

# 沉默氯离子通道蛋白 1 基因表达对胃癌细胞的影响

马鹏飞 孙君军 郑幼伟 刘伟峰 张晓辉 张小博

**摘要 目的** 观察沉默细胞内氯离子通道蛋白 1 (chloride channel protein 1, CLIC1) 的基因表达后对胃癌 BGC-823 细胞增殖、侵袭、迁移以及周期和凋亡的影响。**方法** 化学合成针对 CLIC1 的靶向 siRNA (CLIC1 siRNA 组), 以转染脂质体试剂细胞 (MOCK 组) 和空白细胞 (CTRL 组) 作为对照。用 MTT、流式细胞术以及 Transwell 分别观察细胞的增殖、周期、凋亡、侵袭和迁移能力的变化。**结果** 转染 24h、48h 和 72h 后, CLIC1 siRNA 组与 MOCK 组、CTRL 组相比, 其增殖能力均显著增强 ( $P < 0.05$ ); 转染 48h 后 CLIC1 siRNA 组  $G_2/M$  期细胞明显增多 ( $P < 0.05$ )、凋亡率显著降低 ( $P < 0.05$ )、侵袭及迁移细胞数明显下降 ( $P < 0.05$ )。**结论** CLIC1 在胃癌的发生、发展及侵袭迁移中过程发挥重要作用。

**关键词** 胃癌 siRNA CLIC1

**中图分类号** R73 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.10.024

**Effects of Silencing Chloride Intracellular Channel 1 Gene Expression on the Gastric Cancer Cell.** Ma Pengfei, Sun Junjun, Zheng Youwei, et al. Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Henan 471003, China

**Abstract Objective** To study the effects of silencing CLIC1 gene expression on proliferation, migration, invasion, cell cycle and apoptosis of gastric cancer cell line BGC-823. **Methods** Synthesized siRNA targeting CLIC1 was transfected into BGC-823 cells, while BGC-823 cells transfected with Lipofectamine 2000 and vacant BGC-823 cells were used as controls. Using MTT and flow cytometry, we studied the change of proliferation, apoptosis, cell cycle of BGC-823 cells after the expression of clc1 gene was inhibited. At the same time, cell invasion was assessed by transwell chamber. **Results** Compared CLIC1 siRNA group with MOCK group and CTRL group, after transfecting 24h, 48h and 72h with CLIC1 siRNA, the energy of proliferation of BGC-823 cells was significantly increased ( $P < 0.05$ ). After transfecting 48h with CLIC1 siRNA, the number of cells in  $G_2/M$  period increased ( $P < 0.05$ ), the number of apoptosis cells decreased remarkably ( $P < 0.05$ ). And the number of invasion and migration cells decreased drastically ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** CLIC1 may play an important role in the gastric carcinogenesis and metastasis.

**Key words** Gastric cancer; siRNA; CLIC1

胃癌在全球癌症致死原因中排第 2 位, 在我国更是高发<sup>[1]</sup>。复发和转移是导致其治疗失败的重要原因, 如何抑制肿瘤细胞侵袭和转移是治疗胃癌亟待解决的问题。氯离子通道蛋白 1 (CLIC1) 在正常胃组织中有少量的表达, 而在胃癌组织中过表达, 并且 CLIC1 与淋巴结和周围神经的侵袭、迁移及病理分期密切相关, 提示它是一个潜在的肿瘤标志物<sup>[2]</sup>。本研究中, 笔者通过 RNA 干扰技术沉默胃癌细胞中 CLIC1 的表达, 探讨其发生、发展机制。

## 材料与方法

1. 试剂和材料: 脂质体 2000 (Lipo2000) 购自美国 Invitrogen 公司; MGC-823 购自中国科学院上海

细胞库; 周期和凋亡试剂盒购自南京 KeyGEN 公司; Transwell 购自美国 Corning 公司; MTT (噻唑蓝) 购自美国 Sigma 公司。

2. 胃癌细胞 MGC-823 的培养: 将 MGC-823 培养于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱内培养, 细胞培养液 DMEM 中加入 10% 胎牛血清。

3. siRNA 合成: 参照文献<sup>[3]</sup>于上海吉玛公司合成适宜的 siRNA 片段。

4. 细胞转染与分组: 实验分为 3 个组: ①空白对照组 (CTRL 组); ②脂质体对照组 (MOCK 组); ③CLIC1 siRNA 组; 用 Lipo2000 做瞬时转染; 参照前期实验<sup>[3]</sup>用标记带有荧光的阴性对照 siRNA 优化转染条件, 评价转染效率; 用实时定量 PCR 和 Western blot 法检测沉默前后 CLIC1 基因及蛋白的表达情况。

5. 噻唑蓝 (MTT) 法检测细胞增殖: 转染后分别于

基金项目: 河南省基础与前沿技术研究计划项目 (132300410106)  
作者单位: 471003 洛阳, 河南科技大学第一附属医院肝胆外科  
通讯作者: 马鹏飞, 电子邮箱: 812833259@qq.com

0、24、48、72h 4 个时间点对各组细胞进行检测,用酶标仪检测各孔吸光度(A 值)。制作生长曲线并计算细胞增殖率。

6. 流式细胞术检测细胞周期和凋亡:转染 48h 后,收集细胞并制成悬液:(1)周期实验:调整细胞浓度为  $1 \times 10^6/ml$ ,用 70% 的乙醇固定,放 4℃ 冰箱中过夜。PBS 洗涤后加入 0.1ml 的核糖核酸酶 A,37℃ 水浴 30min。再加入 0.4ml 的 PI 混匀,置冰上避光 30min。流式细胞仪检测  $G_0/G_1$  期、S 期以及  $G_2/M$  期的相对比例。(2)凋亡实验:用 PBS 洗涤细胞两次,调整细胞数到  $(1 \sim 5) \times 10^5$  个,加入 0.5ml 的 Binding Buffer,反复吹打,先后加入  $5\mu l$  的 Annexin V - FITC 和 PI,混匀。避光 5 ~ 15min,1h 内流式细胞仪检测凋亡。

7. 检测各组细胞的迁移和侵袭能力:(1)侵袭实验:用 FN 和 Matrigel 基质涂抹在 Transwell 小室下构建基膜,将转染 48h 后的各组胃癌细胞用含 0.5% 胎牛血清的 DMEM 悬浮,浓度调整到  $4.0 \times 10^5$  个/毫升,取 0.1ml 注入 Transwell 小室,将 0.5ml 含 5% 胎牛血清的 DMEM 加入下室,培养 24h 后取出小室并用棉签抹去上层未转移细胞,甲醛固定下层细胞后并结晶紫染色,镜下随机取 5 个视野统计数目后取平均值。计算穿膜细胞数。(2)迁移实验:除 Transwell 小室不涂抹 Matrigel 胶外其余与侵袭实验一致。

8. 统计学方法:应用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计分析,单因素方差分析(one-way ANOVA)法检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1. MTT 实验检测细胞增殖:所绘生长曲线图如图 1:(1)转染后 24、48、72h 3 个时间点 CLIC1 siRNA 组细胞增殖明显增强( $P < 0.05$ ),MOCK 组和 CTRL 组之间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。(2)BGC - 823 增殖率在转染 24h 后为 22.38%,48h 后为 25.53%,72h 后为 20.17%。表明,抑制 CLIC1 的表达会增强胃癌细胞在体外的生长,且在 48h 的增殖率最高。

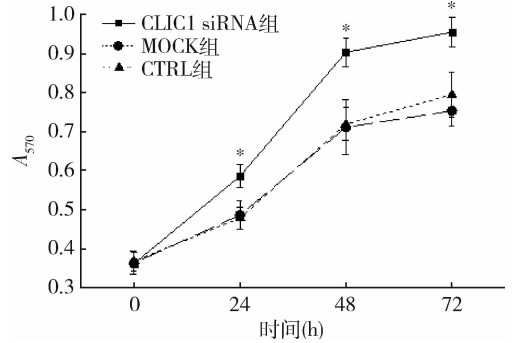


图 1 CLIC1 siRNA 对 BGC - 823 细胞生长曲线的影响与 MOCK 组比较,\*  $P < 0.05$

2. CLIC1 siRNA 对胃癌细胞周期的影响:转染 48h 后(图 2),CLIC1 siRNA 组  $G_2/M$  期比例达到  $(19.13\% \pm 1.38\%)$ ,与 CTRL 组  $(11.55\% \pm 0.99\%)$  和 MOCK 组  $(11.57\% \pm 1.01\%)$  比较,前者停滞在  $G_2/M$  期的比例明显增加( $P < 0.05$ ),而 CTRL 组和 MOCK 组之间比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图 3)。可见下调 CLIC1 在 MGC - 823 细胞中的基因表达, $G_2/M$  的停滞期会增强。

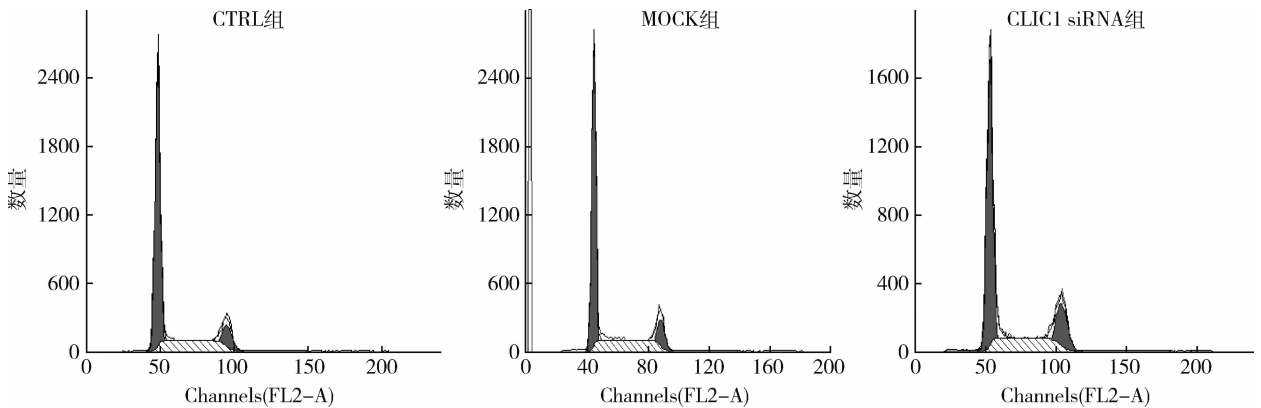


图 2 流式细胞仪检测 BGC - 823 胞周期分布

3. CLIC1 siRNA 对胃癌细胞凋亡的影响:转染 48h 后,测定 MOCK 组、CTRL 组和 CLIC1 siRNA 组细胞的凋亡率分别为  $16.59\% \pm 0.62\%$ 、 $16.11\% \pm$

$1.06\%$ 、 $10.03\% \pm 1.01\%$ (图 4)。CLIC1 siRNA 组细胞凋亡率显著低于 CTRL 组和 MOCK 对照组( $P < 0.05$ ),而 CTRL 组和 MOCK 组之间比较差异无统计

学意义 ( $P > 0.05$ , 图 5)。

4. CLIC1 siRNA 对胃癌细胞株侵袭和迁移能力的影响: 在侵袭实验 (图 6) 和迁移实验 (图 7) 中, CLIC1 siRNA 组穿膜细胞数均低于 CTRL 组、MOCK 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 与 CTRL 组比较, 细胞侵袭和迁移能力抑制率分别为 53.26% (图 8) 和 51.09% (图 9)。CTRL 组和 MOCK 组间比较差异均无统计学意义, 提示 CLIC1 siRNA 抑制 BGC-823 细胞中 CLIC1 基因表达后抑制了胃癌细胞的侵袭和迁移能力。

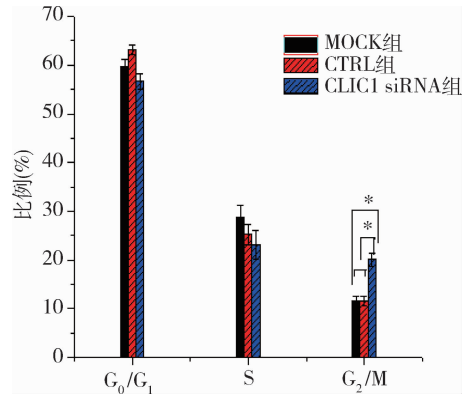


图 3 各组细胞周期分布的比较

\*  $P < 0.05$

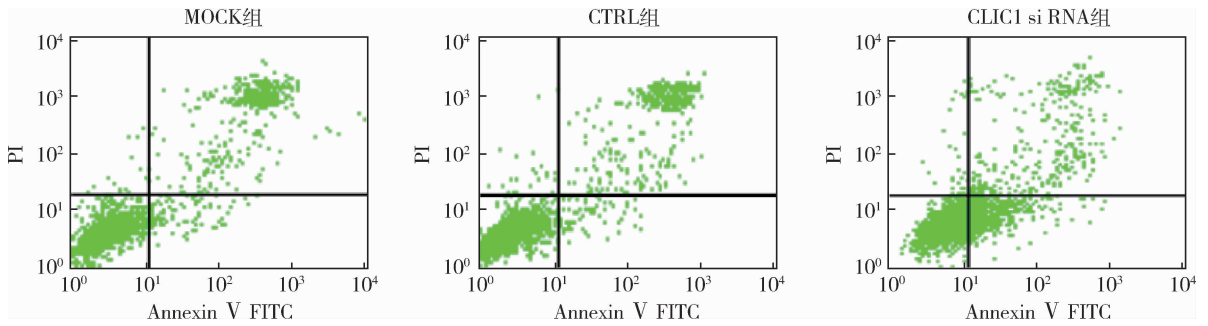


图 4 流式细胞仪检测各组 BGC-823 细胞凋亡率

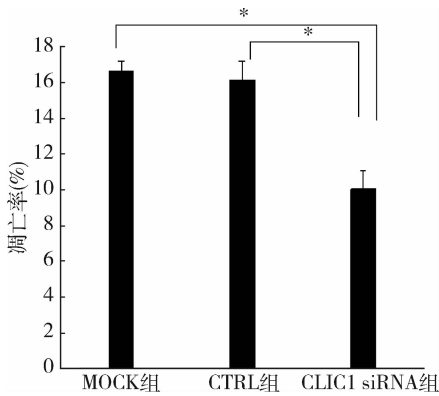


图 5 各组细胞凋亡率的比较

\*  $P < 0.05$

### 讨 论

细胞内氯离子通道蛋白 1 以可溶型和整合膜型两种形式广泛存在, 并且两种形式可以相互转换。可溶型 CLIC1 的结构与 GST 超家族具有同源性, 具有氧化还原酶活性, 在适当条件下可溶型 CLIC1 整合到细胞膜的脂质双层结构中则能发挥离子通道功能<sup>[4,5]</sup>。近年来研究发现 CLIC1 在多种肿瘤细胞中高表达, 如卵巢癌、胰腺癌等, 有研究显示, CLIC1 在胃癌组织中亦高表达<sup>[2,6,7]</sup>。通过进一步研究发现, CLIC1 不仅参与调解细胞容积、pH 值、跨膜转运等生理过程, 而且参与调解癌细胞的增殖、分化、周期、侵袭、转移等过程<sup>[8-11]</sup>。然而, CLIC1 对胃癌细胞 BGC-

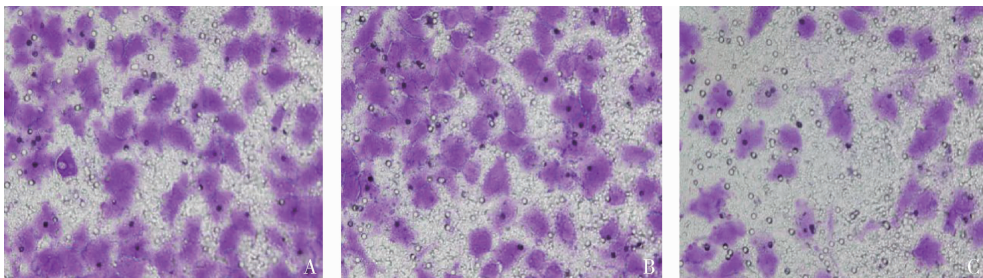


图 6 各组细胞侵袭实验中穿越基膜的细胞 (结晶紫染色,  $\times 400$ )

A. MOCK 组; B. CTRL 组; C. CLIC1 siRNA 组

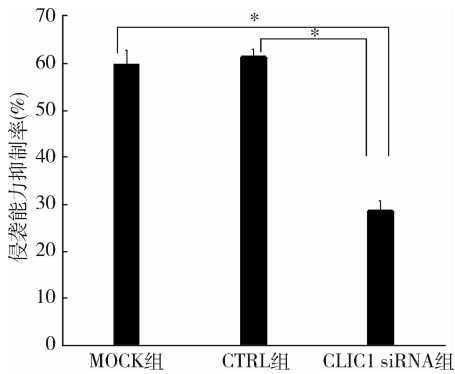


图7 各组细胞侵袭数目的比较  
\*  $P < 0.05$

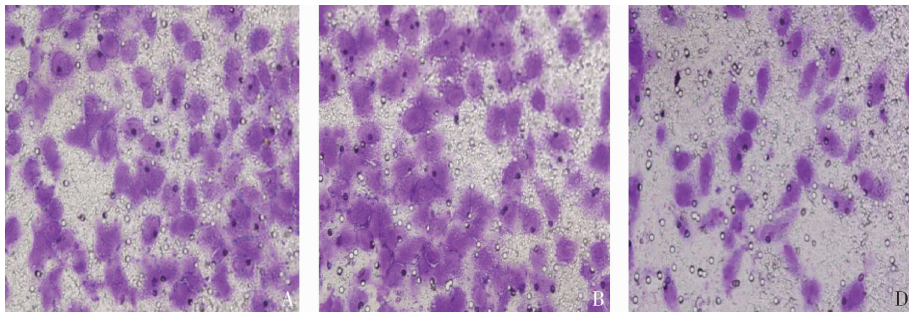


图8 各组细胞迁移实验中穿越基膜的细胞(结晶紫染色,  $\times 400$ )  
A. MOCK组; B. CTRL组; C. CLIC1 siRNA组

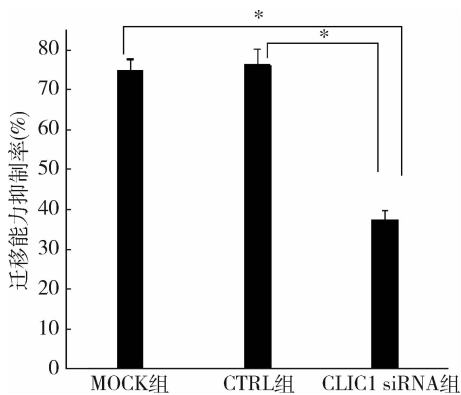


图9 各组细胞侵袭数目的比较  
\*  $P < 0.05$

823 生物学行为的影响尚未见报道。

本研究中,笔者利用 siRNA 将 BGC - 823 中 CLIC1 基因的表达有效沉默,发现沉默 CLIC1 后胃癌细胞的增殖能力显著增强,并且在 48h 增殖率最高,提示 CLIC1 基因本身可能抑制细胞的增殖。这与以往文献报道 CLIC1 基因在肝癌细胞中的作用相一致<sup>[11]</sup>。

在周期实验中,笔者发现,抑制胃癌 BGC - 823 细胞中 CLIC1 基因的表达,可以影响细胞周期的进展,使细胞周期停滞在  $G_2/M$  期。这与用 IAA94 阻断中国仓鼠 CHO - K1 细胞中 CLIC1 的基因表达后,细胞

近年来研究发现,CLIC1 在肿瘤侵袭和转移过程中发挥着重要的作用<sup>[13]</sup>。笔者通过 siRNA 下调 CLIC1 基因在胃癌 BGC - 823 细胞中的表达,发现胃癌细胞的侵袭 ( $P < 0.05$ ) 和迁移能力 ( $P < 0.05$ ) 显著下降。相反,Wang 等<sup>[14]</sup>通过上调 CLIC1 在神经胶质瘤细胞中的表达发现它则能促进细胞的侵袭和迁移。这一作用与前述的 CLIC1 基因本身可能抑制细胞的增殖并能促进细胞的凋亡的结果相互矛盾,李荣宽等<sup>[11]</sup>推测其机制很可能为 CLIC1 本身为一种抑癌基因,但高表达的 CLIC1 基因反馈性地增加了上游调控因子纤维状肌动蛋白 (fibros actin, F - actin) 的表达,因为 F - actin 是细胞内重要的细胞骨架组成部分,具有调控细胞运动的功能,参与调控细胞的侵袭和转移,同时能通过信号转导通路调控细胞内的 CLIC1<sup>[15,16]</sup>。肿瘤内 CLIC1 高表达可能反馈性引起 F - actin 的表达,从而促进了肿瘤细胞的迁移和侵袭。另外 Pan 在对结肠癌的研究中,发现 CLIC1 是通过 ROS/ERK 信号传导通路对细胞的侵袭和迁移进行调控<sup>[17]</sup>;不过,在小鼠肝癌中 CLIC1 对肿瘤细胞侵袭和迁移进行的调控则与模联蛋白 A7 和凝溶胶蛋白有关<sup>[18]</sup>。而在对胃癌细胞 SGC - 7901 的研究中发

停滞在  $G_2/M$  期的结果一致,而且可能与阻断 CLIC1 酶的活性有关<sup>[4]</sup>。进一步研究发现,当细胞停滞在  $G_2/M$  期时 CLIC1 存在于细胞膜,并且其电流密度大约是  $G_1/S$  期的 2 倍,笔者推测 CLIC1 可能参与调控细胞的生理、生化过程<sup>[12]</sup>。另外笔者研究发现,转染 48h 后,CLIC1 siRNA 组细胞凋亡率显著下降 ( $P < 0.05$ ),提示 CLIC1 基因有促进胃癌细胞凋亡的作用,这与笔者的前期实验及李荣宽等<sup>[3,11]</sup>的研究结果相似。

现,此调解过程则可能由 ROS/p38 MAPK 信号通路来完成<sup>[19]</sup>。但在 BGC-823 细胞中的调控机制尚需进一步研究。

参考文献

- 1 Saralamma VV, Nagappan A, Hong G E, *et al.* Poncirin induces apoptosis in AGS human gastric cancer cells through extrinsic apoptotic pathway by up-regulation of fas ligand[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(9):22676-22691
- 2 Chen CD, Wang CS, Huang YH, *et al.* Overexpression of CLIC1 in human gastric carcinoma and its clinicopathological significance[J]. *Proteomics*, 2007, 7(1):155-167
- 3 Ma PF, Chen JQ, Wang Z, *et al.* Function of chloride intracellular channel 1 in gastric cancer cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(24):3070-3080
- 4 Al KH, Brown LJ, Hossain KR, *et al.* Members of the chloride intracellular ion channel protein family demonstrate glutaredoxin-like enzymatic activity[J]. *PLoS One*, 2015, 10(1):e115699
- 5 Averaimo S, Abeti R, Savalli N, *et al.* Point mutations in the transmembrane region of the clie1 ion channel selectively modify its biophysical properties[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9):e74523
- 6 Tang HY, Beer LA, Tanyi JL, *et al.* Protein isoform-specific validation defines multiple chloride intracellular channel and tropomyosin isoforms as serological biomarkers of ovarian cancer[J]. *Journal of proteomics*, 2013, 89: 165-178
- 7 Jia NN, Dong SL, Zhao G, *et al.* CLIC1 overexpression is associated with poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinomas[J]. *J Cancer R Therapeut*, 2016, 12:892-896
- 8 Peretti M, Angelini M, Savalli N, *et al.* Chloride channels in cancer: Focus on chloride intracellular channel 1 and 4 (CLIC1 AND CLIC4) proteins in tumor development and as novel therapeutic targets[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1848(10 Pt B):2523-2531
- 9 Wang W, Xu X, Wang W, *et al.* The expression and clinical significance of CLIC1 and HSP27 in lung adenocarcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2011, 32(6):1199-1208

- 10 Lu J, Dong Q, Zhang B, *et al.* Chloride intracellular channel 1 (CLIC1) is activated and functions as an oncogene in pancreatic cancer[J]. *Med Oncol*, 2015, 32(6):616
- 11 李荣宽,唐建武,张军,等. shRNA 稳定转染抑制氯离子通道蛋白 1 基因的表达对小鼠肝癌细胞的影响[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2010, 4(6):721-727
- 12 Stefania A, Rosemary HM, Michael RD. Chloride intracellular channel 1 (CLIC1): Sensor and effector during oxidative stress[J]. *FEBS Lett*, 2010, 584:2076-2084
- 13 Ding Q, Li M, Wu X, *et al.* CLIC1 overexpression is associated with poor prognosis in gallbladder cancer[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(1):193-198
- 14 Wang L, He S, Tu Y, *et al.* Elevated expression of CLIC1 is correlated with poor prognosis in human gliomas[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012, 31:44
- 15 Wang P, Zeng Y, Liu T, *et al.* Chloride intracellular channel 1 regulates colon cancer cell migration and invasion through ROS/ERK pathway[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(8):2071-2078
- 16 Singh H, Cousin MA, Ashley RH. Functional reconstitution of mammalian 'chloride intracellular channels' CLIC 1, CLIC4 and CLIC5 reveals differential regulation by cytoskeletal actin[J]. *FEBS Journal*, 2007, 274:6306-6316
- 17 Suginta W, Karoulias N, Aitken A, *et al.* Chloride intracellular channel protein CLIC4 (p64H1) binds directly to brain dynamin I in a complex containing actin, tubulin and 14-3-3 isoforms[J]. *Biochem J* 2001, 359:55-64
- 18 Zhang J, Li M, Song M, *et al.* Clie1 plays a role in mouse hepatocarcinoma via modulating Annexin A7 and Gelsolin in vitro and in vivo[J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 69:416-419
- 19 Zhao W, Lu M, Zhang Q. Chloride intracellular channel 1 regulates migration and invasion in gastric cancer by triggering the ROS-mediated p38 MAPK signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(6):8041-8047

(收稿日期:2017-07-15)

(修回日期:2017-09-08)

(上接第 86 页)

- 8 宋国智,刘吉祥,常成,等. Kawase's 入路切除脑干海绵状血管瘤的临床研究[J]. *神经损伤与功能重建*, 2016, 11(6):512-514
- 9 Xiao X, Zhang L, Wu Z, *et al.* Surgical resection of large and giant petroclival meningiomas via a modified anterior transpetrous approach[J]. *Neurosurg Rev*, 2013, 36(4):587-593
- 10 Shibao S, Borghei-Razavi H, Orii M, *et al.* Anterior transpetrosal approach combined with partial posterior petrosectomy for petroclival meningiomas with posterior extension[J]. *World Neurosurg*, 2015, 84(2):574-579
- 11 张喜安,漆松涛,张嘉林,等. 改良颞下经岩骨入路显微外科切除岩斜坡区肿瘤 20 例[J]. *中华神经外科杂志*, 2010, 26(1):65-67
- 12 陈立华,杨艺,徐如祥. 岩斜坡区脑膜瘤的手术入路选择及其手术相关问题探讨[J]. *中华神经医学杂志*, 2015, 14(3):314-319
- 13 鲁军体,王娜,程龙海,等. 颞下经小脑幕入路手术切除岩尖斜

坡区肿瘤的效果分析[J]. *神经损伤与功能重建*, 2016, 11(3):266-267

- 14 Borghei-Razavi H, Tomio R, Fereshtehnejad SM, *et al.* Pathological location of cranial nerves in petroclival lesions: how to avoid their injury during anterior petrosal approach[J]. *J Neurol Surg Part B Skull Base*, 2016, 77(1):6-13
- 15 Natarajan SK, Sekhar LN, Schessel D, *et al.* Petroclival meningiomas: multimodality treatment and outcomes at long-term follow-up. [J]. *Neurosurgery*, 2007, 60(6):979-981
- 16 Borgheirazavi H, Tomio R, Fereshtehnejad SM, *et al.* Anterior petrosal approach: the safety of Kawase triangle as an anatomical landmark for anterior petrosectomy in petroclival meningiomas[J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2015, 139(1):282-287

(收稿日期:2018-01-04)

(修回日期:2018-01-05)