DOI:10.16016/j.1000-5404.201510120

尿苷三磷酸通过 PTEN/Vimentin 抑制胃癌细胞的侵袭

万晗星,谢 睿,刘菁菁,杨仕明,董 辉 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院消化内科)

[摘要] **目的** 研究尿苷三磷酸(uridine triphosphate, UTP)对胃癌细胞迁移和侵袭的影响及其分子机制。**方法** 采用细胞划痕实验检测 UTP 对胃癌细胞 MKN-45 和 SGC-7901 迁移能力的影响;Transwell 检测 UTP 对正常人胃黏膜细胞 GES-1 和胃癌细胞 MKN-45、SGC-7901 侵袭能力的影响;Western blot 检测 UTP 对胃癌细胞 MKN-45 和 SGC-7901 PTEN 磷酸化水平及 Vimentin 表达的影响。**结果** 细胞划痕实验表明 UTP 组抑制胃癌细胞 MKN-45 和 SGC-7901 迁移($P<0.05$)。Transwell 实验结果显示 UTP 组抑制胃癌细胞 MKN-45 和 SGC-7901 侵袭($P<0.01$),但对正常人胃黏膜细胞 GES-1 无影响($P>0.05$)。Western blot 实验证实 UTP 组可增强胃癌细胞 MKN-45 和 SGC-7901 PTEN 磷酸化水平,同时下调 Vimentin 的表达。**结论** UTP 抑制胃癌细胞的迁移和侵袭,可能是与其上调 PTEN 磷酸化水平,抑制 Vimentin 表达有关。

[关键词] 尿苷三磷酸;PTEN 磷酸化;胃肿瘤;肿瘤转移
[中图法分类号] R342.4;R730.23;R735.2 [文献标志码] A

UTP attenuates migration of gastric cancer cells *via* PTEN/vimentin

Wan Hanxing, Xie Rei, Liu Jingjing, Yang Shiming, Dong Hui (Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of uridine triphosphate (UTP) on the migration and invasion of gastric cancer cells and investigate related molecular mechanism. **Methods** Wound scratch assay was applied for examining the migration of gastric cancer MKN-45 and SGC-7901 cells. Transwell migration assay was used to analyze the invasion of human gastric mucosal GES-1 cells, MKN-45 and SGC-7901 cells. Western blot analysis was carried out to detect the phosphorylation of PTEN and the expression of vimentin. **Results** UTP inhibited the migration and invasion of MKN-45 and SGC-7901 cells ($P<0.05$), but not of GES-1 cells ($P>0.05$). Western blot analysis showed that UTP increased the phosphorylation level of PTEN in MKN-45 and SGC-7901 cells, and meanwhile, down-regulated the expression of vimentin. **Conclusion** UTP inhibits the migration and invasion of gastric cancer cells, probably through inducing the phosphorylation of PTEN and down-regulating the expression of vimentin.

[**Key words**] uridine triphosphate; phospho-PTEN; gastric cancer; tumor metastasis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81570477, 31371167). Corresponding author: Yang Shiming, E-mail: shimingyang@yahoo.com; Dong Hui, E-mail: h2dong@ucsdedu

近年来的研究表明,第 10 号染色体丢失的张力蛋白同源的磷酸酶基因(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten,PTEN)是具有蛋白磷酸酶和脂质磷酸酶双重特异性酶活性的抑癌基因[1]。PTEN 基因的异常与肿瘤细胞生长、黏附、侵袭和转移过程密切相关[2-4]。目前研究表明,在恶性肿瘤的进展过程中,各种刺激物可以通过诱导上皮-间充质化(epithelial mesenchymal transition,EMT),影响肿瘤细胞的迁移过程[5-8]。目前已获得 EMT 发生过程中的一些生物标记物。波形蛋白(vimentin)因其高度的选择性表达作为间质细胞的标志物受到了广泛的研究[9],通过检测 Vimentin 的蛋白水平可判断肿瘤细胞的迁移和侵袭能力。尿苷三磷酸(uridine triphosphate,UTP)是一种嘧啶核苷酸,可作为 RNA 合成的原料及能量来源。前期研究表明,UTP 能够抑制某些癌细胞的迁移和侵袭,但其在胃癌发生和发展中的作用,至今少见报道。目前已知,调控 PTEN 基因可以影响

[基金项目] 国家自然基金面上项目(81570477,31371167)
[通信作者] 杨仕明,E-mail:shimingyang@yahoo.com
董 辉,E-mail:h2dong@ucsd.edu
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160229.1710.003.html(2016-02-29)

Vimentin 的表达,进而影响癌细胞的迁移和侵袭[10-11]。但至今不知 UTP 能否在胃癌细胞内,影响 PTEN 基因或 Vimentin 的表达。因此,本研究拟初步探讨 UTP 对胃癌细胞迁移和侵袭能力的影响及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人胃癌细胞 MKN-45、SGC-7901 及 GES-1 细胞为本实验室保存。

1.2 主要试剂与仪器

UTP(Sigma),抗体 PTEN, Phospho-PTEN(Ser380/Thr382/383)购至 Cell Signaling Technology, Vimentin 购至 Abcam, GAPDH 购至 Santa。高糖 DMEM 培养液及胎牛血清(美国 HyClone 公司),蛋白提取试剂盒(碧云天),8 μmol/L Transwell 小室(Milipore 公司),6 孔板和 24 孔板(Milipore 公司)。

1.3 细胞培养

人胃癌细胞 MKN-45、SGC-7901 及 GES-1 细胞,于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养。

1.4 细胞划痕实验

实验分 2 组:对照组和 UTP(20 μmol/L)组。常规消化 MKN-45、SGC-7901 细胞,接种到 24 孔板里,每组设置 3 个副孔,培养 24 h,待细胞铺满,用 200 μL 灭菌枪头在单层细胞划“-”,用 PBS 轻轻洗 3 次;对照组加 1 mL 无血清的培养基;UTP 组 1 mL 无血清培养基里加 20 μmol/L UTP。显微镜下拍照(3~5 个视野/孔,显微镜 ×200),并做好标记,24 h 后再次拍照,视野拍前一次的地方。用 Image j 软件分析数据。

1.5 Transwell 实验

Transwell 小室上室铺基质胶。实验分 2 组:对照组和 UTP(20 μmol/L)组。将 MKN-45、SGC-7901 及 GES-1 细胞常规消化,细胞计数板计数后接种到 Transwell 小室上室[(1~3)×10^5/孔],每组设置 3 个副孔,Transwell 小室上室加 100 μL 无血清的培养基,下室为 600 μL 含 10% 胎牛血清的培养基。对照组小室上室加 100 μL 无血清培养基,UTP 组小室上室加 100 μL 含 UTP(20 μmol/L) 的无血清培养基,两组接种细胞数量一样。24 h 时弃掉培养基并用 PBS 清洗,4% 多聚甲醛固定 20 min,再用 PBS 清洗 3 遍,结晶紫染色 15 min,棉签轻轻刮掉小室上室内的细胞,显微镜下随机选取 3 个视野拍照并计数。

1.6 Western blot 检测

采用蛋白裂解液提取细胞总蛋白,100 ℃,煮 5 min 使蛋白变性,RCDC 法检测蛋白浓度,5% 的浓缩胶和 10% 的分离胶 SDS-PAGE 电泳,每孔上样量为 30~50 μg 蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳。常规湿转法转膜(恒压 100 V,70~100 min),5% 的脱脂奶粉常温封闭 2 h,一抗 4 ℃过夜(PTEN 1∶1 000,分子量 57×10^3;P-PTEN 1∶1 000,分子量 57×10^3; Vimentin 1∶1 000,分子量 55×10^3;GAPDH 1∶500,分子量 36×10^3);二抗常温孵育 1 h(山羊抗鼠 1∶5 000,山羊抗兔 1∶10 000)。ECL 化学发光,凝胶成像系统显影。

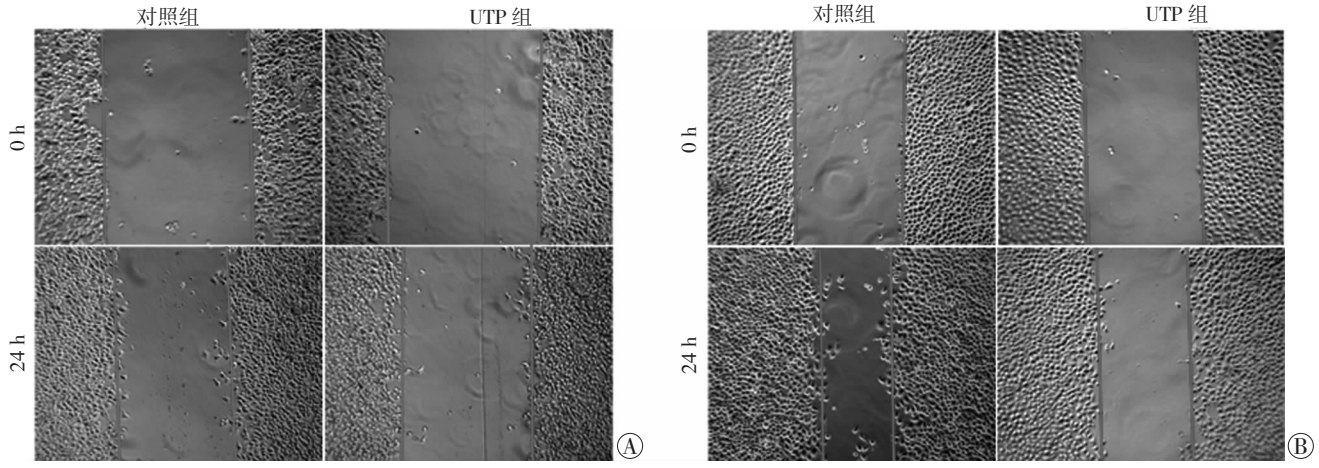
1.7 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件分析数据,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两配对样本之间采用配对样本 t 检验,两组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 UTP 对胃癌细胞迁移能力的影响

与正常对照组相比,UTP(20 μmol/L)作用 24 h 后,胃癌细胞 MKN-45 的迁移能力受到了明显抑制($P<0.05$); UTP 对胃癌细胞 SGC-7901 迁移能力的影响与之类似($P<0.05$,图 1)。因此,UTP 能够抑制胃癌细胞 MKN-45 和 SGC-7901 的迁移。



A:MKN-45;B:SGC-7901

图 1 细胞划痕实验检测 UTP 对胃癌细胞 MKN-45 和 SGC-7901 迁移能力的影响 (×200)

2.2 UTP 对胃癌细胞及正常细胞侵袭能力的影响

与正常对照组相比,UTP(20 μmol/L)作用 24 h 后,Transwell 实验结果显示 GES-1 正常胃黏膜细胞穿膜的数量无显著性差异($P>0.05$);但与对照组[(1 583.32±15.28),(2 036.33±55.32)]相比 MKN-45 和 SGC-7901 胃癌细胞数量[(451.67±226.62),(1 440.00±36.06)]却明显减少($P<0.01$),如图 2 所示。因此,UTP 抑制胃癌细胞 MKN-45 和 SGC-7901 的侵袭能力,但对正常 GES-1 细胞的侵袭能力却没有影响。

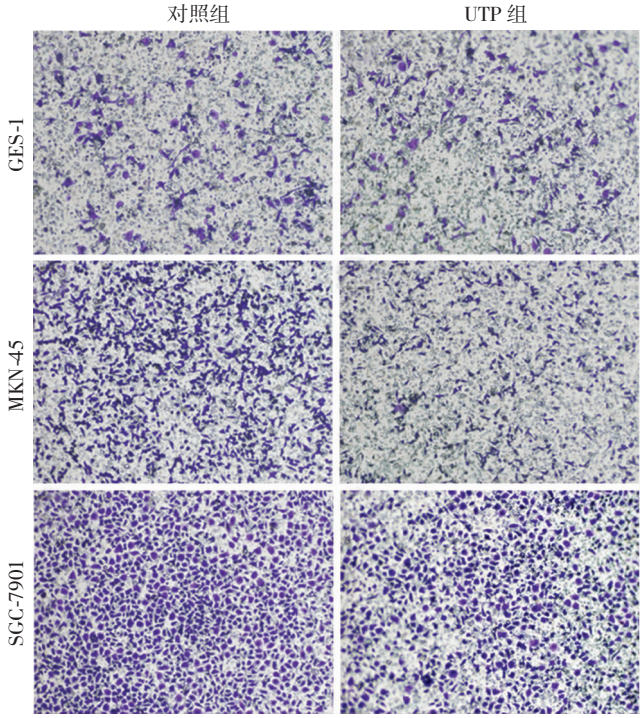
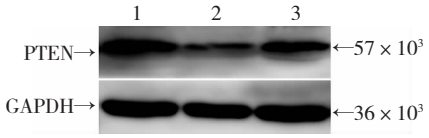


图 2 Transwell 实验检测 UTP 对 MKN-45 和 SGC-7901 及 GES-1 细胞侵袭能力的影响 (结晶紫×200)

2.3 PTEN 在正常胃黏膜细胞中的表达水平高于在胃癌细胞中的表达

PTEN 在 GES-1 正常细胞中的表达高于在胃癌细胞 MKN-45 和 SGC-7901 细胞中的表达。如图 3 所示。

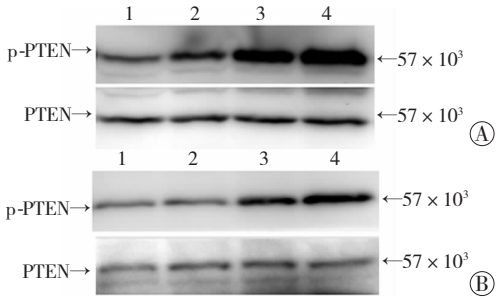


1:GES; 2: SGC-7901;3:MKN-45

图 3 Western blot 检测 PTEN 在 GES-1 和 MKN-45 以及 SGC-7901 细胞中的表达

2.4 UTP 对胃癌细胞 PTEN 磷酸化水平的影响

与 0 h 相比,UTP(50 μmol/L)作用 12 h 后,MKN-45 和 SGC-7901 胃癌细胞的 PTEN 磷酸化水平升高,24~36 h 呈持续增高趋势,如图 4 所示。因此,UTP 上调了胃癌细胞 PTEN 的磷酸化水平。

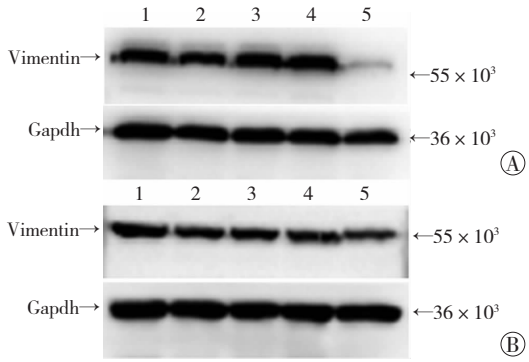


A:MKN-45; B:SGC-7901;1:0 h; 2: 12 h; 3: 24 h; 4: 36 h

图 4 Western blot 检测 UTP 对胃癌细胞 PTEN 磷酸化水平的影响

2.5 UTP 对胃癌细胞 Vimentin 蛋白水平表达的影响

与 0 h 相比,UTP(50 μmol/L)对胃癌细胞 MKN-45 和 SGC-7901 中 Vimentin 蛋白表达的影响呈下降的趋势。UTP 作用 24 h 以内,Vimentin 的表达并没有显著变化。但在 36 h 后,胃癌细胞 MKN-45 和 SGC-7901 中的 Vimentin 表达水平均降低,尤其以 MKN-45 癌细胞内 Vimentin 表达水平的降低最为明显,如图 5 所示。因此,UTP 抑制胃癌细胞 MKN-45 和 SGC-7901 的 Vimentin 蛋白表达。



A:MKN-45; B:SGC-7901;1:0 h; 2: 6 h; 3: 12 h; 4: 24 h; 5: 36 h

图 5 Western blot 检测 UTP 对胃癌细胞 Vimentin 蛋白水平表达的影响

3 讨论

我们前期研究发现 UTP 可以促进肝癌细胞的增值,迁移和侵袭[12],但是对胃癌发生、发展的影响,至今少见报道。本研究初步探讨了 UTP 在胃癌细胞中的作用。首先,划痕实验发现 UTP 抑制胃癌细胞的迁移能力。其次,Transwell 实验结果表明 UTP 对正常胃黏膜细胞的侵袭能力没有影响,却抑制了胃癌细胞的侵袭能力。这说明 UTP 对正常胃黏膜细胞和癌细胞具有不一样的影响,而肿瘤的发生是一个从正常到癌变的过程。UTP 不影响正常细胞,却特异性抑制胃癌细胞的侵袭能力,表明它很有可能参与了胃癌的发展进程。以往对 UTP 的研究报道仅限于其在癌症中的

作用,而少见报道 UTP 对正常细胞与癌细胞之间的影响差异。我们首次发现 UTP 可以特异性抑制胃癌细胞的迁移和侵袭,但是 UTP 通过什么样的机制,发挥这一作用并不清楚。以往文献报道,UTP 对不同肿瘤的作用一般通过嘌呤受体 P2Y 的不同亚型来实现[12]。在本研究中我们推测,UTP 发挥抑制胃癌的迁移和侵袭,可能也是通过影响了 P2Y 受体家族的不同亚型。本研究的缺陷在于目前尚不知道,UTP 究竟通过影响了 P2Y 受体家族的那一个亚型,来发挥其抑制胃癌迁移和侵袭的作用。

在某些因素的刺激下,细胞丧失了细胞间的紧密黏附,脱落到达合适环境,定位增殖形成转移灶[13]。相关信号通路的变化可能会影响胃癌的迁移侵袭。例如,刘丰等[14]研究发现 PTEN 蛋白表达下调可能与胃癌的侵袭转移密切相关。Li 等[15]研究发现 PTEN 可能参与了胃癌细胞的分化、浸润和淋巴结转移的调节,PTEN 的缺失可能会有助于细胞浸润、远处转移和加速胃癌的进展。目前的许多研究都提示,PTEN 在抑制胃癌细胞的迁移和侵袭中起重要作用。我们的 Western blot 结果证实,PTEN 在正常胃黏膜细胞中的表达水平高于胃癌细胞中的表达,说明 PTEN 在正常胃黏膜细胞中具有抑癌作用。我们进一步发现,UTP 能显著上调胃癌细胞中 PTEN 的磷酸化水平,证实了 UTP 是通过活化 PTEN 信号通路抑制了胃癌细胞的迁移和侵袭。

大量文献报道,PTEN 的变化可以影响 Vimentin 的表达,进而影响不同癌细胞的迁移和侵袭能力[15-16],但 PTEN 在胃癌细胞内是否对 Vimentin 产生影响,则少见文献报道。我们推测 UTP 可能通过影响 PTEN,进而影响 Vimentin 的表达,发挥对胃癌细胞迁移侵袭的影响。结果如我们的预想,UTP 能够明显抑制胃癌细胞中 Vimentin 蛋白表达。正如结果部分所述,UTP 对 PTEN 磷酸化水平的影响相对发生较早,而对 Vimentin 的影响则相对发生较晚,表明 UTP 是先影响 PTEN 磷酸化,进而影响 Vimentin 表达变化的。尽管 Vimentin 的改变可影响肿瘤细胞的迁移和侵袭能力,但在细胞发生迁移和侵袭的早期,可能 Vimentin 的变化尚不明显而无法检测到,但更透彻的分子机制还需要我们进一步的研究来阐明。

综上所述,我们发现 UTP 通过 PTEN/Vimentin 抑制了胃癌细胞的迁移和侵袭,从而参与了胃癌的发展进程。

参考文献:

[1] Li J, Yen C, Liaw D, *et al*. PTEN: a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer[J]. Science, 1997, 275(5308): 1943-1947.

[2] Wikman H, Lamszus K, Detels N, *et al*. Relevance of PTEN loss in brain metastasis formation in breast cancer patients [J]. Breast Cancer Res, 2012, 14(2): R49. DOI: 10.1186/bcr3150

[3] Noro R, Gemma A, Miyanaga A, *et al*. PTEN inactivation in lung cancer cells and the effect of its recovery on treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors [J]. Int J Oncol, 2007, 31(5): 1157-1163.

[4] 徐晓艳, 范鹏程. 胃癌组织中 PTEN 表达与血管生成和侵袭转移关系[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2010,

[5] Kokkinos M I, Wafai R, Wong M K, *et al*. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer--observations *in vitro* and *in vivo*[J]. Cells Tissues Organs, 2007, 185(1/3): 191-203.

[6] Lorusso G, Ruegg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis[J]. Histochem Cell Biol, 2008, 130(6): 1091-1103.

[7] Thiery J P, Acloque H, Huang R Y, *et al*. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. Cell, 2009, 139(5): 871-890. DOI:10.1016/j.cell.2009.11.007

[8] Ansieau S, Courtois-Cox S, Morel A P, *et al*. Failsafe program escape and EMT: A deleterious partnership[J]. Semin Cancer Biol, 2011, 21(6): 392-396. DOI:10.1016/j.semcancer.2011.09.014

[9] 洪伦, 沈守荣. 上皮-间质转化及相关 microRNA 分子与肿瘤的恶性行为的研究进展[J]. 中国癌症杂志, 2011, 21(9): 725-730.

[10] Zhang H Y, Wang Z Q, Li Y Y, *et al*. Transforming growth factor-β1-induced epithelial-mesenchymal transition in human esophageal squamous cell carcinoma via the PTEN/PI3K signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2014, 32(5): 2134-2142. DOI: 10.3892/or.2014.3453

[11] 谢强, 黄作平, 闫雍容, 等. mir-221 调控 ptenakt 信号介导人胶质瘤耐药细胞上皮间质转化相关基因的表达[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(2): 218-222

[12] Xie R, Xu J, Wen G, *et al*. The P2Y2 nucleotide receptor mediates the proliferation and migration of human hepatocellular carcinoma cells induced by ATP[J]. J Biol Chem, 2014, 289(27): 19137-19149.

[13] 赵俊卿, 李云峰, 杨之斌. 肿瘤细胞发生细胞上皮-间质转变机制的研究[J]. 肿瘤, 2010, 30(10): 890-893.

[14] 刘丰, 范昌仁, 胡光荣. 胃癌组织中 PTEN 的表达及其与患者生物学行为的关系[J]. 中国药物与临床, 2010, 10(5): 529-530.

[15] Li M, Sun H, Song L, *et al*. Immunohistochemical expression of mTOR negatively correlates with PTEN expression in gastric carcinoma[J]. Oncol Lett. 2012, 4(6): 1213-1218.

[16] Kim J, Kang H S, Lee Y J, *et al*. EGR1-dependent PTEN upregulation by 2-benzoyloxycinnamaldehyde attenuates cell invasion and EMT in colon cancer[J]. Cancer Lett, 2014, 349(1): 35-44.

(**收稿**:2015-10-21;**修回**:2015-11-24)

(编辑 王 红)