

siRNA 转染 U251 细胞下调 Moesin 导致 PDGF 及 CD44 表达下降

伍明,李学军,李臻琰,成磊,唐智,袁贤瑞

Downregulation of Expression of Moesin in U251 Cells after Transfection with siRNA Leads PDGF and CD44 to Decrease

WU Ming, LI Xue-jun, LI Zhen-yan, CHENG Lei, TANG Zhi, YUAN Xian-rui

Department of Neurosurgery, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China

Corresponding Author: YUAN Xian-rui, E-mail: xry69@163.com

Abstract: Objective To explore the possible ways how Moesin proteins involved in the growth and invasion of human brain glioblastoma (U251). **Methods** The human brain glioblastoma cell line U251 was chosen as the research object. Small interfering RNA fragment was designed for Moesin coding gene and transfected into cells. Through the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was screened out the most efficient siRNA silencing fragments for follow-up experiments. Three different intervention U251 cells (blank control group, negative control and transfection group) were designed for RT-PCR determination of expression of PDGF, and the amount of CD44 was measured by flow cytometry. **Results** Screening of a fragment of Moesin-139 by RT-PCR and Western-blot was the best silent; RT-PCR found that PDGF mRNA expression of U251 cells in the transfected group was 0.09377 ± 0.008546 on average which was much lower than that of the blank group (0.4663 ± 0.01844) and negative control group was (0.4570 ± 0.02159). The difference was of obviously statistical significance ($P < 0.01$). Flow cytometry detected that the expression of CD44 in transfected group was $(26.73 \pm 2.720)\%$ at minimum which had obvious differences with 2 other groups ($F = 173.669, sig = 0.000$). **Conclusion** In U251 cells, the downregulation of the expression of Moesin will lead to PDGF and CD44 to decrease at the same time. Moesin probably plays an important role in the invasion and metastasis of in human glioma cell by regulating PDGF and CD44. Moesin may become a target molecule in the treatment of human glioma.

Key words: Moesin; Glioma; PDGF; CD44; Small interfering RNA

摘要:目的 探讨 Moesin 蛋白参与影响人脑胶质细胞瘤(U251)细胞生长和侵袭的可能途径。**方法** 以人脑胶质细胞瘤 U251 细胞系为研究对象,针对 Moesin 编码基因设计小干扰 RNA 片段转染入细胞,通过反转录聚合酶链反应(RT-PCR)筛选沉默效率最高的 siRNA 片段进行后续实验。通过对设计的 3 组不同干预的 U251 细胞(空白组、阴性对照组、转染组)进行 RT-PCR 测定 PDGF 的表达,以及流式细胞方法测定 CD44 的含量。**结果** RT-PCR 和 Western-blot 筛选出沉默效果最好的 Moesin-139 片段;RT-PCR 发现转染组 U251 细胞中 PDGF 的 mRNA 的平均表达为 0.09377 ± 0.008546 ,远低于空白组(0.4663 ± 0.01844)和阴性对照组(0.4570 ± 0.02159),其差异有统计学意义($P < 0.01$);流式细胞术检测发现转染组中 CD44 的表达最低为 $(26.73 \pm 2.720)\%$,与其他两组差异明显($F = 173.669, sig = 0.000$)。**结论** U251 细胞中 Moesin 表达下降将导致 PDGF 和 CD44 的表达同时下降,同时生长和侵袭能力明显下降,提示 Moesin 可能通过调节 PDGF 与 CD44 在人脑胶质瘤细胞的生长、侵袭过程中发挥重要作用, Moesin 有可能成为治疗人脑胶质瘤的靶点分子。

关键词: Moesin; 胶质瘤; PDGF; CD44; siRNA

中图分类号:R739.41;R73-36 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2011)02-0121-05

收稿日期:2010-01-08;修回日期:2010-03-25

基金项目:湖南省科技厅胶质瘤基金资助项目(JT3049)

作者单位:410008 长沙,中南大学湘雅医院神经外科

通信作者:袁贤瑞, E-mail: xry69@163.com

作者简介:伍明(1981-),男,博士,住院医师,主要从事神经外科肿瘤学研究

0 引言

神经胶质瘤采用包括手术、放射治疗及化学治疗等综合疗法仍难以取得满意疗效,生物治疗已经成为胶质瘤治疗的第 4 种模式^[1]。膜突蛋白 Moesin(membrane-organizing extension spikeprotein)

是埃兹蛋白、根蛋白和膜突蛋白 (Ezrin-radixin-moesin, ERM) 家族成员之一, 为上皮细胞的胞膜与细胞骨架之间的连接分子。目前其在人脑胶质细胞瘤中相关作用尚未见报道, 本实验采用目前较为流行的 siRNA 转染胶质母细胞瘤 U251 细胞干扰下调 Moesin 表达的方法, 来探讨 Moesin 在人脑胶质瘤中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人星形细胞瘤 U251 细胞株 (中南大学肿瘤研究所细胞中心), 为胶质母细胞瘤 WHO IV 级。脂质体转染试剂 lipofectamine2000 (美国 Invitrogen 公司); Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司); RNA 提取试剂盒 (德国 Qiagen 公司); 反转录试剂盒 (加拿大 Fermentas 公司); 一抗: 羊 Moesin 单克隆抗体 (美国 SANTA 公司), 鼠 GAPDH 抗体 (美国 ProMab 公司); 二抗: 兔抗羊 IgG/HRP 抗体; 一抗: 人 CD44 抗体 (美国 eBioscience 公司); 荧光二抗: FITC 鼠 IgG 抗体 (美国 eBioscience 公司); 流式细胞仪 (Beckman 公司)

1.2 小干扰 RNA (siRNA) 的设计

从 Genbank 中检索人全长 Moesin 基因序列, 根据 <http://www.ebi.ac.uk/blastall/nucleotide.html>, siRNA 由 Genepharma 合成, 基因名称: MSN 基因 ID: NM_002444, 合成的 siRNA 资料 (目的基因 3 对 + 1 对阴性对照), 见表 1。转染前一天, $(4 \sim 5) \times 10^4$ /L 细胞接种在 6 孔板上, 2ml 含 FBS 的基础培养液。选择用于初期接种的细胞数量, 应能在 24 h 内使细胞汇合达到 70%, 用 Lipofectamine2000™ 将 siRNA 转染入细胞。siRNA 的终浓度为 110 nmol/L。参照 Lipofectamine2000™ 说明书进行转染操作。

表 1 针对 Moesin 设计的小干扰 RNA 序列

Table 1 siRNA sequence specific to Moesin

Moesin-171	5'-GGCUGAAACUCAUAAGAATT-3' 5'-UUCUUAUUGAGUUUCAGCCAG-3'
Moesin-139	5'-GCAGUACCAGGACACUAAATT-3' 5'-UUUAGUGUCCUGGUACUGCAG-3'
Moesin-742	5'-CUCUUUCAUGAUAAAGAAATT-3' 5'-UUUCUUAUCAUUGAAAGAGAT-3'
Negative control	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3' 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'

1.3 RT-PCR 初步筛选最为有效的 siRNA 片段

在转染后 48h 提取细胞总 RNA, 用反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 初步筛选一对最为有效的 siR-

NA。使用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA 并进行反转录反应。PCR 引物为 Moesin (157bp) F: 5'-AGGATGTGCGGAAGGAAAG-3', R: 5'-TCAGGCGGGCAGTAAATATC-3'。对照引物 GAPDH (450bp) F: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', R: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。PCR 条件: 95°C, 5 min; 94°C, 50s; 59°C, 50s; 72°C, 1min (循环 32 次)。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

1.4 Western blot 筛选 siRNA 下调 Moesin 蛋白最佳片段

选择不同干预的 5 组 U251 细胞进行 Moesin 蛋白测定。提取细胞总蛋白, 经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至 PVDF 膜上, 10% 脱脂奶粉封闭 1h, 一抗为 1:500 稀释羊 Moesin 抗体和 1:8 000 稀释的鼠 GAPDH 抗体。二抗为兔抗羊 IgG/HRP 1:40 000 稀释。PVDF 膜依次与抗体作用后与免疫印迹化学发光试剂反应。X 线片曝光、显影、定影后分析。

1.5 细胞转染

实验共分 3 组, 空白组 (无任何干扰)、阴性对照组 (仅加入转染试剂), 以及 siRNA 组 (有效 siRNA + 转染试剂), 空白对照组只应用 lipofectamine 2000 脂质体按说明书进行转染。转染后继续培养 6、12、24、48h 进行检测分析, 每组实验重复 3 次。

1.6 RT-PCR 检测 PDGF mRNA 的量

收集转染后 48 h 进入对数生长期的 U251 细胞, 使用 Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司) 提取细胞总 RNA 并进行反转录反应。PCR 引物为 PDGF (181bp): F: 5'-TCCTGGAGATAGACTCCGTA-3', R: 5'-CGAGGAATCTCGTAAATGAC-3'。对照引物 GAPDH (450bp): F: 5'-ACCACAGTC-CATGCCATCAC-3', R: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。PCR 条件: 95°C, 5 min; 94°C, 50 s; 59°C, 50 s; 72°C, 1 min (循环 32 次)。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 加样量为 10 μ l, 电压 120V, 电泳完毕后在溴化乙锭 (EB) 中染色, 在紫外灯下观察结果并照相。每组检测均设置 3 个平行样本, 实验重复 5 次。

1.7 流式细胞仪检测各组 CD44 的表达

各组待测 U251 细胞样本以 0.25% 胰酶消化, 制成单细胞悬液, 300g 离心 5 min, PBS 洗涤细胞 3 次, 调整细胞浓度为 1×10^6 /ml, 取 1ml 细胞悬液, 用 PBS 洗 3 次, 依次加入鼠抗人 CD44 及 FITC 抗鼠 IgG, 4°C 避光培养 30 min, 加 PBS 1ml 离心洗涤以洗去未标记抗体, 加 PBS 调至 200 μ l 体积重悬细胞, 上流式细胞仪检测, 以 Cell Quest Plot 分析软件

分析结果。每组检测 2 个平行样本,实验重复 5 次。

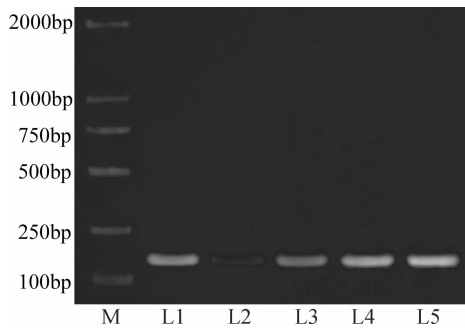
1.8 统计学方法

用 SPSS16.0 统计分析软件包处理数据,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。多样本均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),采用 SPSS16.0 进行统计绘图。

2 结果

2.1 siRNA 的初步筛选结果

通过 RT-PCR 可以发现,第二对 siRNA 的下调作用效率更高,见图 1。siRNA (Moesin-siRNA-139) 基因沉默效果最好,mRNA 表达明显抑制。



L1: U251 + Moesin-siRNA-171; L2: U251 + Moesin-siRNA-139; L3: U251 + Moesin-siRNA-742; L4: U251 + negative-siRNA(negative control); L5: U251 (only plus transfection reagent)

图 1 PT-PCR 初步筛选最佳 siRNA 片段结果

Figure 1 Best results of initial screening of siRNA fragments

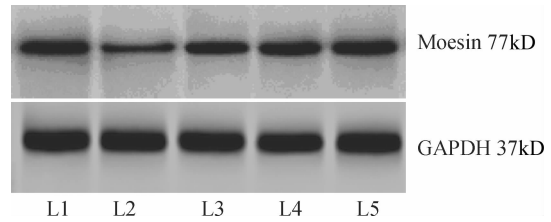
2.2 Western blot 检测 siRNA 下调 Moesin 蛋白表达

通过采用 Western-blot 方法检测 L1~L5 组 U251 细胞中 Moesin 蛋白的表达水平,我们发现,L2 的 Moesin 蛋白表达明显下降,与 RT-PCR 结果相一致,相对表达水平为 $(25.93 \pm 1.86)\%$,较之 L1 组的 $(51.36 \pm 1.27)\%$ 以及 L3 组的 $(51.37 \pm 0.93)\%$,其差异有统计学意义($P < 0.01, n = 2$),见图 2。

2.3 RT-PCR 检测 PDGF mRNA 的量

在提取的细胞标本中,均可检测到 PDGF mRNA 的表达。如图 3 所示,经过 siRNA 干预沉默 Moesin

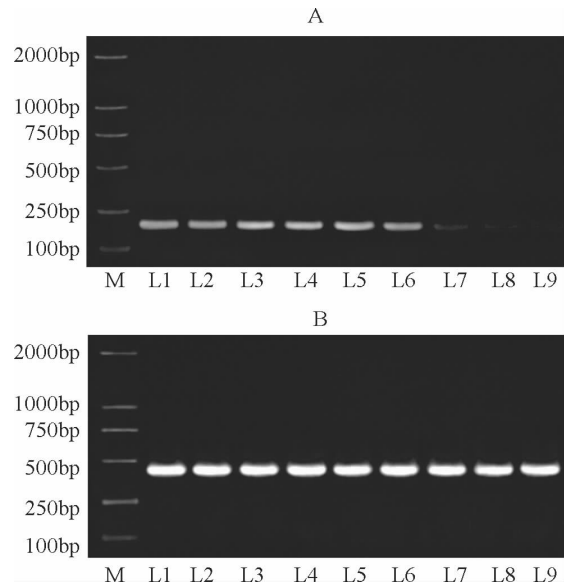
以后,转染组的 U251 细胞中 PDGF mRNA 的表达水平 (0.09377 ± 0.008546) 明显低于空白组 (0.4663 ± 0.01844) 和阴性对照组 (0.4570 ± 0.02159) ,其差异有统计学意义($P < 0.01$)。



L1: U251 + Moesin-siRNA-171; L2: U251 + Moesin-siRNA-139; L3: U251 + Moesin-siRNA-742; L4: U251 + negative-siRNA (negative control); L5: U251 (only plus transfection reagent)

图 2 Western blot 检测不同干预 U251 细胞株中 Moesin 蛋白的表达水平

Figure 2 Moesin protein expression level of different interventions U251 cell lines detected by Western blot method

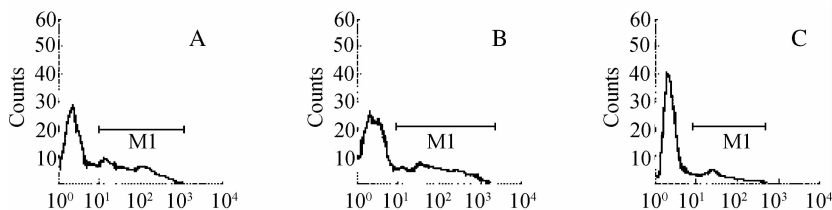


A: PDGF-181bp; B: GAPDH-450bp

L1~L3: blank control group; L3~L6: negative control group; L7~L9: transfection group

图 3 PCR 检测 PDGF 的 mRNA 表达

Figure 3 by RT-PCR mRNA expression of PDGF detected



A: blank control group; B: negative control group; C: transfection group

图 4 各组 U251 细胞中 CD44 的量

Figure 4 The amount of CD44 in each U251 cells group

2.4 流式细胞仪检测各组 CD44 的表达

经重复实验证实发现, siRNA 转染组 U251 细胞样本中 CD44 的检测值(26.73 ± 2.720)% 明显下降, 见图 4, 与空白组(46.37 ± 2.461)% 以及阴性对照组(46.73 ± 2.866)% 之间差异有统计学意义($F = 173.669, sig = 0.000, P < 0.01$)。

3 讨论

Moesin 膜突蛋白属 ERM 家族成员之一, 目前国内有众多文献报道证实, Moesin 在胃癌^[2]、肝癌^[3]、喉癌^[4]和口腔鳞状细胞癌^[5]中表达异常增高, 并且 Moesin 的表达程度与上述恶性肿瘤的临床分期、淋巴结转移和分化程度密切相关, 从而提示 Moesin 在恶性肿瘤中的侵袭和转移可能起到相关作用。Carmeci^[6]研究认为 Moesin 可能参与了雌激素受体阴性肿瘤的扩散和转移。Moesin 在神经系统肿瘤如星形胶质细胞瘤中的表达和作用机制尚未见文献报道。本实验采用 siRNA 干扰下调 Moesin 在 U251 细胞中的表达后, 检测发现 PDGF 与 CD44 的量均明显下降。

血小板源性生长因子(PDGF)是多种细胞产生的内源性肽类生长因子, 正常组织内的 PDGF 的表达受到严格的调控, 表达水平很低甚至完全检测不到。而 PDGF 及其受体 PDGFR 的过度表达在不同恶性程度的胶质瘤细胞株和外科肿瘤标本中均可见到, 且表达水平越高, 肿瘤恶性程度越高, 预后越差^[7]。PDGF 家族各成员在胶质瘤细胞株和肿瘤组织中的表达并没有完全重叠, 提示 PDGF 在促胶质瘤形成中可能有多种作用机制参与^[8]。Bond^[9]报道 PDGF 可以提高 MMP 蛋白的合成及其 mRNA 的表达, 对肿瘤的侵袭和转移及炎症反应的发展有重要意义^[10]。对于 Moesin 和 PDGF 的相关性, Hugo^[11]曾通过膜增生性肾小球肾炎实验证实细胞骨架连接蛋白 Moesin 和 Radixin 是由血小板衍生生长因子上调表达, 但不是碱性成纤维细胞生长因子, 并证实这一调节机制对细胞的迁移和形态改变有重要作用。本实验中下调 Moesin 的表达后 PDGF 也出现下降, 可能是由于 Moesin 表达下降后反馈性地导致其上游调节的 PDGF 的表达下降。

CD44 是分布极为广泛的细胞表面跨膜糖蛋白, 按相对分子质量大小可分为 80~90kD、110~160kD 和 180~215kD 三类^[12]。CD44 与肿瘤转移的相关性, 在 1991 年由德国研究人员取得了突破性进展^[13], 其剪接变体 CD44V6 的表达有助于肿瘤

细胞获得转移潜能, 作为淋巴细胞的归巢受体和透明质酸的主要受体, 能够引起细胞的形态和游动性改变, 更被认为直接参与肿瘤的侵袭和转移^[14]。近些年的研究表明, ERM 蛋白与这些膜受体蛋白分子均具有复杂的相互作用^[15]。本实验中显示在 U251 细胞中, 采用 siRNA 下调 Moesin 的表达直接导致 CD44 的表达明显下降, 并且对比空白组和阴性对照组其下降幅度有统计学意义, 同样也提示了 Moesin 在 CD44 参与的肿瘤侵袭和转移中有直接作用。国外文献也有类似报道, Ichikawa 等^[16-17]采用免疫组织化学的方法, 检测 Moesin 与 CD44 在正常表皮和各种皮肤肿瘤上皮, 以及黑色素瘤中的表达, 发现两者之间具有密切一致性, 其结果与本实验有相似之处。分析原因可能为: (1) Moesin 作为分子链接器, 需要和 ICAM-3 和 CD44 等黏附分子结合, 连接膜受体和细胞骨架^[18], 从而在细胞运动时调节细胞的形态学变化^[19]。结合方式为羧基末端结合肌动蛋白微丝, 而氨基端依赖于一个结合配偶体, 如 CD44, 连接质膜^[20]。(2) 黏附分子 CD44, 作为主要的透明质酸受体, 介导细胞黏附和迁移的各种生理和病理过程。CD44 的充分活动, 必须结合 ERM 蛋白^[21]。CD44 可以结合生长因子, 并提交给其真正的高亲和力受体, 从而促进肿瘤细胞增殖和侵袭, 而这种情况的前提是, CD44 的蛋白需结合于 Ezrin^[22]或 Moesin 细胞质尾部, 链接于细胞骨架^[23]。

综上所述, U251 细胞中 Moesin 表达下降将导致 PDGF 和 CD44 的表达同时下降, 生长和侵袭能力下降; Moesin 在人脑胶质瘤细胞的生长和侵袭过程中可能通过与 PDGF 以及 CD44 相互作用, 发挥重要作用; Moesin 有可能成为治疗人脑胶质瘤的靶点分子。

参考文献:

- [1] Chen ZG, Broddus WC, Zhu C, et al. Current status of gene therapy for gliomas [J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1): 96-100.
- [2] 李莹杰, 陶晓峰, 贺岩, 等. Ezrin 和 Moesin 在胃癌中的表达及其临床意义 [J]. 中国肿瘤, 2007, 16(7): 550-552.
- [3] TAO Xiao-feng, JIN Xiao-ming, WANG Qi-min, et al. Expression of ezrin and moesin in hepatocellular carcinoma [J]. J Diag Pathol, 2007, 16(6): 30-32.
- [4] 李婷婷, 徐秀玉, 王鑫, 等. 膜组织结构伸展刺突蛋白在喉癌中的表达 [J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2007, 14(1): 37-40.
- [5] Kobayashi H, Sagara J, Kurita H, et al. Clinical significance of cellular distribution of moesin in patients with oral squamous cell carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(2): 572-580.
- [6] Carmeci C, Thompson DA, Kuang WW, et al. Moesin expres-

- sion is associated with the estrogen receptor-negative breast cancer phenotype [J]. *Surgery*, 1998, 124 (2):211-217.
- [7] Shih AH, Holland EC. Platelet-derived growth factor (PDGF) and glial tumorigenesis [J]. *Cancer Lett*, 2006, 232 (2): 139-147.
- [8] Reigstad LJ, Varhaug JE, Lillehaug JR. Structural and functional specificities of PDGF -C and PDGF-D, the novel members of the p latelet-derived growth factors family [J]. *FEBS J*, 2005, 272(22):5723-5741.
- [9] Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, et al. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines; an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B [J]. *FEBS Lett*, 1998, 435(1):29-34.
- [10] 赵鹏, 陆小明, 鲁艾林, 等. OPN 基因 RNA i 对 U87 胶质瘤细胞生长和侵袭的抑制作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16(4):383-386.
- [11] Hugo C, Hugo C, Pichler R, et al. The Cytoskeletal Linking Proteins, Moesin and Radixin, Are Upregulated by Platelet-derived Growth Factor, but not Basic Fibroblast Growth Factor in Experimental Mesangial Proliferative Glomerulonephritis [J]. *J Clin Invest*, 1996, 97(11):2499-2508.
- [12] Brown TA, Bouchard T, St John T, et al. Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as heparan-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons [J]. *J Cell Biol*, 1991, 113(1):207-221.
- [13] Günthert U, Hofmann M, Rudy W, et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells [J]. *Cell*, 1991, 65(1):13-24.
- [14] Ermak G, Jennings T, Robinson L, et al. Restricted patterns of CD44 variant exon expression in human papillary thyroid carcinoma [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(5):1037-1042.
- [15] Martin TA, Harrison G, Mansel RE, et al. The role of CD44/Ezrin complex in cancer metastasis [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2003, 46 (2):165-186.
- [16] Ichikawa T, Masumoto J, Kaneko M, et al. Expression of moesin and its associated molecule CD44 in epithelial skin tumors [J]. *J Cutan Pathol*, 1998, 25(5):237-243.
- [17] Ichikawa T, Masumoto J, Kaneko M, et al. Moesin and CD44 expression in cutaneous melanocytic tumours [J]. *Br J Dermatol*, 1998, 138(5):763-768.
- [18] Tsukita S, Oishi K, Sato N, et al. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons [J]. *J Cell Biol*, 1994, 126 (2): 391-401.
- [19] Serrador JM, Alonso-Lebrero JL, del Pozo MA, et al. Moesin interacts with the cytoplasmic region of intercellular adhesion molecule-3 and is redistributed to the uropod of T lymphocytes during cell polarization [J]. *J Cell Biol*, 1997, 138 (6): 1409-1423.
- [20] Tsukita S, Yonemura S, Tsukita S. ERM proteins; head-to-tail regulation of actin-plasma membrane interaction [J]. *Trends Biochem Sci*, 1997, 22(2):53-58.
- [21] Mori T, Kitano K, Terawaki S, et al. Structural basis for CD44 recognition by ERM proteins [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(43): 29602-29612.
- [22] 李莹杰, 陶晓峰, 贺岩, 等. Ezrin、CD44 在胃癌组织中的表达及其相关性 [J]. *肿瘤防治研究*, 2008, 35 (3): 188-190.
- [23] Herrlich P, Morrison H, Sleeman J, et al. CD44 acts both as a growth- and invasiveness-promoting molecule and as a tumor-suppressing cofactor [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 910: 106-118; discussion 118-120.

[编辑校对: 黄园玲]