

RNA 干扰 $G_{\alpha 13}$ 对人卵巢癌 HO-8910PM 细胞侵袭转移的影响^{*}符伟玉¹, 曾振飞¹, 兰柳波¹, 吴科锋^{2**}

(1. 广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 湛江 524023; 2. 广东天然药物研究与开发重点实验室, 湛江 524023)

摘要 目的: 利用小干扰 RNA 技术沉默 $G_{\alpha 13}$ 基因的表达, 探讨其对人卵巢癌 HO-8910PM 细胞生长与转移的影响。方法: 以 Shuttle Vector 1.0-CMV 为载体, 构建针对 $G_{\alpha 13}$ 的 shRNA 重组表达质粒; 转染人卵巢癌细胞 HO-8910PM, 利用 RT-PCR 和 Western Blot 分别检测 $G_{\alpha 13}$ 基因 mRNA 和蛋白的表达水平。体外通过 MTT 法、Transwell 小室、Matrigel 胶模型、流式细胞术, 观察 $G_{\alpha 13}$ 被沉默后对人卵巢癌 HO-8910PM 细胞生长与侵袭转移的影响; 放射自显影方法分析 Rho GTPases 活性。结果: RT-PCR 和 Western Blot 结果显示, Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}$ B siRNA 转染组 $G_{\alpha 13}$ 基因的表达水平被有效抑制。与对照组相比, Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}$ B siRNA 转染组的细胞侵袭、迁移力明显下降 ($P < 0.01$), 细胞被阻滞在 G_0/G_1 期, 且膜上 Rho GTPases 与 GTP 结合活性明显下降。结论: 靶向 $G_{\alpha 13}$ 的重组 shRNA 质粒能够有效抑制 $G_{\alpha 13}$ 基因在 HO-8910PM 细胞中的表达, 并能降低 HO-8910PM 细胞侵袭迁移的能力, 其机制可能与降低细胞膜上 Rho GTPases 活性有关, 可为卵巢癌的靶向治疗提供参考。

关键词: 溶血磷脂酸; RNA 干扰技术; 侵袭迁移; 基因表达; 卵巢癌

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2017)01-0090-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.01.11

Effect of RNA interference of $G_{\alpha 13}$ on invasion and metastasis of human ovarian cancer HO-8910PM cells^{*}FU Wei-yu¹, ZEN Zhen-fei¹, LAN Liu-bo¹, WU Ke-feng^{2**}

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China;

2. Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China)

Abstract Objective: To investigate the inhibitory effect of $G_{\alpha 13}$ gene silencing on the growth and metastasis of human ovarian carcinoma HO-8910PM cell line by RNAi system. **Methods:** A RNAi system expressing shRNAs targeting $G_{\alpha 13}$ was developed based on the Shuttle Vector 1.0-CMV. After transfection, RT-PCR assay was used to determine the changes of mRNA expression of subunit of $G_{\alpha 13}$, and changes of protein expression of subunit of $G_{\alpha 13}$ were detected by western blot. The effects of $G_{\alpha 13}$ knockdown on HO-8910PM cells growth and metastasis were analyzed by MTT assay, Transwell migration assay and Matrigel invasion assay.

* 广东省科技计划项目 (No 2011B031800343); 湛江市财政资金科技专项竞争性分配项目 (No.2013A01008)

** 通信作者 Tel: (0759) 2388405; E-mail: winokhere@sina.com

第一作者 Tel: (0759) 2388405; E-mail: winvee@gdmc.edu.cn

GTP-binding activity of Rho GTPases was detected by autoradiography. **Results:** A series of RNAi system expressing shRNA targeting $G_{\alpha 13}$ was successively developed; RNAi could effectively down-regulate the mRNA and protein level of $G_{\alpha 13}$; RNAi can inhibit growth and metastasis of HO-8910PM cell ($P < 0.01$), induce cell cycle to pause at G_0/G_1 phase, and decrease the binding abilities of Rho GTPases and GTP. **Conclusion:** Recombinant plasmid expressing shRNA targeting $G_{\alpha 13}$ has successively performed the RNAi effects in HO-8910PM; the RNAi system can inhibit growth and metastasis of HO-8910PM cells via decreasing the activation of Rho GTPases, which can provide a reference for targeted therapy in ovarian cancer.

Keywords: lysophosphatidic acid; RNA interference; migration and invasion; gene expression; ovarian cancer

卵巢癌 (ovarian carcinoma) 是严重威胁女性生命健康的恶性肿瘤之一, 其死亡率高居妇科肿瘤之首^[1]。卵巢癌预后差与其起病隐匿、易发生腹腔性转移密切相关^[2-4]。近年来研究发现, 卵巢癌的侵袭转移与溶血磷脂酸 (lysophosphatidic acid, LPA) / $G_{\alpha 13}$ (LPA- $G_{\alpha 13}$) 信号通路活化有关, LPA 可通过 G 蛋白偶联受体抑制癌细胞凋亡, 促进其增殖和侵袭、转移等生物学行为^[5-6], 而 $G_{\alpha 13}$ 能特异介导 LPA 信号传递, 激活 Rho, 促进卵巢癌细胞增殖、抑制凋亡、降低顺铂敏感性; 同时上调组织促血管生成因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达, 促进肿瘤血管生成间接刺激肿瘤生长和转移^[7-9]。为进一步研究 $G_{\alpha 13}$ 与卵巢癌侵袭迁移的关系, 采用 siRNA 技术 (small interfering RNA, siRNA) 沉默卵巢癌细胞株 HO-8910PM 中 $G_{\alpha 13}$ 的表达, 观察沉默 $G_{\alpha 13}$ 表达后, HO-8910PM 细胞生物学行为变化, 为卵巢癌靶向药物治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料与试剂

HO-8910PM 细胞株购自上海细胞生物所; RPMI 1640 培养基 (Gibco); 小牛血清 (杭州四季青工程有限公司); Amiloride、Dimethyl Amiloride (Sigma 公司); Matrigel (BD 公司); $G_{\alpha 13}$ 山羊 IgG 单抗 (Santa Cruz 公司); ECL 试剂 (Santa Cruz 公司); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔和抗小鼠 IgG、辣根过氧化物酶标记兔抗山羊 IgG (北京中杉公司); 琼脂糖 (Amresco 公司); RT-PCR 试剂盒 (Qiagen 公司); Trizol (上海生工生物工程技术有限公司); 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养

HO-8910PM 细胞培养于含 10% 小牛血清, $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素的 RPMI-1640 完全培养基中, 37°C 、5% CO_2 饱和湿度孵箱培

养。取对数生长期细胞用于实验。

1.3 重组质粒的构建、鉴定和稳定转染株的筛选

1.3.1 重组质粒构建、鉴定 以 Shuttle Vector 1.0-CMV (cytomegalovirus, CMV) 为载体, 构建针对 $G_{\alpha 13}$ 的 shRNA 重组表达质粒, 由上海生物工程有限公司构建和鉴定 (共构建了 4 个, 分别命名为 Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}$ A、B、C、D)。 $G_{\alpha 13}$ A: 上游引物为 5'-TCGAGCCTCAAGCAGCTTATGCTATTCAAGAGATAGCATAAGCTGCTTGAGGTT A-3', 下游引物为 5'-CTAGTAACCT CAAGCAGCTTATGCTATCTCTTGAATAGCATAAGCTGCTTGAGG C-3'; $G_{\alpha 13}$ B: 上游引物为 5'-TCGAGCAAG ATATTCTGCTTGCCATTC AAGAGATGGCAAGCAGAATATCTTGTTA-3', 下游引物为 5'-CTAGTAACAAGATATTCTGCTTG CCATCTCTTGAATGGCAAGCAGAATATCTTG C-3'; $G_{\alpha 13}$ C: 上游引物为 5'-TCGAGGACCTATGTGAAGCGGC GTTCAAGAGACAGCCGCTTCACATAGGTCTTA-3', 下游引物为 5'-CTAGTAAGACCTATGTGAAGCGGCTGTCTCTGAACAGCCGCTTCACATAGGTCC-3'; $G_{\alpha 13}$ D: 上游引物为 5'-TCGAGGTCCAAGGAGATCGACAAA TTCAAGAG ATTTGTGCTGATCTCCTTGGA CTT A-3', 下游引物为 5'-CTAGTAAGTCCAAGGAGATCGACA AATCTCTTGAATTTGTGCTGATCTCCTTGGA C-3'。根据分子克隆提供的操作步骤进行细菌转化, 挑选阳性转化细菌, 抽提质粒, 并经公司测序鉴定正确后用于实验。质粒的抽提按照质粒抽提试剂盒说明书操作。

1.3.2 建立稳定低表达 $G_{\alpha 13}$ 基因的人卵巢癌细胞 HO-8910PM 细胞株 具体步骤按 Lipofectamine 2000 转染 HO-8910PM 细胞的标准化操作流程进行, 在荧光显微镜下观察分析转染率。RT-PCR、Western Blot 鉴定阳性克隆 $G_{\alpha 13}$ 干扰效果。

1.4 MTT 法检测细胞增殖能力

每孔约 8×10^3 个细胞接种至 96 孔板, 在 37°C 、5% CO_2 饱和湿度条件下过夜, 实验干扰组转染重组质粒, 同时设立阴性(空载体)对照组、空白(脂质体)组, 每组设 8 个平行孔, 并设 PRMI 1640 完全培养基调零孔, 置培养板于孵箱中 24、48 h, 每孔加入 MTT ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) $10 \mu\text{L}$, 继续培养 4 h。倾去培养液, 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ DMSO 溶解, 用微量振荡器摇振 15 min, 于酶标仪上以测定波长为 570 nm, 参考波长为 450 nm, 测定其吸光度。实验重复 3 次。

1.5 Matrigel 检测 HO-8910PM 细胞侵袭能力

将 PVDF 滤膜用 manicure 贴在 Transwell 小室上, 风干; 在膜的外表面涂 Fibronectin $4.5 \mu\text{g}$ ($10 \mu\text{L}$), 置超净台内风干, 膜内表面涂 Matrigel $5 \mu\text{g}$ ($10 \mu\text{L}$), 干燥, 形成人工重组基底膜; 在 24 孔板内加入 0.1% BSA-RPMI 1640, 每孔 $600 \mu\text{L}$; 收集对数生长期的 HO-8910PM 细胞, 悬浮于含 0.1% BSA-RPMI 1640 培养基中, 终浓度为 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$; 将 Transwell 小室浸于 24 孔板的条件培养基中, 将细胞悬液加到 Transwell 小室中, 每小室 $100 \mu\text{L}$, 并同时转染重组质粒, 对照组加入等量的 PBS。 37°C 、5% CO_2 温箱内孵育 6 h。将 Transwell 小室取出, 滤膜用甲醇固定 1 min, 苏木精染色 3 min, 水洗, 伊红染色 10 s, 水洗, 用 PBS 浸湿的棉签擦去滤膜内表面的细胞; 用封片胶将滤膜封于载玻片上, 于 $200\times$ 显微镜下计数穿过 PVDF 滤膜的细胞数。每膜计数上下左右中 5 个随机不同视野, 每组平行设 3 个滤膜。

1.6 Transwell 检测 HO-8910PM 细胞迁移能力

Transwell 实验不铺 Matrigel 胶, 37°C 、5% CO_2 温箱内孵育 6 h 取出小室, 其余步骤参照“1.5”项下侵袭实验。

1.7 流式细胞术检测细胞的周期

转染重组质粒 48 h 后, 收集 HO-8910PM 细胞, $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 低速离心 5 min, 弃上清, PBS 清洗 1 次, 离心去 PBS, 加入预冷的 70% 乙醇, 4°C 固定 24 h 以上。 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 除去乙醇, PBS 清洗 1 次, $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 弃 PBS, 加 0.5 mL $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PI (含 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ RNase A) 于避光处染色 30 min, 用 Coulter EPTCSXL-31240 流式细胞仪进行检测。每组均设 3 个平行管。

1.8 HO-8910PM 细胞膜上 Rho GTPases 与 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP 结合活性分析

1.8.1 细胞蛋白的提取 以 2.5×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞数密度接种, 处理 48 h 后, 常规收获各组细胞, 在 1×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞中加入 $100 \mu\text{L}$ 预冷至 0°C 的 NP 40 裂解液裂解, 冰上放置 30 min, 4°C 、 $12\,000 \times g$ 离心 15 min, 将上清收集至另一微量离心管。

1.8.2 蛋白质浓度测定 按 Lowry 比色法, 以 BSA 为标准蛋白, 用 Eppendorf Biophotometer 仪测定样品蛋白浓度。

1.8.3 GTP 结合活性的分析 $15 \mu\text{L}$ 样品 ($60 \mu\text{g}$ 细胞蛋白) 中加入 $2 \times$ SDS 加样缓冲液 $15 \mu\text{L}$, 沸水中煮沸 5 min, 经 15% SDS PAGE 电泳后电转移至 NC 膜, 而后在缓冲液 ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, $192 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘氨酸) 中复性并孵育过夜, 换成结合缓冲液 ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris PH 7.5, 0.3% Tween 20, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGTA) 室温孵育 20 min 后, 加入 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP 室温孵育 90 min, 用结合缓冲液洗 NC 膜 3 次, 每次 10 min, 最后放射自显影观察定位于膜上的 Rho GTPases 与 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP 的结合。

1.9 统计学分析

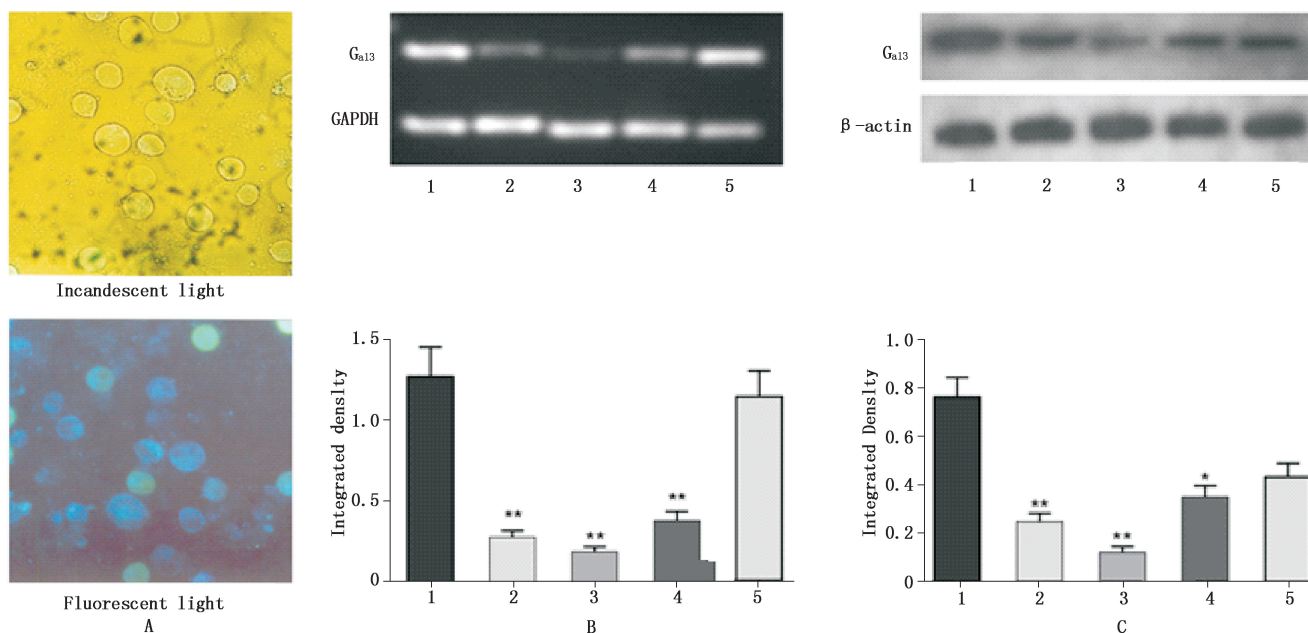
本实验数据资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS13.0 统计软件, 单因素方差分析或 t 检验进行统计学处理。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性, $P < 0.01$ 表示数据有非常大的显著性差异。

2 结果

2.1 沉默 $G_{\alpha 13}$ 亚基的 Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}$ /ShRNA/HO-8910PM 细胞系的建立和鉴定

构建的 $G_{\alpha 13}$ 亚基干扰质粒 (Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}$ A、B、C、D) 在脂质体的介导下转染人卵巢癌细胞 HO-8910PM, 作用 48 h 后, 可见大量绿色荧光表达, 表明 $G_{\alpha 13}$ 亚基干扰质粒已成功转染入细胞中 (图 1-A)。

用 RT-PCR 的方法检测 HO-8910PM 细胞中干扰效率显示, Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}$ A、B、C、D 各组较对照载体 (试剂盒提供) 组 $G_{\alpha 13}$ mRNA 表达明显下调, 而 Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}$ B 组干扰效率可达 90% 以上 (图 1-B)。Western blot 检测也显示, Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}$ A、B、C、D 各组较对照载体组 $G_{\alpha 13}$ 蛋白表达明显减少, 且以 Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}$ B 组干扰效果最明显, 与 RT-PCR 结果一致 (图 1-C)。因此, 选取 Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}$ B 干扰组作为有效干扰组进行后续实验研究。



A. 阳性细胞克隆筛选和扩增 (the positive cell clone was screened and amplified) B. RT-PCR 法检测 $G_{\alpha 13}$ 亚基的沉默效果 (the silence effect of $G_{\alpha 13}$ was detected by RT-PCR) C. Western blot 法检测 $G_{\alpha 13}$ 亚基的沉默效果 (the silence effect of $G_{\alpha 13}$ was detected by Western blot)

1. Shuttle Vector 1.0-CMV 2. Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}A$ 3. Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}B$ 4. Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}C$ 5. Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}D$

注 (note): 与 Shuttle Vector 1.0-CMV 比较 (compared to Shuttle Vector 1.0-CMV); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 1 稳定低表达 $G_{\alpha 13}$ 亚基的 HO8910PM 细胞系的建立和鉴定

Fig. 1 Construction and identification of stable low expression of $G_{\alpha 13}$ gene in HO8910PM cell lines

2.2 沉默 $G_{\alpha 13}$ 亚基对 HO-8910PM 细胞增殖的影响

HO-8910 细胞转染的 Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}B$ 质粒,分别培养 24 h 和 48 h,用 MTT 法测定其对细胞生长的影响,与空白 (脂质体) 组、穿梭载体 1.0-CMV 组相比, $G_{\alpha 13}B$ 穿梭载体 1.0-CMV 组 (Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}B$) 可明显抑制 HO-8910PM 细胞的增殖 ($P < 0.01$),而空白组与穿梭载体 1.0-CMV 组之间无明显差异 ($P > 0.05$),见表 1。

2.3 沉默 $G_{\alpha 13}$ 亚基对 HO-8910PM 细胞迁移能力的影响

siRNA 转染 48 h 后,显微镜下计数空白组、穿梭载体 1.0-CMV 组和 $G_{\alpha 13}B$ 穿梭载体 1.0-CMV 组穿过 Transwell 上室的细胞数,并进行统计分析。结果显示,与空白组和穿梭载体 1.0-CMV 组相比, $G_{\alpha 13}B$ 穿梭载体 1.0-CMV 组穿过小室的细胞数明显减少 ($P < 0.01$),而空白组和穿梭载体 1.0-CMV 组的细胞数无明显差异 ($P > 0.05$)。说明 $G_{\alpha 13}$ 亚基被沉默后,HO-8910PM 细胞的迁移能力明显下降,见图 2。

表 1 沉默 $G_{\alpha 13}B$ 对 HO-8910PM 细胞的增殖抑制作用

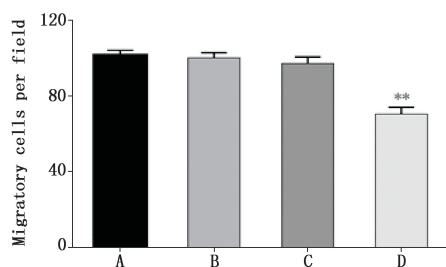
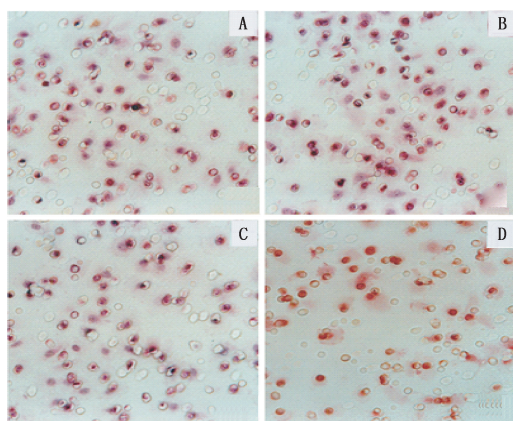
Tab. 1 Inhibition of HO-8910PM cells proliferation by silencing $G_{\alpha 13}B$

组别 (groups)	抑制率 (inhibition rate) / %	
	24 h	48 h
空白组 (control)	0	0
脂质体组 (liposome)	0.38 ± 1.24	0.55 ± 1.74
穿梭载体 1.0-CMV 组 (Shuttle Vector 1.0-CMV)	0.97 ± 0.55	0.93 ± 0.21
$G_{\alpha 13}B$ 穿梭载体 1.0-CMV 组 (Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}B$)	$32.64 \pm 2.28^{**}$	$36.17 \pm 1.56^{**}$

注 (note): $G_{\alpha 13}B$ 穿梭载体 1.0-CMV 组与穿梭载体 1.0-CMV/脂质体组/空白组比较 (Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}B$ group compared to control/Lip/Shuttle Vector 1.0-CMV group); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ** $P < 0.01$

2.4 沉默 $G_{\alpha 13}$ 亚基对 HO-8910PM 细胞侵袭的影响

siRNA 转染 48 h 后,显微镜下计数空白组、穿梭载体 1.0-CMV 组和 $G_{\alpha 13}B$ 穿梭载体 1.0-CMV 组穿过基底膜的细胞数,并进行统计分析。结果显示,与空白



A. 空白组 (control) B. 脂质体组 (liposome) C. 穿梭载体 1.0-CMV 组 (Shuttle Vector 1.0-CMV) D. $G_{\alpha 13}B$ 穿梭载体 1.0-CMV 组 (Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}B$)

注 (note): $G_{\alpha 13}B$ 穿梭载体 1.0-CMV 组与穿梭载体 1.0-CMV/脂质体组/空白组比较 (Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}B$ group compared to control/Lip/Shuttle Vector 1.0-CMV group); ** $P < 0.01$

图 2 沉默 $G_{\alpha 13}$ 亚基对 HO-8910PM 细胞迁移能力的影响

Fig. 2 Effect of $G_{\alpha 13}B$ gene silencing on migration of HO-8910PM cells

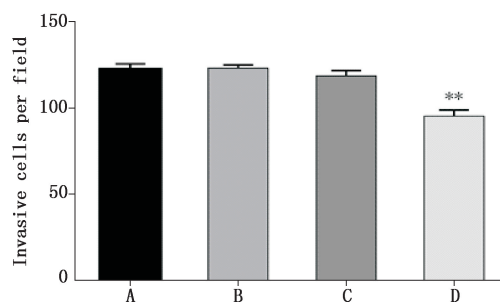
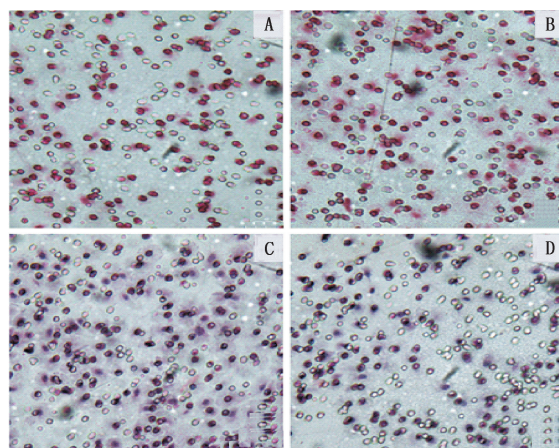
组和穿梭载体 1.0-CMV 组相比, $G_{\alpha 13}B$ 穿梭载体 1.0-CMV 组穿过基底膜的细胞数明显减少 ($P < 0.01$), 而空白组和穿梭载体 1.0-CMV 组的细胞数无明显差异 ($P > 0.05$)。说明 $G_{\alpha 13}$ 亚基被沉默后, HO-8910PM 细胞侵袭能力下降, 见图 3。

2.5 沉默 $G_{\alpha 13}$ 亚基对 HO-8910PM 细胞周期的影响

HO-8910PM 细胞转染重组质粒 Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}B$ 细胞 48 h 后, 收集各组细胞, 流式细胞仪检测发现, 与空白组和穿梭载体 1.0-CMV 组相比, $G_{\alpha 13}B$ 穿梭载体 1.0-CMV 组 G_0/G_1 期细胞数增多, S 期和 G_2/M 期细胞数减少, 统计分析具有明显差异 ($P < 0.05$); 而空白组和穿梭载体 1.0-CMV 组的细胞数无明显差异 ($P > 0.05$), 见图 4。

2.6 沉默 $G_{\alpha 13}$ 亚基对 HO-8910PM 细胞膜上 Rho GTPases 与 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP 结合活性的影响

放射自显影结果显示, HO-8910PM 细胞转染重组质粒 12、24 和 48 h 后, Rho GTPases 结合的 GTP 量明显低于对照组。以下结果提示转染质粒后 12 h



A. 空白组 (control) B. 脂质体组 (liposome) C. 穿梭载体 1.0-CMV 组 (Shuttle Vector 1.0-CMV) D. $G_{\alpha 13}B$ 穿梭载体 1.0-CMV 组 (Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}B$)

注 (note): $G_{\alpha 13}B$ 穿梭载体 1.0-CMV 组与穿梭载体 1.0-CMV/脂质体组/空白组比较 (Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}B$ group compared to control/Lip/Shuttle Vector 1.0-CMV group); ** $P < 0.01$

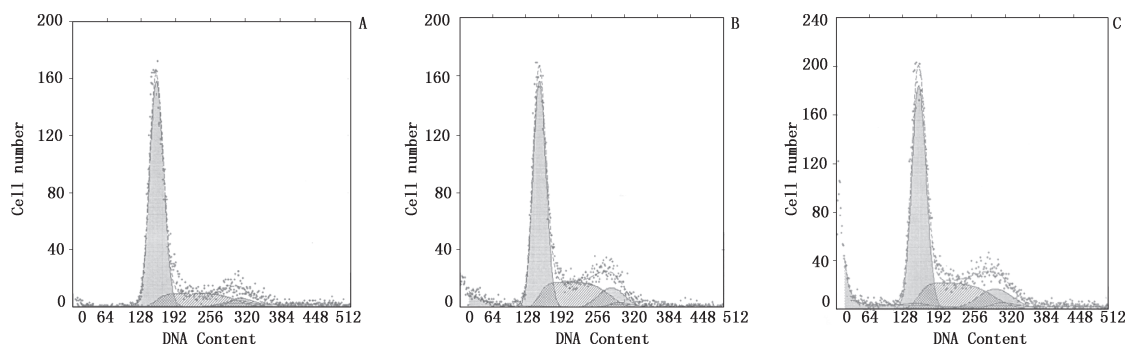
图 3 沉默 $G_{\alpha 13}$ 亚基对 HO-8910PM 细胞侵袭能力的影响

Fig. 3 Effect of $G_{\alpha 13}B$ gene silencing on HO-8910PM cells invasion

可诱导 Rho GTPases 与 GTP 结合能力的下降, 24 h 后效果更明显, 48 h 与 24 h 差别不大, 提示 $G_{\alpha 13}$ 亚基被沉默后, HO-8910PM 细胞膜上 Rho GTPases 与 GTP 结合活性下降, 见图 5。

3 讨论

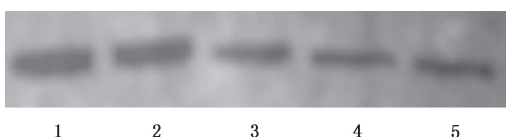
肿瘤转移的关键因素是肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力, 抑制肿瘤细胞的迁移侵袭能力已经成为近年研究肿瘤的热点, 靶向抑制参与肿瘤细胞迁移侵袭过程的基因为治疗肿瘤提供了新思路。研究发现, 异源三聚体 G 蛋白是影响 G 蛋白偶联信号传导的关键分子, 其中 G_{α} 亚基被认为是影响 G 蛋白信号传导的主要因素, 其家族成员主要包括 $G_{\alpha s}$ 、 $G_{\alpha i}$ 、 $G_{\alpha q}$ 和 $G_{\alpha 12/13}$ [10-11]。 $G_{\alpha 13}$ 是 $G_{\alpha 12/13}$ 家族的 2 个成员之一, 活化的 $G_{\alpha 13}$ 能直接与 Rho 特异性的鸟苷酸交换因子 (RhoGEFs) 相互作用来激活 Rho [12-14], 影响细胞增殖、细胞骨架重构、细胞迁移与侵袭等一系列的生理过程。



A. 空白组 (control) B. 穿梭载体 1.0-CMV 组 (Shuttle Vector 1.0-CMV) C. $G_{\alpha 13}B$ 穿梭载体 1.0-CMV 组 (Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}B$)

图 4 沉默 $G_{\alpha 13}$ 亚基对 HO8910PM 细胞细胞周期的影响

Fig. 4 Effect of $G_{\alpha 13}B$ gene silencing on HO-8910PM cell cycle



1. 空白组 (control) 2. 穿梭载体 1.0-CMV 组 (Shuttle Vector 1.0-CMV) 3. $G_{\alpha 13}B$ 穿梭载体 1.0-CMV 组 12 h (Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}B$ for 12 h) 4. $G_{\alpha 13}B$ 穿梭载体 1.0-CMV 组 24 h (Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}B$ for 24 h) 5. $G_{\alpha 13}B$ 穿梭载体 1.0-CMV 组 48 h (Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}B$ for 48 h)

图 5 沉默 $G_{\alpha 13}$ 亚基对 HO8910PM 细胞的 Rho GTPases 与 GTP 结合活性的影响

Fig. 5 Effect of $G_{\alpha 13}B$ gene silencing on the GTP-binding activity of Rho GTPases in HO-8910PM cells

$G_{\alpha 13}$ 被认为和受体酪氨酸激酶一样能调控 G 蛋白偶联受体特异性刺激细胞迁移^[15-17]。有证据指出, $G_{\alpha 13}$ 特异介导 LPA 信号传递, 通过激活 Rho, 促进卵巢癌细胞增殖和抑制凋亡; 同时上调组织促血管生成因子 VEGF 的表达, 促进肿瘤血管生成间接刺激肿瘤生长和转移^[9, 18-20]。也有资料显示, 沉默 $G_{\alpha 13}$ 能特异性消除 LPA 刺激所引起的胰腺癌细胞侵袭转移^[21]。那么, 沉默 $G_{\alpha 13}$ 是否能同样消除已形成高转移特性的卵巢癌细胞的侵袭转移等恶性生物学行为, 需要针对 $G_{\alpha 13}$ 基因设计 siRNA 序列, 筛选出针对 $G_{\alpha 13}$ 基因干扰效果最好的 siRNA, 研究 $G_{\alpha 13}$ 基因被沉默后, 高转移卵巢癌细胞株 HO-8910PM 生物学行为的变化。结果发现, Shuttle Vector 1.0-CMV $G_{\alpha 13}B$ 对 $G_{\alpha 13}$ 基因干扰效果最为明显, 并且, $G_{\alpha 13}$ 基因被沉默后, HO-8910PM 细胞膜上 Rho GTPases 与 GTP 结合活性明显下降, 细胞穿过基底膜细胞数明显减少, 表明 $G_{\alpha 13}$ 基因沉默后 HO-

8910PM 细胞的侵袭、迁移能力明显下降, 细胞被阻滞在 G_0/G_1 期, 提示了干扰 $G_{\alpha 13}$ 的表达能有效降低卵巢癌的侵袭转移能力。

尽管沉默 $G_{\alpha 13}$ 能在一定程度上降低 HO-8910PM 细胞的侵袭、迁移能力, 但其抑制效果并不十分理想。这也许与 $G_{\alpha 13}$ 和 $G_{\alpha 12/13}$ 的另一成员 $G_{\alpha 12}$ 表达在不同类型肿瘤之间存在差异性有关。最近有研究报道, 抑制 $G_{\alpha 12}$ 的转录活性和沉默 $G_{\alpha 12}$ 能显著抑制卵巢癌细胞的增殖与生长^[9, 22], 因此, 进一步探讨 $G_{\alpha 12/13}$ 不同家族成员在卵巢癌组织中的分布, 阐明 $G_{\alpha 12/13}$ 家族成员参与卵巢癌侵袭转移过程的相关机制, 对指导卵巢癌的靶向治疗有更重要的临床意义。

参考文献

- [1] SIEGEL RL, MILLER KD, JENAL A. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65 (1): 5e29
- [2] 朱银芳, 谭布珍. 卵巢癌相关转移基因的研究进展 [J]. 肿瘤, 2014, 34 (9): 875
ZHU YF, TANG BZ. Advance in research on ovarian cancer-related metastatic genes [J]. Tumor, 2014, 34 (9): 875
- [3] ROTH C. Ovarian cancer: risk factors, treatment and management [J]. Br J Nurs, 2013, 22 (17): S23
- [4] HANSEN JM, COLEMAN RL, SOOD AK. Targeting the tumour microenvironment in ovarian cancer [J]. Eur J Cancer, 2016, 56 (1): 131
- [5] SUGIMOTO N, TAKUWA N, YOSHIOKA K. *et al.* Rho-dependent, Rho kinase-independent inhibitory regulation of Rac and cell migration by LPA1 receptor in Gi-inactivated CHO cells [J]. Exp Cell Res, 2006, 312 (10): 1899
- [6] 余雪琛, 张元珍, 陈慧君. 溶血磷脂酸溶血磷脂酸通过 RAC 的活化诱导卵巢癌细胞的侵袭转移 [J]. 中华肿瘤杂志, 2015, 37 (2): 95

- YU XC, ZHANG YZ, CHEN HJ. Lysophosphatidic acid (LPA) stimulates invasion and metastatic colonization of ovarian cancer cells through Rac activation [J]. *Chin J Oncol*, 2015, 37(2): 95
- [7] MOERS A, NURNBERG A, GOBBELS S, *et al.* Galpha12/Galpha13 deficiency causes localized overmigration of neurons in the developing cerebral and cerebellar cortices [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(5): 1480
- [8] GOMATHINAYAGAM R, MURALIDHARAN J, HA JH, *et al.* Hax-1 is required for Rac1-Cortactin interaction and ovarian carcinoma cell migration [J]. *Genes Cancer*, 2014, 5(3-4): 84
- [9] HA JH, GOMATHINAYAGAM R, YAN M, *et al.* Determinant role for the gep oncogenes, $G_{\alpha 12/13}$, in ovarian cancer cell proliferation and xenograft tumor growth [J]. *Genes Cancer*, 2015, 6(7-8): 356
- [10] OLDHAM WM, HAMM HE. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(1): 60
- [11] 杨纪春, 施小凤, 奚晓东. G 蛋白与整合素 $\alpha IIb\beta 3$ 的双向信号转导 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2015, 31(3): 251
YANG JC, SHI XF, XI XD. G protein and integrin $\alpha IIb\beta 3$ bidirectional signal transduction [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2015, 31(3): 251
- [12] GU JL, MULLER S, MANCINO V, *et al.* Interaction of $G_{\alpha 12}$ with $G_{\alpha 13}$ and $G_{\alpha q}$ signaling pathways [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(14): 9352
- [13] GONG H, SHEN B, FLEVARIS P, *et al.* G protein subunit Galpha13 binds to integrin $\alpha IIb\beta 3$ and mediates integrin "outside-in" signaling [J]. *Science*, 2010, 327(5963): 340
- [14] FLEVARIS P, STOJANOVIC A, GONG H, *et al.* A molecular switch that controls cell spreading and retraction [J]. *J Cell Biol*, 2007, 179(3): 553
- [15] CHOW CR, EBINE K, KNAB LM, *et al.* Cancer cell invasion in three-dimensional collagen is regulated differentially by $G_{\alpha 13}$ protein and discoidin domain receptor 1-Par3 protein signaling [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(4): 1605
- [16] KELLY P, CASEY PJ, MEIGS TE. Biologic functions of the G_{12} subfamily of heterotrimeric g proteins: growth, migration, and metastasis [J]. *Biochemistry*, 2007, 46(23): 6677
- [17] GOLDSMITH ZG, HA JH, JAYARAMAN M, *et al.* Lysophosphatidic acid stimulates the proliferation of ovarian cancer cells via the gep proto-oncogene $G_{\alpha 12}$ [J]. *Genes Cancer*, 2011, 2(5): 563
- [18] SUGIMOTO N, TAKUWA N, YOSHIOKA K. Rho-dependent, Rho kinase-independent inhibitory regulation of Rac and cell migration by LPA1 receptor in Gi-inactivated CHO cells [J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(10): 1899
- [19] TKACHENKO E, SABORI-GHOMI M, PERTZ O, *et al.* Protein kinase A governs a RhoA-RhoGDI protrusion-retraction pacemaker in migrating cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(6): 660
- [20] CHANG F, LEMMON C, LIETHA D, *et al.* Tyrosine phosphorylation of Rac1: a role in regulation of cell spreading [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28587
- [21] GARDNER JA, HA JH, JAYARMAN M, *et al.* The gep proto-oncogene $G_{\alpha 13}$ mediates lysophosphatidic acid mediated migration of pancreatic cancer cells [J]. *Pancreas*, 2013, 42(5): 819
- [22] HA JH, WARD JD, VARADARAJALU L, *et al.* The gep proto-oncogene $G_{\alpha 12}$ mediates LPA-stimulated activation of CREB in ovarian cancer cells [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(1): 122

(本文于 2016 年 1 月 27 日收到)