

转染 GKN2 基因对 CD44(+)SGC7901 胃癌干细胞的抑制作用

胡皓彬,凌 晖,蔡志宏,肖 萍,李艳春

(湖南省人民医院/湖南师范大学附属第一医院病理科,湖南 长沙 410002)

摘要:目的 研究胃动蛋白 2(GKN2)高表达对 CD44(+)SGC7901 胃癌干细胞(GCSCs)的增殖、迁移、侵袭的影响。方法 采用免疫磁珠分选技术(MACS)从人胃癌细胞 SGC7901 中分选 CD44(+)SGC7901 GCSCs,免疫荧光测试分选效率;将 GKN2 高表达腺病毒载体转染入 GCSCs,Western Blot 验证转染后 GKN2 的表达情况;CCK8、Transwell 迁移侵袭实验观察 GKN2 高表达对 GCSCs 增殖、迁移和侵袭的影响。结果 免疫荧光结果显示,CD44(+)SGC7901 GCSCs 经免疫磁珠分选后数目大幅增加;CCK8 增殖实验显示,GKN2 转染组在 450 nm 处的 OD 值均低于未转染组及空载体组 ($P<0.05$);Transwell 迁移实验结果显示,GKN2 高表达组迁移及侵袭至下室的细胞数均低于未转染组及空载体组 ($P<0.05$)。结论 GKN2 高表达能抑制 CD44(+)SGC7901 GCSCs 的增殖,且能抑制其迁移及侵袭能力。

关键词:胃癌;胃癌干细胞;GKN2

中图分类号:R735.2

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2024.01.024

文章编号:1006-1959(2024)01-0140-05

Inhibitory Effect of GKN2 Gene Transfection on CD44(+)SGC7901 Gastric Cancer Stem Cells

HU Hao-bin, LING Hui, CAI Zhi-hong, XIAO Ping, LI Yan-chun

(Department of Pathology, Hunan Provincial People's Hospital/the First Affiliated Hospital of Hunan Normal University, Changsha 410002, Hunan, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of high expression of GKN2 on the proliferation, migration and invasion of CD44 (+)SGC7901 gastric cancer stem cells (GCSCs). **Methods** CD44(+)SGC7901 GCSCs were isolated from human gastric cancer cell line SGC7901 by magnet-activated cell sorting (MACS), and the sorting efficiency was tested by immunofluorescence. The GKN2 high expression adenovirus vector was transfected into GCSCs, and the expression of GKN2 after transfection was verified by Western Blot. The effects of high expression of GKN2 on the proliferation, migration and invasion of human GCSCs were observed by CCK8 and Transwell migration and invasion experiments. **Results** Immunofluorescence results showed that the number of CD44 (+)SGC7901 GCSCs increased significantly after magnet-activated cell sorting. CCK8 proliferation assay showed that the OD value of GKN2 transfection group at 450 nm was lower than that of non-transfection group and empty vector group ($P<0.05$). Transwell migration assay showed that the number of cells migrating and invading to the lower chamber in the GKN2 high expression group was lower than that in the non-transfection group and the empty vector group ($P<0.05$). **Conclusion** High expression of GKN2 can inhibit the proliferation, migration and invasion of CD44(+)SGC7901 GCSCs.

Key words: Gastric cancer; Gastric cancer stem cells; GKN2

胃癌(gastric cancer)的死亡率在恶性肿瘤中名列前茅,且逐年稳步增长^[1]。影响胃癌预后的因素有很多,如肿瘤干细胞(CSCs)与胃癌的预后较差有关^[2]。CSCs能促进癌细胞的生长与转移,胃癌中同样存在CSCs,即胃癌干细胞(GCSCs)^[3,4]。GCSCs的存在是胃癌难以根治的重要原因之一,因此越来越受到人们的关注。Takaishi S等^[5]最早发现CD44(+)的胃癌细胞具有干细胞特性,CD44(-)细胞的致瘤潜能更低。CD44的表达与胃癌中

的多种干细胞标志物有关,是调控细胞干样特性的中心环节^[6]。CD44普遍应用于GCSCs的分离鉴定。GKN2(gastrokines-2)是胃粘液分泌细胞系产生的一种分泌蛋白,其在胃癌中普遍表达减少或缺失^[7]。有证据表明^[8,9],GKN2缺失是胃癌发病机制之一,并提示恢复GKN2表达可作为抑制胃癌进展的一个策略。可以推测,GKN2在GCSCs中可能同样表达缺失,且恢复GKN2的表达,对GCSCs可能具有相似的抑制作用。为此,本研究用GKN2高表达腺病毒载体转染CD44(+)SGC7901细胞,即胃癌样细胞(GCSCs),验证转染前后GCSCs中GKN2的表达,同时通过检测其增殖、迁移、侵袭的影响,评估GKN2对GCSCs的抑制作用,现报道如下。

作者简介:胡皓彬(1990.8-),男,湖南长沙人,硕士,住院医师,主要从事胃癌相关研究

1 材料与方法

1.1 实验材料 人胃癌 SGC7901 细胞株为南华大学肿瘤研究所保存并友情提供。人 CD44 免疫磁珠及 MiniMACS 分选器 (Miltenyi 公司), Alexa Fluor® 488 anti-mouse/human CD44 (Biolegend 公司), 载体: Ad-GFP-GKN2 表达载体和 Ad-GFP 空载体 (汉恒生物科技有限公司), iBind™ 仪器、iBind™ 溶液试剂盒和 iBind™ 卡片 (Life 公司), 抗体: 兔抗人 GKN2 单克隆抗体、兔抗人 β -actin 单克隆抗体、二抗羊抗兔 IgG-HRP (abcam 公司), CCK-8 试剂盒 (日本同仁供应, 货号为 ck04), Transwell 小室及 Matrigel 基质胶 (Corning 公司)。

1.2 方法

1.2.1 SGC7901 细胞培养及免疫磁珠细胞分选 (MACS) ①取 SGC7901 细胞, 加入 5 ml 含 10%~15% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 放入含 5% CO₂ 以及较高相对饱和湿度 (95%) 的 37 °C 恒温培养箱中进行培养, 细胞融合度达 80% 以上时可进行传代。②将 SGC7901 贴壁细胞用 4 °C 预冷的 AutoMACS 缓冲液制成细胞密度为 1×10^7 个/ml 的悬液后离心, 每 1×10^7 个细胞加 80 μ l 缓冲液及 20 μ l CD44 免疫磁珠于 4 °C 孵育 15 min, 加 500 μ l 缓冲液重悬。安装 MiniMACS 分选器, 往 MS 柱加入细胞悬液, CD44(-) 细胞会自然流出, 而 CD44(+) 细胞则吸附于 MS 柱中。取下 MS 柱, 于柱中加入 1 ml 缓冲液, 用所配备的活塞非常快速果断地推下, 流出的即为 CD44(+) 细胞。将分选出的 CD44(+) SGC7901 细胞用无血清培养基 (SFM) 放入恒温培养箱中进行培养。③使用 Alexa Fluor® 488 anti-mouse/human CD44 免疫荧光抗体检测 SGC7901 细胞分选后 CD44 的表达情况。

1.2.2 CD44(+) SGC7901 细胞瞬时转染, Western Blot 验证转染前后 GKN2 的表达 ①腺病毒转染: 取生长状态良好的 CD44(+) SGC7901 细胞, 进行腺病毒转染: 加入 Ad-GFP-GKN2 过表达载体或 Ad-GFP 空载体, 将细胞分为未转染组、空载体组和 GKN2 高表达组, 转染后用 SFM 培养基, 放入培养箱中培养备用。②Western Blot 检测: 提取各组细胞总蛋白, 取少量蛋白进行 BCA 蛋白定量, 其余进行加热变性。取 20 μ l 每孔样品, 进行 SDS-PAGE 电泳及转膜, 然后使用 iBind 蛋白质印迹处理系统顺次完成封闭、孵一抗、孵二抗和清洗步骤, 整个过程自动

完成。最后 ECL 显影、拍照, 最后用 AlphaImager2200 软件进行结果分析。

1.2.3 CCK-8 增殖实验 取生长状态良好的未转染组、空载体组、GKN2 高表达组细胞, 制成细胞细胞密度为 2.5×10^5 个/ml 的悬液, 种于 96 孔板, 每孔种 100 μ l, 每组设 6 个复孔, 另设一组只加 100 μ l SFM 培养基的空白孔组, 余孔每孔用 100 μ l PBS 补齐。设 3 块复板, 分别培养 24、48、72 h 后, 每孔中加入 CCK8 溶液 10 μ l, 37 °C 恒温培养箱中孵育 2 h 后使用酶标仪测 450 nm 处的 OD 值, 并计算 GKN2 高表达组抑制 CD44(+) SGC7901 细胞生长的抑制率。

1.2.4 Transwell 迁移实验 取生长状态良好的 3 组细胞, 用不含血清的 RPMI-1640 培养基重悬, 调节细胞浓度至 1×10^6 个/ml, 往 Transwell 上室中加入 150 μ l 细胞悬液, 24 孔板中加入 700 μ l 含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基作为下室, 将上室放在下室上, 放入含 5% CO₂ 以及较高相对饱和湿度 (95%) 的 37 °C 恒温培养箱中培养 72 h 后, 取出小室, 4% 多聚甲醛固定 15~30 min, 结晶紫染液染色 20 min, 显微镜下拍照, 取 5 个视野, 计数。

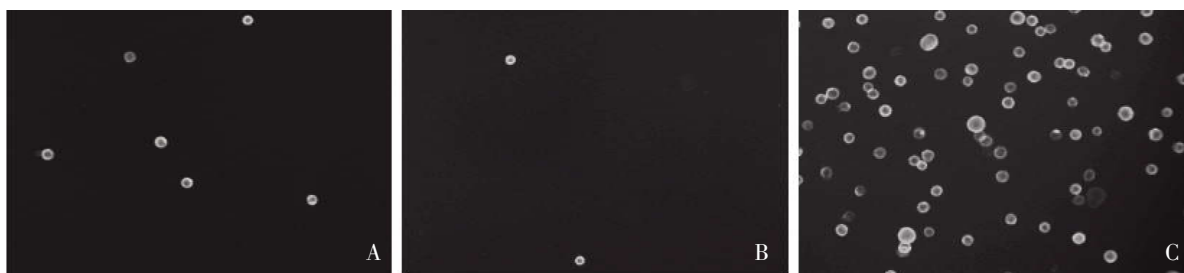
1.2.5 Transwell 侵袭实验 Matrigel 基质胶与不含血清的 RPMI-1640 培养基按 1:5 的比例混合 (冰上操作), 往 Transwell 上室中加入 40 μ l 基质胶, 细胞培养箱中静置 2 h, 待其形成薄层凝胶收集各组细胞, 余后步骤与 Transwell 迁移实验相同。

1.3 统计学方法 将所得实验数据用统计学软件 SPSS 20.0 分析, 计量资料 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫荧光检测分选前后 SGC7901 细胞膜 CD44 表达情况 使用 CD44 荧光抗体孵育后, 细胞膜表面表达绿色荧光的即为 CD44 阳性细胞。结果显示, 未分选的 SGC7901 细胞可见少量阳性细胞; 而分选后 CD44(+) SGC7901 细胞数目大量增加, 分选成功, 所得 CD44(+) SGC7901 细胞为 GCSCs, 见图 1。

2.2 Western Blot 验证转染前后 GKN2 的表达 Ad-GFP-GKN2 转染 GCSCs 细胞 48 h 后检测其转染前后蛋白表达。GKN2 高表达组中 GKN2 的表达量增加, 证明 GKN2 转染成功, 同时证明 GCSCs 细胞中 GKN2 的表达缺失, 见图 2。



注:A:未分选 SGC7901 细胞($\times 20$);B:CD44(-)SGC7901 细胞($\times 20$);C:CD44(+)SGC7901 细胞($\times 20$)

图 1 免疫荧光检测分选前后 SGC7901 细胞膜 CD44 的表达情况

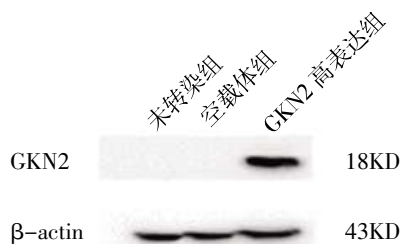


图 2 Western Blot 检测 3 组 GCSCs 细胞中 GKN2 蛋白的表达

2.3 CCK8 增殖实验结果 3 组 450 nm 处的 OD 值 (OD450)见表 1,转染后不同时间点 GKN2 高表达组 OD450 均低于未转染组及空载体组,差异有统计学意义($P<0.05$)。且随着时间的增加,抑制率(与空载体组对比)呈现增高的趋势。GKN2 高表达能抑制 GCSCs 的增殖,且在转染后 96 h 内,抑制率与时间呈正相关。

2.4 Transwell 迁移实验结果 Transwell 下室中含有的血清可以促使 GCSCs 从上室往下室迁移,见图3;

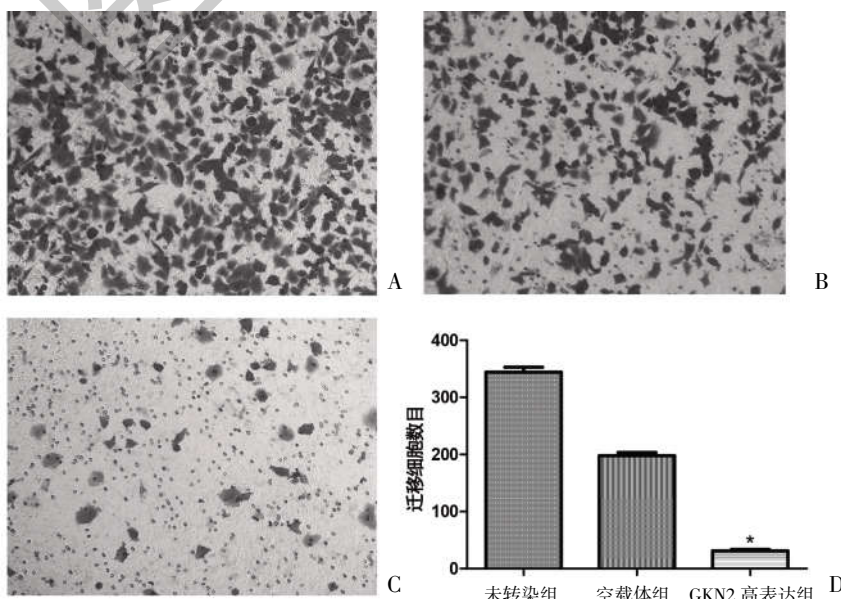
血清使 GCSCs 分化为贴壁的 SGC7901 细胞,并且细胞会被结晶紫染成紫色,显微镜下计数被染色的细胞数,GKN2 高表达组低于未转染组及空载体组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 Transwell 侵袭实验结果 细胞穿过基质胶进入下室的过程可模拟细胞对组织的侵袭行为,进入下室的 GCSCs 分化为贴壁癌细胞并被结晶紫染色。结果显示,GKN2 高表达组低于其余两组,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。

表 1 3 组于转染后不同时间后的 OD450 值($\bar{x}\pm s$)

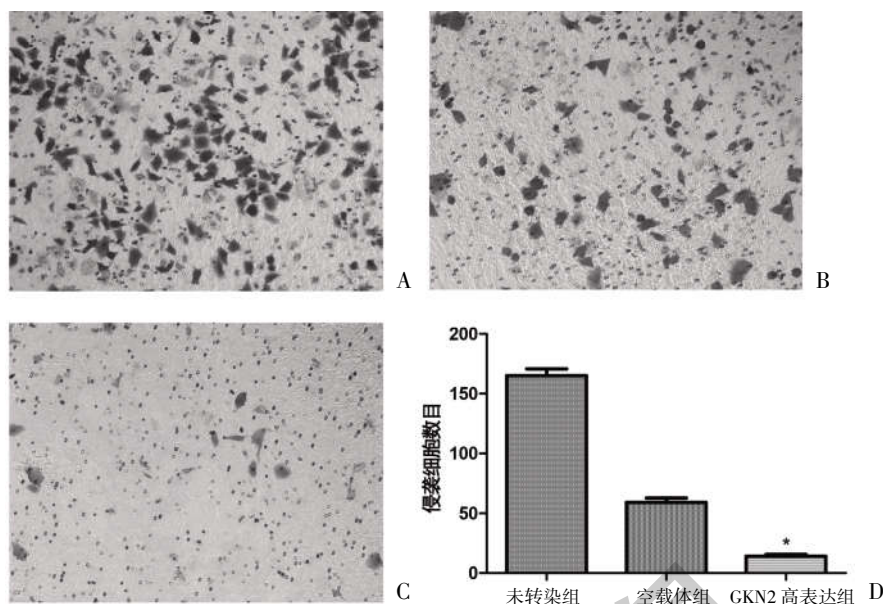
| 时间(h) | 未转染组 | 空载体组 | GKN2 高表达组 | |
|-------|-------------------|-------------------|--------------------|--------|
| | | | OD450 | 抑制率(%) |
| 48 | 0.355 \pm 0.031 | 0.331 \pm 0.027 | 0.298 \pm 0.029* | 12.840 |
| 72 | 0.332 \pm 0.035 | 0.301 \pm 0.026 | 0.259 \pm 0.031* | 18.502 |
| 96 | 0.256 \pm 0.028 | 0.203 \pm 0.016 | 0.169 \pm 0.014* | 26.357 |

注:与未转染组及空载体组比较,* $P<0.05$



注:A:未转染组($\times 20$);B:空载体组($\times 20$);C:GKN2 高表达组($\times 20$);D:与未转染组及空载体组比较,* $P<0.05$

图 3 GKN2 对 GCSCs 迁移能力的影响



注:A:未转染组($\times 20$);B:空载体组($\times 20$);C:GKN2 高表达组($\times 20$);D:与未转染组及空载体组比较, $P < 0.05$

图 4 GKN2 对 GCSCs 侵袭能力的影响

3 讨论

近代观点认为,恶性肿瘤拥有的无限增殖能力以及易于复发的特性,与肿瘤干细胞(CSCs)的存在密切相关。CSCs 只占整个肿瘤中的一小部分,却与肿瘤的发生、发展、转移以及复发等行为有着密不可分的关系^[10-12]。研究 CSCs 的前提是将其从肿瘤组织中分离出来并对其进行鉴定。目前免疫磁珠(MACS)法和流式细胞术较为常用,通过细胞表面标志物进行细胞分选,如 CD44、CD24、CD133、EpCAM 等。而 CD44 是最常用的,也是被认为最关键的 GCSCs 标志物^[6,13]。本研究选用 CD44 作为分选标准,采用 MACS 法,从胃癌细胞系 SGC7901 中分离出 CD44(+) 的细胞,再用免疫荧光法验证分选是否成功,同时也验证 GCSCs 只占肿瘤中的一小部分这一理论。

GKN2 均属于胃动蛋白家族——“gastrokines”(GKNs)成员,该家族是一种胃黏膜产生的分泌蛋白,目前包含 3 个成员:GKN1、GKN2 和 GKN3。GKN1 和 GKN2 都被认为在维持胃粘膜动态平衡、抑制胃肠道肿瘤方面起着重要作用^[14],与胃癌的发生密切相关。本研究主要探讨 GCSCs 与 GKN2 的关系。Western Blot 结果显示 GCSCs 中 GKN2 的表达几乎缺失,说明 GCSCs 与其余多种胃癌细胞系一样,GKN2 的表达显著降低,这提示 GKN2 的表达水平可能从干细胞水平就开始改变,再经过一系列的

调控机制,最终导致了胃癌的发生。因此,研究 GCSCs 中 GKN2 表达量的改变有较大的意义。前期研究也已证实,GKN2 高表达可抑制人胃癌 MKN28 细胞的增殖、迁移和侵袭^[15]。而 GCSCs 作为肿瘤恶性行为的“罪魁祸首”。本研究选用转染效率高、转染速度快的 GKN2 过表达腺病毒载体,对 GCSCs 进行瞬时转染,并使用 Western Blot 证实转染后 GKN2 的表达水平大幅度增加,说明瞬时转染成功。CCK8 增殖实验结果表明 GKN2 能抑制 GCSCs 的生长,且其抑制作用在 96 h 内与时间成正相关。该结果为研究 GKN2 与 GCSCs 间的作用关系创造了前提。研究表明,CSCs 的迁移侵袭能力较强,且与肿瘤组织的侵袭性密切相关,GCSCs 作为 CSCs 中的一大类也同样如此^[16-19]。总之,GKN2 能抑制胃癌细胞的侵袭性,而 GCSCs 又在胃癌的侵袭性中起着重要作用,为此,本研究采用 Tanswell 法观察了 GKN2 高表达对 GCSCs 迁移及侵袭的影响。由于 GCSCs 为不贴壁细胞,为了便于观察,本次在下室中加入 10% 胎牛血清,使穿过小室的 GCSCs 分化为贴壁的胃癌细胞。结果显示,GKN2 高表达组穿过小室的细胞数目减少,这说明 GKN2 高表达能显著抑制 GCSCs 的迁移及侵袭。GKN2 的缺失会使其伴侣蛋白:TFF1,失去其抑制胃癌侵袭和转移的作用^[20,21],而其具体机制,则有待进一步探究。

目前,肿瘤的治疗已逐渐进入分子靶向阶段,寻

找有效的基因靶点,针对性的抑制恶性肿瘤的生长,是人们所追求的目标。许多研究表明,GKN2对胃癌有抑制作用,本研究亦证实,GKN2能够抑制GCSCs。尽管GKN2已发现多年,但其抑制胃癌的具体机制依然未有完全阐明,仍有很高的研究价值,对其进行更深入的探索与研究,可能为临床治疗胃癌开拓新的方向。

参考文献:

- [1]赵鹤,魏晓敏,尹素凤.1988-2017年中国居民胃癌死亡趋势分析[J].实用预防医学,2020,27(12):1468-1471.
- [2]韩方征,张潇霖,董唯一,等.肿瘤干细胞标志物CD24、CD44在胃癌组织中的共表达及患者临床病理参数和预后[J].中国组织工程研究,2018,22(29):4625-4630.
- [3]Dai ZT,Xiang Y,Duan YY.MiR-17-5p and MKL-1 modulate stem cell characteristics of gastric cancer cells [J].Int J Biol Sci,2021,17(9):2278-2293.
- [4]Walcher L,Kistenmacher AK,Suo H.Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies[J].Front Immunol,2020,11:1280.
- [5]Takaishi S,Okumura T,Tu S,et al.Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44 [J].Stem Cells,2009,27(5):1006-1020.
- [6]Dzobo K,Sinkala M.Cancer Stem Cell Marker CD44 Plays Multiple Key Roles in Human Cancers: Immune Suppression/Evasion, Drug Resistance, Epithelial-Mesenchymal Transition, and Metastasis[J].OMICS,2021,25(5):313-332.
- [7]毛芑,陶力,赵心恺,等.抑癌基因GKN2在胃癌中的表达及其临床意义[J].新医学,2018,49(7):489-492.
- [8]戴劲,彭铁立,余相地.过表达胃动蛋白对胃癌细胞生物学行为的影响[J].消化肿瘤杂志(电子版),2020,12(2):117-121.
- [9]Zhang Z,Xue H,Dong Y,et al.GKN2 promotes oxidative stress-induced gastric cancer cell apoptosis via the Hsc70 pathway[J].J Exp Clin Cancer Res,2019,38(1):338.
- [10]Sun L,Huang C,Zhu M,et al.Gastric cancer mesenchymal stem cells regulate PD-L1-CTCF enhancing cancer stem cell-like properties and tumorigenesis [J].Theranostics,2020,10(26):11950-11962.
- [11]Fatehullah A,Terakado Y,Sagiraju S.A tumour-resident Lgr5+ stem-cell-like pool drives the establishment and progression of advanced gastric cancers[J].Nat Cell Biol,2021,23(12):1299-1313.
- [12]Ni H,Qin H,Sun C.MiR-375 reduces the stemness of gastric cancer cells through triggering ferroptosis [J].Stem Cell Res Ther,2021,12(1):325.
- [13]Yang F,Zheng Z,Xue X,et al.Targeted eradication of gastric cancer stem cells by CD44 targeting USP22 small interfering RNA-loaded nanoliposomes [J].Future Oncol,2019,15(3):281-295.
- [14]Chung Nien Chin S,O'Connor L,Scurr M,et al.Coordinate expression loss of GKN1 and GKN2 in gastric cancer via impairment of a glucocorticoid-responsive enhancer [J].Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,2020,319(2):G175-G188.
- [15]蔡志宏,曹怡静,刘姣,等.转染胃动蛋白2基因抑制人胃癌细胞系MKN28增殖、迁移和侵袭 [J].基础医学与临床,2018,38(3):370-374.
- [16]Zhang H,Wang M,He Y,et al.Chemotoxicity-induced exosomal lncFERO regulates ferroptosis and stemness in gastric cancer stem cells[J].Cell Death Dis,2021,12(12):1116.
- [17]Li H,Wang C,Lan L,et al.METTL3 promotes oxaliplatin resistance of gastric cancer CD133+ stem cells by promoting PARP1 mRNA stability[J].Cell Mol Life Sci,2022,79(3):135.
- [18]Lee JH,Kim S,Han S,et al.p57Kip2 imposes the reserve stem cell state of gastric chief cells[J].Cell Stem Cell,2022,29(5):826-839.
- [19]Ukai S,Honma R,Sakamoto N,et al.Molecular biological analysis of 5-FU-resistant gastric cancer organoids; KHDRBS3 contributes to the attainment of features of cancer stem cell [J].Oncogene,2020,39(50):7265-7278.
- [20]Kim O,Yoon JH,Choi WS,et al.Heterodimeric interaction between GKN2 and TFF1 entails synergistic antiproliferative and pro-apoptotic effects on gastric cancer cells [J].Gastric Cancer,2017,20(5):772-783.
- [21]Liu W,Li J,Zhang D,et al.Trefoil factor 1 and gastrokine 2 inhibit Helicobacter pylori-induced proliferation and inflammation in gastric cardia and distal carcinogenesis [J].Oncol Lett,2020,20(6):318.

收稿日期:2023-02-20;修回日期:2023-02-28

编辑/成森