



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.04.013
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.04.013
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(4):541-546.

· 基础研究 ·

GSK-3 β 在钙黏蛋白 17 介导的胃癌细胞侵袭中的作用及机制研究

卢昕, 孟庆彬, 邵永胜

(湖北省武汉市第一医院 胃肠外科, 湖北 武汉 430022)

摘要

目的: 探讨 GSK-3 β 在钙黏蛋白 17 (CDH17) 介导的胃癌细胞侵袭中的作用及机制。

方法: 分别用 CDH17 siRNA 转染或 GSK-3 β 抑制剂 SB216763 处理胃癌 MKN-45 细胞, 以无处理和转染空载体的 MKN-45 细胞为空白对照及阴性对照, 检测各组细胞 GSK-3 β 、 β -catenin、NF- κ B (p50/p65) 的表达以及侵袭力变化。

结果: 与空白对照细胞比较, CDH17 siRNA 转染后的 MKN-45 细胞 CDH17、磷酸化 GSK-3 β 、 β -catenin 与 p50/p65 蛋白表达均明显降低, 侵袭细胞数明显减少 (均 $P < 0.05$); SB216763 处理后的 MKN-45 细胞 CDH17 与 β -catenin 表达无明显变化 (均 $P > 0.05$), 磷酸化 GSK-3 β 与 p50/p65 表达明显降低, 侵袭细胞数明显减少 (均 $P < 0.05$); 转染空载体的 MKN-45 细胞各项指标均无明显变化 (均 $P > 0.05$)。

结论: 在 CDH17 介导的胃癌细胞侵袭信号通路中, GSK-3 β 可能处于 β -catenin 下游, 通过其磷酸化水平而调节 NF- κ B 活性的关键分子。

关键词

胃肿瘤; 钙黏着糖蛋白类; 糖原合成酶激酶 3; 肿瘤浸润
中图分类号: R735.2

Role of GSK-3 in cadherin 17-mediated gastric cancer cell invasion and the mechanism

LU Xin, MENG Qingbin, SHAO Yongsheng

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

Abstract

Objective: To investigate the role of glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) in cadherin 17 (CDH17)-mediated of gastric cancer cell invasion and the mechanism.

Methods: Gastric cancer MKN-45 cells were transfected with CDH17 siRNA or exposed to GSK-3 β inhibitor SB216763 respectively, with untreated and empty vector transfected MKN-45 cells as blank control and negative control, respectively. The changes in GSK-3 β , β -catenin and NF- κ B (p50/p65) expressions and invasion ability of each group of cells were determined.

Results: Compared with blank control cells, in MKN-45 cells transfected with CDH17 siRNA, the CDH17,

基金项目: 2015 年度武汉市卫计委临床医学科研究资助项目 (wx15c31)。

收稿日期: 2015-11-26; 修订日期: 2016-03-11。

作者简介: 卢昕, 湖北省武汉市第一医院副主任医师, 主要从事肿瘤分子生物学方面的研究。

通信作者: 邵永胜, Email: 2435063100@qq.com

phosphorylated GSK-3 β , β -catenin and p50/p65 expressions were significantly decreased, and the number of invaded cells was significantly reduced (all $P < 0.05$). In MKN-45 cells exposed to SB216763, the CDH17 and β -catenin expressions showed no significant difference (both $P > 0.05$), while the phosphorylated GSK-3 β and p50/p65 expressions were significantly decreased, and number of invaded cells was significantly reduced (all $P < 0.05$). In MKN-45 cells transfected with empty vectors, all parameters showed no significant change (all $P > 0.05$).

Conclusion: In the signaling pathway of CDH17-mediated gastric cancer cell invasion, GSK-3 β may be an important molecule downstream to β -catenin for regulating NF- κ B activity through its phosphorylation level.

Key words Stomach Neoplasms; Cadherins; Glycogen Synthase Kinase 3; Neoplasm Invasiveness

CLC number: R735.2

目前研究^[1-4]发现钙黏蛋白17 (cadherin 17, CDH17) 可通过Wnt/ β -catenin和NF- κ B^[5-9]等信号通路参与调节胃癌细胞的增殖、侵袭、成瘤等恶性生物学行为, 而糖原合酶激酶(GSK)-3 β 则均参与Wnt/ β -catenin和NF- κ B信号通路对多种恶性肿瘤生物学行为的调节^[10-15], 但GSK-3 β 在上述信号通路中的调节位点尚存争议。笔者前期研究也发现, 在诱导胃癌细胞侵袭的同时, 细胞内PI3K/Akt信号通路显著活化, 而GSK-3 β 作为该通路的下游信号分子之一, 是否也参与胃癌细胞侵袭及相关机制仍不清楚。本实验通过检测CDH17对胃癌细胞中GSK-3 β 活化、Wnt信号分子 β -catenin和NF- κ B信号分子p65的核表达及侵袭力影响, 并分析抑制GSK-3 β 活化后对 β -catenin和p65的核表达及侵袭力的影响, 探讨GSK-3 β 在CDH17介导的胃癌细胞侵袭中的作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

CDH17一抗购自美国Abcam公司; 磷酸化GSK-3 β 、总GSK-3 β 、 β -catenin和p65一抗和GSK-3 β 抑制剂SB216763购自美国Cell Signaling Technology公司。相应的二抗和SABC免疫荧光试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。核蛋白提取试剂盒(含胞浆蛋白提取试剂及核蛋白提取试剂)和超敏ECL化学发光试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。胎牛血清和高糖DMEM培养基购自美国Hyclone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 细胞培养

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 $^{\circ}$ C, 5%CO₂养箱, 2~3 d传代1次。

1.3 CDH17 siRNA 的构建与转染

CDH17基因的cDNA序列由Genebank (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siRNA由上海吉玛生物制药有限公司合成纯化。合成纯化的siRNA用全式金脂质体转染试剂盒依说明书(北京全式金生物技术有限公司)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。

1.4 Western blot

将MKN-45细胞以SB216763 (10 μ M) 孵育48 h后, 同上述转染与未转染细胞洗涤, 加入胞浆蛋白提取试剂, 16 000 g离心5 min后弃上清, 再加入核蛋白提取试剂, 16 000 g离心5 min后取上清。蛋白定量后, 煮沸变性后按30 μ g/孔上样, 经12% 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CDH17 (1:1 000), p-GSK-3 β (1:1 000)、GSK-3 β (1:1 000)、 β -catenin (1:1 000) 和p65

(1:500)及β-actin(1:1 000)一抗4℃孵育过夜,二抗室温孵育1 h后,ECL化学发光,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。

1.5 Transwell 侵袭实验

将上述分组处理的胃癌MKN-45细胞按 1×10^5 /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,下室加入完全培养基,孵育8 h后,苏木素染色,显微镜下计数穿膜细胞。

1.6 统计学处理

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用SPSS 11.0统计软件进行方差分析和t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CDH17 诱导胃癌 MKN-45 细胞 GSK-3β 活化

Western blot显示,各组胃癌细胞总GSK-3β表达水平无明显差异。与无处理MKN-45细胞(空白对照组)比较,转染特异性CDH17 siRNA 48 h后(CDH17 siRNA转染组),沉默胃癌MKN-45细胞CDH17表达,则GSK-3β磷酸化水平也明显受抑制($P < 0.05$);未转染siRNA时,GSK-3β抑制剂SB216763处理的MKN-45细胞(SB216763组),GSK-3β磷酸化水平明显降低($P < 0.05$),且与CDH17 siRNA转染组无统计学差异($P > 0.05$),而CDH17表达无明显改变($P > 0.05$);转染空载体的MKN-45细胞(阴性对照组)与空白对照组间GSK-3β及CDH17无统计学差异(均 $P > 0.05$) (图1)。

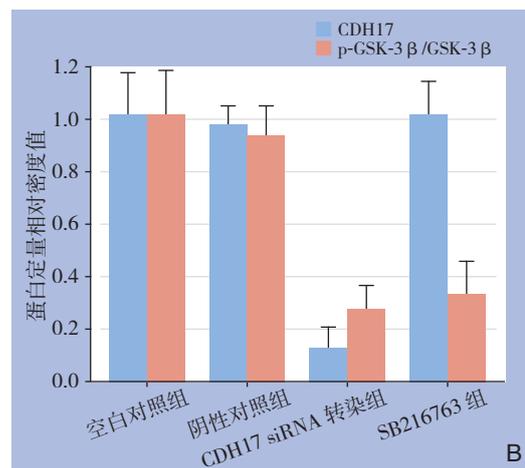
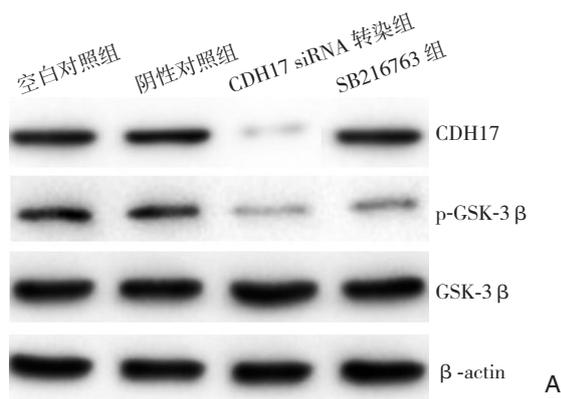


图1 CDH17与GSK-3β表达检测

A: Western blot 检测; B: 蛋白相对表达量比较

Figure 1 Determination of CDH17 and GSK-3β expressions levels

A: Western blot analysis; B: Comparison of the relative protein expression

2.2 抑制 GSK-3β 活化减少 CDH17 诱导的胃癌细胞侵袭

Transwell侵袭实验检测显示,与空白对照组比较,CDH17 siRNA转染组细胞侵袭数明显下降[(2 900 ± 520) vs. (12 750 ± 18 50), $P < 0.05$];SB216763组细胞侵袭数明显减少[(3 625 ± 580) vs. (12 750 ± 1 850), $P < 0.05$],且与CDH17 siRNA转染组无统计学差异($P > 0.05$);阴性对照组细胞侵袭数无明显改变($P > 0.05$) (图2)。

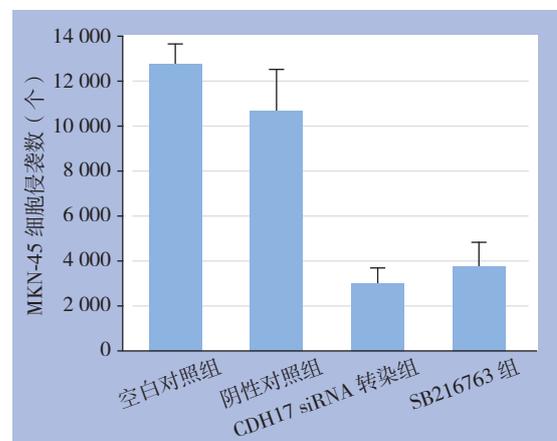


图2 各组侵袭细胞数比较

Figure 2 Comparison of the numbers of invaded cells among groups

2.3 抑制 GSK-3 β 活化对胃癌细胞核 NF- κ B 信号活化的影响

Western blot显示,与空白对照组比较,CDH17 siRNA转染组细胞核p50/p65表达明显下降

($P < 0.05$); SB216763组细胞核p50/p65表达明显下降($P < 0.05$),且与CDH17 siRNA转染组无统计学差异($P > 0.05$);阴性对照组细胞核p50/p65表达无明显改变($P > 0.05$) (图3)。

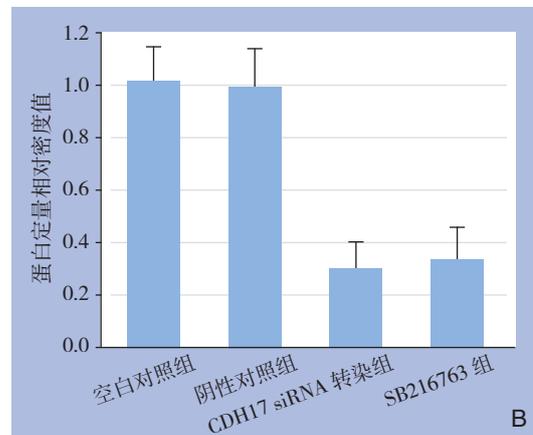
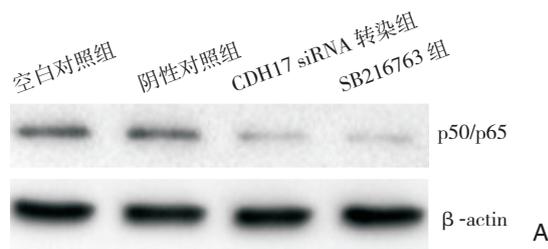


图3 p50/p65 表达检测

Figure 3 Determination of p50/p65 expression

A: Western blot 检测; B: 蛋白相对表达量比较

A: Western blot analysis; B: Comparison of the relative protein expression levels

2.4 抑制 GSK-3 β 活化对胃癌细胞核 Wnt 信号活化的影响

Western blot显示,与空白对照组比较,CDH17 siRNA转染组细胞核 β -catenin表达明显下降($P < 0.05$); SB216763组细胞核 β -catenin表达

无统计学差异($P > 0.05$),且其表达水平明显高于CDH17 siRNA转染组细胞($P < 0.05$);阴性对照组细胞核 β -catenin表达无明显改变($P > 0.05$) (图4)。

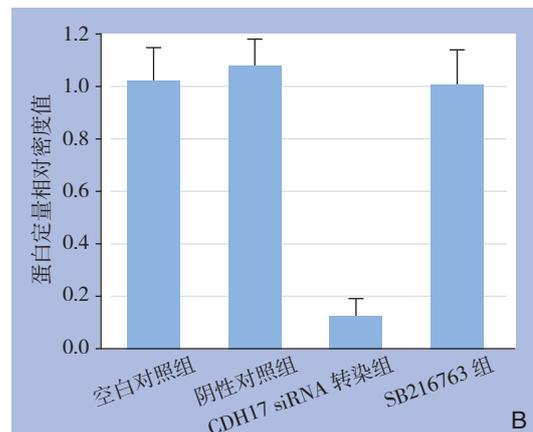
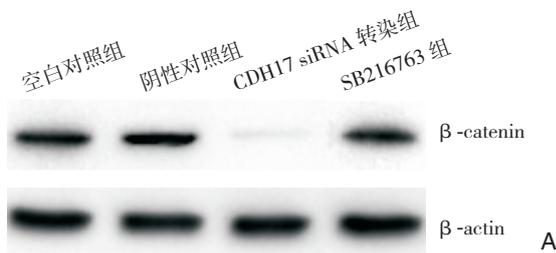


图4 β -catenin 表达检测

Figure 4 Determination of β -catenin expression

A: Western blot 检测; B: 蛋白相对表达量比较

A: Western blot analysis; B: Comparison of the relative protein expression levels

3 讨论

Wnt/ β -catenin^[1-4]和NF- κ B^[5-9]信号通路均参与CDH17诱导的胃癌细胞增殖、侵袭、成瘤及淋巴转移、进展等恶性生物学行为。GSK-3 β 分别通

过调节 β -catenin的降解和NF- κ B信号的核内活化,在多发性骨髓瘤、乳腺癌、胰腺癌等多种恶性肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[10-15]。此类研究提示GSK-3 β 可能是CDH17诱导胃癌细胞增殖、侵袭等恶性行为的关键介导信号分子。本实验发

现胃癌细胞CDH17的高表达可显著诱导GSK-3 β 磷酸化及上调核 β -catenin和p50/p65的表达,同时增强胃癌细胞的侵袭能力,干扰CDH17表达后,GSK-3 β 磷酸化水平及核 β -catenin和p50/p65表达水平均明显受抑制,胃癌细胞侵袭能力也显著下降。在应用抑制剂抑制GSK-3 β 磷酸化后,胃癌细胞CDH17表达及核 β -catenin的表达不受影响,但核p50/p65的表达受抑制,胃癌细胞侵袭能力也显著下降。

GSK-3 β 是PI3K/Akt信号通路重要下游分子之一,主要参与细胞调控细胞糖原合成与讲解,进而参与调节细胞增殖、运动等多种生理功能,磷酸化与非磷酸化是调节其活性的重要途径^[16-19]。CDH17高表达诱导胃癌细胞GSK-3 β 磷酸化水平增加提示GSK-3 β 活化,同时SB216763抑制GSK-3 β 磷酸化活化后,胃癌细胞CDH17表达不受影响进一步提示CDH17是GSK-3 β 活化的上游启动分子。而上述情况造成的GSK-3 β 活化受抑制后,胃癌侵袭能力的减弱均进一步证实GSK-3 β 活化是CDH17介导胃癌细胞侵袭的关键中间信号分子。

本实验还表明,CDH17可上调胃癌细胞核表达NF- κ B信号分子p50/p65,提示核NF- κ B信号活化,抑制CDH17表达可抑制核NF- κ B信号活化。但在应用抑制剂抑制GSK-3 β 活化后,即使CDH17表达不受影响,胃癌细胞核NF- κ B信号活化仍受显著抑制,提示GSK-3 β 可能是调节核NF- κ B信号的上游分子。由于核内NF- κ B可调控基质金属蛋白酶-9等表达,从而参与胃癌细胞的淋巴转移、侵袭^[2, 6],因而推测NF- κ B信号是GSK-3 β 调节胃癌细胞侵袭能力的下游执行信号。

同时本研究还发现,CDH17也显著上调胃癌细胞核表达Wnt信号分子 β -catenin,抑制CDH17表达可抑制核 β -catenin表达,提示CDH17调控胃癌细胞Wnt信号通路的活化。然而与NF- κ B信号不同,但在应用抑制剂抑制GSK-3 β 活化后,只要CDH17表达不受影响,胃癌细胞核Wnt信号的活化不受显著影响。尽管目前报道GSK-3 β 是调节 β -catenin降解,从而调控Wnt信号的关键上游分子^[20-21],但本研究结果表明不能排除GSK-3 β 可能作为Wnt信号下游分子的可能性。同时由于相关研究^[8]检测胞浆内 β -catenin的表达变化,而 β -catenin核转位时可能存在进一步表达调节,也可能造成与核 β -catenin表达不一致。

本研究揭示GSK-3 β 活化是介导CDH17诱导的胃癌细胞侵袭的关键信号分子,而核内NF- κ B信号的活化则可能是介导胃癌细胞侵袭的下游分子机制。由于GSK-3 β 是PI3K/Akt信号通路的重要下游分子,同时也参与Wnt信号通路的调节,因而GSK-3 β 可能是多条参与调节胃癌细胞生物学行为信号通路的中间交联分子。GSK-3 β 活性的调节及相关信号通路的交联对话机制的阐明有助于制定新的有效抗癌策略。

参考文献

- [1] 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. doi: 10.1371/journal.pone.0056959.
- [2] Meng W, Gu T, Gao LM, et al. Correlation of cadherin-17 protein expression with clinicopathological features and prognosis of patients with sporadic gastric cancer[J]. Braz J Med Biol Res, 2015, 48(12):1077-1086.
- [3] Long ZW, Zhou ML, Fu JW, et al. Association between cadherin-17 expression and pathological characteristics of gastric cancer: a meta-analysis[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(12):3694-3705.
- [4] 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.
- [5] Chen Y, Whetstone HC, Youn A, et al. Beta-catenin signaling pathway is crucial for bone morphogenetic protein 2 to induce new bone formation[J]. J Biol Chem, 2007, 282(1):526-533.
- [6] Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling[J]. Cell, 2008, 132(3):344-362.
- [7] Panarelli NC, Yantiss RK, Yeh MM, et al. Tissue-specific cadherin CDH17 is a useful marker of gastrointestinal adenocarcinomas with higher sensitivity than CDX2[J]. Am J Clin Pathol, 2012, 138(2):211-222.
- [8] Lee HJ, Nam KT, Park HS, et al. Gene expression profiling of metaplastic lineages identifies CDH17 as a prognostic marker in early stage gastric cancer[J]. Gastroenterology, 2010, 139(1):213-225.
- [9] Zhang J, Liu QS, Dong WG. Blockade of proliferation and migration of gastric cancer via targeting CDH17 with an artificial microRNA[J]. Med Oncol, 2011, 28(2):494-501.
- [10] Zhang B, Yang Y, Shi X, et al. Proton pump inhibitor pantoprazole abrogates adriamycin-resistant gastric cancer cell invasiveness via suppression of Akt/GSK- β / β -catenin signaling and epithelial-mesenchymal transition[J]. Cancer Lett, 2015, 356(2 Pt B):704-712.
- [11] Müller W, Frank U, Teo R, et al. Wnt signaling in hydroid development: ectopic heads and giant buds induced by GSK-3beta

- inhibitors[J]. *Int J Dev Biol*, 2007, 51(3):211-220.
- [12] 周谊霞, 李龙, 于燕妮, 等. 糖原合酶激酶-3 β 抑制剂对糖尿病肾病大鼠Wnt和核因子- κ B信号通路的影响[J]. *中华病理学杂志*, 2015, 44(11):783-787.
- Zhou Y, Li L, Yu Y, et al. Impact of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) inhibitor on Wnt and NF- κ B signal pathways in a rat model of diabetic nephropathy[J]. *Chinese Journal of Pathology*, 2015, 44(11):783-787.
- [13] Fu K, Pan H, Liu S, et al. Glycogen synthase kinase-3 β regulates tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis via the NF- κ B pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(6):3557-3564.
- [14] Ougolkov AV, Bone ND, Fernandez-Zapico ME, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 activity leads to epigenetic silencing of nuclear factor kappaB target genes and induction of apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells[J]. *Blood*, 2007, 110(2):735-742.
- [15] 廖新华, 仇广林, 陈锐, 等. 胃癌细胞中 β 肾上腺能受体与NF- κ B通路及其下游侵袭相关因子的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2013, 22(10):1285-1290.
- Liao XH, Qiu GL, Chen R, et al. Connections of β -adrenergic receptor to nf- κ b pathway and its downstream invasion-related factors in stomach cancer cells[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2013, 22(10):1285-1290.
- [16] Abraham AG, O'Neill E. PI3K/Akt-mediated regulation of p53 in cancer[J]. *Biochem Soc Trans*, 2014, 42(4):798-803.
- [17] Gangarossa G, Sakkaki S, Lory P, et al. Mouse hippocampal phosphorylation footprint induced by generalized seizures: Focus on ERK, mTORC1 and Akt/GSK-3 pathways [J]. *Neuroscience*, 2015, 311:474-483. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.10.051.
- [18] Wang G, Feng CC, Chu SJ, et al. Toosendanin inhibits growth and induces apoptosis in colorectal cancer cells through suppression of AKT/GSK-3 β / β -catenin pathway[J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(5):1767-1774.
- [19] Yuan H, Meng X, Guo W, et al. Transmembrane-Bound IL-15-Promoted Epithelial-Mesenchymal Transition in Renal Cancer Cells Requires the Src-Dependent Akt/GSK-3 β / β -Catenin Pathway[J]. *Neoplasia*, 2015, 17(5):410-420.
- [20] Qu F, Li CB, Yuan BT, et al. MicroRNA-26a induces osteosarcoma cell growth and metastasis via the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(2):1592-1596.
- [21] Lv YF, Dai H, Yan GN, et al. Downregulation of tumor suppressing STF cDNA 3 promotes epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis of osteosarcoma by the Wnt/GSK-3 β / β -catenin/Snail signaling pathway[J]. *Cancer Lett*, 2016, 373(2):164-173.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 卢昕, 孟庆彬, 邵永胜. GSK-3 β 在钙黏蛋白17介导的胃癌细胞侵袭中的作用及机制研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(4):541-546. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.04.013

Cite this article as: Lu X, Meng QB, Shso YS. Role of GSK-3 β in cadherin 17-mediated gastric cancer cell invasion and the mechanism[J]. *Chin J Gen Surg*, 2016, 25(4):541-546. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.04.013

本刊 2016 年各期重点内容安排

本刊 2016 年各期重点内容安排如下, 欢迎赐稿。

第 1 期 肝脏外科消融、微创手术

第 2 期 胆管细胞癌基础与临床

第 3 期 胰腺手术的规范化与个体化方案

第 4 期 胃肠道微创手术及新技术

第 5 期 乳腺、甲状腺肿瘤基础与临床研究

第 6 期 主动脉瘤与主动脉夹层的外科处理

第 7 期 肝细胞癌基础与临床研究

第 8 期 胆道外科疾病的微创治疗

第 9 期 胰腺肿瘤的基础与临床研究

第 10 期 消化道肿瘤及胃肠外科疾病

第 11 期 乳腺、甲状腺及内分泌外科

第 12 期 血管外科疾病及其他

中国普通外科杂志编辑部