

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.27.006

文章编号: 1005-8982(2017)27-0027-05

下调 α -catulin 基因表达对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响*

赵乃阔¹, 胡庆军¹, 史朝晖²

(1.河南省焦作市人民医院 消化内科, 河南 焦作 454000;

2.河南大学淮海医院, 河南 开封 475000)

摘要:目的 探讨抑制 α -catulin 基因表达对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响,以及可能的机制。**方法** 培养人胃癌细胞 SGC-7901,根据转染物不同将细胞分为 siRNA- α -catulin 组、siRNA-对照序列组和空白对照组,MTT 法检测细胞增殖能力,Transwell 法检测细胞迁移和侵袭能力,Western blot 检测细胞中 α -catulin、N-钙粘蛋白(N-cadherin)、E-钙粘蛋白(E-cadherin)和波形蛋白(Vimentin)表达。**结果** siRNA- α -catulin 组细胞 24、48、72 及 96 h 时吸光度 A 值均低于 siRNA-对照序列组和空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 siRNA-对照序列组和空白对照组比较,siRNA- α -catulin 组迁移细胞数和侵袭细胞数均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 siRNA-对照序列组和空白对照组比较,siRNA- α -catulin 组细胞中 α -catulin、N-cadherin 及 Vimentin 蛋白相对表达量均降低,而 E-cadherin 蛋白相对表达量增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 特异性沉默人胃癌细胞 SGC-7901 中 α -catulin 基因表达可有效抑制细胞增殖、迁移和侵袭能力,其机制可能与抑制上皮-间质转化过程有关。

关键词: 胃癌; α -catulin; 细胞增殖; 细胞侵袭; 上皮-间质转化

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

Genetic inhibition of α -catulin on proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells*

Nai-kuo Zhao¹, Qing-jun Hu¹, Chao-hui Shi²

(1. Department of Gastroenterology, People's Hospital of Jiaozuo City, Jiaozuo, Henan 454000, China; 2. Huaihai Hospital Affiliated to Henan University, Kaifeng, Henan 475000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of genetic inhibition of α -catulin on proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells. **Methods** Human gastric cancer cell line SGC-7901 were cultured and were divided into siRNA- α -catulin group, siRNA sequence control group and negative control group. MTT and Transwell assay were performed to measure cell proliferation and cell invasion, respectively. The levels of α -catulin, N-cadherin, E-cadherin and Vimentin were determined by Western blot. **Results** MTT results indicated that optical density value at 24 h, 48 h, 72 h and 96 h in the siRNA- α -catulin group were significantly lower than that of siRNA-control sequence group and negative control group ($P < 0.05$). The amount of migrating cells and invasive cells in siRNA- α -catulin group were decreased dramatically compared with siRNA-control sequence group and blank control group ($P < 0.05$). Expression levels of α -catulin, N-cadherin and Vimentin in siRNA- α -catulin group decreased while E-cadherin increased significantly when compared with siRNA-control sequence group and blank control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Genetic knockdown of α -catulin gene in SGC-7901 cell line could prevent cell proliferation, migration and invasion by inhibition of transition of epithelial-mesenchymal.

收稿日期: 2017-05-16

* 基金项目: 河南省 2015 年科技发展计划 (No: 152300410164)

Keywords: gastric cancer; α -catulin; cell proliferation; cell invasion; epithelial-mesenchymal transit

胃癌作为发病率高、致死率高的消化道恶性肿瘤,由于发病隐匿,早期症状不明显且缺乏有效的筛查方法,多数患者临床确诊时已进展至中晚期,错失最佳的治疗时机^[1],即使患者接受手术切除治疗,由于肿瘤复发、转移率高,5 年生存率仅 20% 左右^[2]。目前,影响胃癌复发、转移相关机制尚未完全清楚,因此,从分子生物学方面积极探讨相关机制以指导治疗,对延长患者生命,改善预后具有重要意义。 α -catulin 作为一种细胞骨架连接蛋白,在 Rho 信号通路中发挥重要作用,与炎症反应、细胞凋亡、骨架重建、细胞迁移与侵袭以及上皮-间质转化等过程密切相关^[3],有研究指出^[4],上皮-间质转化在胃癌细胞转移、侵袭、抗凋亡和耐药中发挥重要作用。本研究拟利用小分子干扰 RNA 技术 (small interference RNA, siRNA) 特异性下调人胃癌细胞 SGC-7901 中 α -catulin 基因表达,探讨其对细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响,以及可能的机制,以期为胃癌机制研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和设备

人胃癌细胞 SGC-7901(购自美国 ATCC),RPMI 1640 细胞培养基、优质胎牛血清及胰蛋白酶(购自美国 Gibco 公司),Lipofectamine 2000 转染试剂盒(购自美国 Invitrogen 公司),siRNA- α -catulin 和 siRNA- 对照序列(上海吉玛制药技术有限公司设计合成),MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒、ECL 显色试剂盒(购自碧云天生物技术公司),二甲基亚砜 (DMSO)(购自北京索莱宝科技公司),Transwell 小室(购自美国 Corning 公司),兔抗人 α -catulin 多克隆抗体(购自上海万疆生物公司),兔抗人 N-钙粘蛋白(N-cadherin)多克隆抗体、鼠抗人 E-钙粘蛋白(E-cadherin)多克隆抗体(购自美国 Santa Cruz 公司),兔抗人波形蛋白(Vimentin)单克隆抗体(购自美国 Cell Signaling 公司),实时荧光定量 PCR 仪(购自 ABI 公司),凝胶电泳分析系统(购自美国 Bio-rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和分组处理 将人胃癌细胞 SGC-7901 置于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 细胞培养基中,于含 5% 二氧化碳 CO₂ 的 37℃ 恒温培养箱中培

养,待细胞融合度达 85% 时,用胰酶消化后,传代培养,取 3~5 代细胞进行实验。按照 Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒说明书对细胞进行转染,根据转染物不同将细胞分为 3 组:① siRNA- α -catulin 组。转染 α -catulin 干扰序列:正向 5'-CCAUUACAUCAC CAACAATT-3',反向 5'-UUGUUGGUGAUGUUAU GGTT-3';② siRNA- 对照序列组。转染阴性对照序列:正向 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',反向 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3';③ 空白对照组。不做任何处理。转染后于含 5% CO₂ 的 37℃ 恒温培养箱中继续培养,完成后续实验。

1.2.2 不同转染组细胞增殖能力检测 取各转染组细胞,胰酶消化后,调整细胞密度为 1.5×10^6 个/ml,接种于 96 孔板,每孔 100 μ l,于含 5% CO₂ 的 37℃ 恒温培养箱中进行培养,分别于培养 24、48、72 和 96 h 时,向各孔加入 MTT 液(浓度 5 g/L)20 μ l,37℃ 孵育 6 h,去除上清液,再加入 200 μ l 的 DMSO,于摇床上振荡 15 min,使沉淀溶解充分,利用全自动酶标仪取 490 nm 波长处对各孔吸光度 A 值进行检测。

1.2.3 Transwell 法检测细胞迁移能力 取各转染组转染后培养 48 h 细胞,调整细胞密度为 1.5×10^6 个/ml,取细胞悬液 200 μ l 加入 Transwell 小室上室,将 600 μ l 含 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液加入下室,于 37℃ 恒温培养箱中培养 24 h,取出小室,用棉签将上室中散落的细胞轻轻擦去,甲醇固定,结晶紫染色后,用倒置显微镜进行观察,随机选取 5 个高倍视野计数穿膜细胞数,取均值作为迁移细胞数^[5]。

1.2.4 Transwell 法检测细胞侵袭能力 取 Matrigel 胶铺于 Transwell 小室中,风干备用。其余步骤同 1.2.3。

1.2.5 Western blot 检测各转染组细胞中 α -catulin、N-cadherin、E-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达 取各转染组转染后培养 48 h 细胞,加入细胞裂解液,用总蛋白提取试剂盒对细胞中总蛋白提取,利用 BCA 蛋白定量检测试剂盒检测蛋白纯度并定量。取 50 μ g 总蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳,电转移至 PVDF 膜,用 5% 脱脂奶粉 4℃ 封闭 5 h,用 TBST 液漂洗 3 次,加入一抗兔抗人 α -catulin 多克隆抗体、兔抗人 N-cadherin 多克隆抗体、鼠抗人 E-cadherin 多克隆抗

体、兔抗人 Vimentin 单克隆抗体(稀释比例分别为 1 : 800、1 : 500、1 : 1 200 及 1 : 1 000),4℃过夜孵育,TBST 液漂洗 3 次,加入二抗,室温下孵育 4 h,利用 ECL 显色试剂盒避光反应 15 min,拍照,利用 Image J 图像分析软件分析细胞中 α -catulin、N-cadherin、E-cadherin 和 Vimentin 蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法

数据处理采用 SPSS 21.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞增殖能力比较

siRNA- α -catulin 组细胞 24、48、72 和 96 h 时吸光度 A 值均低于 siRNA- 对照序列组和空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 siRNA- α -catulin 组细胞增殖能力被抑制,见图 1。

2.2 各转染组细胞迁移和侵袭能力比较

3 组转染组迁移细胞数和侵袭细胞数差异有统计学意义($F = 72.505$ 和 99.266 ,均 $P = 0.000$),其中,与 siRNA- 对照序列组和空白对照组比较,siRNA- α -catulin 组迁移细胞数和侵袭细胞数均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1 和图 2、3。

2.3 各转染组细胞中 α -catulin、N-cadherin、E-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达比较

3 组细胞中 α -catulin、N-cadherin、E-cadherin 和 Vimentin 蛋白相对表达量差异有统计学意义($F = 33.134、8.486、19.664$ 和 17.414 ,均 $P = 0.000$),其中,与 siRNA- 对照序列组和空白对照组比较,siRNA- α -catulin 组细胞中 α -catulin、N-cadherin 及 Vi-

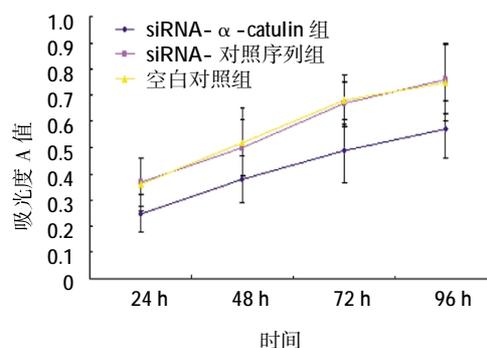
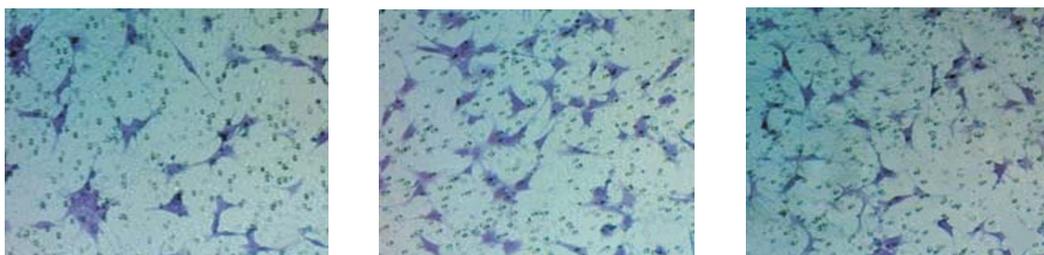


图 1 各转染组细胞增殖能力比较

表 1 各转染组细胞迁移和侵袭能力比较 ($\bar{x} \pm s$)

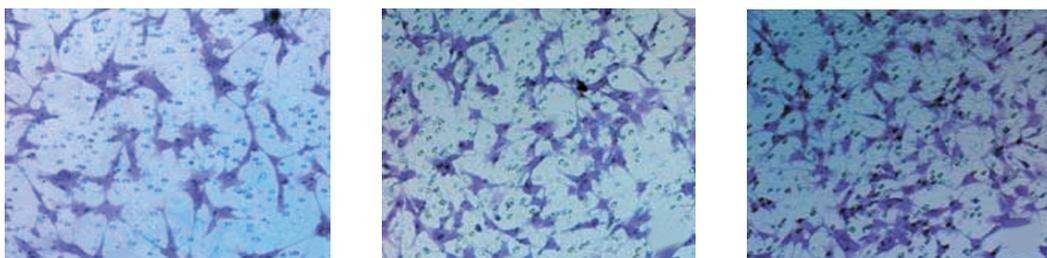
组别	迁移细胞数	侵袭细胞数
siRNA- α -catulin 组	117.6 \pm 8.2 ⁽¹⁾²⁾	85.2 \pm 6.7 ⁽¹⁾²⁾
siRNA- 对照序列组	179.5 \pm 10.7	144.1 \pm 10.2
空白对照组	182.3 \pm 12.0	142.8 \pm 9.5
F 值	72.505	99.266
P 值	0.000	0.000

注:1)与空白对照组比较, $P < 0.05$;2)与 siRNA- 对照序列组比较, $P < 0.05$



A siRNA- α -catulin 组 B siRNA- 对照序列组 C 空白对照组

图 2 各转染组细胞迁移能力比较 (结晶紫 $\times 400$)



A siRNA- α -catulin 组 B siRNA- 对照序列组 C 空白对照组

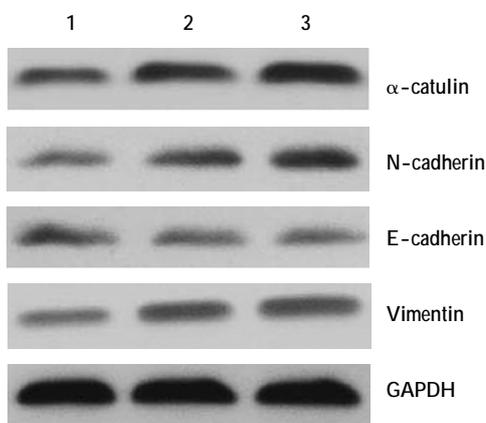
图 3 各转染组细胞侵袭能力比较 (结晶紫 $\times 400$)

mentin 蛋白相对表达量均降低,而 E-cadherin 蛋白相对表达量增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2 和图 4。

表 2 各转染组细胞中 α -catulin、N-cadherin、E-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	α -catulin 蛋白	N-cadherin 蛋白	E-cadherin 蛋白	Vimentin 蛋白
siRNA- α -catulin 组	$0.26 \pm 0.07^{(1)(2)}$	$0.32 \pm 0.08^{(1)(2)}$	$0.59 \pm 0.12^{(1)(2)}$	$0.43 \pm 0.14^{(1)(2)}$
siRNA- 对照序列组	0.73 ± 0.10	0.64 ± 0.13	0.36 ± 0.08	0.79 ± 0.13
空白对照组	0.75 ± 0.12	0.63 ± 0.11	0.35 ± 0.10	0.81 ± 0.15
F 值	33.134	8.486	19.664	17.414
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:1)与空白对照组比较, $P < 0.05$;2)与 siRNA- 对照序列组比较, $P < 0.05$



1: siRNA- α -catulin 组;2: siRNA- 对照序列组;3: 空白对照组

图 4 各转染组细胞中 α -catulin、N-cadherin、E-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达

3 讨论

胃癌发病率、致死率均位居我国消化道肿瘤首位,具有发病率高、确诊晚、转移率高及预后较差等特点^[6],研究表明^[7],胃癌复发、转移是导致患者死亡的主要因素。因此,积极探讨影响胃癌侵袭、转移的相关机制对治疗和预后具有重要意义。 α -catulin 作为 Rho 信号通路中重要组件,由 CTNNAL1 基因编码,其蛋白结构中含有与 α -连环蛋白(α -actinin)和黏着斑蛋白(Vinculin)结合位点,与炎症、细胞衰老、凋亡及骨架重构等过程密切相关^[8],有研究指出^[9], α -catulin 在头颈部鳞癌中呈高表达。CAO 等^[10]指出, α -actinin 与鳞状细胞癌细胞迁移和侵袭密切相关,可作为癌症患者预后的标志物和未来的治疗靶标。本研究利用 siRNA 技术特异性沉默人胃癌 SGC-7901 细胞中 α -catulin 基因,结果显示,siRNA- α -catulin 组细胞中 α -catulin 蛋白表达量低于 siRNA- 对照序列组和空白对照组,提示细胞中 α -catulin 基因表

达被成功抑制。

有研究指出^[11], α -catulin 可通过改变细胞周期中的关键性基因而抑制肿瘤细胞衰老,加速细胞增殖。本研究 MTT 细胞增殖结果显示,siRNA- α -catulin 组细胞 24、48、72 和 96h 时吸光度 A 值均低于 siRNA- 对照序列组和空白对照组,说明特异性沉默胃癌细胞中 α -catulin 基因后,细胞增殖能力被抑制,提示 α -catulin 可能参与胃癌细胞增殖过程。本研究显示,与 siRNA- 对照序列组和空白对照组比较,siRNA- α -catulin 组迁移细胞数和侵袭细胞数均降低,说明特异性沉默胃癌细胞中 α -catulin 基因可有效抑制细胞迁移、侵袭能力。研究表明^[12],上皮-间质转化与肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭能力密切相关。N-cadherin、E-cadherin 和 Vimentin 是上皮-间质转化特异性标志物,发生上皮-间质转化时,N-cadherin、Vimentin 表达升高,而 E-cadherin 表达被抑制^[13]。本研究结果显示,siRNA- α -catulin 组细胞中 N-cadherin、Vimentin 蛋白表达被抑制,而 E-cadherin 蛋白表达量增加,说明特异性沉默 α -catulin 基因上皮-间质转化过程被抑制。

综上所述,特异性沉默人胃癌细胞 SGC-7901 中 α -catulin 基因表达可有效抑制细胞增殖、迁移和侵袭能力,其机制可能与抑制上皮-间质转化过程有关。

参 考 文 献:

- [1] PETRELLI F, BERENATO R, TURATI L, et al. Prognostic value of diffuse versus intestinal histotype in patients with gastric cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. J Gastrointest Oncol, 2017, 8(1): 148-163.
- [2] GADDE R, TAMARIZ L, HANNA M, et al. Metastatic gastric cancer (MGC) patients: Can we improve survival by metastasecto-

- my? A systematic review and meta-analysis [J]. *J Surg Oncol*, 2015, 112(1): 38-45.
- [3] BEAR M D, LIU T, ABUALKHAIR S, et al. Alpha-catulin co-localizes with vimentin intermediate filaments and functions in pulmonary vascular endothelial cell migration via ROCK[J]. *J Cell Physiol*, 2016, 231(4): 934-943.
- [4] 杨柳, 石燕, 戴广海. 上皮细胞间质化在胃癌发生发展中的作用[J]. *解放军医学院学报*, 2016, 37(3): 292-294.
- [5] 于路平, 刘春雷, 李清, 等. 性别决定区 Y 框蛋白 18 在前列腺癌中的表达及其对细胞功能的影响[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2017, 38(2): 141-145.
- [6] VEISANI Y, DELPISHEH A. Survival rate of gastric cancer in iran; a systematic review and meta-analysis [J]. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2016, 9(2): 78-86.
- [7] OKUGAWA Y, MOHRI Y, TANAKA K, et al. Metastasis-associated protein is a predictive biomarker for metastasis and recurrence in gastric cancer[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(4): 1893-1900.
- [8] 马雪, 张斌, 韩春耀, 等. 下调 α -catulin 基因的表达对舌鳞癌细胞株 Tscca 侵袭及迁移能力影响的体外研究[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2016, 54(6): 12-15.
- [9] 邱波, 张卓, 申道福, 等. 头颈部鳞癌中 α -catulin 表达的临床病理和预后意义[J]. *中国医科大学学报*, 2015, 44(12): 1079-1086.
- [10] CAO C, CHEN Y, MASOOD R, et al. α -Catulin marks the invasion front of squamous cell carcinoma and is important for tumor cell metastasis[J]. *Mol Cancer Res*, 2012, 10(7): 892-903.
- [11] FAN L C, CHIANG W F, LIANG C H, et al. α -Catulin knockdown induces senescence in cancer cells [J]. *Oncogene*, 2011, 30(23): 2610-2621.
- [12] 白一禾, 秦兆宇, 贺福初, 等. HMG20A 对肝癌细胞体外增殖与迁移的影响及其机制[J]. *复旦学报(医学版)*, 2016, 43(4): 385-392.
- [13] JI L, ZHANG B, ZHAO G. Liver X receptor α (LXR α) promoted invasion and EMT of gastric cancer cells by regulation of NF- κ B activity[J]. *Hum Cell*, 2017, 30(2): 124-132.

(王荣兵 编辑)