

敲低性别决定区 Y-box 蛋白 5 对胃癌细胞增殖、侵袭和上皮间质转化的影响

李天生,冯东升,菅书明

(许昌市中心医院,河南 许昌 461000)

摘要: [目的] 探讨敲低性别决定区 Y-box 蛋白 5(Sox-5)的表达水平及对胃癌细胞增殖、侵袭和上皮间质转化(EMT)的影响。[方法] 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测胃癌细胞和正常人胃黏膜上皮细胞中 Sox-5 mRNA 的相对表达水平;sh-NC 和 sh-Sox-5 质粒转染 BGC823 细胞,蛋白免疫印迹实验检测 Sox-5 蛋白表达水平;MTT 实验、划痕实验和 Transwell 实验分别检测 BGC823 细胞增殖活性、迁移能力和侵袭能力;蛋白免疫印迹实验检测 Twist、波形蛋白(Vimentin)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)的表达。[结果] 胃癌细胞中 Sox-5 mRNA 的相对表达水平高于正常人胃黏膜上皮细胞($P<0.01$);与转染 sh-NC 组相比,转染 sh-Sox5 质粒组中 Sox-5 蛋白的相对表达水平降低(1.120 ± 0.142 vs 0.124 ± 0.010 , $t=9.032$, $P<0.001$);与转染 sh-NC 组相比,转染 sh-Sox-5 组细胞增殖活性显著降低(1.32 ± 0.10 vs 0.74 ± 0.06 , $t=3.514$, $P=0.005$),迁移率能力减弱($46.2\%\pm4.7\%$ vs $17.6\%\pm2.5\%$, $t=9.625$, $P<0.001$),侵袭能力减弱(93.7 ± 9.1 vs 113.7 ± 6.5 , $t=3.103$, $P=0.036$);敲低 Sox-5 蛋白表达后 Twist 和 Vimentin 蛋白表达减弱,E-cadherin 蛋白表达增强(P 均 <0.001)。[结论] 敲低胃癌细胞中 Sox-5 的表达,可抑制胃癌细胞的增殖、迁移、侵袭和 EMT。

关键词: 胃癌;Sox-5;增殖;迁移;侵袭

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2021)12-1017-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2021.12.B008

Effects of Knockdown on Sex Determining Region Y-box Protein 5 Gastric Cancer Cell Proliferation, Invasion and Epithelial-Mesenchymal Transition

LI Tian-sheng, FENG Dong-sheng, JIAN Shu-ming

(Xuchang Central Hospital, Xuchang 463000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of knocking down expression level of sex determining region Y-box protein 5 (Sox-5) on the proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of gastric cancer cells. [Methods] The relative expression level of Sox-5 mRNA in gastric cancer cells and normal human gastric mucosal epithelial cells was detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). The sh-NC and sh-Sox-5 plasmids were transfected into gastric cancer BGC823 cells, and the protein expression level of Sox-5 was detected by Western blotting. The proliferation activity, migration ability and invasion ability of BGC823 cells was detected by MTT method, scratch assay and transwell test, respectively. The expression of Twist, Vimentin, and E-cadherin proteins was detected by Western blotting. [Results] The relative expression level of Sox-5 mRNA in gastric cancer cells was higher than that in normal human gastric mucosal epithelial cells ($P<0.01$). Compared with the sh-NC transfected group, the relative expression level of Sox-5 protein in the sh-Sox5 plasmid transfected group was reduced (1.120 ± 0.142 vs 0.124 ± 0.010 , $t=9.032$, $P<0.001$). Compared with the transfected sh-NC group, the cell proliferation activity of the transfected sh-Sox-5 group was significantly reduced (1.32 ± 0.10 vs 0.74 ± 0.06 , $t=3.514$, $P=0.005$), the cell migration rate was decreased ($46.2\%\pm4.7\%$ vs $17.6\%\pm2.5\%$, $t=9.625$, $P<0.001$), and the invasion ability was also decreased (93.7 ± 9.1 vs 113.7 ± 6.5 , $t=3.103$, $P=0.036$). After knocking down Sox-5 protein expression, the expression of Twist and Vimentin protein decreased, and the expression of E-cadherin protein increased(all $P<0.001$). [Conclusion] Knockdown of Sox-5 expression can inhibit the proliferation, migration, invasion and EMT of gastric cancer cells.

Subject words: gastric cancer; Sox-5; proliferation; migration; invasion

胃癌是常见的消化道恶性肿瘤,发病率在恶性肿

瘤中列第 5 位,死亡率居第 3 位^[1]。手术是治疗胃癌的有效方法,但术后复发转移仍是一大难题,研究胃癌潜在的转移机制,作出相应的预防措施,可有效提高胃癌术后的生存率^[2]。上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT) 在癌症的转移进展中

基金项目: 2019 年河南省医学科技攻关项目共建项目(LHGJ20191393)
通信作者: 菅书明,主任,主任医师,本科;许昌市中心医院胃肠外科,
河南省许昌市魏都区华佗路 30 号(461000);E-mail: jian-shuming1012@126.com

收稿日期: 2021-06-03; **修回日期:** 2021-07-27

起关键作用,在 EMT 过程中上皮细胞失去细胞间的黏附形成间充质表型,改变细胞的形态和基因表达,增强细胞的运动能力和侵袭能力,促进癌细胞的转移^[3-4]。EMT 涉及多种蛋白质的改变,包括 E-钙黏连蛋白(E-cadherin)的失活、间充质标记波形蛋白(Vimentin)的激活,这些复杂的过程由级联信号网络和一些转录因子相互作用完成^[5]。性别决定区 Y-box 蛋白 5(sex determining region Y-box protein 5, Sox-5)是 SOX 家族中的一个转录因子,近几年对 Sox-5 的研究主要集中在肿瘤进展中。本文主要研究 Sox-5 在胃癌中的表达,对胃癌细胞增殖、侵袭和 EMT 的影响,为胃癌的靶向治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 一般材料

胃癌细胞 AGS、MGC803、BGC823 和正常人胃黏膜上皮细胞 GES-1 细胞购于 ATCC 细胞库;培养基(RPMI 1640)、胎牛血清、龙胆紫和多聚甲醛固定液等购于北京索莱宝生物科技有限公司;反转录试剂盒和总 RNA 提取试剂盒购于赛默飞;anti-Sox-5、anti-Twist、anti-Vimentin、anti-E-cadherin 和二抗购于美国 Abcam 公司;sh-NC 和 sh-Sox-5 质粒由深圳市默赛尔生物医学科技发展有限公司构建;Transwell 小室购于美国 Corning 公司;酶标仪型号:Multiskan FC 购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司,流式细胞仪型号:FACS-can 购于美国 BD 公司,凝胶成像仪型号:Amersham Imager 600,购于美国 GE 公司。

1.2 qRT-PCR 检测 Sox-5 mRNA 相对表达水平

按照 Trizol 试剂说明提取组织和细胞中的总 RNA。Sox-5 上游引物序列为 5'-CAGCCAGAGCCAGGACATTACG-3'、下游引物序列为 5'-GTCCTGGTCCGGCCTTACGT-3';GAPDH 上游引物序列为 5'-GACCTTACGATACTCCATG-3'、下游引物序列为 5'-CTACAGAGAGATTGTCTTG-3'。反转录为 cDNA,以 GAPDH 作为内参,按照公式 $RQ=2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算 Sox-5 mRNA 的相对表达水平。

1.3 转染实验敲低 BGC823 细胞中 Sox-5 蛋白表达

收集 BGC823 细胞,接种至 6 孔板中,每孔 5×10^5 个细胞,采用无血清培养基孵育 24 h。用 Lipofectamine 2000 将 sh-NC 和 sh-Sox-5 质粒转染至细胞

中,分别标记为 sh-NC 组和 sh-Sox-5 组。恒温箱中培养 6 h 后更换新鲜含有 10%胎牛血清的培养液,继续孵育 48 h,利用蛋白免疫印迹实验检测转染效率。

1.4 蛋白免疫印迹实验检测 Sox-5 蛋白表达

收集 sh-NC 和 sh-Sox-5 组细胞,1 000 r/min 离心 5 min 弃去上清,加入 2 mL PBS 溶液清洗细胞,再次 1 000 r/min 离心 5 min 弃去上清。向细胞沉淀中加入细胞裂解液 500 μ L,放置冰块上裂解 30 min,在此期间每隔 10 min 轻轻弹动 EP 管,使细胞充分裂解。根据 BCA 蛋白定量试剂盒的标准品的浓度曲线计算提取蛋白的浓度。按照 1:1 的比例加入 Loading buffer 充分混匀放置沸水中煮 5 min,使蛋白变性。制作 10%的浓缩胶和 15%的分离胶,加入 30 μ g 蛋白样品行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将凝胶上的蛋白湿转至 PVDF 膜上。采用 5%的脱脂奶粉浸泡室温下封闭 2 h、TBST 溶液清洗后放置 anti-Sox-5 抗体、anti- β -actin 抗体(1:1 000)盒中,4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜, TBST 溶液清洗后放入二抗(1:4 000)盒中室温孵育 1 h。在膜上滴加显影液,至于凝胶成像系统中拍照。

1.5 MTT 实验检测细胞增殖

sh-NC 和 sh-Sox-5 组细胞以每孔 2×10^3 的密度接种于 96 孔板中,每组细胞设置 6 个平行孔,共铺 6 块板,依次标记的检测时间点为 12、24、36、48、60、72 h。至检测时间点时向检测孔中加入 20 μ L(5 mg/mL) 噻唑蓝溶液,放置恒温箱中继续孵育 4 h。移液器吸去上清,加入 150 μ L 二甲基亚砷溶液,震荡 5 min 使细胞充分裂解,利用酶标仪检测 570 nm 处的细胞的光密度(optical density, OD)值。

1.6 划痕实验检测细胞迁移能力

sh-NC 和 sh-Sox-5 组细胞以 3×10^5 的密度接种于 6 孔板中,每组细胞设置 3 个平行孔。放置恒温箱中培养 24 h,此时细胞融合度达 80%左右。用 10 μ L 的枪头,自上至下划一道伤痕,拍照标记为 24 h 时划痕的宽度(a)。更换新鲜培养基,放置恒温箱中继续孵育 48 h,拍照标记为 72 h 时划痕的宽度(b)。迁移率=(a-b)/a $\times$ 100%。

1.7 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

sh-NC 和 sh-Sox-5 组细胞,每孔 2×10^4 个细胞接种于 6 孔板中,用 100 μ L 无血清培养基悬浮细胞,种至小室里面。在小室下部加入 6 000 μ L 含有 20%血清的培养基,放置恒温箱中培养 48 h。取出小室,

倒掉培养基,然后依次放入含有多聚甲醛和结晶紫溶液中进行固定和染色。用棉签擦去小室里面未发生侵袭的细胞,放在显微镜下拍照,计算每个视野中发生侵袭的细胞。

1.8 蛋白免疫印迹实验检测 Twist、Vimentin 和 E-cadherin 蛋白表达

蛋白提取、定量、变性及凝胶电泳方法见 1.4 部分,采用 5%的脱脂奶粉浸泡室温下封闭 2 h、TBST 溶液清洗后放置 anti-Twist、anti-Vimentin、anti-E-cadherin 抗体和 anti- β -actin 抗体(1:1 000)盒中,4℃冰箱中过夜,TBST 溶液清洗后放入二抗(1:4 000)盒中室温孵育 1 h。在膜上滴加显影液,至于凝胶成像系统中拍照。

1.9 统计学处理

应用 SPSS 21.0 软件行统计分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间的两两比较采用 SNK-*q* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Sox-5 mRNA 在胃癌细胞中的表达水平

Sox-5 mRNA 在胃癌细胞 AGS、MGC803、BGC823 细胞和正常人胃黏膜上皮细胞 GES-1 中的相对表达水平分别为 3.42 ± 0.57 、 3.15 ± 0.62 、 4.07 ± 0.53 和 1.00 ± 0.07 ,单因素方差分析显示组间 Sox-5 mRNA 相对表达水平具有统计学差异($F=39.660$, $P<0.001$),组间两两比较结果显示,AGS、MGC803、BGC823 细胞 Sox-5 mRNA 相对表达水平均高于 GES-1 ($q=2.430$ 、 2.147 、 3.130 , P 均<0.01)。BGC823 细胞中 Sox-5 mRNA 的表达水平最高,选择 BGC823 细胞进行后续实验。

2.2 敲低 BGC823 细胞中 Sox-5 蛋白表达

利用转染实验敲低 BGC823 细胞中 Sox-5 蛋白表达,蛋白免疫印迹实验显示 sh-Sox-5 组 Sox-5 蛋白的相对表达水平为 0.124 ± 0.010 ,显著低于 sh-NC 组 Sox-5 蛋白的相对表达水平(1.120 ± 0.142 , $t=9.032$, $P<0.001$)(Figure 1A)。

2.3 敲低 BGC823 细胞中 Sox-5 蛋白表达对细胞增殖的影响

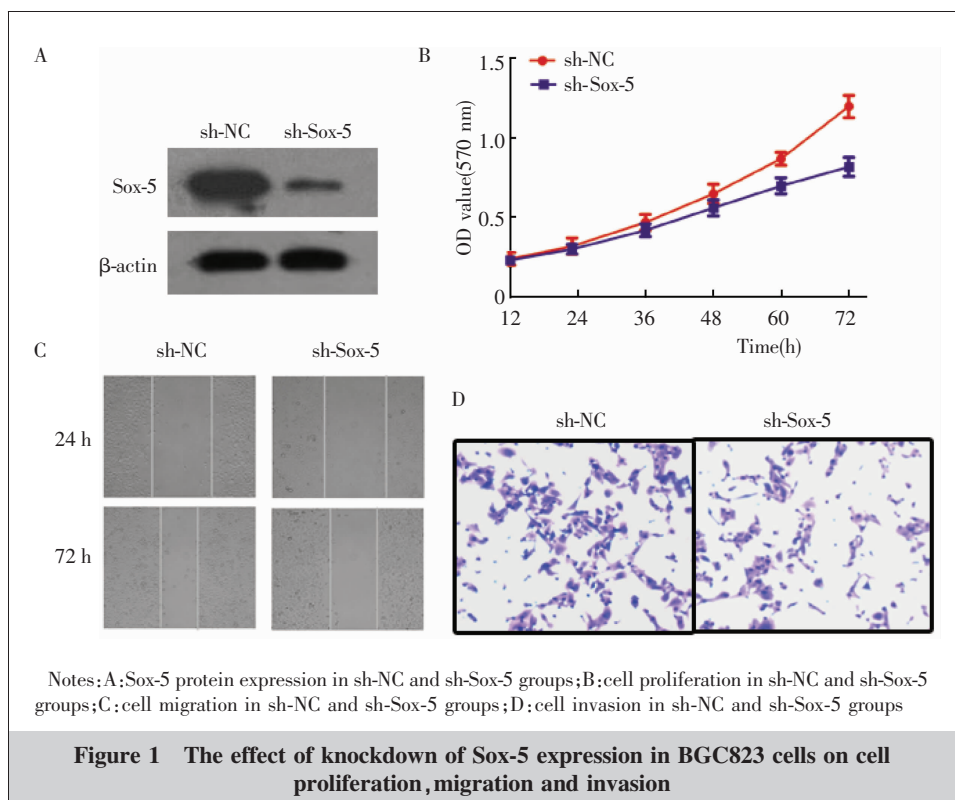
细胞培养 72 h 时,sh-Sox-5 组细胞的 OD 值为 0.74 ± 0.06 ,低于 sh-NC 组细胞 OD 值(1.32 ± 0.10 , $t=3.514$, $P=0.005$)(Figure 1B)。

2.4 敲低 BGC823 细胞中 Sox-5 蛋白表达对细胞迁移的影响

划痕实验检测细胞的迁移能力,以 24 h 细胞为对照,培养 72 h 时 sh-Sox-5 组细胞的迁移率为 $17.6\% \pm 2.5\%$,低于 sh-NC 组细胞的迁移率($46.2\% \pm 4.7\%$, $t=9.625$, $P<0.001$)(Figure 1C)。

2.5 敲低 BGC823 细胞中 Sox-5 蛋白表达对侵袭影响

Transwell 实验检测细胞的侵袭能力,细胞孵育 48 h 后显示 sh-Sox-5 组穿膜细胞数为 93.7 ± 9.1 ,低于 sh-NC 组穿膜细胞数(113.7 ± 6.5 , $t=3.103$, $P=0.036$)(Figure 1D)。



2.6 敲低 BGC823 细胞中 Sox-5 蛋白表达对 EMT 相关蛋白表达的影响

利用蛋白免疫印迹实验检测敲低 BGC823 细胞中 Sox-5 蛋白表达后对 EMT 相关蛋白表达的影响,结果显示 sh-Sox-5 组 Twist 和 Vimentin 蛋白灰度值低于 sh-NC 组,E-cadherin 蛋白灰度值高于 sh-NC 组(Figure 2,Table 1)。

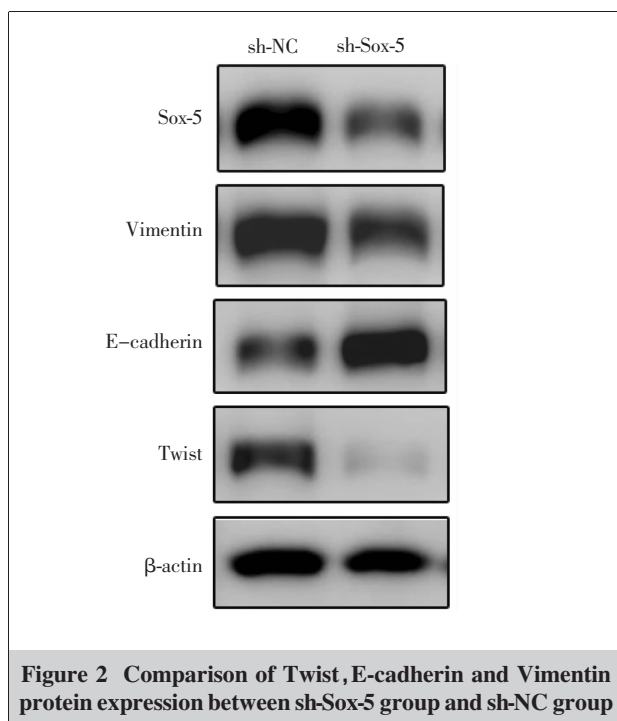


Table 1 Comparison of protein expression gray values in two groups

Group	Sox-5	Vimentin	E-cadherin	Twist
sh-NC	1.152±0.105	1.025±0.114	0.374±0.017	0.745±0.021
sh-SOX5	0.105±0.012	0.185±0.013	1.320±0.181	0.025±0.001
t	15.201	12.054	15.382	8.263
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

胃癌是临床上常见的恶性肿瘤,术后的复发转移使其生存率降低^[6]。肿瘤细胞从相对固定的细胞表型过度到具有侵袭性的细胞表型被认为是发生侵袭的重要原因^[7],寻找在侵袭过程中发挥重要作用的关键因子是目前能解决的主要问题。

研究显示,Sox-5 在多种恶性肿瘤中高表达,并且与肿瘤的侵袭和转移相关,主要包括乳腺癌、胃癌和卵巢癌^[8-10]。另外在前列腺癌中 Sox-5 的表达明显增加,通过 TGF-β 介导的 EMT 促进前列腺癌转移,

导致患者预后不良^[11]。Sox-5 在原发性肺癌组织中表达增加,将 Sox-5 转染至肺癌细胞中使其过表达后,增加了细胞的侵袭和转移能力,相反将 Sox-5 敲低以后肺癌细胞的侵袭和转移能力减弱^[12]。

本研究中,我们首先检测了胃癌组织和细胞中 Sox-5 的表达,结果显示在胃癌组织和细胞中 Sox-5 均处于高表达水平。将 sh-Sox-5 转染至 BGC823 细胞中,使 Sox-5 蛋白表达降低,进一步研究 Sox-5 对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。结果显示 Sox-5 低表达组细胞的增殖、迁移和侵袭能力减弱。EMT 参与肿瘤细胞转移的早期阶段,在恶性肿瘤中促进细胞转化成更具有侵袭能力的细胞表型。EMT 的发生伴随着肿瘤标志物的变化,主要包括 E-cadherin、Twist 和 Vimentin 蛋白。本研究中 Sox-5 被敲低以后, Twist 和 Vimentin 蛋白的表达减弱,E-cadherin 蛋白的表达增强。在许多恶性肿瘤中转录因子(Twist、Snail、Slug、ZEB1 和 ZEB2)在上皮间质转化中发挥重要作用,经常被过度激活促进癌细胞的迁移和侵袭^[13]。Twist 是胚胎发育中起关键调节作用的转录因子,广泛参与调控器官的生长发育、肿瘤形成、细胞增殖和分化等过程, Twist 的过表达可能促进细胞表型的恶性转化,有利于细胞的侵袭^[14]。Vimentin 蛋白的过表达与肿瘤的生长、侵袭和预后不良密切相关^[15]。而 E-cadherin 蛋白表达的减弱使细胞之间的黏附作用减小,有利于细胞的游离和远处转移。因此推断 Sox-5 促进胃癌细胞的侵袭与上皮间质转化有关。

综上所述, Sox-5 在胃癌中表达升高,敲低其表达后可抑制胃癌细胞的增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化,发挥一定抗肿瘤活性,有可能成为胃癌治疗的有效靶点。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
- [2] Saito H, Kono Y, Murakami Y, et al. Prognostic significance of pre- and postoperative lymphocyte counts in patients with gastric cancer[J]. Dig Surg, 2019, 36(2): 137-143.
- [3] Pastushenko I, Blanpain C. EMT transition states during tumor progression and metastasis[J]. Trends Cell Biol, 2019, 29(3): 212-226.
- [4] Babaei G, Aziz SG, Jaghi NZZ. EMT, cancer stem cells

- and autophagy; The three main axes of metastasis [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133: 110909.
- [5] Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(2): 69–84.
 - [6] Chen D, Liu Z, Liu W, et al. Predicting postoperative peritoneal metastasis in gastric cancer with serosal invasion using a collagen nomogram[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 179.
 - [7] Sosa MS, Bravo-Cordero JJ. Understanding the mechanistic features of cancer metastasis [J]. Cancer Rep (Hoboken), 2020, 3(1): e1238.
 - [8] Sun C, Ban Y, Wang K, et al. SOX5 promotes breast cancer proliferation and invasion by transactivation of EZH2 [J]. Oncol Lett, 2019, 17(3): 2754–2762.
 - [9] You J, Zhao Q, Fan X, et al. SOX5 promotes cell invasion and metastasis via activation of Twist-mediated epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 2465–2476.
 - [10] Chen L, Cheng X, Tu W, et al. Apatinib inhibits glycolysis by suppressing the VEGFR2/AKT1/SOX5/GLUT4 signaling pathway in ovarian cancer cells [J]. Cell Oncol (Dordr), 2019, 42(5): 679–690.
 - [11] Hu J, Tian J, Zhu S, et al. Sox5 contributes to prostate cancer metastasis and is a master regulator of TGF- β -induced epithelial mesenchymal transition through controlling Twist1 expression[J]. Br J Cancer, 2018, 118(1): 88–97.
 - [12] Chen X, Fu Y, Xu H, et al. SOX5 predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma and promotes tumor metastasis through epithelial-mesenchymal transition [J]. Oncotarget, 2017, 9(13): 10891–10904.
 - [13] Goossens S, Vandamme N, Van Vlierberghe P, et al. EMT transcription factors in cancer development re-evaluated: beyond EMT and MET[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2017, 1868(2): 584–591.
 - [14] Li J, Ma J, Fei X, et al. Roles of cell migration and invasion mediated by Twist in endometriosis[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2019, 45(8): 1488–1496.
 - [15] Liu LG, Yan XB, Xie RT, et al. Stromal expression of vimentin predicts the clinical outcome of stage II colorectal cancer for high-risk patients[J]. Med Sci Monit, 2017, 14(23): 2897–2905.