

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.04.013

· 基础研究 ·

## OPN 基因 RNAi 对 U87 胶质瘤细胞生长和侵袭的抑制作用

赵 鹏, 陆小明, 鲁艾林, 陈云祥, 刘 宁, 傅 震\* (南京医科大学 附属第一医院 神经外科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 探讨靶向骨桥蛋白基因(osteopontin, *OPN*)的 siRNA 片段对 U87 胶质瘤细胞生长和侵袭力的影响及其可能的作用机制。方法: 根据 *OPN* 基因序列设计并合成的 siRNA 片段(*OPN*-RNAi)转染 U87 细胞。MTT 法检测 U87 细胞增殖; Western blotting 检测 *OPN* 及基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)2、MMP9 蛋白的表达; Transwell 小室侵袭实验检测 U87 细胞的侵袭力; 明胶酶谱法检测 MMP2、MMP9 的酶活性。结果: 体外合成的 *OPN*-RNAi 能有效抑制 U87 细胞中 *OPN* 蛋白的表达( $P < 0.05$ ), *OPN*-RNAi 同时还能下调 MMP2、MMP9 蛋白的表达( $P < 0.05$ )及其酶活性( $P < 0.01$ ), 并抑制 U87 细胞的增殖( $P < 0.05$ )和侵袭力( $P < 0.05$ )。结论: *OPN*-RNAi 能够有效抑制 U87 胶质瘤细胞的生长及其侵袭力, 其机制与其抑制 *OPN* 下游基因 *MMP2*、*MMP9* 的表达和酶活性有关。

[关键词] 骨桥蛋白基因; RNAi; U87 胶质瘤; 基质金属蛋白酶

[中图分类号] R739.41; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)04-0383-04

## Knockdown of *OPN* by *OPN*-RNAi inhibits growth and invasiveness of U87 glioma cells

ZHAO Peng, LU Xiao-ming, LU Ai-lin, CHEN Yun-xiang, LIU Ning, FU Zheng\* (Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of siRNA targeting osteopontin (*OPN*-RNAi) on the proliferation and invasiveness of U87 glioma cells and the possible mechanism. **Methods:** *OPN*-RNAi was synthesized according to the gene sequence of *OPN* protein and was transfected into U87 cells. The proliferation of U87 cells was examined by MTT; matrix metalloproteinase (MMP) 2 and MMP9 expression were detected by Western blotting assay; transwell assay and gelatin-zymogram were used to detect the invasion ability of U87 cells and gelatinase activity of MMP2 and MMP9, respectively. **Results:** Synthesized *OPN*-RNAi effectively inhibited the expression of *OPN* in U87 cells ( $P < 0.05$ ). *OPN*-RNAi also significantly decreased the expression of *MMP2* and *MMP9* in U87 cells ( $P < 0.05$ ) and the gelatinase activity of MMP2 and MMP9 ( $P < 0.01$ ), and inhibited the proliferation and invasiveness of U87 cells (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Knockdown of *OPN* with *OPN*-RNAi can inhibit the proliferation and invasiveness of U87 cells, which is probably related to the decreased expression of *MMP2* and *MMP9* genes and their gelatinase activities.

[Key words] osteopontin gene (*OPN*); RNAi; glioma cell; matrix metalloproteinase (MMP)

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(4): 383-386]

目前认为胶质瘤本质上是一种基因异常疾病, 各种致癌因素通过激活一种或多种原癌基因的表达或改变其表达模式, 同时抑制抑癌基因的表达或导致其突变、缺失, 从而使肿瘤细胞逃避了正常生长调控机制, 出现异常增殖、自主侵袭、血管增生等生物学表型, 其中促使肿瘤细胞趋化、黏附和迁移以及肿瘤新生血管形成等因素起着十分重要的作用<sup>[1-2]</sup>。骨桥蛋白(osteopontin, *OPN*)是一种分泌性钙结合糖磷酸化蛋白, 能与整合素、CD44 等多种受体分子结合, 进而促进细胞趋化、黏附、迁移、增殖和血管生成。研究<sup>[3-9]</sup>证实 *OPN* 在机体免疫监控、骨骼重建、血管生

成、组织损伤后重构等正常生理过程中发挥重要功能, 同时研究也发现在胶质瘤、乳腺癌、前列腺癌等多种人类恶性肿瘤中 *OPN* 呈现高表达, 而且罹患恶性肿瘤的患者血清中 *OPN* 的含量明显高于正常人。本

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30672165); 江苏省医学重点人才项目(No. RC2007061)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30672165); the Medical Talent Project of Jiangsu Province (No. RC2007061)。

[作者简介] 赵 鹏(1977-), 男, 重庆市人, 博士, 主治医师, 主要从事胶质瘤的分子生物学研究。E-mail: zhaopeng@njmu.edu.cn

\* 通信作者(Corresponding author)。E-mail: YYPL9@njmu.edu.cn

实验拟通过 siRNA 下调 U87 胶质瘤细胞中 *OPN* 基因表达, 观测其对 U87 细胞生长的影响, 探讨将 *OPN* 作为胶质瘤基因治疗靶点的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要实验材料

*OPN* 抗体购自 Thermo 公司; 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteases, MMP) 2、MMP9 抗体购自 Cell signaling 公司; GAPDH 抗体购自上海康成生物有限公司; siRNA 转染试剂购自 Roche 公司; MTT 试剂盒购自 Promega 公司; 细胞侵袭检测试剂盒购自 Cell biolabs 公司; U87 胶质瘤细胞为本室保存。

### 1.2 siRNA 的设计和合成

根据 Gene bank 提供的 *OPN* 序列 (NM\_001040058), 参照 siRNA 靶点设计原则<sup>[10]</sup>, 运用 siRNA 靶点设计软件 (Invitrogen), 设计并筛选出了一个有效的靶位点: GAGCATTCGGATGTGATTGAT, 另行设计一条无效序列: TTCTCCGAACGTGT-CACGT, 委托上海吉玛公司合成 siRNA, 片段分别命名为 *OPN*-RNAi 和 *OPN*-NC。

### 1.3 细胞培养和转染

U87 胶质瘤细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。适量细胞接种在 35 mm 培养皿中至 50% ~ 80% 融合后, 将合成的 siRNA 片段转入细胞中, 具体操作见试剂说明。转染后细胞分别命名为 U87-*OPN*-RNAi 和 U87-*OPN*-NC。

### 1.4 Western blotting 检测 *OPN* 及 MMP2、MMP9 的表达

具体步骤参考《现代分子生物学实验技术》<sup>[11]</sup>方法进行。简言之, 转染后 48 h 收集细胞, PBS 洗涤 1 次, 离心弃上清, 加入 100 μl 预冷的 RIPA 细胞裂解液 (Pierce), 置冰上 40 min。4 °C、10 000 × *g* 离心 15 min, 取上清进行蛋白质定量 (Lowry 酚试剂法)。取 50 μg 蛋白质加入 2 × 上样缓冲液, 经 100 °C、5 min 变性后用 10% 的 SDS-PAGE 分离。蛋白质半干转移至 PVDF 膜 (Roche)。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液 4 °C 封闭过夜。分别加入 *OPN*、MMP2、MMP9 及 GAPDH 的一抗, 4 °C 过夜, TBST 洗涤 3 次, 加入二抗 (Santa cruz) 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 4 次。加 ECL 显色剂 (Cell signaling) 1 min, X 线胶片曝光成像。所得图像经 Quantity one 4.4 软件定量分析。

### 1.5 MTT 法检测细胞的增殖

细胞转染 24 h 后, 制成单细胞悬液, 按 5 × 10<sup>3</sup>/孔接种于 96 孔板中, 每天每组取 3 复孔用 MTT 法检

测细胞增殖状况, 连续检测 5 d, 绘制细胞生长曲线。

### 1.6 明胶酶谱电泳分析法检测 MMP 明胶酶活性

细胞转染 24 h 后, 按 2 × 10<sup>6</sup> 细胞/孔接种于 6 孔板内, 过夜。次日用 PBS (pH 7.4) 洗涤细胞 2 次, 继续培养 48 h 后收集上清液, 4 °C、2 000 × *g* 离心 10 min, 以含 1 μg/L 明胶的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后漂洗, 37 °C 孵育 24 h, 考马斯亮蓝染色、脱色后即见 MMP 条带, 扫描后所得图像经 Quantity one 4.4 软件分析。

### 1.7 Transwell 小室侵袭实验检测细胞的侵袭性

细胞转染后 72 h, 应用小室侵袭实验试剂盒检测其侵袭力变化, 每组 3 复孔。在上室孔中准确加入 1 × 10<sup>6</sup> 细胞/孔 (无血清培养基的单细胞悬液), 下室中加入完全培养基, 培养 24 h。培养结束后将 Transwell 上室内壁的附着细胞用湿棉签擦去, 穿过聚碳酸酯膜的细胞用结晶紫染色, 最后脱色液溶解, 然后检测脱色液 *D*<sub>560</sub> 的光密度值, 代表穿越细胞数。

### 1.8 统计学处理

所有数据均采用 Stata 7.0 软件进行 ANOVA 检验, 并运用 Scheffe 多重比较分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *OPN*-RNAi 抑制 U87 细胞中 *OPN* 蛋白的表达

*OPN*-RNAi 转染 U87 细胞后 72 h, 抽提总蛋白, Western blotting 检测相关蛋白的表达, 发现 U87、U87-*OPN*-NC 和 U87-*OPN*-RNAi 3 组 *OPN* 的相对表达量分别为 0.51、0.60 和 0.16, U87-*OPN*-RNAi 组 *OPN* 的表达明显下调 (*P* < 0.05), U87-*OPN*-NC 组与未处理 U87 组之间无明显差别 (*P* > 0.05, 图 1)。

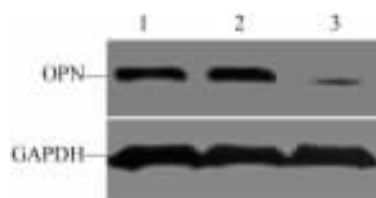


图 1 *OPN*-RNAi 抑制 U87 细胞中 *OPN* 蛋白的表达  
Fig. 1 *OPN*-RNAi inhibited *OPN* expression in U87 cells  
1: U87 cells; 2: U87-*OPN*-NC cells; 3: U87-*OPN*-RNAi cells

### 2.2 *OPN*-RNAi 抑制 U87 细胞的增殖

*OPN*-RNAi 转染 U87 细胞 24 h 后, 按 5 × 10<sup>3</sup>/孔接种于 96 孔板, 次日开始检测, 结果 (图 2) 显示从检测后第 3 天开始, U87-*OPN*-RNAi 细胞的增殖较未处理的 U87 细胞和 U87-*OPN*-NC 细胞出现明显抑制 (*P*

<0.05 或  $P < 0.01$  )。

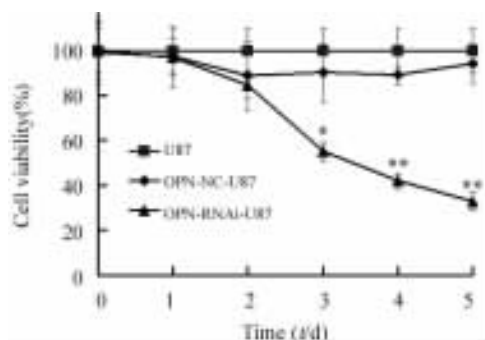


图2 OPN-RNAi 抑制 U87 细胞的生长

Fig.2 OPN-RNAi inhibited proliferation of U87 cells

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs U87 or OPN-RNAi-U87

### 2.3 OPN-RNAi 抑制 U87 细胞中 MMP2、MMP9 蛋白的表达

U87 细胞转染后 72 h, 抽提总蛋白, 检测 MMP2、MMP9 蛋白的表达。结果发现 U87-OPN-RNAi 细胞中 MMP2、MMP9 的相对表达量分别为  $(0.82 \pm 0.21)$  和  $(0.66 \pm 0.6)$ , 较未处理 U87 细胞和 U87-OPN-NC 细胞明显下调 ( $P < 0.05$ ), 而 U87-OPN-NC 与未处理 U87 细胞之间 MMP2、MMP9 的表达无明显差别 ( $P > 0.05$ , 图 3)。

### 2.4 OPN-RNAi 抑制 U87 细胞中 MMP2、MMP9 蛋白的明胶酶活性

转染后 U87 细胞用明胶酶谱法检测其中 MMP 的活性发现, U87-OPN-RNAi 细胞的 MMP2、MMP9 的活性较 U87-OPN-NC 与未处理 U87 细胞明显下调, 仅为 U87 组的 21.3% ( $P < 0.01$ ), U87-OPN-NC

组与未处理组间无明显差别 ( $P > 0.05$ , 图 4)。

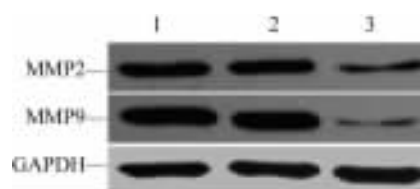


图3 OPN-RNAi 抑制 U87 细胞中 MMP2、MMP9 蛋白的表达

Fig.3 OPN-RNAi inhibited MMP2 and MMP9

expression in U87 cells

1: U87 cells; 2: U87-OPN-NC cells; 3: U87-OPN-RNAi cells

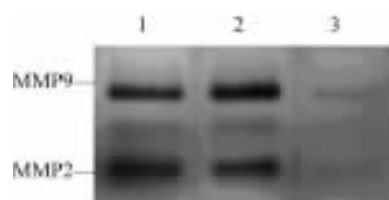


图4 OPN-RNAi 抑制 U87 细胞中 MMP2、9 蛋白明胶酶活性

Fig.4 OPN-RNAi inhibited gelatin activity of MMP2

and MMP9 in U87 cells

1: U87 cells; 2: U87-OPN-NC cells; 3: U87-OPN-RNAi cells

### 2.5 OPN-RNAi 抑制 U87 细胞的侵袭力

OPN-RNAi 转染 U87 细胞 72 h 后检测细胞侵袭力改变, 结果可见 U87-OPN-RNAi 组穿越细胞明显少于对照组, U87、U87-OPN-NC 和 U87-OPN-RNAi 3 组脱色液  $D_{560}$  值分别为:  $(0.83 \pm 0.05)$ 、 $(0.83 \pm 0.07)$  和  $(0.46 \pm 0.01)$ , U87-OPN-RNAi 组细胞侵袭力明显减弱 ( $P < 0.05$ ), 而 U87-OPN-NC 组与未处理组间无显著差别 ( $P > 0.05$ , 图 5)。

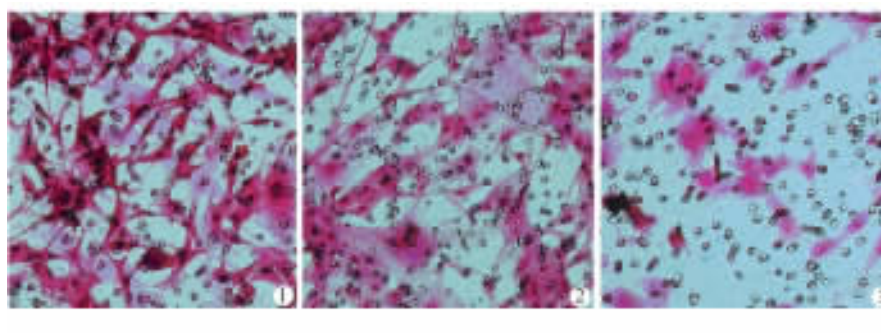


图5 OPN-RNAi 抑制 U87 细胞侵袭力(×200)

Fig.5 OPN-RNAi inhibited invasiveness of U87 cells(×200)

1: U87 cells; 2: U87-OPN-NC cells; 3: U87-OPN-RNAi cells

## 3 讨论

胶质瘤是颅内常见的原发性肿瘤。虽然近年来

胶质瘤的治疗方法有所进展, 但是疗效仍不理想, 预后差, 病死率高, 尤其是恶性胶质瘤<sup>[12]</sup>。胶质瘤本质上是一种基因异常的疾病, 各种致癌因素通过激

活一种/多种原癌基因的表达或改变其表达模式,同时抑制抑癌基因的表达或导致其突变、缺失从而使肿瘤细胞逃避了正常免疫调控,出现异常增殖、侵袭、血管增生等,其中肿瘤细胞趋化、黏附和迁移以及肿瘤新生血管的形成等因素起着十分重要的作用<sup>[1, 2, 13-15]</sup>。

*OPN* 定位于染色体 4q13 上,由 7 个外显子和 6 个内含子组成,所编码蛋白为带负电荷的钙结合糖基化磷蛋白,相对分子质量为 41 500。*OPN* 中含有一个特异的 RGD 序列、一个 SVVYGLR 序列、一个 RS 结构域(凝血酶的裂解位点)、部分 MMP 的酶切位点以及钙结合位点和肝素结合位点。*OPN* 能与整合素、CD44 等多种受体分子结合,进而促进细胞的趋化、黏附、迁移、增殖和血管生成,此外还通过 NF- $\kappa$ B 间接上调 MMP2、MMP9 蛋白的表达,引起细胞外基质破坏,介导肿瘤细胞侵袭转移<sup>[4, 8, 16]</sup>。

MMP 是锌离子依赖性内肽酶,几乎能降解细胞外基质的所有成分,其中 MMP2、MMP9 能够降解 IV 型和 V 型胶原、纤维连接蛋白、弹性蛋白。一方面通过降解基底膜和包绕肿瘤的基质,使肿瘤细胞突破基质屏障,促进肿瘤侵袭、转移;另一方面则通过诱导新生血管生成等促进肿瘤生长和扩散。因而 MMP2、MMP9 在肿瘤的生长、侵袭和转移中发挥重要作用<sup>[4, 17-19]</sup>。

本实验合成了一条靶向人 *OPN* 基因的 RNAi 序列,并导入 U87 胶质瘤细胞中,研究其对 U87 细胞生长的影响。结果发现,OPN-RNAi 能够有效下调 *OPN* 的表达并明显抑制 U87 细胞的生长。在抑制 *OPN* 表达的同时还有效抑制了 *OPN* 下游基因 MMP2、MMP9 的表达及其酶活性,明显下调 U87 细胞的侵袭力。实验结果显示,合成 *OPN*-RNAi 的策略能够成功地在 U87 胶质瘤细胞中应用,而且 *OPN* 的表达与 U87 细胞的增殖、侵袭等生物学特性密切相关,这为以 *OPN* 为靶点的肿瘤基因治疗奠定基础。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Endersby R, Baker SJ. PTEN signaling in brain: neuropathology and tumorigenesis [ J ]. *Oncogene*, 2008, 27( 41 ): 5416-5430.
- [ 2 ] de Groot JF, Gilbert MR. New molecular targets in malignant gliomas [ J ]. *Curr Opin Neurol*, 2007, 20( 6 ): 712-718.
- [ 3 ] Jain S, Chakraborty G, Kundu GC. The crucial role of cyclooxygenase-2 in osteopontin-induced protein kinase C  $\alpha$ /c-Src/IkappaB kinase  $\alpha$ /beta-dependent prostate tumor progression and angiogenesis [ J ]. *Cancer Res*, 2006, 66( 13 ): 6638-6648.
- [ 4 ] Rangaswami H, Bullule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression [ J ]. *Trends Cell Biol*, 2006, 16( 2 ): 79-87.
- [ 5 ] Rodrigues LR, Teixeira JA, Schmitt FL, *et al.* The role of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer [ J ]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007, 16( 6 ): 1087-1097.
- [ 6 ] Chakraborty G, Jain S, Behera R, *et al.* The multifaceted roles of osteopontin in cell signaling, tumor progression and angiogenesis [ J ]. *Curr Mol Med*, 2006, 6( 8 ): 819-830.
- [ 7 ] Zhao J, Dong L, Lu B, *et al.* Down-regulation of osteopontin suppresses growth and metastasis of hepatocellular carcinoma via induction of apoptosis [ J ]. *Gastroenterology*, 2008, 135( 3 ): 956-968.
- [ 8 ] El-Tanani MK, Campbell FC, Kurisetty V, *et al.* The regulation and role of osteopontin in malignant transformation and cancer [ J ]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006, 17( 6 ): 463-474.
- [ 9 ] Selkirk SM, Morrow J, Barone TA, *et al.* Elevation of osteopontin levels in brain tumor cells reduces burden and promotes survival through the inhibition of cell dispersal [ J ]. *J Neurooncol*, 2008, 86( 3 ): 285-296.
- [ 10 ] Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, *et al.* Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference [ J ]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32( 3 ): 936-948.
- [ 11 ] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[ M ]. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2001: 400-403.
- [ 12 ] Wrensch M, Fisher JL, Schwartzbaum JA, *et al.* The molecular epidemiology of gliomas in adults [ J ]. *Neurosurg Focus*, 2005, 19( 5 ): E5.
- [ 13 ] Chakravarti A, Palanichamy K. Overcoming therapeutic resistance in malignant gliomas: current practices and future directions [ J ]. *Cancer Treat Res*, 2008, 139( 2 ): 173-189.
- [ 14 ] Chi AS, Wen PY. Inhibiting kinases in malignant gliomas [ J ]. *Expert Opin Ther Targets*, 2007, 11( 4 ): 473-496.
- [ 15 ] Lawler S, Chioccia EA. Emerging functions of microRNAs in glioblastoma [ J ]. *J Neurooncol*, 2009, 92( 3 ): 297-306.
- [ 16 ] Park JB, Kwak HJ, Lee SH. Role of hyaluronan in glioma invasion [ J ]. *Cell Adh Migr*, 2008, 2( 3 ): 202-207.
- [ 17 ] Vihinen P, Ala-aho R, Kahari VM. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in cancer [ J ]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2005, 5( 3 ): 203-220.
- [ 18 ] Vihinen P, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets [ J ]. *Int J Cancer*, 2002, 99( 2 ): 157-166.
- [ 19 ] Koutroulis I, Zarros A, Theocharis S. The role of matrix metalloproteinases in the pathophysiology and progression of human nervous system malignancies: a chance for the development of targeted therapeutic approaches [ J ]? *Expert Opin Ther Targets*, 2008, 12( 12 ): 1577-1586.

[ 收稿日期 ] 2009-04-08

[ 修回日期 ] 2009-06-11

[ 本文编辑 ] 徐红梅