

IL-8 受体介导 c-Jun 和 Ets-1 异常调控 MMP-9 促进胃癌细胞侵袭

陈惠新^{1*}, 欧志英², 陈丽莎¹, 徐永成¹, 曾书君¹, 罗程¹, 余志金¹

(¹ 惠州市中心人民医院消化内科, 广东 惠州 516001; ² 广州市妇女儿童医疗中心, 广东 广州 510623)

[摘要] 目的: 探讨白介素-8 (IL-8) 受体促进胃癌侵袭所介导的分子机制。方法: 胃癌细胞培养后分别转染空白质粒 pcDNA3.1(+), 针对 IL-8 受体的反义表达质粒 pcDNA3.1(+)/as-IL-8G 和针对 IL-8 受体的正义表达质粒 pcDNA3.1(+)/s-IL-8G, Western blot 检测蛋白表达, 细胞侵袭力用相对侵袭细胞数量表示。结果: 低表达 IL-8 受体的胃癌细胞侵袭能力显著减弱, 且细胞内 c-Jun、Ets-1、MMP-9 的蛋白水平显著下降; 而高表达 IL-8 受体的胃癌细胞侵袭能力则显著增强, 且细胞内 c-Jun、Ets-1、MMP-9 的蛋白水平显著上升。用硫代磷酸化修饰的反义寡聚脱氧核苷酸阻断该细胞内 c-Jun 或 Ets-1 的表达后, MMP-9 的蛋白表达水平显著降低, 并伴随细胞侵袭能力明显下降。结论: IL-8 受体通过介导 c-Jun 和 Ets-1 异常调控 MMP-9 促进了胃癌细胞的侵袭过程。

[关键词] 胃癌; 侵袭; IL-8 受体; c-Jun; Ets-1; MMP-9

[中图分类号] R735.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)02-184-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20170210

IL-8 receptor mediated c-Jun and Ets-1 abnormal promoted gastric cancer cells metastasis through MMP-9

Chen Huixin^{1*}, Ou Zhiying², Chen Lisha¹, Xu Yongcheng¹, Zeng Shujun¹, Luo Cheng¹, Yu Zhijin¹

(¹Department of Gastroenterology, Huizhou Municipal Central Hospital, Huizhou 516001; ²Guangzhou Women and Children's Medical Centre, Guangzhou 510623, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the molecular mechanism in which IL-8 receptor promoted gastric cancer metastasis. **Methods:** Gastric cancer cells were cultured and transfected with IL-8 receptor antisense expression plasmid pcDNA3.1 (+)/as-IL-8G and IL-8 receptor sense expression plasmid pcDNA3.1 (+)/s-IL-8G. Protein expression was detected by Western blotting. Cell invasion was performed in Transwell and the invasion capacity was expressed by the relative invasive cell number. **Results:** Gastric cancer cells with lower expression of IL-8 receptor had significantly reduced invasion ability, and the expression of c-Jun, Ets-1 and MMP-9 decreased correspondingly, while higher expression of IL-8 receptor markedly enhanced the invasion capacity of gastric cancer cells, and the expression of c-Jun, Ets-1 and MMP-9 increased significantly. MMP-9 protein expression level decreased significantly after blocking the c-Jun or Ets-1 expression by phosphorylated modification antisense oligonucleotide technology, and the cell invasion ability decreased obviously at the same time. **Conclusion:** IL-8 receptor promoted gastric cancer cells metastasis through abnormal c-Jun and Ets-1-mediated MMP-9.

[Key words] Gastric cancer; Metastasis; IL-8 receptor; c-Jun; Ets-1; MMP-9

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(02): 184-188]

胃癌是一种严重危害人类健康的疾病, 我国是胃癌的高发区, 每年胃癌新发病例占全部恶性肿瘤

发病的 17% 以上, 病死率占全部恶性肿瘤的 20% 以上。转移是恶性肿瘤的本质特征, 是影响患者生命和治疗效果的主要原因, 也是胃癌患者主要的致死因素。目前胃癌转移的机制尚未完全阐明。值得关注的是, 大多数胃癌通过自分泌和旁分泌方式产生白介素-8 (IL-8), 同时共表达 IL-8 受体, 明显上调

[基金项目] 广东省自然科学基金面上项目 (S201310011923); 惠州市科技计划项目 (2013Y009)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: 13802473695@139.com

基质金属蛋白酶-9(MMP-9)活性^[1],并可能通过经典的 Ras-Raf-MEK-MAPK 通路,刺激肿瘤生长,增加肿瘤细胞运动能力和趋化性的直接作用,以及通过刺激血管新生和促进细胞外基质降解的间接作用来促进肿瘤的生长和转移^[2]。进一步研究发现, MMP-9 的启动子元件中存在着相邻的 Ets-1 和 c-Jun 结合位点^[3]。Ets-1 作为重要的转录因子, MAPK 家族成员 Erk1/2 对 Ets-1 蛋白磷酸化作用是其功能活化最重要的翻译后修饰方式。新近研究表明, Ets-1 具有增强胃癌转移的能力,被认为是促进肿瘤转移的治疗靶基因^[4],提示在胃癌中, MAPK 调节 Ets-1 活化。c-Jun 作为 AP-1 家族中重要的核转录调控因子,是 MAPK 家族成员 JNK 的有效底物。研究表明,在胃癌组织中 c-Jun 转录活性明显增强^[5],提示在胃癌中, MAPK 也同时调节 c-Jun 活化。但是 IL-8 调控 MMP-9 是否与 Ets-1 和 c-Jun 直接相关仍无相关报道,据此本研究考察 IL-8 受体调控 MMP-9 促进胃癌转移的相关分子机制,报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

人胃癌细胞系 AGS 来自武汉大学中国典型培养生物馆藏中心,胎牛血清、高糖 DMEM 培养基、Lipofectamine™2000、TRIzol、PCR 引物、RNA 逆转录试剂盒和质粒提取试剂盒(Invitrogen 公司,美国), Transwell 小室(装有碳酸聚酯微孔膜,孔径 8 μm, Corning 公司,美国), Matrigel(BD 公司,美国),其他试剂均为美国 Sigma 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、转染及筛选

AGS 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养,内含 100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素,在 37℃、5% CO₂ 的饱和湿度条件下培养。以 3×10⁵ 个/孔接种于 24 孔板,总体积 500 μL。转染组分别用无血清 DMEM 50 μL 将核酸和 Lipofectamine™2000 按 1:2 稀释,5 min 内将两者轻柔混匀,在室温下孵育 20 min,形成 Lipofectamine™2000 核酸复合物,加入细胞中轻柔摇匀,37℃、5% CO₂ 孵箱中孵育。分别转染空白质粒 pcDNA3.1(+)(对照组)、针对 IL-8 受体的反义表达质粒 pcDNA3.1(+)/as-IL-8G 和针对 IL-8 受体的正义表达质粒 pcDNA3.1(+)/s-IL-8G 质粒(实验组)(上海吉玛制药技术有限公司)48 h 后,加入 2 mg/mL 四环素筛选 1 周,待未转染组细胞全部死亡而质粒转染组有细胞存活后以 1 mg/mL 四

素维持培养,建立相应的稳定表达株。不含寡核苷酸的细胞转染液(对照组)、含硫代磷酸化修饰的 c-Jun 或(和)Ets-1 反义寡核苷酸(5'-TGAGATCGACGGCCGCCTTCATGGT-3';5'-TCATAGAACAGTCCG-TCACTTCAC-3')(上海吉玛制药技术有限公司)的细胞转染液(实验组)加入 AGS 细胞,48 h 后收集细胞进行后续检测。

1.2.2 Western blot

将实验组和对照组细胞的蛋白样品 60 μg 分别行 10% SDS-PAGE 电泳分离、转移至 PVDF 膜,室温下 5%脱脂奶粉封闭 1 h,加入相应的一抗(1:1 000)4℃孵育过夜,TBS/0.1% Tween-20 洗涤 3 次后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000),37℃孵育 1 h,TBS/0.1% Tween-20 洗涤 3 次后,用 ECL 发光显影。实验重复 3 次,结果取均值。

1.2.3 细胞侵袭实验

在 Transwell 上室滤膜上下表面分别涂纤维粘连蛋白 FN 5 μg 和 Matrigel 5 μg,抽气干燥备用。取指数生长期细胞,以 0.25%胰酶加 EDTA 消化、离心、计数后,以 0.1% BSA DMEM 培养液调整细胞数为 2×10⁶ 个/mL,取细胞 100 μL 接种于 Transwell 上室内,下室加入含 10% BSA 的 DMEM 培养液 600 μL,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中 24 h。培养结束,将滤膜以甲醇固定,HE 染色,棉签擦掉膜表面细胞,中性树脂封片。光镜下随机选择 5 个视野,计算侵袭细胞数,以侵袭细胞相对数目表示细胞的侵袭能力。实验重复 3 次,结果取均值。

1.3 统计学方法

用 SPSS 10.0 统计软件计算,组间分析采用方差分析及其两两比较的方法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建立稳定高表达和低表达 IL-8 受体的胃癌细胞株

AGS 细胞分别转染空白质粒 pcDNA3.1(+),针对 IL-8 受体的反义表达质粒 pcDNA3.1(+)/as-IL-8G 和针对 IL-8 受体的正义表达质粒 pcDNA3.1(+)/s-IL-8G 并进行四环素抗性筛选后,相应的稳定细胞株 AGS-Vector、AGS-as-IL-8G 和 AGS-s-IL-8G 分别提取蛋白并进行 Western blot 检测。结果如图 1 所示,在 AGS-as-IL-8G 细胞内 IL-8 受体(IL-8R)蛋白水平显著降低($P < 0.05$),而在 AGS-s-IL-8G 细胞内 IL-8G 蛋白水平显著升高($P < 0.05$)。

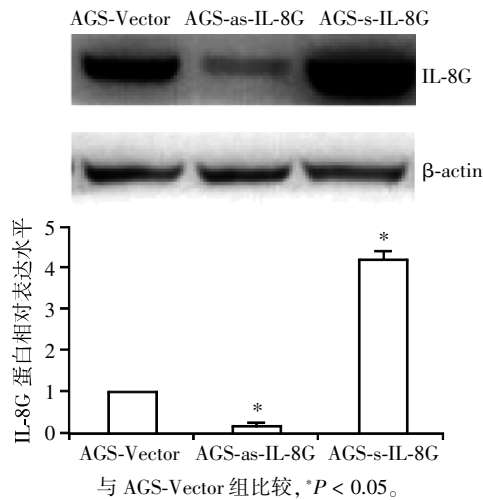


图 1 转染不同质粒后 IL-8 受体蛋白在 AGS 细胞中的表达
Figure 1 The expression of IL-8 receptor in AGS cells transfected with different plasmids

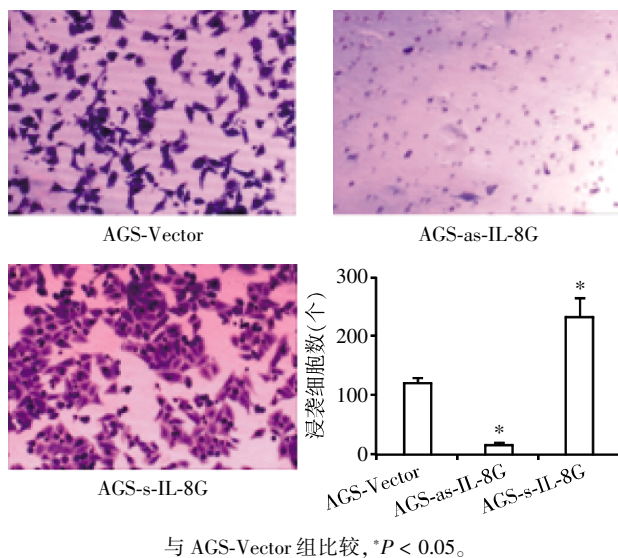


图 2 IL-8 受体对胃癌细胞的侵袭影响
Figure 2 The effect of IL-8 receptor on gastric cancer cells metastasis

2.2 IL-8 受体影响胃癌细胞的侵袭

为了探讨 IL-8 受体对胃癌细胞侵袭的影响,分别用细胞侵袭试验检测了 AGS-Vector、AGS-as-IL-8G 和 AGS-s-IL-8G 这 3 株细胞的侵袭能力。结果如图 2 所示,AGS-as-IL-8G 细胞的侵袭能力显著减弱 ($P < 0.05$),而 AGS-s-IL-8G 细胞的侵袭能力显著增强 ($P < 0.05$)。

2.3 IL-8 受体介导 c-Jun、Ets-1 和 MMP-9 的表达

为了研究 IL-8 受体影响胃癌细胞侵袭的分子机制,用 Western blot 检测了 AGS-Vector、AGS-as-IL-8G 和 AGS-s-IL-8G 这 3 株细胞内 c-Jun、Ets-1 和 MMP-9 的蛋白表达情况。结果如图 3 所示,在 AGS-

as-IL-8G 细胞内 c-Jun、Ets-1 和 MMP-9 的蛋白水平显著下降 ($P < 0.05$),而在 AGS-s-IL-8G 细胞内 c-Jun、Ets-1 和 MMP-9 的蛋白水平显著上升 ($P < 0.05$)。

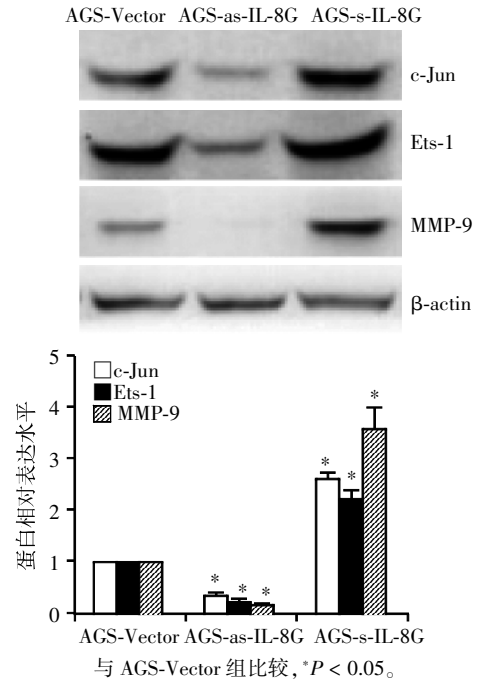


图 3 c-Jun、Ets-1 和 MMP-9 蛋白在各细胞株中的表达
Figure 3 The expression of c-Jun、Ets-1 and MMP-9 in different cell lines

2.4 c-Jun 和 Ets-1 调控 MMP-9 蛋白表达

为了分析 IL-8 受体介导 MMP-9 表达的分子机制,在 AGS-s-IL-8G 细胞内转染 c-Jun 或 Ets-1 的硫代磷酸化修饰的反义寡聚脱氧核苷酸(c-Jun-as、Ets-1-as)以阻断 c-Jun 或 Ets-1 的表达,然后用 Western blot 检测 MMP-9 蛋白的表达情况。结果如图 4 所示,分别阻断 c-Jun 或 Ets-1 后 MMP-9 的蛋白表达水平均有显著降低 ($P < 0.05$),而同时阻断 c-Jun 和 Ets-1 后 MMP-9 的蛋白表达水平降低更明显 ($P < 0.05$)。

2.5 c-Jun 和 Ets-1 调控 MMP-9 介导 IL-8 受体对胃癌细胞侵袭的影响

为了阐释 IL-8 受体对胃癌细胞侵袭的影响是否通过 c-Jun 和 Ets-1 调控 MMP-9,检测了 AGS-s-IL-8G 细胞在阻断 Ets-1 或 c-Jun 前后的侵袭能力。结果如图 5 所示,分别阻断 Ets-1 或 c-Jun 后细胞的侵袭能力均有下降 ($P < 0.05$),而同时阻断 Ets-1 和 c-Jun 后细胞的侵袭能力下降更明显 ($P < 0.05$)。

3 讨论

最近,本课题组利用蛋白组学方法,通过对人

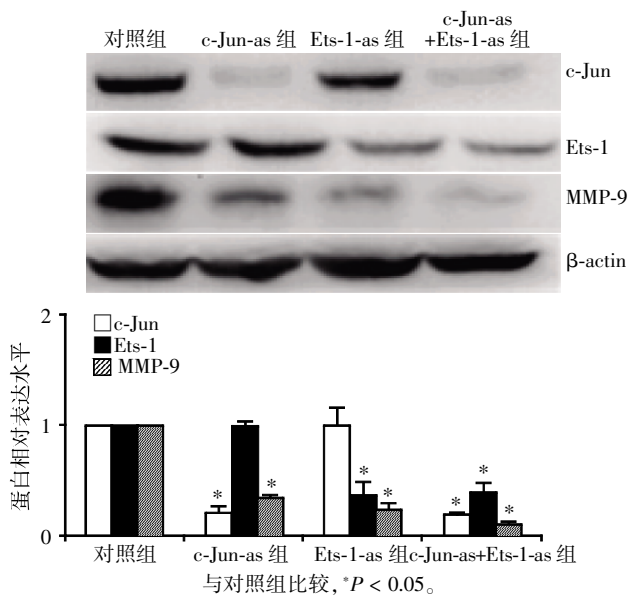


图 4 c-Jun 和 Ets-1 调控 MMP-9 蛋白表达

Figure 4 c-Jun and Ets-1 regulated the expression of MMP-9

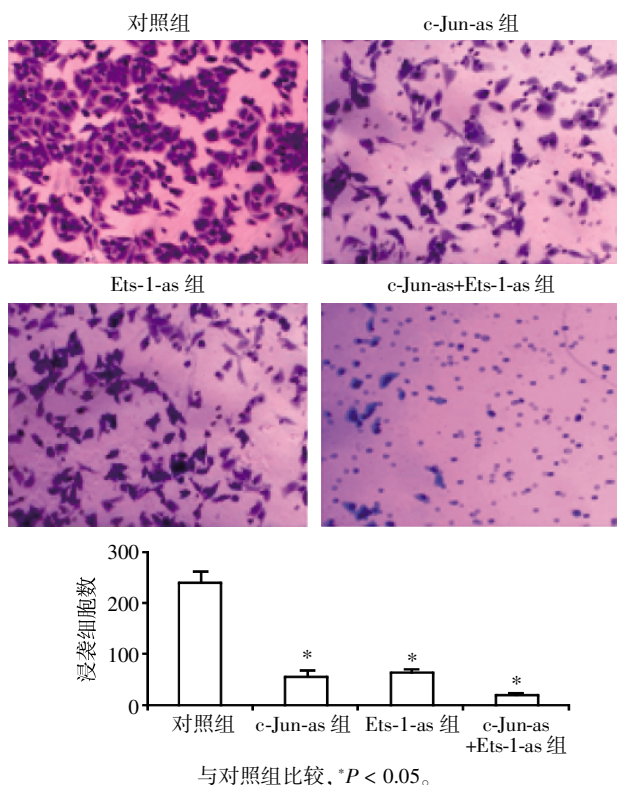


图 5 IL-8 受体介导 c-Jun 和 Ets-1 调控 MMP-9 对胃癌细胞侵袭的影响

Figure 5 The effect of IL-8 receptor mediated c-Jun and Ets-1 on gastric cancer cells metastasis through MMP-9

体正常胃黏膜、不同组织类型胃癌和转移癌进行二维蛋白电泳,与蛋白组数据库比较,检测上述组织蛋白差异表达谱,结合动物试验模型的研究结果,

筛选出 IL-8 受体、c-Jun、Ets-1、MMP-9、Syndecan-1、cdx2、CD44 等一系列与转移相关的差异表达基因,结果显示在胃转移癌中,其表达均明显增强^[6-12]。而本研究发现低表达 IL-8 受体的胃癌细胞侵袭能力显著减弱,且细胞内 c-Jun、Ets-1 和 MMP-9 的蛋白水平显著下降;而高表达 IL-8 受体的胃癌细胞侵袭能力显著增强,且细胞内 c-Jun、Ets-1 和 MMP-9 的蛋白水平显著上升,用硫代磷酸化修饰的反义寡聚脱氧核苷酸阻断该细胞内 c-Jun 或 Ets-1 的表达后, MMP-9 的蛋白表达水平显著降低,并伴随细胞侵袭能力的明显下降($P < 0.05$)。这些结果提示 IL-8 受体介导 c-Jun 和 Ets-1 异常调控 MMP-9 促进了胃癌细胞的侵袭过程。

IL-8 在多种肿瘤转移和侵袭中的作用早有报道,体外研究表明,转染 IL-8 基因的人源肿瘤细胞可导致裸鼠胃壁组织转移瘤的形成^[13]。近年来,多项研究表明过表达 IL-8 通过上调 MMP-9 的表达促进了肿瘤细胞生长和侵袭^[14-15],而最新研究亦报道了肿瘤细胞中 Ets-1 和 c-Jun 与 IL-8 的相互作用^[16-18]。

Ets-1 是最早发现的高度保守的转录因子 Ets 家族成员, Ets-1 在处于血管发育期间分化或迁移的内皮细胞、神经嵴细胞中高表达,在侵袭性肿瘤组织中表达丰富。最新研究发现^[19],转录因子 c-Jun 和 Ets-1 间存在 cross-talk。首先, Ets-1 启动子区存在 c-Jun 结合位点,表明 c-Jun 可能与 Ets-1 启动子区结合而影响 Ets-1 表达。其次,研究证实 Ets-1 与 c-Jun 在空间上存在相互作用,具有协同调控靶基因转录活性的作用。MMP-9 的启动子元件中相邻的 Ets-1 和 c-Jun 结合位点^[3],为 Ets-1 和 c-Jun 转录因子协同调控 MMP-9 提供了重要的分子结构基础。

MMP-9 由结缔组织细胞、巨噬细胞和肿瘤细胞等以前酶原形式表达和分泌,转录调节是 MMP-9 表达最主要的调节方式,依赖于 MMP-9 启动子区的 c-Jun、Ets-1 等多个转录因子结合位点,促进 MMP-9 表达。研究发现, AP-1 和 Ets-1 结合位点是 Ras 癌基因诱导的 MMP-9 上调所必需的,并且已有证据显示, MAPK 能同时活化 Ets-1 和 c-Jun,可能最大程度地诱导 MMP-9 表达^[20]。在动物模型中,阻断转录因子 c-Jun 与 MMP-9 启动子结合,可明显减少胃癌的侵袭和转移,延长小鼠寿命,提示 c-Jun 转录因子调控 MMP-9 表达,进而影响肿瘤的生物行为^[5]。MMP-9 表达高的患者,多出现肿瘤的侵袭和转移,预后差^[21-22]。本研究也发现 IL-8 受体通过 c-Jun 和 Ets-1

上调 MMP-9,从而促进了胃癌细胞的侵袭。

综上所述,本研究首次发现了 IL-8 受体介导 c-Jun 和 Ets-1 间 cross-talk 异常调控 MMP-9 表达这一新的信号转导通路在胃癌侵袭中的作用,为从更深层次阐明胃癌转移的分子机制提供了基础,也为确立胃癌治疗的新靶点提供了科学依据。

[参考文献]

- [1] Grant M, Wilson J, Rock P, et al. Induction of cytokines, MMP9, TIMPs, RANKL and OPG during orthodontic tooth movement[J]. *Eur J Orthod*, 2013, 35(5): 644-651
- [2] Wang J, Pan HF, Hu YT, et al. Polymorphism of IL-8 in 251 allele and gastric cancer susceptibility: a meta-analysis[J]. *Dig Dis Sci*, 2010, 55(7): 1818-1823
- [3] Poon GM. Sequence discrimination by DNA-binding domain of ETS family transcription factor PU.1 is linked to specific hydration of protein-DNA interface[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(22): 18297-18307
- [4] Ren TW, Zhou YN, Wu J, et al. Relationship between Ets-1 expression and angiogenesis, clinicopathological features and survival of patients with gastric carcinoma[J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2009, 31(9): 674-678
- [5] Park JS, Park JH, Khoi PN, et al. MSP-induced RON activation upregulates uPAR expression and cell invasiveness via MAPK, AP-1 and NF-B signals in gastric cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(2): 175-181
- [6] 陈惠新, 陈旻湖, 宋 鑫. 尾型同源盒转录因子 2 在胃癌癌变多阶段组织中的表达及其意义[J]. *中华医学杂志*, 2006, 86(4): 247-249
- [7] 席银雪, 宋 鑫, 陈惠新, 等. Syndecan-1 在胃癌癌变多阶段组织中的表达及其意义[J]. *中华肿瘤杂志*, 2007, 29(3): 193-196
- [8] 宋 鑫, 陈惠新, 陈 浩, 等. 幽门螺杆菌细胞毒素相关基因 A 对人胃腺癌 AGS 细胞生物学行为的影响[J]. *中华肿瘤杂志*, 2008, 30(5): 339-342
- [9] 宋 鑫, 陈惠新, 陈 浩, 等. Claudin-2 在胃粘膜癌变多阶段组织中的表达及意义[J]. *中华消化杂志*, 2008, 28(3): 189-190
- [10] Song X, Chen HX, Shen BC, et al. Expression of Cdx2 and claudin-2 in the mudtistage tissue of gastric carcinogenesis[J]. *Oncology*, 2007, 73(5-6): 357-365
- [11] Song X, Li X, Chen HX, et al. Expression of Claudin-2 in the mudtistage process of gastric carcinogenesis[J]. *Histol Histopathol*, 2008, 23(6): 673-682
- [12] 席银雪, 宋 鑫, 陈惠新, 等. 微血管密度在胃癌癌变多阶段组织中的表达及其意义[J]. *中华医学杂志*, 2006, 86(48): 3405-3408
- [13] Kim SY, Lee YC, Kim HK, et al. Helicobacter pylori CagA transfection of gastric epithelial cells induces interleukin-8[J]. *Cell Microbiol*, 2006, 8(1): 97-106
- [14] Shiau MY, Fan LC, Yang SC, et al. Human papillomavirus up-regulates MMP-2 and MMP-9 expression and activity by inducing interleukin-8 in lung adenocarcinomas [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54423
- [15] Peng PL, Hsieh YS, Wang CJ, et al. Inhibitory effect of berberine on the invasion of human lung cancer cells via decreased productions of urokinase-plasminogen activator and matrix metalloproteinase-2[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, 214(1): 8-15
- [16] Lee KH, Koh SA, Kim JR. Hepatocyte growth factor-mediated gastrin-releasing peptide induces IL-8 expression through Ets-1 in gastric cancer cells[J]. *Oncol Res*, 2013, 20(9): 393-402
- [17] Choi SE, Kim TH, Yi SA, et al. Capsaicin attenuates palmitate-induced expression of macrophage inflammatory protein 1 and interleukin 8 by increasing palmitate oxidation and reducing c-Jun activation in THP-1 (human acute monocytic leukemia cell) cells[J]. *Nutr Res*, 2011, 31(6): 468-478
- [18] Zhang E, Feng X, Liu F, et al. Roles of PI3K/Akt and c-Jun signaling pathways in human papillomavirus type 16 oncoprotein-induced HIF-1 α , VEGF, and IL-8 expression and in vitro angiogenesis in non-small cell lung cancer cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e103440
- [19] Peng Y, Li H, Wu M, et al. NGX6 inhibits AP-1 and Ets-1 expression and down-regulates cyclin D1 in human colorectal cancer[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2009, 41(6): 504-514
- [20] Liao YL, Hu LY, Tsai KW, et al. Transcriptional regulation of miR-196b by ETS2 in gastric cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(4): 760-769
- [21] Yu F, Jiang Q, Zhou Y, et al. Abnormal expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP9) correlates with clinical course in Chinese patients with endometrial cancer [J]. *Dis Markers*, 2012, 32(5): 321-327
- [22] Pan G, Zhang X, Ren J, et al. Semaphorin 5A, an axon guidance molecule, enhances the invasion and metastasis of human gastric cancer through activation of MMP9[J]. *Pathol Oncol Res*, 2013, 19(1): 11-18

[收稿日期] 2016-02-13