

肿瘤发病机制与治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000062

shRNA抑制高尔基体 α -甘露糖苷酶II基因的表达对胃癌细胞侵袭力的影响及机制

张璐¹, 杨雅莹¹, 黄子洋², 易永芬¹

(1. 重庆医科大学基础医学院病理学教研室、分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学附属第一医院老年科, 重庆 400016)

【摘要】目的:初步分析高尔基体 α -甘露糖苷酶II (Golgi α -mannosidase II, GM II) 在低中不同分化人胃癌细胞系中的差异表达, 以探讨 GM II 在胃癌发生发展中的作用。**方法:**应用阳离子脂质体法将合成的靶向 GM II 基因的 pGPU6/GFP/Neo-GM II-1406 质粒载体, 分别转染至低分化胃癌细胞 MGC-803 和中分化胃癌细胞 SGC-7901 中, 然后荧光倒置显微镜观察并计算转染率, 最后经过 G418 筛选出稳定转染的细胞株。应用 RT-PCR 和 Western blot 检测转染后 GM II 和 E-cadherin、 α -catenin 的 mRNA 及蛋白表达变化情况, 同时利用细胞划痕实验和 Transwell 体外侵袭实验来测定 GM II 被沉默后两株细胞侵袭能力的变化。**结果:**GM II 短发卡 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 转染胃癌 MGC-803 和 SGC-7901 细胞后 GM II 的 mRNA 和蛋白表达明显抑制, 而 E-cadherin 和 α -catenin 的 2 种因子检测结果明显升高 ($P < 0.05$); 细胞划痕实验结果显示, 转染重组质粒 pGPU6/GFP/Neo-GM II-1406 组 (GM II shRNA 组) 与对照组 (空白对照组, 阴性对照组) 相比, GM II 被沉默后的胃癌细胞的侵袭能力降低 ($P < 0.05$); Transwell 体外侵袭实验中 GM II shRNA 组胃癌细胞较空白对照组、阴性对照组细胞侵袭能力都明显降低, 18 h 穿过小室的细胞数分别为: (65 ± 5) 、 (197 ± 6) 、 (186 ± 5) 、 (72 ± 4) 、 (178 ± 4) 、 (184 ± 5) 个与对照组相比差别具有统计学意义 (MGC-803: $P = 0.000$, SGC-7901: $P = 0.000$)。**结论:**GM II 基因沉默后的胃癌细胞的侵袭能力下降, 可能与上调 E-cadherin、 α -catenin 的表达有关。

【关键词】高尔基体 α -甘露糖苷酶II; 短发卡 RNA; 胃癌; 侵袭**【中图分类号】**R735.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-03-28

Effect of Golgi α -mannosidase II expression inhibition by shRNA interference on invasive potential of human gastric cancer cell and its mechanism

Zhang Lu¹, Yang Yaying¹, Huang Ziyang², Yi Yongfen¹

(1. Teaching and Research Section of Pathology, College of Basic Medical Science, Molecular Medicine and Cancer Research Center, Chongqing Medical University; 2. Department of Geriatrics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To analyze the expression of Golgi α -mannosidase II (GM II) in different gastric cancer cell lines and to investigate the role of GM II in gastric cancer genesis. **Methods:** The pGPU6/GFP/Neo-GM II-1406 gene was transfected into MGC-803 and SGC-7901 cells using cationic liposome assay. Rates of transfected positive cells were observed and calculated under invert microscope. Gene and protein expression of GM II, E-cadherin and α -catenin were tested using RT-PCR and Western blot respectively. Invasive abilities of cancer cells were analyzed by cell scratch and Transwell assay. **Results:** Protein expression of GM II was significantly inhibited and expression of E-cadherin and α -catenin in MGC-803 and SGC-7901 cells was up-regulated compared with those of untransfected cells ($P < 0.05$). Cell scratch assay showed that the invasive abilities of cells transfected with GM II gene were weaker than those of control group cells ($P < 0.05$). Transwell invasive assay demonstrated that the invasive abilities of cells transfected with GM II gene were weaker than those of shNC groups. Numbers of Transwell cells were 65 ± 5 , 197 ± 6 , 186 ± 5 , 72 ± 4 , 178 ± 4 , 184 ± 5 in three groups during 18 h, with statistical differences ($P < 0.05$). **Conclusion:** GM II gene silencing contributes to decreased invasive ability of gastric cancer cell lines, which is involved with up-regulation of E-cadherin and α -catenin expression.

【Key words】Golgi α -mannosidase II; short hairpin RNA; gastric cancer; invasion

作者介绍: 张璐, Email: 158132285@qq.com,

研究方向: 消化道肿瘤病学。

通信作者: 易永芬, Email: yiyongfen1953@yahoo.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30672431); 重庆市自然科学基金资助项目 (编号: 2010BB5361); 教育部博士点基金资助项目 (编号: 20060631006)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000062.html>

胃癌作为全球第四大重要常见健康问题,第二大癌症死亡原因,其发病率和病死率正在以美国为首的西方发达国家中急剧下降。然而作为高居恶性肿瘤死亡榜首的胃癌在中国等东南亚国家这一情况却不容乐观^[1]。在真核生物生长发育中,蛋白质的 N-糖基化作为一种重要的翻译后的修饰过程更是必不可缺的。蛋白质这一结构的改变与恶性肿瘤生物学行为有着密切联系^[2-4]。在 N-聚糖加工过程中,高尔基体 α -甘露糖苷酶 II (Golgi α -mannosidase II, GM II) 不仅为关键性酶之一,并特意的剪切 GlcNAcMan5GlcNAc2 上 α -1,3 和 α -1,6 连接的甘露糖,当其被特异性抑制后,肿瘤细胞的生长和转移将明显降低,由此 GM II 可能成为癌症治疗的重要靶点之一^[5-7]。本研究运用质粒转染、RT-PCR、蛋白质印记法、细胞划痕实验和 Transwell 体外侵袭实验,靶向沉默低分化胃癌 MGC-803 细胞和中分化胃癌 SGC-7901 细胞的 GM II 后,与 E-cadherin、 α -catenin 的表达情况和侵袭能力的改变及其关系,初步探讨 GM II 和 E-cadherin、 α -catenin 在胃癌发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 pGPU6/GFP/Neo-GM II-1406 为前期筛选出抑制效果最好的质粒表达载体,Lipofectamine[®] 2000 Reagent 试剂购于 Promega 公司产品,RPMI1640 培养基干粉、胰蛋白酶购自美国 HyClone,Trizol、RT-PCR 试剂盒、DNA marker 购于 TakaRa 公司,蛋白裂解液、BCA 蛋白质定量试剂盒、蛋白 marker 购自碧云天生物技术公司,聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜购自鼎国公司,MAN2A1 (人 GM II 基因) 羊抗人多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,E-cadherin、 α -catenin 兔抗人抗体购于北京博奥森有限公司,兔抗人 β -actin 多抗、HRP 标记兔抗羊 IgG、辣根过氧化物酶 (horseradish

peroxidase, HRP) 标记羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术公司,化学发光试剂盒为 Bioworld 公司,RT-PCR 引物由上海生工合成。

1.1.2 细胞来源 低分化胃癌细胞系 MGC-803 为威斯滕生物技术中心提供,中分化胃癌细胞系 SGC-7901 为重庆医科大学基础医学院分子医学与肿瘤研究中心冻存。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 本实验 2 株细胞各自分为 3 组:①GM II shRNA 组;②空白对照组;③阴性对照组,每组设 3 个复孔。

1.2.2 脂质体介导转染法 转染实验参照 Lipofectamine[®] 2000 说明书,转染前 24 h 将胃癌细胞株 MGC-803 和 SGC-7901 以每孔 2×10^5 ml/L 的细胞密度接种于无菌 6 孔板内 37℃,5%CO₂ 的培养箱中培养 24 h,细胞融合度达 90%~95% 时开始分别转染入 GM II shRNA 组及阴性对照组细胞。在无菌 EP 管中准备以下两种溶液,A 液:4 μ g 的 DNA+无抗无血清 RPMI1640 培养基,共 250 μ l 混合液;B 液:10 μ l 脂质体+无抗无血清 RPMI1640 培养基,共 250 μ l 混合液;A 液+B 液混匀,室温孵育 25 min,在无抗无血清 RPMI1640 培养基清洗细胞 3 次后加入,并同时加入 2 ml 无抗无血清培养基,混匀。培养 6 h 后换为有抗胎牛血清,再培养 24 h。荧光显微镜观察其转染情况后加入 400 μ g/ml 浓度的 G418 进行筛选,2 周后,将形成阳性单克隆细胞株进行扩大培养。取出上述细胞铺片,于荧光显微镜下观察并计算转染率。公式:转染率 (%)=(绿色荧光的细胞数/白光下总细胞数)×100%。

1.2.3 RT-PCR 检测 GM II 沉默后胃癌细胞 GM II、E-cadherin 和 α -catenin 的 mRNA 表达 按 Trizol 试剂盒说明提取各组细胞的总 RNA。琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度仪测定 RNA 的质量、浓度及纯度。按 RT-PCR 试剂盒说明逆转录合成 cDNA,接着 RT-PCR 扩增反应,条件如下:第一步 94℃ 30 s,退火(表 1)30 s,72℃ 30 s,共 35 个循环;第二步 98℃ 10 s,68℃ 1 min,共 30 个循环。结束后取反应产物 5 μ l 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。采用 Quantity One 软件分析电泳条带的灰度值,以 β -actin 为参照,以各条带与内参的灰度值的比值表示 GM II mRNA、E-cadherin mRNA、 α -catenin mRNA 的相对含量。

1.2.4 Western blot 检测胃癌细胞 GM II、E-cadherin 和 α -catenin 蛋白的表达 转染 48 h 后,采用 RIPA 裂解液分别提

表 1 RT-PCR 实验中合成的引物序列及产物长度

Tab.1 Primer sequences for RT-PCR and product length

基因	引物序列	退火温度(℃)	产物长度(bp)
GM II	上游:5'-GTTTATTGTCGAAAGTCTCACACC-3'	58.0	126
	下游:5'-CACCTCAACTGGATTTCGG-3'		
E-cadherin	上游:5'-GGGTCTTGCTATGTTGCC-3'	57.3	132
	下游:5'-GTTGCTCTGCTTTTGG-3'		
α -catenin	上游:5'-GATGGACAACATGAGCCAGG-3'	58.0	182
	下游:5'-TATACCAGGCGGGAAGCATCG-3'		
β -actin	上游:5'-CCTTCTACAATGAGCTGCGT-3'	52.3	147
	下游:5'-CCTGGATAGCAACGTACATG-3'		

取 2 株细胞 GM II shRNA 组、空白对照组、阴性对照组各组的总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,蛋白样品和上样缓冲液以 4:1 混合,煮沸变性,经 SDS-PAGE 凝胶电泳后湿转到 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶封闭 1 h,分别加入一抗 GM II (1:500)、E-cadherin (1:500)、 α -catenin (1:500) 和 β -actin (1:1 000),4 °C 冰箱孵育过夜;HRP 标记二抗 (1:1 000) 37 °C 孵育 1 h,吐温 20/Tris-HCl 缓冲盐溶液洗脱 3 次,化学发光显影,采用 Quantity One 软件测定条带的吸光度值,以 β -actin 为参照,以各条带与内参的吸光度的比值表示 GM II、E-cadherin、 α -catenin 蛋白的相对含量。

1.2.5 细胞划痕实验 将 2 株细胞的 3 组细胞用胰酶消化成单细胞悬液,再将各自 3 组细胞分别接种于 6 孔培养板中,混匀后 37 °C,5%CO₂ 孵育箱中培养;待细胞融合至 90% 以后,用无菌 10 μ l 枪头垂直在培养孔板底面从上到下划出 5 条平行的宽度一致的“划痕”,并用无血清 RPMI1640 培养基洗掉划去细胞,换新鲜无血清的 RPMI1640 培养液培养 24 h 后,再转换成 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液培养 24 h,每组细胞设 3 个复孔;观察划痕区细胞侵袭情况并照相,以 48 h 前后划痕宽度差代表各组细胞的相对侵袭能力。

1.2.6 Transwell 体外侵袭实验 将孔径为 8.0 μ m 的 Transwell 小室放入无菌 24 孔板小孔中,用 50 mg/L Matrigel 和无抗无血清 RPMI1640 培养液按 1:5 比例配成的稀释液并包被 Transwell 小室底部膜的上室面,每孔加入 30 μ l 混合液,为防止气泡的产生紧贴小室底部加入,然后将 24 孔板放入 37 °C 孵育箱,5 h 使其成凝胶状。取对数生长的 GM II shRNA 组,空白对照组,阴性对照组的 MGC-803 和 SGC-7901 细胞用 0.25 % 胰蛋白酶消化液将其消化并制备成单细胞悬液,以每孔 200 μ l 细胞密度为 1×10^5 个/ml 接种到小室基底膜上,Transwell 双层共培养板 24 孔板内加入 500 μ l 含 10% 胎牛血清的培养液。放入培养箱 18 h 后,取出 Transwell 小室 PBS 洗 3 遍,4% 多聚甲醛固定 30 min,清洗 3 遍取出并用棉签擦去膜上内室面细胞,自然晾干后 0.1% 结晶紫染色 20 min,用清水洗 3 遍,最后在显微镜下观察细胞,计数上、下、左、右、中 5 个高倍镜视野细胞数并取均值,利用 Image-ProPlus 软件对数据结果进行分析。

1.3 统计学处理

实验结果采用统计学软件 SPSS 11.5 进行统计学处理,计量数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组数据间的比较行单因素方差分析,组间两两均数比较用 LSD-*t* 法,计数资料用百分比 (%) 表示,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 检测细胞内免疫荧光表达及转染效率

将 pGPU6/GFP/Neo-GM II -1406 重组质粒转入胃癌细胞 MGC-803 和 SGC-7901 细胞,48 h 后在荧光倒置显微镜观察细胞绿色荧光蛋白的表达并计算转染率,计算出平均转

染率低分化胃癌细胞株 MGC-803 达到约有 69% (图 1),中分化胃癌细胞株 SGC-7901 达到 64% (图 2)。

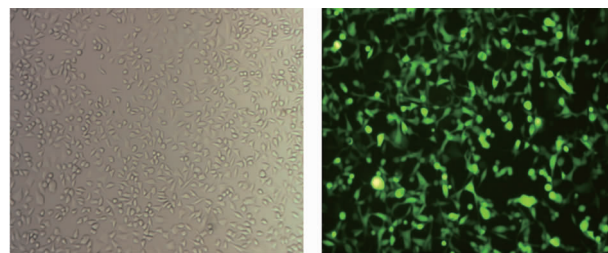


图 1 GM II 重组质粒转染胃癌 MGC-803 细胞 48 h 后转染率的观察 (100 $\times$)

Fig.1 Expression of GFP after GM II plasmid being transfected into gastric cancer cell MGC-803 at 48 h under inverted microscope (100 $\times$) and inverted fluorescence microscope (100 $\times$)

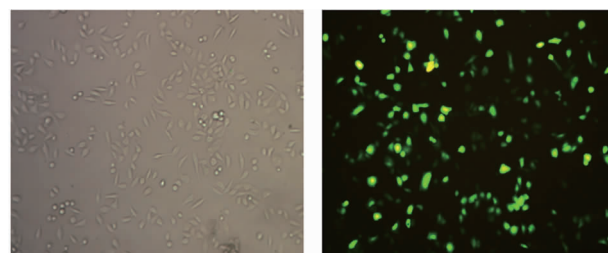


图 2 GM II 重组质粒转染胃癌 SGC-7901 细胞 48 h 后转染率的观察 (100 $\times$)

Fig.2 Expression of GFP after GM II plasmid being transfected into gastric cancer cell SGC-7901 at 48 h under inverted microscope (100 $\times$) and inverted fluorescence microscope (100 $\times$)

2.2 RT-PCR 检测 shRNA 抑制 GM II 后胃癌细胞 GM II、E-cadherin 和 α -catenin 的 mRNA 表达

采用 Quantity One 软件分析电泳条带的灰度值,以 β -actin 为参照,以各条带与内参的灰度值的比值表示 GM II mRNA、E-cadherin mRNA、 α -catenin mRNA 的相对含量。GM II 分别在低分化胃癌细胞 MGC-803 和中分化胃癌细胞 SGC-7901 的 GM II shRNA 组细胞中 mRNA 的表达都明显低于空白对照组,阴性对照组细胞 ($P<0.05$); 2 株细胞的 E-cadherin 和 α -catenin mRNA 的表达在 GM II shRNA 组细胞中明显高于空白对照组,阴性对照组 ($P<0.05$), 3 种因子 mRNA 其各自空白对照组与阴性对照组之间无统计学意义 ($P>0.05$) (图 3、图 4, 表 2、表 3)。

2.3 Western blot 检测 shRNA 抑制 GM II 后胃癌细胞 GM II、E-cadherin 和 α -catenin 蛋白的表达

用 Western blot 检测 2 株细胞各自 3 组细胞中 GM II、E-cadherin、 α -catenin 蛋白的表达,以各条带与内参 β -actin 的吸光度的比值表示蛋白的相对含量,各组 GM II 蛋白的表达即 GM II 与 β -actin 吸光度比值。GM II 分别在低分化胃癌

细胞 MGC-803 和中分化胃癌细胞 SGC-7901 的 GM II shRNA 组细胞中蛋白的表达都明显低于空白对照组,阴性对照组细胞($P<0.05$);2 株细胞的 E-cadherin 和 α -catenin 蛋白表达在 GM II shRNA 组细胞中明显高于空白对照组,阴性对照组($P<0.05$),3 种蛋白各自空白对照组与阴性对照组之间无统计学意义($P>0.05$)(图5、图 6,表 4、表 5)。

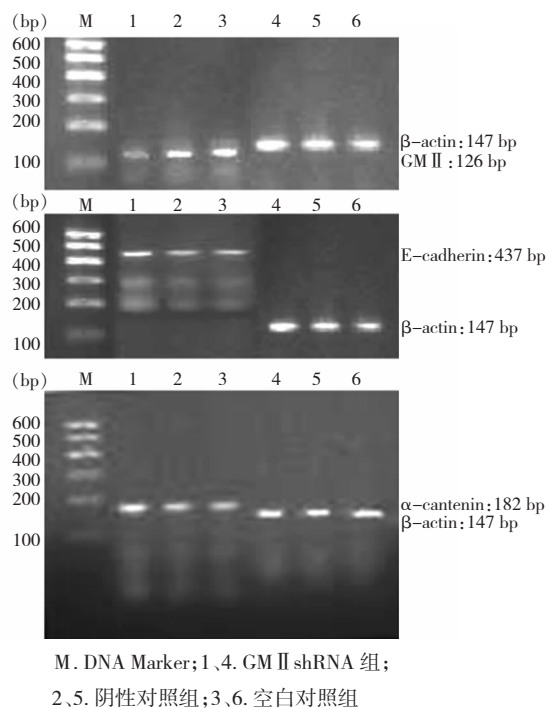


图 3 3 组 MGC-803 细胞中 GM II、E-cadherin、 α -catenin mRNA 表达情况

Fig.3 Expression of GM II, E-cadherin and α -catenin mRNA in three gastric cell lines from MGC-803 detected by RT-PCR

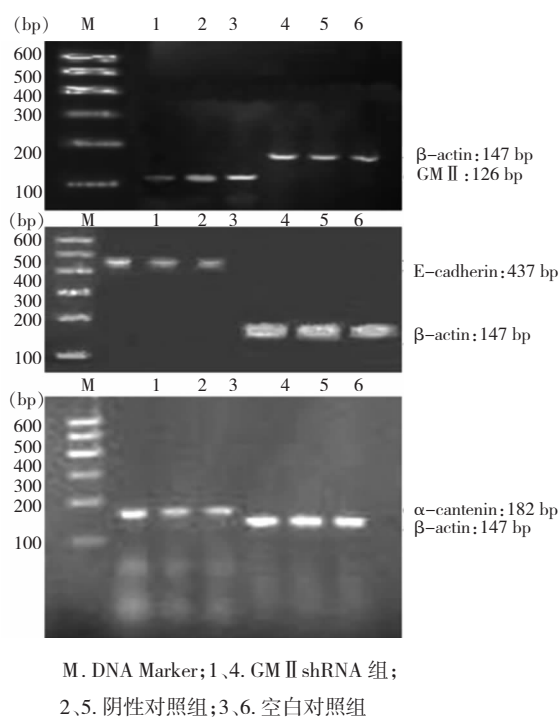


图 4 3 组 SGC-7901 细胞中 GM II、E-cadherin、 α -catenin mRNA 表达情况

Fig.4 Expression of GM II, E-cadherin and α -catenin mRNA in three gastric cell lines from SGC-7901 detected by RT-PCR

2.4 细胞划痕实验结果分析

48 h 后,细胞株 MGC-803 的 3 组细胞比较,差异有统计学意义($F=15.898, P=0.004$),两两比较 GM II shRNA 组细胞[(476.15 ± 131.54) μ m]明显低于空白对照组[(963.24 ± 127.73) μ m]($P=0.003$),同时明显低于阴性对照组[(984.05 ± 114.67) μ m]($P=0.002$)(图 7);细胞株 SGC-7901 的 3 组细胞比较差异

表 2 3 组 MGC-803 细胞中 GM II、E-cadherin、 α -catenin mRNA 表达情况($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Expression of GM II, E-cadherin and α -catenin mRNA in three gastric cell lines from MGC-803 detected by RT-PCR($\bar{x} \pm s$)

mRNA	GM II shRNA 组	空白对照组	阴性对照组	统计量值
GM II	0.377 ± 0.052	0.687 ± 0.012	0.618 ± 0.043	22.822
E-cadherin	0.797 ± 0.016	0.368 ± 0.037	0.364 ± 0.028	231.349
α -catenin	0.838 ± 0.024	0.421 ± 0.051	0.395 ± 0.013	134.418

GM II: 阴性对照组与 GM II shRNA 组和空白对照组($P=0.001, P=0.248$); E-cadherin: 阴性对照组与 GM II shRNA 组和空白对照组($P=0.000, P=0.868$); α -catenin: 阴性对照组与 GM II shRNA 组和空白对照组($P=0.000, P=0.424$)

表 3 3 组 SGC-7901 细胞中 GM II、E-cadherin、 α -catenin mRNA 表达情况($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Expression of GM II, E-cadherin and α -catenin mRNA in three gastric cell lines from SGC-7901 detected by RT-PCR($\bar{x} \pm s$)

mRNA	GM II shRNA 组	空白对照组	阴性对照组	统计量值
GM II	0.489 ± 0.023	0.832 ± 0.033	0.844 ± 0.042	109.077
E-cadherin	1.103 ± 0.009	0.655 ± 0.023	0.676 ± 0.045	256.487
α -catenin	1.033 ± 0.017	0.527 ± 0.021	0.497 ± 0.033	448.789

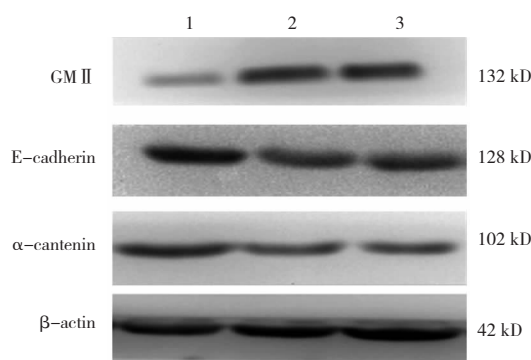
GM II: 阴性对照组与 GM II shRNA 组和空白对照组($P=0.000, P=0.676$); E-cadherin: 阴性对照组与 GM II shRNA 组和空白对照组($P=0.000, P=0.452$); α -catenin: 阴性对照组与 GM II shRNA 组和空白对照组($P=0.000, P=0.186$)

也有统计学意义($F=24.179, P=0.001$), 其两两比较 GM II shRNA 组细胞 $[(392.63 \pm 110.26)] \mu\text{m}$ 也明显低于空白对照组 $[(957.13 \pm 134.25)] \mu\text{m}$ ($P=0.001$) 和阴性对照组 $[(978.03 \pm 112.47)] \mu\text{m}$ ($P=0.001$) (图 8), 2 株细胞空白对照组和阴性对照组之间无统计学意义(MGC-803: $P=0.845$, SGC-7901: $P=0.839$), 表明分别转染干扰质粒载体的低、中分化胃癌细胞的 GM II 下调后, 划痕区运动能力都有所减弱。

2.5 细胞侵袭实验结果分析

18 h 后穿过小室的 MGC-803 细胞每个低倍视野细胞计

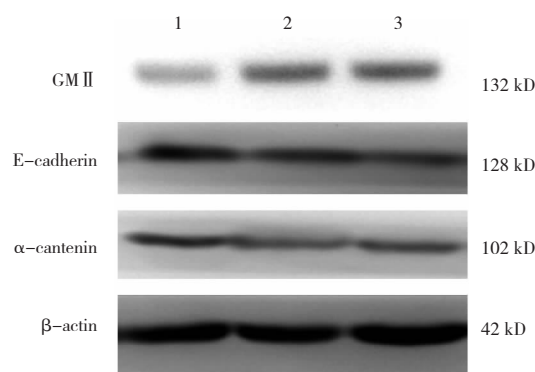
数 3 组比较差异有统计学意义($F=561.384, P=0.000$), 两两比较 GM II shRNA 组 $[(65 \pm 5)$ 个]明显低于空白对照组 $[(197 \pm 6)$ 个] ($P=0.000$) 和阴性对照组(shNC) $[(186 \pm 5)$ 个] ($P=0.000$); SGC-7901 细胞每个低倍视野细胞计数 3 组比较差异也具有统计学意义($F=626.737, P=0.000$), 两两比较 GM II shRNA 组 $[(72 \pm 4)$ 个]明显低于空白对照组 $[(178 \pm 4)$ 个] ($P=0.000$) 和阴性对照组 $[(184 \pm 5)$ 个] ($P=0.000$); 两细胞株各自空白对照组与阴性对照组相比, 差别无统计学意义(MGC-803: $P=0.216$, SGC-7901: $P=0.143$) (图 9、图 10)。



1. GM II shRNA 组; 2. 阴性对照组; 3. 空白对照组

图 5 3 组 MGC-803 细胞中 GM II、E-cadherin、 α -catenin 蛋白表达情况

Fig.5 GM II, E-cadherin and α -catenin protein expression in three gastric cell lines from MGC-803 detected by Western blot



1. GM II shRNA 组; 2. 阴性对照组; 3. 空白对照组

图 6 3 组 SGC-7901 细胞中 GM II、E-cadherin、 α -catenin 蛋白表达情况

Fig.6 GM II, E-cadherin and α -catenin protein expression in three gastric cell lines from SGC-7901 detected by Western blot

表 4 3 组 MGC-803 细胞中 GM II、E-cadherin、 α -catenin 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.4 GM II, E-cadherin and α -catenin protein expression in three gastric cell lines from MGC-803 detected by Western blot ($\bar{x} \pm s$)

蛋白	GM II shRNA 组	空白对照组	阴性对照组	统计量值
GM II	0.577 ± 0.012	1.307 ± 0.033	1.317 ± 0.018	1 041.040
E-cadherin	1.476 ± 0.016	0.825 ± 0.023	0.796 ± 0.025	943.662
α -catenin	1.698 ± 0.019	0.791 ± 0.041	0.825 ± 0.043	611.385

GM II: 阴性对照组与 GM II shRNA 组和空白对照组 ($P=0.000, P=0.610$); E-cadherin: 阴性对照组与 GM II shRNA 组和空白对照组 ($P=0.000, P=0.152$); α -catenin: 阴性对照组与 GM II shRNA 组和空白对照组 ($P=0.000, P=0.292$)

表 5 3 组 SGC-7901 细胞中 GM II、E-cadherin、 α -catenin 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.5 GM II, E-cadherin and α -catenin protein expression in three gastric cell lines from SGC-7901 detected by Western blot ($\bar{x} \pm s$)

蛋白	GM II shRNA 组	空白对照组	阴性对照组	统计量值
GM II	0.623 ± 0.009	1.241 ± 0.020	1.235 ± 0.015	1 282.814
E-cadherin	1.554 ± 0.024	0.669 ± 0.032	0.679 ± 0.027	1 114.597
α -catenin	1.392 ± 0.013	0.612 ± 0.039	0.622 ± 0.011	920.631

GM II: 阴性对照组与 GM II shRNA 组和空白对照组 ($P=0.000, P=0.856$); E-cadherin: 阴性对照组与 GM II shRNA 组和空白对照组 ($P=0.000, P=0.768$); α -catenin: 阴性对照组与 GM II shRNA 组和空白对照组 ($P=0.000, P=0.650$)

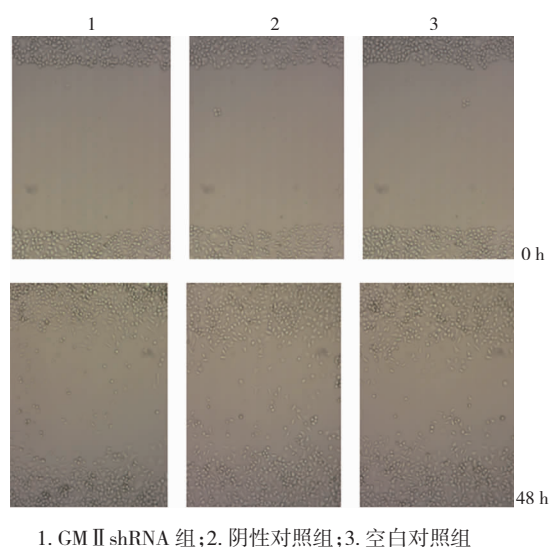


图 7 胃癌细胞 MGC-803 GM II 沉默后划痕实验细胞结果(100×)

Fig.7 Scratch test results after silencing of GM II in gastric cell line MGC-803(100×)

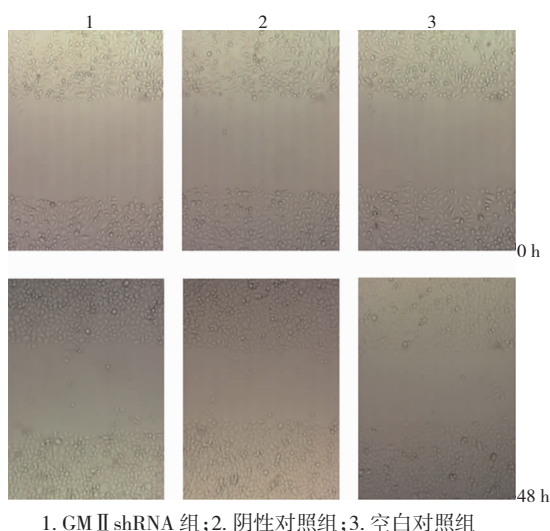


图 8 胃癌细胞 SGC-7901 GM II 沉默后划痕实验细胞结果 (100×)

Fig.8 Scratch test results after silencing of GM II in gastric cell line SGC-7901(100×)

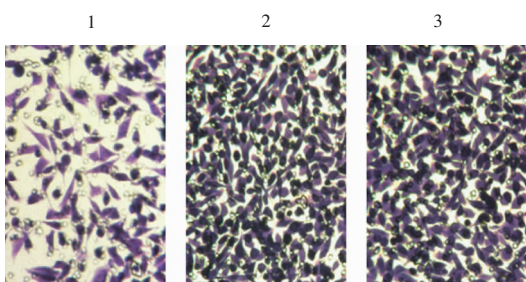
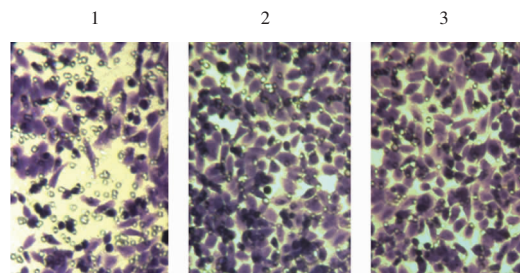


图 9 胃癌细胞 MGC-803 GM II 沉默后侵袭运动变化结果(200×)

Fig.9 Invasive movement results after silencing of GM II in gastric cell line MGC-803(200×)



1. GM II shRNA 组;2. 阴性对照组;3. 空白对照组

图 10 胃癌细胞 SGC-7901 GM II 沉默后侵袭运动变化结果 (200×)

Fig.10 Invasive movement results after silencing of GM II in gastric cell line SGC-7901(200×)

3 讨 论

高尔基体作为一种重要细胞器普遍分布于真核细胞内质网与细胞膜之间并贯穿细胞质,其功能复杂,除了参与蛋白质加工外,最新研究表明,它还能参与细胞分化及细胞间信号传导,其功能障碍也许和肿瘤的发生发展有某种内在联系^[8]。作为细胞内物质运输的交通枢纽体其在癌细胞中功能旺盛,不仅能分泌基质金属蛋白酶、uPA、组织蛋白酶等多种水解酶,其基质蛋白可以活化 Ste20 激酶 YSK1 从而促进细胞侵袭和转移^[9]。癌细胞利用糖蛋白借助其糖链所携带的多种多样生物识别信息,实现改变细胞与周围环境的联系,从而影响细胞的活动(如存活或凋亡、增殖与分化、迁移与侵袭等)^[10]。因此,细胞表面糖蛋白的改变与肿瘤的生物行为如恶性转化、转移与浸润等密切相关^[11]。

GM II 是蛋白质 N-糖基化修饰中关键性糖苷,它通过剪切 N-聚糖链甘露糖残基而在聚糖从甘露糖型转化成复杂型结构中起重要作用。它含有糖水解酶家族的保守序列,由此能特异性的剪切 GlcNAcMan5GlcNAc2 上 α -1,3 和 α -1,6 连接的甘露糖残基,形成以 GlcNAcMan3GlcNAc2 为核心的糖基结构,这一结构是进一步增加 N-乙酰葡萄糖胺单元的基本前提^[12-14]。在对晚期癌症病人的初步临床试验中,给病人口服苦马豆素后,对肿瘤的生长和转移有明显抑制作用。在关于抗肿瘤作用机制的研究中,比较公认的就是苦马豆素能使 GM II 受到抑制,引起癌细胞表面低聚糖结构发生变化,从而改变特殊膜糖蛋白的表达^[15-16]。故本实验将应用阳离

子脂质体法靶向沉默低分化胃癌细胞 MGC-803 和中分化胃癌细胞 SGC-7901 的 GM II 基因,同时运用 RT-PCR 和 Western blot 检测 2 株细胞各组中的 GM II 表达,结果显示,各组细胞各自的 GM II shRNA 组的 GM II 含量明显低于其自己的空白对照组和阴性对照组,说明靶向沉默 GM II 成功,接着体外培养细胞做细胞划痕实验与 Transwell 体外侵袭实验,均显示胃癌细胞侵袭能力下降,这说明 GM II 在胃癌的侵袭活动中扮演着重要角色。

E-cadherin 参与形成和维护正常细胞间的连接,是细胞黏附分子中的一种主要介导细胞间同质黏附依赖性的钙依赖性跨膜糖蛋白,能调节细胞与细胞之间、细胞与基质之间的黏附反应,维持组织结构形态和完整性,同时维持细胞极性和参与分化的调节,几乎存在于所有正常上皮细胞,是一种癌侵袭转移抑制因子。其阳性表达具有抑制肿瘤转移的功能^[17-18],但当 E-cadherin 在病理状态下表达下降或者缺失后,细胞间的相互黏附减弱或者消失,致使细胞分散并向外周浸润性生长。近年来通过在对甲状腺癌、乳腺癌、膀胱癌、前列腺癌及大肠癌等肿瘤的研究中证实,E-cadherin 的表达降低与癌症的分化程度、浸润深度及转移特性明显相关^[19-21]。本研究利用 RT-PCR 和 Western blot 检测靶向沉默 GM II 后的胃癌细胞低分化株 MGC-803 和中分化株 SGC-7901 的 E-cadherin mRNA 和蛋白含量,其各自 GM II shRNA 组的 E-cadherin 的 mRNA 和蛋白含量明显高于各自空白对照组和阴性对照组,各组间差异具有统计学意义,这一结果与岳玮等^[22]的抑制 6A8 α -甘露糖苷酶(人 α -甘露糖苷酶之一)后 E-cadherin 的表达明显增强同时鼻咽癌细胞的转移能力降低的研究结果一致。提示 GM II 促进胃癌浸润转移可能是通过下调 E-cadherin 的表达而得以实现。

肿瘤转移抑制基因 α -catenin 是连环蛋白族(α -cat、 β -cat、 γ -cat、p120ctn)中的一员,在多种组织中均有表达,与纽带蛋白同源,是 E-cadherin 连接细胞骨架的必需成分。 α -catenin 一端与 β -catenin 结合,另一端与肌动蛋白细胞骨架结合,将由 E-cadherin 传送来的信号传导到细胞骨架上从而发挥作用。E-cadherin 的作用高度依赖于 α -catenin 的功能及活力, α -catenin 的异常改变可导致 E-cadherin 与肌动蛋白丝的连接受到破坏,细胞在正常的 E-

cadherin 表达时仍不能相互黏附,从而无法阻止肿瘤细胞脱离原发灶向其他部位转移^[23-26]。本研究课题组在前期通过免疫组化实验初步表明 GM II 与胃癌的侵袭和转移有相关性^[27],为进一步证实这一相关性,应用 RNA 干扰技术构建 GM II shRNA 质粒载体和阴性对照载体,并筛选出抑制效果最好的 pGPU6/GFP/Neo-GM II-1406,本实验中将其成功转入胃癌细胞低分化株 MGC-803 和中分化株 SGC-7901,用 RT-PCR 和 Western blot 检测 GM II 的 mRNA 和蛋白表达,靶向沉默后下调了胃癌细胞 GM II 的 mRNA 和蛋白表达水平。同时检测侵袭转移相关因子 E-cadherin 和 α -catenin 的 mRNA 和蛋白表达情况,结果显示 2 株细胞的 GM II shRNA 组与空白对照组和阴性对照组对比,两因子的 mRNA 和蛋白表达都有所升高。接着应用细胞划痕实验和 Transwell 体外侵袭实验来检测 GM II 沉默后胃癌细胞的侵袭能力变化,结果显示不同分化胃癌细胞的 GM II shRNA 组侵袭能力都有所减弱。本实验所有结果显示 GM II 沉默后胃癌细胞的侵袭能力减弱,可能是通过上调 E-cadherin、 α -catenin 的表达而实现的,这与陈双玲等^[28]在鼻咽癌细胞的研究结果具有一致性,其提示 GM II 可能通过细胞表面黏附分子的改变(下调 E-cadherin 和 α -catenin 的表达)这一途径促进胃癌的侵袭转移,具体通路机制有待进一步研究。

综上所述,GM II shRNA 转染入胃癌细胞低分化株 MGC-803 和中分化株 SGC-7901 后能明显抑制其细胞的侵袭活动能力,综合前期研究结果笔者认为 GM II 是一个促癌基因,它很有可能是通过下调 E-cadherin 和 α -catenin 的表达从而改变细胞生理状态,实现增强胃癌细胞的侵袭能力,由此 GM II 可能成为胃癌治疗、预后的新一代亚细胞生物学靶点。

参 考 文 献

- [1] Krejs GJ. Gastric cancer: epidemiology and risk factors[J]. Dig Dis, 2010, 28(4-5): 600-603.
- [2] Pinho SS, Osório H, Nita-Lazar M, et al. Role of E-cadherin N-glycosylation profile in a mammary tumor model[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 379(4): 1091-1096.
- [3] Santos IC, Silbiger VN, Higuchi DA, et al. Angiostatic activity of human plasminogen fragments is highly dependent on glycosylation[J]. Cancer Sci, 2010, 101(2): 453-459.
- [4] Karya Y, Kawamura C, Tabei T, et al. Bisecting G1cNAc residues on

- laminin-332 down-regulates galectin-3 dependant keratinocyte motility [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(5): 3330-3340.
- [5] Rose DR. Structure, mechanism and inhibition of Golgi α -mannosidase II [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2012, 22(5): 558-562.
- [6] Petersen L, Ardèvol A, Rovira C, et al. Molecular mechanism of the glycosylation step catalyzed by Golgi α -mannosidase II: a QM/MM metadynamics investigation [J]. *J American Chem Soc*, 2010, 132(24): 8291-8300.
- [7] Fiaux H, Kuntz DA, Hoffman D, et al. Functionalized pyrrolidine inhibitors of human type II α -mannosidases as anti-cancer agents: optimizing the fit to the active site [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(15): 7337-7346.
- [8] Rabouille C, Jokitalo E. Golgi apparatus partitioning during cell division [J]. *Mol Memb Biol*, 2003, 20(2): 117-127.
- [9] Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(17): 2123-2133.
- [10] Lau KS, Partridge EA, Grigorian A, et al. Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation [J]. *Cell*, 2007, 129(1): 123-134.
- [11] Varki A, Freeze HH. Glycans in acquired human diseases [M]// Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al. 2nd ed. *Essentials of Glycobiology* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009, 537-551.
- [12] Shah N, Kuntz DA, Rose DR. Golgi α -mannosidase II cleaves two sugars sequentially in the same catalytic site [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(28): 9570-9575.
- [13] Crispin M, Chang VT, Harvey DJ, et al. A human embryonic kidney 293T cell line mutated at the Golgi α -mannosidase II locus [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(32): 21684-21695.
- [14] Sun JY, Yang H, Miao S, et al. Suppressive effects of swainsonine on C6 glioma cell in vitro [J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(11): 1070-1074.
- [15] Kuntz DA, Nakayama S, Shea K, et al. Structural investigation of the binding of 5-substituted swainsonine analogues to Golgi α -mannosidase II [J]. *Chem Bio Chem*, 2010, 11(5): 673-680.
- [16] van den Elsen JM, Kuntz DA, Rose DR. Structure of Golgi α -mannosidase II: a target for inhibition of growth and metastasis of cancer cells [J]. *The EMBO Journal*, 2001, 20(12): 3008-3017.
- [17] Lazăr D, Tüban S, Aresleanu C, et al. The immunohistochemical expression of E-cadherin in gastric cancer; correlations with clinicopathological factors and patients' survival [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2008, 49(4): 459-467.
- [18] 高 钧, 孙 燕, 孙保存, 等. NGAL MMP-9 和 E-cadherin 在结肠癌中的表达及其与预后的关系 [J]. *中国肿瘤临床*, 2011, 38(6): 324-327.
- [19] 卢玉娟, 罗 祎, 易永芬, 等. 高尔基体 α -甘露糖苷酶 II、E-cadherin 和 α -catenin 在卵巢上皮肿瘤组织和不同转移能力的卵巢癌细胞中的表达 [J]. *肿瘤*, 2012, 11(11): 899-906.
- [20] Bourboulia D, Han H, Jensen-Taubman S, et al. TIMP-2 modulates cancer cell transcriptional profile and enhances E-cadherin/beta-catenin complex expression in A549 lung cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2013, 4(1): 166-176.
- [21] Lin YC, Wu MY, Li DR, et al. Prognostic and clinicopathological features of E-cadherin, α -catenin, β -catenin, γ -catenin and cyclin D1 expression in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(22): 3235-3239.
- [22] 岳 玮, 刘 音, 朱立平, 等. 6A8 α -甘露糖苷酶表达抑制致人鼻咽癌细胞 CNE-2L2 与层粘连蛋白粘附减弱及片状伪足减少 [J]. *中国医学科学院学报*, 2003, 25(3): 316-319.
- [23] Shimoyama Y, Nagafuchi A, Fujita S, et al. Cadherin dysfunction in a human cancer cell line: possible involvement of loss of α -catenin expression in reduced cell-cell adhesiveness [J]. *Cancer Res*, 1992, 52(20): 5770-5774.
- [24] Yonemura S, Wada Y, Watanabe T, et al. α -Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development [J]. *Nature Cell Biology*, 2010, 12(6): 533-542.
- [25] Thomas WA, Boscher C, Chu Y, et al. α -Catenin and vinculin cooperate to promote high E-cadherin-based adhesion strength [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(7): 4957-4969.
- [26] Kostyak JC, Naik MU, Naik UP. Calcium- and integrin-binding protein 1 regulates megakaryocyte ploidy, adhesion, and migration [J]. *Blood*, 119(3): 838-846.
- [27] 杨雅莹, 李艳青, 易永芬. 高尔基体 α -甘露糖苷酶 II 在胃癌中的表达及其与 E-cadherin、Galectin-3 的关系 [J]. *重庆医科大学学报*, 2010, 35(9): 1313-1317.
- [28] 陈双玲, 时 岩, 靳玉兰, 等. 6A8 α -甘露糖苷酶表达减弱和表达正常鼻咽癌细胞间的差异基因表达 [J]. *中国医学科学院学报*, 2005, 27(3): 305-310.

(责任编辑: 关蕴良)