

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.05.003

• 基础研究 •

抑制整合素 $\alpha 9$ 基因的表达对黑色素瘤细胞B16F1的生长和肺转移的影响

孙思文, 王海明, 康世钧, 罗荣城

Effects of shRNA-mediated Silencing of Integrin $\alpha 9$ Expression on Growth and Lung Metastasis of B16F1 Melanoma Cells

SUN Siwen, WANG Haiming, KANG Shijun, LUO Rongcheng

Oncology Center, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China



Abstract: **Objective** To investigate the effects of shRNA-mediated silencing of integrin $\alpha 9$ (ITGA9) expression on growth and lung metastasis of B16F1 melanoma cells. **Methods** ITGA9-shRNA plasmid was used to inhibit the expression of ITGA9 in melanoma cell line B16F1. The effectiveness and feasibility of RNA interference were confirmed by RT-PCR and Western blot. Subcutaneous tumor model and lung metastasis model were successfully established on C57BL/6 mouse for observation of tumor growth and the number of lung metastatic foci. **Results** Tumor growth was slowed down in ITGA9-shRNA($P<0.05$). The ratio of average tumor volume between shRNA group and scramble-shRNA group was decreased by 36%. The number of lung metastatic foci was significantly decreased($P<0.05$). **Conclusion** Down-regulation of ITGA9 could inhibit B16F1 growth and lung metastasis *in vivo*. ITGA9 may be a promising target of gene therapy for melanoma.

Key words: Integrin $\alpha 9$; shRNA; Melanoma; B16F1 cells; Lung metastasis

摘要: 目的 观察shRNA干扰整合素 $\alpha 9$ (ITGA9) 的表达对黑色素瘤细胞B16F1的生长和肺转移的影响。方法 用RNA干扰技术下调B16F1中ITGA9的表达, 建立小鼠皮下成瘤和肺转移模型, 观察肿瘤生长情况, 计数肺转移灶数量。结果 ITGA9-shRNA转染组的肿瘤生长速度减慢 ($P < 0.05$) , 实验终点, 该组肿瘤平均体积与scramble-shRNA组相比下降36%; 肺转移灶数量显著减少 ($P < 0.05$) 。结论 下调ITGA9的表达可抑制黑色素瘤细胞B16F1在小鼠体内的生长和肺转移。ITGA9可能成为黑色素瘤的治疗靶点。

关键词: 整合素 $\alpha 9$; shRNA; 黑色素瘤; B16F1细胞; 肺转移

中图分类号: R739.5 文献标识码: A

0 引言

整合素是一类重要的细胞表面黏附分子, 由 α (ITGA) 亚基和 β (ITGB)亚基所组成的异二聚体跨膜糖蛋白。目前发现哺乳动物中有18种ITGA亚基和8种ITGB亚基, 组成24种整合素异二聚体。整合素在多种细胞表面表达, 通过与配体的结合介导细胞之间的以及细胞、胞外基质之间的信号转导, 在细胞分化、胚胎发育及细胞黏附等方面发挥非常重要的作用^[1]。在恶性肿瘤中, 整合素通过介导肿瘤细胞与基底膜、肿瘤细胞与宿主细胞间的黏附及肿瘤发生发展过程中的多种信号传递, 直接或间接的影响肿瘤的生长、黏附、浸润和迁移等多个环节^[2]。1993年发现的ITGA9亚基可

以与ITGB1亚基形成异二聚体, 与IGTA4亚基组成整合素的一个亚家族^[3]。作为最新的整合素亚家族的一员, 有关ITGA9的研究相对较少。本研究采用RNA干扰技术抑制小鼠黑色素瘤细胞B16F1中ITGA9的表达, 观察肿瘤细胞在小鼠体内的生长及肺转移情况, 为肿瘤靶向治疗新途径提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠黑色素瘤细胞系B16F1, 由芝加哥大学孟玉茹教授提供。用含10%胎牛血清的RPMI1640培养液, 置37℃、5%CO₂培养箱中培养。ITGA9靶向shRNA质粒 (ITGA9-shRNA) 、阴性对照质粒 (scramble-shRNA) 、转染试剂和转染培养液购自Santa Cruz公司。RNA提取试剂盒、反转录试剂盒和PCR试剂盒为大连宝生物公司产品。免抗小

收稿日期: 2013-03-28; 修回日期: 2013-12-10

作者单位: 510515广州, 南方医科大学南方医院肿瘤中心

作者简介: 孙思文 (1987-), 女, 博士, 医师, 主要从事肿瘤内科工作

鼠ITGA9单克隆抗体购自Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 shRNA质粒转染B16F1细胞与稳定筛选 将对数生长期的细胞接种到6孔板，用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液置37℃，5%CO₂培养箱中培养。等到细胞长至60%~70%融合，按说明书用转染培养液和转染试剂将ITGA9-shRNA转染细胞，置37℃，5%CO₂培养箱中培养。6 h后更换新鲜10%胎牛血清RPMI1640培养液。转染24 h后，将6孔板中的细胞消化，转至培养瓶中培养。待细胞长至80%融合，用含1 μg/ml嘌呤霉素（Merck公司）的10%胎牛血清RPMI 1640培养液培养3d，收集细胞进行Western blot和RT-PCR检测，并冻存。

1.2.2 荧光定量RT-PCR检测ITGA9 mRNA表达 首先提取细胞总RNA，用1 μg RNA反转录成cDNA。特异性扩增引物由英潍捷基（上海）合成，ITGA9的上游引物序列为5'-AAGTGTGTCGTGCCATACCAAC-3'，下游引物序列为5'-GGTCTGCTCGTAGTAGATGTT-3'；内参β-actin的上游引物序列为5'-GACCCAGA TCATGTTGAGACC-3'，下游引物序列为5'-ACGACCAAGGGCATACAGG-3'。PCR循环：95℃30 s预变性，95℃5 s，60℃30 s共40个循环。

1.2.3 Western blot检测ITGA9蛋白表达 用RIPA（含1%PMSF蛋白酶抑制剂）裂解细胞提取总蛋白，测蛋白浓度。配置10%的分离胶和5%的浓缩胶，每孔上40 μg蛋白进行SDS-PAGE，转至PVDF膜。膜经封闭后，加ITGA9一抗，4℃过夜。经洗涤，加二抗（凯基生物公司）室温孵育2 h。洗涤后，DBA显色，数码照相。

1.2.4 动物实验分组 SPF级雌性、6~8周龄C57BL/6小鼠24只，购自南方医科大学实验动物中心。随机分为A、B、C3组，每组8只。A组为ITGA9-shRNA转染组，B组为阴性对照scramble-shRNA转染组，C组为空白对照组。

1.2.5 皮下成瘤及肺转移动物模型的建立 取对数生长期的B16F1细胞，用胰酶消化后，离心收集细胞，加PBS制成单细胞悬液，调整密度为 $1\times10^7/\text{ml}$ 。于小鼠后肢的外侧部位皮下注射100 μl单细胞悬液（ 1×10^6 个细胞），建立皮下成瘤模型。同时，经小鼠尾静脉注射 1×10^6 个细胞，建立肺转移模型。

1.2.6 观察指标 观察注射后小鼠皮下成瘤情况，每3天用游标卡尺测肿瘤长径(a)、短径(b)，利用公式计算肿瘤体积($V=ab^2/2$)，绘制肿瘤生长曲线。3周后，处死小鼠并解剖取双肺，计数肺部转

移灶的数目。

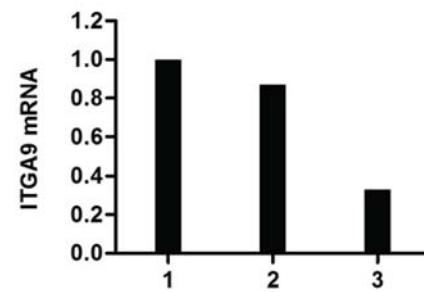
1.3 统计学方法

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用SPSS 10.0软件进行单因素方差分析， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ITGA9-shRNA质粒转染B16F1细胞对ITGA9表达的影响

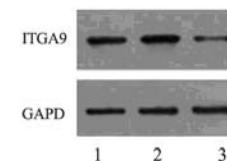
RT-PCR和Western blot结果显示，与scramble-shRNA和空白对照相比，在mRNA水平和蛋白水平，ITGA9-shRNA转染B16F1成功抑制了ITGA9的表达，抑制率分别为67% ($P < 0.05$) 和50% ($P < 0.05$)，见图1、2。



1:B16F1 cells;2: scramble-shRNA transfected B16F1 cells;3: ITGA9-shRNA transfected B16F1 cells

图1 荧光定量RT-PCR检测细胞ITGA9 mRNA的表达

Figure1 Expression of ITGA9 mRNA detected by qRT-PCR



1:B16F1 cells;2: scramble-shRNA transfected B16F1 cells;3: ITGA9-shRNA transfected B16F1 cells

图2 Western blot检测细胞ITGA9蛋白水平的表达

Figure2 Expression of ITGA9 protein detected by Western blot

2.2 观察小鼠皮下成瘤及转移模型中肿瘤生长和肺转移灶的情况

小鼠肿瘤体积生长曲线见图3。ITGA9-shRNA组的肿瘤生长与scramble-shRNA组和空白对照组相比显著减慢 ($P < 0.05$)。在实验终点，ITGA9-shRNA组的肿瘤平均体积与阴性对照组相比下降36%。3周后处死小鼠，取双肺，计数肺表面转移灶的数目。scramble-shRNA组和空白对照组中肺部转移灶平均值分别为(43.13±6.79)个和(43.38±6.323)个，而ITGA9-shRNA组的肺部转移灶明显

减少($P<0.05$)，仅为(18.13±4.74)个，见图4。

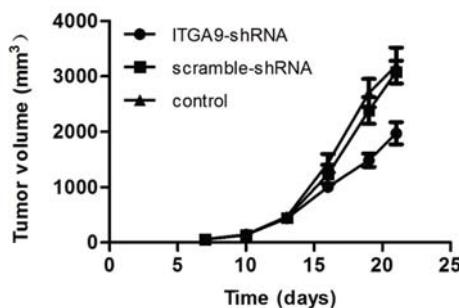


图3 各组小鼠肿瘤生长曲线

Figure3 Growth curves of subcutaneous tumor volume

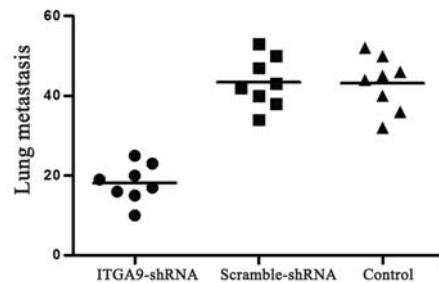


图4 各组小鼠肺转移灶数目

Figure4 Number of lung metastatic lesions

3 讨论

恶性肿瘤表达的黏附分子与肿瘤的生长、侵袭和转移密切相关。黏附分子通过与配体结合启动细胞的多条信号通路，影响细胞的生物学行为，同时也改变细胞本身特性^[4]。多项研究表明，整合素在恶性肿瘤中的表达发生改变。改变表达的整合素影响肿瘤细胞与细胞外基质的相互作用，促进肿瘤细胞迁移，并有助于其存活^[5]。整合素有望成为应用于临床抗肿瘤新药研发的靶点^[6]。

ITGA9在多种肿瘤中表达发生改变。它高表达于肺癌，特别是小细胞肺癌，可能是预后不良的指标^[7]。还有研究表明整合素α9β1是basal-like型乳腺癌的分子标志并提示患者的无转移生存期和总生存期短^[8]。多项实验研究表明ITGA9与肿瘤的侵袭、迁移有关^[9-10]。黑色素瘤恶性程度高，晚期转移患者的治疗效果并不理想，新的治疗方法和治疗靶点亟需进一步研究。ITGA9是否在黑色素瘤的侵袭、迁移中发挥重要作用，需要进一步验证。

本实验用RNA干扰技术，下调B16F1细胞的ITGA9的表达，在小鼠体内观察到肿瘤生长减慢，提示ITGA9可抑制B16F1的局部生长。其机制可能为下调ITGA9影响了B16F1的增殖、分化以及肿瘤血管生成等环节，需进一步探讨。此结果提示ITGA9可能是黑色素瘤治疗的潜在靶点。

本实验使用高转移性的黑色素瘤细胞株B16F1，静脉注射建立肺转移模型，该模型可以很好的评价处理因素对肺转移的影响。一般认为，进入小鼠血液循环的恶性肿瘤细胞是通过黏附毛细血管内皮细胞，穿过基底膜，迁移至组织内增殖，最终形成转移灶。ITGA9-shRNA转染的B16F1细胞在小鼠体内形成的肺转移灶减少，提示ITGA9影响B16F1细胞从黏附、穿过血管内皮到进入组织形成转移灶这一系列环节中的一个或多个环节。这种肺转移抑制作用也可能与肿瘤细胞在血液循环中的存活率降低有关。以上结果表明ITGA9有希望成为抑制黑色素瘤转移的治疗靶点。

参考文献：

- Krissansen GW, Danen EHJ. Integrin superfamily. Encyclopedia of Life Sciences: John Wiley & Sons, Ltd., www.els.net.2007.
- Deb M, Sengupta D, Patra SK. Integrin-epigenetics: a system with imperative impact on cancer[J]. Cancer Metastasis Rev,2012,31(1-2): 221-34.
- Palmer EL, Rüegg C, Ferrando R, et al. Sequence and tissue distribution of the integrin alpha 9 subunit, a novel partner of beta 1 that is widely distributed in epithelia and muscle[J]. J Cell Biol,1993,123(5):1289-97.
- Nasulewicz-Goldeman A, Uszczyńska B, Szczurska-Nowak K, et al. siRNA-mediated silencing of integrin β3 expression inhibits the metastatic potential of B16 melanoma cells[J]. Oncol Rep, 2012,28(5):1567-73.
- Roy S, Bingle L, Marshall JF, et al. The role of α9β1 integrin in modulating epithelial cell behaviour[J]. J Oral Pathol Med, 2011,40(10):755-61.
- Perdih A, Dolenc MS. Small molecule antagonists of integrin receptors[J]. Curr Med Chem,2010,17(22):2371-92.
- Gupta SK, Oommen S, Aubry MC, et al. Integrin α9β1 promotes malignant tumor growth and metastasis by potentiating epithelial-mesenchymal transition[J]. Oncogene,2013,32(2):141-50.
- Allen MD, Vaziri R, Green M, et al. Clinical and functional significance of α9β1 integrin expression in breast cancer: a novel cell-surface marker of the basal phenotype that promotes tumour cell invasion[J]. J Pathol,2011,223(5):646-58.
- Arihiro K, Kaneko M, Fujii S, et al. Significance of alpha 9 beta 1 and alpha v beta 6 integrin expression in breast carcinoma[J]. Breast Cancer,2000,7(1):19-26.
- Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Skrypkina IY,et al. Screening of epigenetic and genetic disturbances of human chromosome 3 genes in colorectal cancer[J]. Ukr Biokhim Zh,2009,81(4):81-7.