

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.24.003

CDH17 调节 TGF- β 自分泌影响胃癌细胞侵袭作用的研究*卢昕,孟庆斌,邵永胜 Δ

(武汉市第一医院胃肠外科 430022)

[摘要] 目的 探讨转化生长因子(TGF)- β 自分泌在钙黏蛋白 17(CDH17)调节胃癌细胞侵袭性中的作用及可能机制。方法 构建 siRNA-CDH17 并转染入胃癌细胞系 MKN-45,沉默其表达。通过免疫荧光染色、Western blot、ELISA 检测 CDH17 沉默前后细胞 TGF- β 表达及培养上清液中 TGF- β 水平变化,观察 TGF- β 的自分泌情况。同时采用 Western blot 检测 TGF- β /Smad3 信号通路活化情况,并通过 Transwell 侵袭实验观察在给予信号通路抑制剂后,胃癌细胞侵袭力的变化,评价 TGF- β 自分泌及相关信号通路活化在 CDH17 调节胃癌细胞侵袭性中的作用。结果 转染 siRNA-CDH17 沉默 MKN-45 细胞 CDH17 表达后,细胞 TGF- β 表达较未转染组明显下降,其培养上清液中 TGF- β 水平也显著减少[(510 \pm 55.0) pg/mL vs. (115 \pm 20) pg/mL, P <0.05]。Western blot 显示 CDH17 沉默后 Smad3 磷酸化水平也明显降低,而给予 TGF- β /Smad3 信号通路抑制剂 SIS3 (10 μ mol/L)也可抑制 CDH17 高表达时的 Smad3 磷酸化水平。同时,沉默 CDH17 及抑制 Smad3 磷酸化均可明显降低 MKN-45 细胞侵袭性(P <0.05)。结论 CDH17 可能通过促进自分泌 TGF- β 活化 TGF- β /Smad3 信号通路参与调节胃癌细胞侵袭性。

[关键词] 胃肿瘤;肿瘤浸润;转化生长因子- β ;CDH17;信号通路

[中图分类号] R735.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)24-3321-03

Study on role of CDH17 regulating TGF- β autocrine for affecting invasion of gastric cancer cells*Lu Xin, Meng Qingbin, Shao Yongsheng Δ

(Department of Gastrointestinal Surgery, Wuhan Municipal No. 1 Hospital, Wuhan, Hubei 430022, China)

[Abstract] **Objective** To explore the role and possible mechanism of transforming growth factor (TGF)- β autocrine in CDH17 regulating invasion of gastric cancer cells. **Methods** Construction and transfection of siRNA-CDH17 into MKN-45 gastric cancer cell line to silence the expression of CDH17. Expression of TGF- β and concentrations of TGF- β in supernatants were detected before and after CDH17 silence by immunofluorescence, immunoblotting and ELISA. The autocrine situation of TGF- β was observed. Meanwhile, the activation of TGF- β /Smad3 signaling pathway was also detected by immunoblot. After giving signaling pathway inhibitor, the changes of invasion ability of MKN-45 cells were observed by Transwell invasion experiment. The role of TGF- β autocrine and related signaling pathway activation in CDH17-regulated invasion of gastric cancer cells was evaluated. **Results** After transfecting siRNA-CDH17 for silencing CDH17 expression in MKN-45 cells, the expression of TGF- β was significantly decreased compared with non-transfection group, its concentration in supernatants was also significantly reduced[(510 \pm 55) pg/mL vs. (115 \pm 20) pg/mL, P <0.01]. The immunoblots revealed that phosphorylation level of Smad3 after CDH17 silence was also significantly diminished. However, giving the TGF- β /Smad3 signaling inhibitor SIS3 (10 μ mol/L) could also suppress the phosphorylation level of Smad3 when CDH17 was highly expressed, meanwhile silencing CDH17 and inhibiting Smad3 phosphorylation could significantly decrease the invasion of MKN-45 gastric cancer cells (P <0.05). **Conclusion** CDH17 could participate in the invasion of gastric cancer cells by promoting TGF- β autocrine to activate TGF- β /Smad3 signaling pathway.

[Key words] stomach neoplasms; neoplasm invasiveness; transforming growth factor - β ; CDH17; signaling pathway

目前研究发现钙黏蛋白 17(CDH17)是参与调节胃癌细胞侵袭及淋巴转移的重要分子^[1],然而目前其确切调控机制仍不明确,笔者前期研究发现 CDH17 可通过诱导胃癌细胞向间质表型转换促进胃癌细胞侵袭,提示上皮间质转化可能是 CDH17 调控胃癌细胞侵袭性的可能机制之一。转化生长因子(TGF)- β 及相关信号通路是参与调节上皮间质转化的重要分子信号^[2]。目前报道多种肿瘤可通过自分泌 TGF 参与调节自身的增殖、侵袭、转移等生物学行为^[3-4]。因此推测 TGF- β 自分泌也可能在 CDH17 诱导的胃癌细胞侵袭中发挥作用。本实验通过比较胃癌细胞 CDH17 沉默前后, TGF- β 的表达及分泌变化和相关信号通路活化情况,观察其对胃癌细胞侵袭性的影响,探讨 TGF- β 自分泌在 CDH17 调节胃癌细胞侵袭性中的作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂 蛋白裂解液 M-PER 购自美国 Thermo Pierce 公司。CDH17 和 TGF- β 一抗购自美国 Abcam 公司,磷酸化 p-Smad3、总 t-Smad3 和 SIS3 一抗购自美国 Cell Signaling Technology 公司。 β -actin 一抗及相应的二抗和链霉亲和素-生物复合物(SABC)免疫荧光试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。超敏电化学发光(ECL)试剂盒购自碧云天生物技术研究所。胎牛血清和高糖 DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司。TGF- β ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司。去细胞因子基质胶购自美国 Sigma-Aldrich 公司。24 孔嵌套 Transwell(聚碳酸酯膜孔径 8 μ m)购自美国 Corning 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 胃癌细胞系 MKN-45 由华中

科技大学同济医学院附属协和医院普通外科实验室保存提供。细胞培养于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 完全培养基中,置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱, 2~3 d 传代一次。实验共分为 3 组: 转染 siRNA-CDH17 组; 转染 CDH17 空白质粒 (vector) 组和非转染组。

1.2.2 siRNA-CDH17 的构建与转染 CDH17 基因的 cDNA 序列由 GenBank (NM_001144663.1) 获得, 针对该序列的 3 种不同 siRNA 由在线 RNAi 设计算法设计 (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)。所有设计的 siRNAs 由上海吉玛生物制药有限公司合成纯化。合成纯化的 siRNAs 用全式金脂质体转染试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司) 根据说明书转染入 MKN-45 细胞。经实时定量 PCR 鉴定, siRNA-CDH17 序列正义链: 5'-TGC AUT TCC UAA GGC TGA-3', 反义链 5'-GAU CCT GGT TCA AUA ACA T-3', 具有最佳干扰效率。再将 siRNA-CDH17 用上述方法和试剂盒分别转染入 MKN-45 细胞。细胞转染 48 h 后用于实验, 细胞活性由台盼蓝染色鉴定。

1.2.3 细胞免疫荧光染色 分别将转染与非转染 MKN-45 细胞接种于盖玻片上, 以 SABC 法进行免疫荧光染色。4% 多聚甲醛固定后, 以 0.1% Triton-x-100 对细胞膜打孔 15 min, 30% 过氧化氢与甲醇混合浸泡 60 min 以灭活内源性过氧化物酶, 洗涤后以 5% 牛血清清蛋白封闭 60 min, 分别加入 CDH17 和 TGF-β 一抗 (1:100), 4℃ 湿盒内孵育过夜。再滴加生物素化二抗室温孵育 20 min 后加入异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的 SABC 荧光反应液室温孵育 20 min, 脱水, 透明, 封片, 荧光显微镜观察。

1.2.4 ELISA 收集上述各组细胞培养上清液, 按 TGF-β ELISA 试剂盒说明测定标准曲线后加样, 每孔终体积 50 μL。用封板膜封板后置 37℃ 温育 30 min 后甩干、洗涤, 重复 5 次, 拍干。每孔加入酶标试剂 50 μL, 空白孔除外, 重复上述步骤 5 次, 拍干。每孔加入显色剂 A 50 μL, 再加入显色剂 B 50 μL, 轻轻振荡混匀, 37℃ 避光显色 15 min。每孔加终止液 50 μL, 终止反应, 最后以空白孔调零, 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度。

1.2.5 Western blot 将转染 siRNA-空载体组细胞预先用 SIS3 (10 μmol/L) 孵育 24 h, 然后同上述转染和未转染细胞洗涤加入蛋白裂解液提取总蛋白。蛋白定量后, 煮沸变性后按每孔 30 μg 上样, 经 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 凝胶电泳后转移至 PVDF 膜, 以 5% 脱脂奶粉封闭 60 min, 分别加入 TGF-β (1:1000)、p-Smad3 (1:1000) 和 t-Smad3 (1:1000) 及 β-actin (1:1000) 一抗 4℃ 孵育过夜, 二抗室温孵育 1 h 后, 采用 ECL, 以 Bio-Rad 荧光成像系统显影。目的蛋白表达以 β-actin 作为参照相对定量。

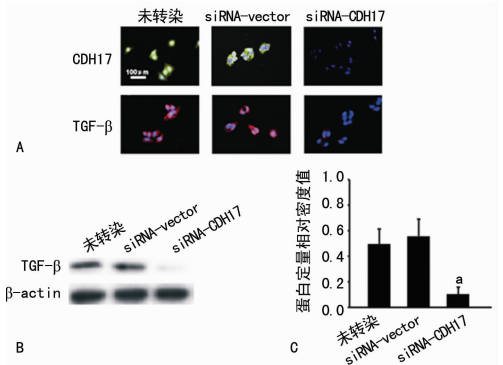
1.2.6 Transwell 侵袭实验 将上述经 SIS3 孵育的细胞及转染和未转染细胞按 1×10⁵/孔接种于铺有去细胞因子基质胶的 24 孔 Transwell 嵌套 (滤膜孔径为 8 μm) 中, 上室加入不含血清的高糖 DMEM 培养基, 下室均加入含 10% 胎牛血清的完全培养基, 孵育 8 h 后, 苏木素染色, 显微镜下计数穿膜细胞。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 11.0 统计软件进行数据分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析和 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 siRNA-CDH17 转染对 TGF-β 表达的影响 细胞免疫荧光显示转染 siRNA-CDH17 后, MKN-45 细胞 CDH17 及 TGF-β 表达明显下降, Western blot 也显示沉默 CDH17 表达后,

TGF-β 表达也明显减少。转染 siRNA-vector (空载体) 组与未转染对照组 TGF-β 呈现相对高表达, 二者间表达水平比较差异无统计学意义 (图 1)。

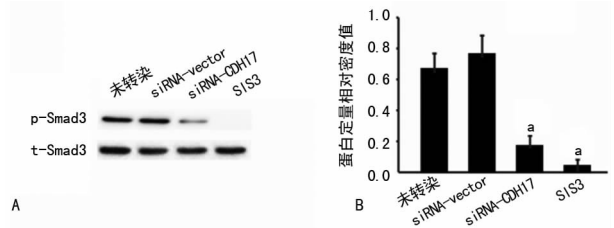


A: 免疫荧光染色; B: Western blot; C: Western blot 相对定量。^a: *P* < 0.05

图 1 siRNA-CDH17 转染对 TGF-β 表达的影响

2.2 siRNA-CDH17 转染对 TGF-β 分泌的影响 ELISA 检测显示, 转染 siRNA-CDH17, 沉默 MKN-45 细胞 CDH17 表达后, 其培养上清液中 TGF-β 水平明显降低 [(510±55) pg/mL vs. (115±20) pg/mL, *P* < 0.05], 而转染 siRNA-vector 组与未转染组上清液中 TGF-β 水平相对较高, 两组比较差异无统计学意义 [(510±55) pg/mL vs. (485±38) pg/mL, *P* > 0.05]。

2.3 siRNA-CDH17 转染对 TGF-β/Smad3 信号通路活化的影响 转染 siRNA-CDH17, 沉默 CDH17 表达后, 胃癌 MKN-45 细胞 Smad3 磷酸化水平较未转染组明显下降 (*P* < 0.05), 而转染 siRNA-vector 组与未转染组细胞 Smad3 磷酸化水平较高, 两组比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。而 TGF-β/Smad3 信号通路抑制剂 SIS3 可明显减少 siRNA-vector 组的 Smad3 磷酸化水平 (*P* < 0.05), 见图 2。



A: Western blot; B: Western blot 相对定量。^a: *P* < 0.05

图 2 siRNA-CDH17 转染对 TGF-β/Smad3 信号通路活化的影响

2.4 TGF-β/Smad3 信号通路对 MKN-45 细胞侵袭性的影响 Transwell 侵袭实验检测显示, 较未转染组 (9 525±1 000) 及 siRNA-vector 组 (9 525±1 000), siRNA-CDH17 转染 (2 650±410) 及应用 SIS3 处理 (3 800±525) 均可明显减少胃癌 MKN-45 细胞的侵袭数, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。

3 讨论

前期研究发现 CDH17 表达可诱导胃癌细胞向间质细胞表型转化, 提示上皮间质转化可能在 CDH17 调控胃癌细胞转移、侵袭中发挥作用。因此探讨上皮间质转化相关信号机制与 CDH17 侵袭调控间的关系, 有助于进一步阐明胃癌侵袭调控的信号生物学机制。本实验通过检测 CDH17 对胃癌细胞 TGF-β 产生和 TGF-β/Smad3 信号通路活化的影响, 以及 TGF-β/Smad3 信号活化在胃癌细胞侵袭中的作用, 探讨 TGF-β 及其相关信号通路在 CDH17 调控胃癌细胞侵袭性中的可能

作用及机制。

本研究发现在胃癌细胞高表达 CDH17 时,细胞 TGF- β 的表达及分泌均较高,而抑制 CDH17 表达后,TGF- β 的表达及分泌均明显减少,提示 CDH17 可能对胃癌细胞 TGF- β 的分泌发挥作用。尽管 CDH17 是钙黏蛋白家族成员,通常被作为下游蛋白受上游分子信号调节。但近来研究表明,采用 siRNA 干扰技术,抑制 CDH17 的基因表达,可抑制上游 β -catenin/Wnt 和 Ras/MEK 信号通路活化,进而影响胃癌细胞的侵袭^[5-6]。本研究则发现,CDH17 高表达伴随的 TGF- β 高表达可增加 Smad3 磷酸化水平,而沉默 CDH17 表达后,在 TGF- β 产生减少的同时,Smad3 磷酸化水平也显著下降,表明 CDH17 也可介导上游 TGF- β /Smad3 信号通路活化,进而促进胃癌细胞侵袭。

TGF- β /Smad3 信号通路在介导上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)中发挥最重要功能^[7]。而 EMT 通过细胞表型向间质转化,使细胞高表达基质金属蛋白酶,从而易于分解细胞外基质,利于细胞迁移;同时通过间质转化本身,细胞内骨架重排,迁移能力增强也有利于细胞迁移力及侵袭性增强^[8]。前期研究证实,CDH17 可通过诱导胃癌细胞 EMT 促进其侵袭。本研究也发现,Smad3 磷酸化水平与胃癌细胞侵袭性相关,无论抑制 CDH17 表达或直接抑制 Smad3 活化均可显著减少胃癌细胞侵袭。进一步证实 TGF- β /Smad3 信号通路可能通过诱导 EMT 在介导胃癌细胞侵袭性中发挥重要作用。

本研究发现为 CDH17 在调节胃癌细胞侵袭性中的作用提供了又一新的分子细胞生物学机制,较以往的研究不仅关注分子信号机制本身,结合前期研究更进一步揭示分子信号与侵袭终效应间的细胞生物学行为联系。但由于 β -catenin/Wnt 和 Ras/MEK 等信号通路也在 CDH17 介导的胃癌细胞侵袭中发挥重要作用,且细胞信号本身存在多种信号交联机制。因此进一步深入探寻信号交联分子在其中的作用,更有助于进一步阐明胃癌细胞侵袭转移机制。同时 CDH17 介导上游信号通路的活化调节是直接作用还是需要中间分子机制参与是下一个

研究目标。

参考文献

- [1] Park SS,Kang SH,Park JM,et al. Expression of liver-intestine cadherin and its correlation with lymph node metastasis in gastric cancer;can it predict N stage preoperatively? [J]. *Ann Surg Oncol*,2007,14(1):94-99.
 - [2] Zavadil J,Bottinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions [J]. *Oncogene*,2005,24(37):5764-5774.
 - [3] 蔡洪培,高勇,张翼翔. 人肝癌细胞系 SMMC-7721 细胞 TGF- α 的自分泌[J]. 第二军医大学学报,2001,22(4):393-394.
 - [4] 洪祖蓓,狄文,丁传伟. TGF- α /EGFR 自分泌环调控卵巢癌细胞增殖转移的分子机制[J]. 中国癌症杂志,2006,16(11):899-902.
 - [5] Qiu HB,Zhang LY,Ren C,et al. Targeting CDH17 suppresses tumor progression in gastric cancer by downregulating Wnt/ β -catenin signaling[J]. *PLoS One*,2013,8(3):e56959.
 - [6] Wang J,Kang WM,Yu JC,et al. Cadherin-17 induces tumorigenesis and lymphatic metastasis in gastric cancer through activation of NF κ B signaling pathway [J]. *Cancer Biol Ther*,2013,14(3):262-270.
 - [7] Micalizzi DS,Farabaugh SM,Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer:parallels between normal development and tumor progression[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*,2010,15(2):117-134.
 - [8] Yang J,Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis [J]. *Dev Cell*,2008,14(6):818-829.
- (收稿日期:2016-12-19 修回日期:2017-03-07)
-
- (上接第 3320 页)
- 些年的研究中得到了长足的发展^[11]。AAV 载体可操作性强,许多 AAV 已在临床中应用。因此,AAV-TIPE2 载体在 SLE 及其他自身免疫性疾病中应用,将有着无限广阔的前景。
- ## 参考文献
- [1] Li F,Yang Y,Zhu X,et al. Macrophage polarization modulates development of systemic lupus erythematosus[J]. *Cell Physiol Biochem*,2015,37(4):1279-1288.
 - [2] Sun H,Gong S,Carmody RJ,et al. TIPE2,a negative regulator of innate and adaptive immunity that maintains immune homeostasis[J]. *Cell*,2008,133(3):415-426.
 - [3] 黄雯,吴厚生,冯树芳. 活化淋巴细胞的 ENA 免疫原性分析[J]. 中华皮肤科杂志,2003,36(2):82-84.
 - [4] Davis BK. Isolation,culture,and functional evaluation of bone marrow-derived macrophages[J]. *Methods Mol Biol*,2013,1031(1):27-35.
 - [5] Koerber JT,Maheshri N,Kaspar BK,et al. Construction of diverse adeno-associated viral libraries for directed evolution of enhanced gene delivery vehicles[J]. *Nat Protoc*,2006,1(2):701-706.
 - [6] 张有斌,余云生,沈振亚,等. 过表达大鼠 TIPE2 基因重组腺病毒载体的构建[J]. 中国组织工程研究,2014,18(11):1743-1748.
 - [7] Lou Y,Zhang G,Geng M,et al. TIPE2 negatively regulates inflammation by switching arginine metabolism from nitric oxide synthase to arginase[J]. *PLoS One*,2014,9(5):e96508.
 - [8] Li D,Song L,Fan Y,et al. Down-regulation of TIPE2 mRNA expression in pheral blood mononuclear cells from Patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Immunol*,2009,133(3):422-427.
 - [9] Sun H,Zhuang G,Chai L,et al. TIPE2 controls innate immunity to RNA by targeting the phosphatidylinositol 3-kinase-Rac pathway[J]. *J Immunol*,2012,189(6):2768-2773.
 - [10] 石春燕,何琼,杨晶晶,等. TIPE2 过表达质粒转染大鼠佐剂型关节炎滑膜成纤维样细胞及分析[J]. 中国免疫学杂志,2013,29(12):1240-1243,1253.
 - [11] 李安琪,翟静. 腺相关病毒载体介导的肿瘤基因治疗研究进展[J]. 世界临床药物,2010,31(11):687-690.
- (收稿日期:2016-12-18 修回日期:2017-03-06)