

RNA 干扰技术体外抑制肝星状细胞表皮形态发生素表达及其对肝癌细胞迁移能力的影响*

石磊^{1, 2)} 贾雅丽¹⁾ 张晓梅³⁾ 袁红丰¹⁾ 曾泉¹⁾
周军年¹⁾ 岳文^{1)**} 裴雪涛^{1)**}

(¹⁾ 军事医学科学院输血医学研究所干细胞与再生医学研究室, 北京 100850; (²⁾ 解放军 302 医院感染性疾病诊疗与研究中心, 北京 100039;
(³⁾ 解放军总医院消化内科, 北京 100853)

摘要 肿瘤微环境中肝星状细胞能够影响肝癌细胞的生物学行为。在肝脏发育过程中, 肝星状细胞通过表皮形态发生素(epimorphin, EPM, syntaxin2)与肝干细胞接触而促进肝干细胞的功能性分化。EPM 在溃疡性结肠炎、间质性肺炎以及结肠癌中也发挥了重要的作用。发现肝细胞癌(HCC)细胞能够促使星状细胞 EPM 表达上调。为了研究肝星状细胞的 EPM 对于肝癌可能的作用, 构建了针对 EPM 基因表达的 shRNA 干扰载体, 并将质粒转染肝星状细胞, 获得了两株携带该干扰片段的细胞系。RT-PCR 与 Western blot 检测结果表明, 转基因干扰星状细胞系 EPM mRNA 和蛋白质表达量明显降低。之后, 使用转基因细胞系的条件培养基对于肿瘤细胞进行侵袭能力的检测, 并对星状细胞与肝癌细胞三维共培养, 证明 EPM 干涉后肝星状细胞促进肿瘤细胞迁移的能力降低。结果表明通过 RNAi 可稳定干扰人肝星状细胞 EPM 基因的表达, 并且 EPM 能够促进肝癌细胞的转移。

关键词 RNA 干扰, 人肝星状细胞, 表皮形态发生素, 癌, 肝细胞, 细胞交流

学科分类号 R34

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00660

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球癌症相关性死亡的主要原因之一, 其发病过程复杂, 大部分 HCC 的发生均有肝硬化背景, 目前有关 HCC 发病机制的研究出现许多热点。肿瘤微环境(tumor microenvironment)是一个复杂的综合系统, 它由许多基质细胞组成, 包括肝星状细胞、免疫和炎性细胞、脂肪细胞、胶质细胞、平滑肌细胞以及一些血管细胞等^[1]。这些细胞可以被肿瘤细胞诱导, 在其周围产生大量的生长因子、细胞趋化因子以及基质降解酶, 有利于肿瘤细胞的增殖和侵袭^[2-3]。

肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是肝脏正常及病理情况下细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的主要来源, HSC 活化合成大量 ECM 是肝纤维化和肝硬化发生的核心环节。研究表明, 星状细胞除存在于肝脏和胰腺外, 也存在于肺、肾、小肠等部位^[4-5]。自 Enzan 等^[6]通过 α -平滑肌肌动蛋

白(α -smooth muscle actin, α -SMA)染色发现 HCC 基质中有明显的肌纤维母细胞(myofibroblast, MFB)浸润以来, 肝癌微环境中肿瘤细胞与 HSC 的生物学行为逐渐受到关注。目前, 有研究指出肿瘤微环境中的 HSC 能够显著影响 HCC 细胞的生物学行为, 促进 HCC 细胞浸润与增殖^[7-9]。

人表皮形态发生素(epimorphin, EPM, syntaxin-2)基因定位在 7 号染色体, 基因编码序列为 911 bp, 编码 290 个氨基酸。EPM 蛋白存在着 3 种亚型: I、II 型为 34 ku, III 型为 31 ku, 这 3 种形式的蛋

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2005CB522702, 2009CB521704)和国家自然科学基金(30900857)资助项目。

** 通讯联系人。

岳文. Tel: 010-66931949, E-mail: wenyue26@yahoo.com

裴雪涛. Tel: 010-66932240, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2011-01-06, 接受日期: 2011-02-17

白质是由选择性剪接产生的^[10-11]。EPM 高度保守, 主要表达于与表皮组织、肌肉和血管相邻近的组织、外分泌和内分泌腺等, 在正常肝脏主要表达于肝窦状隙的肝星状细胞(HSC)、汇管区血管和胆管上。EPM 通过表皮-间质相互作用介导表皮形态发生, 腺管状结构或球状类器官体的形成^[11-12]。肝脏发育过程中, HSC 主要通过表面特异性表达的 EPM 与肝干细胞直接接触而促进肝干细胞的功能性分化^[13]。在某些疾病中, EPM 也发挥了重要的作用。Bascom 等^[14]发现未生育和初产雌性 WAP-EPM 小鼠发生肺泡异常增生和高分化腺癌, 表明在乳腺正常的形态发生过程改变会导致肿瘤。EPM 在溃疡性结肠炎病人中 EPM 阳性细胞的数量和表达谱都会发生改变^[15]。在非特异性间质性肺炎中, EPM 参与了弥漫间质性肺纤维化的修复^[16]。

为进一步研究肿瘤微环境中 EPM 在肝星状细胞对肝癌细胞影响过程中发挥的作用, 我们使用 HCC 条件培养基培养 HSC, 鉴定 EPM 表达是否会发生改变, 并希望通过 RNAi 技术降低肝星状细胞中 EPM 的表达, 进一步研究了 EPM 干涉后 HSC 对肝癌细胞生物学行为的影响。本文使用 RNAi 技术成功构建了 EPM 沉默的肝星状细胞, 发现 EPM 沉默的肝星状细胞促进肝癌细胞迁移的能力减弱, 并且在三维共培养体系中成球能力增强, 这一现象提示 EPM 与肿瘤转移相关。

1 材料与方法

1.1 材料

LX-2 细胞购自中南大学中心实验室; HBx F344、HepG2、MHCC97H 由军事医学科学院干细胞与再生医学研究室保存; 限制性内切酶、dNTP、Taq 酶及快速连接试剂盒均购自宝生物公司(Takara); 引物合成及测序由上海英骏(Invitrogen)公司完成; pSicoR-PGK-puro (Addgene, Inc.); 高糖培养基、Puromycin、Polybrene 购自 Sigma 公司; 胎牛血清

购自 Hyclone 公司; Lipofectamine 2000 及 TRIzol 均购自 Invitrogen 公司; EPM 抗体购自 Abcam 公司; HRP-IgG 购自中杉金桥公司; Matrigel 胶和 Transwell 小室购自 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及条件培养基获取。LX-2、HBx F344、HepG2、MHCC97H 细胞置 37℃、5% CO₂ 孵箱中使用高糖 DMEM 添加 10%FBS 培养。为获得条件培养基, 细胞置 37℃, 5% CO₂ 孵箱中添加完全培养液培养, 待细胞生长至 80%~90%汇合时, 使用无血清高糖 DMEM 冲洗 3 次, 加入无血清高糖 DMEM 继续培养, 48 h 之后收取培养基, 2 000 g 离心, 取上清分装冻存于-70℃备用。

1.2.2 实时定量 PCR 检测肿瘤细胞条件培养基培养后 LX-2 细胞中的 EPM 表达水平。用 TRIzol 提取肿瘤细胞条件培养基培养后 LX-2 细胞总 RNA, 各取 1 μg 总 RNA 进行反转录得到 cDNA。采用 SYBR Green 法实时定量 PCR 检测 EPM 的表达。所用引物序列为: EPM 上游引物, 5' CCATCTTC-ACTTCCGACATTAT 3', EPM 下游引物: 5' GT-GGCATTCATAACATTTCTT 3'; GAPDH 上游引物, CTGACTTCAACAGCGACACC; GAPDH 下游引物, TGCTGTAGCCAAATTCGTTGT。各组 PCR 均重复 3 次。

1.2.3 人 EPM 基因慢病毒干涉载体的构建。通过 RNAi 序列设计软件(<http://www.promega.com/siRNA Designer/program/>)设计产生了针对人 EPM 基因并符合慢病毒干涉载体 pSico-PGK-puro 插入序列要求的 5 条干涉片段(表 1)。合成引物后, 经退火、磷酸化, 连接到使用 *Hpa* I 和 *Xho* I 酶切过的慢病毒干涉载体, 转化 DH5α 感受态细胞, 挑选阳性克隆并提取质粒, 经 *Xho* I、*Xba* I 双酶切鉴定正确后测序鉴定。以 pSico-PGK-puro 为对照质粒。

Table 1 RNA interference oligonucleotides of EPM

	Forward primer(5'→3')	Reverse primer(5'→3')
Oligo1	TGTTAAAGGCTATTGAACAATTCAAGA	GATTGTTCAATAGCCTTTAACTTTTTC
Oligo2	TGCATGAAGTTTAATTAGGATTCAAGA	GATCCTAATTAACTTCATGCTTTTTTC
Oligo3	TGAGCAAGGCAAGAAGGAAATTCAAGA	GATTCCTTCTTGCTTGTCTTTTTTC
Oligo4	TGTGGATCTTCGGATACGAATTCAAGA	GATTCGTATCCGAAGATCCACTTTTTTC
Oligo5	TGAATGATGATGGAGACACATTCAAGA	GATGTGTCTCCATCATCATCTTTTTTC

1.2.4 瞬时转染. 将 LX-2 细胞接种于 6 孔板中, 用含 10%胎牛血清的高糖培养基, 在 37℃、5% CO₂ 条件下培养, 融合度大于 90%时瞬时转染. 用 Lipofectamine2000 转染细胞, 每孔加入溶解于 opti-MEM 的 10 μ l Lipofectamine2000 和 4 μ g ShEPM 质粒 DNA, 对照组加入与实验组等量的 Lipofectamine2000 和 pSicoR-scramble 质粒 DNA. 转染 48 h 换液, 72 h 后收获细胞用于检测.

1.2.5 包装病毒. 293-FT 细胞培养条件为: 高糖 DMEM 添加 10%FBS. 制备慢病毒干涉载体, 慢病毒干涉对照载体. 慢病毒干涉载体或慢病毒对照载体及包装质粒 pLP1、pLP2、pLP/VSVG 质粒用 Lipofectamine 2000 共转染 293FT 细胞. 10 h 后更换含 1 mmol/L 丙酮酸钠的完全培养基. 转染 48~72 h 后收集上清于 15 ml 的无菌离心管中, 4℃, 3 000 r/min 离心 15 min 以去除细胞碎片, 病毒上清分装冻存于-70℃备用.

1.2.6 获得稳定干涉 EPM 的 LX-2 细胞. LX-2 细胞培养基为高糖 DMEM 添加 10%FBS, 去除 LX-2 细胞的培养基, 加入含 EPM 干涉片段的慢病毒毒液或对照慢病毒毒液及终浓度为 8 mg/L 的 Polybrene, 置 37℃, 5%CO₂ 的孵箱中培养过夜. 次日, 去除毒液, 加入添加 2 mg/L Puromycin 的完全培养液, 培养 1 周. 药物筛选具有 Puromycin 抗性的细胞后, 干涉 LX-2 细胞和对照 LX-2 细胞分别命名为 LX-2-sh EPM 1、LX-2-sh EPM 2 和 LX-2-control.

1.2.7 RT-PCR. 用 Trizol 试剂按照说明书方法提取 LX-2-sh EPM 和 LX-2-control 细胞的总 RNA. 各取 1 μ g RNA, 反转录成 cDNA. 用 PCR 方法检测 EPM 基因的表达情况, 以 GAPDH 为内参照. 所用引物序列为: EPM 上游引物, 5' CCATCTTC-ACTTCCGACATTAT 3', EPM 下游引物: 5' GT-GGCATTTCATAACATTCTT 3'; GAPDH 上游引物, CTGACTTCAACAGCGACACC; GAPDH 下游引物, TGCTGTAGCCAAATTCGTTGT.

1.2.8 Western blotting. 用 RIPA 提取 LX-2-sh EPM 和 LX-2-control 细胞蛋白, 2 种细胞蛋白各取 100 μ g, 加入 5 $\times$ 上样缓冲液, 煮沸 5 min, 进行 SDS-PAGE, 电泳完毕, 用 iblot(Invitrogen 公司)进行转膜, 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h 后, 加入兔抗人 EPM 抗体(1:2 000), 4℃过夜, TBST 洗涤

3 次, 每次 10 min, 加入 HRP 偶联山羊抗兔二抗 (1:1 000), 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 4 次, 每次 15 min, ECL 显影. 以 β -actin 为内参照.

1.2.9 LX-2-sh EPM 1、LX-2-sh EPM 2 和 LX-2-control 细胞条件培养基的获取. 3 种细胞置 37℃, 5%CO₂ 的孵箱中添加完全培养液培养, 待细胞生长至 80%~90%汇合时, 使用无血清高糖 DMEM 冲洗 3 次, 加入无血清高糖 DMEM 继续培养, 48 h 之后收取培养基, 2 000 g 离心, 取上清分装冻存于-70℃备用.

1.2.10 划痕实验. HBx F344、HepG2、MHCC97H 置于 37℃, 5% CO₂ 的孵箱中使用高糖 DMEM 添加 10%FBS 于 6 孔板中培养, 90%~100%融合时使用无血清 DMEM 洗 3 次, 使用移液器枪头划痕, 分别加入 LX-2-sh EPM 1、LX-2-sh EPM 2 和 LX-2-shEPM control 细胞条件培养基. 72 h 后照相, 测量划痕宽度.

1.2.11 Transwell 实验. -20℃保存的 Matrigel, 4℃过夜融化. 用无血清培养基 1:6 稀释 Matrigel, 充分混匀. 取稀释的 Matrigel 400 μ l 加入 transwell 板上室, 覆盖整个聚碳酸酯膜, 37℃, 30 min, 使 Matrigel 聚合成胶. 细胞用 PBS 漂洗 3 次, 用无血清培养基制备单细胞悬液, 每个小室加入 5×10^5 个细胞, 小室置于 6 孔板中, 下层分别为 LX-2-sh EPM 1、LX-2-sh EPM 2 和 LX-2-shEPM control 细胞条件培养基.

1.2.12 MHCC97H 细胞培养. MHCC97H 细胞分别与 LX-2-sh EPM 1、LX-2-sh EPM 2 和 LX-2-shEPM control 细胞三维共培养, -20℃保存的 Matrigel, 4℃过夜融化. 微量移液枪头和 96 孔细胞培养板预先冰上预冷. 取 96 孔培养板每孔加入 10 μ l Matrigel 原液, 37℃孵育 20 min. 使用 Matrigel 胶混悬细胞, MHCC97H 细胞与 3 种 LX-2 的密度均为 0.50×10^6 /ml, 每孔种入 70 μ l 混悬液. 37℃孵育 30 min, 使 Matrigel 胶凝结后每孔加入 100 μ l 完全培养基, 每 48 h 换液一次, 并观察照相.

1.2.13 统计学处理. 定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SAS 9.1.3 统计软件进行统计分析. 本研究采用单因素两水平成组设计, 用 t 检验对平均值进行两两(ShEPM1 与 control、ShEPM2 与 control)比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义.

2 结 果

2.1 LX-2 经肝癌细胞条件培养基培养后 EPM 表达水平升高

为了研究肿瘤细胞对于星状细胞表达水平的影

响, 我们收集了肝癌细胞的条件培养基培养 LX-2 细胞. 经 72 h 后提取 LX-2 细胞总 RNA, 反转录为 cDNA 后进行荧光实时定量 PCR 检测, 证明肝癌细胞的条件培养基能够促进 LX-2 表达 EPM (图 1).

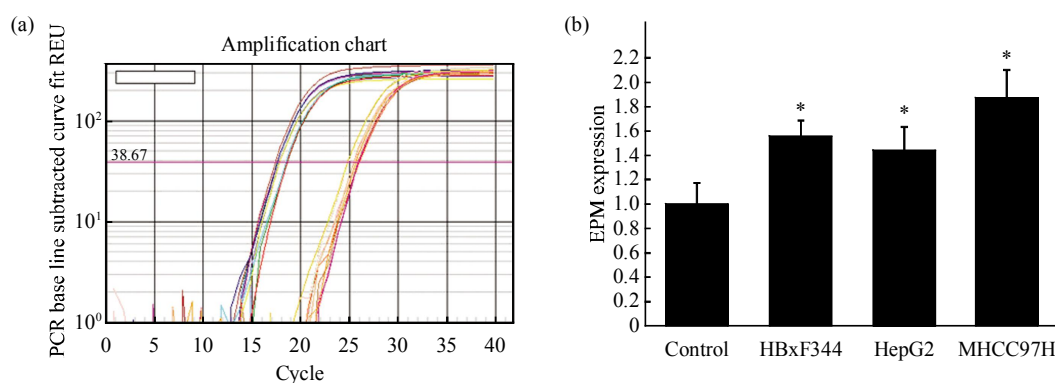


Fig. 1 Relative quantitative PCR using the comparative SYBR Green method for the detection of EPM mRNA levels in LX-2

(a) Real time PCR amplification curve. (b) The mRNA level of EPM was increased significantly in LX-2 after cultured by HCC conditioned medium compared with control. * $P < 0.05$ compared to control.

2.2 成功构建人 EPM 基因的慢病毒干扰载体

经网站提供的 RNAi 序列设计软件设计, 我们获得了 5 条 RNA 序列用于实验研究, 同时, 以 pSicoR-scramble 为对照质粒. 根据载体要求体外合成包含这些序列的 DNA 序列, 经引物退火, 磷酸化, 连接到慢病毒干扰载体, 转化 DH5 α 感受态

细胞, 挑选克隆扩大培养, 提取质粒并用 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定, 以未连接干扰片段的空干扰载体作为阴性对照, 酶切鉴定正确(图 2), 然后经测序鉴定确实已经将所设计的片段连接到慢病毒干扰载体中, 表明慢病毒干扰载体构建成功.

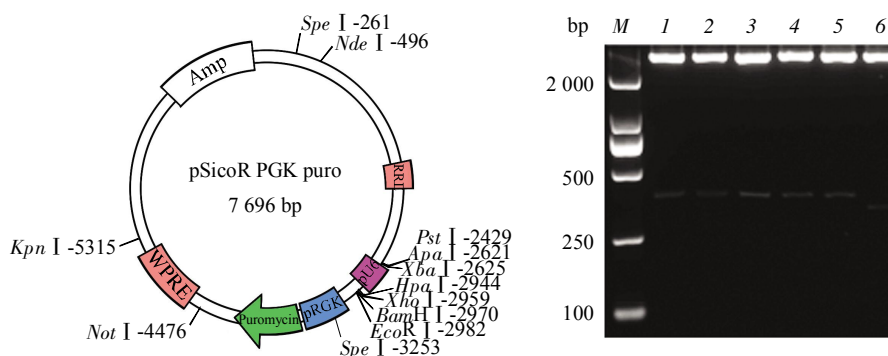


Fig. 2 Identification of shRNA expression plasmids by using restriction endonuclease

The digestion of the plasmids with *Xho* I and *Xba* I resulted in a 380 bp and 7 300 bp fragment. M: DNA marker DL2000; 1: ShEPM 1; 2: ShEPM 2; 3: ShEPM 3; 4: ShEPM 4; 5: ShEPM 5; 6: pSico-PGK-puro.

2.3 瞬时转染鉴定各干扰片段效果

瞬时转染后 72 h 消化细胞, 用 RIPA 提取细胞蛋白, 2 种细胞蛋白各取 100 μ g, 以 β -actin 为参

照进行蛋白质免疫印迹检测. 结果表明 ShEPM-1、ShEPM-2、ShEPM-4、ShEPM-5 均有较好的干扰效果(图 3), 选取 1、2 进行稳定转染实验.

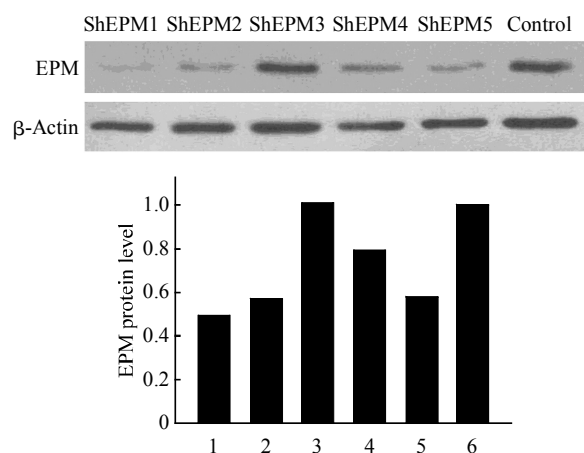


Fig. 3 Western blot analysis of EPM protein levels in LX-2 after transient transfection with shRNA expression plasmids

The results of Western blot demonstrated that the three EPM shRNA vectors (1, 2, 5) caused suppression of EPM protein expression prominently in comparison with the control.

2.4 慢病毒毒液的产生与感染获得稳定表达干涉 EPM 片段及对照的 LX-2 细胞

慢病毒毒液的产生将慢病毒干涉载体或慢病毒脱靶对照载体及包装质粒 pLP1、pLP2、pLP/VSVG 用 Lipofectamine 2000 共转染 293FT 细胞 48 h 后于显微镜下观察: 大部分细胞形成大量合胞体, 病毒已开始进行包装。转染 72 h 后收集细胞上清液并离心去除细胞碎片。将毒液分装冻存或直接感染靶细胞。感染前一天于 6 孔板中按照 5×10^5 个/孔的密度接种 LX-2 细胞, 感染时, 用添加有 8 mg/L Polybrene 的 1 ml 慢病毒毒液更换

LX-2 细胞培养基, 24 h 后更换为 2 mg/L Puromycin 的生长培养基培养, 以感染细胞为对照筛选具有 Puromycin 抗性的细胞。48 h 后未转染的细胞全部死亡。干涉 LX-2 细胞和对照 LX-2 细胞分别命名为 LX-2-sh EPM 1、LX-2-sh EPM 2 和 LX-2-control。之后换完全培养基按 1:3 传代(图 4)。

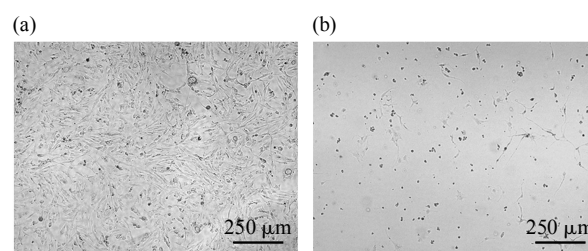


Fig. 4 After selection with puromycin for 3 days, stable cell pools were used for cell proliferation and colony formation studies

(a) LX-2 cells were infected with shRNAi-expressing lentivirus. (b) LX-2 cells were not exposed to lentivirus.

2.5 EPM 干涉效果的鉴定

分别提取 LX-2-sh EPM 和 LX-2-control 细胞总 RNA, 各取 1 μg RNA 进行逆转录反应, 然后进行半定量 PCR 和实时荧光定量 PCR 分析。半定量 RT-PCR 分析表明, 干涉后 EPM 的 mRNA 表达水平明显下降(图 5a), 同时我们对其干涉效果在蛋白质水平上进行了进一步的分析。蛋白质免疫印迹结果表明, ShEPM-1、ShEPM-2 干涉序列均能有效干涉 EPM 的表达(图 5b)。从 RNA 水平和蛋白质水平均能说明所设计的 1、2 号干涉序列能够明显降低内源 EPM 表达。

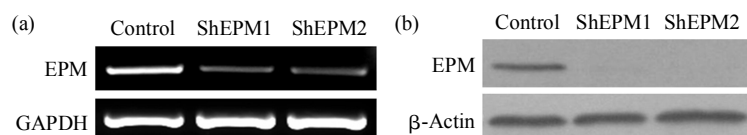


Fig. 5 RT-PCR and Western blot analysis of EPM levels in LX-2 after stable transfection with shRNA expression plasmids RT-PCR analyses(a) and Western blot (b) indicated that the mRNA and protein levels of EPM in the transgenic cell lines were significantly lower than that in control.

2.6 ShEPM-1、ShEPM-2 和 ShEPM-control 细胞条件培养基对于肝癌细胞体外迁移和浸润能力的影响

为了研究 EPM 干涉后肝星状细胞对于肝癌细

胞迁移能力的影响, 对于 3 种肝癌细胞系进行了划痕实验和 Transwell 实验, 之后分别使用不同的条件培养基培养, 72 h 之后观测。结果证明, EPM 被干涉之后, 肝癌细胞的迁移能力下降(图 6)。

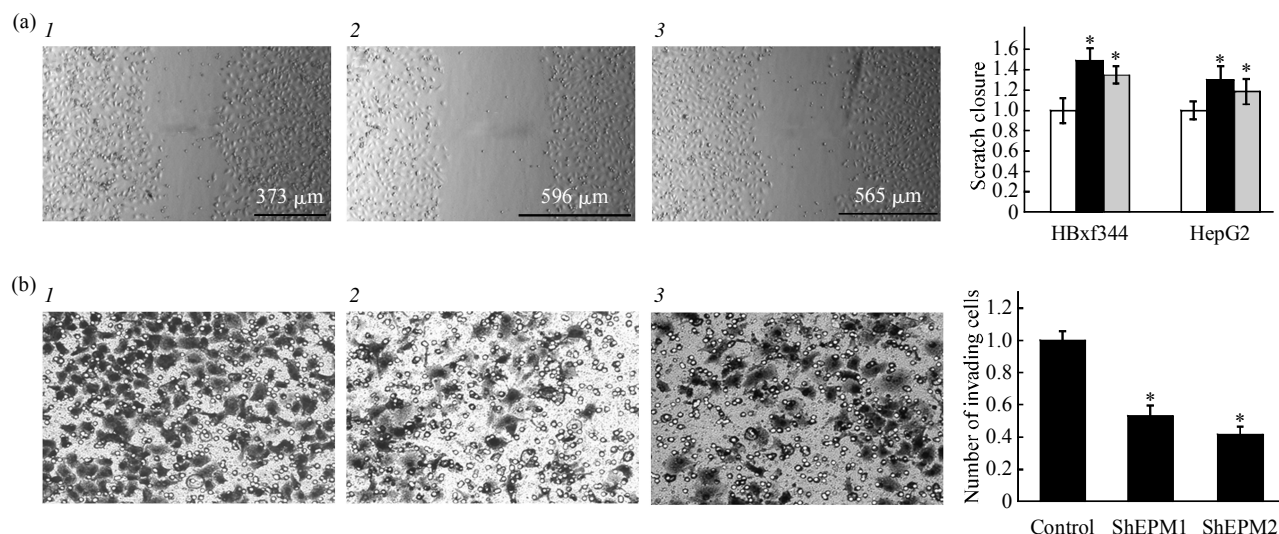


Fig. 6 Migratory potential of HCC cell lines were analyzed in monolayer scratch assays(a) and Transwell assay(b)

HCCs were stimulated with conditioned medium (CM) collected from HSCs that had been stably knocked down EPM. (a) Representative pictures of the areas between scratch fronts after 72 h. □: Control; ■: ShEPM1; ▒: ShEPM2. (b) A transwell motility assay using MHCC97H cells was performed on inserts pre-coated with Matrigel. Images are representative of the migration of different conditioned medium in three separate experiments. 1: LX-2-sh EPM control; 2: LX-2EPM 1; 3: LX-2-sh EPM 2. * $P < 0.05$ compared to control.

2.7 ShEPM-1、ShEPM-2 和 ShEPM-control 细胞与 MHCC97H 三维共培养

为了进一步研究星状细胞 EPM 对于肝癌细胞生物学作用的影响, 我们对于 MHCC97H 细胞与 LX-2 细胞进行了三维共培养。观察到在三维共培

养体系中, MHCC97H 细胞与未干涉 EPM 的 LX-2 相互之间较少粘附, 而 EPM 干涉的 LX-2 细胞更容易与 MHCC97H 粘附并成球膨胀性生长, 提示 EPM 的存在对于肿瘤细胞的迁移有促进作用。

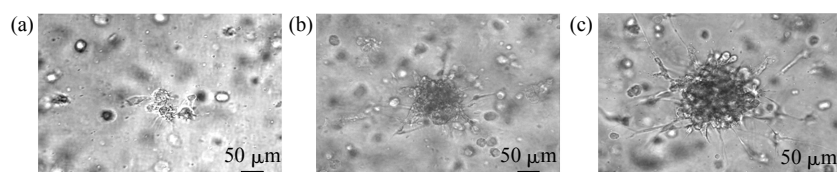


Fig. 7 Phase-contrast micrographs of LX-2 cells and MHCC97H cells viewed directly inside three-dimensional co-culture models for morphology on day 2

(a) LX-2-sh EPM control. (b) LX-2EPM 1. (c) LX-2-sh EPM 2.

3 讨 论

肿瘤的发生和转移与肿瘤细胞所处的内外环境有着密切关系。它不仅与肿瘤细胞自身的(核和胞质)内在环境有关, 而且与包括肿瘤所在组织的结构、功能和代谢有关。肿瘤细胞可以通过自分泌和旁分泌, 改变和维持自身生存和发展的条件, 促

进肿瘤的生长和发展。全身和局部组织也可通过代谢、分泌、免疫、结构和功能的改变, 限制和影响肿瘤的发生和发展。肿瘤微环境(tumor microenvironment)成纤维细胞(myofibroblast, MFB)是许多肿瘤基质的主要成分, 如结肠癌、子宫颈癌和皮肤癌。而在肝癌组织中, MFB 的主要来源为活化了的肝星状细胞。近年来, 对于肝癌肿瘤微环

境中 HSC 与 HCC 细胞之间的相互作用逐渐引起人们的重视, Faouzi 等^[17]研究表明 HCC 细胞可以诱导离体 HSC 的活化, 而另外的研究证明活化的 HSC 能够显著影响 HCC 细胞的生物学行为, 促进 HCC 细胞的增殖与侵袭^[7-9]。

人肝脏活化的 HSC 可通过分泌多种细胞因子而增加 HCC 细胞株的侵袭与增殖, HSC 还参与 HCC 基质的许多 ECM 成分的合成^[8]。现已证明静息的 HSC 活化后加速了 HCC 细胞本身肿瘤的进程。Dong 等^[18]发现在体外活化的 HSC 能够通过分泌肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)提高肝癌细胞的迁移能力。Mikula 等^[19]证明转化生长因子 β (transform growth factor, TGF- β)也参与了活化的星状细胞对于肝癌细胞生物学行为的影响。Amann 等^[7]通过 Western blot 方法在体外检测 NF κ B 和 ERK 在 HSC 与 HCC 相互作用时的变化, 证明 NF κ B 和 ERK 参与了肝癌的进展, 从而促进肝癌细胞的迁移和增殖。因此, 活化 HSC 的众多细胞因子可以对肝癌细胞产生影响。

Epimorphin 自 1992 年被发现以来, 对它的研究越来越深入。Hirai 等^[20-21]发现, 重组的 EPM 可以刺激毛囊从毛发生长的终期进入毛发生长的初期, 并发现这种活性主要存在于一个只有 10 个氨基酸的小肽上, 表明 EPM 很有可能在毛发再生方面具有临床应用前景。Zhou 等^[22]研究在肝脏发育过程中, 发现 EPM 蛋白能够影响 WB-F344 细胞的有丝分裂方向从而调控肝脏前体细胞向胆管细胞的分化。Shaker 等^[23]通过应用 EPM 基因缺失小鼠研究慢性肠炎相关性结肠癌发现, EPM 缺失后能够通过减少 IL-6 的分泌及其介导的炎症反应从而降低结肠癌的发生, 揭示了 MFB 在结肠损伤、修复和癌变过程中的角色, 也证明了结肠癌微环境中多种细胞因子参与此过程。

在本实验中我们通过 HCC 的条件培养基培养 HSCs, 证明 HCCs 能够促进 HSCs 的 EPM 表达上调。为了进一步研究 EPM 表达增加之后可能对 HCCs 的生物学作用, 我们使用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)方法成功构建了 EPM 干扰载体。目前, RNAi 已经成为基因沉默的重要手段, 在治疗肿瘤及病毒感染方面也展现了相当积极的前景^[24]。慢病毒载体是一种新型病毒载体, 具有获得病毒周期短、滴度高, 可以感染分裂、非分裂细胞, 能整合入宿主基因组从而稳定表达目的基因等特点。慢病毒干扰载体将 RNAi 技术和慢病毒载体

的特点结合到一起, 使得其能够整合进宿主基因组从而发挥稳定的 RNA 干扰效果, 拓宽了 RNA 干扰技术在基因功能研究中的重要作用。我们所用的慢病毒干扰载体采用 RNA 聚合酶 III U6 启动子, 在人细胞内能够使下游 400 bp 内的序列有效地进行转录, 同时, 在 RNA 干扰片段序列后加上 TTTTTT 序列以中止转录^[25]。我们设计了特异针对人 EPM 基因的干扰 RNA 片段, 通过构建慢病毒干扰载体, 利用 293FT 细胞包装慢病毒, 可获得具有感染力的能够稳定干涉人 EPM 的慢病毒毒液。HSC 细胞内源性高表达 EPM, 是检测所设计的 EPM 干扰片段干涉效果的理想细胞。我们用慢病毒毒液感染 EPM 细胞, 感染后, 不论是 mRNA 水平还是蛋白质水平, 均成功地稳定干涉了 HSC 细胞内源 EPM 基因的表达。稳定干涉 EPM 的肝星状细胞的获得, 为进一步验证 EPM 对肝癌细胞生物学行为的影响奠定了基础。

在研究细胞与细胞之间的相互作用时, 常把某种细胞培养上清液按照一定程序处理, 称为该细胞的条件培养基(conditioned medium, CM), 往往利用某种细胞的 CM 对另一种细胞培养来研究该种细胞所分泌的因子对另一种细胞的作用。在本研究中, 我们收集了稳定干涉 EPM 的 HSC 条件培养基, 用其检测 EPM 干涉后对于肿瘤细胞迁移能力的影响。实验结果发现, EPM 干涉后肝癌细胞的迁移能力较对照明显下降, 即 EPM 能够提高肿瘤细胞的迁移能力。

三维细胞培养技术(three-dimensional cell culture, TDCC)不同于传统的二维化单层细胞培养, 是将具有三维结构不同材料的载体与各种不同种类的细胞在体外共同培养, 使细胞能够在载体的三维立体空间结构中迁移、生长, 构成三维的细胞-载体复合物。目前已较多地应用到了肿瘤生物学的研究。在我们所构建的三维培养体系中, EPM 被干涉后的星状细胞与肝癌细胞相互黏附, 呈球状生长, 体积明显高于对照组。Weinberg 等^[26]在研究 MicroRNA 9 与肿瘤转移的关系时, 认为聚集和成球的细胞迁移能力下降, 而分散生长的细胞有较强的迁移能力。因此, 我们观察到的现象证明在肿瘤微环境中星状细胞的 EPM 干涉后, 肝癌细胞转移能力下降。

综上所述, 我们通过构建慢病毒干扰载体的方法, 稳定干涉了 LX-2 细胞内源 EPM 表达, 干涉效果明显。通过条件培养基培养肝癌细胞, 发现

EPM 干涉后肝癌细胞的迁移能力下降. 这一工作将有利于我们进一步开展 EPM 在肝癌微环境中参与调控作用的研究.

参 考 文 献

- [1] Baird L, Terskikh A. The tumor microenvironment. *Adv Exp Med Biol*, 2010, **671**: 67-73
- [2] Umemura A, Itoh Y, Itoh K, *et al.* Association of gankyrin protein expression with early clinical stages and insulin-like growth factor-binding protein 5 expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2008, **47**(2): 493-502
- [3] Shirako E, Hirayama N, Tsukada Y, *et al.* Up-regulation of p21 CIP1 expression mediated by ERK-dependent and independent pathways contributes to hepatocyte growth factor-induced inhibition of HepG2 hepatoma cell proliferation. *J Cell Biochem*, 2008, **104**(1): 176-188
- [4] Guo J S, Friedman S L. Hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis*, 2007, **27**(4): 413-426
- [5] Friedman S L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*, 2008, **88**(1): 125-172
- [6] Enzan H, Himeno H, Iwamura S, *et al.* Alpha-smooth muscle actin-positive perisinusoidal stromal cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 1994, **19**(4): 895-903
- [7] Amann T, Bataille F, Spruss T, *et al.* Activated hepatic stellate cells promote tumorigenicity of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*, 2009, **100**(4): 646-653
- [8] Th  ret N, Musso O, Turlin B, *et al.* Increased extracellular matrix remodeling is associated with tumor progression in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology*, 2001, **34**(1): 82-88
- [9] Antoine M, Tag C G, Gressner A M, *et al.* Expression of E-selectin ligand-1 (CFR/ESL-1) on hepatic stellate cells: Implications for leukocyte extravasation and liver metastasis. *Oncology Reports*, 2009, **21**(2): 357-362
- [10] Lehnert L, Lerch M M, Hirai Y, *et al.* Autocrine stimulation of human pancreatic duct-like development by soluble isoforms of epimorphin *in vitro*. *J Cell Biol*, 2001, **152**(5): 911-922
- [11] 周军年, 王韞芳, 裴雪涛. 表皮形态发生素(Epimorphin)与表皮形态发生. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007, **23**(6): 436-441
Zhou J N, Wang Y F, Pei X T. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2007, **23**(6): 436-441
- [12] Hirai Y, Lochter A, Galosy S, *et al.* Epimorphin functions as a key morphoregulator for mammary epithelial cells. *J Cell Biol*, 1998, **140**(1): 159-169
- [13] Miura K, Nagai H, Ueno Y, *et al.* Epimorphin is involved in differentiation of rat hepatic stem-like cells through cell-cell contact. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **311**(2): 415-423
- [14] Bascom J L, Fata J E, Hirai Y, *et al.* Epimorphin overexpression in the mouse mammary gland promotes alveolar hyperplasia and mammary adenocarcinoma. *Cancer Res*, 2005, **65**(19): 8617-8621
- [15] Shirasaka T, Iizuka M, Yukawa M, *et al.* Altered expression of epimorphin in ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003, **18**(5): 570-577
- [16] Terasaki Y, Fukuda Y, Suga M, *et al.* Epimorphin expression in interstitial pneumonia. *Respir Res*, 2005, **6**: 6
- [17] Faouzi S, Lepreux S, Bedin C, *et al.* Activation of cultured rat hepatic stellate cells by tumoral hepatocytes. *Lab Invest*, 1999, **79**(4): 485-493
- [18] Dong G, Chen Z, Li Z Y, *et al.* Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 2001, **61**(15): 5911-5918
- [19] Mikula M, Proell V, Fischer A N, *et al.* Activated hepatic stellate cells induce tumor progression of neoplastic hepatocytes in a TGF-   dependent fashion. *J Cell Physiol*, 2006, **209**(2): 560-567
- [20] Hirai Y, Takebe K, Nakajima K. Structural optimization of pep7, a small peptide extracted from epimorphin, for effective induction of hair follicle anagen. *Exp Dermatol*, 2005, **14**(9): 692-699
- [21] Takebe K, Oka Y, Radisky D, *et al.* Epimorphin acts to induce hair follicle anagen in C57BL/6 mice. *FASEB J*, 2003, **17** (14): 2037-2047
- [22] Zhou J N, Zhao L, Qin L P, *et al.* Epimorphin regulates bile duct formation via effects on mitosis orientation in rat liver epithelial stem-like cells. *PLoS One*, 2010, **5**(3): e9732
- [23] Shaker A, Swietlicki E A, Wang L H, *et al.* Epimorphin deletion protects mice from inflammation-induced colon carcinogenesis and alters stem cell niche myofibroblast secretion. *J Clin Invest*, 2010, **120**(6): 2081-2093
- [24] Behlke M A. Progress towards *in vivo* use of siRNAs. *Mol Ther*, 2006, **13**(4): 644-670
- [25] Ventura A, Meissner A, Dillon C P, *et al.* Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(28): 10380-10385
- [26] Ma L, Young J, Prabhala H, *et al.* miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol*, 2010, **12**(3): 247-256

RNAi-mediated Stable Silencing of EPM Expression in Hepatic Stellate Cells Decrease Migration of Hepatocellular Carcinoma*

SHI Lei^{1,2)}, JIA Ya-Li¹⁾, ZHANG Xiao-Mei³⁾, YUAN Hong-Feng¹⁾,
ZENG Quan¹⁾, ZHOU Jun-Nian¹⁾, YUE Wen^{1)**}, PEI Xue-Tao^{1)**}

¹⁾ Stem Cell and Regenerative Medicine Laboratory, Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China;

²⁾ Treatment and Research Center of Infectious Diseases, Beijing 302 Hospital, Beijing 100039, China;

³⁾ Department of Gastroenterology and Hepatology, PLA General Hospital 100853, China)

Abstract Hepatic stellate cells(HSC) in tumor microenvironment infiltrate the hepatocellular carcinoma(HCC) stroma, and they play a critical role in HCC progression. Epimorphin (EPM, also called syntaxin2), a mesenchymal cell surface-associated molecule expressed in HSC, is a key regulator for liver progenitor cells differentiation, especially during the course of tubulogenesis. It has been reported that the dysfunction of EPM is related to ulcerative colitis, interstitial pneumonia and colon carcinoma. Therefore, the development of an EPM-knockdown HSCs will be highly beneficial in such studies. Stable EPM-knockdown transgenic cell lines were generated by transfecting human hepatic stellate cells with RNA interference(RNAi) plasmids. Reverse transcriptase polymerase chain reaction(PCR) analyses and Western blot indicated that the mRNA and protein levels of EPM in the transgenic cell lines were significantly lower than that in control. Conditioned media (CM) collected from the transgenic cell lines significantly decreased migration of HCC cells cultured in monolayers and transwells. HCCs and HSCs were co-cultured in 3D model, knocked-down EPM HSCs generated bigger spheroid cultures than control, the phenomenon also demonstrated that EPM could promote HCCs migration. The results show that RNAi can be used to stably knock down expression of EPM in human hepatic stellate cells and further improvements in related technologies will facilitate the studies of its roles in HCC tumorigenesis, proliferation and migration.

Key words RNA interference, human hepatic stellate cells, epimorphin, carcinoma, hepatocellular, cell communication

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00660

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2005CB522702, 2009CB521704) and The National Natural Science Foundation of China (30900857).

**Corresponding author.

YUE Wen. Tel: 86-10-66931949, E-mail: wenyue26@yahoo.com

PEI Xue-Tao. Tel: 86-10-66932240, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

Received: January 6, 2011 Accepted: February 17, 2011