

ACTN4 对胃癌细胞侵袭转移的影响

夷 青 申俊龙 刘亚斌

摘要 目的 研究 α -辅肌动蛋白(α -actinin-4, ACTN4)在胃癌 SGC7901 细胞及正常胃黏膜上皮 RGM-1 细胞中的表达及对胃癌 SGC7901 细胞侵袭和转移的影响。**方法** 通过 qRT-PCR 技术及蛋白印迹技术检测 ACTN4 在胃癌 SGC7901 细胞及 RGM-1 正常胃黏膜上皮细胞中的表达;利用 RNAi 技术敲低 SGC7901 细胞中的 ACTN4 表达,并应用 qRT-PCR 及蛋白印迹技术检测 SGC7901 细胞中 ACTN4 的沉默效果;通过 Transwell 实验检测细胞侵袭及转移能力的变化。结果 ACTN4 在胃癌 SGC7901 细胞中明显高表达;ACTN4-siRNA 可有效敲低 SGC7901 细胞中 ACTN4 的表达,敲低 ACTN4 的表达可以明显降低胃癌 SGC7901 细胞的侵袭转移能力。**结论** ACTN4 在胃癌细胞发生侵袭转移中发挥着重要作用。

关键词 α -辅肌动蛋白 SGC7901 细胞 侵袭转移 胃癌

中图分类号 R605 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.12.025

Effect of ACTN4 on Invasion and Migration of Gastric Cancer Cells. Yi Qing, Shen Junlong, Liu Yabin. Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu 225800, China

Abstract Objective To investigate the expression of ACTN4 in gastric cancer cells SGC7901 and normal gastric mucosa epithelial cells RGM-1 and detect the effect of ACTN4 on the invasion and migration of gastric cancer cells SGC7901. **Methods** The expression of ACTN4 in SGC7901 cells and RGM-1 cells was detected by qRT-PCR and western blot. The silencing effect of ACTN4-siRNA was detected by qRT-PCR. After siRNA and control siRNA transfected into SGC7901 cells, the invasion and migration ability of SGC7901 cells were analyzed by transwell assay. **Results** The expression of ACTN4 in SGC7901 cells was higher than in RGM-1 cells. ACTN4 expression of SGC7901 cells was effectively silenced by ACTN4-siRNA and the invasion and migration abilities of SGC7901 cells decreased after transfected ACTN4-siRNA. **Conclusion** ACTN4 may play an important role in the invasion and migration of human gastric cancer.

Key words α -actinin-4 (ACTN4); SGC7901 cells; Invasion and migration; Gastric cancer

胃癌(gastric cancer)是最常见的原发性、恶性消化系统肿瘤之一,好发于中老年人。近年来,发病年龄趋于年轻化,尽管手术、放化疗、生物治疗的综合治疗对胃癌患者有一定的疗效,但一些确诊已处于晚期或者治疗后肿瘤发生远处转移的患者最终因治疗无效而失去生命^[1]。因此,研究胃癌侵袭转移的分子机制,寻找有效的治疗靶点,对胃癌的治疗具有重大意义。

α -辅肌动蛋白-4(α -actinin-4, ACTN4)是一种膜相关骨架蛋白的肌动蛋白,研究发现其与多种肿瘤的发生、发展及侵袭转移密切相关^[2]。但 ACTN4 对胃癌细胞侵袭和转移的作用,目前尚无研究报道。本研究探讨 ACTN4 在胃癌细胞中的表达及

对胃癌细胞株 SGC7901 细胞侵袭和迁移的影响,为明确胃癌侵袭转移的机制提供理论依据。

材料与方法

1. 材料:ACTN4 一抗及内参 β -actin 一抗购自 Abcam 公司;MTT 试剂盒购自 Promega 公司;TRIzol 细胞裂解液购自碧云天公司;LipofectamineTM2000 购于美国 Invitrogen 公司;RNA 反转录试剂购自 TaKaRa 公司,干扰 RNA 由上海吉玛公司合成,Transwell 小室购自 Milipore 公司;SGC7901 细胞、RGM-1 细胞购自中国上海细胞库。

2. 设计并合成 ACTN4-siRNA:ACTN4 的干扰序列 ACTN4-siRNA 及对照序列 ACTN4-NC 由上海吉玛公司设计并合成。

3. 细胞培养和转染:用含 100ml/L 胎牛血清的 DMEM 培养基,于 37℃、50ml/L CO₂ 培养箱中培养 SGC7901 细胞、RGM-1 细胞。当细胞密度约 70%~80% 时,将 ACTN4-siRNA 及对照序列 ACTN4-NC

作者单位:225800 南京中医药大学(夷青、申俊龙);210029 南京医科大学第二附属医院普外科(刘亚斌)

通讯作者:申俊龙,电子信箱:yiqingDDLPL@163.com

经 Lipofectamine™ 2000 转染至 SGC7901 细胞,具体操作见 Lipofectamine™ 2000 说明书。转染后的 SGC7901 细胞分别命名为 ACTN4 - siRNA 组、ACTN4 - NC 组。

4. 荧光实时定量 PCR (qRT - PCR): 收集需要检测的处于对数生长期的各组细胞, TRIzol 细胞裂解液裂解细胞, 提取细胞的总 RNA, 并通过反转录试剂盒将其 RNA 反转录为 cDNA。qRT - PCR 反应条件为: 95℃ 4min, 95℃ 15s, 58℃ 40s, 循环 40 次。

5. 蛋白印迹 (Western blot) 法检测: 收集需要检测的处于对数生长期的各组细胞, 消化、离心、提取蛋白; 煮沸使蛋白质发生变性; SDS - PAGE 对蛋白样品进行电泳分离, 通过半干转将蛋白电转移到 PVDF 膜上, 脱脂奶粉 (50g/L) 室温摇晃封闭 1h, 加入一抗 ACTN4 (1: 1000) 及内参 β - actin, (1: 3000), 孵育过夜 (4℃)。7min × 3 次 TBST 洗涤后, 加入二抗 (1: 3000), 室温下孵育 1h, 7min × 3 次 TBST 洗涤后, 滴加发光液显影, 成像仪成像。

6. Transwell 实验检测 SGC7901 细胞侵袭转移能力: 沉默 ACTN4 对 SGC7901 细胞侵袭力的影响, 每组设置 4 个复孔。胰蛋白酶消化各组细胞, 利用无菌生理盐水洗 2 遍, 用含 BSA (10g/L) 的无血清培养液将细胞重悬, 并将细胞密度调整为 1×10^5 个/毫升, 预先用 Matrigel 包被小室上室的基膜, 每组取细胞悬液 150μl 加入其中, 下室中加入 500μl 含血清 (100ml/L) 的培养基, 培养 24h。培养结束后, 取出小室, 无菌生理盐水淋洗, 微孔膜内层的细胞用棉签小心擦去, 乙醇 (950ml/L) 固定 8min, 结晶紫溶液 (4g/L) 染色后于倒置显微镜下计数, 每个样本随机取 5 个视野的平均值, 分析各组间的差异并绘制柱状图。检测沉默 ACTN4 对 SGC7901 细胞转移力的影响时, Transwell 小室的上室中无 Matrigel, 其他操作相同。

7. 统计学方法: 采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析, 实验数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多个组间的数据比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. ACTN4 在胃癌 SGC7901 细胞中高表达: 收集处于对数生长期的胃癌 SGC7901 细胞及正常胃黏膜上皮 RGM - 1 细胞, 分别提取细胞的总 RNA 及总蛋白, 通过荧光实时定量 qRT - PCR 技术及 Western blot 法实验检测细胞中 ACTN4 在 mRNA 及蛋白水平的表达情况, 与人正常胃黏膜上皮 RGM - 1 细胞相

比, 在 mRNA 水平, ACTN4 在 SGC7901 细胞中明显高表达 (图 1, $P < 0.05$); 同样, 在蛋白水平, ACTN4 在 SGC7901 细胞中明显高表达 (图 2)。

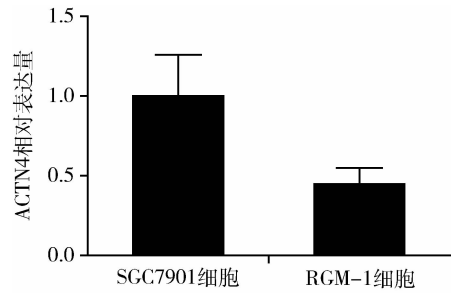


图 1 qRT - PCR 法检测细胞中 ACTN4 基因的 mRNA 水平表达

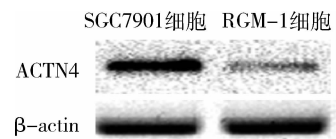


图 2 Western blot 法检测细胞中 ACTN4 基因的蛋白水平表达

2. ACTN4 - siRNA 沉默 SGC7901 细胞中 ACTN4 的 mRNA 及蛋白水平表达: 转染 ACTN4 - siRNA 及对照序列于 SGC7901 细胞系, 48h 后, 提取细胞总 RNA, 反转录为 cDNA, qRT - PCR 检测 mRNA 水平变化, 发现与 ACTN4 - NC 组相比, ACTN4 - siRNA 组 ACTN4 表达明显下调 ($P < 0.05$, 图 3、图 4)。

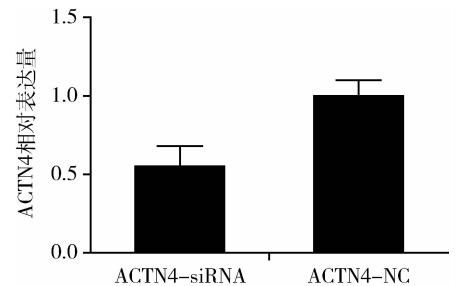


图 3 qRT - PCR 法检测 ACTN4 沉默效果

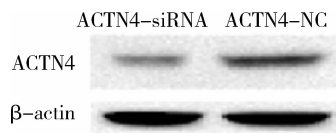


图 4 Western blot 法检测 ACTN4 的沉默效果

3. ACTN4 - siRNA 沉默 SGC7901 细胞中 ACTN4 对细胞的侵袭转移的影响: 通过 Transwell 侵袭实验检测沉默 SGC7901 细胞中 ACTN4 对细胞侵袭力的

影响。与对照组相比,转染 ACTN4 - siRNA 沉默 ACTN4 表达的 SGC7901 细胞穿过微孔膜的细胞数目明显减少,随机取 5 个视野细胞计数,取平均值,ACTN4 - NC 组细胞数 53 ± 18 ,ACTN4 - siRNA 组细胞数 25 ± 10 ,分析显示,ACTN4 - siRNA 组与 ACTN4 - NC 组间比较,差异有统计学意义(图 5, $P < 0.05$);检测沉默 SGC7901 细胞中 ACTN4 对细胞转

移力的影响。与对照组相比,转染 ACTN4 - siRNA 沉默 ACTN4 表达的 SGC7901 细胞穿过微孔膜的细胞数目同样明显减少,随机取 5 个视野细胞计数,取平均值,ACTN4 - NC 组细胞数 69 ± 20 ,ACTN4 - siRNA 组细胞数 33 ± 12 ,ACTN4 - siRNA 组与 ACTN4 - NC 组间比较,差异同样具有统计学意义(图 6, $P < 0.05$)。

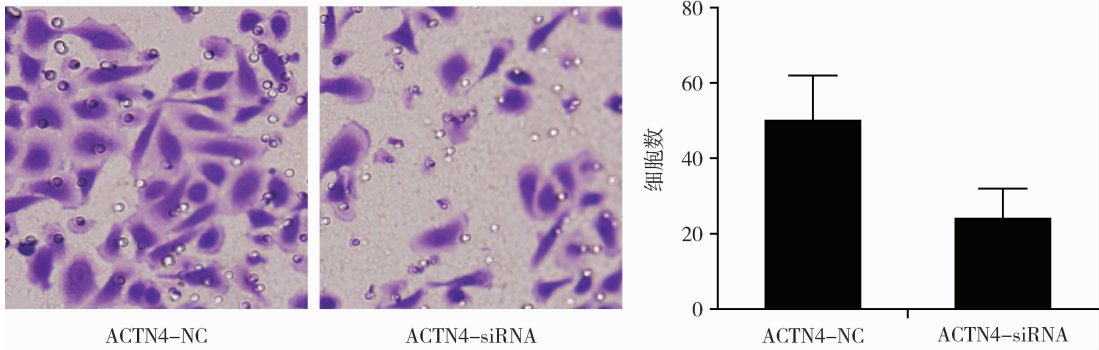


图 5 Transwell 实验检测细胞的侵袭能力(结晶紫, ×400)

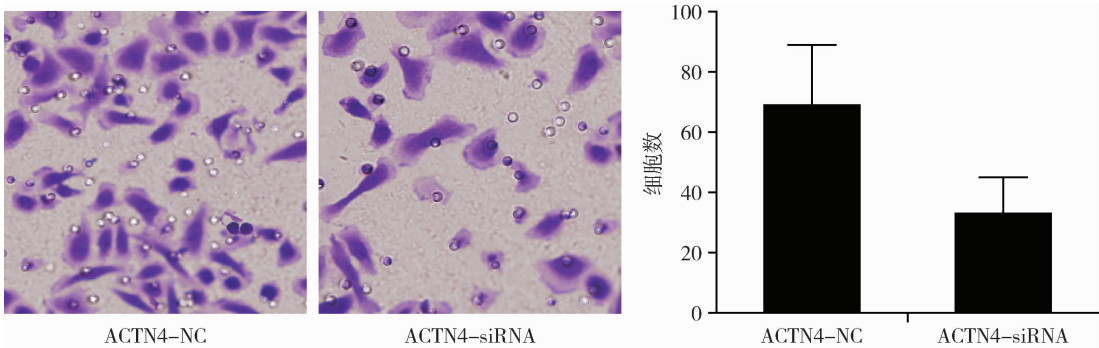


图 6 Transwell 实验检测细胞的转移能力(结晶紫, ×400)

讨 论

α -辅肌动蛋白(ACTN)是目前细胞骨架、细胞运动科学研究中的热点蛋白之一,其含有两个肌动蛋白的结合位点,可使肌动蛋白成束,由于两个结合位点相距较远,因此,形成的肌动蛋白束比较松散。ACTN 目前发现有 4 种类型(1、2、3、4),其分布具有组织特异性。ACTN 通过与钙黏素(cadherin)、整合素(integrins)等的协同作用,在细胞运动、细胞黏附、细胞形状中发挥着至关重要的作用,并在肿瘤的发生、发展、侵袭、转移中发挥着重要作用^[3]。

早在 1998 年研究已证实 ACTN4 是一种肿瘤转移相关的基因^[4]。在骨肿瘤中高分子质量激肽原结构域 5 调节细胞黏附及侵袭与 ACTN4 相关^[5]。沉默 ACTN4 的表达可以明显降低口腔鳞状细胞癌的侵袭

能力^[6]。鼠双微体结合蛋白(murine double minute binding protein, MTBP)通过下调 ACTN4 的表达可以抑制肿瘤细胞的转移及丝状伪足的形成,而后者在肿瘤侵袭起始阶段起着重要的黏附作用^[7]。在星形胶质细胞瘤等肿瘤中 ACTN4 与瘤细胞的运动和侵袭能力相关^[8]。此外,有文献报道在快速增长肿瘤内,ACTN4 可以通过结合转录因子 NF- κ B 等,调控压力刺激的肿瘤细胞的增殖^[9]。在人类表皮癌细胞、膀胱癌、肺癌及卵巢癌中高表达,被认为是候选的癌基因,促进膀胱癌的侵袭转移,并与膀胱癌、卵巢癌患者的预后不良有关^[10]。由此可见,ACTN4 与肿瘤的发生、发展及侵袭、转移密切相关。

本研究发现 ACTN4 在胃癌细胞中的表达明显高于人正常胃黏膜上皮 RGM-1 细胞中的表达。为明

确 ACTN4 对胃癌细胞侵袭转移的影响,笔者沉默了胃癌细胞株中 ACTN4 的表达检测 SGC7901 细胞侵袭和迁移能力的变化。结果发现沉默 ACTN4 的表达后,细胞的侵袭及转移能力明显减弱,为明确胃癌侵袭转移的机制提供理论依据。综上所述,本研究利用 RNA 干扰技术沉默胃癌 SGC7901 细胞中 ACTN4 的表达,通过 Transwell 实验观察到 ACTN4 沉默可以抑制胃癌细胞的迁移与侵袭能力,说明 ACTN4 在胃癌转移中发挥着至关重要的作用。为 ACTN4 在胃癌进展中的分子机制的研究提供了一定的前期基础,为临床上胃癌的预后判定、靶向治疗提供了新的思路。

参考文献

- 1 Xie QP, Xiang C, Wang G, *et al.* MACC1 upregulation promotes gastric cancer tumor cell metastasis and predicts a poor prognosis[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2016, 17 (5): 361 - 366
- 2 Gao Y, Li G, Sun L, *et al.* ACTN4 and the pathways associated with cell motility and adhesion contribute to the process of lung cancer metastasis to the brain[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 277
- 3 Honda K. The biological role of actinin - 4 (ACTN4) in malignant phenotypes of cancer[J]. *Cell Biosci*, 2015, 5: 41
- 4 Honda K, Yamada T, Endo R, *et al.* Actinin - 4, a novel actin - bundling protein associated with cell motility and cancer invasion[J].

J Cell Biol, 1998, 140 (6): 1383 - 1393

- 5 Hatoh T, Maeda T, Takeuchi K, *et al.* Domain 5 of high molecular weight kininogen inhibits collagen - mediated cancer cell adhesion and invasion in association with alpha - actinin - 4[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 427 (3): 497 - 502
- 6 Yamada S, Yanamoto S, Yoshida H, *et al.* RNAi - mediated down - regulation of alpha - actinin - 4 decreases invasion potential in oral squamous cell carcinoma[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2010, 39 (1): 61 - 67
- 7 Agarwal N, Adhikari AS, Iyer SV, *et al.* MTBP suppresses cell migration and filopodia formation by inhibiting ACTN4[J]. *Oncogene*, 2013, 32 (4): 462 - 470
- 8 Bolshakova A, Petukhova O, Turoverova L, *et al.* Extra - cellular matrix proteins induce re - distribution of alpha - actinin - 1 and alpha - actinin - 4 in A431 cells[J]. *Cell Biol Int*, 2007, 31 (4): 360 - 365
- 9 Downey C, Craig DH, Basson MD. Isoform - specific modulation of pressure - stimulated cancer cell proliferation and adhesion by alpha - actinin[J]. *Am J Surg*, 2011, 202 (5): 520 - 523
- 10 Yoshii H, Ito K, Asano T, *et al.* Increased expression of alpha - actinin - 4 is associated with unfavorable pathological features and invasiveness of bladder cancer[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30 (3): 1073 - 1080

(收稿日期:2016 - 05 - 07)

(修回日期:2016 - 05 - 19)

(接第 129 页)

参考文献

- 1 Han Y, Yu Z, Wen S, *et al.* Prognostic value of chemotherapy - induced neutropenia in early - stage breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 131(2):483 - 490
- 2 Ishitobi M, Komoike Y, Motomura K, *et al.* Prognostic significance of neutropenia on day one of anthracycline - based neoadjuvant chemotherapy in operable breast cancer[J]. *Oncology*, 2010, 78(3 - 4): 213 - 219
- 3 Donskov F. Immunomonitoring and prognostic relevance of neutrophils in clinical trials[J]. *Semin Cancer Biol*, 2013, 23(3):200 - 207
- 4 Shen M, Hu P, Donskov F, *et al.* Tumor - associated neutrophils as a new prognostic factor in cancer: a systematic review and meta - analysis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6):e98259
- 5 Gao B, Klumpen HJ, Gurney H. Dose calculation of anticancer drugs [J]. *Exp Opin Drug Metab Toxicol*, 2008, 4(10):1307 - 1319
- 6 Noronha V. Adjuvant docetaxel for node - positive breast cancer[J]. *New En J Med*, 2005, 353(9):2302 - 2313
- 7 Maio MD, Gridelli C, Gallo C, *et al.* Chemotherapy - induced neutropenia and treatment efficacy in advanced non - small - cell lung cancer: a pooled analysis of three randomised trials[J]. *Lancet Oncol*, 2005, 6(9):669 - 677
- 8 Kurbacher CM, Fietz T, Diel IJ, *et al.* NADIR: A non - interventional study on the prophylaxis of chemotherapy - induced neutropenia using lipetilgrastim - first interim analysis [J]. *Oncol Res Treat*,

2015, 38(5):221 - 229

- 9 Sandström M, Lindman H, Nygren P, *et al.* Population analysis of the pharmacokinetics and the haematological toxicity of the fluorouracil - epirubicin - cyclophosphamide regimen in breast cancer patients[J]. *Cancer Chemothe Pharmacol*, 2006, 58(58):143 - 156
- 10 Tazzyman S, Barry ST, Ashton S, *et al.* Inhibition of neutrophil infiltration into A549 lung tumors in vitro and in vivo using a CXCR2 - specific antagonist is associated with reduced tumor growth [J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(4):847 - 858
- 11 Queen MM, Ryan RE, Holzer RG, *et al.* Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(19):8896 - 8904
- 12 Spicer JD, Medonald B, Cools - Lartigue J J, *et al.* Neutrophils promote liver metastasis via Mac - 1 - mediated interactions with circulating tumor cells[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(16):3919 - 3927
- 13 Strell C, Lang K, Niggemann B, *et al.* Neutrophil granulocytes promote the migratory activity of MDA - MB - 468 human breast carcinoma cells via ICAM - 1[J]. *Ex Cell Res*, 2010, 316(1):138 - 138
- 14 Yan HH, Pickup MY, Gorska AE, *et al.* Gr - 1⁺ CD11b⁺ myeloid cells tip the balance of immune protection to tumor promotion in the premetastatic lung[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(15):6139 - 6149
- 15 Wu Y, Zhao Q, Peng C, *et al.* Neutrophils promote motility of cancer cells via a hyaluronan - mediated TLR4/PI3K activation loop[J]. *J Pathol*, 2011, 225(3):438 - 447

(收稿日期:2016 - 04 - 25)

(修回日期:2016 - 05 - 08)