

siRNA 干扰沉默 *NUF2* 基因对肝癌 HCCLM3 细胞迁移和侵袭的影响*

郭云韬, 喻超, 陈礼闻, 孙诚谊**

(贵州医科大学医院 肝胆外科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨 siRNA 干扰对人肝癌 HCCLM3 细胞细胞分裂相关基因 *NUF2* 蛋白表达及细胞迁移与侵袭能力的影响。方法: 转染 siRNA 到 HCCLM3 细胞, 采用 western blot 法检测 HCCLM3 细胞的 *NUF2* 蛋白表达; 应用划痕、Transwell 小室侵袭实验检测转染 siRNA 后, 肝癌 HCCLM3 细胞体外迁移和侵袭能力。结果: siRNA 转染组 HCCLM3 细胞 *NUF2* 蛋白的表达明显低于对照组, HCCLM3 细胞迁移和侵袭能力均显著低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 下调 *NUF2* 基因的表达能有效抑制肝癌细胞 HCCLM3 的迁移和侵袭, *NUF2* 可能成为肝癌治疗的新靶点。

[关键词] 肝肿瘤; *NUF2* 基因; RNA 干扰; HCCLM3 细胞; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R735.7; R34-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)02-0147-04

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.02.005

The Influence of siRNA Inhibiting *NUF2* Gene on Migration and Invasion of Hepatoma Cell HCCLM3

GUO Yuntao, YU Chao, CHEN Liwen, SUN Chengyi

(Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the disturbing effect of siRNA on the expression of *NUF2* gene in human hepatoma HCCLM3 cells and its influence on migration and invasion of these cells. **Methods:** HCCLM3 cells were transfected with siRNA, and the expression of *NUF2* protein in these cells was measured by western blot assay. Wound-healing assay and transwell chamber invasion assay were used to measure the HCCLM3 migration and invasion ability after transfected by siRNA. **Results:** The expression level of *NUF2* protein in cells transfected with siRNA were significantly lower than that in control group cells ($P < 0.05$). The migration and invasion of HCCLM3 cell transfected with *NUF2* siRNA were dramatically lower than that of control group cells ($P < 0.05$). **Conclusion:** Down-regulation of *NUF2* expression can significantly inhibit HCCLM3 cell migration and invasion, thus *NUF2* might become a novel therapeutic target for hepatocellular carcinoma.

[Key words] liver neoplasms; *NUF2* gene; RNA interference; HCCLM3 cells; migration; invasion

肝细胞癌是一种侵袭和转移能力很强的常见恶性肿瘤,其发病率和死亡率近年来逐渐上升^[1]。肝癌治疗手段包括手术切除、射频消融、肝移植和分子靶向治疗等,但由于肝癌的高侵袭及高转移特

性,采用现有的治疗手段治疗后容易出现复发和转移^[2-6],因此探讨肝癌细胞的侵袭、转移机制具有重要的临床意义。细胞分裂相关基因 *NUF2* 又名 CDCA1,是动粒-微管连接中的重要组成部分,在

*[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81660483); 国家国际科技合作专项资助(2014DFA31420); 贵州省第四批人才基地(贵州省外科人才培养基地)基金资助

**通信作者 E-mail: sunchengyi2014@163.com

网络出版时间:2017-02-17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170217.1104.017.html>

细胞有丝分裂过程中起到稳定着丝粒和使染色体正确分离的作用^[7-8]。研究发现,NUF2 在多种恶性肿瘤中表达上升,且在肿瘤形成与发展过程中起重要作用^[9]。但 NUF2 与肝癌的侵袭转移是否有关尚未见报道,本研究旨在研究 siRNA 干扰沉默 NUF2 基因对肝癌迁移和侵袭能力的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞、仪器与试剂

肝癌细胞株 HCCLM3 购自美国模式培养物集存库(ATCC),DMEM 培养基、胰蛋白酶和胎牛血清购自美国 Gibco 公司,NUF2 抗体购自 Abcam 公司,NUF2 siRNA 及其阴性对照(negative control, NC)购自广州锐博公司,GAPDH 抗体购自武汉三鹰公司,二抗购自美国 Sigma 公司,脂质体 Lipofectamine3000 购自美国 Invitrogen 公司,Transwell 小室购自美国 Corning 公司,基质胶 Matrigel 购自美国 BD Biosciences 公司。

1.2 方法

1.2.1 HCCLM3 细胞培养与传代 将冻存于液氮中的肝癌 HCCLM3 细胞株 37 ℃ 水浴箱中快速融化并转移至离心管,800 r/min 低温离心 5 min,弃上清,将细胞重新悬浮于 1 mL 新鲜培养液于 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。待细胞贴壁,换培养液 1 次,至细胞密度达到 80% 开始传代。吸去培养液,加 0.25% 胰蛋白酶 1~2 mL 37 ℃ 消化 2~3 min,镜下观察细胞间距增大,有颗粒感时滴加培养液 2 mL 终止消化。加 10% 胎牛血清 DMEM 培养基制成单个细胞悬液,置于培养箱内形成单层即可进行实验。

1.2.2 细胞转染 接种 HCCLM3 细胞,当细胞密度为 50%~60% 时,按照脂质体 Lipofectamine3000 转染试剂说明要求将 siRNA 和其阴性对照(NC)分别转染 HCCLM3 细胞,siRNA 组和 NC 组的浓度均为 50 nmol/L。

1.2.3 NUF2 蛋白表达 NUF2 siRNA 细胞转染 48 h 后,裂解细胞提取蛋白质,用 BCA 法测蛋白浓度。取 30 μg 蛋白上样到 9% SDS-PAGE 胶,电泳、转膜至 PVDF 膜(用甲醇浸泡),5% 牛奶(溶于 1XTBST)室温封闭 1 h。根据膜上蛋白 mark 裁剪 PVDF 膜,再将膜放入一抗中(NUF2 抗体 1:2 000, GAPDH 抗体 1:3 000)4 ℃ 孵育过夜。洗膜后再用相应的辣根过氧化物酶标记的二抗(1:3 000)室温

孵育 1 h,曝光显影,用软件 ImageJ1.42 测灰度值,并与内参相比得其相对表达量。

1.2.4 细胞划痕实验 HCCLM3 细胞转染后,当细胞密度达 90% 时,200 μL 枪头保持垂直进行划痕,PBS 清洗细胞 2 次以除去划痕后脱落的细胞,放入细胞培养箱中继续培养。分别在划痕后 0 h 和 24 h 两个时间点进行拍照,统计不同处理组细胞迁移速率。

1.2.5 Transwell 小室侵袭实验 无血清培养基稀释 Matrigel 胶(6:1),取 80 μL 均匀铺于 Transwell 小室上室,37 ℃ 孵育 1 h。转染 24 h 后的 HCCLM3 消化、离心、计数,调整细胞浓度为 3×10^8 /L,取各组细胞悬液 200 μL 加入 Transwell 小室上室,在下室加入 20% 胎牛血清 DMEM 培养基 500 μL 作为趋化因子,常规培养 24 h。取出 transwell 小室,用棉签擦去上室剩余培养基和未发生转移的细胞,用 1% 多聚甲醛固定细胞 20 min 后弃去多聚甲醛,加入 0.1% 的结晶紫染液染色 30 min。光学显微镜下观察侵袭至膜上的细胞数,每个复孔取 5 个视野进行计数,并取均数进行统计。

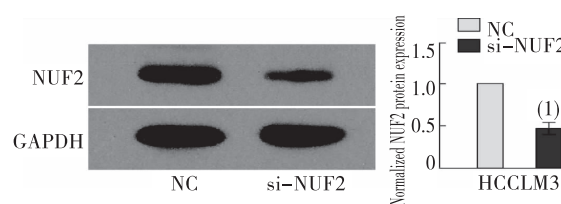
1.3 统计学处理

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,两样本比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 siRNA 沉默 NUF2 基因的效率

HCCLM3 细胞转染 siRNA 48 h 后收取细胞,提取总蛋白,Western blot 检测 NUF2 蛋白表达, GAPDH 作为内参。结果显示,干扰组 NUF2 蛋白的表达较阴性对照组(NC)显著下降($P < 0.05$)。见图 1。



①与 NC 组比较, $P < 0.05$

图 1 NUF2 蛋白表达(Western blot)

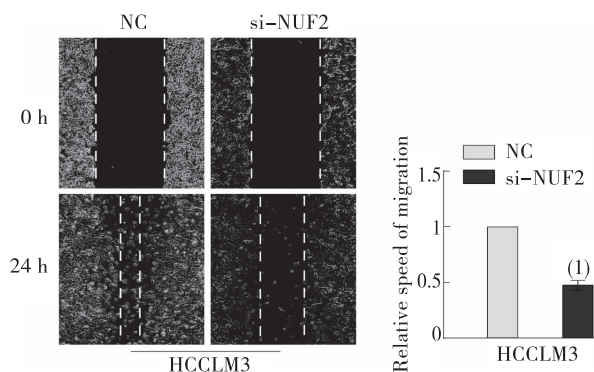
Fig. 1 Western blot results showing expression of NUF2 protein

2.2 体外细胞迁移能力

HCCLM3 细胞划痕实验显示, siRNA NUF2 转染组的细胞迁移能力明显降低, 与 NC 组比较, 其迁移速度为 NC 组的 (0.47 ± 0.04) 倍, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示 RNA 干扰沉默 NUF2 基因表达能显著降低肝癌 HCCLM3 细胞的迁移能力。见图 2。

2.3 体外细胞侵袭能力

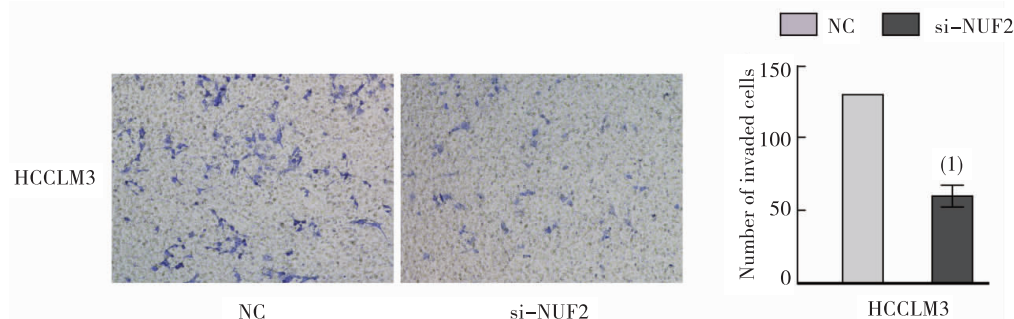
HCCLM3 细胞小室侵袭实验显示, siRNA NUF2 转染组穿过小室的细胞数为 (60.20 ± 6.31) 较 NC 组 (131.40 ± 9.85) 明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示, RNA 干扰沉默 NUF2 基因表达能显著降低肝癌 HCCLM3 细胞的侵袭能力。见图 3。



(1) 与 NC 组比较, $P < 0.05$

图 2 HCCLM3 细胞的迁移能力(划痕实验)

Fig. 2 Wound-healing assay results showing the migration ability of HCCLM3 cells



(1) 与 NC 组比较, $P < 0.05$

图 3 HCCLM3 细胞侵袭能力(Transwell 小室实验)

Fig. 3 Transwell chamber assay results showing the invasion ability of HCCLM3 cells

3 讨论

目前,手术治疗仍是治疗肝癌首选和最有效的方式,但肝癌患者接受根治性手术切除后 5 年的复发率仍高达 50%,其中主要原因就是因为肝癌具有高度的侵袭和转移特性^[10]。因此,如何阻滞肝癌细胞侵袭与转移,是目前肝癌研究的热点之一。许多研究证实,染色体的不稳定与肿瘤的形成与进展密切相关^[11-12]。在细胞有丝分裂过程中,染色体分离障碍往往会导致染色体的不稳定,而由 NUF2, NDC80, SPC24 和 SPC25 蛋白组成的 NDC80 复合体,能够稳定动粒-微管和保障染色体的正常分离^[13-14]。NUF2 作为 NDC80 复合体的重要组成部分,在动粒-微管的粘附中起重要作用,涉及有丝分裂和肿瘤发生发展的重要环节^[15]。2002 年,DeLuca 等^[16]在宫颈癌 Hela 细胞中干扰沉默 NUF2 基因,发现纺锤体形成正常,细胞进入

有丝分裂,但纺锤体不能与动粒正确黏附,细胞被阻滞在分裂早中期,最终导致细胞死亡。该研究第 1 次证实了 NUF2 有某些癌基因的特征,可能作为肿瘤治疗潜在靶点。其后,越来越多的研究发现,NUF2 在肺癌、肝癌、膀胱癌、结直肠癌、胃癌、卵巢癌等多种恶性肿瘤中表达升高,且涉及肿瘤细胞转移、侵袭、分裂和增殖等多种特性^[15, 17-20]。以上结果均表明 NUF2 的异常表达可能与肿瘤的发生发展有密切关系。然而,NUF2 对肝癌的侵袭转移是否有影响尚未见报道。本研究首先通过 siRNA 干扰沉默技术,瞬时抑制目的基因 NUF2 的表达。划痕实验和 Transwell 小室侵袭实验证明,NUF2 基因表达下调后,肝癌 HCCLM3 细胞的迁移和侵袭能力显著下降 ($P < 0.05$)。因此,在肝癌的基因靶向治疗中,NUF2 可能成为一个重要的靶点。但 NUF2 促进肝癌细胞的迁移与侵袭是通过其本身还是与别的基因相互作用来实现有待进一步的深入研究。

4 参考文献

- [1] Zhu P, Jin J, Liao Y, et al. A novel prognostic biomarker SPC24 up-regulated in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2015(38): 41383–41397.
- [2] Dhanasekaran R, Limaye A, Cabrera R. Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis, and therapeutics[J]. *Hepat Med*, 2012(7): 19–37.
- [3] Kawashima I, Kawashima Y, Matsuoka Y, et al. Suppression of postsurgical recurrence of hepatocellular carcinoma treated with autologous formalin-fixed tumor vaccine, with special reference to glypican-3[J]. *Clin Case Rep*, 2015(6): 444–447.
- [4] Lu L, Qiu C, Li D, et al. MicroRNA-505 suppresses proliferation and invasion in hepatoma cells by directly targeting high-mobility group box 1[J]. *Life Sci*, 2016(15): 12–18.
- [5] Kim YS, Moon KS, Lee KH, et al. Spontaneous acute epidural hematoma developed due to skull metastasis of hepatocellular carcinoma: A case report and review of the literature[J]. *Oncol Lett*, 2016(1): 741–744.
- [6] 李爱军, 马森林, 吴孟超. 分子靶向药物在肝癌治疗中的作用[J]. *肝胆胰外科杂志*, 2015(3): 255–258.
- [7] Nabetani A, Koujin T, Tsutsumi C, et al. A conserved protein, Nuf2, is implicated in connecting the centromere to the spindle during chromosome segregation: a link between the kinetochore function and the spindle checkpoint[J]. *Chromosoma*, 2001(5): 322–334.
- [8] Liu D, Ding X, Du J, et al. Human NUF2 Interacts with Centromere-associated Protein E and Is Essential for a Stable Spindle Microtubule-Kinetochore Attachment[J]. *J Biol Chem*, 2007(29): 21415–21424.
- [9] Hu P, Chen X, Sun J, et al. siRNA-mediated knockdown against NUF2 suppresses pancreatic cancer proliferation in vitro and in vivo[J]. *Bioscience Rep*, 2015(1): 1–11.
- [10] 刘新城, 黄毓, 廖晖, 等. MTHFD2 在肝细胞癌中表达的初步观察[J]. *中华医学杂志*, 2015(48): 3908–3911.
- [11] Venkitaraman AR. Tumour suppressor mechanisms in the control of chromosome stability: insights from BRCA2[J]. *Mol Cells*, 2014(2): 95–99.
- [12] Lomonosov M. Stabilization of stalled DNA replication forks by the BRCA2 breast cancer susceptibility protein[J]. *Gene Dev*, 2003(24): 3017–3022.
- [13] Alushin GM, Musinipally V, Matson D, et al. Multimodal microtubule binding by the Ndc80 kinetochore complex[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2012(11): 1161–1167.
- [14] Umbreit NT, Gestaut DR, Tien JF, et al. The Ndc80 kinetochore complex directly modulates microtubule dynamics[J]. *PNAS*, 2012(40): 16113–16118.
- [15] Liu Q, Dai S, Li H, et al. Silencing of NUF2 inhibits tumor growth and induces apoptosis in human hepatocellular carcinomas[J]. *Asian Pac J Cancer P*, 2014(20): 8623–8629.
- [16] DeLuca JG, Moree B, Hickey JM, et al. hNuf2 inhibition blocks stable kinetochore-microtubule attachment and induces mitotic cell death in HeLa cells[J]. *J Cell Biol*, 2002(4): 549–555.
- [17] Hayama S, Daigo Y, Kato T, et al. Activation of CDCA1-KNTC2, members of centromere protein complex, involved in pulmonary carcinogenesis[J]. *Cancer Res*, 2006(21): 10339–10348.
- [18] Kaneko N, Miura K, Gu Z, et al. siRNA-mediated knockdown against CDCA1 and KNTC2, both frequently overexpressed in colorectal and gastric cancers, suppresses cell proliferation and induces apoptosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009(4): 1235–1240.
- [19] Sethi G, Pathak HB, Zhang H, et al. An RNA interference lethality screen of the human druggable genome to identify molecular vulnerabilities in epithelial ovarian cancer[J]. *PLoS One*, 2012(10): e47086.
- [20] Hu P, Shangguang J, Zhang L. Downregulation of NUF2 inhibits tumor growth and induces apoptosis by regulating lncRNA AF339813[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015(3): 2638–2648.

(2016-10-20 收稿, 2017-01-22 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 苏晓庆