 h、24 h、48 h、72 h、96 h)的细胞活力, 每个时间点分别检测 8 个复孔. 测量两组的 A_{450} 值, 绘制生长曲线, 并计算 LoVo GnT-V/1564 组的生长抑制率. 细胞生长抑制率(IR)=(对照组 A_{450} 值-干扰组 A_{450} 值)/对照组 A_{450} 值 $\times 100\%$.

1.2.7 异质黏附实验. 取对数生长期的待测细胞, 分为 LoVo GnT-V/NC 组和 LoVo GnT-V/1564 组, 每组设 24 个孔. 细胞用无血清 RPMI1640 培养过夜. 取 96 孔板, Matrigel 胶 50 μ l/孔铺板, 轻轻摇晃铺平 Matrigel 胶, 37℃ 10 min 凝固. 10 g/L BSA ($1 \times$ PBS 配制)煮沸 13 min 变性后, 每孔加 100 μ l 封闭 1 h, 封闭结束后用 $1 \times$ PBS 冲洗 2 次. 用 0.25% 胰酶消化细胞, $1 \times$ PBS 洗涤细胞, 800 r/min 离心 5 min 沉淀细胞, 弃上清, 将细胞重悬于含氯化钙 1 mmol/L、氯化镁 1 mmol/L、氯化锰 0.2 mmol/L 及 5 g/L BSA 的 RPMI1640 中, 调整细胞浓度为 5×10^4 /ml. 按 100 μ l/孔加入细胞悬液, 37℃ 孵育 1 h. 取出 96 孔板, $1 \times$ PBS 冲洗 3 次, 每孔加入 100 μ l RPMI1640 和 10 μ l CCK-8, 37℃、5% CO₂ 培养 1 h, 测量各组 A_{450} 值.

1.2.8 趋化运动实验. 在 transwell 小室(其滤膜孔径为 8 μ m)中进行, 分为 LoVo GnT-V/NC 组和 LoVo GnT-V/1564 组, 每组设 4 个孔. 取对数生长期的细胞, 用无血清 RPMI1640 培养过夜. 用 0.25% 胰酶消化细胞, $1 \times$ PBS 洗涤细胞, 800 r/min 离心 5 min 沉淀细胞, 弃上清, 将细胞重悬于含氯化钙 1 mmol/L, 氯化镁 1 mmol/L, 氯化锰 0.2 mmol/L 及 5 g/L BSA 的 RPMI1640 中, 调整细胞浓度为 1×10^5 /ml, 按 200 μ l/上室加入细胞悬液, 下室每室加 500 μ l 含 10% 新生牛血清(作为趋化因子)的 RPMI-1640 培养液. 37℃ 5% CO₂ 培养 6 h, 取出上室, 用棉签擦去膜上室面的细胞, 4% 多聚甲醛固定膜下室面的细胞 15 min, $1 \times$ PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 结晶紫染色 3 min, $1 \times$ PBS 清洗干净, 小心用刀片将膜从小室中分离出来, 将膜下室面朝上置于载玻片上, 吹风机干燥后, 中性树脂封固. 在 400 $\times$ 高倍镜下, 每张膜取上、下、左、

右、中 5 个视野计数。

1.2.9 划痕愈合实验. 取对数生长期的待测细胞, 分为 LoVo GnT-V/NC 组和 LoVo GnT-V/1564 组, 每组设 3 个孔. 含 10 mg/L Collagen IV 的 1×PBS 包被 6 孔板过夜, 小心吸去上清. 用 0.25%胰酶消化细胞, 1×PBS 洗涤细胞, 800 r/min 离心 5 min 沉淀细胞, 弃上清, 将细胞重悬于含 10%新生牛血清的 RPMI1640 中, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 按 $5 \times 10^5/\text{孔}$ 接种细胞, 培养 3 h, 使细胞呈现出单层贴壁生长状态. 用 100 μl 的 tip 头在 6 孔板中的单细胞层上划痕, 37°C 5% CO_2 培养 36 h. 分别于划痕后 0 h、12 h、24 h、36 h 每个孔取 4 个视野拍照, 观察划痕愈合能力, 用愈合率代表愈合能力. 愈合率 = [(愈合前两侧细胞层距离 - 愈合后两侧细胞层距离) / 愈合前两侧细胞层距离] $\times 100\%$.

1.2.10 细胞侵袭实验. 在 transwell 小室(其滤膜孔径为 8 μm)中进行, 分为 LoVo GnT-V/NC 组和 LoVo GnT-V/1564 组, 每组设 4 个孔. 取对数生长期的细胞, 用无血清 RPMI1640 培养过夜. Matrigel 胶 4°C 过夜融化, 每个 transwell 上室加入 50 μl , 从边缘轻轻加入, 避免出现气泡, 轻轻摇晃铺平 Matrigel 胶, 37°C 10 min 凝固. 用 0.25%胰酶消化细胞, 1×PBS 洗涤细胞, 800 r/min 离心 5 min 沉淀细胞, 弃上清, 将细胞重悬于含氯化钙 1 mmol/L、氯化镁 1 mmol/L、氯化锰 0.2 mmol/L 及 5 g/L BSA 的 RPMI1640 中, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 按 200 μl /上室加入细胞悬液, 下室每室加 500 μl 含 10%新生牛血清的 RPMI-1640 培养液. 37°C 5% CO_2 培养 48 h. 取出上室, 用棉签擦去膜上室面的 Matrigel 胶和细胞, 4%多聚甲醛固定膜下室面的细胞 15 min, 1×PBS 清洗 3 次, 每次 5 min. 结晶紫染色 3 min, 1×PBS 清洗干净, 小心用刀片将膜从小室中分离出来, 将膜下室面朝上置于载玻片上, 吹风机干燥后, 中性树脂封固. 在 400×高倍镜下, 每张膜取上、下、左、右、中 5 个视野计数。

1.2.11 统计学分析. 实验结果均经 SPSS13.0 软件统计. 两组比较采用 *t* 检验, 多组比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结 果

2.1 重组质粒的稳定转染

质粒 pGPU6/GFP/Neo 中含有编码 GFP 的基因, 故转染细胞在荧光显微镜下可激发出绿色荧

光. 在荧光显微镜下观察, 所有转染细胞均发荧光, 说明稳定转染成功(图 1), 分别命名为 LoVo GnT-V/1564、LoVo GnT-V/2224 和 LoVo GnT-V/NC.

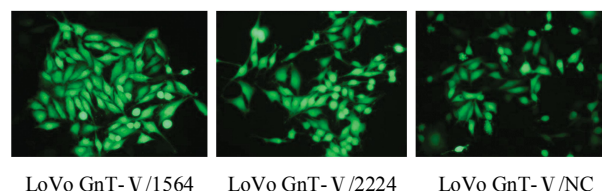


Fig. 1 Fluorescent photos of stably transfected LoVo cells (200×)

2.2 干扰效果检测

各组细胞均能扩增出 555 bp 的 GnT-V 基因片段, 条带强弱不一致. LoVo GnT-V/1564 和 LoVo GnT-V/2224 组细胞 GnT-V 基因的表达较 LoVo GnT-V/NC 组明显降低, 表明转染 GnT-V shRNA 载体能抑制目的基因 mRNA 表达(图 2), Western blot 结果也显示转染 GnT-V shRNA 载体能抑制 GnT-V 蛋白表达(图 3). Image-Pro Plus 6.0 软件分析 GnT-V 基因 mRNA 及蛋白质的表达水平, 按照公式进行计算后显示, LoVo GnT-V/1564 和 LoVo GnT-V/2224 组 mRNA 水平的抑制率分别为

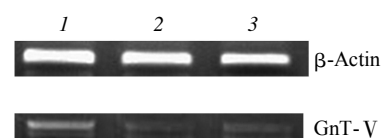


Fig. 2 Influence of GnT-V shRNA expression vectors on GnT-V mRNA expression

The mRNA expression of GnT-V in three cell groups were evaluated by semi-quantitative RT-PCR. As shown in the pictures, GnT-V shRNA can reduce expression of GnT-V mRNA in LoVo GnT-V/1564 cells and LoVo GnT-V/2224 cells, by 82% and 71.5% respectively. 1: LoVo GnT-V/NC; 2: LoVo GnT-V/1564; 3: LoVo GnT-V/2224.

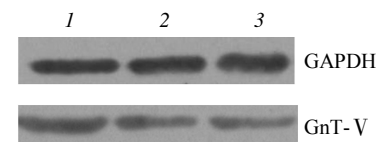


Fig. 3 Influence of GnT-V shRNA expression vectors on GnT-V protein expression

The protein expression of GnT-V in three cell groups were analyzed by immunoblotting with anti-GnT-V antibody. As illustrated in the pictures, GnT-V shRNA can down-regulate GnT-V protein expression of LoVo GnT-V/1564 cells and LoVo GnT-V/2224 cells, by 68% and 56% respectively. 1: LoVo GnT-V/NC; 2: LoVo GnT-V/2224; 3: LoVo GnT-V/1564.

82%和 71.5%，蛋白质水平的抑制率分别为 68%和 56%，与 LoVo GnT- V /NC 组相比均有统计学意义 ($P<0.01$)。选择干扰效率较高的 LoVo GnT- V /1564 进行下一步实验。

2.3 GnT- V shRNA 对细胞增殖的影响

以细胞在不同时间点(0 h、24 h、48 h、72 h、96 h)的 A_{450} 值绘制细胞生长曲线(图 4a)，并计算出 LoVo GnT- V /1564 的生长抑制率(图 4b)，可见，GnT- V shRNA 对 LoVo 细胞增殖呈明显的抑制作用，尤以 72 h 为著，与对照组相比均有统计学意义($P<0.001$)。

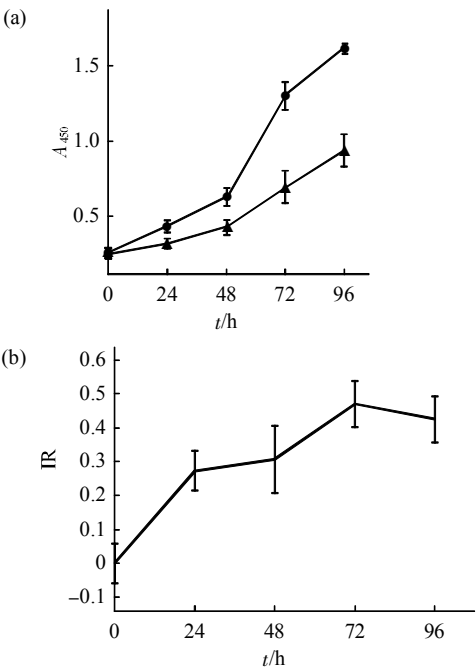


Fig. 4 Influence of GnT- V shRNA expression vectors on cell proliferation
CCK-8 assay showed proliferation of LoVo GnT- V /1564 was inhibited obviously ($P<0.001$), especially in 72 h. (a) Cell growth curve. The data are represented as ($\bar{x} \pm s$). ●—●: GnT- V /NC; ▲—▲: GnT- V /1564. (b) Growth inhibitory rate of LoVo GnT- V /1564. The data are represented as ($\bar{x} \pm 2s$).

2.4 GnT- V shRNA 对细胞黏附性、运动性和侵袭性的影响

以 Matrigel 胶模仿基底膜进行黏附实验，结果显示下调 GnT- V 表达可增强 LoVo 细胞的黏附能力(表 2， $t=-3.357$ ， $P<0.01$)，而显著抑制 LoVo 细胞的趋化运动性(表 2，图 5， $t=44.051$ ， $P<0.001$)。划痕实验也显示抑制 GnT- V 表达显著延长 LoVo 细胞的愈合时间(图 6、7)。为明确 GnT- V 对 LoVo 细胞侵袭能力的影响，在 transwell 板的基础上，用 Matrigel 胶模仿基底膜构建侵袭性检测系统。实验结果显示，抑制 GnT- V 表达可以显著抑制 LoVo 细胞的侵袭能力(表 2，图 8， $t=61.626$ ， $P<0.001$)。

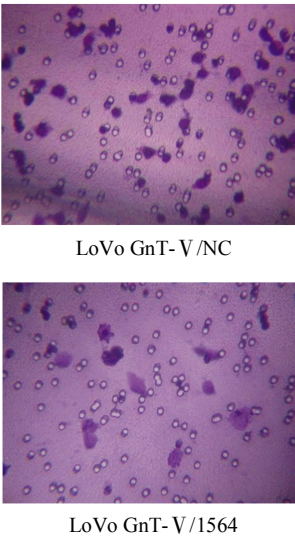


Fig. 5 Comparison of chemotactic migration of LoVo GnT- V /NC and LoVo GnT- V /1564

24-well microchemotactic chambers were used to examine cell migration. 10% newborn cow serum was chosen as chemotatic factor. Results are shown as the number of cells that had migrated through the polycarbonate membranes by counting 5 randomly chosen HPF under light microscopy ($400\times$) for each replicate. The results showed down-regulation of GnT- V expression can significantly inhibit chemotactic migration of LoVo cells.

Table 2 Comparison of cell adhesion, chemotactic migration and invasive ability of LoVo GnT- V /NC and LoVo GnT- V /1564

	<i>n</i>	LoVo GnT- V / NC	LoVo GnT- V /1564	<i>t</i>	<i>P</i> values
Adhesion(A_{450})	24	0.164±0.015	0.177±0.014	-3.357	0.002
Chemotactic migration	20	25.65±1.39	7.25±1.25	44.051	0.000
Invasive ability	20	39.55±2.16	5.10±1.25	61.626	0.000

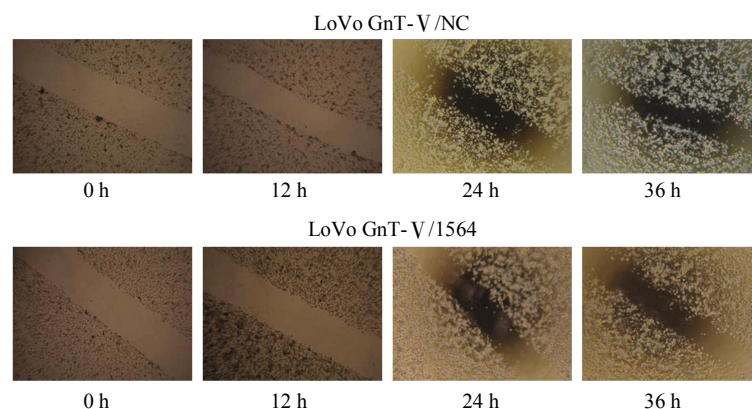


Fig. 6 Comparison of wound closure assay of LoVo GnT-V/NC and LoVo GnT-V/1564

Cells were plated onto Collagen IV coated wells, and were cultured to grow to monolayer. Linear scrape wounds were made on the cell monolayers, and cultured in the presence of 10% newborn cow serum. The wounds were allowed to heal for 36 hours. Pictures of wound heal were taken at 0 h, 12 h, 24 h and 36 h respectively (240 $\times$). The pictures showed that down-regulation of GnT-V expression can significantly prolong wound heal time of LoVo cell.

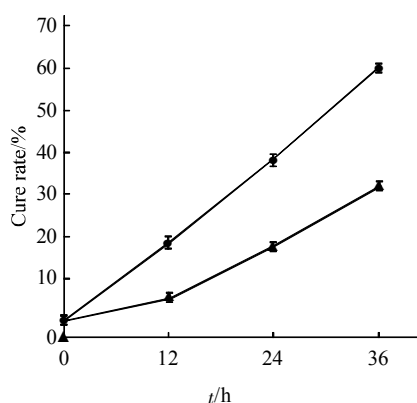


Fig. 7 Contrasting of wound cure rate of LoVo GnT-V/NC to LoVo GnT-V/1564

The graph show that down-regulation of GnT-V expression can significantly inhibit LoVo cell migration on Collagen IV. The data are represented as ($\bar{x} \pm 2s$). ●—●: GnT-V/NC; ▲—▲: GnT-V/1564.

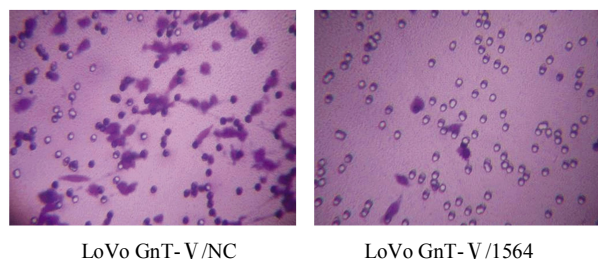


Fig. 8 Contrasting of cell invasive ability of LoVo GnT-V/NC to LoVo GnT-V/1564

24-well microchemotactic chambers and Matrigel gel were used to examine cell invasion. The number of cells that had penetrated through the Matrigel gel and polycarbonate membranes were determined by counting 5 randomly chosen HPF under light microscopy (400 $\times$) for each replicate. The results showed that penetrated LoVo GnT-V/NC cells through the Matrigel gel and polycarbonate membranes are much more than LoVo GnT-V/1564.

3 讨 论

为了进一步研究 GnT-V 基因与结肠癌的关系, 以前的一些研究多采用转入正义或反义寡核苷酸的方法, 在本研究中我们采用了一种新的基因功能研究技术, 即 RNAi 技术^[6]. RNAi 技术是 Fire 和 Mello 等在 1998 年研究秀丽隐杆线虫发现并命名的, 后来 Aoki 等^[7]发现 RNAi 技术比单独运用反义 RNA 诱导基因沉默的效率高 10 倍, 2001 年 Elbashir 等^[8]的研究证实在哺乳动物细胞中也可以应用此技术, 从而高效、特异地阻断哺乳动物细胞内同源基因表达, 故 RNAi 技术非常适合用于研究和阻滞肿瘤细胞中异常基因或蛋白质的表达^[9]. siRNA 可通过化学合成、质粒或病毒载体的转录产生, 相比之下, 质粒载体转录产生的 siRNA 方式比较适合于长期研究肿瘤基因的功能^[4, 10].

本研究将含有真核细胞内转录启动子 U6 并能分别在原核和真核细胞水平进行阳性克隆抗性筛选的真核表达载体 pGPU6/GFP/Neo, 与针对 GnT-V 基因设计的 shRNA 转录模板 DNA 相连接, 成功地构建了重组转录载体 pGPU6/GFP/Neo GnT-V, 并通过脂质体转染导入人结肠癌 LoVo 细胞中进行表达, 发现转染重组质粒后的 LoVo 细胞在 GnT-V mRNA 和蛋白质水平都明显下调, 并对细胞增殖呈明显的抑制作用, 尤以 72 h 为著. 推测可能机制^[11]为 GnT-V 直接通过增加整合蛋白 $\alpha 5$ 亚基 N-糖链的 $\beta 1, 6$ 分支结构, 使其成熟和转运至细胞膜, 导致膜表面 $\alpha 5$ 含量增加, 也可能由于 GnT-V 的众多糖蛋白产物, 其 N-糖链 $\beta 1, 6$ -GlcNAc 糖基

的增多而有利于整合蛋白及 E- 钙粘蛋白的加工和转运. 此外, 过表达 GnT- V 可影响到整合蛋白 $\alpha 5$ 亚基基因的转录水平. 整合蛋白表达的增加可促进其分子在细胞表面成簇, 易与整合蛋白配体结合, 从而通过其下游的黏着斑激酶转导正性的生存信号^[12], 促进细胞增殖. 故 GnT- V 表达下调后能抑制细胞增殖.

肿瘤细胞的侵袭和转移在很大程度上是由于细胞运动能力的增强. 当肿瘤细胞变得更有运动性和侵袭性的时候, 肿瘤细胞通过输出信号调节整合蛋白与细胞外基质的亲和力, 同时也通过输入信号亲和力, 调节细胞与细胞外基质的黏附力, 促进或抑制细胞运动^[13]. 细胞 - 细胞外基质黏附太强或太弱都不利于细胞运动^[14], 细胞与细胞外基质的中等程度的黏附才可以导致细胞最强的运动力^[15]. 本研究发现, 下调 GnT- V 表达可增强 LoVo 细胞的黏附能力($t = -3.357$, $P < 0.01$), 而显著抑制 LoVo 细胞的趋化运动性($t = 44.051$, $P < 0.001$). 划痕实验也显示, 抑制 GnT- V 表达显著延长 LoVo 细胞的愈合时间. 在用 Matrigel 胶介导的细胞侵袭实验结果显示, 抑制 GnT- V 表达可以显著抑制 LoVo 细胞的侵袭能力($t = 61.626$, $P < 0.001$).

本研究构建的靶向性 GnT- V shRNA 真核表达载体能够显著地抑制人结直肠癌 LoVo 细胞中 GnT- V 的表达, 从而抑制 LoVo 细胞的增殖、迁移及侵袭能力, 可能为结直肠癌分子靶向治疗提供一个新的靶标.

参 考 文 献

- Kleane R, Berger E C. The molecular and cell biology of glycosyltransferase. *Biochem Biophys Acta*, 1993, **1154**(3~4): 283
- Hakomori S. Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv Cancer Res*, 1989, **52**: 257~331
- Brummelkamp T R, Bernards R. New tools for functional mammalian cancer genetics. *Nat Rev Cancer*, 2003, **3**(10): 781~789
- Reynolds A, Leake D, Boese Q, *et al.* Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*, 2004, **22**(3): 326~330
- Murata K, Miyoshi E, Ihara S, *et al.* Attachment of human colon cancer cells to vascular endothelium is enhanced by N-Acetylglucosaminyltransferase V. *Oncology*, 2004, **66**(6): 492~501
- Couzin J. Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash. *Science*, 2002, **298**(5602): 2296~2297
- Aoki Y, Cioca D P, Oidaira H, *et al.* RNA interference may be more potent than antisense RNA in human cancer cell lines. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2003, **30**(1~2): 96~102
- Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, **411**(6836): 494~498
- Izquierdo M. Short interfering RNAs as a tool for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther*, 2005, **12**(3): 217~227
- Malik I, Garrido M, Bahr M, *et al.* Comparison of test systems for RNA interference. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **341**(1): 245~253
- 王丽影, 陈伉俪, 苏剑敏, 等. N- 乙酰氨基葡萄糖转移酶 - V 过表达对人肝癌细胞迁移及粘附分子表达的影响. *实验生物学报*, 2001, **34**(3): 219~225
- Wang L Y, Chen K L, Su J M, *et al.* *Acta Biol Exp Sin*, 2001, **34**(3): 219~225
- Giancotti F G, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science*, 1999, **285**: 1028~1032
- Hood J D, Cheresch D A. Role of Integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer*, 2002, **2**(2): 91~100
- Dhawan P, Singh A B, Deane N G, *et al.* Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest*, 2005, **115**(7): 1765~1776
- Brown E, Hogg N. Where the outside meets the inside: Integrins as activators and targets of signal transduction cascades. *Immunol Lett*, 1996, **54**(2~3): 189~193

shRNAs Aiming at Glycosyltransferase Inhibit Invasive and Proliferative Ability of LoVo Cell Line *in vitro**

HE Fu-Li¹⁾, MA Qiang²⁾, ZHANG Jian^{1)**}

¹⁾Oncology Center, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China;

²⁾The Institute of Antibody Engineering, School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract To construct expression vectors of small hairpin RNA aimed at N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT- V) gene, and to investigate effects of GnT- V shRNA on proliferation, adhesion, migration and invasion of LoVo cell line. siRNAs were designed according to the coding sequence of GnT- V gene, shRNA expression

vectors were constructed and transfected into LoVo cell line, cell lines which stably expressed low level of GnT- V were established by G418 screening. The mRNA and protein expression of GnT- V were measured by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) and Western blot analysis, respectively. The effects of pGPU6/GFP/Neo GnT- V shRNA vectors on proliferation, adhesion, migration and invasion of LoVo cell line were evaluated by CCK-8 assay, heterogenous adhesion, wound closure assay, chemotactic migration and cell invasive experiment, respectively. GnT- V shRNA expression plasmid was constructed successfully and pGPU6/GFP/Neo GnT- V shRNA down-regulated expression of GnT- V dramatically in LoVo cell. Expression of LoVo GnT- V /1564 and LoVo GnT- V /2224 decreased by 82%, 71.5% respectively at mRNA level, and 68%, 56% respectively at protein level. The more effective interfered cell line, LoVo GnT- V /1564, was chosen to do further experiment. CCK-8 assay showed proliferation of LoVo GnT- V /1564 was suppressed obviously, compared to proliferation of negative control group cell ($P < 0.001$), especially in 72 hours; down-regulation of GnT- V expression can enhance adhesive ability ($t = -3.357$, $P < 0.01$) and inhibit chemotactic migration ($t = 44.051$, $P < 0.001$) in LoVo cell line; quantitative analysis of the wound closure assay also indicated that down-regulation of GnT- V expression can significantly prolong wound heal hours of LoVo cell line; cell invasive experiment using Matrigel gel showed that penetrative cell numbers of LoVo GnT- V /1564 and LoVo GnT- V /NC were 5.10 ± 1.25 and 39.55 ± 2.16 respectively, penetrative cell numbers of LoVo GnT- V /1564 cell was reduced obviously, compared to negative control group cell ($t = 61.626$, $P < 0.001$). The shRNA aimed at GnT- V gene could reduce the expression of GnT- V both in the level of mRNA and protein. By this way, it can inhibit proliferation, migration and invasion of LoVo cell line, so the sequence of RNA interference against GnT- V may be a valid target to treat colorectal cancer.

Key words GnT- V, RNAi, colorectal cancer, invasive ability

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00041

*This work was supported by a grant from Science and Technology Plan of Guangdong Province(0054).

**Corresponding author.

Tel: 13925091863, E-mail: 13925091863@139.com

Received: January 16, 2009 Accepted: March 25, 2009