

EphA2 对神经胶质瘤细胞系 U251 的凋亡、增殖、迁移和侵袭的研究 *

柏燕燕¹⁾ 史毅²⁾ 惠国桢³⁾ 张艳荣¹⁾ 董万利^{1)**} 胡锦^{4)**} 金由辛^{2)**}

¹⁾苏州大学附属第一人民医院神经内科, 苏州 215006; ²⁾中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所, 上海 200031;

³⁾苏州大学附属第一人民医院神经外科, 苏州 215006; ⁴⁾上海交通大学附属第六人民医院神经外科, 上海 200240)

摘要 为了研究 EphA2 对神经胶质瘤细胞系 U251 在增殖、凋亡、迁移和侵袭方面所起的作用, 用 RT-PCR 方法检测正常脑组织标本与两种恶性胶质瘤细胞系中 EphA2 mRNA 表达水平, 然后用化学合成的针对 EphA2 基因的小干扰 RNA(siRNA)下调该基因的表达, 以检测其在 U251 中的生物学功能. 证实了 EphA2 基因在正常脑组织标本中的表达水平远低于两种恶性胶质瘤细胞系. 把体外化学合成针对 EphA2 基因的小干扰 RNA(siRNA-EphA2)转染入 U251 细胞后, Western blot, 实时定量 RT-PCR 检测到 U251 细胞中 EphA2 蛋白及 mRNA 表达水平都明显降低, 并且细胞增殖受到显著抑制, 同时出现了明显的细胞凋亡. 伤口愈合实验(检测细胞迁移能力), Transwell 小室实验(检测细胞侵袭能力)均表明, 下调 EphA2 的表达后, 细胞的迁移和侵袭能力较阴性对照组显著减弱. 上述结果表明, 在神经胶质瘤 U251 细胞中, EphA2 与其恶性增殖及高度侵袭性相关, 可作为分子治疗的有效靶点.

关键词 神经胶质瘤, U251 细胞, 小干扰 RNA, EphA2

学科分类号 Q7, R6

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00598

Eph(erythropoietin producing human hepatocellular carcinoma)受体家族是受体酪氨酸激酶(RTKs)家族成员中最大的亚族, Eph 受体和其配体 ephrins 间的相互作用参与了胚胎发育的许多过程, 如在神经轴突导向、血管发生、肿瘤形成^[1~3]等方面具有重要作用. EphA2 是 EphA 亚家族受体 8 个成员中的第 2 个, 与 Eph 受体家族的其他成员有着相似的结构特征, 并且与细胞增殖、迁移等有关^[4]. EphA2 在正常成熟细胞尤其是上皮细胞中处于低表达状态, 而在一些恶性肿瘤中广泛高表达, 如乳腺癌、食管癌、前列腺癌、侵袭性黑色素瘤以及卵巢癌等^[5~9]. 有数据证实, 在神经胶质瘤中 EphA2 基因也呈现高表达水平^[10], 但到目前为止, EphA2 在神经胶质瘤中的生物学功能还不是很清楚.

神经胶质瘤因其较高的致死率成为众所周知的恶性肿瘤^[11], 此肿瘤常常生长在中枢神经系统深部, 目前临床上采用的手术切除术和放射疗法对病人都具有潜在的危险性. 因此, 从分子生物学方面抑制神经胶质瘤的恶性进展成为新的延长病人生命

的可行方法.

我们的实验研究就是应用 RNA 干扰技术下调在胶质瘤中异常高表达的 EphA2 基因, 探讨此基因在神经胶质瘤细胞系 U251 中的生物学效应以寻找潜在的治疗胶质瘤的生物学方法.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系及其培养. 人类星形胶质瘤细胞系 U251、U87 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库. U251 细胞培养液为含 10% 胎牛血清(FBS, Hyclone)的 DMEM 高糖培养基, U87 细胞的培养液为添加了 10% FBS 的 EME 高糖培养基.

* 国家自然科学基金资助项目(30770824).

** 通讯联系人.

董万利. Tel: 0512-67780307, E-mail: dwlsz@163.com

胡锦. Tel: 021-64369181, E-mail: hujin_dana@126.com

金由辛. Tel: 021-54921112, E-mail: yxjin@sibs.ac.cn

收稿日期: 2008-08-28, 接受日期: 2008-10-27

细胞均于 37℃, 5% CO₂ 培养箱(Thermo 公司)中培养. 正常的脑组织标本由苏州大学神经外科惠赠.

1.1.2 主要试剂与仪器. 绿色荧光标记小干扰 RNA(FITC-siRNA)以及体外化学合成的 siRNA 购自上海吉玛公司; EphA2 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; DMEM 购于上海吉诺生物科技有限公司; Opti-MEM 优化培养液购自美国 Invitrogen 公司; M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司; INTERFERin™ 购自深圳达科为公司; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自美国 Sigma 公司; Transwell 小室购自美国 BD 公司; CCK-8 细胞计数试剂盒购自日本同仁化学研究所. 主要仪器有 PCR 仪(Eppendorf 公司); 实时定量 PCR 仪(MJ research 公司); DK-8D 型电热恒温水浴; Eppendorf-centrifuge 5810R 高速冷冻离心机; Western blot 荧光成像分析仪(FUJIFILM); 流式细胞仪(美国 BD 公司).

1.2 方法

1.2.1 siRNA 的设计和合成. 人 siRNA-EphA2 的序列参照文献[12]合成, EphA2 siRNA 正义链序列 5' UGACAUGCCGAUCUACAUG 3', 反义链序列 5' CAUGUAGAUCGGCAUGUCA 3'. 非特异随机对照由上海吉玛公司赠送, 正义链, 5' UUCUCCGAACGUGUCACGUTT 3', 反义链, 5' ACGUGACACGUUCGGAGAATT 3'.

1.2.2 RT-PCR 检测 EphA2 基因表达. 根据 RNArose Reagent 试剂说明书, 抽提正常脑组织及两种胶质瘤细胞 U251、U87 中的总 RNA. 紫外分光光度计进行核酸定量, 取 2 μg 总 RNA 于 37℃ 经 DNase(Promega 公司)消化处理, 在逆转录酶(Promega 公司), RNA 酶抑制剂(Promega 公司)作用下进行反转录合成 cDNA, 取反转录产物 5 μl 为模板进行 PCR 以扩增 EphA2 基因及内参 GAPDH 基因. PCR 反应条件如下: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共进行 34 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min. 所用引物如下: EphA2 上游引物, 5' TTCAGCCACCAC-AACATCAT 3'; EphA2 下游引物, 5' TCAGACA-CCTTGCAGACCAG 3'; GAPDH 上游引物, 5' GTCGTGGAGTCTACTGGCGTCTT 3'; 下游引物, 5' CAGTCTTCTGAGTGGCAGTGATGG 3'. EphA2 的 PCR 产物长度为 263 bp. GAPDH 的 PCR 产物长度为 280 bp. PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳(含 0.15 g/L 溴化乙锭)分离后, 用 GDS8000 凝胶成像分析系统拍照分析.

1.2.3 转染 siRNA.

a. 细胞转染及转染效率测定. 转染的细胞选用复苏后传代 3~5 代的细胞, 转染试剂选用 INTERFERin™, 转染程序严格按照转染试剂的说明进行. 具体方法为: 转染前一天把细胞消化传代, 转染时, 给细胞换新鲜的培养液. 用 Opti-MEM 稀释 siRNA, 加入适量 INTERFERin, 混匀, 室温下孵育 10 min 后滴加到细胞中, 适时收集细胞. 用终浓度为 50 nmol/L 的绿色荧光素标记的小干扰 RNA(FITC-siRNA)转染细胞, 24 h 后收集细胞并用流式细胞仪检测转染效率.

b. Western blot 检测 EphA2 蛋白水平. U251 细胞于转染前一天接种到 6 孔平板中, 使得转染时细胞融合度为 30%~50%. 培养条件、转染条件如前所述. 转染分 3 个组: A 组, 转染非特异性对照组(NC) siRNA 50 nmol/L, B 组, 转染 siRNA-EphA2 10 nmol/L, C 组, 转染 siRNA-EphA2 50 nmol/L. 转染 48 h 后收集细胞, 总蛋白的提取用赛百胜公司的 Protein Extraction solution, 并且用 Bradford 方法定量蛋白质. 上样前取 20 μg 等量蛋白质加上等体积 2× 上样缓冲液, 于 95℃ 变性 10 min 后进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 分离胶浓度为 10%, 积层胶浓度为 4%, 积层胶中所用电压为 120 V, 在分离胶中为 160 V. 电泳结束后, 恒流 200 mA, 90 min 将蛋白质转到 PVDF 膜上, 然后用含 5% BSA 的 TTBS 室温封闭 1 h, 分别加入 1:5 000 稀释的小鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体(Kangchen 公司)和 1:500 稀释的兔抗人 EphA2 多克隆抗体, 稀释液为含 1% BSA 的 TTBS, 4℃ 杂交过夜. TTBS 洗膜 4 次, 每次 5 min 后分别加入 1:10 000 稀释的羊抗鼠和鼠抗兔 IgG-HRP(Kangchen 公司), 稀释液为含 1% BSA 的 TTBS, 室温杂交 1 h, TTBS 洗膜 4 次, 每次 10 min. 之后向膜上滴加 1.5 ml SuperSignal west Pico Chemiluminescent Substrate(Thermo)进行化学发光, 用 Western blot 荧光成像分析仪检测图像.

c. 实时定量 RT-PCR(Real-time RT-PCR). 转染前一天把细胞消化传代至 12 孔平板中, 使得转染时细胞融合度为 30%~50%. 实验分 3 组, 每组 3 个重复. A 组: NC siRNA 10 nmol/L, B 组: EphA2-siRNA 10 nmol/L, C 组: EphA2-siRNA 50 nmol/L. 48 h 后收集细胞, 抽取总 RNA. 取 1 μg 总 RNA 反转录成 cDNA, 用均等的 2 μl cDNA 作为模板进行实时定量 PCR 反应. 反应体系中含

有 1 μl 的荧光染料 EvaGreen (20 $\times$), 所用引物同前面所述. 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s; 68 $^{\circ}\text{C}$ 退火及延伸 30 s, 82 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 s 解链引物二聚体, 读板, 共进行 44 个循环. 然后, 用 $\Delta\Delta\text{CT}$ 法^[13] 进行计算.

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡. 将细胞接种至 6 孔板中, 24 h 后转染细胞, 分别设立对照组和实验组, 均采用 50 nmol/L 的转染浓度, 转染 48 h 后收集细胞, PBS 洗一遍, 根据 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒的说明书, 用 1 $\times$ 结合液 500 μl 重悬细胞, 加入 5 μl Annexin V 和 10 μl PI. 避光孵育 10 min 后, 用流式细胞仪检测细胞凋亡率.

1.2.5 CCK-8 检测细胞增殖. 将 U251 细胞传代至一个 96 孔板中, 每孔细胞数量约为 2 000 个, 24 h 后, 换 100 μl 新鲜培养液, 转染细胞, 采用 10 nmol/L 的转染浓度, 分别于转染后 0 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h 向细胞培养液中加入 10 μl CCK-8, 入细胞培养箱中孵育 3 h 后, 测量 450 nm 处吸光度.

1.2.6 伤口愈合实验. 在转染前 24 h, 把细胞消化传代到 12 孔板中, 使得转染时细胞融合率达到 60%~80%, 分别设立实验组和对照组, 转染浓度均为 50 nmol/L, 转染后 24 h, 用吸头在每个孔中划出宽度基本相同的一道无细胞区域, 即类似一道伤口. 继续在培养箱中孵育 24 h, 观察伤口愈合情况, 即细胞的迁移能力, 然后照像保存.

1.2.7 Transwell 小室检测细胞侵袭能力. 用 BD Growth Factor Reduced (GFR) MatrigelTM Invasion Chambers 检测细胞的侵袭能力. 首先转染细胞, 转染浓度均为 50 nmol/L, 分别设计对照组和实验组, 转染的细胞在细胞培养箱中培养 24 h 后, 将无 FBS 的 DMEM 高糖培养基 500 μl 加入 Transwell 小室的上室, 放入培养箱中水化 2 h. 水化结束后, 吸弃上室的培养液, 向下室中加入 750 μl 含 10%FBS 的 DMEM 高糖培养基, 然后用胰酶消化转染 24 h 的细胞, 用含 0.1%BSA 的无血清 DMEM 高糖培养基重悬细胞, 采用血细胞计数器多次重复计数细胞, 吸取含有 1×10^5 个细胞的悬液加入上室, 并用无血清的 DMEM 高糖培养基补充上室溶液至 500 μl . 放入培养箱中继续孵育 24 h, 孵育结束后, 吸弃上室中的溶液, 用较小的棉签轻轻擦去小室内侧壁未转膜的细胞, 用 0.1% 结晶紫染小室膜 15 min, 晾干, 拍照保存, 然后计数(被结晶紫染色的细胞数)观察结果.

1.2.8 统计分析. 各实验独立重复 3 次以上, 所选图表为重复实验的结果之一. 数据处理用 sigmaplot 10 软件分析, 数据两两比较用 Student *t* 检验进行, $P < 0.05$ 认为具有统计学意义. $P < 0.01$ 认为具有显著统计学意义.

2 结 果

2.1 RT-PCR 检测 EphA2 基因表达情况

RT-PCR 检测正常脑组织和两种胶质瘤细胞系中 EphA2 基因表达情况, 图 1 显示, 正常脑组织中 EphA2 mRNA 表达水平很低, 而两种胶质瘤细胞 U251 和 U87 中 EphA2 mRNA 的表达水平分别为正常脑组织的 8.8 和 8.7 倍.

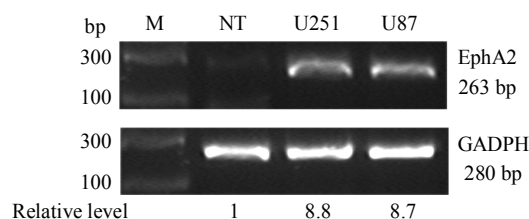


Fig. 1 Expression of EphA2 mRNA levels in normal brain tissue (NT) and two glioma cell lines (U251 and U87)

2.2 转染 siRNA

转染效率: 设立空白对照组和转染 50 nmol/L 带有绿色荧光 FITC 的 siRNA, 转染 24 h 后收集细胞, 用流式细胞仪检测转染效率. 经 WinMDI 2.9 软件分析, M2 期的数值代表阳性转染率, 图 2a 显示转染效率高达 70.31%. Western blot 检测转染 10 nmol/L 和 50 nmol/L siRNA-EphA2, 在 48 h 后与阴性对照组比较蛋白质的表达量. 经 Muti-gauge 软件分析: 转染 10 nmol/L siRNA-EphA2, 蛋白质的抑制率达到 50%, 转染 50 nmol/L siRNA-EphA2, 蛋白质的抑制率到达 70%, 具有统计学意义 (图 2b). 实时定量 RT-PCR 分别转染 10 nmol/L, 50 nmol/L siRNA-EphA2, 48 h 后收集细胞, 抽提 RNA, 然后逆转录成 cDNA, 按照实时定量 PCR 体系采用检测转染 siRNA-EphA2 后与阴性对照组比较 mRNA 水平的变化. 结果经 opticon monitor analysis software 软件分析, 转染 10 nmol/L, 50 nmol/L siRNA-EphA2 后 mRNA 的表达水平与阴性对照组相比分别降低了 45%, 70%, 图片数值取自 3 次重复实验的平均值(图 2c).

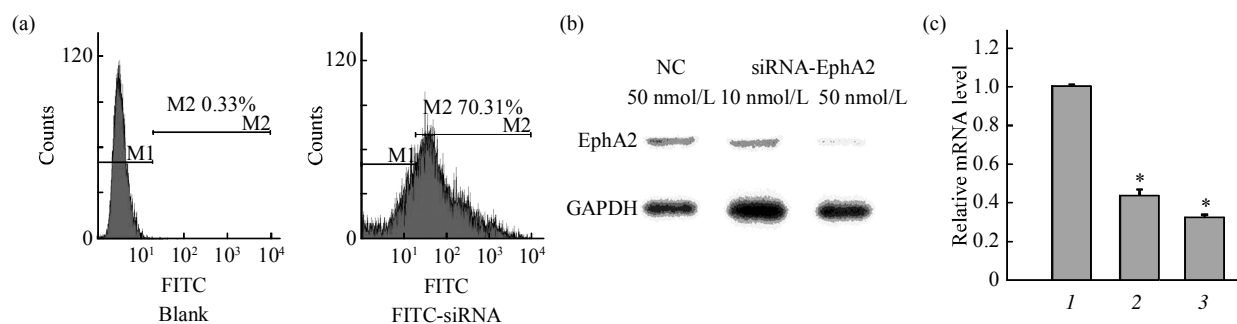


Fig. 2 Knock down EphA2 gene by transfecting with siRNA-EphA2 in U251 cell line

(a) The transfection efficiency is tested by flow cytometry, and the transfection efficiency is up to 70.31%. (b) Different-concentration of siRNA-EphA2 or 50 nmol/L of non-specificity siRNA (NC) were transfected in U251 cell. 48 h post-transfection, the EphA2 protein were detected by Western blot. (c) Silencing the receptor EphA2 inhibited the expression of receptor EphA2 mRNA in concentration-dependent manner in U251 cell line through Real-time PCR. The values of 10 nmol/L and 50 nmol/L siRNA-EphA2, were considered significant at $P < 0.01$ (*) versus the control respectively. The results are expressed as the $\bar{x} \pm s$ from 3 independent experiments. 1: NC; 2: 10 nmol/L siRNA-EphA2; 3: 50 nmol/L siRNA-EphA2.

2.3 Annexin V, PI 双染检测细胞凋亡

转染 48 h 后的 siRNA-EphA2 实验组细胞和阴性对照组细胞, 分别用 Annexin V, PI 双染, 上流式细胞仪检测细胞凋亡率的差别. 用 WinMDI 2.9

软件分析阴性对照组的凋亡率为 6.56%, 转染 siRNA-EphA2 组的凋亡率为 28.21%. 统计学分析 $P < 0.01$, 有显著的意义(图 3).

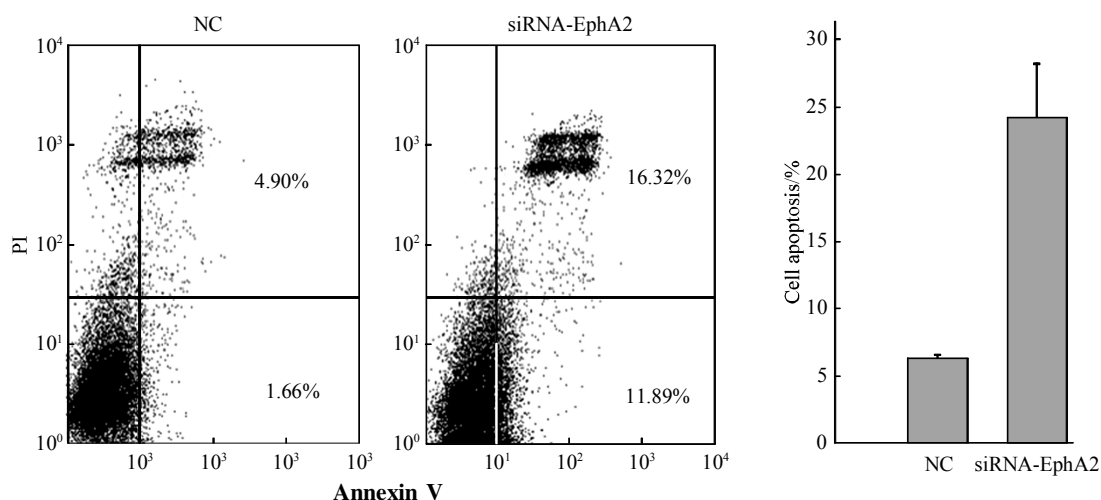


Fig. 3 The graph illustrates Annexin-V/propidium iodide staining of glioma cell line U251

U251 cells were transfected with small interfering RNA (siRNA) for the receptor EphA2 (50 nmol/L) or non-specificity siRNA (NC) of 50 nmol/L, then the cells were subjected to flow cytometry. The values were considered significant at $P < 0.01$ versus control.

2.4 CCK-8 检测转染 siRNA-EphA2 与非特异性 siRNA 后细胞增殖水平的变化

分别在转染 0 h, 48 h, 72 h, 96 h 的时间点收集细胞培养液, 用分光光度计在 450 nm 处检测吸光度(A_{450}), 把各个时间点的吸光度值连线起来. 根据吸光度值与活细胞活力成正比的原理, 我们发现转染 siRNA-EphA2 与阴性对照组(NC)相比细胞增殖受到了明显的抑制(图 4).

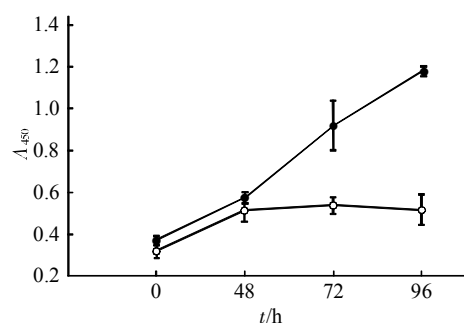


Fig. 4 Knock down of the receptor EphA2 gene inhibited the proliferation of U251 cells as evaluated by the CCK-8 assay

●—●: NC; ○—○: siRNA-EphA2.

2.5 伤口愈合实验检测细胞的迁移能力

划线后观察 24 h 可以看出, 与转染阴性对照组相比, 转染 50 nmol/L siRNA-EphA2 的实验组进入空白处的细胞明显减少, 表明削弱 EphA2 表达水平使细胞迁移能力受到影响(图 5).

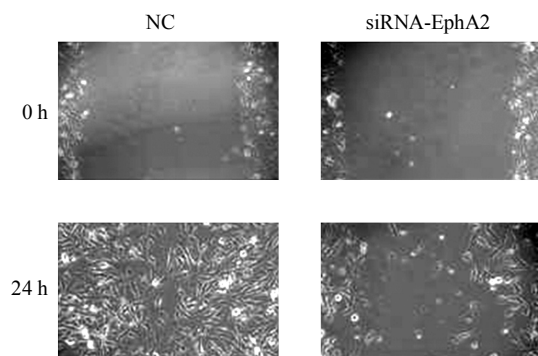


Fig. 5 Silencing the receptor gene EphA2 inhibited the haptotactic migration of malignant glioma cells (U251)

2.6 侵袭实验

Transwell 小室的实验结果(图 6)可明显看出, 经 siRNA-EphA2 处理后的 U251 细胞穿小室膜的细胞数量明显少于阴性对照组, 提示 EphA2 基因的表达下调使细胞的侵袭能力受到抑制.

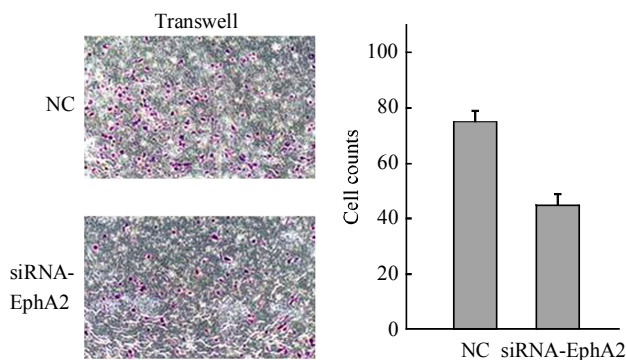


Fig. 6 Knock down effect on EphA2 by siRNA attenuated U251 cells invasion ability

3 讨 论

受体酪氨酸激酶家族(RTKs)的成员常常是转化致癌基因的产物, 与人类肿瘤的发生和发展有着广泛的联系^[14]. Eph 家族是目前知道的最大的一个 RTKs 亚族, EphA2 是 Eph 家族中的第二个成员, 它可以通过胞外配体结合区结合 ephrinA1-A5, 形成复合物, 激活胞质的酪氨酸磷酸酶活化, 从而启动不同信号途径将信号逐级传递, 主要参与胚胎发育, 细胞迁移导向和血管形成等生物学过程. 大量

的研究表明, EphA2 在一些肿瘤组织中的表达量明显高于正常组织, 这种结果也同样存在于神经胶质瘤中. 实验研究表明 90% 的多型性恶性胶质瘤组织和瘤细胞系中 EphA2 mRNA 较正常脑组织表达量增高. 且在鼠类的胶质瘤组织中发现 EphA2 的水平也是升高的^[15]. 我们的实验证实了: 在两种胶质瘤细胞系(U251、U87)中 EphA2 mRNA 表达水平显著高于正常脑组织标本. 由此可见, EphA2 在神经胶质瘤的发生和发展过程中起到了一定的作用. 并且抑制这个基因的表达可能是一个可以用于医学治疗的方法.

EphA2 蛋白在细胞膜上有两种状态: a. ephrinA1 配体与 EphA2 受体结合形成复合物后, 可以引起 EphA2 受体发生磷酸化, 通过信号转导到下游信号调节细胞正常的生长, 发育等, 同时复合物还可以使 EphA2 受体自身降解. b. 在肿瘤细胞中, EphA2 通常是去磷酸化状态且表达水平是升高的, 原因在于肿瘤细胞中, 细胞之间的连接是不稳定的, 引起 EphA2 不能有效地与细胞外的配体结合并发生磷酸化, 同时, EphA2 的降解也就减少了^[15].

EphA2 在正常细胞中的作用体现在: a. 在正常细胞中, EphA2 与配体 ephrine-1 结合后, 可以在一系列的细胞系中抑制 Ras/MAPK 级联反应, 并且可以减弱由 PDGE、EGF、VEGF 等引起的 MAPK 的活性, 从而抑制细胞的增殖^[16]. b. 正常细胞中, EphA2 可以诱导细胞凋亡. 研究证明, EphA2 是野生型 p53 及其家族(p63, p73)成员的靶基因. 磷酸化的 EphA2, 可以招募蛋白酪氨酸磷酸酶 SHP2, 使 FAK 去磷酸化并失活, FAK 的信号传导受到抑制, 导致细胞凋亡的发生^[17]. c. EphA2 胞内区 SAM 结构域中保守的 Tyr932 磷酸化后可与 SH2 结合, 而很多参与调节细胞形态、黏附的信号蛋白和酶, 如 Ras-GTPase 激活蛋白、磷脂酰肌醇 3- 激酶(PI3K)等相互作用的蛋白质都含有 SH2 结构域, 从而 EphA2 可以通过上述蛋白质和酶, 调节细胞形态、黏附和运动等.

在肿瘤细胞中, 由于 EphA2 不能有效地与细胞外的配体结合并发生磷酸化, 所以, EphA2 在肿瘤细胞中的作用与其在正常细胞中截然不同. EphA2 在一系列的恶性肿瘤中是一个癌蛋白, 它促进了细胞的生长加强了细胞的侵袭能力. 在恶性间皮细胞瘤中, 由于细胞分化失调, 细胞异常生长和细胞与细胞之间的连接不紧密导致了细胞内

EphA2 聚集^[18]。在高表达 EphA2 的乳腺癌组织中, 转染表达 EphA2 突变体, 引起肿瘤体积减小和肿瘤细胞凋亡增加, 并且这种变化是因为缺乏 RhoA GTP 酶活化引起的^[19]。在胰腺癌中增强了 ephrinA1 的活性使得 EphA2 的表达降低, 并且减弱了肿瘤细胞的迁移和侵袭能力^[20]。同时, EphA2 在肿瘤新血管形成及侵袭转移中起到了很重要的作用, EphA2 和其配体 ephrinA1 表达于多种癌组织和其血管内皮系统, 而且抑制 EphA2 的活化可以削弱肿瘤的血管形成^[21]。可见, EphA2 在许多肿瘤中的作用是多样的, 并且与肿瘤的恶性相关。因此抑制 EphA2 可以成为一个新的治疗靶点。

RNA 干扰技术是把体外合成的一段双链的小分子 RNA 导入细胞, 使具有同源序列的基因表达受到抑制, 是一种新颖的有效的研究肿瘤基因的方法。目前, 把这项技术应用于肿瘤基因治疗是新兴的热点^[22]。

与正常间皮细胞相比, EphA2 高表达于恶性间皮瘤细胞系及原发的肿瘤组织, 并且应用 RNA 干扰技术下调 EphA2 的表达, 引发了由 caspase-9 介导的细胞凋亡, 减少肿瘤细胞的活力, 降低侵袭和转移能力^[23]。在骨肉瘤细胞中, 转染进带有 siRNA-EphA2 的质粒, 发现细胞呈现低水平生长, 高水平凋亡和低微血管密度状态^[24]。提示 RNA 干扰技术抑制 EphA2 基因的过表达可以有效抑制肿瘤的恶性行为。

本实验是在研究证明 EphA2 在恶性多型性胶质瘤中高表达的前提下, 应用针对 EphA2 的 siRNA, 把其转染到胶质瘤细胞系 U251 中, 发现, 无论是在基因水平还是蛋白质水平, 都检测到了较转染非特异性 siRNA 组减少的情况。这说明我们化学合成的 siRNA-EphA2 是有效的。在 EphA2 低表达水平, 我们同时用 CCK-8 检测到细胞的生长速度及密度相对未处理组是明显下调的。此外, 用凋亡试剂盒 Annexin V, PI 双染检测到转染入针对靶基因 siRNA 组的胶质瘤细胞无论是早期凋亡率还是晚期凋亡率都显著高于阴性对照组。我们还利用细胞迁移和侵袭方面用伤口愈合实验和 Transwell 小室实验证明, 在 EphA2 低表达组, 细胞的伤口愈合能力减弱即细胞迁移能力减少并且细胞的侵袭能力减弱。这就与上述观点一致, 恶性神经胶质瘤中, EphA2 也是一个癌蛋白, 可以加快肿瘤的生长和侵袭能力。当我们靶向抑制 EphA2 后, 抑制了细胞增殖、增加了细胞凋亡、加强了细

胞之间的连接。此结果与 Liu 等^[25]在胶质瘤细胞 U251 中转染进 ephrin-A1, 发现减弱了肿瘤细胞的生长和移动的结果是一致的。

此外, 我们实验室之前的数据(文章正在出版中)显示, EphB4 对神经胶质瘤细胞系 U251 的影响也是体现在增殖、凋亡、迁移、侵袭方面的。而与 EphB4 相比, 抑制 EphA2 基因后, 在细胞增殖、细胞迁移和侵袭方面出现了比抑制 EphB4 更明显的作用, 但在细胞凋亡方面, 两者的作用是同等的。Eph 家族还有很多其他的成员, 那些成员在神经胶质瘤的作用又是体现在哪里呢? 这是一个值得继续深入研究的问题。

本研究为国内外首次报道使用针对受体酪氨酸蛋白激酶 EphA2 受体的 siRNA, 沉默该基因表达使 U251 细胞在增殖、凋亡、迁移、侵袭方面受到影响, 表明了运用 siRNA-EphA2 是一种有效抑制 U251 细胞恶性行为的方法, 至于 siRNA-EphA2 如何能作用于人体, 成为有效的治疗手段仍是一个难题, 有待进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 Birgbauer E, Cowan C A, Sretavan D W, *et al.* Kinase independent function of EphB receptors in retinal axon pathfinding to the optic disc from dorsal but not ventral retina. *Development*. 2000, **127**(6): 1231~1241
- 2 Helbling P M, Saulnier D M, Brandli A W. The receptor tyrosine kinase EphB4 and ephrin-B ligands restrict angiogenic growth of embryonic veins in *Xenopus laevis*. *Development*, 2000, **127** (2): 269~278
- 3 Kiyokawa E, Takai S, Tanaka M, *et al.* Overexpression of ERK, an EPH family receptor protein tyrosine kinase, in various human tumors. *Cancer Res*, 1994, **54**(14): 3645~3650
- 4 Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 1990, **61**(2): 203~212
- 5 Zelinski D P, Zantek N D, Stewart J C, *et al.* EphA2 overexpression causes tumorigenesis of mammary epithelial cells. *Cancer Res*, 2001, **61**(5): 2301~2306
- 6 Miyazaki T, Kato H, Fukuchi I M, *et al.* EphA2 overexpression correlates with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 2003, **103**(5): 657~663
- 7 Walker-Daniels J, Coffman K, Azimi M, *et al.* Overexpression of the EphA2 tyrosine kinase in prostate cancer. *Prostate*, 1999, **41** (4): 275~280
- 8 Easty D J, Bennett D C. Protein tyrosine kinases in malignant melanoma. *Melanoma Res*, 2000, **10**(5): 401~411
- 9 Thaker P H, Deavers M, Celestino J, *et al.* EphA2 expression is associated with aggressive features in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2004, **10**(15): 5145~5150
- 10 Wykosky J, Gibo D M, Stanton C, *et al.* EphA2 as a novel molecular marker and target in glioblastoma multiforme. *Mol Cancer Res*, 2005, **3**(10): 541~551

- 11 Miller C R, Perry A. Glioblastoma. Arch Pathol Lab Med, 2007, **131** (3): 397~406
- 12 Mark S Duxbury, Hiromichi Ito, Michael J Zinner, *et al.* EphA2: a determinant of malignant cellular behavior and a potential therapeutic target in pancreatic adenocarcinoma. Oncogene, 2004, **23**(7): 1448~1456
- 13 Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat Protoc, 2008, **3**(6): 1101~1108
- 14 Van der Geer P, Hunter T, Lindberg R A. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. Annu Rev Cell Biol, 1994, **10**: 251~337
- 15 Alker-Daniels J, Hess A R, Hendrix M J, *et al.* Differential regulation of EphA2 in normal and malignant cells. Am J Pathol, 2003, **162**(4): 1037~1042
- 16 Miao H, Wei B R, Peehl D M, *et al.* Activation of EphA receptor tyrosine kinase inhibits the Ras/MAPK pathway. Nat Cell Biol, 2001, **3**(5): 527~530
- 17 Dohn M, Jiang J, Chen X. Receptor tyrosine kinase EphA2 is regulated by p53-family proteins and induces apoptosis. Oncogene, 2001, **20**(45): 6503~6515
- 18 Nasreen N, Mohammed K A, Lai Y, *et al.* Receptor EphA2 activation with ephrinA1 suppresses growth of malignant mesothelioma (MM). Cancer Lett, 2007, **258**(2): 215~222
- 19 Fang W B, Brantley-Sieders D M, Parker M A, *et al.* A Kinase-dependent role for EphA2 receptor in promoting tumor growth and metastasis. Oncogene, 2005, **24**(53):7859~7868
- 20 Duxbury M S, Ito H, Zinner M J, *et al.* Ligation of EphA2 by Ephrin A1- Fc inhibits pancreatic adenocarcinoma cellular invasiveness. Biochem Biophys Res Commun, 2004, **320**(4): 1096~1102
- 21 Cheng N, Brantley D M, Liu H, *et al.* Blockade of EphA receptor tyrosine kinase activation inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced angiogenesis. Mol Cancer Res, 2002, **1**(1): 2~11
- 22 Yu J Y, Deruiter S L, Turner D L. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, **99**(9): 6047~6052
- 23 Nasreen N, Mohammed K A, Antony V B. Antony silencing the receptor EphA2 suppresses the growth and haptotaxis of malignant mesothelioma cells. Cancer, 2006, **107**(10): 2425~2435
- 24 Zhang L Z, Cai X S, Qian Z K, *et al.* Effect of EPHA2-siRNA plasmid on biological behavior of human osteosarcoma cells *in vitro*. Chin J Oncology, 2007, **29**(8):566~569
- 25 Liu D P, Wang Y, Koeffler H P, *et al.* Ephrin-A1 is a negative regulator in glioma through down-regulation of EphA2 and FAK. Int J Oncol, 2007, **30**(4): 865~871

Function Study of EphA2 Gene in The Cell Apoptosis, Growth, Migration and Invasion of Glioma Cell Line U251*

BAI Yan-Yan¹⁾, SHI Yi²⁾, HUI Guo-Zhen³⁾, ZHANG Yan-Rong¹⁾, DONG Wan-Li^{1)*}, HU Jin^{4)*}, JIN You-Xin^{2)*}

¹⁾ Department of Neurology, The Affiliated First Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China;

²⁾ Institute of Biochemistry and Cell Biology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

³⁾ Department of Neurosurgery, The Affiliated First Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China;

⁴⁾ Department of Neurosurgery, The Affiliated Six Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract In order to explore the function of EphA2 gene on the proliferation, apoptosis, motility and invasion of glioma cell line U251. The EphA2 mRNA levels of normal brain and two glioma cell lines U251 and U87 were detected by reverse transcription PCR (RT-PCR). Then, the function of EphA2 in glioma cell line U251 was analyzed by RNAi technology. The expression level of EphA2 gene was higher in U251 and U87 cells than that in normal brain. siRNA targeting EphA2 was designed and synthesized and then the siRNA was transfected into U251 cell with a high transfection efficiency of 70.31%. 50 nmol/L of siRNA could lead to over 70.0% reduction in EphA2 protein and mRNA level detected by Western blot and RT-PCR respectively. The cell proliferation was notably attenuated and the apoptosis was significantly increased after EphA2 was downregulated. The migration and invasion of glioma cells were also attenuated when EphA2 was knocked down by siRNA. EphA2 plays an important role in the malignance of glioma U251 cells and may be a novel molecular marker for the malignance of the glioma cell line U251. EphA2 could be a potential target in gene therapy for glioma.

Key words glioma, U251, siRNA, EphA2

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00598

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30770824).

**Corresponding author.

DONG Wan-Li. Tel: 86-512-67780307, E-mail: dwlsz@163.com

HU Jin. Tel: 86-21-64369181, E-mail: hujin_dana@126.com

JIN You-Xin. Tel: 86-21-54921112, E-mail: yxjin@sibs.ac.cn

Received: August 28, 2008 Accepted: October 27, 2008