

抑制 KIAA1429 表达对人胃癌细胞侵袭和迁移的影响及其机制

缪冉, 吴立胜, 代聪聪, 姚寒晖

摘要 目的 观察抑制 KIAA1429 基因对胃癌细胞侵袭和迁移能力的影响,并探讨其机制。方法 将细胞随机分为两组: 干扰组、对照组,分别转染针对 KIAA1429 基因的干扰慢病毒及阴性对照空载慢病毒。分别采用 qRT-PCR 法和 Western blot 法检测细胞中的 KIAA1429 mRNA 和蛋白表达情况; 采用 Transwell 实验观察细胞体外迁移及侵袭能力(穿膜细胞数), 细胞划痕实验观察细胞体外迁移能力(24 h 迁移距离); 采用 Western blot 法检测细胞上皮间充质转化(EMT) 相关分子(E-Cadherin、N-Cadherin) 蛋白表达量。结果 抑制 KIAA1429 基因表达后, KIAA1429 mRNA 及蛋白表达量降低; 与对照组比较, 干扰组穿膜细胞数减少, 24 h 迁移距离减少, 细胞中 N-Cadherin 蛋白表达减少, E-Cadherin 蛋白表达增加($P < 0.05$)。结论 慢病毒介导的抑制 KIAA1429 基因表达, 可降低胃癌 SGC7901 和 MGC803 细胞迁移和侵袭能力; 其机制可能与调控 N-Cadherin、E-Cadherin 的表达从而抑制 EMT 过程有关。

关键词 胃癌; KIAA1429; 细胞迁移; 细胞侵袭; 上皮间质转化

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)09-1372-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.09.008

胃癌是世界上最常见的消化道肿瘤之一, 超过 70% 的病例发生在发展中国家, 并且仍然是全球癌症死亡的主要原因之一^[1]。尽管近几十年来胃癌诊断和治疗取得了相当大的进展, 但 5 年总生存率仍不令人满意^[2]。因此, 进一步探索胃癌进展中新的生物学标志物对于了解胃癌发展和设计治疗靶标至关重要。

细胞的 RNA, 如 mRNA、circRNA、tRNA 等, 在不同位点携带数百种不同的转录后加工修饰。6-甲基腺苷(N⁶-methyladenosine, m⁶A) 是真核生物中 mRNA 最丰富的内部化学修饰^[3]。m⁶A 的动态调控蛋

白包括甲基转移酶(Writers)、去甲基化酶(Erasers) 和读取基因(Readers)^[4]。其甲基转移酶是多组分复合物, 由 METTL3、METTL14、WTAP、KIAA1429、RBM15 和 ZC3H13 组成^[5]。最近研究^[6-10] 表明, m⁶A 相关蛋白参与了不同类型癌症的发生和发展, 如急性髓性白血病、胆管癌、胶质母细胞瘤和肝细胞癌的发生发展都有 m⁶A 甲基转移酶的参与。然而, 作为 m⁶A 甲基转移酶复合物的关键组分, KIAA1429 在胃癌的发生和发展中的功能作用仍有待确定, 该实验运用慢病毒干扰胃癌细胞 KIAA1429 的表达, 观察其对胃癌细胞生物学性质的影响并初步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及细胞培养 人胃癌 SGC7901 和 MGC803 细胞株均购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。人胃癌 SGC7901 和 MGC803 细胞在补充有 10% 胎牛血清(美国 Gibco 公司) 和 1% 青霉素-链霉素混合物(美国 Gibco 公司) 的 1640 培养基(美国 Gibco 公司) 中培养。将细胞置于 37 ℃、5% CO₂ 的细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 中培养。

1.2 对照/干扰细胞系的建立 人胃癌 SGC7901 和 MGC803 细胞用含 10% 胎牛血清的 1640 培养液培养至融合度约 70%, 然后按照制造商(上海 Obio 公司) 的说明, 用 KIAA1429 干扰慢病毒和 pLKD-CMV-G & PR-U6 阴性对照载体转染胃癌细胞, 病毒转染 24 h 后更换含有 10% 血清的新鲜培养基。最后使用含 10 μg/ml 嘌呤霉素 1640 培养基筛选 14 d 后继续扩增。所获得的稳定转染的对照组细胞和干扰组细胞分别命名为 shRNA 和 shKIAA1429。

1.3 实时荧光定量 PCR 检测 SGC7901 和 MGC803 细胞中 KIAA1429 mRNA 表达 通过 TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司) 从培养的细胞中提取总 RNA, 并根据制造商的说明书用 Primescript RT 试剂(日本 TaKaRa 公司) 逆转录合成 cDNA。通过使用 StepOne Plus Real-time PCR 系统(美国 Applied Bio-

2019-04-04 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1808085MH285)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院普通外科, 合肥 230001

作者简介: 缪冉, 男, 硕士研究生;

吴立胜, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wlsh-eng1210@163.com

systems 公司), 用 SYBR Green RT-PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司) 进行所有 qRT-PCR 的 mRNA 分析。以下引物用于 qRT-PCR, KIAA1429 上游引物: 5'-GAGTAAGAGCCCATAGCAGT-3', 下游引物: 5'-TAGCACCAGACCATCAGTATTCAC-3'; β -actin 上游引物: 5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3', 下游引物: 5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3'。PCR 反应总体积为 10 μ l: ddH₂O 3.2 μ l、Rox 0.2 μ l、上游和下游引物各 0.3 μ l、Mix 5 μ l、cDNA 1 μ l。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 设置 40 个循环。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 mRNA 表达的相对变化。

1.4 Western blot 法检验 KIAA1429 蛋白水平

选取生长状态良好的胃癌 SGC7901 和 MGC803 细胞, 加入蛋白裂解缓冲液及蛋白酶抑制剂(上海碧云天公司) 冰上放置 20 min 后刮取细胞裂解物, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液并使用 BCA 蛋白质测定试剂盒(上海碧云天公司) 定量蛋白质, 加入蛋白上样缓冲液(5 $\times$) 后水浴煮沸 5 min 使其充分变性, 后置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。制备 12% SDS-PAGE, 以 β -actin 作为内参, 加入蛋白并电泳。将蛋白以湿转法转移到 PVDF 膜上, 并用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 然后分别将膜放入用一抗稀释液稀释配制的 KIAA1429 和 β -actin 抗体中, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日将 PVDF 膜清洗 3 次后, 分别加入羊抗兔 IgG 抗体(1:5 000, 美国 CST 公司) 和兔抗小鼠 IgG 抗体(1:5 000, 美国 CST 公司), 室温摇床孵育 1 h。再将 PVDF 膜清洗 3 次后, 加入显色液, 曝光并观察结果。

1.5 Transwell 细胞迁移侵袭实验 ① 细胞迁移实验选取生长状态良好的胃癌 SGC7901 和 MGC803 细胞, 以 0.25% 胰酶消化, 终止消化后离心弃去培养基, 用不含血清的 1640 培养基重悬细胞, 将细胞密度调整至 1×10^5 /ml。反复多次吹打混匀细胞悬液后, 取 200 μ l 细胞悬液加入 Transwell 小室上室。24 孔板下室中加入 600 μ l 含 10% 血清的 1640 培养基, 轻轻摇匀后放入培养箱中培养 24~48 h。取出 Transwell 小室, 弃去孔中培养液, 用棉签轻轻擦掉上室细胞, PBS 洗 3 次, 甲醇固定细胞 30 min, 适当风干小室后, 使用 0.1% 结晶紫染色 20 min, PBS 洗 3 次, 风干小室。将小室置于显微镜下, 随机选取 4 个视野观察细胞, 拍照并计数。② 细胞侵袭实验将 Matrigel 基质胶与 1640 培养基进行 1:15 比例稀释后包被 Transwell 小室上室, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱 30

min 使其聚合成凝胶, 使用前进行基底膜水化, 后续实验步骤与细胞迁移实验相同。

1.6 细胞划痕实验 选取生长状态良好的胃癌 SGC7901 和 MGC803 细胞, 以 0.25% 胰酶消化, 调整细胞浓度, 以每孔 8×10^4 个将细胞接种于 6 孔板中, 待细胞生长至覆盖皿底 80% 以上时, 使用 100 μ l 移液枪枪头在培养板上做十字划线, 弃培养基, PBS 清洗 3 次更换新鲜培养基, 显微镜下观察并拍照后放回培养箱培养。24 h 后再次弃培养基, PBS 清洗 3 次更换新鲜培养基, 显微镜下观察并拍照细胞的迁移愈合情况, 评价其转移能力。

1.7 Western blot 法分别检测 shRNA 和 shKIAA1429 细胞中 E-Cadherin、N-Cadherin 蛋白的表达水平 分别收集 SGC7901、MGC803 shRNA 和 sh-KIAA1429 细胞, 按 1.4 节的方法检测细胞中 E-Cadherin 及 N-Cadherin 蛋白的表达水平(1:1 000, 抗体均购自美国 CST 公司)。

1.8 统计学处理 所有实验独立重复 3 次。实验结果采用 SPSS 21.0 及 Graph Prism 6.0 软件进行分析及绘图, 定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 t 检验进行比较分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒转染抑制 KIAA1429 mRNA 表达 将 KIAA1429 干扰慢病毒载体和 pLKD-CMV-G & PR-U6 对照载体感染胃癌细胞, 应用实时荧光定量 PCR 法分别检测胃癌 SGC7901、MGC803 细胞 shRNA 组和 shKIAA1429 组 KIAA1429 mRNA 的表达水平。结果显示, 与 shRNA 组比较, shKIAA1429 组 KIAA1429 mRNA 的表达水平明显下调, 差异有统计学意义($t = 20.402, 15.627, P < 0.05$)。见图 1。

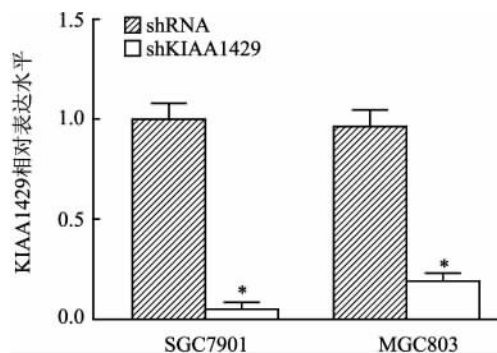


图1 实时荧光定量 PCR 检测 KIAA1429 mRNA 水平
与 shRNA 组比较: * $P < 0.05$

2.2 慢病毒转染抑制 KIAA1429 蛋白表达 进一

步使用 Western blot 法检测胃癌 SGC7901、MGC803 细胞 shRNA 组和 shKIAA1429 组 KIAA1429 蛋白的表达水平。结果显示 shKIAA1429 组 KIAA1429 蛋白相对表达量低于 shRNA 组(图 2)。这与实时荧光定量 PCR 的检测结果一致,说明在 SGC7901 和 MGC803 细胞中成功抑制 KIAA1429 基因的表达,可以用于后续实验。

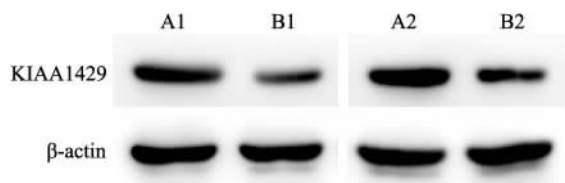


图 2 Western blot 法检测 KIAA1429 蛋白表达水平

A1: 胃癌 SGC7901 细胞的 shRNA 组; B1: 胃癌 SGC7901 细胞的 shKIAA1429 组; A2: 胃癌 MGC803 细胞的 shRNA 组; B2: 胃癌 MGC803 细胞的 shKIAA1429 组

2.3 干扰 KIAA1429 抑制胃癌细胞的迁移和侵袭

分别对 SGC7901 和 MGC803 细胞进行 Transwell 细胞实验。迁移实验结果(图 3A)显示,24 h 后 shKIAA1429 组细胞迁移个数较 shRNA 组低,差异有统计学意义($t = 4.111, 5.662, P < 0.05$)。同时侵

袭实验结果(图 3B)显示,shKIAA1429 组的细胞迁移率在 24 h 较 shRNA 组低,差异有统计学意义($t = 6.523, 14.581, P < 0.05$)。

2.4 干扰 KIAA1429 抑制胃癌细胞的划痕愈合能力

为进一步分析 KIAA1429 对胃癌 SGC7901 和 MGC803 细胞迁移的影响,采用划痕实验检测细胞迁移能力。与 shRNA 组比较,24 h 时 shKIAA1429 组划痕愈合率降低,差异有统计学意义($t = 6.836, 10.305, P < 0.05$)。见图 4。

2.5 干扰 KIAA1429 影响 E-Cadherin、N-Cadherin 蛋白表达

应用 Western blot 法检测 shRNA 组和 shKIAA1429 组细胞的上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)分子标志物的表达情况。结果显示,与 shRNA 组比较,shKIAA1429 组细胞 N-Cadherin 蛋白表达减少, E-Cadherin 蛋白表达增加,见图 5。

3 讨论

最近研究表明,m6A 基转移酶参与了不同类型癌症的发生和发展,如 WTAP 在白血病细胞的异常增殖中起重要作用^[6];同时在胆管癌特别是在淋巴

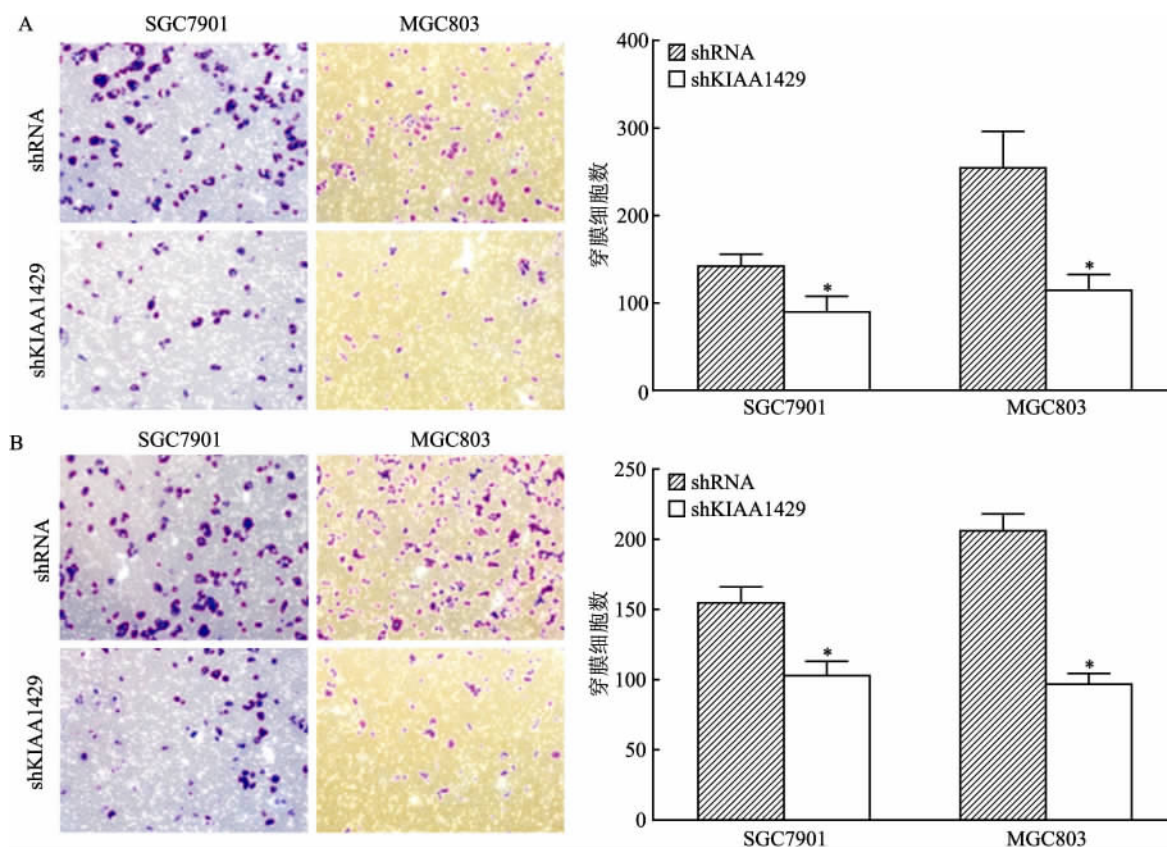


图 3 Transwell 细胞实验检测胃癌细胞迁移、侵袭能力

A: 迁移实验; B: 侵袭实验; 与 shRNA 组比较: * $P < 0.05$

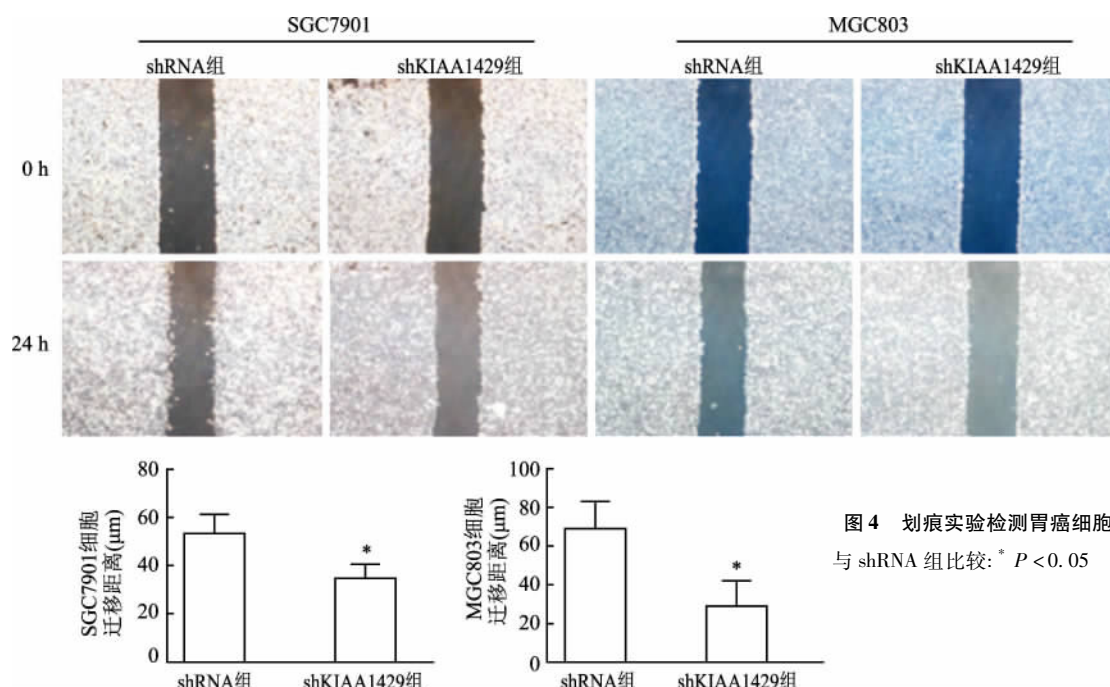


图4 划痕实验检测胃癌细胞迁移能力与 shRNA 组比较: * $P < 0.05$

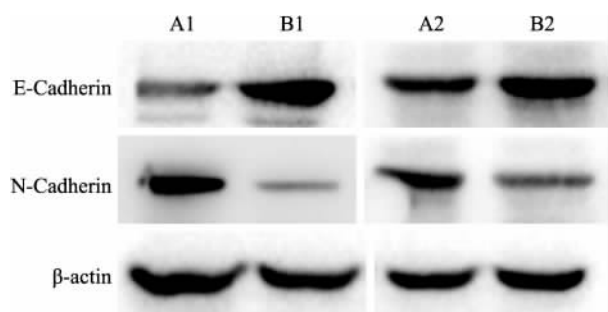


图5 Western blot 法检测胃癌细胞中 E-Cadherin、N-Cadherin 蛋白相对表达水平

A1: 胃癌 SGC7901 细胞 shRNA 组; B1: 胃癌 SGC7901 细胞 shKIAA1429 组; A2: 胃癌 MGC803 细胞 shRNA 组; B2: 胃癌 MGC803 细胞 shKIAA1429 组

结或血管内的转移性胆管癌细胞中过度表达: WTAP 的过度表达或干扰分别显著增加或减少胆管癌细胞的迁移和侵袭^[7]。Cui et al^[8] 发现在胶质母细胞瘤干细胞(GSCs)中, METTL3 沉默诱导的 m6A 水平降低导致癌基因如 ADAM19、EPA3 和 KLF4 的上调,同时下调 CDKN2A 和 BRCA2 等肿瘤抑制因子的表达。但是 Visvanathan et al^[9] 得到了相反的结论,他们发现 METTL3 介导的 m6A 修饰是 GSC 维持所必需的,研究结果表明 METTL3 在 GSCs 中上调, METTL3 的沉默则下调胶质瘤重编程因子 POU3F2、SOX2、SALL2 和 OLIG2 以抑制 GSCs 的生长。对于肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC),抑制 METTL14 增强了 HCC 细胞的转移能

力,过表达 METTL14 则抑制细胞迁移和侵袭^[10]。最近研究^[11]表明, KIAA1429 作为 m6A 甲基转移酶多蛋白复合物的催化成分之一,在肿瘤进展中同样起着至关重要的作用。然而, KIAA1429 对胃癌的发生发展有何意义,目前尚无相关报道。

为探索 KIAA1429 在胃癌细胞转移活性中的作用,本研究选取胃癌细胞系 SGC7901 和 MGC803 进行慢病毒转染,结果显示 shKIAA1429 组 mRNA 和蛋白表达量较 shRNA 组显著降低,验证了转染模型成功建立。通过 Transwell 细胞侵袭实验,发现干扰胃癌细胞 KIAA1429 基因后,细胞的侵袭能力随之降低。接着 Transwell 细胞转移实验以及细胞划痕试验结果表明,减少 KIAA1429 基因表达,胃癌细胞的转移能力也随之降低。总之,本实验表明 KIAA1429 基因的表达可以促进胃癌细胞的迁移及侵袭能力。

EMT 是胃癌进展的关键驱动因素,在胃癌侵袭、转移和复发的早期阶段发挥着重要作用。EMT 诱导的细胞迁移并通过淋巴系统和血液到达其转移生态位。并且 EMT 表型与恶性胃癌阶段相关^[12]。EMT 是一个复杂的多步骤过程,它不仅是一种复杂的形态学变化过程,同时与几种上皮和间充质基因的转录或表达水平改变有关^[13]。本研究显示, KIAA1429 基因表达受到抑制后,胃癌细胞中 EMT 过程受到抑制,表现为 E-Cadherin 表达上调而 N-Cadherin 表达下调。这表明抑制 KIAA1429 基因的表

达,减弱了胃癌细胞 SGC7901 和 MGC803 细胞侵袭和迁移的能力,其中的机制可能与 EMT 过程受到抑制有关。

参考文献

- [1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87–108.
- [2] Kamangar F, Dores G M, Anderson W F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(14): 2137–50.
- [3] Roundtree I A, Evans M E, Pan T, et al. Dynamic RNA modifications in gene expression regulation [J]. *Cell*, 2017, 169(7): 1187–200.
- [4] Zhao B S, Roundtree I A, He C. Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(1): 31–42.
- [5] Knuckles P, Lence T, Haussmann I U, et al. Zc3h13/Flacc is required for adenosine methylation by bridging the mRNA-binding factor Rbm15/Spenito to the m⁶A machinery component Wtap/Fl (2) d [J]. *Genes Dev*, 2018, 32(5–6): 415–29.
- [6] Bansal H, Yihua Q, Iyer S P, et al. WTAP is a novel oncogenic protein in acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2014, 28(5): 1171–4.
- [7] Hongjae J, Hyeun S, Myoungun H, et al. WTAP regulates migration and invasion of cholangiocarcinoma cells [J]. *J Gastroenterol*, 2013, 48(11): 1271–82.
- [8] Cui Q, Shi H, Ye P, et al. m⁶A RNA methylation regulates the self-renewal and tumorigenesis of glioblastoma stem cells [J]. *Cell Reports*, 2017, 18(11): 2622–34.
- [9] Visvanathan A, Patil V, Arora A, et al. Essential role of MET-TL3-mediated m⁶A modification in glioma stem-like cells maintenance and radioresistance [J]. *Oncogene*, 2018, 37(4): 522–33.
- [10] Ma J Z, Yang F, Zhou C C, et al. METTL14 suppresses the metastatic potential of hepatocellular carcinoma by modulating N⁶-methyladenosine-dependent primary microRNA processing [J]. *Hepatology*, 2017, 65(2): 529–43.
- [11] Wang X, Zhao B S, Roundtree I A, et al. N(6)-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency [J]. *Cell*, 2015, 161(6): 1388–99.
- [12] Zheng H, Li W, Wang Y, et al. miR-23a inhibits E-cadherin expression and is regulated by AP-1 and NFAT4 complex during Fas-induced EMT in gastrointestinal cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(1): 173–83.
- [13] Yang Y, Pan X, Lei W, et al. Transforming growth factor- β 1 induces epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis *via* a cell cycle-dependent mechanism [J]. *Oncogene*, 2006, 25(55): 7235–44.

Effect of KIAA1429 knockdown on invasion and migration of human gastric cancer cells and its mechanism

Miao Ran, Wu Lisheng, Dai Congcong, et al

(Dept of General Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To observe the effect of inhibiting KIAA1429 gene on the invasion and migration of gastric cancer cells, and to explore its mechanism. **Methods** The cells were randomly divided into two groups. The knockdown group and the control group were transfected with the interfering lentivirus against the KIAA1429 gene and the negative control empty lentivirus. The expression of KIAA1429 mRNA and protein was detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot. The migration ability was observed by cell scratch assay and Transwell assay. The invasion ability was observed by Transwell assay. Western blot was used to detect the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related molecules (E-Cadherin, N-Cadherin). **Results** The expression of KIAA1429 mRNA and protein was decreased after inhibiting the expression of KIAA1429 gene. Compared with the control group, the number of transmembrane cells in the knockdown group was decreased, the migration distance was decreased at 24 h, the expression of N-Cadherin protein was decreased, the expression of E-Cadherin protein was increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Lentivirus-mediated inhibition of KIAA1429 gene expression can reduce the migration and invasion of gastric cancer SGC7901 and MGC803 cells. The mechanism may be related to the regulation of N-Cadherin and E-Cadherin expression and inhibition of EMT.

Key words gastric cancer; KIAA1429; cell migration; cell invasion; epithelial-mesenchymal transition