

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.09.010

shRNA claudin-1 对 SW620 细胞侵袭转移的影响

宋 宇

(长春大学特教学院, 长春 130022)

【摘 要】目的:本研究通过抑制 SW620 中 claudin-1 的表达量来观察 claudin-1 对细胞粘附和侵袭转移能力的影响。方法:首先通过 shRNA 干扰技术抑制 SW620 中 claudin-1 的表达量,看其对基底膜几种介质粘附能力的改变,然后再通过 Transwell 小室侵袭实验及细胞划痕实验来检测其侵袭转移能力的影响。结果:低表达 claudin-1 后抑制了 SW620 细胞对 4 种不同介质的粘附能力,层粘连蛋白、纤维连接蛋白、胶原蛋白 IV、胶原蛋白 I 的粘附抑制率分别为 61%、29%、48%、13%;并且 SW620-control 组的细胞比 SW620-shRNA 更具有侵袭力,抑制率高达 70%($P<0.001$);而且抑制 claudin-1 后细胞的迁移能力明显减弱。结论:抑制 claudin-1 的表达可以抑制 SW620 的粘附能力和侵袭转移能力。

【关键词】claudin-1;细胞粘附;侵袭

【中国图书分类法分类号】R735

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-02-09

Influence of shRNA claudin-1 on invasion and metastasis of SW620 cells

SONG Yu

(College of Special Education, Changchun University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of claudin-1 on the cell adhesion, invasion and metastasis capacity through inhibiting the expression of claudin-1 in SW620 cells. Methods: The expression of claudin-1 in SW620 cell was inhibited through shRNA interfering technique to detect its effect on cell adhesion ability. Then Transwell chamber invasion assay and cell scratch test were applied to detect the invasion and metastasis of cells. Results: Low expression of claudin-1 can inhibit adhesion of SW620 cells to laminin, fibronectin, collagen IV and Collagen I, with adhesive inhibition rate of 61%, 29%, 48%, 12% respectively. The cell invasiveness was stronger in SW620-control group than in SW620-shRNA group, with inhibition rate of 70% ($P<0.001$). After the inhibition of claudin-1, cell migration was significantly reduced. Conclusion: Inhibiting claudin-1 expression could suppress the adhesive and invasive ability of SW620 cells.

【Key words】claudin-1; cell adhesion; invasion

大肠癌是常见的消化道恶性肿瘤,其发病率与死亡率有着逐年升高的趋势^[1],而其死亡率又与肠癌的转移密切相关,现今大部分的研究都集中在与肿瘤相关转移的一些分子上,随着研究的发现,肿瘤的转移与肿瘤细胞的粘附、迁移、分化等密切相关。肿瘤的浸润过程,常常首先表现为同质粘附力减弱从而肿瘤细胞从原发灶中脱落,随后出现异质粘附的增强,粘附于基底膜上随后进一步的浸润形成转移灶。近年来对于细胞黏附分子的研究报道较多。claudin-1 是由 Furuse 等^[2]在 1998 年发现的一类新型的紧密连接蛋白,它参与了细胞之间的连接和调节,并有研究发现人类大肠癌组织中比正常组织

中明显上调,并且它的表达量随着大肠癌发展进程逐渐增加,出现细胞膜向细胞质转移的趋势。为了进一步研究 claudin-1 的生物学习性,通过抑制 claudin-1 的表达来观察其对细胞基质粘附能力和侵袭转移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株

SW620 细胞株来自(美国组织培养保藏中心, ATCC),由中国科学院上海细胞生物学研究所提供。

1.2 claudin-1 shRNA

自行设计 1 段 shRNA 片段及 1 段无意义干扰片断,交上海吉玛制药有限公司合成,片段序列见表 1。

作者简介:宋 宇(1970-),男,讲师,硕士,
研究方向:内科治疗。

表 1 干扰片段在 Tspan-5 cDNA 全长中的起始位置

Tab.1 Starting site of interference fragment

in Tspan-5 cDNA	
片段	干扰位点
claudin-1	CATCTTCATCAATATGGAA
阴性对照	GTTCTCCGAACGTGTCACGT

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 SW620 在 37 °C 50 ml/L CO₂ 条件下,培养于含 100 ml/L 胎牛血清的 RPMI1640 中,每周传代 2 次。

1.3.2 脂质体法转染 SW620 细胞 用 Lipofectamine™ 2000 TM 将质粒导入 SW620 细胞。具体步骤:将 SW620 细胞消化下来,调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml,按 2 ml/孔接种入 6 孔板,用无抗生素培养液培养 16~24 h 以上至细胞密度达到 75%左右。撤去原培养液,1×PBS 轻轻冲洗 3 遍,按 2 ml/孔加入 Opti-MEN I 溶液。按照说明书加入质粒后,将其置于 37 °C,5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养 24 h 后更换无抗生素的含 10%胎牛血清的 PRMI1640 培养液,48 h 后挑取单克隆阳性细胞培养。

1.3.3 免疫蛋白质印迹(Western blot)检测 claudin-1 蛋白表达水平 恒压 80 V,当溴酚蓝前沿进入分离胶,把电压提高到 120 V,继续电泳直到溴酚蓝到达分离胶底部。半干电转移,5%的脱脂奶粉/TBS-T 封闭 PVDF 膜 2 h,轻柔摇动,室温。5%的脱脂奶粉/TBS-T 稀释相应的兔抗鼠一抗(1:1 000),与 PVDF 膜 4 °C 孵育过夜。TBS-T 洗涤 3 × 5 min。羊抗兔二抗与一抗结合。5%的脱脂奶粉/TBS-T 稀释相应的二抗(1:5 000),与 PVDF 膜孵育 1 h,室温轻柔摇动。TBS-T 洗涤 3 × 5 min;TBS 再洗涤 5 min。增强化学发光显影,用 UVI 凝胶成像系统摄像,Image-Pro Plus 6.0 软件分析条带灰度值。

1.3.4 粘附试验 用 96 孔板,待测细胞株(shRNA 组,对照组)各组,每组设 12 个孔。取对数生长期的细胞,用无血清 RPMI1640 培养过夜;Collagen IV、纤维连接蛋白、层粘连蛋白、VN 溶液均 10 μg/ml(1 × PBS 配制),每孔 75 μl,置 37 °C 铺板 1 h;10 g/L BSA(1 × PBS 配制)煮沸 13 min 变性后,每孔加 100 μl 封闭 1 h,封闭结束后用 1 × PBS 冲洗 2 次;将细胞消化后重新用 PBS 稀释至 10^8 个/L,然后每孔加入 200 μl 细胞液,放入温箱 1 h 后拿出用 1 × PBS 冲洗 3 次,每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μl 和完全培养 200 μl;37 °C,5% CO₂ 培养 4 h;吸出液体,每孔加入 DMSO 150 μl;室温孵育 10 min;微振荡器振荡 15 min;用酶联免疫检测仪在 570 nm 处读取吸光度(Absorbance, A)值。

1.3.5 细胞侵袭实验 待测细胞各组,每组设 4 个孔。取细胞对数生长期,用无血清 RPMI1640 培养过夜。按说明书铺基质胶。消化下细胞后,用 PBS 溶液调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml。上下分别加入 100 μl 细胞悬液和 500 μl 含 10% FBS 的 RPMI1640 培养液。37 °C、50 ml/L CO₂ 培养 48 h。取出上室,除去膜上室面的基质胶和细胞,4%多聚甲醛固定膜下室

面的细胞 15 min。结晶紫染色 10 min,取下风干后,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。

1.3.6 细胞划痕实验 细胞长满单层后,用 10 μl 枪头在中间划一横线,利用丝裂菌素处理 1 h 之后,0、24 h 分别观察照相。

2 结果

2.1 应用 RNA 干扰技术抑制 claudin-1 的表达

为抑制 claudin-1 的表达,用自行设计 1 段 shRNA 片段进行转染,构建稳定的转染细胞株,命名为 SW620-shRNA,并用一段无意义 shRNA 作为对照组,命名为 SW620-control,使用 Western blot 证实干扰效果。结果见图 1。

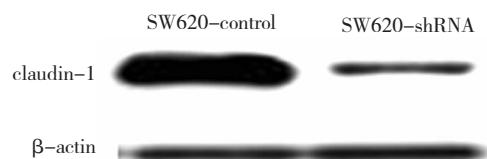


图 1 Western blot 检测 claudin-1 的表达水平

Fig.1 Western blot detection of expression levels of claudin-1

2.2 抑制 claudin-1 的表达后,细胞粘附能力的改变

分别以基底膜主要成份胶原蛋白 IV、纤维连接蛋白、层粘连蛋白、胶原蛋白 I 为粘附介质进行 SW620-shRNA、SW620-control 细胞的基底膜粘附实验,结果见图 2 和表 2。低表达 claudin-1 后抑制了 SW620 细胞对 4 种不同介质的粘附能力(胶原蛋白 IV $t=10.32, P<0.001$;纤维连接蛋白 $t=9.41, P<0.001$;层粘连蛋白 $t=12.45, P<0.001$;胶原蛋白 I $t=3.88, P<0.01$)。层粘连蛋白、纤维连接蛋白、胶原蛋白 IV、胶原蛋白 I 分别为 61%、29%、48%、13%。

表 2 SW620-shRNA 与 SW620-control 粘附性比较($\bar{x} \pm s$)Tab.2 Comparison of cell adhesion between SW620-shRNA and SW620-control ($\bar{x} \pm s$)

粘附性	例数 (n)	SW620-shRNA	SW620-control	t 值	P 值
胶原蛋白 I 粘附性 (A_{570nm})	12	0.96 ± 0.08	1.08 ± 0.06	3.88	0.01
胶原蛋白 IV 粘附性 (A_{570nm})	12	0.44 ± 0.07	0.92 ± 0.10	10.32	0.001
纤维连接蛋白粘附性 (A_{570nm})	12	0.37 ± 0.04	0.54 ± 0.05	9.41	0.000
层粘连蛋白粘附性 (A_{570nm})	12	0.12 ± 0.02	0.29 ± 0.05	12.45	0.000

2.3 抑制 claudin-1 的表达后,对细胞侵袭力的改变(图 3)

穿膜侵袭实验检测 SW620-shRNA 与 SW620-control 细

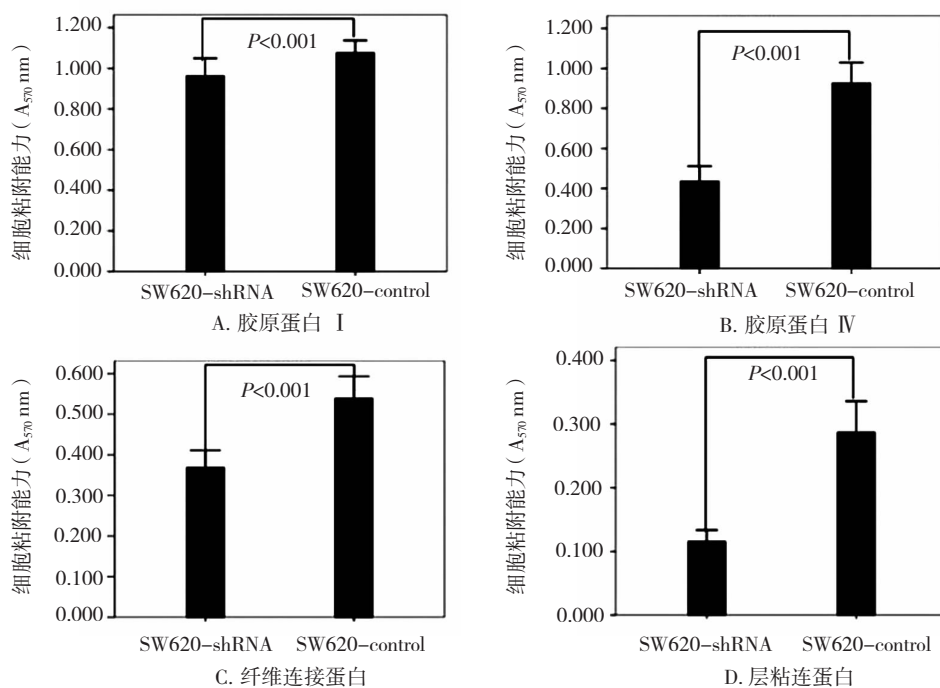


图2 低表达 claudin-1 后,能降低 SW620 细胞的粘附能力,尤其以层粘连蛋白介质为主
Fig.2 Reducing SW620 cell adhesive ability, mainly to laminin medium by lowering expression of claudin-1

胞对基质胶侵袭能力的差异。结果显示 SW620-control 组的细胞比 SW620-shRNA 更具侵袭力,抑制率高达 70% ($P < 0.001$)。

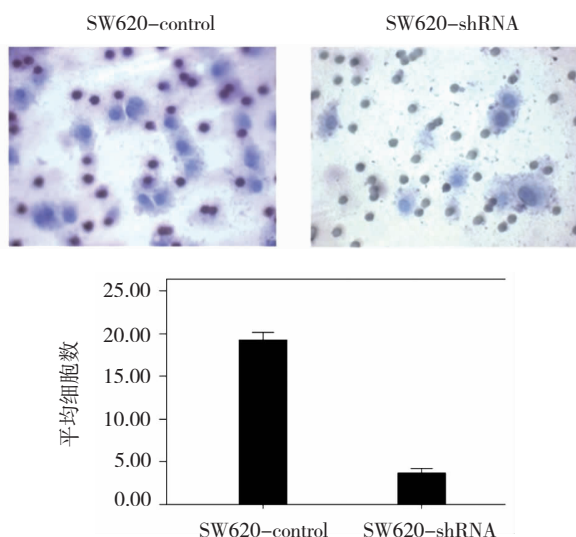


图3 下调 claudin-1 表达水平抑制 SW620 细胞的侵袭性
Fig.3 Inhibiting SW620 cell invasiveness by down-regulation of claudin-1 expressions

2.4 降低 claudin-1 表达水平后,对细胞迁移能力的影响 (图4)

细胞划痕实验检测 SW620-shRNA 与 SW620-control 细胞的迁移能力。结果显示 SW620-shRNA 组的细胞比 SW620-control 组的细胞迁移能力明显减弱。

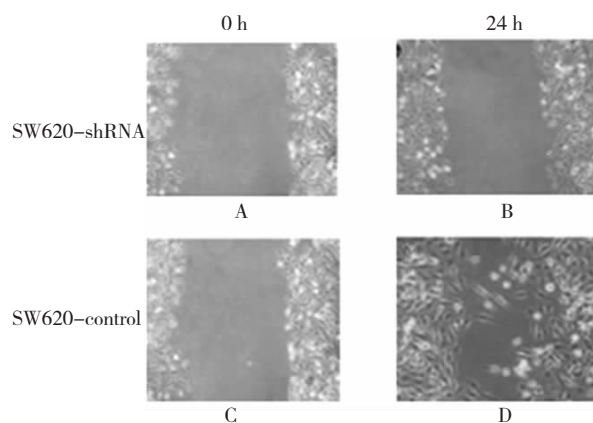


图4 抑制 claudin-1 表达水平可以减弱细胞的迁移能力
Fig.4 Reducing cell migration ability by inhibiting expressions of claudin-1

3 讨论

claudin-1 是 1 个位于人染色体 3q28~q29 的基因,编码 211 个氨基酸,其主要的功能是参与细胞间的紧密连接。研究发现它在不同肿瘤中的发病机理是有差异的,如其在乳腺癌^[3,4]、肺腺癌^[5]中以低表达的形式促进肿瘤的发病,而在肾细胞癌、卵巢癌、胃腺癌、大肠癌、颈部肿瘤、胃癌中却以过表达的形式促进疾病发展^[6-12]。

癌细胞侵袭过程是一个非常复杂的过程,其粘

附能力的改变在不同时期有着不同的变化。首先是由细胞黏附分子介导的肿瘤细胞彼此之间的粘附力减少,导致肿瘤从原位中脱落,随后癌细胞与基质的附着力增加。研究中发现低表达 claudin-1 后抑制了 SW620 细胞对 4 种不同介质的粘附能力层粘连蛋白、纤维连接蛋白、胶原蛋白 IV、胶原蛋白 I 的粘附抑制率分别为 61%、29%、48%、13%;其中层粘连蛋白的抑制率最高。正常上皮细胞具有的一种层粘连蛋白受体,这种受体通常分布于细胞的基底面,与层粘连蛋白分子结合从而连接上皮细胞。在癌细胞中这种受体较正常细胞明显增加,而且其分布也由基底部分布至整个细胞的表面,这样使得癌细胞各个面都能与基底膜相作用,从而增加了癌细胞与基底膜的粘附能力。而本研究结果提示 claudin-1 影响细胞的粘附能力可能主要是通过层粘连蛋白起作用。随后发现 claudin-1 还可以影响到细胞的侵袭能力,从而 claudin-1 在肿瘤细胞中起到了调节粘附和侵袭能力的重要作用。

国外有研究表明过表达 claudin-1 可以通过上调 ZEB-1^[13] 从而抑制 E-cadherin 的表达,引起 β -catenin 的核转位,从而激活 β -catenin/Tcf 信号通路来影响肿瘤细胞的增殖性和侵袭性。结合本实验结果提示 claudin-1 是一个可以影响肿瘤增殖、粘附、侵袭一些生物活性的分子,可以成为一个肿瘤标记性分子或者治疗肿瘤的一个靶向分子。

参 考 文 献

- [1] Peto J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade [J]. Nature, 2001, 411(6835): 390-395.
- [2] Furuse M, Fujita K, Hiiiragi T, et al. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence

similarity to occludin [J]. J Cell Biol, 1998, 141(7): 1539-1550.

- [3] Kramer F, White K, Kubbies M, et al. Genomic organization of claudin-1 and its assessment in hereditary and sporadic breast cancer [J]. Hum Genet, 2000, 107(3): 249-256.
- [4] Tokes A M, Kulka J, Paku S, et al. Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study [J]. Breast Cancer Res, 2005, 7(2): 296-305.
- [5] Chao Y C, Pan S H, Yang S C, et al. Claudin-1 is a metastasis suppressor and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179(2): 123-133.
- [6] Fritzsche F R, Oelrich B, Johannsen M, et al. Claudin-1 protein expression is a prognostic marker of patient survival in renal cell carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(21): 7035-7042.
- [7] Lee J W, Lee S J, Seo J, et al. Increased expressions of claudin-1 and claudin-7 during the progression of cervical neoplasia [J]. Gynecol Oncol, 2005, 97(1): 53-59.
- [8] Soini Y, Talvensaaari-Mattila A. Expression of claudins 1, 4, 5 and 7 in ovarian tumors of diverse types [J]. Int J Gynecol Pathol, 2006, 25(4): 330-335.
- [9] Resnick M B, Gavilanez M, Newton E, et al. Claudin expression in gastric adenocarcinomas: a tissue microarray study with prognostic correlation [J]. Hum Pathol, 2005, 36(8): 886-892.
- [10] Billings S D, Walsh S V, Fisher C, et al. Aberrant expression of tight junction-related proteins ZO-, claudin-1 and occludin in synovial sarcoma an immunohistochemical study with ultrastructural correlation [J]. Mod Pathol, 2004, 17(2): 141-149.
- [11] Huo Q, Kinugasa T, Wang L, et al. Claudin-1 protein is a major factor involved in the tumorigenesis of colorectal cancer [J]. Anticancer Res, 2009, 29(3): 851-857.
- [12] de Oliveira S S, de Oliveira I M, De Souza W, et al. Claudins upregulation in human colorectal cancer [J]. FEBS Lett, 2005, 579(27): 6179-6185.
- [13] Singh A B, Sharma A, Smith J J. Claudin-1 up-regulates the repressor ZEB-1 to inhibit E-cadherin expression in colon cancer cells [J]. Gastroenterology, 2011, 141(6): 2140-2153.

(责任编辑: 冉明会)

《中华医学教育探索杂志》

欢迎赐稿、订阅

在线投稿网站: yxjyts.alljournals.ac.cn

邮发代号: 78-127