

过表达胃动蛋白对胃癌细胞生物行为学的影响

戴劲¹, 彭铁立¹, 余相地^{2*}

1. 广州医科大学消化病研究所, 广州医科大学附属第六医院(清远市人民医院) 消化内科, 广东 清远 511500

2. 贵州省人民医院 麻醉科, 贵州 贵阳 550001

【摘要】 目的 探讨过表达胃动蛋白(gastrokine-2, GKN2)对胃癌细胞生物行为学的影响。方法 体外培养 SGC-7901、AGS 胃癌细胞, 构建 GKN2 过表达质粒, 利用 Lipofectamine 2000 进行 GKN2 过表达质粒与胃癌细胞的转染。获得 GKN2 过表达的 SGC-7901、AGS 胃癌细胞为 GKN2 组, 空载转染上述胃癌细胞为 vector 组。采用分别采用细胞黏附实验、细胞侵袭实验和四甲基偶氮唑盐(MTT)法, 观察 GKN2 对胃癌细胞黏附作用、侵袭力和细胞活性的影响。**结果** 与 vector 组相比, GKN2 组 GKN2 的表达量明显增加($P<0.001$); 与 vector 组相比, GKN2 组胃癌细胞黏附能力降低($P<0.05$), 胃癌细胞侵袭力明显减慢($P<0.05$), 胃癌细胞活性明显降低($P<0.05$)。**结论** GKN2 能够抑制胃癌细胞黏附能力, 迁移能力和细胞活性。

【关键词】 胃癌细胞; 胃动蛋白 2; 细胞黏附力; 细胞侵袭力; 细胞活性

Effect of over-expressing gastrokine-2 on biological behaviors of gastric cancer cells

Dai Jin¹, Peng Tieli¹, Yu Xiangdi^{2*}

1. Department of Gastroenterology, the Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Qingyuan People's Hospital, Guangdong 511500, Guangdong, China

2. Department of Anesthesiology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550003, Guizhou, China

【Abstract】 Objective This study aims to explore the effect of over-expressing gastrokine-2 (GKN2) on biological behaviors of gastric cancer cells. **Methods** Gastric cell lines (SGC-7901 and AGS) were cultivated in vitro, the GKN2 overexpression vector was constructed and gastric cell lines were transfected with the method of Lipofectamine 2000. GKN2 overexpression gastric cancer cell lines were experiment group (GKN2), the control group was gastric cell lines was transfected with empty vector (vector). GKN2 expression was measured by RT-PCR; the effect of GKN2 on gastric cell lines adhesion, invasion and viability was measured by adhesion assay, Transwell assay and MTT assay. **Results** The success of transfection was demonstrated that the expression of GKN2 in GKN2 group increased significantly by compared to vector group ($P<0.05$); adhesive ability of cells in GKN2 group was decreased ($P<0.05$); invasion ability of cells in GKN2 group was inhibited ($P<0.05$) and the percentage of viable cells was decreased in GKN2 group ($P<0.05$).

Conclusion Gastrokine-2 inhibits the adhesion, invasion ability and viability rate of gastric cancer cells.

【Key words】 Gastric cell lines; Gastrokine-2; Cell adhesion ability; Cell invasiveness; Cell viability

胃癌是全球范围内常见的高发生率、高致死率的恶性肿瘤之一^[1]。因此,探索胃癌的发病机制并寻找其潜在的治疗靶点有重要的意义。胃动蛋

白 2(gastrokine-2, GKN2)是近年来新出现的胃癌抑癌基因家族-gastrokine 家族中的一员^[2]。卫拴昱等对 GKN2 在胃癌组织中的表达及临床意义做了一个较为全面的分析,他们不仅发现 GKN2 在人的胃癌组织中的表达水平相对于癌旁正常胃黏膜显著下调甚至缺失,而且 GKN2 表达水平与胃癌患者的预后相关^[3]。然而有关 GKN2 在体外对胃

基金项目:贵州省科技计划项目黔科合基础([2017]1107);贵州省科技计划项目黔科合 LH 字([2016]7174)

第一作者:戴劲,副主任医师, E-mail: 67358976@qq.com

*通信作者:余相地,副主任医师, E-mail: Xiangdi_Yu@163.com

癌细胞的研究,目前尚无相关报告。因此,本研究将探讨 GKN2 在体外对胃癌细胞生物行为学的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 胃癌细胞系(SGC-7901 和 AGS)购自 American Type Culture Collection 公司(ATCC, 马纳萨斯, VA, 美国)。用含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基(Gibco 公司, 格兰德艾兰, NY, 美国)在 37℃, 5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.2 质粒的构建及转染 利用软件 Clone Manager 7 设计 GKN2 的引物(F, ATGCAAGCTTATGAAAATA CTTGTGGC 和 R, GCATCGAGCTAAACATGAATG TCT), 将经过 PCR 扩增、酶切后得到目的基因与 pEGFP-N1 载体连接, 然后经过转化、筛选后进行质粒提取, 将得到的质粒进行酶切及测序鉴定。利用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司, 卡尔斯巴德, CA, 美国)进行 GKN2 过表达质粒与胃癌细胞系(SGC-7901 和 AGS)的转染为 GKN2 组。以空载质粒转染上述细胞为 vector 组。

1.3 RT-PCR 实验 将胰蛋白酶消化收集到的细胞用 Trizol Reagent (Invitrogen 公司, 卡尔斯巴德, CA, 美国)处理, 加入氯仿充分振荡后静置 5 min; 在 4℃, 8000 r/min 离心 20 min, 完成离心后取上清加入等量的异丙醇, 静置 5 min 后在同样的条件下再次离心 20 min, 小心去除上清, 加入无 RNA 酶水将沉淀溶解, 取 1 μl 测 RNA 总量, 其余保存于 -80℃ 冰箱。采用 PrimeScript RT Reagent Kit 试剂盒(Invitrogen 公司, 卡尔斯巴德, CA, 美国)的说明书进行反转录, 采用 SYBR Premix Ex Taq TM II 试剂盒(Invitrogen 公司, 卡尔斯巴德, CA, 美国)进行实时荧光 PCR。反应结束后确认实时荧光 PCR 的扩增曲线和融解曲线, 进行 PCR 定量时制作标准曲线。

1.4 蛋白质印迹法 将准备好的细胞样品用 RIPA 裂解液制备好的样品, 用 12% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。电泳完毕后取出凝胶, 将胶上的蛋白质转移至硝酸纤维膜上。将膜于特异的一抗和二抗孵育(抗体用 TBST 缓冲液稀释, 一抗与二抗孵育之后用 TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 15 min), 所有的抗体都购自北京生物科技有限公司(北京, 中国)。蛋白条带用 Odyssey Imaging Systems 显影并保持图像。蛋白条带的光密度用 Image-Pro-Plus 5.1 软件进行定量分析。

1.5 细胞黏附实验 将 24 孔板用 20 μg/ml 的纤维连接蛋白溶液包被, 4℃ 过夜; 将制备好的单细胞悬液(浓度为 5×10⁴/ml)分别用不同浓度的丙泊酚的实验培养基在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 30 min, 用 PBS 洗掉未黏附细胞后, 用 4% 多聚甲醛在室温下固定细胞 15 min, 然后用 1:1000 的 Hoechst 在室温下孵育细胞 10 min。在荧光显微镜下观察采集图像, 然后用 Image J 统计黏附的细胞数。

1.6 细胞侵袭实验 根据说明书使用 Corning Costar Transwell Cell Culture Inserts (CLS3464; Corning 公司, NY, 美国)进行细胞侵袭实验。在丙泊酚或对照溶剂处理 24 h 后, 用无血清培养基制成单细胞悬液(1×10⁵/ml)。上层小室加入 100 μl 细胞悬液, 下层小室加入全培养基。12 h 后用 4% PFA 固定迁移的细胞并用结晶紫溶液染色 15 min。用荧光显微镜拍摄图片。

1.7 四甲基偶氮唑盐(MTT)法 细胞培养在 96 孔板中三组不同浓度的培养基中, 在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 小心吸去培养上清, 加入 100 μl 新鲜培养基, 每孔加 MTT 溶液, 继续 37℃ 培养 4 h, 然后小心吸掉培养上清, 每孔加入 100 μl DMSO, 使结晶物充分溶解。用酶联免疫检测仪在 490 nm 处测量各孔的吸光值, 代表活性细胞百分比。

1.5 统计学处理 各组计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 数据采用 SPSS 16.0 统计分析软件统计分析。用 Shapiro-Wilk 法进行正态性检验, 用 Leven 法进行方差齐性检验。各组均数两两比较用 LSD-*t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GKN2 过表达 SGC-7901/AGS 胃癌细胞模型构建成功 在荧光显微镜下观察慢病毒转染效率, 结果显示, 经过筛选, 慢病毒转染效率达到 90% 以上, 证明慢病毒已成功导入胃癌细胞株。为了进一步确定 GKN2 在胃癌细胞株中过表达, 我们利用 RT-PCR 和蛋白质印迹法检测相关胃癌细胞株 GKN2 的表达情况。与 vector 组相比, GKN2 组 GKN2 的表达量明显增加(*P*<0.001), 见图 1、图 2。

2.2 GKN2 过表达 SGC-7901/AGS 胃癌细胞黏附能力降低 细胞黏附实验结果表明 GKN2 过表达质粒转染胃癌 AGS 和 SGC-7901 细胞后, 细胞的黏附能力明显降低(图 3)。由此可见 GKN2 可以抑

制胃癌细胞体外黏附能力。

2.3 GKN2 过表达 SGC-7901/AGS 胃癌细胞侵袭力降低 Transwell 实验结果表明 GKN2 过表达质粒转染胃癌 AGS 和 SGC-7901 细胞后, 细胞的侵袭率明显降低(图 4)。

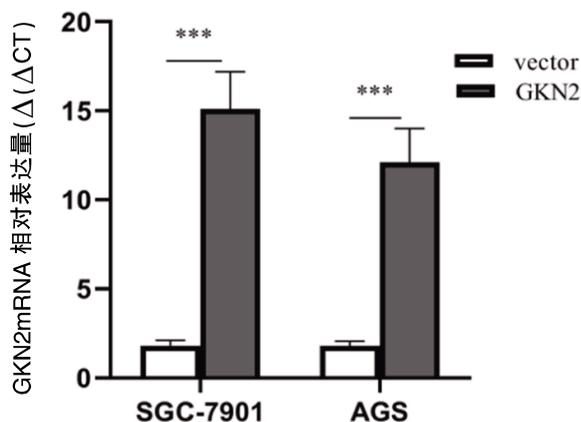


图 1 RT-PCR 检测 GKN2 导入成功

注:***代表与 vector 组相比差异有统计学意义 ($P<0.05$) (SGC-7901: GKN2 比 vector, $P=0.0012$; AGS: GKN2 比 vector, $P=0.0026$)

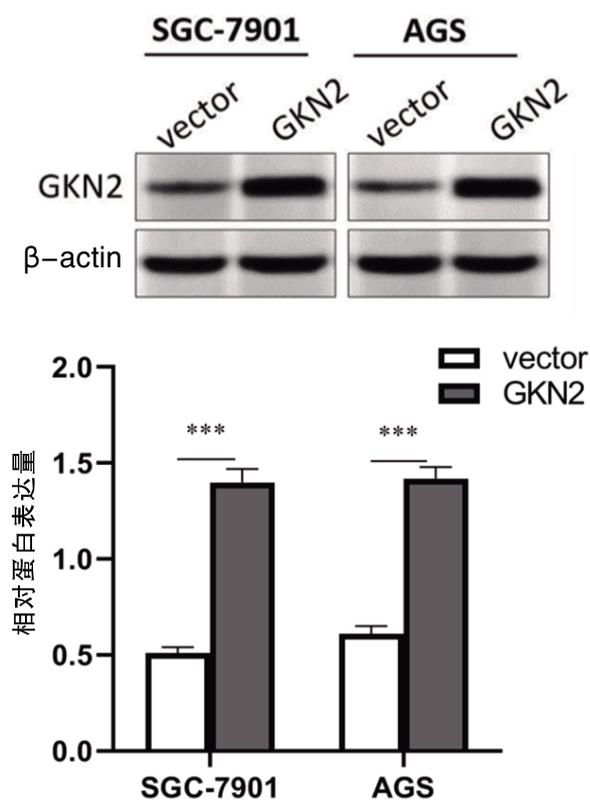


图 2 蛋白质印迹法检测 GKN2 导入成功

注:***代表与 vector 组相比有显著性差异 ($P<0.05$) (SGC-7901: GKN2 比 vector, $P=0.019$; AGS: GKN2 比 vector, $P=0.021$)

2.4 GKN2 过表达 SGC-7901/AGS 胃癌细胞活性明显降低 MTT 实验表明 GKN2 过表达质粒转染胃癌 AGS 和 SGC-7901 细胞后, 细胞的活性明显降低(图 5)。

3 讨论

本研究发现, 与对照组相比, GKN2 过表达胃癌细胞黏附、侵袭能力和细胞活性明显降低。我们首次通过体外实验证实 GKN2 过表达对胃癌细胞的生物行为学有明显抑制作用; 由此可推测 GKN2 对胃癌的发生发展发挥着关键作用。

GKN2 也曾被称为 TFIZI、GDDR、blottin, 它是近年来新出现的胃癌抑癌基因家族-gastrokine 家族中的一员。GKN2 基因位于人类染色体 2 p13, 与 gastrokine 的另一个成员 GKN1 基因相距 22 kb, 两者具有很高的同源性。GKN2 基因包含了 5 个外显

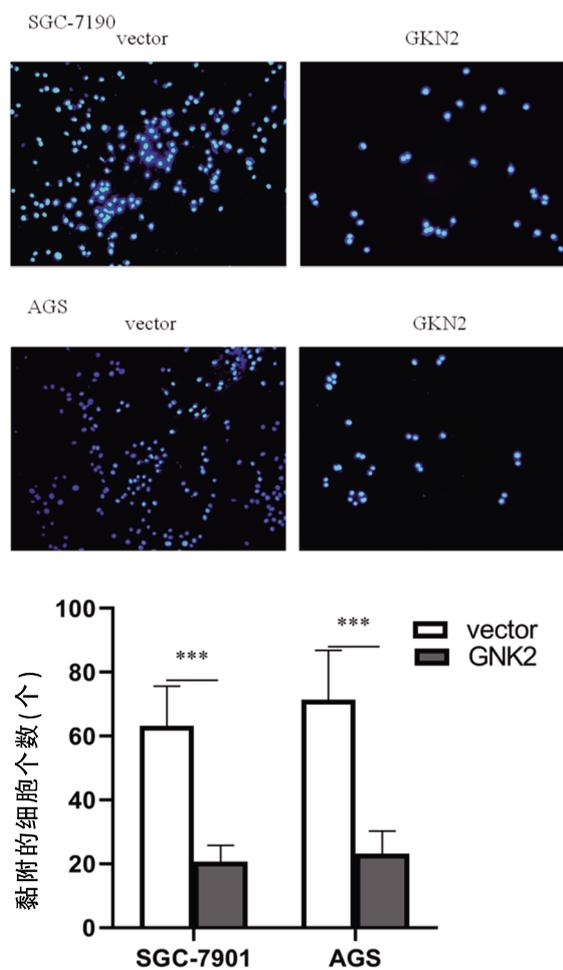


图 3 胃癌细胞体外黏附能力的比较

注:***代表与 GKN2 组相比有显著性差异 (Hoechst 染色)($P<0.05$) (SGC-7901: GKN2 比 vector, $P=0.0037$; AGS: GKN2 比 vector, $P=0.0029$)

子,共同编码一个相对分子质量 18.3 的蛋白,主要分布于胃小弯侧的胃黏膜细胞中^[4]。GKN2 基因

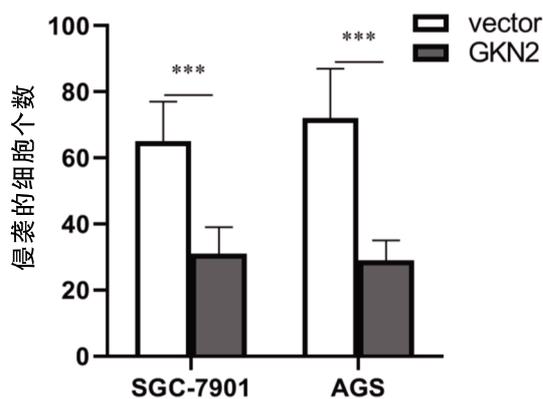
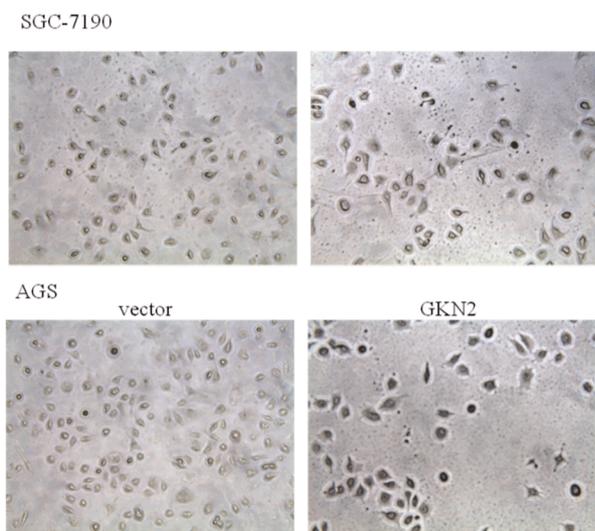


图4 胃癌细胞体外侵袭能力的比较

注:***代表与GKN2组相比有显著性差异(4%多聚甲醛固定,无染色)($P < 0.05$) (SGC-7910: GKN2比vector, $P = 0.021$; AGS: GKN2比vector, $P = 0.018$)

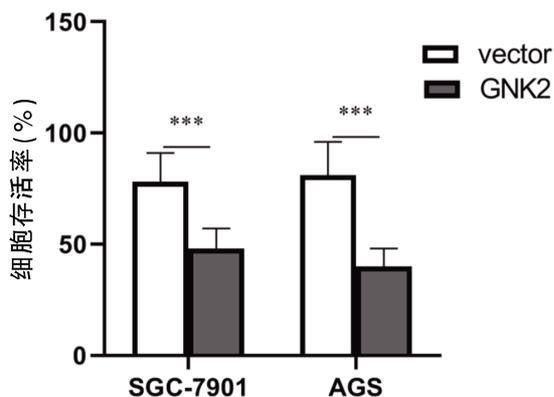


图5 胃癌细胞体外活性的比较

注:***代表与GKN2组相比有显著性差异($P < 0.05$) (SGC-7910: GKN2比vector, $P = 0.035$; AGS: GKN2比vector, $P = 0.027$)

最先由中国学者克隆,同时发现人GKN2基因与来自鼠的正常胃黏膜的一个大小为750 bp的基因部分同源,而且GKN2在人体胃癌组织中的表达相对于正常胃黏膜明显下降甚至缺失^[5]。GKNs是一种由胃黏液分泌细胞产生的胃特异性蛋白质分子,随黏液一起覆盖于胃黏膜层的表面,GKNs对维持胃黏膜的完整性和稳态起了至关重要的作用^[6]。很多研究表明GKNs可以作为治疗和诊断胃癌新的靶点^[7,8]。我们之前的研究已经表明胃癌患者样本中的GKN2表达下调^[7];为了进一步证实GKN2在胃癌发生发展中的关键作用,我们进一步通过GKN2过表达细胞株证实GKN2可以明显抑制胃癌细胞的黏附、侵袭和活性。

胃癌细胞黏附能力的增强为癌细胞侵袭和转移的重要因素,癌细胞从原发灶到新的部位形成新的瘤体,要经过与内皮细胞、内皮下基底膜和实质器官宿主细胞的黏附。癌细胞黏附有易变性,如癌细胞运动时,是黏附和去黏附不断交替来完成的。黏附性太强,可使癌细胞运动停止或变慢;若粘附性太弱,也不利于细胞转移和侵袭^[9]。癌细胞离开其原发灶组织而侵犯至邻近组织,并在该处继续繁殖生长,这个过程就是癌细胞的侵袭过程;包括癌细胞的原位运动和异位运动;侵袭是恶性肿瘤最重要的特征之一,也是影响患者预后的主要因素^[9]。癌细胞分裂周期失控,不受正常调控系统的控制,能持续的分裂与增殖;癌细胞失去定着依赖性,可以在琼脂、甲基纤维素等支撑物上生长;其活力显著高于正常细胞,这也是肿瘤难以治愈的原因之一^[9]。从GKN2对胃癌细胞生物行为学的影响可以推测,GKN2抑制胃癌发生发展的关键蛋白质分子,但其确切的机制有待进一步研究。

综上所述,体外实验证实GKN2对胃癌细胞的黏附、侵袭和活性都有明显的抑制作用,为在体实验的进一步研究提供了理论依据。

参考文献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA-Cancer J Clin, 2018, 68 (6):394-424.
- [2] DOKHAEE F, MAZHARI S, GALEHDARI M, et al. Evaluation of GKN1 and GKN2 gene expression as a biomarker of gastric cancer [J]. Gastroenterol Hepatol Bed Bench. 2018, 11(Suppl 1): S140.
- [3] 卫拴显,肖虹,郑绘霞,等. HER2/neu、HIF-1 α 与ki-67在

- 胃癌中的表达及临床意义[J/CD]. 消化与肿瘤杂志(电子版), 2019, 11(1):27-33.
- [4] ZHANG Z, XUE H, DONG Y, et al. GKN2 promotes oxidative stress-induced gastric cancer cell apoptosis via Hsc70 pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38:338.
- [5] 蔡志宏, 曹怡静, 刘娇, 等. 转染胃动力蛋白2基因抑制人胃癌细胞系 MKN28 增殖、迁移和侵袭[J]. *基础医学与临床*, 201, 38(3).
- [6] MOSS SF, LEE JW, SABO E, et al. Decreased Expression of Gastrokine 1 and the Trefoil Factor Interacting Protein TFIZ1/GKN2 in Gastric Cancer: Influence of Tumor Histology and Relationship to Prognosis [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(13): 4161-4167.
- [7] DAI J, ZHANG N, WANG JH, et al. Gastrokine -2 is downregulated in gastric cancer and its restoration suppresses gastric tumorigenesis and cancer metastasis [J]. *Tumor Biol*, 2014, 35(5):4199-4207.
- [8] MOSS SF, LEE JW, SABO E, et al. Decreased Expression of Gastrokine 1 and the Trefoil Factor Interacting Protein TFIZ1/GKN2 in Gastric Cancer: Influence of Tumor Histology and Relationship to Prognosis [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(13): 4161-7.
- [9] 孙中尚, 谢睿, 周传文, 等. 胃癌相关转录因子 11 与胃癌细胞恶性表型关系的探究[J/CD]. *消化肿瘤杂志(电子版)*, 2019, 11(3):249-256.