

· 临床研究 ·

SOX7 对胃癌 MKN45 细胞株体外迁移侵袭的影响

宋隆明

(重庆市合川区中西医结合医院外科 401520)

摘要:目的 探讨转录调节因子 SOX7 对人胃癌 MKN45 细胞株体外迁移侵袭能力的影响。方法 以人胃癌 MKN45 细胞株作为研究对象,用脂质体介导转染 pIRES2-EGFP-SOX7 重组质粒并建立稳定过表达 SOX7 的 MKN45 细胞株,用 Real-time PCR 和 Western blot 验证 SOX7 过表达的情况,并检测转染前后 MKN45 细胞增殖和侵袭能力的变化,并用 Western blot 检测 Wnt/ β -catenin 信号通路下游关键因子 MMP-9 的表达情况。结果 Real-time PCR 和 Western blot 证实转染后的 MKN45 细胞 SOX7 表达明显上调,转染组较对照组增殖和侵袭能力明显下降,且 Wnt/ β -catenin 信号通路下游关键因子 MMP-9 表达明显下调。结论 SOX7 在体外可以有效抑制人胃癌 MKN45 细胞株的增殖和侵袭,其机制可能是通过负性调控 Wnt/ β -catenin 信号通路引起的。

关键词:胃癌;SOX7;MKN45;Wnt/ β -catenin;侵袭转移

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.24.018

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)24-2504-02

SOX7 inhibits migration and invasion of MKN45 cells in vitro

Song Longming

(Combine Traditional Chinese and Western Medicine Hospital of Hechuan Region, Chongqing 401520, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of SOX7 on migration and invasion of MKN45 cells in vitro. **Methods** SOX7 overexpression in MKN45 cells by using pIRES2-EGFP-SOX7 plasmids. Real-time PCR and Western-blot were performed to detect the mRNA level and protein level of SOX7 in MKN45 with or without SOX7 overexpression. Proliferation and invasion assay were performed to examine the changes between MKN45 cells with SOX7 expression and control. Western-blot was performed to detect the change of MMP-9 expression between MKN45 cells with SOX7 expression and control. **Results** SOX7 was significantly upregulated in MKN45 after transfected. Proliferation and invasion were significantly decreased in MKN45 cells with SOX7 expression compared with control. The expression of MMP-9 was significantly decreased in MKN45 cells with SOX7 expression compared with control. **Conclusion** SOX7 could inhibit proliferation and invasion of MKN45 cells in vitro through blocking Wnt/ β -catenin.

Key words: gastric cancer; SOX7; MKN45; Wnt/ β -catenin; invasion

胃癌是常见的消化道恶性肿瘤,在世界范围内其发病率和致死率均排在所有恶性肿瘤的第 4 位^[1]。在中国,其发病率和死亡率高居所有恶性肿瘤的首位。目前,胃癌发生、发展的机制尚不清楚,其诊断和治疗仍是医学界悬而未决的难题。从分子生物学的角度来探讨这些问题将是未来解决胃癌治疗难题的重要手段。SOX7 是近期发现的 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键的负性调控因子,SOX 基因根据 HMG 盒基因序列的同源性分为 10 个亚组,SOX7 是 SOX 家族 F 亚组的成员之一,它可以和 β -catenin 竞争 TCF/LEF(T cell factor/lymphoid enhancer factor)上的结合位点,从而抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活^[2]。已有报道,SOX7 在一些恶性肿瘤中低表达,如乳腺癌、肝癌、前列腺癌和结肠癌,且和这些肿瘤的进展有明显的相关性^[3-4];作者在前期的研究中已经发现 SOX7 在胃癌组织中低表达,且其表达水平与胃癌病灶的大小、淋巴结转移和临床分期有关。为了进一步验证 SOX7 抑制胃癌进展的作用,作者通过在 MKN45 胃癌细胞中外源性的过表达 SOX7,观察细胞增殖和侵袭能力的改变,并检测与肿瘤转移相关的 Wnt/ β -catenin 信号通路下游靶蛋白 MMP-9 的表达情况,初步探讨其分子机制。

1 材料与方

1.1 细胞培养 人类低分化胃癌细胞株 MKN45 购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,在含 10% 胎牛血清(四季青生物工程有限公司)的 RPMI-1640 培养基(Hyclone 公司)中,37℃、5% CO₂ 条件下培养。倒置相差显微镜下观察细胞

生长情况,1~2 d 换液,生长至 80% 覆盖率时用胰酶消化传代。

1.2 质粒转染及稳定表达 SOX7 细胞株建立 从 GeneBank 中调取 SOX7 的 CDS 区碱基序列(NM_031439),委托北京基诺生物有限公司合成 pIRES2-EGFP-SOX7 重组质粒和 pIRES2-EGFP 质粒。将对数期生长的 MKN45 细胞接种至 6 孔板中,待细胞长至 50% 融合时,每孔按质粒和脂质体体积比 1:2.5 加 1 mL 无血清培养基进行转染,培养 8 h 后,更换为普通培养基。24 h 后荧光显微镜观察转染效率,并加入终浓度 400 μ g/mL 的 G418(Sigma 公司)进行筛选,2 周后挑选发绿色荧光的单克隆进行扩大培养,培养基中加入 200 μ g/mL 的 G418 维持。相同的方法用 pIRES2-EGFP 质粒转染细胞作为对照组。

1.3 Real-time PCR 检测 取对数生长期的细胞,待其生长至 80% 融合后,用 Trizol 法提取总 RNA,用紫外分光光度计在 260、280 nm 处测吸光度值,计算 RNA 含量和纯度。按 cDNA 反转录酶试剂盒(TaKaRa 公司)说明书进行操作,取 2 μ g RNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。SOX7 上游引物序列为 5'-CAA GAT GCT GGG AAA GTC GT-3',下游引物序列为 5'-CCG GTA CTT GTA GTT GGG GTA GT-3',产物长度 118 bp;内参 GAPDH 上游引物序列为 5'-AGC CTC AAG ATC ATC AGC AAT G-3',内参 GAPDH 下游引物 5'-TGT GGT CAT GAG TCC TTC CAC G-3'。反应体系:

总体积 20 μ L, 其中 cDNA 1.5 μ L, 上、下游分别 1 μ L, SYBR mix 10 μ L (TaKaRa 公司), 灭酶水 6.5 μ L。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 采集荧光, 获取溶解曲线。以 GAPDH 为内参, 使用 2- $\Delta\Delta$ C_t 方法进行分析。

1.4 Western blot 检测 取对数生长期的细胞, 待其生长至 80% 融合后, 使用 RIPA 强效裂解液 (碧云天公司) 提取总蛋白, 用 BCA 蛋白定量试剂盒 (碧云天公司) 进行定量, 根据分子量配置 10% SDS-PAGE 胶, 上样量 100 μ g, 40 V 恒压电泳, 待溴酚蓝离开浓缩胶后, 恒压 80 V 电泳至溴酚蓝到玻璃板底部终止, 恒流 250 mA 将蛋白转印至 PVDF 膜上, 脱脂奶粉封闭 1 h, SOX7 一抗 1:100 (Santa Cruz 公司), MMP-9 一抗 1:100 (博奥森公司) 或 GAPDH 一抗 1:1000 (碧云天公司) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 90 min, 洗膜 3 次, 每次 10 min; ECL 化学发光试剂盒显影 (碧云天公司)。用 Quantity One 4.6.2 软件对条带灰度值进行分析。

1.5 细胞增殖率检测 用 MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒 (碧云天公司) 检测各组细胞的增殖率, 操作按照试剂盒说明进行。

1.6 细胞侵袭检测 将各组细胞按 1×10^5 种于底部铺有 Matrigel 胶 (BD 公司) 的 Millicell 小室中 (Millipore 公司), 小室内加入含 1% 胎牛血清的培养基并将之放于 24 孔板上, 24 孔板内加入含 10% 胎牛血清的培养基作为诱导, 培养 24 h 后用棉签去除小室底部的胶和未穿透的细胞, 用 4% 的多聚甲醛固定小室外穿透的细胞, 吉姆萨进行染色, 取随机 5 个 100 倍视野计数穿透细胞进行分析。

2 结 果

2.1 SOX7 过表达的 MKN45 细胞稳定株建立 pIRES2-EGFP-SOX7 和 pIRES2-EGFP 转染细胞后, 经 G418 筛选后的稳定株均显现绿色荧光 (图 1A)。转染 SOX7 质粒组的 SOX7 mRNA 和蛋白水平明显高于转染空白质粒组和亲代 MKN45 细胞组 (图 1B)。

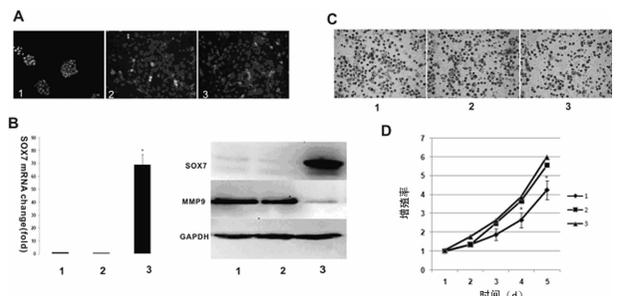


图 1 SOX 过表达的 MKN45 细胞株的建立、增殖及 MMP-9 蛋白表达

2.2 SOX7 过表达抑制 MKN45 细胞增殖和侵袭能力 转染 SOX7 质粒组的侵袭能力明显低于转染空白质粒组和亲代 MKN45 细胞组 ($P < 0.05$), 见图 1C。转染 SOX7 质粒组 (60 ± 9) 的增殖能力明显低于转染空白质粒组 (122 ± 17) 和亲代 MKN45 细胞组 (137 ± 24), $P < 0.05$, 见图 1D。

2.3 SOX7 过表达下调 MMP-9 表达 转染 SOX7 质粒组的 MMP-9 蛋白表达明显低于转染空白质粒组和亲代 MKN45 细胞组 ($P < 0.05$), 见图 1B。

3 讨 论

Wnt/ β -catenin 信号通路是一种对细胞增殖和分化具有重要调节作用的信号传导系统。越来越多的研究证明 Wnt/ β -catenin 信号通路在肿瘤发生、发展中也同样发挥了重要作用^[5]。 β -catenin 是 Wnt/ β -catenin 信号通路中关键性因子, 它进入细胞核后, 能与 TCF/LEF 结合, 激活其下游的与肿瘤转移和发生有关的靶基因, 如 CD44^[6]、MMP-9^[7] 及 C-MYC^[8] 等, 从而促进肿瘤的进展。SOX7 是近期发现的 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键负性调控因子, 它可以和 β -catenin 竞争 TCF 上的结合位点, 从而抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活。而且, SOX7 在胞浆中还可以通过促进 β -catenin-AXIN1-GSK3 β -APC 复合体的形成, 促进 β -catenin 的磷酸化降解, 阻止 β -catenin 进入胞核发挥作用^[9]。

在前期的研究中, 作者已经发现 SOX7 在胃癌组织中低表达, 且其表达水平与胃癌的大小, 淋巴结转移和临床分期有关。为了进一步验证 SOX7 抑制胃癌进展的作用, 作者通过在 MKN45 胃癌细胞中外源性的过表达 SOX7, 观察细胞增殖和侵袭能力的改变, 结果发现 SOX7 过表达可以降低 MKN45 细胞的增殖和侵袭能力, 这与之前在结肠癌中的研究结果类似^[10], 作者推测其可能的机制与 SOX7 负性调控 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。为了验证这一假设, 作者检测了过表达 SOX7 前后 MKN45 中与肿瘤转移相关的 Wnt/ β -catenin 信号通路下游靶蛋白 MMP-9 的表达情况, MMP-9 是肿瘤转移过程中的一个重要蛋白, 它可以降解细胞外基质, 为癌细胞的游走转移提供必要的通道^[11]。实验结果提示过表达 SOX7 后 MMP-9 的表达是明显下调的, 因此, 作者认为在胃癌 MKN45 细胞中, 过表达 SOX7 可以通过和 β -catenin 竞争 TCF/LEF 结合位点, 阻止 β -catenin-TCF/LEF 复合体的形成, 继而抑制下游靶蛋白而发挥作用。此外, 过表达 SOX7 可以增加胞浆中游离 SOX7 蛋白的水平, SOX7 在胞浆中可以促进 β -catenin-AXIN1-GSK3 β -APC 复合体的形成, 增加 β -catenin 的磷酸化降解。Wnt/ β -catenin 信号通路下游还有许多与上皮细胞间质转化及肿瘤干细胞相关的因子^[12], 如重要的间质标志物 VIM-ENTIN^[13], 它已经被证明是 Wnt/ β -catenin 信号通路下游的靶点, 因此, SOX7 对于抑制 EMT 可能也有重要的作用, 也可能是 SOX7 发挥抑癌作用的潜在机制。此外, 有研究发现, SOX7 和 SOX18 在斑马鱼发育过程中调节其血管生成^[14], 但是目前尚无 SOX7 对于肿瘤血管生成调控的研究, 肿瘤血管生成是肿瘤进展的必要条件, 探讨 SOX7 对于肿瘤血管生成的作用对于肿瘤发生、发展的研究可能有潜在的意义。

综上所述, 作者在胃癌组织中发现 SOX7 可能是胃癌进展的一个重要抑制因子, 随后在体外研究中进一步证实了这一现象, 并初步探讨了可能的机制。研究发现, SOX7 不仅可以抑制胃癌细胞的增殖, 促进胃癌细胞的转移, 并且可能对于胃癌细胞的凋亡、耐药和血管生成有一定的调控作用。在下一步的研究中作者将在检测更多的 Wnt/ β -catenin (下转第 2509 页)

室重塑的发生有关,抗 IL-17 治疗可能成为心脏重塑治疗的潜在策略和新的靶点,进一步研究 IL-17 的作用可能会发现心室重塑新的发生机制,从而为 MI 后心室重塑的预防和治疗带来新的视角和方法。

参考文献:

- [1] Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al. IL-23 drives apathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation[J]. *J Exp Med*, 2005, 201(10): 233-240.
- [2] Feng WW, Li WM, Liu W, et al. IL-17 induces myocardial fibrosis and enhances RANKL/OPG and MMP/TIMP signaling in isoproterenol-induced heart failure[J]. *Exp Mol Pathol*, 2009, 87(3): 212-218.
- [3] Zaba LC, Cardinale I, Gilleaudeau P, et al. Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses[J]. *J Exp Med*, 2007, 204(13): 3183-3194.
- [4] Hyung WL, Lee J, Peter H, et al. Human Th17 cells share major trafficking receptors with both polarized effector T cells and FOXP3+ regulatory T cells[J]. *Immunol*, 2008, 180: 122-129.
- [5] Dolores MC, Feldman MD, Srinivas M, et al. IL-17 stimulates MMP-1 expression in primary human cardiac fibroblasts via p38 MAPK- and ERK1/2-dependent C/EBP- β , NF-KB, and AP-1 activation[J]. *Am J Physiol Heart Circ*

Physiol, 2007, 293(6): H3356-H3365.

- [6] Liu W, Feng W, Wang F. Osteoprotegerin/RANK/RANKL axis in cardiac remodeling due to immuno-inflammatory myocardial disease[J]. *Exp Mol Pathol*, 2008, 84(3): 213-217.
- [7] Kaliyamurthi V, Srinivas M, Dolores M. Resveratrol inhibits high glucose-induced PI3K/Akt/ERK-dependent interleukin-17 expression in primary mouse cardiac fibroblasts[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294(5): H2078-H2087.
- [8] Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, et al. Transforming growth factor beta induces development of the T (H) 17 lineage[J]. *Nature*, 2007, 441(4): 231-234.
- [9] McAllister FA, Henry JL, Kreindler PJ, et al. Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene-alpha and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium; implications for airway inflammation in cystic fibrosis[J]. *Immunol*, 2005, 175(1): 404-412.
- [10] Komiyama YS, Nakae T, Matsuki A, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmunity encephalomyelitis[J]. *Immunol*, 2006, 177(1): 566-573.

(收稿日期: 2011-12-08 修回日期: 2012-02-22)

(上接第 2505 页)

信号通路下游靶蛋白(如 CD44、C-MYC、VIMENTIN)的同时,横向的探讨 SOX7 对胃癌细胞凋亡、耐药性和血管生成的作用,并且纵向的对 SOX7 和 TCF/LEF 的关系进行深入探讨,本研究可能为胃癌的诊断和治疗提供一个新的靶点。

参考文献:

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55(2): 74-108.
- [2] Khan NP, Pandith AA, Hussain MU, et al. Novelty of Axin 2 and lack of Axin 1 gene mutation in colorectal cancer: a study in Kashmiri population[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 355(1/2): 149-155.
- [3] Katoh M. Expression of human SOX7 in normal tissues and tumors[J]. *Int J Mol Med*, 2002, 9(4): 363-368.
- [4] Lu T, Hano H, Meng C, et al. Frequent loss of heterozygosity in two distinct regions, 8p23.1 and 8p22, in hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(7): 1090-1097.
- [5] Espada J, Calvo MB, Diaz-Prado S, et al. Wnt signalling and cancer stem cells[J]. *Clin Transl Oncol*, 2009, 11(7): 411-427.
- [6] Wielenga VJ, Smits R, Korinek V, et al. Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway[J]. *Am J Pathol*, 1999, 154(2): 515-523.
- [7] Blavier L, Lazaryev A, Dorey F, et al. Matrix metallopro-

teases play an active role in Wnt1-induced mammary tumorigenesis[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(5): 2691-2699.

- [8] He TC, Sparks AB, Rago C, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway[J]. *Science*, 1998, 281(5382): 1509-1512.
- [9] Sinner D, Kordich JJ, Spence JR, et al. Sox17 and Sox4 differentially regulate beta-catenin/T-cell factor activity and proliferation of colon carcinoma cells[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(22): 7802-7815.
- [10] Zhang Y, Huang S, Dong W, et al. SOX7, down-regulated in colorectal cancer, induces apoptosis and inhibits proliferation of colorectal cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2009, 277(1): 29-37.
- [11] 李斌, 陈武科, 陈鹏, 等. 乳腺癌中 MTA1、MMP-9 表达与临床病理研究[J]. *重庆医学*, 2010, 39(12): 1552-1554.
- [12] Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer[J]. *Oncogene*, 2010, 29(34): 4741-4751.
- [13] Gilles C, Polette M, Mestdagt M, et al. Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(10): 2658-2664.
- [14] Pendeville H, Winandy M, Manfroid I, et al. Zebrafish Sox7 and Sox18 function together to control arterial-venous identity[J]. *Dev Biol*, 2008, 317(2): 405-416.

(收稿日期: 2011-10-09 修回日期: 2012-01-06)