

网络出版时间: 2020-4-7 16:48 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200403.1821.008.html>

MAST3 对胃癌细胞 SGC-7901 细胞增殖及迁移的作用

王 磊 陈 鹤 张 敏 王中新

摘要 目的 探讨 MAST3 对胃癌细胞 SGC-7901 的增殖及迁移作用。方法 使用 Western blot 及 qRT-PCR 法检测 MAST3 在胃癌组织中的表达情况, 进一步将 MAST3-RNAi 和 pEx-3-MAST3 转染到 SGC-7901 细胞中, 分别使用 qRT-PCR、Western blot 检测 CyclinD1、C-myc 及 MMP-9、MMP-3 的表达, 观察 MAST3 对 SGC-7901 的增殖及迁移作用; 通过流式细胞仪检测细胞周期。结果 Western blot 结果显示, MAST3 在胃癌组织中高于癌旁组织($P < 0.01$), 且在 TGF- β 1 刺激后表达也随之增加。使用 MAST3-RNAi 抑制 MAST3 表达后, CyclinD1 和 C-myc 蛋白表达明显低于对照组($P < 0.01$), 且 S 期和 G₂/M 期细胞明显降低, 同时 MMP9 和 MMP3 蛋白表达也明显低于对照组; 使用 pEx-3-MAST3 过表达 MAST3 后, CyclinD1 和 C-myc 蛋白表达明显高于对照组($P < 0.01$), 且 S 期和 G₂/M 期细胞升高, MMP-9 和 MMP-3 蛋白表达也明显高于对照组。结论 MAST3 能够调控胃癌细胞 SGC-7901 细胞的增殖及迁移能力。

关键词 MAST3; 人胃癌 SGC7901 细胞; 增殖; 迁移

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)04-0523-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.04.008

胃癌作为目前常见的恶性肿瘤之一^[1], 具有较复杂的发病、侵袭及转移机制。其癌变过程是长期的细胞生物学行为由正常演变为异常的过程, 其发病与端粒酶激活、抑癌基因失活和癌基因激活等引发的多因素、多阶段及多基因变异相关^[2-3]。

目前有关 MAST3 基因的研究主要集中在炎症性肠病中, 研究^[4-5]表明缺失 MAST3 的细胞能够使 Toll 样受体 4 依赖的 NF- κ B 的活性下降, 由此也进一步证明了 NF- κ B 途径在炎症性肠病发病机制中起到重要作用。但对于 MAST3 基因在胃癌发生、发展中的作用及其机制等尚未完全明确。本研究旨在观察 MAST3 在胃癌中的表达情况以及探索干扰及过表达 MAST3 对胃癌细胞 SGC-7901 细胞增殖及迁

移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 胎牛血清来源于美国 PAN 公司; DMEM 高糖培养基购自美国 Hyclone 公司; Opti-MEM 购自美国 Gibco 公司; 转染使用的 Lipofectamine 2 000 Reagent 试剂购自美国 Invitrogen 公司; 人外源性生长因子 TGF- β 购自美国 PeproTech 公司; TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司; ReverTra Ace qPCR RT Master Mix 和 SYBR Green PCR Master Mix 均购自日本 TOYOBO 公司; RIPA 裂解液和细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 小鼠抗 β -actin 抗体和兔抗 MAST3 抗体购自美国 Bioworld 公司; 山羊抗兔和山羊抗小鼠的二抗购自北京中杉生物技术公司; 细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)、C-myc 抗体、MMP-3 和 MMP-9 购自美国 Cell signaling technology 公司; MAST3 的过表达质粒与小干扰 RNA 均购自上海吉玛制药技术有限公司。

1.2 样本收集与细胞培养 选取临床中 6 例 33~78(61 ± 4.8)岁胃癌患者, 在手术后分别选取胃癌和癌旁组织, 生理盐水清洗后, 多聚甲醛固定和冰冻保存, 同时患者已签署知情同意书。

人胃癌细胞株 SGC-7901 细胞来自安徽医科大学药学院赠送, 使用含 10% 胎牛血清的培养基于 37°C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

1.3 细胞转染 转染使用对数生长期的细胞, 按照说明书使用 Lip2000 将 MAST3-RNAi 和 pEx-3-MAST3 分别转染到 SGC-7901 细胞中, 6 h 后使用 TGF- β 进行刺激。细胞转染 48 h 后, 收集细胞进行后续研究。

1.4 qRT-PCR 检测细胞中 MAST3、CyclinD1、C-myc、MMP-3 和 MMP-9 mRNA 的表达 使用 TRIzol 法提取组织和细胞中总 RNA, 并使用 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix 逆转录成 cDNA。根据 SYBR Green PCR Master Mix 说明书步骤进行 qRT-PCR 检测。

1.5 Western blot 印迹法检测细胞中 MAST3、Cy-

2019-12-17 接收

基金项目: 安徽高校自然科学研究项目(编号: KJ2017A208)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院检验科, 合肥 230022

作者简介: 王 磊, 男, 硕士研究生;

王中新, 男, 副教授, 主任技师, 责任作者, E-mail: aywzhx87

@163.com

clinD1、C-myc、MMP-3 和 MMP-9 蛋白表达的改变

收集组织和处理后的细胞，并使用蛋白裂解液裂解；离心后提取组织和细胞中的总蛋白，并加入 SDS-蛋白上样缓冲液煮沸变性。使用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测蛋白相对表达量。按照组别依次加样，依次电泳、转膜、封闭后，一抗（稀释浓度均为 1:500）孵育过夜，之后二抗（稀释浓度均为 1:5000）孵育 1 h。使用凝胶成像分析系统扫描成像并分析。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期 收集处理后的细胞，冷 PBS 清洗 2 次后，使用 70% 乙醇固定变性过夜。离心、清洗后收集细胞，根据说明书加入 500 μl 缓冲液重悬细胞，分别加入 RNaseA、PI 4°C 避光孵育 30 min 后上机检测分析。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理，数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用方差分析（ANOVA），两独立样本之间比较采用 t 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MAST3 在胃癌组织中的表达 为了探究 MAST3 在胃癌中的作用，本研究首先选取胃癌组织和癌旁组织，并通过 Western blot 和 qRT-PCR 检测 MAST3 的表达情况。qRT-PCR 和 Western blot 结果显示，胃癌组织中 MAST3 mRNA 和蛋白表达均高于癌旁组织，且差异有统计意义 ($F = 21.36, P < 0.01$; $F = 18.76, P < 0.01$)，见图 1A、1B。同时，本研究还检测了 TGF-β1 对胃癌细胞株 SGC-7901 细胞中 MAST3 的表达的影响，TGF-β1 能够上调 SGC-7901 细胞中 MAST3 mRNA 和蛋白的表达，且差异有统计意义 ($F = 33.81, P < 0.01$; $F = 28.71, P < 0.01$)，见图 1A、1C。提示，MAST3 与胃癌的发生有着密切的关系。

2.2 沉默 MAST3 对 SGC-7901 细胞增殖及迁移的影响 使用 MAST3-RNAi 沉默 SGC-7901 细胞中 MAST3 的表达，观察对 SGC-7901 细胞增殖和迁移的影响。qRT-PCR 和 Western blot 结果证实 MAST3-RNAi 能够降低 TGF-β1 刺激 SGC-7901 细胞中 MAST3 mRNA 和蛋白的表达，且差异有统计意义 ($P < 0.01$)，见图 2A、2B。同时本研究还检测了细胞增殖相关基因 C-myc 和 CyclinD1 的表达变化，qRT-PCR 和 Western blot 结果表明 MAST3-RNAi 能够降低 TGF-β1 刺激 SGC-7901 细胞中 C-myc 和 CyclinD1 mRNA 和蛋白的表达，且差异有统计意义 (P

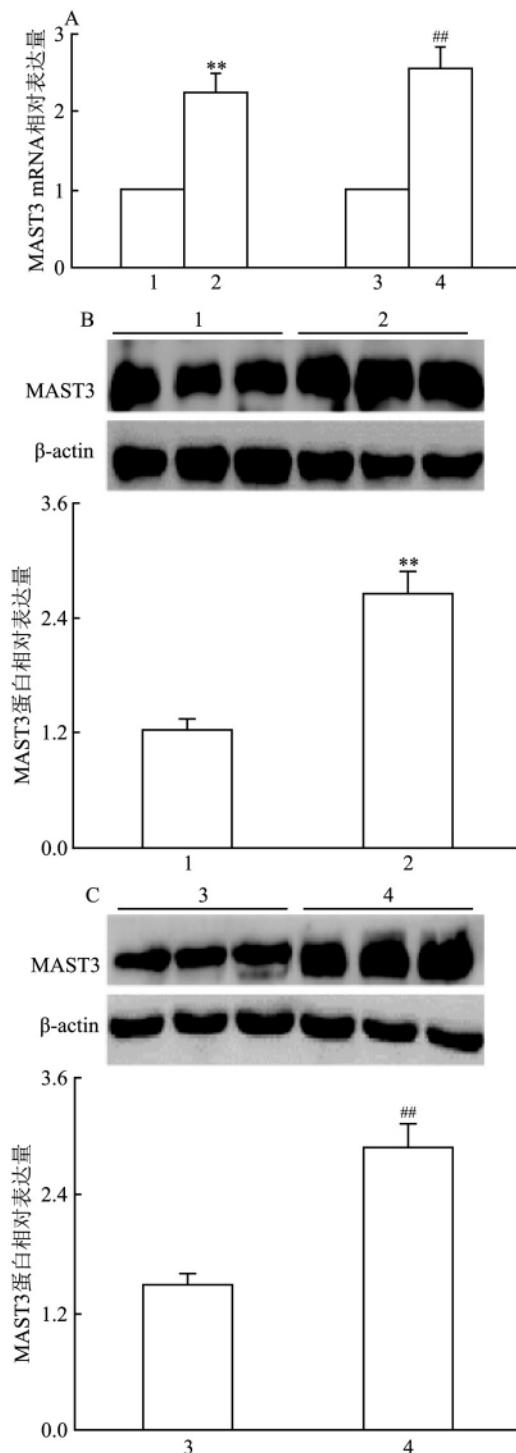


图 1 MAST3 在胃癌中的表达变化

A: qRT-PCR 检测 MAST3 mRNA 表达，胃癌组织（左侧），TGF-β1 刺激 SGC-7901 细胞（右侧）；B: Western blot 检测 MAST3 蛋白在胃癌中的表达；C: Western blot 检测 TGF-β1 刺激 SGC-7901 细胞中 MAST3 蛋白的表达；1: 癌旁组织；2: 胃癌组织；3: 对照组；4: TGF-β1 刺激组；与癌旁组织比较：** $P < 0.01$ ；与对照组比较：# $P < 0.01$

< 0.01 ），见图 2C、2D。细胞周期研究结果也表明，MAST3-RNAi 组 S 期和 G₂/M 期细胞比例（45 ± 5.2）% 明显低于 NC-RNAi 组 S 期和 G₂/M 期细胞

比例($65 \pm 8.7\%$)%，且差异有统计意义($P < 0.05$)，见图2E。本研究检测了细胞迁移相关基因MMP-3和MMP-9的表达变化，qRT-PCR和Western blot结果都表明MAST3-RNAi能够下调TGF- β 1刺激SGC-7901细胞中MMP-3和MMP-9 mRNA和蛋白的表达，且差异有统计意义($P < 0.01$)，见图2F、2G。提示抑制MAST3表达可以抑制胃癌细胞SGC-7901的增殖及迁移能力。

2.3 过表达MAST3对SGC-7901细胞增殖及迁

移的影响 为了进一步探究MAST3在胃癌中的作用，使用过表达质粒pEx-3-MAST3过表达SGC-7901细胞中MAST3的表达。qRT-PCR和Western blot结果证实pEx-3-MAST3能够增加TGF- β 1刺激SGC-7901细胞中MAST3 mRNA和蛋白的表达，且差异有统计意义($P < 0.01$)，见图3A、3B。qRT-PCR和Western blot结果表明pEx-3-MAST3能够升高TGF- β 1刺激SGC-7901细胞中C-myc和CyclinD1 mRNA和蛋白的表达，且差异有统计意义($P < 0.01$)，见图

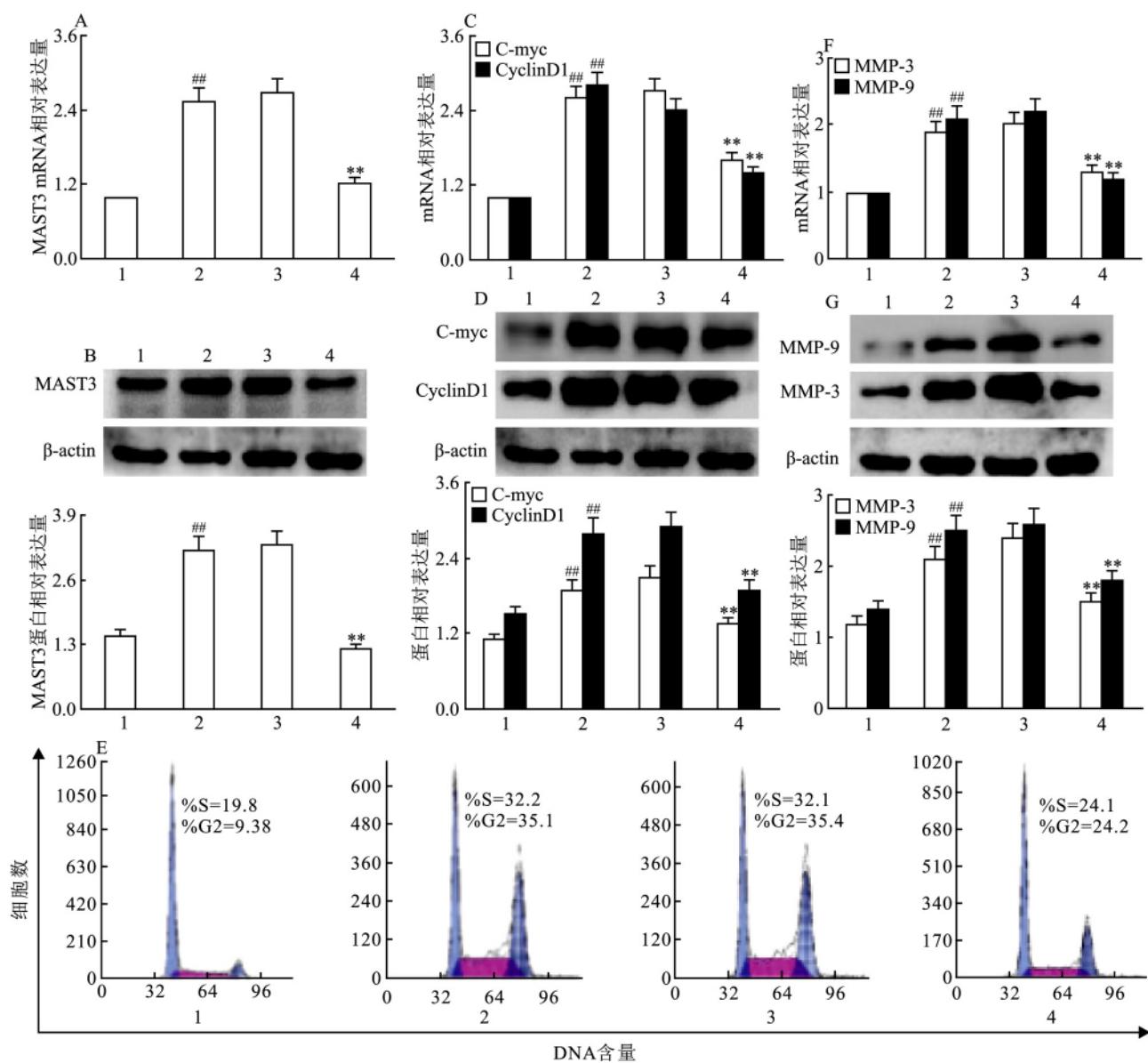


图2 MAST3-RNAi对SGC-7901细胞增殖及迁移的影响

A: qRT-PCR 检测 MAST3 mRNA 在 SGC-7901 中的表达；B: Western blot 检测 MAST3 蛋白在 SGC-7901 中的表达；C: qRT-PCR 检测 SGC-7901 细胞中 C-myc 和 CyclinD1 mRNA 的表达；D: Western blot 检测 SGC-7901 细胞中 C-myc 和 CyclinD1 蛋白的表达；E: 流式细胞仪检测 SGC-7901 细胞细胞周期；F: qRT-PCR 检测 SGC-7901 细胞中 MMP-3 和 MMP-9 mRNA 的表达；G: Western blot 检测 SGC-7901 细胞中 MMP-3 和 MMP-9 蛋白的表达；1: 正常组；2: TGF- β 1 刺激组；3: TGF- β 1 刺激 + NC-RNAi 组；4: TGF- β 1 刺激 + MAST3-RNAi 组；与正常组比较: ** $P < 0.01$ ；与 TGF- β 1 刺激 + NC-RNAi 组比较: ** $P < 0.01$

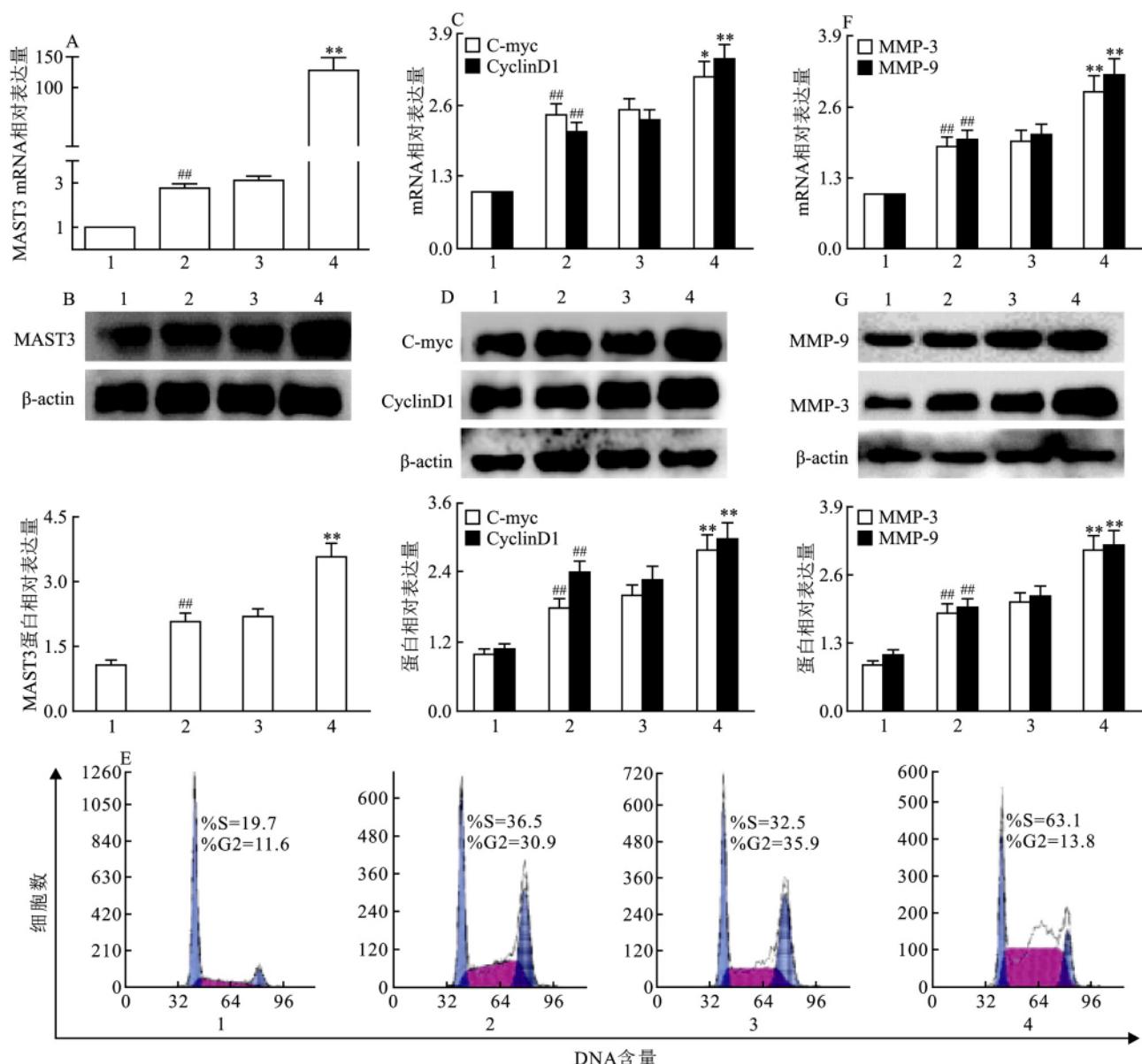


图3 pEx-3-MAST3 对 SGC-7901 细胞增殖及迁移的影响

A: qRT-PCR 检测 MAST3 mRNA 在 SGC-7901 中的表达; B: Western blot 检测 MAST3 蛋白在 SGC-7901 中的表达; C: qRT-PCR 检测 SGC-7901 细胞中 C-myc 和 CyclinD1 mRNA 的表达; D: Western blot 检测 SGC-7901 细胞中 C-myc 和 CyclinD1 蛋白的表达; E: 流式细胞仪检测 SGC-7901 细胞周期; F: qRT-PCR 检测 SGC-7901 细胞中 MMP-3 和 MMP-9 mRNA 的表达; G: Western blot 检测 SGC-7901 细胞中 MMP-3 和 MMP-9 蛋白的表达; 1: 正常组; 2: TGF-β1 刺激组; 3: TGF-β1 刺激 + pEx 组; 4: TGF-β1 刺激 + pEx-3-MAST3 组; 与正常组比较: **P < 0.01; 与 TGF-β1 刺激 + pEx 组比较: ***P < 0.01

3C、3D。细胞周期结果也表明, pEx-3-MAST3 组 S 期和 G₂/M 期细胞比例(77 ± 4.8)% 高于 pEx-3 组 S 期和 G₂/M 期细胞比例(66 ± 5.1)%, 且差异有统计意义($P < 0.05$), 见图 3E。qRT-PCR 和 Western blot 结果也都表明 pEx-3-MAST3 能够上调 TGF-β1 刺激 SGC-7901 细胞中 MMP-3 和 MMP-9 mRNA 和蛋白的表达, 且差异有统计意义($P < 0.01$), 见图 3F、3G。提示, 增加 MAST3 表达能够增加胃癌细胞 SGC-7901 的增殖及迁移能力。

3 讨论

胃癌发病机制较为复杂, 尚未能完全明确, 目前仍未有彻底治愈胃癌的治疗手段。肿瘤的发生发展是多基因参与的复杂过程, 包括癌基因的异常激活和抑癌基因失活^[6]。随着细胞分子生物学研究的进展, 肿瘤的基因靶向治疗成为国内外研究热点, 为寻求新的治疗方式应用于临床, 以达到更好的治疗效果。

MAST 家族是相对未知的激酶分支,而 MAST3 是 MAST 家族成员之一,序列同一性分析以及功能测定已显示 MAST3 参与许多细胞免疫应答的调节过程^[7-8]。有研究^[5]显示 MAST3 在鼠和人的免疫细胞中表达,同时阐明 MAST3 在调节肠道炎症中蛋白质相互作用中的功能将有助于确定导致肠道炎症的复杂分子机制^[9-10]。本研究中,通过 qRT-PCR 及 Western blot 检测 MAST3 的表达,结果表明胃癌中 MAST3 mRNA 和蛋白表达明显高于癌旁组织,说明 MAST3 与胃癌的发生有着密切的关系。

TGF-β1 是一种转化生长因子,它通常被用来诱导 SGC-7901 细胞发生上皮间质转化,使细胞发生增殖、迁移等,从而加重胃癌的发生发展^[11]。本研究显示 TGF-β1 能够增加胃癌细胞株 SGC-7901 细胞中 MAST3 mRNA 和蛋白的表达。同时,本研究还显示 MAST3 表达可以影响细胞周期蛋白 CyclinD1 和癌基因 C-myc 表达。CyclinD1 和 C-myc 已经被证明参与细胞的增殖,能够反映细胞增殖情况^[12]。Western blot 和 qRT-PCR 结果表明,使用 MAST3-RNAi 后,CyclinD1、C-myc 的蛋白及 mRNA 表达下调。相反,pEx-3-MAST3 增加 MAST3 表达后,CyclinD1、C-myc 的蛋白及 mRNA 表达明显上调。说明 MAST3 可能参与胃癌细胞的增殖。为了进一步确认并观察 MAST3 对细胞增殖的作用,本研究还分析细胞周期情况,结果显示 MAST3-RNAi 能够降低 SGC-7901 细胞中 S 期和 G₂/M 期细胞比例,抑制了细胞的有丝分裂,从而阻滞了细胞增殖;同时,过表达 MAST3 后,能够增加 SGC-7901 细胞中 S 期和 G₂/M 期细胞比例。这进一步说明了 MAST3 的表达可以调控 SGC-7901 细胞的增殖,从而参与胃癌的发生。

本研究还表明 MAST3 表达可以影响 SGC-7901 细胞的迁移。Western blot 和 qRT-PCR 结果显示,使用 MAST3-RNAi 后,MMP-9 和 MMP-3 的蛋白及 mRNA 表达下调。相反,pEx-3-MAST3 增加 MAST3 表达后,MMP-9 和 MMP-3 的蛋白及 mRNA 表达明

显上调。提示 MAST3 可能会影响 SGC-7901 细胞的迁移。

参考文献

- [1] 卢明东,孙维建,李丕宏,等.棉酚诱导人胃癌 MGC-803 细胞凋亡的影响及机制研究[J].中药材,2014,37(12):2263-6.
- [2] 陈慧,潘冰,张仙土,等.胃癌组织中 DPC4 蛋白的表达及其与临床病理特征的关系[J].中国现代医生,2013,51(14):91-3.
- [3] 陈鹤,卢杨,赵燕,等.miRNA-323 对胃癌细胞增殖作用的研究[J].安徽医科大学学报,2019,54(4):520-4.
- [4] Labbé C, Goyette P, Lefebvre C, et al. MAST3: a novel IBD risk factor that modulates TLR4 signaling[J]. Genes Immun, 2008, 9(7): 602-12.
- [5] Franks I. IBD: a MAST3-regulated gene set in IBD[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011, 8(12): 659.
- [6] 陈雪华,柯山,李建芳,等.TAGLN 在胃癌组织中的表达及其与转移的关系[J].上海交通大学学报(医学版),2007,27(5):503-7.
- [7] Andrade E C, Musante V, Horiuchi A, et al. ARPP-16 is a striatal-enriched inhibitor of protein phosphatase 2A regulated by microtubule-associated serine/threonine kinase 3 (mast 3 kinase)[J]. J Neurosci, 2017, 37(10): 2709-22.
- [8] Halling M L, Kjeldsen J, Knudsen T, et al. Patients with inflammatory bowel disease have increased risk of autoimmune and inflammatory diseases[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(33): 6137-46.
- [9] D'Aoust J, Battat R, Bessissow T. Management of inflammatory bowel disease with Clostridium difficile infection[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(27): 4986-5003.
- [10] Labbé C, Boucher G, Foisy S, et al. Genome-wide expression profiling implicates a MAST3-regulated gene set in colonic mucosal inflammation of ulcerative colitis patients[J]. Inflamm Bowel Dis, 2012, 18(6): 1072-80.
- [11] Liang M, Liu X C, Liu T, et al. GLI-1 facilitates the EMT induced by TGF-β1 in gastric cancer[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(20): 6809-15.
- [12] 彭伟辉,黄江生,段伦喜,等.miRNA-145 调控靶基因 c-Myc 抑制胃癌增殖、侵袭[J].医学研究杂志,2018,47(5):60-4.

Effect of MAST3 on proliferation and migration in gastric cancer SGC-7901 cells

Wang Lei, Chen He, Zhang Min, et al

(Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract **Objective** To investigate the effect of MAST3 on proliferation and migration in SGC-7901 cells.

网络出版时间: 2020-4-7 16:48 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200403.1821.009.html>

miR-486-5p 靶向 FOXO1 抑制结肠癌干细胞干性的初步研究

龚立刚¹, 艾成思², 王梦萍¹

摘要 目的 研究 miR-486-5p 在结肠癌(CRC)细胞系和 CRC 干细胞(CSCs)中的表达水平,并探讨 miR-486-5p 对 CRC CSCs 干性的影响和对 FOXO1 的靶向调控作用。方法

qRT-PCR 检测 miR-486-5p 在 CRC 细胞系 SW480、HCT116、SW620 和 HT29 及正常结肠细胞系 NCM460 中的表达水平。培养 HCT116 细胞中的 CSCs。Western blot 检测 Nanog、SOX2、OCT4 干性标志蛋白及 miR-486-5p 在 CSCs 中的表达。经脂质体分别转染 miR-486-5p mimic 和对照(NC)48 h 后, MTS 检测 CSCs 增殖能力, Transwell 实验检测 CSCs 转移能力, Boyden 实验检测 CSCs 侵袭能力。遗传霉素(G418)筛选稳定过表达 miR-486-5p 的 CSCs 细胞, 注射到 BALB/c 裸鼠皮下, 观察 miR-486-5p 对 CSCs 体内致瘤能力的影响。经 TargetScan 7.1 软件预测及双荧光素酶报道基因实验验证 miR-486-5p 对 FOXO1 基因的靶向作用。qRT-PCR 检测 miR-486-5p 对 CSCs 中 FOXO1 mRNA 表达影响。结果

qRT-PCR 结果显示 miR-486-5p 在 CRC 细胞系中的表达低于正常结肠细胞系(均 $P < 0.05$)。OCT4、Nanog、SOX2 干细胞标志物在 CSCs 中表达上调; miR-486-5p 在 CSCs 中表达显

著下降; miR-486-5p mimic 后, CSCs 细胞增殖、转移及侵袭能力均下降(均 $P < 0.05$)。CSCs_{miR-486-5p} 裸鼠成瘤能力降低($P < 0.05$)。TargetScan7.1 预测软件和双荧光素酶报道基因实验证实 FOXO1 为 miR-486-5p 的靶基因, miR-486-5p mimic 组 FOXO1 mRNA 的表达减少($P < 0.05$)。结论 miR-486-5p 在 CRC 细胞系和 CSCs 中均低表达, miR-486-5p 能通过负调控 FOXO1 抑制 CSCs 的干性。

关键词 结肠癌; CSCs; miR-486-5p; FOXO1; 干性

中图分类号 R 735.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)04-0528-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.04.009

结肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见的消化系统恶性肿瘤, 在世界肿瘤相关死亡中位居第四位^[1]。虽然 CRC 的手术治疗和化疗在过去几年取得了较大的进展, 但 CRC 患者的预后较差, 5 年生存率仅为 50%~65%^[2]。CRC 是较为复杂的疾病, 以腺瘤开始在慢性炎症和持续感染等因素作用下经过上皮细胞和癌前细胞突变的累积演变而来, 但其发生发展的具体作用机制尚未明确^[3]。同时 CRC 的重要特征为淋巴细胞浸润和转移, 而转移导致的治疗困难是 CRC 患者死亡的重要原因^[4]。因此, 寻找 CRC 恶性进展过程中发挥关键作用的调控因子,

2019-11-27 接收

基金项目: 湖北省卫生和计划生育委员会科研项目(编号: MJ2017Y065)

作者单位: 武汉市第八医院¹ 病理科、² 检验科 武汉 430010

作者信息: 龚立刚, 男, 主治医师, 责任作者, E-mail: gan20140204@126.com

Methods Western blot and qRT-PCR were used to detect MAST3 expression in gastric cancer tissues. MAST3-RNAi and pEx-3-MAST3 were further transfected into SGC-7901 cells, and the expressions of CyclinD1, C-myc, MMP9 and MMP3 were detected by qRT-PCR and Western blot, respectively, and the effect of MAST3 on the proliferation and migration of SGC-7901 cells was observed. Cell cycle was detected by flow cytometry. **Results** Western blot results showed that MAST3 was significantly higher in gastric cancer tissues than that in adjacent tissues($P < 0.01$), and the expression increased significantly after TGF-β1 stimulation. After MAST3-RNAi inhibited the expression of MAST3, the expression of CyclinD1 and C-myc protein was significantly lower than that of the control group($P < 0.01$), and the cells in S phase and G₂/M phase significantly decreased, while the expression of MMP-9 and MMP-3 protein was also significantly lower than that of the control. The expression of CyclinD1 and C-myc protein was significantly higher than that of the control group after pEx-3-MAST3 over-expression of MAST3($P < 0.01$), and the cells in S phase and G₂/M phase significantly increased, MMP-9 and MMP-3 protein expression was also significantly higher than that of the control group. **Conclusion** MAST3 can regulate the proliferation and migration of gastric cancer SGC-7901 cells.

Key words MAST3; SGC-7901 cells; proliferation; migration