

稳定转染靶向 autotaxin 的 shRNA 对胃癌细胞株 AGS 增殖、迁移及侵袭力的影响

陈周浔 郭 健 刘纳新 朱冠保

摘 要 **目的** 研究 shRNA 抑制人胃癌细胞株 AGS 中自分泌运动因子 Autotaxin 表达对胃癌细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响。**方法** 通过基因序列设计合成特异性 ATX - shRNA 及随机阴性对照 mock - shRNA, 构建相应的表达质粒 pSUPER - ATX 及 pSUPER - mock, 在阳离子脂质体的介导下将此表达质粒及空载质粒 pSUPER - control 转染至人胃癌细胞株 AGS。于转染后 24、48、72h 收集细胞, 用 RT - PCR 和 Western blot 法检测转染后各组细胞及野型 AGS 细胞的内源性 ATX mRNA 和蛋白的表达; 体外实验 (MTT 法、transwell 法及 matrigel 法) 测定肿瘤细胞增殖、体外迁移及侵袭能力。**结果** shRNA 表达载体 pSUPER - ATX 经限制性酶切及序列分析证明基因插入正确。转染 pSUPER - ATX 后的胃癌细胞 ATX mRNA 和蛋白较其他组表达明显降低 ($P < 0.01$), 其增殖、体外迁移及侵袭力也明显降低。**结论** shRNA 能有效持续抑制人胃癌细胞株 AGS 的 ATX 基因与蛋白的表达, 并降低癌细胞的迁移及侵袭力。

关键词 Autotaxin 短发夹 RNA 胃癌细胞 增殖 迁移 侵袭

Effects of Stably Expressing shRNA - targeted Autotaxin on Proliferation, Migratory and Invasive Capability of Gastric Carcinoma AGS Cells. Chen Zhouxun, Guo Jian, Liu Naxin, Zhu Guanbao. Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To explore the effect of shRNA targeting autotaxin on the migratory and invasive capability of human gastric cancer cell AGS. **Methods** The pSUPER - ATX and pSUPER - mock (non - specific), which were constructed in corresponding to the ATX - shRNA and negative control mock - shRNA synthesized on basis of gene sequence, were transfected with blank plasmid pSUPER - control into human gastric cancer cell AGS by Lipofectamine. At 24h, 48h and 72h post - transfection, the cells were harvested and analyzed. The endogenous ATX mRNA and protein of different group AGS cells were detected by RT - PCR and western blot assays. The cell proliferation was measured by MTT assay. In vitro transwell test and matrigel test were used to detect the cell migratory and invasive capability. **Results** PCR and Western blot analyses confirmed that the recombinant plasmids pSUPER - ATX, pSUPER - mock have been successfully constructed. The mRNA and protein level of ATX in pSUPER - ATX group were both significantly down - regulated ($P < 0.01$), and the cell proliferation, migration and invasive capability were significantly decreased as well. **Conclusion** The specific shRNA targeting ATX down - regulated the endogenous ATX of human gastric cancer AGS cells, and could inhibit the AGS cell proliferation, migratory and invasive capability.

Key words Autotaxin; shRNA; Gastric carcinoma cell; Proliferation; Migration; Invasiveness

胃癌的浸润转移是一个多因素综合作用的复杂的连续过程, 在这个过程中, 有许多不同因子在不同层次上单独调节, 或者通过相互间的调节来调控整个浸润转移过程; 另一方面肿瘤细胞自身的增殖和凋亡状态也与浸润转移的过程密切相关。由于对此机制缺乏深入了解, 阻碍了有效防治措施。Autotaxin 是一种胞外磷酸二酯酶、细胞自分泌运动刺激因子, 首先

由 Stracke 等^[1]从人类恶性黑色素瘤细胞 A2058 培养基中分离并纯化, 为 125kDa 胞外糖蛋白, 据报道能刺激黑色素瘤细胞产生随机性或方向性的运动。蛋白序列分析研究表明 ATX 与细胞表面一型溶血磷脂酶 D (lysophospholipase D, LysoPLD) 有显著的同源性, 通过对其外部氨基酸的剪切而被释放到胞外, 能将溶血磷脂酰胆碱 (LPC) 水解转化为被称为多功能“磷脂调控因子”的胆碱溶血磷脂酸 (LPA)^[2,3]。水解终产物 LPA 的产生能较充分地解释 ATX 对肿瘤细胞的间接调控影响。因此通过拮抗溶血磷脂酸的合成、阻断溶血磷脂酸的代谢途径和抑制溶血磷脂酸受体的活

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (Y207596)

作者单位: 325000 温州医学院附属第一医院胃肠外科

通讯作者: 陈周浔, 电子信箱: zhouxun.chen@hotmail.com

性及其信号转导, 可望成为抗肿瘤生长和转移的新方向。揭示自分泌运动因子 ATX 与胃癌浸润、转移及预后的关系, 对于阐明胃癌发展的分子机制以及防治有重大意义。而有效地阻断 ATX 活性则成为胃癌肿瘤分子靶靶, 并有可能为分子疗法提供新的理论及实践依据。

材料与方法

1. 材料: 菌株和质粒: 人胃癌细胞株 AGS、大肠杆菌 DH5 α 由本研究组保存。主要材料: pSUPER RNAi System, 购自 Oligoengine 公司, RT-PCR 试剂盒购自德国 QIAGEN 公司, Trizol 试剂及 LipofectamineTM 2000 Reagent 购自 Invitrogen 公司, RPMI 1640 培养基及 10% 牛胎血清购自 GIBCO 公司, Autotaxin (E-12) Antibody: sc-374222 购自 Santa cruz biotechnology 公司, 8 μ m 孔径的聚碳酸酯膜 transwell 小室购自 Corning 公司, matrigel 基质胶购自 BD PharMingen 公司。

2. 方法: (1) shRNA-ATX 设计、合成及质粒载体构建: 按照人 Autotaxin 基因序列, 通过网上设计软件 OptiRNA 中, 选取两条靶序列, 分别为 p1: 5'-ATCCTCGACATGGCAAGGAG-3' 和 p2: 5'-CTCAGAAAGTGAAATCTCGCTCTC-3' 设计并合成编码 shRNA 序列的 DNA 单链, 经退火连接后, 经由 Xho I/Bgl II 双酶切克隆至带有 H1 启动子的质粒载体 pSuper-neo-GFP 中, 用含卡那霉素抗性的 LB 平板筛选阳性克隆, 挑取克隆质粒后行酶切鉴定并测序。取得测序正确的重组 ShRNA-Autotaxin, PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40s (30 个循环), 72 $^{\circ}$ C 10min。将表达质粒转染胃癌细胞, 得到长期稳定低表达的细胞克隆。本实验设 4 组: 分别为 WT (野生型组)、pSUPER-control 空载质粒组、pSUPER-mock 组 (随机片段组)、pSUPER-ATX 组。(2) 蛋白质印迹法检测 ATX 蛋白的表达: 以 GAPDH 的水平作为等量蛋白质样本的内对照, 每个标本至少重复 3 次进行 SDS-PAGE 电泳, 并转至硝酸纤维素膜上, 室温封闭 2h 后, 用 TBST 缓冲液漂洗 3 次, 再加入兔抗人 ATX 抗体 (1:1000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 缓冲液漂洗 3 次后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗 (1:2000), 室温摇床孵育 1h, 增强化学发光系统显色, 暗室内 X 线底片感光成像。(3) 细胞增殖试验: 将细胞接种域孔板中培养, 每孔细胞数约为 2×10^3 个, 分别在培养 24、48、72、96h 后, 每孔加入 MTT 溶液 (5mg/ml) 20 μ l, 继续培养 4h 后, 吸弃上清液, 每孔加入二甲基亚砜 150 μ l, 室温下振荡 10min, 使结晶完全溶解。在酶标仪上于波长 490nm 处测定各孔的吸光度值。重复实验 3 次, 取平均值。(4) 细胞迁移及侵袭实验: 采用 Corning 公司 8 μ m 孔径的聚碳酸酯膜 transwell 小室 (24 孔板)。在 transwell 小室的下室中预先加入 600 μ l 20% FCS 的 1640 培养基, 37 $^{\circ}$ C 平衡 1h, 将不同胃癌细胞株的细胞用 PBS 洗 3 次。胰酶消化后重悬于含 10% FBS 的 1640 培养基中, 取 1×10^6 /ml 细胞 100 μ l 加入至 transwell 上室。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培

养。取出 transwell 小室, 从上室用棉棒擦净未穿透微孔滤膜的细胞。PBS 冲洗后用 4% 甲醛固定, 行 Giemsa 染色在 200 倍显微镜下计数滤膜下表面的细胞数, 随机计数 5 个视野中的细胞数目, 每个标本重复 3 次。以迁移细胞的数目 (取试验平均值) 来表示肿瘤细胞的迁移能力。与细胞迁移实验的不同, 细胞侵袭实验加用细胞外基质 matrigel (BD PharMingen) 来模拟体内细胞外基质环境。将细胞外基质 matrigel, 按 50 μ l/cm² 的比例加入 transwell 小室的聚碳酸酯膜上表面, 37 $^{\circ}$ C 或室温下通风橱中放置 30min 使其成胶。其余操作步骤同迁移实验。以侵袭细胞的数目来表示肿瘤细胞的侵袭能力。

3. 统计学方法: 数据采用 excel 数据包统计处理, 采用 *t* 检验, one-way ANOVA 法进行统计学处理, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. AGS 野型细胞和各组转染细胞的 ATX 差异性表达: 用 RT-PCR 检测细胞 ATX mRNA 表达的改变, 选取构建后的两个细胞克隆 pSUPER-ATX1 和 pSUPER-ATX2, 结果显示: 此两组 pSUPER-ATX 转染细胞的 ATX mRNA 表达量相对于 WT 细胞分别下降了 (79.34 $\pm$ 9.95)% 和 (95.42 $\pm$ 1.93)%, 提示在 shRNA 的作用下, ATX mRNA 的表达受到明显抑制 ($t = 7.247, P < 0.01$; $t = 14.391, P < 0.01$, 图 1), WT 组、pSUPER-control 组及 pSUPER-mock 组之间的 ATX mRNA 的表达量没有明显区别。用 Western blot 法检测细胞 ATX 蛋白表达的改变, 结果显示: 两组 pSUPER-ATX 转染细胞的 ATX mRNA 表达量相对于 WT 细胞分别下降了 (78.45 $\pm$ 5.45)% 和 (85.42 $\pm$ 3.56)%, 提示在 shRNA 的作用下, ATX 蛋白的表达受到明显抑制 ($t = 8.457, P < 0.01$; $t = 11.936, P < 0.01$, 图 2), 野型及阴性对照组的 ATX 蛋白的表达量没有明显区别。上述结果显示, pSUPER-ATX2 对细胞内源性 ATX 的表达抑制效果优于 pSUPER-ATX1, 故将 pSUPER-ATX2 组选为以下细胞生物学行为测定的实验细胞克隆。

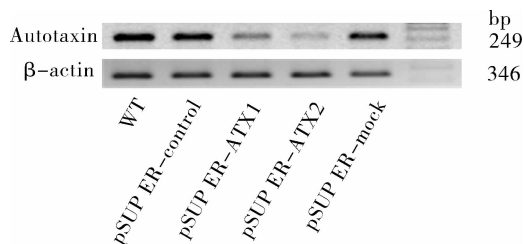


图 1 野型 AGS 组以及空载质粒 pSUPER-control 组、pSUPER-ATX 组 (2 组克隆, 分别为 pSUPER-ATX1、pSUPER-ATX2)、随机片段组 pSUPER-mock 组转染后 ATX mRNA 表达量的改变

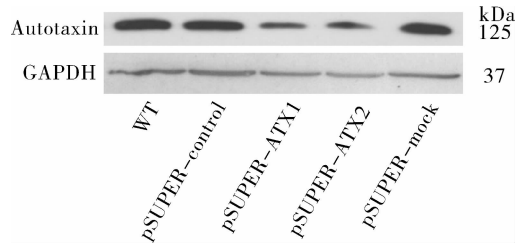


图2 野生型 AGS 组以及空载质粒 pSUPER - control 组、pSUPER - ATX 组 (2 组克隆, 分别为 pSUPER - ATX1、pSUPER - ATX2)、随机片段组 pSUPER - mock 组转染后 ATX 蛋白表达量的改变

2. 细胞增殖能力的改变: 采用 MTT 法测定 4 组细胞的增殖能力, 结果如图 3 所示。在转染后 50h, pSUPER - ATX2 组细胞增殖能力较 WT 组、pSUPER - control 组以及 pSUPER - mock 组持续降低, 根据存活细胞数量与吸光度值呈正比的原理, 各组间细胞数量有区别, pSUPER - ATX2 对 AGS 细胞的增殖能力有抑制作用, 但此差异没有统计学的显著性。

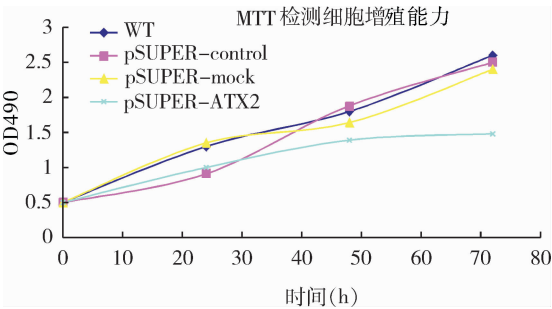


图3 MTT 法检测转染后各组 AGS 细胞吸光度值的改变
pSUPER - ATX2 组迁移细胞数较 WT 组、pSUPER - control 组以及 pSUPER - mock 组吸光度值减少 ($P > 0.05$)

3. 细胞迁移和侵袭能力的改变: 采用 transwell 法及 matrigel 法测定细胞迁移和侵袭能力, 选取 pSUPER - ATX2 克隆参与实验比较。结果显示: 在转染后 20h 起, pSUPER - ATX2 组较 WT 组、pSUPER - control 组以及 pSUPER - mock 组的迁移和侵袭细胞数开始降低; 转染后 48 ~ 72h, pSUPER - ATX2 组迁移和侵袭细胞相对于 WT 组、pSUPER - control 组以及 pSUPER - mock 组有明显减少, 如图 4、图 5 所示。以 pSUPER - ATX 组和 WT 组对比结果为例, 迁移细胞数分别下降了 $(67.63 \pm 12.03)\%$ ($t = 15.487, P < 0.01$) 和侵袭细胞数分别下降了 $(68.02 \pm 15.63)\%$ ($t = 9.417, P < 0.01$)。这些结果提示在 pSUPER - ATX 的作用下, 胃癌细胞 AGS 的迁移和侵袭能力也受到不同程度的抑制。

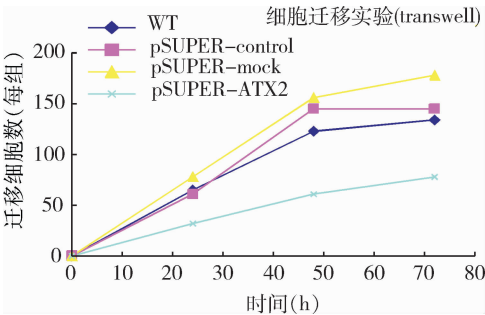


图4 转染后各组细胞迁移能力的改变
转染后 48h 及 72h: pSUPER - ATX2 组迁移细胞数较 WT 组、pSUPER - control 组以及 pSUPER - mock 组显著减少 ($P < 0.01$)

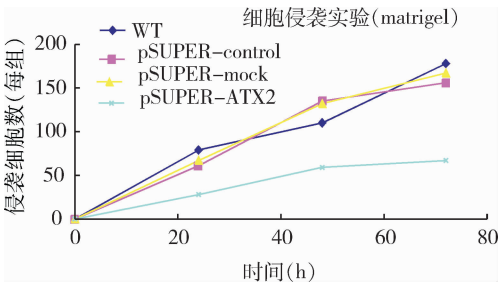


图5 转染后各组细胞侵袭能力的改变
转染后 48h 及 72h: pSUPER - ATX2 组迁移细胞数较 WT 组、pSUPER - control 组以及 pSUPER - mock 组显著减少 ($P < 0.01$)

4. AGS 细胞迁移及侵袭实验图片: pSUPER - ATX 组相比野生型细胞 WT, 空载质粒组 pSUPER - control 细胞以及随机片段组 pSUPER - mock 细胞, 其跨膜穿透的细胞数明显较少 ($P < 0.01$, 图 6)。

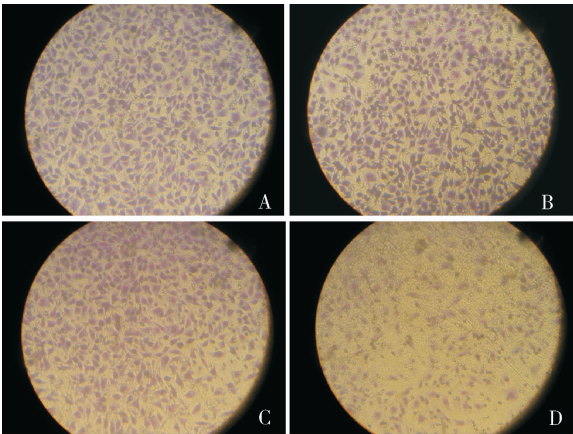


图6 细胞侵袭能力分析
A. 野生型 AGS 细胞 WT; B. 空载质粒组 (阴性对照) pSUPER - control 细胞; C. 随机片段组 pSUPER - mock 细胞; D. pSUPER - ATX 组细胞

讨 论

目前国内外对 ATX 在正常细胞及肿瘤细胞中的表达的研究主要集中在甲状腺癌、恶性黑色素瘤、乳腺癌、肝细胞癌以及成神经细胞瘤, 中有相关报

道^[4-13]。Euer 等^[14]报道通过使用基因芯片技术发现, ATX 与 40 余种和细胞高转移特性密切相关基因的高表达调节有相关性。体外实验结果表明, 通过质粒转染无内源性 ATX 表达的 NIH3T3 细胞后, 此细胞具有更强的侵袭性转移潜力^[15]; 在体外细胞学研究中证实 ATX 系统能介导瘤细胞的迁移性, 进一步体内实验证明, 转染 ATX 后细胞的成血管能力明显增强, 从而间接证实了 ATX 扮演的成血管因子功能。Noh 等最近首次使用 RNA 干扰技术阻断乳腺癌 MDA435 细胞的 ATX 表达, 并利用基因芯片技术将亲本细胞和转染细胞基因表达进行广谱扫描比较, 发现绝大部分被上调或下调的基因与细胞代谢、细胞骨架结构、转录调节以及细胞信号转导密切相关。故认为 ATX 是磷酸代谢信号转导中的关键调节因子而因此可以成为新的乳腺癌基因疗法的分子靶靶。

本研究组在过去的研究中发现, 相对于无远处及淋巴转移的胃癌组织样本, ATX 在伴有远处及区域淋巴转移的胃癌样本中呈显著的高表达态, 数据结果显示 ATX 与人类胃癌细胞的转移潜力呈正相关。正常胃组织中的 ATX 可能在细胞的生长调控中起一定的作用, 其具体作用机制尚待进一步研究。本研究利用 RNA 干扰技术, 将 ATX 经由 Xho I / Bgl II 双酶切克隆至带有 H1 启动子的质粒载体 pSuper - neo - GFP 中, 转染人胃癌细胞株, 建立稳定传代的低表达 ATX 的细胞株。检测结果提示靶向 shRNA 的导入可以抑制 AGS 细胞内源性的 ATX mRNA 和蛋白的表达。而转染后低表达 ATX 的 AGS 细胞迁移和侵袭能力显著低于野型细胞。由此提示 ATX 参与介导胃癌细胞的侵袭及转移过程, 其信号转导通路在胃癌细胞转移中很可能起着举足轻重的作用, 而干预这些信号通路则可能成为胃癌转移防治的理想选择, 同时也为 ATX 作为胃癌分子靶点提供新的理论及实践依据。本研究组推测 ATX 参与介导胃癌细胞的侵袭及转移过程可能依赖于 RhoGTP 酶的参与。RhoGTP 酶家族是一类参与众多细胞信号转导通路的重要蛋白, 其家组成员是联系膜表面受体与肌动蛋白细胞骨架的关键调节分子, 起着分子开关的作用。反应于细胞外信号诱导肌动蛋白细胞骨架组织的相应改变, 继发一系列的生物学反应, 如细胞形态形成、趋化作用及轴突的定向等。Reymond 等证实, 细胞运动信号转导主要通过几种 GTP 酶等完成调控, 因此 Rho、Rac、Cdc42 以及 Ras 在细胞运动过程中具有促进作用。这些因子在调节细胞骨架、细胞运动、细胞增殖、

细胞凋亡等方面发挥重要作用。本研究结果为进一步揭示自分泌运动因子 ATX 在促进胃癌细胞的侵袭及转移的分子机制而需进行的体内研究提供了基础。

参考文献

- 1 Stracke ML, Krutzsch HC, Unsworth EJ, *et al.* Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility - stimulating protein[J]. J Biol Chem, 1992, 267(4):2524 - 2529
- 2 Umez - Goto M, Kishi Y, Taira A, *et al.* Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production[J]. J Cell Biol, 2002, 158(2):227 - 233
- 3 Liu S, Murph M, Panupinthu N, *et al.* ATX - LPA receptor axis in inflammation and cancer[J]. Cell Cycle, 2009, 8(22):3695 - 3701
- 4 Kehlen A, Englert N, Seifert A, *et al.* Expression, regulation and function of autotaxin in thyroid carcinomas[J]. Int J Cancer, 2004, 109(6):833 - 838
- 5 Seifert A, Klonisch T, Wulfaenger J, *et al.* The cellular localization of autotaxin impacts on its biological functions in human thyroid carcinoma cells[J]. Oncol Rep, 2008, 19(6):1485 - 1491
- 6 Saunders LP, Ouellette A, Bandle R, *et al.* Identification of small - molecule inhibitors of autotaxin that inhibit melanoma cell migration and invasion[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(10):3352 - 3362
- 7 Zhang H, Xu X, Gajewiak J, *et al.* Dual activity lysophosphatidic acid receptor pan - antagonist/autotaxin inhibitor reduces breast cancer cell migration in vitro and causes tumor regression in vivo[J]. Cancer Res, 2009, 69(13):5441 - 5449
- 8 Liu S, Umez - Goto M, Murph M, *et al.* Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases[J]. Cancer Cell, 2009, 15(6):539 - 550
- 9 Panupinthu N, Lee HY, Mills GB. Lysophosphatidic acid production and action: critical new players in breast cancer initiation and progression[J]. Br J Cancer, 2010, 102(6):941 - 946
- 10 Cooper AB, Wu J, Lu D, *et al.* Is autotaxin (ENPP2) the link between hepatitis C and hepatocellular cancer? [J]. J Gastrointest Surg, 2007, 11(12):1628 - 1634
- 11 Wu JM, Xu Y, Skill NJ, *et al.* Autotaxin expression and its connection with the TNF - alpha - NF - kappaB axis in human hepatocellular carcinoma[J]. Mol Cancer, 2010, 9:71
- 12 Wang W, Wu F, Fang F, *et al.* Inhibition of invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells via targeting RhoC in vitro and in vivo[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(21):6804 - 6812
- 13 Haga A, Nagai H, Deyashiki Y. Autotaxin promotes the expression of matrix metalloproteinase - 3 via activation of the MAPK cascade in human fibrosarcoma HT - 1080 cells[J]. Cancer Invest, 2009, 27(4):384 - 390
- 14 Euer N, Schwirzke M, Evtimova V, *et al.* Identification of genes associated with metastasis of mammary carcinoma in metastatic versus non - metastatic cell lines[J]. Anticancer Res, 2002, 22(2A):733 - 740
- 15 Nam SW, Clair T, Campo CK, *et al.* Autotaxin (ATX), a potent tumor motogen, augments invasive and metastatic potential of ras - transformed cells[J]. Oncogene, 2000, 19:241 - 247

(收稿:2012 - 04 - 17)

(修回:2012 - 05 - 14)