

## FSCN1 与钆配合物在抗胃癌中的作用及相关性研究

张敏<sup>1</sup> 徐元宏<sup>1</sup> 董兵斌<sup>2</sup> 卢敏<sup>1</sup> 陈鹤<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨 FSCN1 在胃癌增殖中的作用,并研究 FSCN1 与钆配合物在胃癌中的相互作用。方法 通过荧光定量 PCR 及 Western blot 法检测胃癌组织中 FSCN1 的表达水平;MTT、EdU 法检测干扰 FSCN1 后细胞增殖能力变化;用钆配合物处理 SGC-7901 后检测 FSCN1 mRNA、蛋白表达水平及细胞的增殖能力;siRNA 抑制 FSCN1 的表达,过表达 FSCN1 后检测钆配合物对细胞的增殖能力影响。结果 荧光定量 PCR 及 Western blot 法均显示胃癌组织中 FSCN1 表达水平显著高于癌旁组织;MTT 与 EdU 法结果显示,与 siNC 组比较,干扰 FSCN1 后细胞的增殖受到明显抑制 ( $P < 0.01$ );钆配合物处理 SGC-7901 后,定量 PCR 结果显示,与 siNC 组比较,FSCN1 表达水平受到抑制 ( $P < 0.01$ ),MTT 法结果显示,与 siNC 组比较,细胞增殖受到抑制 ( $P < 0.01$ );MMT 法结果显示过表达 FSCN1 后抑制钆配合物对细胞增殖能力的影响。结论 FSCN1 具有促进胃癌细胞增殖的能力,钆配合物通过抑制 FSCN1 的表达起抑癌作用。

**关键词** FSCN1;胃癌;钆配合物;SGC-7901

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)12-1744-05

胃癌是目前全球常见的人类消化道恶性肿瘤之一,其分子机制仍未被完全解释清楚。因此明确胃癌的发生、发展和转移的分子机制对于提高胃癌的诊断、治疗及预后都有重要的意义。Fascin-1 (FSCN1) 是相对分子量为 55 ku 的细胞骨架蛋白,其能通过聚合肌动蛋白催化其成束而改变细胞骨架,使细胞膜表面突起增多,从而增加上皮细胞的运动性<sup>[1]</sup>。在人体正常组织中 FSCN1 表达相对较少,而在多种肿瘤组织中均呈高表达<sup>[2-3]</sup>。FSCN1 蛋白在胃癌中表达高于癌旁组织(距离癌组织 > 2 cm),FSCN1 的表达量与胃癌体积、侵袭程度、淋巴转移和 TNM 分型呈正相关性<sup>[4-5]</sup>。已有大量文献<sup>[2-5]</sup>报道 FSCN1 对肿瘤转移机制的影响,但对肿瘤增殖

的作用机制研究未见报道。该研究检测了胃癌组织中 FSCN1 mRNA 及其蛋白的表达水平,探讨 FSCN1 在胃癌增殖中的作用,并研究 FSCN1 与钆配合物在胃癌中的相互作用。

### 1 材料与方法

**1.1 细胞及组织来源** 人胃癌细胞株 SGC-7901 购自中国科学院上海生命科学院细胞资源中心。从安徽医科大学第一附属医院收集 20 例胃癌组织及其配对的癌旁组织(距离癌组织 > 2 cm)。所有样品液氮冷冻后存放于 -80 °C 冰箱。该研究获得患者及其家属知情同意和安徽医科大学第一附属医院伦理委员会的批准。

**1.2 主要试剂及仪器** TRIzol、Lipofectamine<sup>®</sup> 2000、RPMI-1640、胎牛血清(FBS)、青霉素/链霉素购自美国 Life Technologies 公司;FSCN1 抗体(MAB3582)和 PVDF 膜购自德国 Millipore 公司;Ligation high Ver. 2 反转录试剂购自日本东洋纺公司;siRNA、MTT 购自美国 Sigma 公司;定量试剂购自美国 KAPA 公司;Cell-Light<sup>™</sup> EdU Apollo<sup>®</sup> 488 *In Vitro* Imaging Kit 购自广州锐博公司;PMSF、BCA 蛋白定量试剂购自上海碧云天公司;Cocktail Protease Inhibitor 购自美国 Roche 公司;PrimeSTAR<sup>®</sup> HS DNA Polymerase with GC Buffer、EcoR I、BamH I 购自日本 TaKaRa 公司;引物由上海英俊公司合成。Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System、NanoDrop 2000 购自美国 Thermo Scientific 公司;Odyssey 蛋白印迹成像系统购自中国 LI-COR 公司;DMI3000 B 型倒置荧光显微镜购自德国 Leica 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 细胞转染** SGC-7901 用含 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素的 RPMI-1640 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的条件下进行培养。使用 Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 转染 siRNA、FSCN1 过表达质粒,具体操作参考说明书。6 孔板中每孔 siRNA 终浓度为 50 nmol/L,质粒每孔为 4 μg。转染 siNC 为 siNC 组,转染 siFSCN1 为 siFSCN1 组,转染过表达空载质粒为 NC 组,转染 FSCN1 过表达质粒为 FSCN1 组。

2015-09-30 接收

基金项目:安徽省年度重点科研计划项目(编号:1301043022)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院<sup>1</sup> 检验科、<sup>2</sup> 普通外科,合肥 230022

作者简介:张敏,女,副主任技师;

徐元宏,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: xy-hong1964@163.com

**1.3.2 钆配合物处理细胞** 使用浓度为 7.865  $\mu\text{mol/L}$  的钆配合物 L203 进行对细胞的给药处理 48 h, 记为 L203 组。

**1.3.3 Western blot 法检测** 用含有  $1 \times \text{cocktail}$  及 1 mmol/L PMSF 的 RIPA 强裂解液冰上裂解 30 min 提取细胞总蛋白, 并用 BCA 试剂盒进行蛋白定量后, 取 60  $\mu\text{g}$  总蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳后, 将蛋白转膜到 PVDF 膜上。用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 室温封闭 1 h, 并用 FSCN1 抗体结合, PBST 洗脱 3 遍后用带荧光标记的二抗孵育并扫膜拍照, 以  $\beta\text{-actin}$  作为内参。

**1.3.4 RNA 抽提及实时定量 PCR** 用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 参照逆转录试剂盒 FSQ-301 说明书以 10  $\mu\text{l}$  体系进行逆转录。将逆转录所得 cDNA 进行实时荧光定量。FSCN1 上游引物: 5'-ACAG-CAGGGGACTCAG-3', 下游引物: 5'-CCCACCGTC-CAGTATT-3'。18S 上游引物: 5'-CAGCCAC-CCGAGATTGAGCA-3', 下游引物: 5'-TAG-TAGCCGACGGGCGGTGTG-3'。反应条件为: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 3 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退水 30 s, 扩增 40 个循环。数据采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法进行相对定量分析。

**1.3.5 FSCN1 过表达载体构建** 从人 cDNA 中扩增出 FSCN1 (NM\_003088.3) 完整 CDS 区, 经过 EcoR I / BamH I 酶切后, 连接到 pcDNA3.1(-) 载体中。转化到 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 挑选单克隆。经过 PCR、酶切鉴定后进行测序。上游引物序列为: 5'-TAAGAATTCGCGCAGCGCCTCTCGTCTAC-3'; 下游引物序列为: 5'-TAAGGATCCGTTAGCAGG-GAGGGTTGGCAGGAGC-3'。

**1.3.6 MTT 实验** SGC-7901 经过处理后接种 1 000 个/200  $\mu\text{l}$  到 96 孔板中, 每组设 3 个复孔。在 1、3、4、5 d 每孔加 MTT 溶液 (5 mg/ml 用 PBS 配) 20  $\mu\text{l}$ 。继续孵育 4 ~ 6 h 终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液, 每孔加 150  $\mu\text{l}$  DMSO 充分溶解, 在 450 nm 处测定吸光度 (optical density) 值, 计算 3 个重复孔的平均 OD 值。按以下公式计算细胞的生长抑制率: 细胞生长抑制率 (%) =  $(\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{实验组}}) / \text{OD}_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。绘制不同药物浓度的细胞生长抑制率曲线, 并计算半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ )。

**1.3.7 EdU 实验** 将处理后的细胞用胰酶消化, 按  $1 \times 10^4$  个细胞/孔加入到 96 孔板中, 待细胞完全贴壁后, 每孔中加入 50  $\mu\text{mol/L}$  的 EdU 稀释液, 继续培养 2 h, 弃反应液, PBS 清洗细胞 2 次, 用 4% 多聚

甲醛室温固定 30 min, 每孔加入 50  $\mu\text{l}$ 、2 mg/ml 甘氨酸摇床孵育 5 min, PBS 洗 3 次。最后分别用 Apollo<sup>®</sup> 488 染色反应液和 Hoechst 33342 染色 30 min, 期间用含 0.5% TritonX-100 的 PBS 洗 3 次。在荧光显微镜下观察结果。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 软件进行分析, 所有计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  形式表示, 两组比较采用  $t$  检验, 多组比较采用方差分析, 组间差异比较采用方差齐性检验, 两两比较采用 LSD 法检验。

## 2 结果

**2.1 FSCN1 在胃癌组织中的表达** 相比于癌旁组织, 在胃癌组织中有 60% (12 例) 样本 FSCN1 mRNA 的表达水平显著增高, 15% 样本中 FSCN1 mRNA 表达水平无显著差异, 25% 的样本中 FSCN1 mRNA 表达水平降低 (图 1A)。随后, 提取其中 9 例胃癌组织及相应癌旁组织的总蛋白进行 Western blot 法检测, 与癌旁组织相比有 6 例样品的胃癌组织中 FSCN1 蛋白表达水平明显上升 (图 1B), 差异有统计学意义。结果表明, FSCN1 在胃癌组织中的表达明显高于癌旁组织。

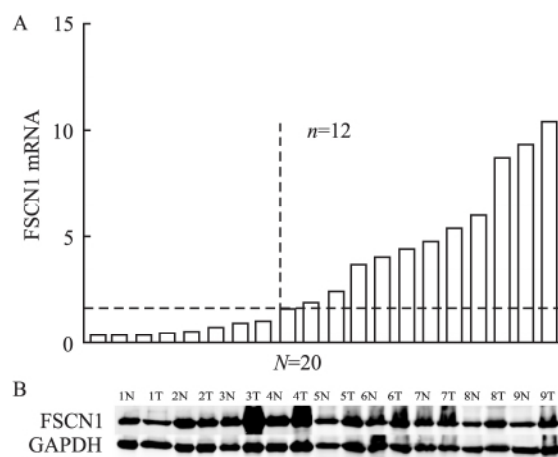


图 1 FSCN1 在胃癌组织中的表达

A: qRT-PCR 检测 FSCN1 在 20 例胃癌组织中的表达情况; N: 总样本量; n: FSCN1 在胃癌组织中高表达的样本量; B: Western blot 法检测 FSCN1 在 9 例胃癌组织中的表达; 1~9: 样本编号; N: 癌旁组织; T: 胃癌组织

**2.2 通过 siRNA 下调胃癌细胞中 FSCN1 的表达对细胞增殖的影响** FSCN1 siRNA 转染 SGC-7901, 48 h 后通过 Western blot 法验证 siFSCN1 可以降低 FSCN1 表达水平, 并且下调 FSCN1 后能够有效抑制胃癌细胞的增殖 (图 2A、2B)。EdU 实验结果也得到相同的结论, 转染了 siNC 的 SGC-7901 细胞均有

50%以上能被 EdU 标记,而 siFSCN1 组被 EdU 标记的细胞均少于 25%,其数值分别为(51 ± 4.3)%、(22 ± 2.7)% ( $P=0.0016$ )。相比 siNC 组,siFSCN1 组 DNA 的复制活性显著降低,即细胞增殖能力显著降低(图 2C)。

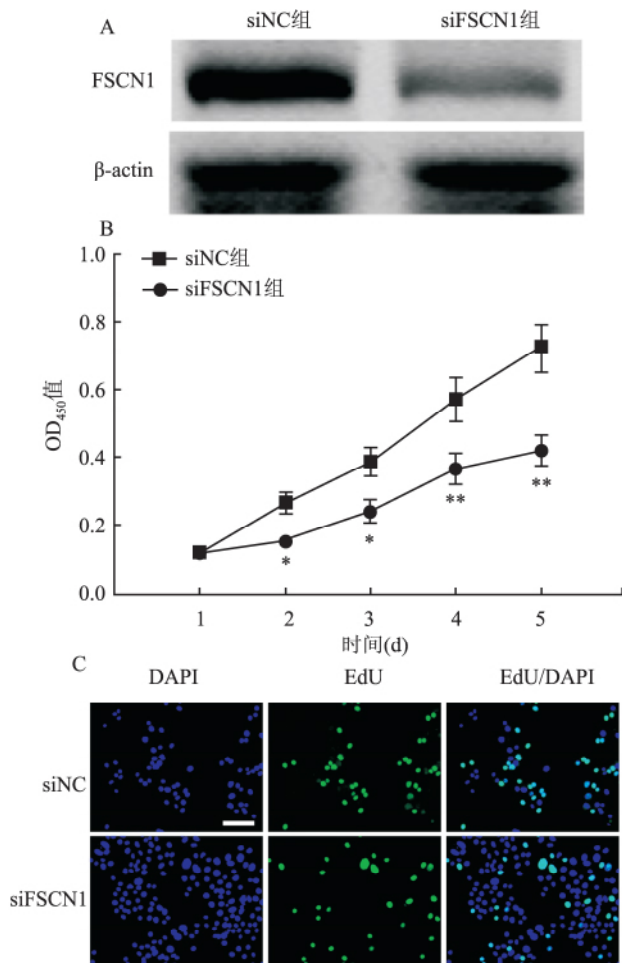


图 2 干扰 SGC-7901 中 FSCN1 的表达对细胞增殖的影响

A: Western blot 法检测转染 siFSCN1、siNC 至 SGC-7901 后 FSCN1 蛋白表达水平; B: MTT 法检测 SGC-7901 敲减 FSCN1 后细胞增殖能力变化;与 siNC 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; C: EdU 法检测转染 siFSCN1、siNC 至 SGC-7901 后细胞增殖能力,细胞核处于 S 期的细胞显示为绿色,其他显示为蓝色(DAPI),倒置荧光显微镜成像 ×200

**2.3 L203 通过降低 FSCN1 表达水平对细胞增殖的影响** 按上述处理 24 h 后显示细胞增殖能力受到明显抑制,测得 IC<sub>50</sub> 为 7.865 μmol/L (图 3A、3B)。同时,MTT 实验显示 L203 组相对于 NC 组,SGC-7901 的增殖明显受到抑制( $P=0.0028$ ),见图 3C。为了进一步证明 L203 是通过影响 FSCN1 的表达水平来发挥抑制胃癌细胞增殖作用,在 L203 药物处理 48 h 后分别用 qRT-PCR 和 Western blot 法检测 FSCN1 的表达水平,结果显示 L203 处理组 FSCN1

mRNA 及蛋白表达水平较 NC 组均降低 50% 以上(图 3D、3E)。

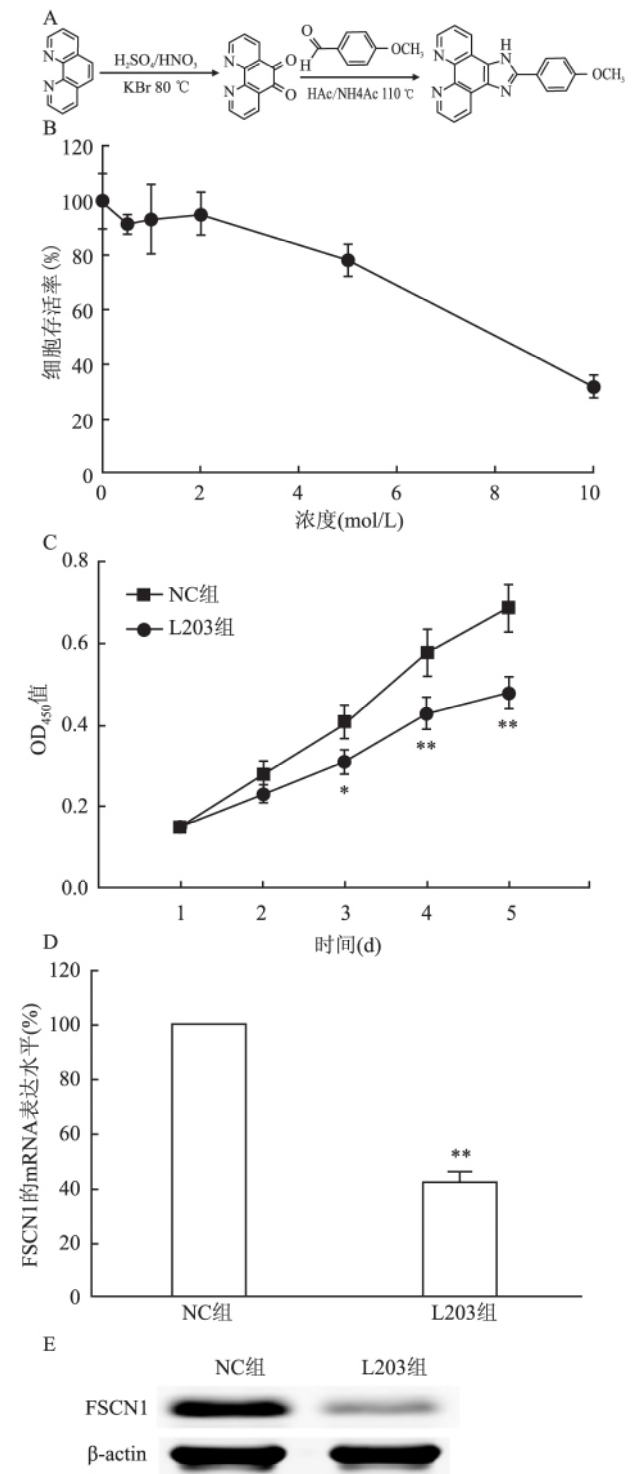


图 3 L203 对 SGC-7901 的增殖及 FSCN1 表达水平的影响

A: L203 的结构式; B: 不同浓度 L203 对诱导 24 h 后 SGC-7901 细胞的存活率; C: MTT 检测 L203 处理后不同时间点细胞的增殖情况; D: qRT-PCR 法检测 L203 处理后 FSCN1 mRNA 表达水平; E: Western blot 法检测 L203 处理后 FSCN1 蛋白表达水平;与 NC 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

## 2.4 过表达 FSCN1 对 L203 的抑癌作用的影响

MTT 结果显示 SGC-7901 中过表达 FSCN1 可以显著促进 L203 处理过的细胞的增殖 ( $P = 0.0035$ ), 但细胞增殖速度仍低于 NC 组(图 4A); EdU 结果显示 FSCN1 可以显著促进 L203 处理过的细胞的增殖 ( $P = 0.0028$ ), 但细胞增殖速度仍低于 NC 组(图 4B)。

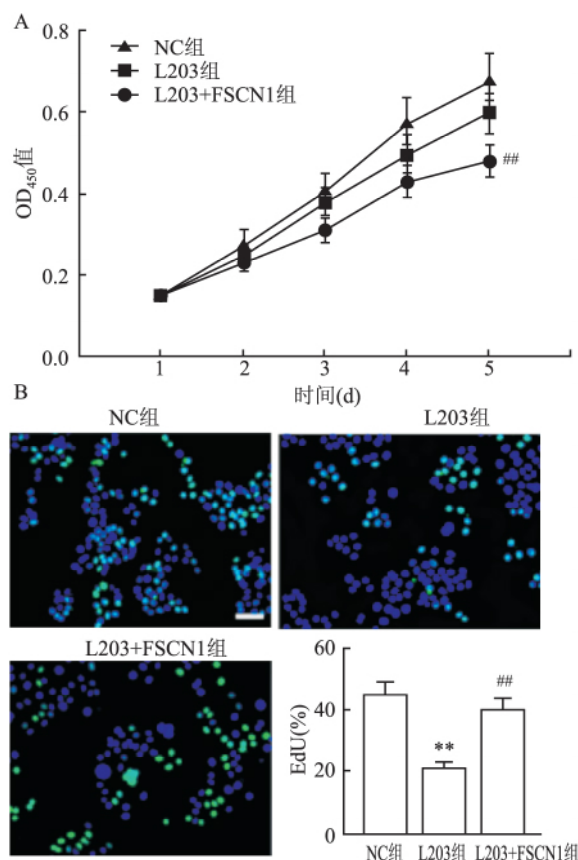


图4 过表达 FSCN1 对 L203 的抗癌作用的影响

A: MTT 法检测转染空载及 FSCN1 过表达质粒到 SGC-7901 后同时以 L203 处理的细胞增殖能力变化; B: EdU 法检测转染空载及 FSCN1 过表达质粒到 SGC-7901 后同时以 L203 处理细胞后的增殖能力变化, 细胞核处于 S 期的细胞显示为绿色, 其他显示为蓝色 (DAPI), 倒置荧光显微镜成像  $\times 200$ ; 与 NC 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 L203 组比较: ##  $P < 0.01$

## 3 讨论

FSCN1 在细胞迁移、运动、黏附和细胞相互作用等方面具有重要的作用, 并且 FSCN1 作为原癌基因在多种肿瘤细胞中通过增加肿瘤细胞的运动能力促进肿瘤的形成<sup>[3]</sup>。在胃癌组织中 FSCN1 蛋白表达与肿瘤增殖、侵袭、转移和 TNM 分型呈正相关性。研究<sup>[6]</sup>显示在胃癌细胞 MKN45 中敲减 FSCN1 的表达会抑制细胞的增殖和迁移。本研究检测了 FSCN1 在胃癌组织及其配对的癌旁组织中的表达水平, 显示 FSCN1 在胃癌组织中高表达。在 SGC-7901 中下

调 FSCN1 表达可抑制胃癌细胞的增殖。

化疗是目前临床治疗癌症的三大手段之一, 铂类药物是目前治疗癌症的常用药物, 但这些药物副作用大、容易产生耐药性等使其临床应用受限<sup>[7]</sup>。钆配合物作为一类低毒高效的金属基抗肿瘤化合物, 与顺铂等相比具有更复杂的作用机制及较低的毒副作用而成为研究的热点<sup>[8]</sup>。目前钆配合物的抗癌机制研究主要集中在以下几个方面: 与单个碱基作用; 与蛋白和多肽作用; 与 DNA 作用<sup>[9]</sup>。钆配合物作为当前非铂类抗癌药物的研究热点, 有文献<sup>[10]</sup>报道其可以抑制胃癌细胞 SGC-7901 增殖。对于钆配合物与 DNA 及单个碱基的相互作用机制已研究比较透彻, 但对于其他的靶向作用机制尚不清楚, 这极大地制约了钆的临床应用<sup>[8]</sup>。本研究显示 SGC-7901 细胞经过钆配合物 L203 作用后细胞增殖能力受到抑制,  $IC_{50}$  为  $7.865 \mu\text{mol/L}$ 。SGC-7901 经 L203 处理后 FSCN1 的 mRNA 和蛋白表达水平都比未加药物处理组明显降低。

通过 L203 处理细胞后过表达 FSCN1 质粒, MTT 及 EdU 实验进一步确认 FSCN1 的过表达可以降低钆配合物的抑癌作用。该研究成果为确认钆配合物的蛋白作用靶点提供了依据。钆配合物的抑癌作用还需要进一步研究。

## 参考文献

- [1] Jayo A, Parsons M. Fascin: a key regulator of cytoskeletal dynamics [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(10): 1614-7.
- [2] 周亮, 王德盛. Fascin-1 与消化系统恶性肿瘤 [J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(23): 2125-30.
- [3] Tan V Y, Lewis S J, Adams J C, et al. Association of fascin-1 with mortality, disease progression and metastasis in carcinomas: a systematic review and meta-analysis [J]. BMC Med, 2013, 11: 52.
- [4] 勾文峰, 杨雪峰, 赵爽, 等. 胃癌组织及细胞株细胞骨架蛋白 Fascin-1 表达临床意义分析 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 21(18): 1400-4.
- [5] Tsai W C, Jin J S, Chang W K, et al. Association of cortactin and fascin-1 expression in gastric adenocarcinoma: correlation with clinicopathological parameters [J]. J Histochem Cytochem, 2007, 55(9): 955-62.
- [6] Fu H, Wen J F, Hu Z L, et al. Knockdown of fascin1 expression suppresses the proliferation and metastasis of gastric cancer cells [J]. Pathology, 2009, 41(7): 655-60.
- [7] 牟永平, 吴刚, 周立社, 等. 抗肿瘤金属配合物药物及其药理作用的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(11): 1409-13.
- [8] 杨清, 罗文平, 王金涛, 等. 芳基钆抗癌化合物的研究进展 [J]. 中国科学: 化学, 2014, 44(4): 437-47.
- [9] 刘杰, 计亮年, 梅文杰. 金属钆配合物的抗肿瘤活性及其作用机理 [J]. 化学进展, 2004, 16(6): 969-74.
- [10] 薛瑶瑶. 钆(II)杂(芳)环醚(酮)缩氨基硫脲配合物的合成, 表征及其生物活性研究 [D]. 西北大学, 2011.

## microRNA-137 对人胃癌 MKN-45 细胞迁移侵袭的影响

刘晓阳<sup>1,2</sup>, 郑海伦<sup>2</sup>, 任志<sup>2</sup>, 张磊<sup>1</sup>

**摘要** 目的 研究 miR-137 过表达对人胃癌 MKN-45 细胞迁移侵袭的影响。方法 采用 RT-PCR 法检测 5 株胃癌细胞和人胃黏膜上皮细胞(GES)中 miR-137 的表达。构建 miR-137 慢病毒,并转染 MKN-45 细胞。通过划痕实验、细胞侵袭小室检测和 Transwell 侵袭实验以分析过表达 miR-137 对 MKN-45 细胞迁移侵袭的影响。结果 MKN-45 细胞中 miR-137 的表达丰度明显低于在 GES、MKN-74、AGS、SGC-7901 和 BGC-823 细胞,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。同时成功构建 micro up 病毒感染的细胞组。划痕实验结果显示,与空白对照组(CON组)和阴性对照组(NC组)比较,micro up 组 24、48 h 后平均迁移率差异有统计学意义( $P < 0.05$ );细胞侵袭小室检测结果显示,与 CON 组、NC 组比较,micro up 组的平均迁移率差异有统计学意义( $P < 0.01$ );Transwell

侵袭实验结果显示,与 CON 组、NC 组比较,micro up 组平均迁移率差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论 miR-137 过表达能明显抑制人胃癌 MKN-45 细胞迁移侵袭能力,有可能成为胃癌治疗的新靶点。

**关键词** 胃癌; miR-137; MKN-45; 细胞侵袭

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)12-1748-05

microRNA(miR)是长度约 18~25 个核苷酸的非编码单链小分子 RNA,越来越多的研究<sup>[1-2]</sup>提示 miR 几乎参与调控所有人类已知的细胞进程,在功能上充当癌基因或抑癌基因的角色,在肿瘤的发生和发展中起着重要的调控作用。胃癌是人类的常见恶性肿瘤。该研究通过在人胃癌 MKN-45 细胞中转染 miR-137 使其过表达,探讨 miR-137 对胃癌细胞侵袭和转移能力的影响,进一步揭示 miR-137 在胃癌细胞中的生物学功能。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料 has-miR-137、永生化正常人胃黏

2015-09-08 接收

基金项目:安徽高等学院省级自然科学研究项目(编号:KJ2012B103)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学第一附属医院消化内科,合肥 230022

<sup>2</sup>蚌埠医学院第一附属医院消化科,蚌埠 233003

作者简介:刘晓阳,男,主治医师;

张磊,女,副教授,主任医师,硕士生导师;责任作者;E-mail: chinazhanglei@163.com

## Ru complex as tumor inhibitor by regulating FSCN1 in gastric cancer cells

Zhang Min<sup>1</sup>, Xu Yuanhong<sup>1</sup>, Dong Bingbin<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Clinical Laboratory, <sup>2</sup>Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To study the role of FSCN1 in the proliferation of gastric cancer and the interaction between FSCN1 and Ru complex in gastric cancer. **Methods** The expression level of FSCN1 was measured by qRT-PCR and Western blot. The proliferation ability was tested using MTT and EdU assays. Then the mRNA and protein levels of FSCN1 in SGC-7901 cells were measured after treating with Ru complex. FSCN1 were transfected into cells, and the proliferation ability was tested using MTT and EdU assays after treating with Ru complex. **Results** The expression level of FSCN1 in gastric cancer tissues was higher than that in adjacent tissues. Knockdown of FSCN1 in SGC-7901 cells inhibited cell proliferation. The proliferation ability and the expression level of FSCN1 in SGC-7901 cells were decreased after treating with Ru complex. And overexpression of FSCN1 reversed the anti-tumor effect of Ru complex. **Conclusion** FSCN1 as the oncogene can regulate gastric cancer proliferation, and Ru complex reverses the course by inhibiting FSCN1 expression.

**Key words** FSCN1; gastric cancer; Ru complex; SGC-7901