



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.012
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.012
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(10):1406-1410.

· 基础研究 ·

CDH17 对胃癌细胞侵袭性的影响及其机制

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 CDH17 在胃癌细胞中的表达及其对胃癌侵袭性的影响。

方法: 分别用 Transwell 侵袭实验、免疫荧光染色及 Western blot 法检测正常胃黏膜 GES-1 细胞和胃癌 MGC803 细胞与 BGC823 细胞的侵袭力与 CDH17、上皮标志物 E-cadherin、间质标志物 N-cadherin 的表达, 以及两种胃癌细胞转染 CDH17siRNA 后以上指标的变化。

结果: 正常胃黏膜 GES-1 细胞无穿膜细胞、无 CDH17 与 N-cadherin 表达, 而有明显的 E-cadherin 表达; 与 GES-1 细胞比较, 两种胃癌细胞均有明显的穿膜细胞及明显的 CDH17 与 N-cadherin 表达, 而 E-cadherin 呈低表达 (均 $P < 0.05$), 且高侵袭力的 MGC803 细胞上述变化较侵袭力的 BGC823 细胞更为明显; 两种胃癌细胞转染 CDH17siRNA 后, 上述指标变化较转染前明显抑制 (均 $P < 0.05$), 且在两种细胞间的差异缩小 (均 $P > 0.05$)。

结论: CDH17 高表达可能通过上皮间质转化促进胃癌细胞系侵袭性。

关键词

胃肿瘤; 上皮-间质转化; 钙黏着糖蛋白类; 肿瘤浸润
中图分类号: R735.2

Influence of CDH17 on invasion ability of gastric cancer cells 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 CDH17 expression in gastric cancer cells and its influence on the invasiveness of gastric cancer cells.

Methods: The invasion ability and expressions of CDH17, epithelial marker E-cadherin and mesenchymal marker N-cadherin in normal gastric mucosal GES-1 cells, and gastric cancer MGC803 and BGC823 cells were examined by Transwell migration assay, immunofluorescence staining and Western blot analysis, respectively, and the changes in above parameters in the two types of gastric cancer cells after transfection with CDH17siRNA were also determined.

Results: No invading cells or CDH17 and N-cadherin expression, but evident E-cadherin expression was seen in normal gastric mucosal GES-1 cells. In either MGC803 or BGC823 cells compared with GES-1 cells, there was considerable number of invading cells as well as marked CDH17 and N-cadherin expressions, but significantly

基金项目: 2015 年度武汉市卫生计生委临床医学科研资助项目 (wx15c31)。

收稿日期: 2015-05-12; 修订日期: 2015-09-08。

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: shaoyongsheng1211@medmail.com.cn

reduced E-cadherin expression (all $P < 0.05$), and further, the changes in these parameters in highly invasive MGC803 cells were more evident than those in less invasive BGC823 cells. After CDH17 siRNA transfection, the changes in above parameters in both types of gastric cells were significantly weakened compared with those before transfection, and the differences of which between the two types of cells were decreased (all $P > 0.05$).

Conclusion: High CDH17 expression can promote invasion ability of gastric cancer cells, probably via epithelial-mesenchymal transition.

Key words Stomach Neoplasms; Epithelial-Mesenchymal Transition; Cadherins; Neoplasm Invasiveness

CLC number: R735.2

胃癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一,其病死率仅次于肺癌。目前尽管在胃癌的诊断及治疗有了显著进展,但肿瘤侵袭、转移仍然是限制患者远期生存的主要因素^[1-2]。目前研究^[3-4]发现肠钙黏蛋白(CDH17)与胃癌的淋巴转移密切相关,同时它可作用于 β -catenin/Wnt^[5-6]和Ras/MEK^[7-8]等多条信号通路,在胃癌的增殖、转移进展中发挥重要效应。由于 β -catenin/Wnt和Ras/MEK信号是调控上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的重要通路^[9-11],因此笔者推测CDH17可能通过调控上皮间质转化过程在胃癌的侵袭力中发挥重要作用。本实验通过比较不同侵袭性胃癌细胞中CDH17的表达与侵袭力差别,观察沉默CDH17基因前后上皮及间质标志的表达变化和侵袭力变化,探讨CDH17在胃癌细胞侵袭力中的作用及可能机制。

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, E-cadherin和N-cadherin一抗购自美国Abcam公司, β -actin一抗及相应的二抗和SABC免疫荧光试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。超敏ECL化学发光试剂盒购自碧云天生物研究所。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 μm)购自美国Corning公司。

1.2 细胞培养

正常胃黏膜细胞GES-1和胃癌细胞系MGC803及BGC823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 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱, 2~3 d传代1次。正常胃黏膜细胞GES-1作为对照。

1.3 PSF 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依说明书(北京全式金生物技术有限公司)转染入MGC803及BGC823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MGC803及BGC823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 Transwell侵袭实验

将上述分组处理的细胞按 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。

1.5 细胞免疫荧光染色

分别将转染与非转染胃癌MGC803和BGC823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%双氧水与甲醇混合浸泡60 min以灭活内源性过氧化物酶,洗涤后以5%牛血清白蛋白封闭60 min,分别加入CDH17、E-cadherin和N-cadherin一抗(1:100), 4 $^{\circ}\text{C}$ 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。正常胃黏膜上皮细胞作为对照。

1.6 Western blot

细胞分别按上述分组处理后,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30 μg/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), E-cadherin (1:1 000) 和 N-cadherin (1:1 000) 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。

1.7 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 q 检验。

2 结果

2.1 细胞系侵袭力检测及沉默CDH17对胃癌细胞侵袭力的影响

Transwell侵袭实验显示正常胃黏膜细胞GES-1未见穿膜细胞,胃癌细胞系MGC803和BGC823穿膜细胞数分别为 $8\ 850 \pm 845$ 、 $3\ 750 \pm 520$,且MGC803细胞穿膜细胞数明显多于BGC823细胞 ($P < 0.05$)。

对胃癌细胞系MGC803和BGC823转染CDH17 siRNA后,胃癌细胞系MGC803细胞和BGC823细胞穿膜细胞数较转染前明显减少,分别为 750 ± 175 、 675 ± 120 (均 $P < 0.05$),且MGC803细胞与BGC823细胞比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图1)。

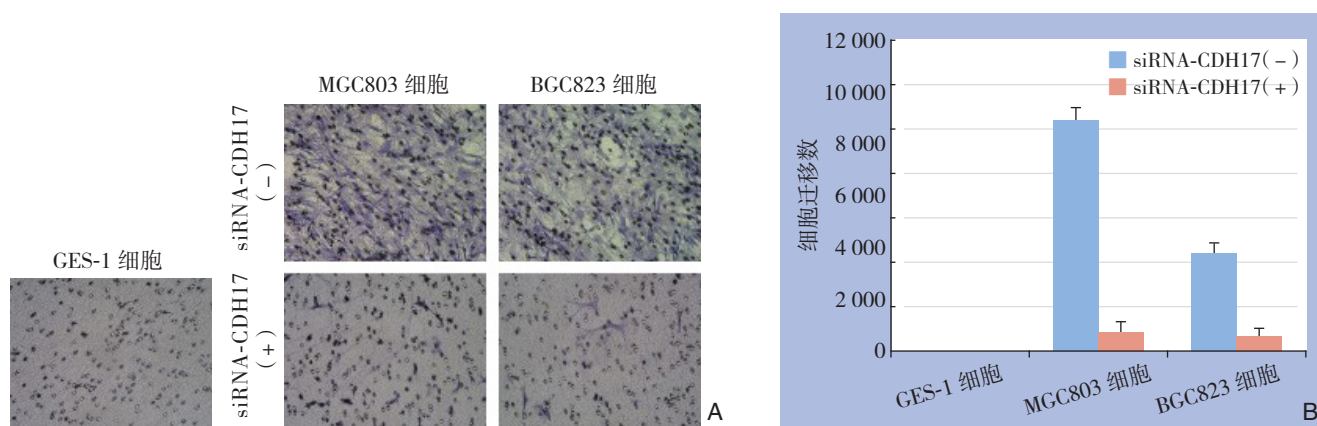


图1 细胞侵袭力检测

A: 穿膜细胞照片 ($\times 100$); B: 不同细胞细胞穿膜迁移数比较

Figure 1 Determination of cell invasiveness
different cells

A: Images of the invading cells ($\times 100$); B: Comparison of numbers of invading cells among

2.2 CDH17及表面标志物表达检测及CDH17对胃癌细胞CDH17及表面标志物表达的影响

免疫细胞荧光染色及Western blot检测显示,正常胃黏膜细胞系GES-1未见CDH17和间质标志物N-cadherin表达,上皮标志物E-cadherin高表达。与正常胃黏膜细胞系比较,胃癌细胞系MGC803及BGC823中CDH17和间质标志物N-cadherin高表达 (均 $P < 0.05$),而上皮标志物E-cadherin低表达 (均 $P < 0.05$)。同时高侵袭性的MGC803胃癌细胞系CDH17和N-cadherin的表达相对高于低侵袭性的

BGC823胃癌细胞系,而上皮标志物E-cadherin表达相对低于低侵袭性的BGC823胃癌细胞系,但均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

转染CDH17 siRNA后, MGC803细胞和BGC823细胞中CDH17表达及间质标志物N-cadherin表达均较转染前均明显降低 (均 $P < 0.05$),而上皮标志物E-cadherin表达较转染前均明显升高 (均 $P < 0.05$)。转染后CDH17及标志物的表达在两种细胞间差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (图2)。

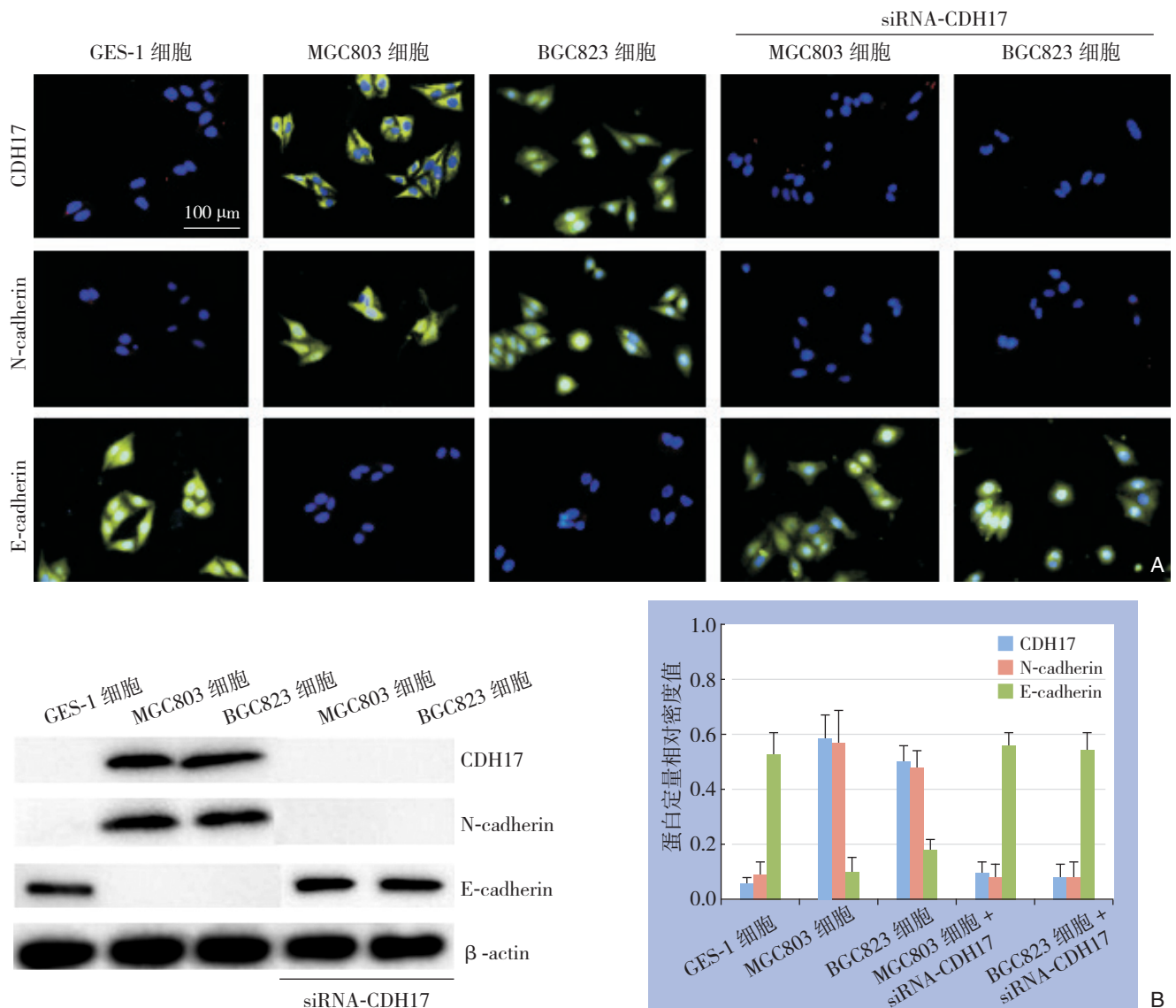


图 2 CDH17 及表面标志物表达检测 A: 免疫荧光染色 (×400); B: Western blot 检测

Figure 2 Determination of the expressions of CDH17 and surface markers A: Immunofluorescence staining (×400); B: Western blot analysis

3 讨论

胃癌发病率和病死率很高, 在亚洲国家尤为突出, 胃癌细胞极易出现淋巴结转移, 一旦出现淋巴结转移, 患者预后明显变差^[12-13]。近期研究^[14]发现 CDH17 阳性与胃癌的微血管浸润及淋巴转移密切相关, 同时 CDH17 可通过调节 β -catenin/Wnt 和 Ras/MEK 信号通路参与胃癌的恶性增殖进展过程^[9-11]。本实验通过比较 CDH17 在不同侵袭性胃癌细胞中的差别及相关表面标志表达差别, 初步明确 CDH17 在胃癌细胞侵袭力中的作用, 再通过应用干扰 RNA 技术, 沉默 CDH17 表达, 观察沉默前后不同胃癌细胞系侵袭力变化, 及上皮标志和间质标志表达变化, 探讨 CDH17 在胃癌细胞侵袭性中的可能作用机制。

本研究发现胃癌细胞系中 CDH17 表达明显升高, 而正常胃黏膜细胞不表达 CDH17, 提示 CDH17 是胃癌细胞恶性标志之一。同时, 高侵袭性的胃癌细胞 CDH17 表达高于低侵袭性的胃癌细胞, 进一步提示 CDH17 在胃癌的侵袭、转移能力中发挥作用, 进而印证 CDH17 的表达情况在临床中作为指示胃癌淋巴转移和指导分期的实际意义。本研究还发现, 在高侵袭性胃癌细胞高表达 CDH17 的同时, 伴随上皮标志物 E-cadherin 表达下调和间质标志物 N-cadherin 的表达上调, 提示 CDH17 的表达与上皮间质转化过程密切相关。上皮间质转化是肿瘤的侵袭和远处转移的基础, 这种表型的转换允许肿瘤细胞摆脱细胞-细胞间连接, 而表现得更具侵袭性。其中 E-cadherin 在上皮

间质转化中发挥关键作用^[15-17], E-cadherin的表达缺失将导致细胞间连接松散, 细胞易于游走、侵袭, 同时N-cadherin的表达将使细胞更易于与间质纤维黏附, 进一步促进细胞摆脱正常锚定位置而通过间质向其他部位侵袭、转移^[18-20]。

此外本研究也显示, CDH17的表达程度与伴随的上皮和间质标志表达变化及侵袭力密切相关。高侵袭力的胃癌细胞CDH17表达相对高于低侵袭力的胃癌细胞, 其伴随的上皮标志物E-cadherin的表达也相对低于低侵袭力的胃癌细胞, 而间质标志物N-cadherin的表达则相对高, 进一步提示CDH17不仅可作为胃癌细胞是否具有侵袭力的观察指标, 一定程度上也可作为其侵袭力强度的评判指标。通过干扰RNA技术沉默胃癌细胞系CDH17表达后, 胃癌细胞的侵袭力明显下降, 标志表达变化逆转, 上皮标志表达增加, 而间质标志表达下降, 提示干预CDH17可作为抑制胃癌细胞侵袭、转移的有效手段之一。同时CDH17沉默后不同侵袭力胃癌细胞之间侵袭力下降至无显著差异的低水平状态, 进一步表明CDH17可能是胃癌细胞侵袭、转移的主要调节蛋白之一。

在探讨CDH17对胃癌细胞侵袭力影响的同时, 本研究揭示上皮间质转化这一生物学行为在其中的重要作用, 并表明相关分子可能成为遏制胃癌侵袭、转移的重要治疗靶点。进一步研究CDH17与上皮间质转化这一生物学行为的关系, 将可能阐明CDH17对胃癌细胞侵袭力作用的具体生物分子机制。

参考文献

- [1] Hartgrink HH, Jansen EP, van Grieken NC, et al. Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2009, 374(9688):477-490.
- [2] 胡林, 李昌荣, 李红浪. 胃全系膜切除在改善胃癌手术预后中的应用及前景[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(10):1406-1410.
- [3] 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.
- [4] 陆瑞祺, 吴巨钢, 周国才, 等. 胃癌中CXCR4和CD133的表达及其对淋巴转移的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(4):415-420.
- [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. doi: 10.1371/journal.pone.0056959.
- [6] Wang Y, Shek FH, Wong KF, et al. Anti-cadherin-17 antibody modulates beta-catenin signaling and tumorigenicity of hepatocellular carcinoma[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9):e72386. doi: 10.1371/journal.pone.0072386.
- [7] Lin Z, Zhang C, Zhang M, et al. Targeting cadherin-17 inactivates Ras/Raf/MEK/ERK signaling and inhibits cell proliferation in gastric cancer[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1):e85296. doi: 10.1371/journal.pone.0085296.
- [8] Bartolomé RA, Barderas R, Torres S, et al. Cadherin-17 interacts with α 2 β 1 integrin to regulate cell proliferation and adhesion in colorectal cancer cells causing liver metastasis[J]. *Oncogene*, 2014, 33(13):1658-1669.
- [9] Mongroo PS, Rustgi AK. The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition[J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 10(3):219-222.
- [10] Shao DD, Xue W, Krall EB, et al. KRAS and YAP1 converge to regulate EMT and tumor survival[J]. *Cell*, 2014, 158(1):171-184.
- [11] Xu W, Wang Z, Zhang W, et al. Mutated K-ras activates CDK8 to stimulate the epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer in part via the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(2 Pt B):613-627.
- [12] Yamaguchi N, Isomoto H, Fukuda E, et al. Clinical outcomes of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer by indication criteria[J]. *Digestion*, 2009, 80(3):173-181.
- [13] 李小宝, 梅乐园, 车向明. 影响胃癌预后因素的研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2013, 22(4):494-497.
- [14] Wang J, Yu JC, Kang WM, et al. The predictive effect of cadherin-17 on lymph node micrometastasis in pN0 gastric cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2012, 19(5):1529-1534.
- [15] 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.
- [16] 陈璐, 陈子华. 上皮间质转化与恶性肿瘤的转移和侵袭[J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(7):886-892.
- [17] 刘忠涛, 熊力, 文宇, 等. TGF- β 介导的上皮间质转化[J]. *中国普通外科杂志*, 2013, 22(2):211-217.
- [18] Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis[J]. *Dev Cell*, 2008, 14(6):818-829.
- [19] Buendia AJ, Peñafiel-Verdu C, Navarro JA, et al. N-cadherin expression in feline mammary tumors is associated with a reduced E-cadherin expression and the presence of regional metastasis[J]. *Vet Pathol*, 2014, 51(4):755-758.
- [20] Luo H, Hao X, Ge C, et al. TC21 promotes cell motility and metastasis by regulating the expression of E-cadherin and N-cadherin in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2010, 37(4):853-859.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 卢昕, 孟庆彬, 邵永胜. CDH17对胃癌细胞侵袭性的影响及其机制[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(10):1406-1410. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.012

Cite this article as: LU X, MENG QB, SHAO YS. Influence of CDH17 on invasion ability of gastric cancer cells and the mechanism[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(10):1406-1410. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.012