

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.06.009

· 基础研究 ·

慢病毒介导 *RhoA* 基因沉默对卵巢癌细胞侵袭和迁移的影响

杨文娟¹, 康佳丽¹, 王小霞¹, 刘启才², 王冬昱¹, 贾菡¹ (1. 广州医学院附属广州市第一人民医院妇产科, 广东 广州 510180; 2. 广州医学院中心实验室, 广东 广州 510182)

[摘要] **目的:**建立慢病毒介导 *RhoA* 基因稳定沉默卵巢癌 HO8910 细胞株,研究 *RhoA* 基因对 HO8910 细胞侵袭和迁移的影响。**方法:**构建靶向沉默 *RhoA* 基因的慢病毒载体 Lenti-U6-sh*RhoA*,将其感染 HO8910 细胞,经过嘌呤霉素筛选,建立稳定沉默 *RhoA* 基因的 HO8910 细胞。实时荧光定量 PCR 检测 HO8910 细胞中 *RhoA* mRNA 的表达;MTT 检测 HO8910 细胞的增殖;Transwell 体外迁移和侵袭实验检测 *RhoA* 基因沉默对 HO8910 细胞侵袭和迁移的影响。**结果:**成功构建靶向 *RhoA* 基因的慢病毒载体 Lenti-U6-sh*RhoA*,建立了 *RhoA* 基因稳定沉默的 HO8910 细胞。与 Lenti-U6-NC 对照组对比, *RhoA* 基因稳定沉默 HO8910 细胞 *RhoA* mRNA 的表达明显降低[(30.7 ± 5.40)% vs (95.9 ± 6.53)% , $P < 0.05$];沉默 *RhoA* 基因能降低 HO8910 细胞的存活率[(51.16 ± 7.41)% vs (95.67 ± 2.14)% , $P < 0.05$];*RhoA* 基因沉默组 HO8910 细胞的侵袭、迁移及黏附能力较 Lenti-U6-NC 对照组明显受到抑制[迁移穿过人工基底膜细胞数(31 ± 6) vs (84 ± 13)个, $P < 0.05$; 穿过微孔膜的细胞数(97 ± 12) vs (689 ± 23)个, $P < 0.05$; 黏附率(68.16 ± 6.53)% vs (98.71 ± 4.92)% , $P < 0.05$]。**结论:**慢病毒介导的 *RhoA* 基因沉默能抑制卵巢癌 HO8910 细胞的侵袭和迁移。

[关键词] 慢病毒;RNA 干扰;*RhoA* 基因;卵巢癌;侵袭;迁移

[中图分类号] R737.31; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)06-0615-06

Effect of lentivirus-mediated silence of *RhoA* gene on invasion and migration of ovarian cancer cells

YANG Wen-juan¹, KANG Jia-li¹, WANG Xiao-xia¹, LIU Qi-cai², WANG Dong-yu¹, JIA Han¹ (1. Department of Gynecology & Obstetrics, Guangzhou First Municipal People's Hospital, Affiliated to Guangzhou Medical College, Guangzhou 510180, Guangdong, China; 2. Central Laboratory, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:**To construct a ovary cancer cell line HO8910 with a stable knockdown of *RhoA* gene by lentiviral vectors; and to investigate the effect of *RhoA* gene on invasion and migration of HO8910 cells. **Methods:** Lenti-U6-sh*RhoA* lentivirus targeting silence *RhoA* gene expression was constructed and infected into HO8910 cells. HO8910 cells stable knockdown *RhoA* gene expression were obtained by puromycin selection. The expression of *RhoA* mRNA in HO8910 cells was detected by real-time PCR; the proliferation of HO8910 cells was detected by MTT assay; and Transwell migration assay and Matrigel invasion assay were used to measure the effect of *RhoA* gene silence on invasion and migration of HO8910 cells. **Results:** The lentiviral vector Lenti-U6-sh*RhoA* targeting *RhoA* gene was constructed successfully and a stable *RhoA* knockdown HO8910 cell line was established. The *RhoA* gene expression was efficiently suppressed by Lenti-U6-sh*RhoA* with a expression rate of (30.7 ± 5.4)% , compared with the control Lenti-U6-NC group (95.9 ± 6.53)% ($P < 0.05$). The knockdown of *RhoA* gene inhibited the survival rate of HO8910 cells ([51.16 ± 7.41]% vs [95.67 ± 2.14]%, $P < 0.05$); Compared with the Lenti-U6-NC group, the capabilities of the invasion (97 ± 12 vs 689 ± 23, $P < 0.05$), migration (31 ± 6 vs 84 ± 13, $P < 0.05$) and adhesion rate ([68.16 ± 6.53]% vs [98.71 ± 4.92]%, $P < 0.05$) were also obviously suppressed in the *RhoA* stable knockdown HO8910 cell line. **Conclusion:** The lentivirus-

[基金项目] 广东省科技计划资助项目(No. 2010B031600185)。Project supported by the Science and Technology Program of Guangdong Province (No. 2010B031600185)

[作者简介] 杨文娟(1986-),女,安徽省合肥市人,硕士生,主要从事生殖内分泌的基础和临床研究,E-mail:ywjshihaoren@126.com

[通信作者] 康佳丽(KANG Jia-li, corresponding author),E-mail:kangjiali1961@21cn.com

mediated *RhoA* gene silence can suppress the invasion and migration of ovary cancer HO8910 cells.

[**Key words**] lentivirus; RNA interference; *RhoA* gene; ovary cancer; invasion; migration

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(6): 615-620]

侵袭性和迁移性是恶性肿瘤的重要标志, 大约 90% 的肿瘤患者最终死于肿瘤的侵袭和迁移。在女性恶性肿瘤中, 卵巢癌病死率位于首位^[1], 确诊时 60% ~ 70% 的患者已属晚期, 并且在手术或联合化疗后仍有 50% ~ 80% 的患者复发。事实上, 多种人类肿瘤当出现原发肿瘤病灶时, 肿瘤细胞已以微小细胞克隆的形式发生了全身性的播散^[2]。所以, 深入了解卵巢癌侵袭和迁移发生的分子机制, 降低卵巢癌细胞的侵袭和迁移能力, 能为卵巢癌的治疗提供新的方向。*RhoA* (Ras homologue member A) 蛋白具有调控细胞形态和运动的功能。研究^[3-5]发现, 该基因在多种恶性肿瘤高表达, 与肿瘤的迁移和侵袭密切相关。RNAi 技术由于其高效性和特异性成为目前基因沉默的首选工具, 然而如何将其优势发挥到临床生物治疗却是个难题。本实验通过构建慢病毒载体, 采用 RNAi 技术沉默卵巢癌 HO8910 细胞中 *RhoA* 基因的表达, 建立 *RhoA* 基因稳定低表达的 HO8910 细胞株, 并通过体外实验研究其侵袭和迁移的变化, 为卵巢癌的靶向治疗提供有用的实验资料。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂

人卵巢癌 HO8910 细胞、人肾上皮 293T 细胞购自中山大学实验动物中心。HO8910 细胞培养于含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素混合液的 PRIM 1640 培养基中; 293T 细胞培养于含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素混合液的 DMEM 高糖培养基中, 培养条件均为 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度。慢病毒表达载体 psiHIV-U6、Lenti-PacTM HIV 慢病毒表达包装试剂盒购自美国 GeneCopoeia 公司, 质粒小量抽提试剂盒、无内毒素质粒中量抽提试剂盒购自德国 MN 公司, 脂质体 Lipo2000、TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司, 两步法实时荧光定量试剂盒购自日本 TaKaRa 公司, MTT 购自美国 Sigma 公司, Matrigel 胶购自美国 BD 公司, Transwell 室购自美国 Corning 公司。

1.2 慢病毒 psiHIV-U6-sh*RhoA* 及 psiHIV-U6-NC 的包装、收集和浓缩

对数生长期 293T 细胞消化重悬后取 1.5×10^6 个细胞提前 2 d 接种于培养瓶, 将干扰质粒 psiHIV-U6-*RhoA*-sh2(干扰序列为 5'-GAAGGCAGAGATATGGCAA-3') 和通用阴性对照质粒 psiHIV-U6-NC 按

病毒包装说明书进行包装, 收集 48 和 72 h 的上清液。离心、过滤后滤液于 4 °C、 $50\,000 \times g$ 离心 4 h 进行浓缩, 分装, 存放于 -80 °C。所收集的病毒分别命名为 Lenti-U6-sh*RhoA* 及 Lenti-U6-NC。

1.3 慢病毒 Lenti-U6-sh*RhoA* 及 Lenti-U6-NC 感染卵巢癌 HO8910 细胞及稳定克隆的建立

提前 1 d 将 5×10^5 个 HO8910 细胞接种于 6 孔板, 分别取 0.5 ml 浓缩病毒 Lenti-U6-sh*RhoA* 和 Lenti-U6-NC 感染 HO8910 细胞。48 h 后, 将各组细胞按 1:20 进行稀释, 非选择培养液培养 24 h 后向其中加入嘌呤霉素, 终质量浓度为 1.5 μg/ml (已经预实验测出嘌呤霉素对 HO8910 细胞的最小致死量为 1.5 μg/ml), 待耐嘌呤霉素的细胞克隆形成后, 在荧光显微镜下挑取完全表达绿色荧光蛋白的单克隆细胞集落, 于 6 孔板中进行扩大培养, 所建立细胞分别以所用慢病毒命名, 以下实验均分组为 *RhoA* 沉默组、阴性对照组和空白组 (HO8910 组)。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测 *RhoA* 沉默对 HO8910 细胞中 *RhoA* mRNA 表达的影响

用 TRIzol 试剂分别提取各组细胞的总 RNA, 用逆转录试剂盒将 RNA 转化为 cDNA, 然后用 Strata-gene 荧光定量 PCR 仪进行扩增。PCR 引物: *RhoA* 上游引物为 5'-TTCCATCGACAGCCCTGATAGTTTA-3', 下游引物为 5'-CACGTTGGGACAGAAATGCTTG-3'; *GAPDH* 上游引物为 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3', 下游引物为 5'-TGGTGAAGACGCCACTGGA-3', 以上两步实验均按照两步法实时荧光定量试剂盒 SYBR PrimeScript RT-PCR Kit 说明书进行。反应参数: 预变性 95 °C 30 s 1 个循环; PCR 反应阶段 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 40 个循环。数据分析由 SDS2.2.2 软件自动完成。

1.5 MTT 及细胞计数法评价 *RhoA* 沉默对 HO8910 细胞生长的影响

取生长良好的 3 组细胞以 0.25% 胰蛋白酶消化, 制备成单细胞悬液连续计数 7 d 细胞生长曲线, 并计算 3 组细胞的倍增时间。细胞倍增时间 $DT = t \times [\lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)]$ (t 为培养时间, N_0 为首次记下的细胞数, N_t 为 t 时间的细胞数)。MTT 法: 以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板。分别在第 1、2、3、4、5 d 每组细胞取 5 个孔, 每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/ml) 10 μl, 37 °C 继续培育 4 h。吸弃孔内培养液, 每

孔加 100 μl DMSO,振荡 10 min 使结晶充分溶解,酶标仪检测 492 nm 波长处的光密度 D 值,细胞存活率(%) = 试验组 D_{492} /空白组 D_{492}) \times 100%。每组设 5 个复孔,实验均重复 3 次^[6]。

1.6 Transwell 实验检测 *RhoA* 沉默对 HO8910 细胞迁移和侵袭的影响

将 Matrigel 胶 1:3 稀释,取 30 μl 铺于 Transwell 小室滤膜的上表面,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 使之固化。各组细胞以 5×10^4 个/孔接种于小室的滤膜上方,0.5% 胎牛血清的培养液培养,下室加入 600 μl 含 20% 胎牛血清的培养液,48 h 后多聚甲醛固定 1 min,结晶紫染色后在倒置显微镜下随机选择中央及四周 5 个视野($\times 200$),计数穿过人工基底膜和微孔膜的细胞数目。细胞迁移实验步骤与侵袭实验相同,Transwell 小室滤膜的上表面不加 Matrigel 胶。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.7 细胞黏附实验检测 *RhoA* 沉默对 HO8910 细胞黏附能力的影响

将 Matrigel 胶 1:3 稀释,每孔 30 μl 加入 96 孔板,1% 牛血清白蛋白封闭过夜。各组细胞按 1×10^5 个/孔接种,培养 1 h 后除去未黏附细胞,加入 10 μl MTT,4 h 后吸弃孔内培养液,加入 100 μl DMSO,振荡 10 min,酶标仪检测 492 nm 波长处的 D_{492} 值,相对黏附率(%) = 实验组 D_{492} /空白组 $D_{492} \times 100\%$ 。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 13.0 软件,采用 t 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功包装靶向人 *RhoA* 基因的慢病毒 Lenti-U6-sh*RhoA* 及对照 Lenti-U6-NC

利用脂质体 Lipo2000 分别将干扰质粒 Lenti-U6-sh*RhoA*、Lenti-U6-NC 与慢病毒包装质粒共转染 293T 细胞,24 h 后荧光强度高,细胞生长良好,转染效率达 80%。转染 48 h 后,细胞出现融合现象,荧光强度达到最高。将病毒浓缩液感染 293T 细胞后 24 h,干扰组干扰效率达到 85% 以上,阴性对照组干扰效率为 70%(图 1),证明慢病毒包装成功。

2.2 Lenti-U6-sh*RhoA* 及 Lenti-U6-NC 稳定感染 HO8910 细胞的成功建立

将病毒浓缩液 Lenti-U6-sh*RhoA* 及 Lenti-U6-NC 感染卵巢癌 HO8910 细胞,48 h 后荧光显微镜下观察,病毒感染效率约为 60%(图 2)。进行嘌呤霉素加压筛选,20 d 左右稳定表达荧光蛋白的细胞克隆

集落形成(图 3)。扩大培养的细胞克隆培养 10 代后细胞内荧光蛋白表达量达 98% 以上,表明 Lenti-U6-sh*RhoA* 慢病毒作为干扰载体能稳定持久地整合于靶细胞 HO8910 的基因组,从而实现干扰序列长期稳定的表达。

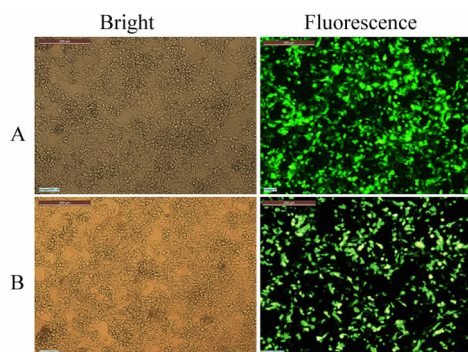


图 1 慢病毒 Lenti-U6-sh*RhoA* 及对照 Lenti-U6-NC 感染 293T 细胞 24 h 后荧光蛋白的表达($\times 100$)
Fig. 1 Fluorescence expression in 293T cells infected with Lenti-U6-sh*RhoA* or Lenti-U6-NC for 24 h($\times 100$)
A: Lenti-U6-sh*RhoA*; B: Lenti-U6-NC

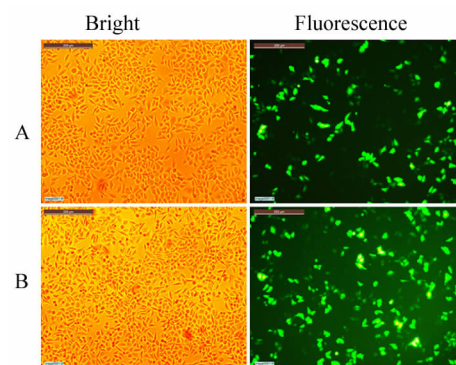


图 2 Lenti-U6-sh*RhoA* 及 Lenti-U6-NC 感染卵巢癌 HO8910 细胞 48 h 后荧光蛋白的表达($\times 200$)
Fig. 2 Fluorescence expression in ovarian cancer HO8910 cells infected with Lenti-U6-sh*RhoA* or Lenti-U6-NC for 48 h($\times 200$)
A: Lenti-U6-sh*RhoA*; B: Lenti-U6-NC

2.3 *RhoA* 沉默降低 HO8910 细胞 *RhoA* mRNA 的表达
实验结果显示,Lenti-U6-sh*RhoA* 稳定沉默细胞组 HO8910 细胞中 *RhoA* mRNA 的表达率较 Lenti-U6-NC 对照组、HO8910 组显著降低[(30.7 ± 5.40)% vs (95.9 ± 6.53)%、(100.0 ± 4.37)%], $P < 0.05$ 。结果表明,慢病毒为干扰载体进行针对 *RhoA* 基因的 RNAi 能显著降低卵巢癌细胞 HO8910 中 *RhoA* mRNA 的表达。

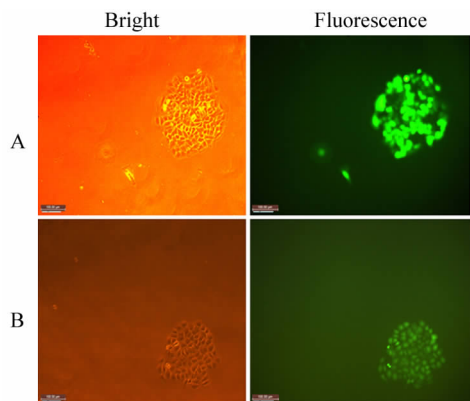


图3 嘌呤霉素加压筛选后 Lenti-U6-shRhoA 及 Lenti-U6-NC 单克隆 HO8910 细胞集落的形成(×200)
Fig. 3 Formation of the puromycin-resistant Lenti-U6-shRhoA and Lenti-U6-NC colonies detected by fluorescence microscopy(×200)
A: Lenti-U6-shRhoA; B: Lenti-U6-NC

2.4 RhoA 沉默降低 HO8910 细胞的增殖能力

Lenti-U6-shRhoA 稳定沉默组 HO8910 细胞的倍增时间显著增加, 倍增时间为 38.94 h, 阴性对照组及 HO8910 细胞的倍增时间为 27.72 h 和 28.39 h (各组均取 d 3 和 d 5 两个点计算, 表 1)。Lenti-U6-shRhoA 稳定沉默组 HO8910 细胞从第 3 天开始存活率明显下降, 在第 5 天时, 存活率达到最低 [(51.16 ± 7.41)% vs (95.67 ± 2.14)%、(100.00 ± 14.12)% , P < 0.05]。由此表明, 降低 RhoA 基因的表达能显著延长 HO8910 细胞的分裂周期, 降低 HO8910 细胞的增殖能力(图 4)。

表 1 细胞计数法检测 Lenti-U6-shRhoA 对 HO8910 细胞增殖的影响 (×10³/ml)

Tab. 1 Effect of Lenti-U6-shRhoA on proliferation of HO8910 cells detected by cell counting (×10³/ml)

	Lenti-U6-shRhoA	Lenti-U6-NC	HO8910
Day1	6.4 ± 1.14	6.8 ± 1.48	7.6 ± 3.36
Day2	8.4 ± 2.30	9.0 ± 3.53	10.0 ± 1.73
Day3	12.0 ± 3.46*	14.8 ± 2.49	17.6 ± 4.16
Day4	20.2 ± 4.60*	31.4 ± 8.39	32.8 ± 4.55
Day5	28.2 ± 6.30*	49.0 ± 7.09	56.8 ± 7.43
Day6	38.8 ± 3.11*	62.8 ± 7.09	67.2 ± 8.64
Day7	49.6 ± 4.98*	72.0 ± 8.57	77.0 ± 5.83

* P < 0.05 vs Lenti-U6-NC or HO8910 groups

2.5 RhoA 沉默降低 HO8910 细胞的侵袭和迁移能力

RhoA 基因稳定沉默组 HO8910 细胞穿过人工基底膜 Matrigel 胶和微孔膜的数目较 Lenti-U6-NC 组、HO8910 组显著降低 [(31 ± 6) vs (84 ± 13)、(89 ± 15)个, P < 0.05; 图 5)。由此表明, 沉默 RhoA 基因能降低卵巢癌 HO8910 细胞体外侵袭能力。此外, Lenti-U6-shRhoA 稳定沉默组 HO8910 细胞穿过微孔膜的数目较 Lenti-U6-NC 组、HO8910 组也显著降低 [(97 ± 12) vs (689 ± 23)、(712 ± 18)个, P < 0.05; 图 6]。结果说明, 沉默 RhoA 基因表达也能降低 HO8910 细胞体外迁移能力。

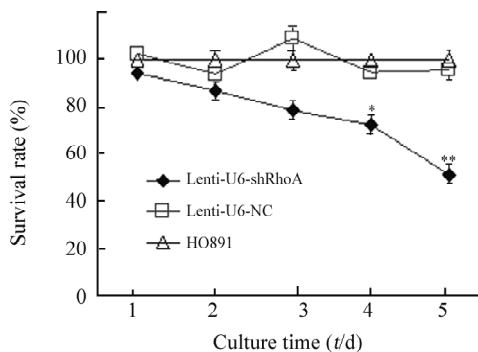


图 4 MTT 法检测 Lenti-U6-shRhoA 对 HO8910 细胞存活率的影响

Fig. 4 Effect of Lenti-U6-shRhoA on survival rate of HO8910 cells detected by MTT assay
* P < 0.05, ** P < 0.01 vs Lenti-U6-NC group

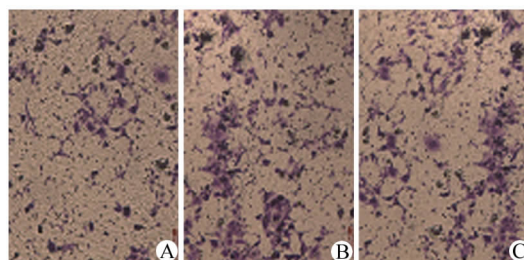


图 5 慢性毒 Lenti-U6-shRhoA 感染降低卵巢癌 HO8910 细胞的侵袭能力 (×200)

Fig. 5 Lenti-U6-shRhoA infection suppressed invasion of ovarian cancer HO8910 cells (×200)
A: Lenti-U6-shRhoA; B: Lenti-U6-NC; C: HO8910

2.6 RhoA 沉默降低 HO8910 细胞黏附能力

细胞黏附实验结果显示, Lenti-U6-shRhoA 稳定沉默组 HO8910 细胞相对黏附率较 Lenti-U6-NC 组、HO8910 组显著降低, 3 组 D 值分别为 0.212 ± 0.032, 0.307 ± 0.026 和 0.311 ± 0.016, 将 Lenti-U6-

shRhoA 和 Lenti-U6-NC 的 *D* 值分别除以 HO8910 细胞 *D* 值得出相对黏附率, RhoA 沉默组 HO8910 细胞的黏附率明显低于另外两组[(68.16 ± 6.53)% vs (98.71 ± 4.92)% 、(100.00 ± 5.81)% , $P < 0.05$]。由此表明, *RhoA* 沉默显著降低卵巢癌 HO8910 细胞的黏附能力。

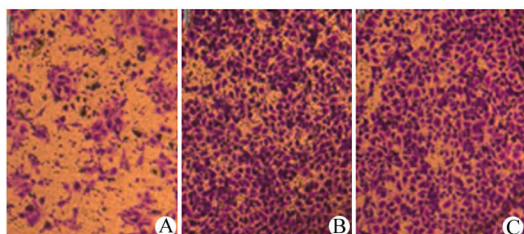


图 6 慢性毒 Lenti-U6-shRhoA 感染降低卵巢癌 HO8910 细胞的迁移能力 (× 200)

Fig. 6 Lenti-U6-shRhoA infection suppressed migration of ovarian cancer HO8910 cells (× 200)

A: Lenti-U6-shRhoA; B: Lenti-U6-NC; C: HO8910

3 讨论

近年来, RNA 干扰技术发展迅速, 它以其高效性和特异性成为基因沉默的首选方法。RNA 干扰属于转录后基因沉默, 在不影响器官发育的基础上抑制目的基因的表达。Kennedy 等^[7]采用 RNA 干扰技术作用于 IIIb 期卵巢浆液性囊腺癌患者的癌细胞, 显示出强大的沉默功能, 然而如何将其优势发挥到临床靶向治疗却是一个难题。RNA 干扰技术的关键是 siRNA 的生成, 目前常用的 siRNA 的获取方法有化学合成、体外转录、长片段 dsRNA 经 RNase III 降解法进行体外制备, 或者通过质粒载体、病毒载体在细胞中表达产生。体外制备的 siRNA 转染效率高, 但是价格昂贵, 容易降解, 只能产生短暂干扰作用; 利用脂质体转染质粒虽然可以在细胞体内持续表达 siRNA, 但是对有些细胞转染效率低。

本课题组尝试过用脂质体转染卵巢癌细胞, 转染效率只有 40%, 并且转染后细胞死亡率高, 建立的稳定转染细胞株不稳定, 随着培养代数增加, *eGFP* 基因会发生丢失。所以最后本实验选用慢病毒作为载体, 它由人类免疫缺陷 I 型病毒演变而来, 属于逆转录病毒家族, 无致癌性, 感染效率高, 既能够感染分裂细胞, 也能够感染非分裂细胞, 激发外源基因的表达^[10-13], 加之其可以在哺乳动物体内发生作用, 是基因治疗的理想工具^[14]。本实验组所建立的 Lenti-U6-shRhoA 沉默 HO8910 细胞株和通用阴性对

照 Lenti-U6-NC 感染 HO8910 细胞株在培养 10 代后, 其 *eGFP* 蛋白的表达量仍然达到 98% 以上, 为下一步进行裸鼠体内实验打下了基础。

肿瘤细胞的侵袭和迁移涉及细胞的增殖、运动、降解细胞外基质和黏附等多个步骤。RhoA 蛋白属于小分子 G 蛋白, 是 Rho 家族成员之一, 作为一种分子开关, 循环于非活性的 GDP 结合形式和活性的 GTP 结合形式之间, 调控下游的效应分子或靶蛋白控制肌动蛋白骨架和黏着斑的形成, 从而调节细胞的运动^[15-18]; 同时其又能促使细胞前缘和细胞外基质间形成新的黏附点, 并诱导一些分泌蛋白酶的表达^[19], 从而能维持细胞连续迁移。多项研究^[20-21]表明, RhoA 蛋白在乳腺癌、食道癌、结肠癌等多种肿瘤中表达增加, 并且与淋巴结转移和短生存期有密切关系。林英姿等^[22]通过免疫组化方法检测发现, RhoA 蛋白在卵巢癌组织中表达增高, 其阳性率随临床分期、肿瘤恶性程度的增加而增加。但是对于沉默 *RhoA* 基因能否抑制卵巢癌细胞的侵袭和迁移的研究未见报道。本课题利用慢病毒作为载体通过 RNA 干扰技术建立了 *RhoA* 基因稳定低表达的卵巢癌 HO8910 细胞株, 从体外实验的角度证实 *RhoA* 基因与卵巢癌细胞侵袭和迁移之间的关系, 下一步将用所构建的 Lenti-U6-shRhoA 慢病毒载体进行体内实验, 为卵巢癌的靶向治疗提供实验依据。

体外实验发现, Lenti-U6-shRhoA 干扰组 HO8910 细胞在数量和存活率上都低于 Lenti-U6-NC 组和空白对照组, 且 HO8910 细胞倍增时间明显延长, 存活率仅为空白对照组的 (51.16 ± 7.41)% , 表明 *RhoA* 基因沉默能抑制 HO8910 肿瘤细胞的生长。RhoA 通过调节基质金属蛋白酶和金属蛋白酶组织抑制因子的水平来调节细胞外基质的降解和重建。在细胞迁移和人工重组基底膜实验中, Lenti-U6-shRhoA 干扰组 HO8910 细胞与阴性对照 Lenti-U6-NC 组和空白组相比, 穿过微孔膜和人工基底膜的细胞数明显减少, 说明 Lenti-U6-shRhoA 干扰组 HO8910 细胞运动和降解细胞外基质的能力降低, 表现出低迁移性和低侵袭性。黏附是肿瘤细胞通过细胞表面受体与细胞外基质成分的黏附蛋白发生特异性结合, 本研究显示 Lenti-U6-shRhoA 干扰组 HO8910 细胞的相对黏附率仅为空白对照组的 (68.16 ± 6.53)% ($P < 0.05$), 说明抑制 *RhoA* 基因表达能降低卵巢癌 HO8910 细胞的黏附能力。

综上所述, 本实验通过包装慢病毒 Lenti-U6-shRhoA, 建立了慢病毒介导的 *RhoA* 基因稳定沉默卵巢癌 HO8910 细胞株, 从细胞生长、迁移、侵袭和

黏附四个方面证实了抑制 *RhoA* 基因表达能抑制卵巢癌 H08910 细胞的侵袭和迁移, 为慢病毒介导卵巢癌的生物治疗提供了实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer Statistics, 2008 [J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2): 71-96.
- [2] Fidler IJ. Seed and soil revisited: Contribution of the organ micro-environment to cancer metastasis [J]. Surg Oncol Clin N Am, 2001, 10(2): 257-269.
- [3] Jeon H, Kwak D, Noh J, et al. Phospholipase D2 induces stress fiber formation through mediating nucleotide exchange for RhoA [J]. Cell Signal, 2011, 23(8): 1320-1326.
- [4] Wang JL, Zhang JL, Chen W, et al. Roles of Small GTPase Rac1 in the regulation of actin cytoskeleton during dengue virus infection [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2010, 4(8): e809.
- [5] Rosman DS, Phukan S, Huang CC, et al. TGFBR1 6A enhances the migration and invasion of MCF-7 breast cancer cells through RhoA activation [J]. Cancer Res, 2008, 68(5): 1319-1328.
- [6] Feng RH, Zhu ZG, Li JF, et al. Inhibition of human telomerase in MKN-45 cell line by antisense hTR expression vector induces cell apoptosis and growth arrest [J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(3): 436-440.
- [7] Kennedy A, Dong H, Chen DH, et al. Elevation of seprase expression and promotion of all invasive phenotype by collagenous matrices in ovarian tumor cells [J]. Int J Cancer, 2009, 124(1): 27-35.
- [8] 林杨, 崔满华, 滕红, 等. 应用 RNA 干扰沉默 NOB1 基因对卵巢癌 HEY 细胞增殖和周期的影响 [J]. 中国妇幼保健, 2010, 25(8): 1077-1080.
- [9] Ma JJ, Chen BL, Xin XY. Inhibition of multi-drug resistance of ovarian carcinoma by small interfering RNA targeting to MRP2 gene [J]. Arch Gynecol Obstet, 2009, 279(2): 149-157.
- [10] Levine BL, Humeau LM, Boyer J, et al. Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(46): 17372-17377.
- [11] Baka K, Goto-Koshino Y, Mizukoshi F, et al. Inhibition of the replication of feline immunodeficiency virus by lentiviral vector-mediated RNA interference in feline cell lines [J]. J Vet Med Sci, 2008, 70(8): 777-783.
- [12] Wiznerowicz M, Trono D. Conditional suppression of cellular genes: Lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference [J]. J Virol, 2003, 77(16): 8957-8961.
- [13] 苏桂栋, 尹倩, 孙桂芹, 等. 重组慢病毒载体建立稳定表达绿色荧光蛋白宫颈癌细胞系 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2010, 26(11): 833-836.
- [14] Ikawa M, Tanaka N, Kao WW, et al. Generation of transgenic mice using lentiviral vectors: A novel preclinical assessment of lentiviral vectors for gene therapy [J]. Mol Ther, 2003, 8(4): 666-673.
- [15] Ruseva Z, Geiger PX, Hutzler P, et al. Tumor suppressor KAI1 affects integrin $\alpha v \beta 3$ -mediated ovarian cancer cell adhesion, motility, and proliferation [J]. Exp Cell Res, 2009, 315(10): 1759-1771.
- [16] Kardash E, Reichman-Fried M, Maitre JL, et al. A role for Rho GTPases and Cell-cell adhesion in single-cell motility *in vivo* [J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(1): 47-53.
- [17] Couvillon AD, Exton JH. Role of heterotrimeric G-proteins in lysophosphatidic acid-mediated neurite retraction by RhoA-dependent and-independent mechanisms in N1E-115 cells [J]. Cell Signal, 2006, 18(5): 715-728.
- [18] Bijman MN, van Berkel MP, van Nieuw Amerongen GP, et al. Interference with actin dynamics is superior to disturbance of microtubule function in the inhibition of human ovarian cancer cell motility [J]. Biochem Pharmacol, 2008, 76(6): 707-716.
- [19] Mateus AR, Seruca R, Machado JC, et al. EGFR regulates RhoA GTP dependent cell motility in E-cadherin mutant cells [J]. Hum Mol Genet, 2007, 16(13): 1639-1647.
- [20] Takami Y, Higashi M, Kumagai S, et al. The activity of RhoA is correlated with lymph node metastasis in human colorectal cancer [J]. Dig Dis Sci, 2008, 53(2): 467-473.
- [21] Li XR, Wu W, Quyang J, et al. Underexpression of deleted in liver cancer 2(DLC2) is associated with over expression of RhoA and poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. BMC Cancer, 2008, 23(8): 205-232.
- [22] 林英姿, 陈仁, 彭江龙, 等. RhoA 在卵巢癌组织中的表达及意义 [J]. 医学综述, 2008, 14(11): 1738-1740.
- [收稿日期] 2012 - 08 - 22 [修回日期] 2012 - 10 - 02
[本文编辑] 王莹

《中国肿瘤生物治疗杂志》欢迎投稿、欢迎订阅