siRNA介导S100A4基因沉默对胃癌细胞中MMP-2和E-cadherin表达及细胞侵袭能力的影响

赵 滢[1*]，高立红[1]，王 楠[1]，鲍晨辉[1]，王文学[2]，张天彪[3]
（1. 中国医科大学附属盛京医院胃肠营养外科，辽宁 沈阳 110004; 2. 机器人学国家重点实验室（中国科学院沈阳自动化研究所），辽宁 沈阳110004; 3. 中国医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室，辽宁 沈阳 110122）

【摘要】 **目的** 观察用RNA干扰技术沉默人胃癌细胞株MGC-803中钙结合蛋白S100A4的基因，对基质金属蛋白酶2（matrix metalloproteinase 2, MMP-2）和E-钙黏素(E-cadherin)表达变化，探讨S100A4对胃癌细胞侵袭能力的影响及作用机制。**方法** 采用RNA干扰技术将针对S100A4和非特异性阴性对照序列的siRNA转染至人胃癌MGC-803细胞，利用荧光实时定量RT-PCR和蛋白免疫印迹法（Western Blot）检测S100A4基因和蛋白的表达，筛选S100A4基因沉默组和阴性对照组细胞。采用Western Blot方法检测MMP-2和E-cadherin蛋白表达。利用Transwell Matrigel方法检测各实验组中MGC-803细胞体外侵袭能力。**结果** 成功建立S100A4基因沉默的人胃癌MGC-803细胞。S100A4基因沉默的胃癌MGC-803细胞中MMP-2蛋白表达降低，而E-cadherin蛋白表达明显上调；细胞体外侵袭能力亦显著下降。**结论** S100A4能通过调控MMP-2和E-cadherin的表达影响胃癌细胞MGC-803的侵袭能力。

【关键词】 胃癌；S100A4；基质金属蛋白酶2；E-钙黏素；基因沉默
【中图分类号】 R735.2 【文献标识码】 A 【DOI】 10.16695/j.cnki.1006-2947.2018.04.008

Effects of siRNA-mediated S100A4 silencing on MMP-2 and E-cadherin expression and invasive ability of gastric cancer cells

ZHAO Ying[*1], GAO Li-hong[1], WANG Nan[1], BAO Chen-hui[1], WANG Wen-xue[2], ZHANG Tian-biao[3]
(1. Department of Gastrointestinal Nutrition Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Liaoning Shenyang 110004; 2. State key Laboratory of Robotics, Shenyang Institute of Automation, Chinese Academy of Sciences; 3. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical, China Medical University, Liaoning Shenyang 110122, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the effects of siRNA-mediated S100A4 silencing on MMP-2 and E-cadherin expression and invasive ability of human gastric cancer cell lines MGC-803. **Methods** The S100A4-siRNA was transfected into human gastric cancer MGC-803 cells. The expressions of S100A4 mRNA and protein were detected by Real-time RT-PCR and Western blot to select S100A4 silencing and negative control cells. The levels of MMP-2 and E-cadherin proteins were determined by Western blot. The changes of invasive abilities were detected by Transwell chamber model. **Results** The human gastric cancer MGC-803 cells of S100A4 silencing were successfully established. Compared with the control group, the levels of S100A4 gene and protein were significantly decreased, the expression levels of MMP-2 protein decreased and the level of E-cadherin increased significantly, the invasive ability was reduced obviously In MGC-803 cells of S100A silencing. **Conclusion** S100A4 could regulate the expression of MMP-2 and E-cadherin to affect the invasive abilities of human gastric cancer MGC-803 cells.

【Key words】 Gastric cancer; S100A4; MMP-2; E-cadherin; gene silencing

胃癌是最常见的消化系统恶性肿瘤之一，严重危害人类的健康。侵袭和转移是恶性肿瘤的主要特征，是多种肿瘤相关基因、蛋白共同参与和相互作用的结果，深入研究侵袭转移的机制有助于恶性肿瘤的预防与治疗。S100A4（S100 calcium binding protein A4）属于钙结合蛋白S100家族的成员之一，研究表明，S100A4蛋白的表达与肿瘤的侵袭转移高度相关，目前发现其在很多恶性肿瘤组织中高表

【收稿日期】2018-01-13
【基金项目】国家自然科学青年基金（61703435）；辽宁省博士科研启动基金（201601122）；机器人学国家重点实验室开放基金（2013225021）
*通讯作者（To whom correspondence should be addressed）

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

达，如乳腺癌、胰腺癌、胃癌等。MMP-2是基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases, MMPs）家族中与肿瘤关系最为密切的因子，能够通过降解细胞外基质成分，引导细胞外基质重塑，参与肿瘤的浸润和转移。E-钙粘着蛋白(E-cadherin)是一种跨膜糖蛋白，维持正常细胞间的粘附力，从而抑制细胞的侵袭性。本研究中我们利用RNA干扰技术下调了人胃癌细胞株MGC-803中S100A4基因表达，检测了MMP-2和E-cadherin在MGC-803细胞内蛋白表达的变化，并探讨S100A4对胃癌细胞侵袭能力的影响及作用机制，希望能为胃癌的防治提供新思路和方法。

1 材料和方法

1.1 细胞与试剂

人胃癌细胞株MGC-803细胞购置于中科院上海细胞库。胎牛血清、青、链霉素、RPMI-1640培养基、Trizol、脂质体2000转染试剂（Lipofectamine™ 2000）购自美国Invitrogen公司。Matrigel基质胶购自美国BD公司。8.0μm孔径的Transwell小室购自美国Minipore公司。逆转录试剂盒、PCR扩增试剂盒、碱性磷酸酶标记的抗兔IgG、抗小鼠IgG购自Sigma公司；S100A4、MMP-2、E-cadherin、β-actin一抗购自Santa Cruz公司。

1.2 细胞培养

人胃癌MGC-803细胞贴壁生长于含有10%胎牛血清及青、链霉素的RPMI-1640培养基，于37℃、5% CO_2，95%大气条件下培养。每2天更换一次培养基。

1.3 细胞转染和分组

将针对S100A4的siRNA和非特异性阴性对照序列的siRNA分别转染至人胃癌MGC-803细胞，建立S100A4基因沉默组和阴性对照组细胞。转染步骤按脂质体Lipofectamine2000说明书操作。实验分组：空白对照组（G1），未转染；阴性对照组（G2），转染阴性对照序列；S100A4基因沉默组（G3），转染S100A4-si RNA。

1.4 细胞侵袭实验

采用无血清的培养基RPMI稀释Matrigel基质胶（1 mg/ml），取50μl稀释胶加到transwell上室中。将细胞培养液换成无血清RPMI培养液，饥饿过夜。胰酶消化细胞并调整浓度至5×10^5/ml，加入Transwell室上室中，每孔100μl。在Transwell室下室中加入600μl含10%胎牛血清的RPMI培养基。37℃孵箱孵育20h。用棉签擦掉上室上面的非侵袭细胞，染色，室温下晾干后揭膜置于载玻片上，在倒置显微镜下观察，计数。

1.5 荧光实时定量RT-PCR

应用TRIzol法进行细胞mRNA提取。按逆转录试剂盒说明书进行RNA逆转录反应合成cDNA。然后进行实时荧光定量PCR。所用引物为：S100A4上游引物：5'-GATGTGATGGTGTCCACCTT-3'；下游引物：5'-ATTTCTTCCTGGGCTGCTTA-3'；β-actin上游引物：5'-GGACTI"CGAGCAGGAGATGG-3'；下游引物：5'-GCACCGTGTTGGCGTAGAGG-3'。不同组之间基因表达的相对差异应用循环数（Ct）表示。每个样品的Ct值用β-actin进行校正，mRNA表达量用Ct值与空白对照组Ct值比较所得的倍数表示。

1.6 蛋白免疫印迹法

收集细胞，裂解细胞，离心后取上清。应用二喹啉甲酸法（BCA）法测蛋白浓度。SDS-PAGE电泳、转膜、封闭、孵育S100A（1：500）、MMP-2（1：200）、E-cadherin（1：200）、β-actin（1：1000）等相应一抗，洗脱后加二抗：碱性磷酸酶标记的抗兔IgG（1：1000）、抗小鼠IgG（1：1000）。凝胶成像分析系统分析上述结果，以目的条带与内参β-actin的平均灰度值的比值表示蛋白水平，进行半定量分析。

1.7 统计分析

采用统计软件Graphpad Prism 7进行数据处理与分析。实验数据用平均值±标准差表示。组间比较采用单因素方差分析，当$P<0.05$时为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建立S100A4基因沉默人胃癌MGC-803细胞

Real-time PCR检测结果显示基因沉默组细胞的S100A4 mRNA表达水平为空白对照组细胞的表达量的22.1%，显著低于空白对照组和阴性对照组（$P<0.05$，图1A）。各组S100A4/β-actin相对灰度值别为：G1组0.5167±0.03；G2组0.4967±0.07；G3组0.0933±0.015。Western Blot结果显示基因沉默组细胞的S100A4蛋白表达显著低于空白对照组和阴性对照组细胞（$P<0.05$，图1B、C）。

2.2 细胞侵袭能力测定结果

细胞侵袭实验是反应肿瘤细胞降解基质胶，向下穿透的能力，从而间接反应恶性肿瘤细胞侵袭和转移的能力。各组细胞侵袭数量：G1组57.67±15.57；G2组55.33±9.07；G3组28±6.08。实验结果

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

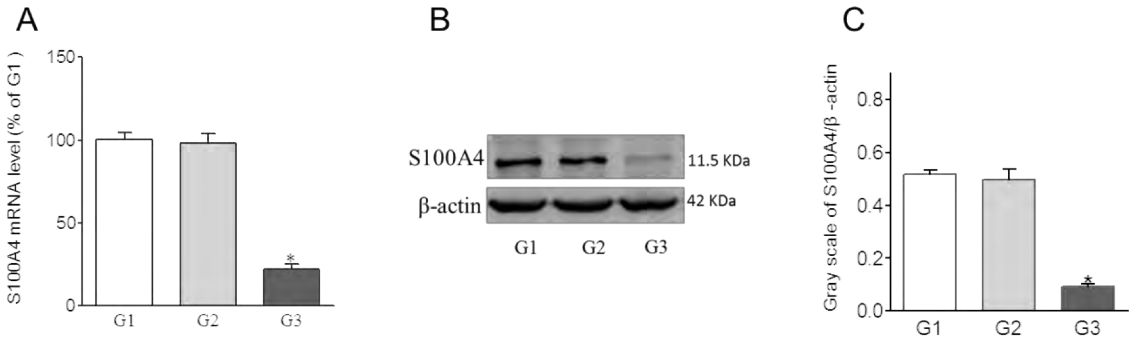

Fig 1. Expressions of S100A4 in human gastric cancer MGC-803 cells
A: Real-time PCR assay, B:Western blot assay, C: Quantitative Western blot analysis, G1: Blank control, G2: Negative control, G3: S100A4 silencing, *$P < 0.05$ vs others

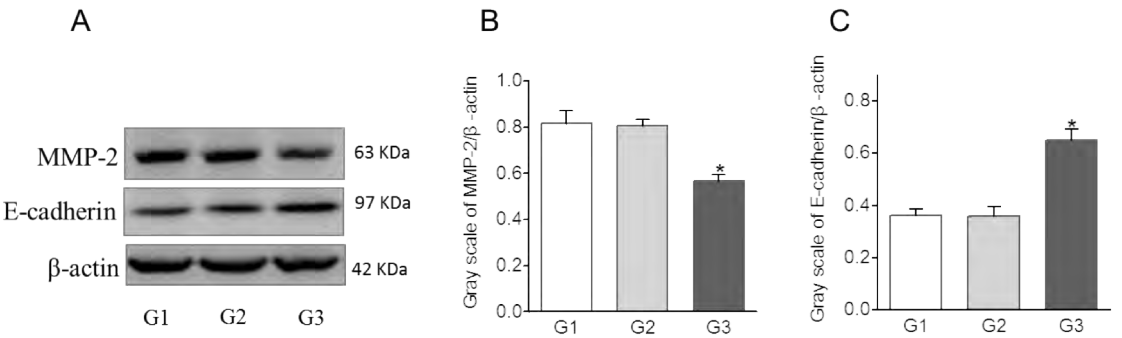

Fig 3. Expressions of MMP-2 and E-cadherin in human gastric cancer MGC-803 cells
A: Western blot, B, C: Quantitative analysis, G1: Blank control, G2: Negative control, G3: S100A4 silencing * vs others $P < 0.05$

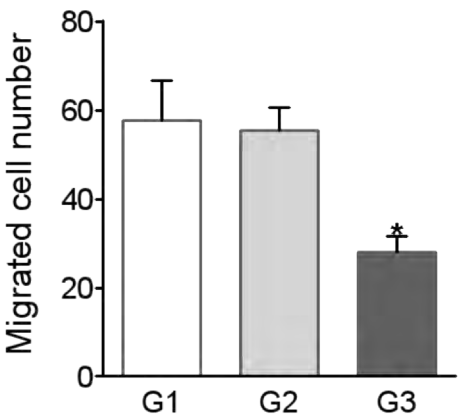

Fig 2. Invasive ability of human gastric cancer MGC-803 cells
G1: Blank control, G2: Negative control, G3: S100A4 silencing, *$P < 0.05$ vs others

显示S100A4基因沉默组穿膜细胞数明显少于空白对照组和阴性对照组（$P<0.05$），S100A4基因沉默是胃癌MGC-803细胞侵袭能力受到抑制（图2）。

2.3 MMP-2和E-cadherin蛋白表达

各组MMP-2/β-actin 相对灰度值分别为：G1组0.8167±0.09；G2组0.8054±0.05；G3组0.5667±0.04。E-cadherin/β-actin 相对灰度值分别为：G1组0.3633±0.04；G2组0.3607±0.06；G3组0.6500±0.07。与空白对照组和阴性对照组相比，S100A4基因沉默的胃癌MGC-803细胞中MMP-2蛋白表达降低（图3A、B），而E-cadherin蛋白表达明显上调（$P<0.05$，图3A、C）。

3 讨论

胃癌是临床常见的消化道恶性肿瘤之一，发病率和死亡率均较高[1]。胃癌发病隐匿，患者出现明显临床症状时多已进入中晚期，肿瘤已发生侵袭转移，造成手术治疗难度大，术后易复发，预后情况较差的问题[2]。恶性肿瘤的侵袭和转移是体内多个与肿瘤相关的基因与蛋白分子相互调控的过程，深入研究侵袭转移的机制非常有助于恶性肿瘤的预防与治疗。

S100A4 是S100 蛋白家族成员之一，是一种具有EF双螺旋结构域的钙结合蛋白，该蛋白是由101个氨基酸组成的多肽，分子量为11.5KDa。其定位于人类1号染色体长臂2 区1带（1q21），由于该区域稳定性差，容易出现各种染色体突变如缺失、异位、重叠等，因此S100A4有可能参与细胞的异常增生、肿瘤的发生发展等[3]。S100A4在很多恶性肿瘤组织中高表达，如乳腺癌、胰腺癌、胃癌、鼻咽癌、甲状腺癌、膀胱癌等[4]。研究表明，将S100A4基因转染至小鼠乳腺癌细胞系，可以使这种原本不能发生转移的小鼠乳腺癌细胞出现转移征象。转染至小鼠黑色素瘤细胞系B16 和人乳腺癌细胞系MCF-

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

7 中后，其发生肺转移的机率明显增加[5,6]。而转染S100A4 反义基因，则可以明显降低具有高转移特性恶性肿瘤细胞系的转移[7]。这些实验结果提示S100A4能促进肿瘤侵袭和转移。

基质金属蛋白酶类(MMPs) 是一类锌离子依赖性肽链内切酶，主要由肿瘤细胞和肿瘤周边间质细胞产生，通过对细胞外基质的降解，参与肿瘤新生血管的生成，促进肿瘤的侵袭和转移。MMP-2 是目前发现其家族中与肿瘤侵袭关系最为密切的基质金属蛋白酶，能特异性地降解细胞外基质和基底膜中的Ⅳ型胶原，分解纤维连接蛋白和层粘连蛋白，在肿瘤细胞突破基底膜屏障而发生浸润转移的过程中起着十分重要的作用[8]。E-钙粘着蛋白(E-cadherin)是一种跨膜糖蛋白,参与钙离子依赖性的细胞间粘附能力的调节,维持正常细胞间的粘附力,从而抑制细胞的侵袭性，是一种重要肿瘤侵袭转移抑制基因[9]。

在本研究中，通过利用RNA干扰技术稳定建立了S100A4基因沉默的人胃癌细胞株MGC-803来探讨S100A4对胃癌细胞侵袭能力的影响及作用机制。细胞体外侵袭实验结果提示S100A4基因沉默的胃癌MGC-803细胞体外侵袭转移能力显著下降。蛋白免疫印迹法的检测结果显示，利用siRNA介导S100A4基因和蛋白表达下调后，细胞内MMP-2蛋白表达出现明显降低，而E-cadherin蛋白表达则显著上调。这些结果说明，S100A4与MMP-2和E-cadherin之间存在调控机制，S100A4能通过上调MMP-2或下调E-cadherin的表达，而影响胃癌细胞MGC-803的侵袭能力。

【参考文献】

[1] Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, et al. Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014, 23(5): 700-713.

[2] Kang WM, Meng QB, Yu JC, et al. Factors associated with early recurrence after curative surgery for gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(19): 5934-5940.

[3] EL Naaman C, Grum-Schwensen B, Mansouri A, et al. Cancer predisposition in mice deficient for the metastasis-associated Mts1(S100A4) gene[J]. Oncogene, 2004, 23(20): 3670-3680.

[4] Ebralidze A, Tulchinsky E, Grigorian M, et al. Isolation and characterization of a gene specifically expressed in different metastatic cells and whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca2+-binding protein family[J]. Genes Dev, 1989, 3(7): 1086-1093.

[5] Mazzucchelli L. Protein S100A4: too long overlooked by pathologists [J]? Am J Pathol, 2002, 160(1): 7-13.

[6] Lloyd BH, Platt-Higgins A, Rudland PS, et al. Human S100A4 (p9Ka) induces the metastatic phenotype upon benign tumour cells[J]. Oncogene. 1998, 17(4): 465-473.

[7] Nikitenko LL, Lloyd BH, Rudland PS, et al. Localisation by in situ hybridisation of S100A4 (p9Ka) mRNA in primary human breast tumour specimens[J]. Int J Cancer, 2000, 86(2): 219-228.

[8] Hadler-Olsen E, Solli AI, Hafstad A, et al. Intracellular MMP-2 activity in skeletal muscle is associated with type II fibers[J]. J Cell Physiol, 2015, 230(1): 160-169.

[9] Guan X, Bidlack FB, Stokes N, et al. E-cadherin can replace N-cadherin during secretory-stage enamel development[J]. PLoS One, 2014, 9(7): 1-11.

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net