

早期给予 XBJ 干预可显著降低急性肺损伤大鼠 MDA 水平,升高 SOD 等抗氧化酶类活力,减轻肺组织损伤。本研究表明,XBJ 能持续上调肺组织 Nrf2 的基因表达,提高 H₂S 中毒大鼠抗氧化能力,降低 MDA 水平,提高 SOD、CAT、GSH - Px 活力和 GSH 含量,发挥细胞保护和抗氧化应激损伤作用,综上所述,XBJ 对 H₂S 中毒急性肺损伤有一定的治疗价值,这为 H₂S 中毒急性肺损伤机制的深入研究和 H₂S 中毒的救治提供良好的前景。

参考文献

- 1 胡振华,唐杰.上海市 132 例急性硫化氢中毒分析[J]. 环境与职业医学,2007,24(6):616-618
- 2 Toyokuni S, Akatsuka S. Pathological investigation of oxidative stress in the post - genomic era[J]. Pathol Int,2007,57(8):461-473
- 3 Marzec JM, Christie JD, Reddy SP, *et al.* Functional polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute lung injury[J]. FASEB J,2007,21(9):2237-2246
- 4 李忠旺,邱俏檬,孙琦,等.血必净注射液对创伤弧菌脓毒症大鼠肺组织 Toll 样受体 4 及核转录因子 - κ B 表达的影响[J]. 中国中西医结合急救,2010,17(1):24-27

- 5 关望,王海英,陈志芳,等.外源性硫化氢对急性肺损伤大鼠氧化应激的调节作用[J]. 当代医学,2010,16(18):7-8
- 6 葛贇,孙未,吴宗盛,等.硫化氢急性中毒大鼠肺组织氧化应激及 Nrf2 基因表达的改变及乌司他丁的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2012,30(1):27-32
- 7 葛贇,余毅娟,郑嘉奕,等.乌司他丁对硫化氢急性中毒大鼠肺组织氧化应激损伤的干预作用及机制研究[J]. 中华急诊医学杂志,2012,21(2):164-170
- 8 Olivier B, Laura AM. Molecular mechanisms of fluoride toxicity[J]. Chemico - Biological Interactions,2010,188(2):319-333
- 9 Xu H, Zhou YL. Activation of PERK signaling through fluoride - mediated endoplasmic reticulum stress in OS732 cells[J]. Toxicology,2010,277(1-3):1-5
- 10 Shih AY, Li P, Murphy TH. A small - molecule - inducible Nrf2 - mediated antioxidant response provides effective prophylaxis against cerebral ischemia in vivo[J]. Neurobiology of Disease,2005,25(44):10321-10335
- 11 Cho HY, Reddy SP, Yamamoto M, *et al.* The transcription factor NRF2 protects against pulmonary fibrosis[J]. FASEB J,2004,18(11):1258-1260

(收稿:2012-04-09)
(修回:2012-04-20)

Msi1 siRNA 对人结肠癌 SW - 480 细胞迁移和侵袭能力的影响

魏建国 赵 芳 孙爱静

摘 要 **目的** 探讨 siRNA 沉默 Msi1 基因表达对人结肠癌 SW - 480 细胞迁移和侵袭能力的影响及其作用机制。**方法** 设计合成特异性 Msi1 siRNA 序列,转染人结肠癌 SW - 480 细胞;利用 Western blotting 检测 Msi1 和 MMP - 9 蛋白的表达;细胞免疫化学检测 MMP - 9 蛋白的表达;划痕实验观察 Msi1 siRNA 对细胞迁移能力的影响;Transwell 实验观察其对细胞侵袭能力的影响。**结果** Msi1 siRNA 能有效抑制人结肠癌 SW - 480 细胞中 Msi1 蛋白的表达;并且使其迁移和侵袭能力明显下降,和对照组相比有统计学意义($P < 0.05$),同时 MMP - 9 在蛋白表达水平明显降低。**结论** 沉默 Msi1 基因后可以显著抑制人结肠癌 SW - 480 细胞的迁移和侵袭能力,MMP - 9 基因表达下降可能参与这一过程。

关键词 结肠癌 Msi1 RNAi 迁移 侵袭

Impact of Msi1 siRNA on the Migration and Invasion of SW - 480 Cell Line. Wei Jianguo, Zhao Fang, Sun Aijing. Department of Pathology, Shaoxing People's Hospital, Zhejiang 312000, China

Abstract Objective To investigate the effect of silencing Msi1 gene with siRNA on cell migration and invasion of SW - 480 cell line. **Methods** Msi1 - specific siRNA was designed and synthesized. Small interfering RNA was transfected into SW - 480 cells to knockdown the Msi1 expression. Protein levels of Msi1 and MMP9 were detected by Western blot. Protein levels of MMP9 were detected by immunohistochemical assay. Cell migration and invasion were detected by wound healing assay and transwell assay. **Results** RNA inter-

基金项目:浙江省医学重点学科建设计划(GJSX - 010 - 004)

作者单位:312000 绍兴市人民医院病理科(魏建国、孙爱静);312030 绍兴县中心医院妇产科(赵芳)

通讯作者:孙爱静,主任医师,电子信箱:Sun_ajing@hotmail. co. jp

ference efficiently suppressed the Msi1 expression in SW - 480 cell line after SW - 480 cells transfected with Msi1 siRNA. Wound Healing assay and Transwell assay showed that Msi1 gene was interfered. SW - 480 cells significantly reduced migration and invasion ($P < 0.05$), and the expression of MMP9 protein levels decreased. **Conclusion** Downregulation of Msi1 leads in to significant inhibition of cell migration and invasion in the SW - 480 cell line. The reduction of MMP - 9 in protein expression may be involved in this process.

Key words Colon cancer; Msi1; RNAi; Migration; Invasion

全世界范围内,结肠癌仍然是消化道最常见的恶性肿瘤之一,极易发生局部侵袭或远处转移,有些甚至在早期就能发生淋巴结转移^[1]。因此,阐明其侵袭和转移机制,是目前根治结肠癌的关键措施之一。Msi1 (musashi homolog 1)是一种 RNA 结合蛋白,在干细胞的维持和中枢神经系统的发展过程中扮演着十分重要的角色^[2]。新近的研究结果表明,Msi1 在许多肿瘤中都表达,Msi1 基因不仅仅是肿瘤干细胞的特异性标志物,而且有可能在肿瘤的发生和发展过程中是一个主要调节者^[3-5]。

我们前期的实验发现 Msi1 siRNA 不但可以使人结肠癌 SW - 480 细胞 Msi1 基因的表达下调,而且还可以使其生长增殖活性受到抑制^[6]。为此,本实验在前期工作的基础上,首先通过 siRNA 沉默 Msi1,然后利用 Western blot、细胞免疫化学、细胞划痕实验、细胞侵袭实验等技术来研究沉默 Msi1 后对人结肠癌 SW - 480 细胞迁移和侵袭能力的影响,并初步探索其作用机制。

材料与方法

1. 材料:SW - 480 细胞由南华大学肿瘤研究所提供;兔抗人 Msi1 单克隆抗体购自 Invitrogen 公司,辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗、兔抗人 β - actin 单克隆抗体均购自 Santa Cruze 公司;Lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司;Transwell 小室购自美国 Costar 公司;siRNA 片段购自上海锐博生物技术有限公司。

2. 细胞培养:SW - 480 细胞培养于含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液中,置于 37℃ 和 5% 的 CO₂ 培养箱中培养,当细胞长到培养瓶约 80% 左右时用 2.5g/L 胰蛋白酶消化传代,并在显微镜下观察,如有细胞间隙增大,胞质回缩后立即倾去胰酶,加适量含血清培养液吹打成单细胞悬液,调整细胞浓度用于实验。

3. RNA 干扰实验:轻轻摇匀 Lipo2000,用不含血清的 DMEM 分别稀释 Lipo2000 和 siRNA,轻轻混匀,室温下孵育 5min;将稀释的 Lipo2000 和稀释的 siRNA 轻轻混和,室温培养 20min 以形成 siRNA - Lipo2000 混和物。取对数生长期的 SW - 480 细胞 1×10^5 /孔接种于 6 孔板中,用不含抗生素的培养基培养,当细胞密度达 30% ~ 50% 左右时转染。将 siRNA - Lipo2000 混和液加入培养孔中,并用无抗生素,无血清的培养基培养,放入 37℃ 的 CO₂ 培养箱中培养 6h 后,更换成有血清

的培养基继续培养。

4. Western blotting 实验:将 1×10^5 个 SW - 480 细胞接种于 6 孔板中,转染 48h 后提取总蛋白,20 微升/孔的蛋白量体积上样,加入上样缓冲液置于 100℃ 煮沸 3min 后行 SDS - PAGE 凝胶电泳。当溴酚兰指示剂到达分离胶下部时,立即断开电源并取下凝胶,置于缓冲液中浸泡 5min 后将总蛋白转移到 PVDF 膜上,依次孵育 I、II 抗,暗室中用蛋白荧光检测试剂盒显示结果于 X 线片, β - actin 作为内参,进行 Western blot 分析。

5. 免疫细胞化学检测:先制作细胞爬片,用 95% 的乙醇固定 15min,PBS 冲洗 10min;加 50 μ l 过氧化物酶阻断剂室温孵育 8min;PBS 冲洗 10min;加 50 μ l 非免疫性动物血清孵育 3min;弃去液体不冲洗;再加 50 μ l 一抗于 4℃ 孵育过夜;PBS 冲洗 10min;加 50 μ l 的二抗室温孵育 10min,PBS 冲洗 10min;加 50 μ l 链霉素抗生物素蛋白 - 过氧化物酶溶液孵育 10min;PBS 洗 10min;加 80 μ l 新鲜配制的 DAB 溶液显色 2min;依次经双蒸水冲洗,苏木素复染,乙醇脱水,二甲苯透明等步骤,最后用中性树胶封片后置于显微镜下观察。

6. 细胞划痕实验:将 SW - 480 细胞 (1×10^5) 接种于 6 孔板中转染细胞,当细胞长至 80% 左右且呈单层贴壁生长时,用 10 μ l 的 Eppendorf Tip 头在单层细胞上垂直划过,用 PBS 冲洗 2 次后继续培养,24h 后置于倒置显微镜下观察伤口愈合情况,并计算划痕距离。实验重复 3 次,计算迁移率 = (原划痕宽度 - 现划痕宽度)/原划痕宽度。

7. 细胞侵袭实验:将无血清的 RPMI1640 培养基和 10mg/ml 的 Matrigel 以 5:1 的比例混合,以 25 微升/孔平铺于 Transwell 小室的聚碳酸酯微孔膜上,放于超净工作台内用紫外线照射 10h。将含细胞数 2×10^5 个的 400 μ l 各组细胞悬液分别接种到不同的小室内,再将小室放在预先放入含趋化因子的培养基 500 μ l 的 24 孔板中;再置于 37℃ 和 5% CO₂ 的恒温细胞培养箱中培养 24h。最后将液体吸出,用棉签擦净上室细胞,膜下层细胞用 95% 乙醇固定 20min 后进行结晶紫溶液染色,倒置显微镜下观察并计数,实验重复 3 次。侵袭抑制率 (%) = [(对照组穿膜细胞数 - 处理组穿膜细胞数)/对照组穿膜细胞数] $\times$ 100%。

8. 统计学方法:数据用 SPSS 13.0 统计分析软件包分析,以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,进行 one - way ANOVA 检验及两个独立样本的 t 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. Western blot 检测转染前后相关蛋白情况:如图 1 和图 2 所示,Msi1 siRNA 组 SW - 480 细胞内

Msi1 和 MMP-9 蛋白表达都减少,与空白对照组、脂质体组和阴性对照组相比,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);而在空白对照组、脂质体组和阴性对照组细胞中 Msi1 和 MMP-9 蛋白表达却无明显改变 ($P > 0.05$)。

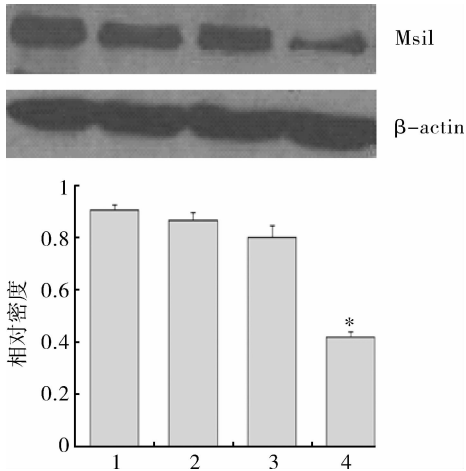


图 1 Msi1 siRNA 对 SW-480 细胞 Msi1 蛋白表达的影响

1. 空白对照组;2. 阴性对照组;3. 脂质体组;4. Msi1 siRNA 组;与 1、2、3 组比较, * $P < 0.05$

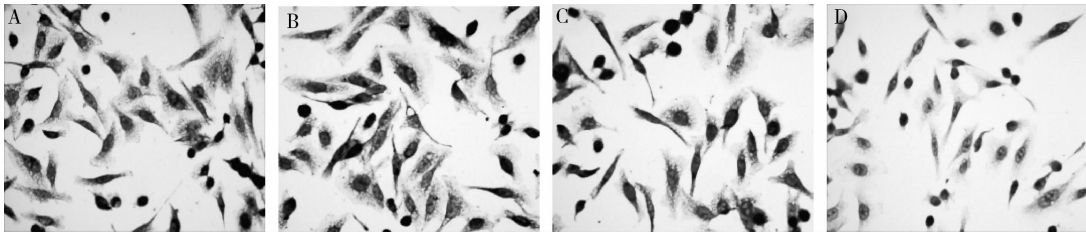


图 3 Msi1 siRNA 对 SW-480 细胞 MMP-9 蛋白表达的影响 (×400)

1. 空白对照组;2. 阴性对照组;3. 脂质体组;4. Msi1 siRNA 组

3. Msi1 siRNA 对 SW-480 细胞迁移的影响:人结肠癌 SW-480 细胞转染 Msi1 siRNA 后,与空白对照组、脂质体组和阴性对照组细胞比较,其细胞的划痕伤口愈合速度明显减慢 ($P < 0.05$,表 1)。

表 1 Msi1 siRNA 对 SW-480 细胞迁移距离的测定

组别	迁移距离 (μm)		
	0h	24h	迁移率 (%)
空白对照组	156.1 ± 2.01	70.4 ± 3.21	54.90 ± 2.23
阴性对照组	160.2 ± 1.05	74.3 ± 5.12	53.62 ± 3.40
脂质体组	163.2 ± 0.56	80.3 ± 3.18	50.80 ± 4.31
Msi1 siRNA 组	159.0 ± 1.49	126.4 ± 9.02 *	20.50 ± 1.78 *

与其他 3 组比较, * $P < 0.05$

4. Msi1 siRNA 对 SW-480 细胞侵袭的影响:人

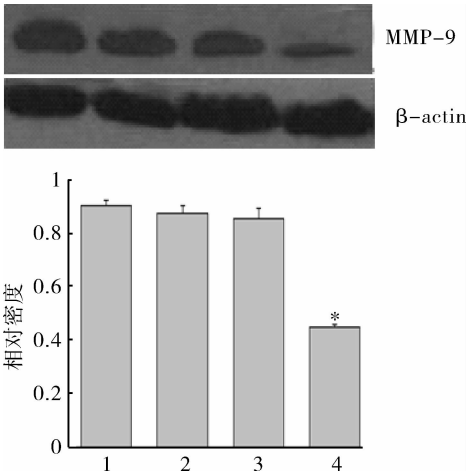


图 2 Msi1 siRNA 对 SW-480 细胞 MMP-9 蛋白表达的影响

1. 空白对照组;2. 阴性对照组;3. 脂质体组;4. Msi1 siRNA 组;与 1、2、3 组比较, * $P < 0.05$

2. 免疫组化观察转染前后 MMP-9 蛋白的表达情况:如图 3 所示,MMP-9 蛋白在 SW-480 细胞胞质中呈强阳性表达,经 Msi1 siRNA 作用 48h 以后,MMP-9 蛋白的表达与空白对照组、脂质体组和阴性对照组相比明显下降。

结肠癌 SW-480 细胞转染 Msi1 siRNA 后,其穿透聚碳酸酯膜的细胞数 (26.32 ± 1.63 个) 明显低于空白对照组 (89.6 ± 1.32 个)、脂质体组 (83.20 ± 2.10 个) 和阴性对照组 (86.7 ± 2.18 个) ($P < 0.05$,表 2)。

讨 论

结肠癌细胞的迁移和侵袭是影响患者生存预后最为关键的因素之一,因此明确其迁移和侵袭的发生机制,抑制其迁移和侵袭的能力成为目前根治结肠癌的重要手段之一,而肿瘤细胞的迁移侵袭必须依靠细胞外基质蛋白的降解,与其最为密切的是 MMP 家族,研究表明 MMP-9 在肿瘤的迁移和侵袭过程中扮演着重要的角色^[7]。MMP-9 可通过降解细胞外基

表 2 Msi1 siRNA 对 SW - 480 细胞侵袭细胞计数

项目	空白对照组	阴性对照组	脂质体组	Msi1 siRNA 组
侵袭细胞均数(个)	89.60 ± 1.32	86.70 ± 2.18	83.20 ± 2.10	26.32 ± 1.63 *
抑制率(%)	0.00 ± 0.00	3.24 ± 0.34	7.14 ± 0.45	70.63 ± 0.42 *

与其他 3 组比较, * $P < 0.05$

质从而促进肿瘤细胞的迁移和侵袭^[8]。目前结肠癌的分子靶向性治疗主要是针对致癌过程中的一些关键因子对其进行干扰,沉默其表达而达到抑制肿瘤细胞增殖、侵袭和转移及促进细胞凋亡的目的,也为结肠癌的治疗提供了新的思路^[9]。

Msi 家族是 RNA 结合蛋白中进化比较保守的家族群,在哺乳动物中包含分别由 Msi 1 和 Msi 2 基因编码的 Msi 1 和 Msi 2 两种蛋白^[10]。研究表明,Msi1 在子宫内膜癌、肝癌、膀胱癌、胶质母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、神经胶质瘤、星形细胞瘤中高表达,其作用是促进肿瘤细胞的增殖、抑制肿瘤细胞的凋亡^[11]。但 Msi 1 在肿瘤细胞中的功能仍未明确,有研究表明 Msi 1 是通过维护周期性依赖性蛋白激酶抑制剂 p21^{CIP1} 的功能和增强 notch 通路的活性从而达到维持肿瘤干细胞自我更新的能力^[12]。

我们的前期实验发现,Msi 1 在人结肠癌 SW - 480 细胞中有表达,沉默 Msi1 对人结肠癌 SW - 480 细胞增殖有负性调节作用,可明显抑制其生长和增殖^[6]。本实验在前期实验的基础上,将 Msi1 siRNA 瞬时转染到人结肠癌 SW - 480 细胞后,细胞划痕实验和细胞侵袭实验分别显示:SW - 480 细胞迁移和侵袭能力都明显下降,同时 Western blot 结果发现,沉默 Msi 1 基因后,不仅使 Msi 1 蛋白表达水平降低,而且使 MMP - 9 蛋白表达水平也明显降低,进一步说明沉默 Msi 1 后,由于 MMP - 9 的减少,对细胞外基质的降解进一步减少,从而使得人结肠癌 SW - 480 细胞迁移和侵袭能力的降低,这与免疫细胞化学实验结果相符合。本实验表明沉默 Msi1 后,SW - 480 细胞的迁移和侵袭能力降低,和 MMP - 9 蛋白表达下调密切相关,但其作用机制需要进一步的研究。

综上所述,沉默 Msi1 基因不仅可以下调人结肠癌 SW - 480 细胞中 Msi1 和 MMP - 9 蛋白的表达,而且还可以抑制其迁移和侵袭的能力。Msi1 基因可否成为一个有效的基因治疗靶点从而被用于肿瘤的分

子靶向治疗,还有待于基础和临床的进一步研究。

参考文献

1 Dotan E, Cohen SJ. Challenges in the management of stage II colon cancer[J]. Semin Oncol,2011,38(4):511 - 520

2 Morgan SC, Yasin S, Uwanogho D, *et al.* Positional specification in a neural stem cell line involves modulation of musashi1 expression[J]. Stem Cells Dev,2010,19(4):579 - 592

3 Nikpour P, Emadi - Baygi M, Steinhoff C, *et al.* The RNA binding protein musashi1 regulates apoptosis, gene expression and stress granule formation in urothelial carcinoma cells[J]. J Cell Mol Med,2011,15(5):1210 - 1224

4 Robert IG, Wang XY, Yuan HY, *et al.* Musashi1: a stem cell marker no longer in search of a function [J]. Cell Cycle,2008,7(17):2635 - 2639

5 De Sousa Abreu R, Sanchez - Diaz PC, Vogel C, *et al.* Genomic analyses of musashi1 downstream targets show a strong association with cancer related processes [J]. J Biol Chem,2009,284(18):12125 - 12135

6 魏建国,赵芳,孙爱静. Msi1 siRNA 对人结肠癌 SW - 480 细胞增殖的影响[J]. 临床与实验病理学杂志,2012,28(2):801 - 804

7 Streit M, Schmidt R, Hilgenfeld RU, *et al.* Adhesion receptors in malignant transformation and dissemination of gastrointestinal tumors [J]. J Mol Med,1996,74(5):253 - 268

8 Watanabe H. Extracellular matrix - regulation of cancer invasion and metastasis[J]. Gan To Kagaku Ryoho,2010,37(11):2058 - 2061

9 Asayama M, Kadowaki S, Yamaguchi K. Issues of molecular targeted therapies in combination with chemotherapy in metastatic colorectal cancer[J]. Nihon Rinsho,2011,69(3):464 - 471

10 Sakakibara S, Nakamura Y, Satoh H, *et al.* Rna - binding protein musashi2: developmentally regulated expression in neural precursor cells and subpopulations of neurons in mammalian CNS [J]. J Neurosci,2001,21(20):8091 - 8107

11 Sharma P, Cline HT. Visual activity regulates neural progenitor cells in developing xenopus CNS through musashi1 [J]. Neuron,2010,68(3):442 - 455

12 Wang XY, Yin Y, Yuan H, *et al.* Musashi1 modulates mammary progenitor cell expansion through proliferin - mediated activation of the Wnt and Notch pathways [J]. Mol Cell Biol,2008,28(11):3589 - 3599

(收稿:2012 - 03 - 15)

(修回:2012 - 04 - 17)