

OPN 通过 SDF-1/CXCR4 轴调控胃癌细胞的生物学行为

王 静¹, 张国新^{2*}

(¹苏州市吴中人民医院消化科, 江苏 苏州 215000; ²南京医科大学第一附属医院消化科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 观察骨桥蛋白(osteopontin, OPN)小干扰 RNA 稳定转染人胃癌细胞 SGC-7901 后, 细胞增殖、凋亡及迁移能力的变化并探讨其可能的分子机制。方法: 用脂质体法分别将 OPNsiRNA-pcDNATM 6.2 及空载体质粒 pcDNATM6.2 转染人胃癌细胞 SGC-7901, 稻瘟素筛选, 克隆环挑取细胞克隆, 用 Western blot 及 RT-PCR 技术筛选阳性克隆, 并检测稳转细胞中 OPN、趋化因子受体 4(CXCR4)、基质金属蛋白酶 2(MMP2)的表达, 应用 MTT 法、流式细胞仪、细胞迁移试验分别检测转染细胞的增殖、凋亡及迁移能力。结果: OPN siRNA 稳定转染细胞 SGC-7901 后, 稳转细胞中 CXCR4 和 MMP2 表达量下降; 细胞的增殖能力(与转染空载体质粒比较)降低、细胞凋亡率显著高于对照组, 转染细胞的迁移能力明显降低。结论: OPN siRNA 使胃癌细胞增殖和迁移能力降低、细胞凋亡增加; 提示 OPN 可能通过 SDF-1/CXCR4 轴及 MMP2 参与的信号通路调节肿瘤细胞生长及转移。

[关键词] OPN; CXCR4; MMP2; 胃癌; 迁移

[中图分类号] R735.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)08-1055-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20130806

Osteopontin regulates the biological behaviour of gastric cancer cell via SDF-1/CXCR4 axis

Wang Jing¹, Zhang Guoxin^{2*}

(¹Department of Gastroenterology, Suzhou Wuzhong People's Hospital, Suzhou 215000; ²Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the biological changes of human gastric cancer cell line SGC-7901, which was stably transfected with siRNA targeting osteopontin (OPN) and to study the molecular mechanism related to the biological changes. **Methods:** SGC-7901 cells were transfected with OPNsiRNA-pcDNATM6.2 and pcDNATM6.2 by lipofectamine 2000. Transfectants were selected and confirmed by Western blot and RT-PCR technique. The proliferation activity was detected by MTT assay and cell apoptosis was tested by flow cytometry. The migration of transfected cells was assayed by using transwell migration chambers. The expressions of OPN, CXCR4, MMP2 on mRNA and protein level were determined by RT-PCR and Western blot. **Result:** SGC-7901 cells were stably transfected with OPNsiRNA-pcDNATM6.2. MTT showed that the growth of OPNsiRNA transfected cells was slower than that of empty vector transfected cells. OPNsiRNA gene transfection can increase the apoptosis. The migration of cells transfected with OPNsiRNA was suppressed compared with the cells transfected with empty vector, and the expressions of CXCR4 and MMP2 in SGC-7901 cells were significantly suppressed after OPN silenced by RNA interference. **Conclusion:** After OPN siRNA treatment, the cell proliferation and motility are suppressed, and apoptosis is enhanced; CXCR4 and MMP2 are OPN targeting genes. OPN may regulate the growth and metastasis of tumor cell via SDF-1/CXCR4 axis and MMP2 involved signaling pathway.

[Key words] OPN; CXCR4; MMP2; gastric cancer; migration

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(8): 1055-1059]

[基金项目] 国家自然科学基金(30770992)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: guoxinz@njmu.edu.cn

cn

胃癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一^[1], 它严重威胁人民身体健康。我国属胃癌高发区, 每年有 15~16 万人死于胃癌, 胃癌易复发和转移是阻止患者生存率提高的主要原因。因此, 研究其复发和转

移的机制仍是当前胃癌防治的关键^[2]。骨桥蛋白(osteopontin, OPN)最早由 Senger 于 1979 年发现^[3], 是一种与恶性转化有关的包含 RGD(精-甘-门冬氨酸)整合素结合区的分泌性磷酸化糖蛋白, 它具有细胞因子和基质蛋白两种性质^[4]。OPN 在胃癌、肝癌、胰腺癌、结肠癌等肿瘤中均有表达^[5-8], 有文献报道抑制骨桥蛋白表达可降低肺癌的侵袭和增殖^[9]。但 OPN 调控肿瘤发生发展的分子机制尚不清楚, 本实验通过 RNA 干扰技术抑制人胃癌细胞株 SGC-7901 中 OPN 的表达, 观察 OPN 对该肿瘤细胞株生物行为的影响, 并探讨其可能的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人胃癌细胞 SGC-7901 购自中国科学院上海细胞所, OPNsiRNA-pcDNATM6.2、pcDNATM6.2 由上海英俊生物公司设计合成, OPN、趋化因子受体 4(CXCR4)、基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase-2, MMP2) 及内参照 β -actin 引物由上海申能博彩生物科技有限公司合成, 兔抗人 OPN、CXCR4 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司, 鼠抗人 MMP2 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 鼠抗人 Tubulin- α 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司, 脂质体细胞转染试剂 LipofectamineTM2000 购自美国 Invitrogen 公司, 稻瘟素购自美国 Sigma 公司, Transwell 小室购自美国 Corning Coster 公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒转染

用脂质体 LipofectamineTM2000 将 OPNsiRNA-pcDNATM6.2 及对应的空载体质粒转染人胃癌细胞 SGC-7901。转染前 1 d 取对数生长期的 SGC-7901 细胞 2.5×10^5 个接种于 35 mm 培养皿, 培养于不含抗生素的 DMEM 培养液(含 10%胎牛血清), 次日观察细胞长至约 90%聚合, 按试剂操作说明进行转染。经稻瘟素(3 mg/ml)筛选约 3 周后用克隆环挑出单克隆进行鉴定。

1.2.2 RT-PCR 和 Western blot

按《分子克隆》第 3 版操作。OPN 上游引物: 5'-GTTATGAAACGAGTCAGCTG-3', 下游引物: 5'-TTAATTGACCTCAGAAGATG-3'; CXCR4 上游引物: 5'-GCCTTATCCTGCCTGGTATTGTC-3', 下游引物 5'-GCCAAGAAAGCCAGGATGAGGAT-3'; MMP2 上游引物: 5'-TGATGGTGTCTGCTGAAAG-3', 下游引

物: 5'-CACGTGAAAAGTGCCTTG-3'; β -actin 上游引物: 5'-CCAGCCATGTACGTTGCTATC-3', 下游引物: 5'-CAGGTCCAGACGCAGGATGGC-3'。PCR 循环参数: OPN、CXCR4、 β -actin: 94°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环; MMP2: 94°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 1 min, 35 个循环。Western blot 中 OPN、CXCR4、MMP2、Tubulin- α 一抗稀释浓度分别为: 1:100、1:500、1:100、1:5 000。

1.2.3 MTT 细胞增殖试验

常规培养细胞, 在 96 孔培养板上接种细胞 1×10^3 个/孔, 每种细胞复孔 25 孔, 另外 25 孔不加细胞只加培养液作为调零孔, 5 孔为 1 组, 分为 5 组, 每孔 200 μ l 培养液, 置培养箱培养, 分别于 24、48、72、96、120、144 h 取 1 组细胞, 每孔加 5 mg/ml MTT 溶液 20 μ l, 继续培养 4 h, 弃去孔内的液体, 加入 150 μ l DMSO 充分溶解 MTT 还原产物, 在酶标仪上读取 490 nm 处的吸光度值, 计算各组平均值, 绘制细胞生长曲线。实验重复 3 次。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率 (Annexin V 双标法)

转染了 OPNsiRNA 及空载体的 SGC-7901 对数生长期细胞, 无血清培养液继续培养 24 h, 0.25%胰酶常规消化收获细胞, 1 500 r/min 离心 3 min, PBS 洗涤 2 次, 重悬于 100 μ l binding 缓冲液, 加入 5 μ l Annexin V-PE 和 5 μ l 7-AAD (50 μ l/ml) 混合, 室温避光孵育 15 min, 再加入 400 μ l binding 缓冲液, 上机检测细胞凋亡率, 计数 1×10^4 个细胞, 每组实验重复 3 次。

1.2.5 细胞迁移试验

对数生长期的 SGC-7901 细胞、转染了 OPN-siRNA 及空载体的 SGC-7901 细胞, 无血清培养液继续培养 24 h, 0.25%胰酶常规消化收获细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 用新鲜的培养液将细胞重悬, 细胞计数。在 Transwell 小室下层加入 600 μ l 完全培养液及趋化诱导剂 100 ng/ml SDF-1, 小室上层加入 2×10^5 个细胞, 继续孵育 24 h, 将小室取出, 甲醇固定 30 min, 苏木素染色 3 min, 伊红染色 20 min, 用棉签将小室膜上层未迁移至下层的细胞抹去, 显微镜下计数, 每个样品选取 5 个视野, 取平均值, 每组实验重复 3 次。

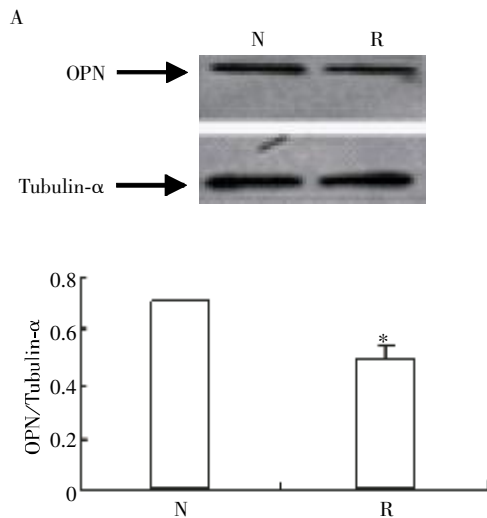
1.3 统计学方法

所有数据运用 SPSS11.0 软件分析, 均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组数据比较采用 *t* 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 稳转细胞的鉴定

SGC-7901 细胞分别转染 OPNsiRNA 基因及空载体质粒后, 挑取细胞单克隆进行扩增培养后用 Western blot 及 RT-PCR 法鉴定(图 1), 获得了稳定表达 OPNsiRNA 基因的 SGC-7901 细胞系(SGC-7901-OPNsiRNA-pcDNA™6.2)。



N:SGC-7901-pcDNA™6.2;R:SGC-7901-OPNsiRNA-pcDNA™6.2。与 N 组比较,* $P < 0.05$ 。

图 1 Western blot(A)和 RT-PCR(B)显示转染了 OPNsiRNA 质粒的细胞较转染空质粒的细胞中 OPN 的表达量明显减少

Figure 1 Western blot(A) and RT-PCR(B) show the expression of OPN in cells transfected with OPNsiRNA was decreased significantly compared with that of cells transfected with empty vector

2.2 OPNsiRNA 基因对 SGC-7901 细胞增殖的影响

OPNsiRNA 基因转染细胞后, 细胞增殖能力明显低于对照组(图 2, $P < 0.05$)。

2.3 OPNsiRNA 对 SGC-7901 细胞凋亡的影响

Annexin V 双标法显示转染了空载体质粒的细胞凋亡率为(4.98 ± 0.21)%(图 3A), 而转染了 OPNsiRNA 的 SGC-7901 细胞凋亡率为(11.78 ± 0.87)%(图 3B), 差异具有统计学意义(图 3C, $P < 0.05$)。

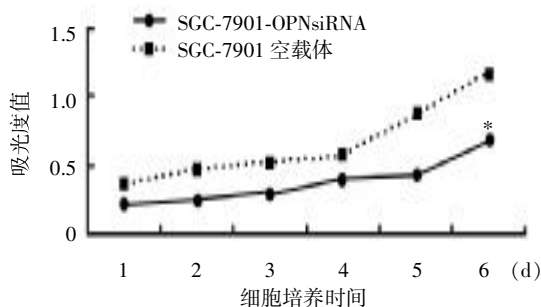
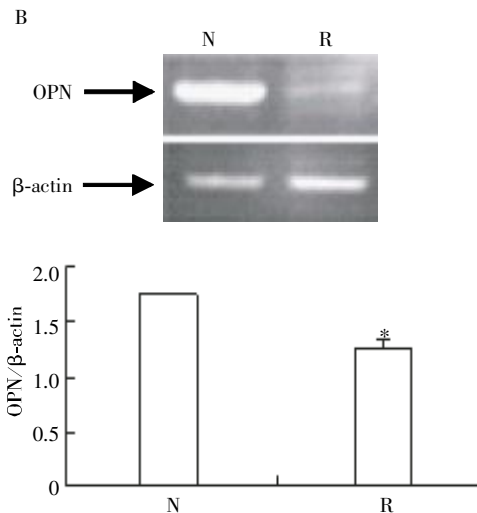


图 2 转染了 OPNsiRNA 质粒的细胞较转染了空质粒的细胞增殖能力明显下降

Figure 2 The cell proliferation of OPNsiRNA gene transfected cells was significantly slower than that of empty vector transfected cells

2.4 OPNsiRNA 对细胞迁移能力的影响

独立资料的 t 检验比较 Transwell 小室细胞迁移试验, 结果显示转染了 OPNsiRNA 的 SGC-7901 细胞迁移能力较转染了空载体质粒的细胞明显降低($P < 0.05$, 图 4)。

2.5 RNA 干扰抑制 OPN 后相关基因的表达

转染了空载体质粒的 SGC-7901 细胞及转染了 OPNsiRNA 的 SGC-7901 细胞常规培养, 细胞融合度达 80%后, 提取蛋白及 RNA 检测。结果与转染了 OPNsiRNA 的细胞相比, CXCR4 及 MMP2 在蛋白及 RNA 水平表达均明显降低(图 5), 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

每年世界上大约有 880 000 人被确诊为胃癌, 而死于胃癌的患者大约有 650 000 人^[10-11]。浸润性生长及远处转移是胃癌病死率升高的主要原因, 虽然目前已经从基因及生物学角度对胃癌的发病机制有了新的认识, 但是仍然没有有效措施降低胃癌的侵袭性生长和转移, 所以寻找调控胃癌侵袭及转移的关键基因及相应的信号通路, 并建立相应的阻断途径, 将是防治胃癌转移的重要措施。

OPN 是细胞外基质(ECM)中重要的功能性蛋

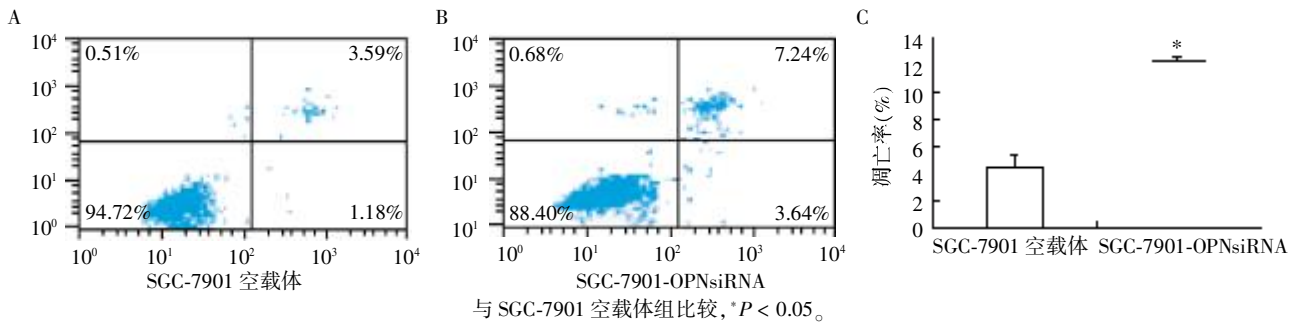
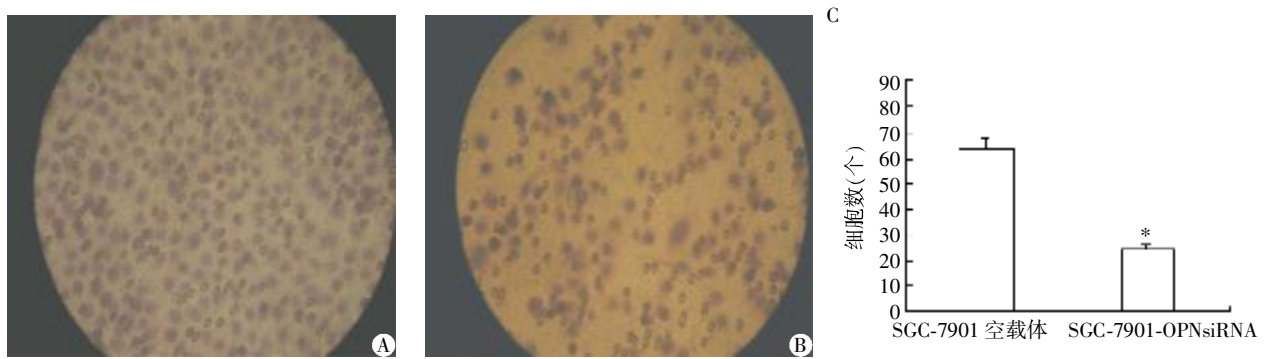


图3 转染了 OPNsiRNA 质粒的细胞较转染了空质粒的细胞凋亡率增高

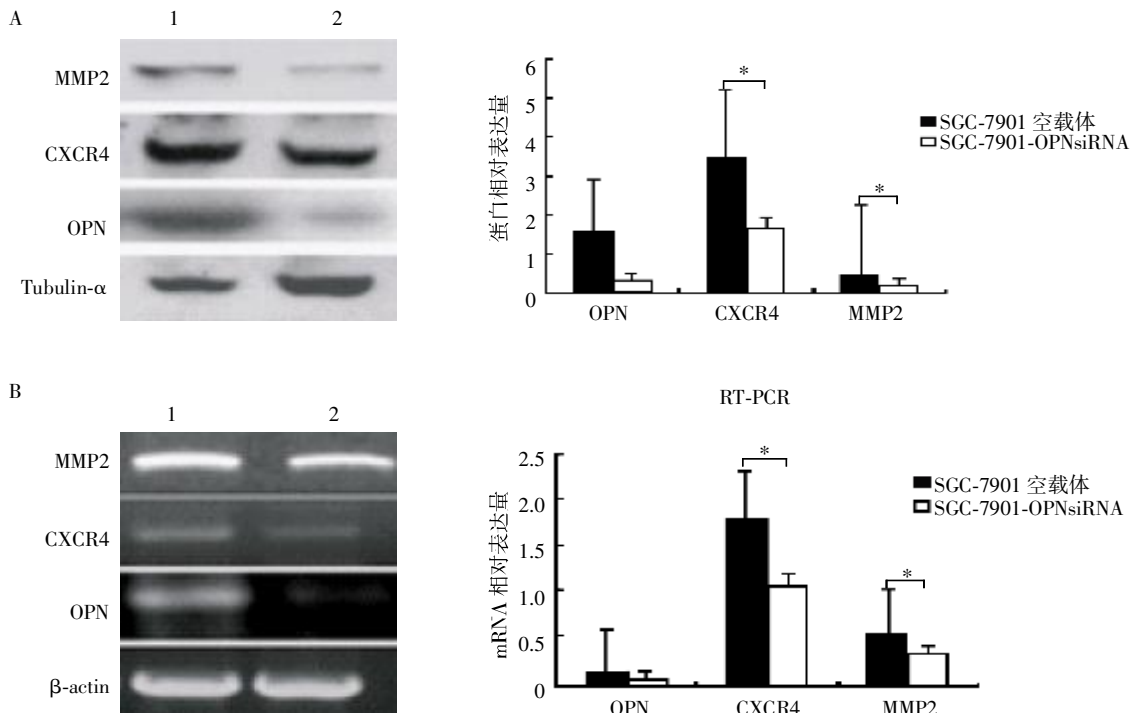
Figure 3 The apoptosis of transfected cells by OPNsiRNA gene was significantly increased than that of empty vector transfected cells



A: SGC-7901 空载体; B: SGC-7901-OPN siRNA; C: 与 SGC-7901 空载体组比较, *P < 0.05。

图4 转染了 OPNsiRNA 质粒的细胞较转染了空质粒的细胞迁移能力下降

Figure 4 The migration of cells transfected with OPNsiRNA was suppressed compared with that of cells transfected with empty vector



A: Western blot; B: RT-PCR; 1: SGC-7901 空载体; 2: SGC-7901-OPN siRNA, *P < 0.05。

图5 转染了 OPNsiRNA 质粒的细胞较转染了空质粒的细胞中 CXCR4 及 MMP2 表达量明显下降

Figure 5 The expression levels of CXCR4 and MMP2 in cells transfected with OPNsiRNA were decreased significantly compared with that of cells transfected with empty vector

白,它既是一种分泌型细胞外基质蛋白又是一种细胞因子,能促进细胞的趋化、黏附和迁移。OPN 与其特异的细胞表面受体相互作用启动信号转导级联反应,目前已经发现 OPN 通过多种信号途径在肿瘤的发生发展中发挥作用。研究发现 OPN 结合细胞膜上整合素和 CD44 受体后激活细胞内相关信号通路,促进肿瘤细胞侵袭转移^[12-13],OPN 通过激活 I κ B 激酶(I κ B kinase,IKK),使 I κ B α 磷酸化、降解,进而激活 NF- κ B,最终激活前基质金属蛋白酶-2(promatrix metalloproteinase-2,pro-MMP-2),引起细胞移行、ECM 浸润及肿瘤生长^[14]。

本研究发现,SGC-7901 转染 OPNsiRNA-pcDNATM6.2 质粒后,MTT 法绘制的细胞生长曲线显示转染 OPNsiRNA 基因的细胞增殖能力较对照组降低,在胃癌细胞 SGC-7901 中抑制 OPN 表达可以促进细胞凋亡,降低细胞迁移能力,这进一步证实了 Tang 等^[15]的研究结果。今后我们将继续应用细胞侵袭试验研究 OPN 对肿瘤细胞侵袭能力的影响。

从 OPN 激活受体转导信号,到最终导致细胞内基因表达的改变,其中参与的调节因子以及诸多细节仍不十分清楚。目前相关研究报道,OPN 及 SDF-1/CXCR4 生物轴都可以通过 MMPs 调节细胞的侵袭与转移。本实验首次发现,通过 RNA 干扰技术使 OPN 表达下降后,CXCR4 及 MMP2 的表达量较对照组明显下降,提示 SDF-1/CXCR4 生物轴及 MMP2 可能参与了 OPN 介导的肿瘤细胞生物学行为。但是否存在 OPN-SDF-1/CXCR4-MMP2 这一未被发现的信号途径参与肿瘤细胞的生物学行为,目前尚不清楚,今后我们将致力于这一方面的研究。

综上所述,通过 RNA 干扰技术可以成功地抑制人胃癌细胞 SGC-7901 中 OPN 的表达,从而抑制细胞增殖及迁移,促进细胞凋亡,使肿瘤恶性程度降低。此外我们发现了一条 OPN 调控肿瘤细胞生物学活性的新的信号途径,为此,可以利用干扰 OPN 及其信号通路中关键分子作为抑制肿瘤转移的新靶点。

[参考文献]

[1] Fan D,Zhang X,Chen X,et al. Bird's-eye view on gastric

cancer research of the past 25 years[J]. J Gastroenterol Hepatol,2005,20(3):360-365

- [2] Da N,Bao Q,Lu AP,et al. Tumor tissues is an independent prognostic indicator in gastric cancer[J]. Oncology, 2007,72:89-96
- [3] Sodek J,Ganss B,Mckee MD. Osteopontin[J]. Crit Rev Oral Biol Med,2000,11(3):297-303
- [4] 李会杰,刘亚玲,井永敏,等. 骨桥蛋白对 I 型神经纤维瘤病小鼠破骨细胞功能的影响[J]. 中华实验外科杂志,2011,28(11):2012
- [5] Zhang J,Takahashi K,Takahashi F,et al. Differential osteopontin expression in lung cancer[J]. Cancer Lett, 2001,171(2):215-222
- [6] 张翼,徐泽宽,张国新,等. 骨桥蛋白和基质金属蛋白酶-2 在胰腺癌中的表达及其临床意义[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2008,28(3):346-349
- [7] 陆健,李克,卞建民,等. 骨桥蛋白在肝癌中表达的临床意义[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2007,27(9):346-349
- [8] 王庆娜,朱海杭,刘军. 结肠癌中骨桥蛋白与环氧合酶-2 的表达及临床意义 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2012,21(2):137-139
- [9] 孙冰生,张真发,王长利. 抑制骨桥蛋白表达降低肺癌侵袭和增殖的机制[J]. 中华实验外科杂志,2011,28(8):1235-1237
- [10] Crew KD,Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer[J]. World J Gastroenterol,2006,12(3):354-362
- [11] Hohenberger P,Gretschel S. Gastric cancer [J]. Lancet, 2003,362(9380):305-315
- [12] Rittling SR,Chambers AE. Role of osteopontin in tumour progression[J]. Br J Cancer,2004,90(10):1877-1881
- [13] Wai PY,Kuo PC. The role of osteopontin in tumor metastasis[J]. J Surg Res,2004,121(2):228-241
- [14] Philip S,Kundu GC. Osteopontin induce nuclear factor kappa B-mediated promatrix metal-aproteinase-2 activation through I kappa B alpha/IKK signaling pathways,and curcumin(diferulolylmethane) down-regulates these pathways[J]. J Biol Chem,2003,278(16):14487-14497
- [15] Tang HW,Wang J,Bai FH,et al. Inhibition of osteopontin would suppress angiogenesis in gastric cancer [J]. Biochem Cell Biol,2007,85(1):103-110

[收稿日期] 2012-10-08