基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001448

GRASP65的表达对胃癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响

易永芬[1]，张婉玉[1]，彭豆豆[1]，罗　祎[2]

（1. 重庆医科大学基础医学院病理学教研室、分子医学与肿瘤研究中心，重庆　400016；
2. 重庆医科大学附属第一医院妇产科，重庆　400016）

【摘　要】目的：探讨高尔基体堆叠蛋白 65（Golgi reassembly stacking protein 65，GRASP65）在体外对人胃癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭能力的影响。**方法**：首先，通过 Western blot 和 RT-qRCR 鉴别低分化胃癌细胞 MKN-45、中分化胃癌细胞 SGC-7901、高分化胃癌细胞 MKN-28 和正常胃黏膜细胞 GES-1 中 GRASP65 蛋白和 mRNA 的表达量。然后，用 siRNA 干扰技术通过 Lipofectamine 2000 瞬时转染下调和 MKN-45 细胞中 GRASP65 的表达量。用 qRT-PCR 和 Western blot 检测转染后各组细胞中 GRASP65 的蛋白和 mRNA 表达量以证实转染成功。最后，用 CCK-8、流式细胞术、Transwell 迁移和侵袭实验检测转染后的各组胃癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭能力的改变。**结果**：Western blot 和 qRT-RCR 结果显示 MKN-45 细胞和 SGC-7901 细胞中 GRASP65 的蛋白和 mRNA 表达量明显高于 MKN-28 细胞和 GES-1 细胞中 GRASP65 蛋白和 mRNA 表达量（$P<0.05$），故选择低分化胃癌细胞 MKN-45 作为实验细胞株来下调 GRASP65 的表达量。qRT-PCR 和 Western blot 结果证明转染成功，转染组 GRASP65 的 mRNA 和蛋白表达量与阴性对照组和空白对照组对比有统计学意义（$P<0.05$）。CCK-8、流式细胞术、Transwell 迁移和侵袭实验均证明，下调 MKN-45 细胞的 GRASP65 的表达量可抑制胃癌细胞 MKN-45 体外增殖、迁移和侵袭能力，并促进细胞凋亡。**结论**：下调 GRASP65 的表达可明显减弱胃癌细胞的体外增殖能力，同时促进胃癌细胞的凋亡、体外侵袭和迁移。

【关键词】GRASP65；siRNA；增殖；凋亡；迁移；侵袭

【中图分类号】R735.2　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2017-03-15

Effect of GRASP65 expression on proliferation, apoptosis, migration and invasion of gastric cancer cells

Yi Yongfen[1], *Zhang Wanyu*[1], *Peng Doudou*[1], *Luo Yi*[2]

(*1. Department of Pathology, Molecular Medicine and Cancer Research Cancer, Chongqing Medical University*;
2. Department of Gynaecology and Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of GRASP65 expression on proliferation, apoptosis, migration and invasion of gastric cancer cells in vitro. ***Methods***: First, Western blot and qRT-PCR were carried out in three different differentiated gastric cancer cells (MKN-45, SGC-7901, MKN-28) and normal gastric mucosa cells (GES-1) to test the expression of GRASP65 protein and mRNA. Then, siRNA interference technique was used through Lipofectamine 2000 to transient transfection MKN-45 cells to knock-down GRAPS65 expression. Western blot and qRT-PCR were used to test GRAPS65 expression and confirm transfection success. Finally, CCK-8, flow cytometry, Transwell migration and

作者介绍：易永芬，Email：yiyongfen1953@aliyun.com，
研究方向：肿瘤病理学，
通信作者：罗　祎，Email：smileyi@163.com。

优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20171128.1749.080.html（2017-11-28）

方剂学杂志，2012，18(10)：236-242.

[12] 陈月桥，王　丽，武建华. 细胞凋亡信号传导途径研究进展[J]. 中国实用医药，2007，2(33)：186-187.

[13] Predescu SA，Zhang J，Bardita C，et al. Mouse lung fibroblast resistance to fas-mediated apoptosis is dependent on the baculoviral inhibitor of apoptosis protein 4 and the cellular FLICE-inhibitory protein [J]. Front Physiol，2017，8：128.

[14] 周鑫党，王丽莉，韩　璐，等. 柿叶化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药，2014，45(21)：3195-3203.

[15] 陈英珠，白卫娜，时　玮，等. 柿叶黄酮对 ApoE 缺失小鼠动脉粥样硬化斑块稳定性的影响[J]. 中国老年学杂志，2015，35(1)：183-184.

[16] 王明贤，胡思进. 柿叶黄酮对高脂血症大鼠血管内皮细胞功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18(13)：242-244.

[17] 孙　懿，谭宏棣，蓝晓步，等. 柿叶黄酮对离体大鼠心脏缺血再灌注损伤的干预作用[J]. 时珍国医国药，2009，20(11)：F0003-0004.

[18] 黄仁彬. 玉郎伞黄酮和柿子叶黄酮对心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制研究[D]. 南宁：广西医科大学，2010：62-69.

[19] 马新博，宫汝飞，石学魁，等. 柿叶黄酮对阿霉素肾病鼠肾组织转化生长因子-β1 和结缔组织生长因子表达的影响[J]. 广东医学，2013，34(12)：1809-1812.

（责任编辑：冉明会）

invasion experiments were used to test the change of ability of cell proliferation, apoptosis, migration and invasion after transfection. ***Results***: Western blot and qRT-PCR results showed that the expressions of GRASP65 protein and mRNA in MKN-45 and SGC-7901 were much higher than those in MKN-28 and GES-1. MKN-45 was chosen as experimental cells. Western blot and qRT-PCR results demonstrated that GRASP65 had been efficiently downregulated through siRNA tansfection. In addition, CCK-8, flow cytometry, Transwell chamber assays results showed that, GRASP65 knockdown can suppress growth, promote apoptosis, inhibit migration and invasion of gastric cancer cells in vitro. ***Conclusion***: GRASP65 knockdown could significantly suppress growth, promote apoptosis, inhibit migration and invasion of gastric cancer cells MKN-45 in vitro.

【Key words】GRASP65; siRNA; proliferation; apoptosis; migration; invasion

胃癌是人类最常见的肿瘤之一，也是全球癌症致死的第二大原因[1]。由于缺乏早期临床表现，胃癌有着很高的发病率和死亡率。尽管外科手术飞速进步，放化疗技术也发展迅猛，胃癌的 5 年生存率仍低于 30%[2-3]。因此，对胃癌的早期筛查和检测有用的生物标志物对于提高患者的生存率至关重要。

高尔基体是一个参与包括蛋白质加工、分类、靶蛋白合成和运输等众多细胞功能的关键细胞器[4]。高尔基体重组和堆叠蛋白 65(GRASP65)是一种集中定位于高尔基体的高尔基体周围蛋白质，也是目前两种有高尔基体堆叠功能的蛋白质之一。然而，国内外目前对 GRASP65 与疾病的研究报道尚少，对其与癌症的研究更是罕见。本课题组前期实验证明，抑制 GM130 的表达可降低胃癌细胞体外增殖、侵袭和迁移能力[5]，其机制可能与 GM130 影响胃癌细胞 O-糖基化及细胞粘附作用有关[6]。已有文献报道，GRASP65 与高尔基体基质蛋白 GM130 有协同作用[7]。故此次继续以胃癌细胞为研究对象，探讨 GRASP65 在胃癌细胞中的作用，为进一步研究高尔基体及其蛋白质在癌症发生发展中的作用提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

胃癌细胞株 MKN-45、SGC-7901、MKN-28 为重庆医科大学基础医学院分子医学与肿瘤研究中心冻存，正常胃黏膜细胞 GES-1 为重庆医科大学附属第一医院胃肠外科实验室馈赠。RPMI1640 培养基购自 Hyclone 公司。胎牛血清购自德国 PAN 公司。细胞消化胰蛋白酶购自碧云天公司。qRT-PCR 试剂盒、RNAiso Plus 购自 Takara 公司。Total RNA 提取试剂盒购自 OMEGA 公司。ERK1/2 抑制剂 U0126 购自 Abmole 公司。兔抗人 GRASP65 多克隆抗体购自 Abcam 公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 均购自北京中杉金桥生物技术公司。Matrigel 胶购自 Bio-Rad 公司，Transwell 小室购自 Corning 公司。siRNA 片段定制于上海吉玛公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将细胞株以单层接种在含 10%新生牛血清、1×10^5 U/L 青霉素、1×10^5 U/L 链霉素的 RPMI1640 培养液中，于 37 ℃、5%CO_2 和饱和湿度培养箱中培养，待细胞长到 90%时进行传代培养，将对数生长期细胞用 0.25%胰蛋白酶消化，加含 10%新生牛血清的 RPMI1640 培养液终止消化。2~3 d 传代 1 次，取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 瞬时转染 转染前 1 d，将 MKN-45 细胞按照 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板。当细胞达 30%~40%融合时，按 Lipofectamine 2000 说明书操作。3 条特异性 siRNA 由上海吉玛公司设计并定制，其序列见表 1。每孔的转染步骤如下(操作均在灭酶条件下进行)：①在已消毒的无酶 EP 管中加入 250 μL Opt-MEN 培养基，再加入 5 μL Lipofectamine 2000，轻轻吹打混匀后，室温静置 5 min；②在已消毒的无酶 EP 管中加入 250 μL Opt-MEN 培养基，再加入 3 μL siRNA 转染片段，吹打混匀；③将①和②混合并混匀，室温静置 20 min；④取 1.5 mL 无血清的 PRMI1640 培养基，再将上述混合物③加入其中，混匀后转移入 6 孔板中，将 6 孔板放入 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养。转染 4~6 h 后换液，将无血清培养基换成含 10%FBS 的培养基，置于培养箱中继续培养。

表 1 siRNA 序列

Tab.1 Sequences of siRNA

名称	序列(5'→3')
siRNA-1167	正义链:GGAACCAUCUUCACCUGCUTT
	反义链:AGCAGGUGAAGAUGGUUCCTT
siRNA-1230	正义链:GGUUGGUUCGGACCAGAUUTT
	反义链:AAUCUGGUCCGAACCAACCTT
siRNA-1565	正义链:CCAGGCAGAGUGACUACAUTT
	反义链:AUGUAGUCACUCUGCCUGGTT
Control-siRNA	正义链:UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	反义链:ACGUGACACGUUCGGAGAATT

1.2.3 RNA 的提取及 qRT-PCR 检测 分别用胰酶消化收集各组对数生长期的细胞，PBS 洗 3 遍后转移至无酶 EP 管

中。每管加入 1 mL RNAiso Plus，冰上静置 5 min，4 ℃离心机中 12 000 g 离心 5 min；将上清液转移至新的 EP 管中，每管加入 200 μL 氯仿，在振荡器上振荡混匀，冰上静置 5 min，4 ℃离心机 12 000 g 离心 5 min；离心后匀浆分 3 层：RNA 水相层（无色上清）、蛋白层（中间白色）、有机层（下层红色），将无色上清液转移至新的 EP 管中并加入等体积的异丙醇，在振荡器上充分混匀，冰上静置 10 min，4 ℃离心机中 12 000 g 离心 10 min；弃上清，管壁上贴有少量 RNA（肉眼或不可见），向其中加入适量 75%乙醇，上下轻柔颠倒洗涤管壁，4 ℃离心机中 12 000 g 离心 5 min；弃上清，将 EP 管倒置与冰上干燥 10 min，加入 20 μL DEPC 水溶解沉淀后，取 1 μL 在核算浓度测定仪上检测 RNA 浓度，之后将 RNA 浓度稀释到 500 ng/μL 以下，按照 Takara 逆转录反应说明书合成 cDNA，反应条件：37 ℃ 15 min，85 ℃ 5 s，4 ℃ 10 min。以逆转录后浓度调节到 10 ng/μL 的 cDNA 为模板，进行 qRT-PCR 反应，以 β-actin 为内参，引物序列见表 2，qRT-PCR 的反应条件为：95 ℃预变性 10 s；95 ℃ 5 s，58.5 ℃ 20 s，72 ℃ 20 s，39 个循环。

表 2 引物序列

Tab.2 Sequences of primers for qRT-PCR

基因	引物序列（5'→3'）
GRSAP65	正义链：CTCCACGGGGATGTGGAACC
	反义链：AGTTACAGTCACCTCCCGGC
β-actin	正义链：CCTTCTACAATGAGCTGCGT
	反义链：CCTGGATAGCAACGTACATG

1.2.4 蛋白质提取和 Western blot 分别收集已长满培养瓶的各组细胞，用 PBS 洗 3 遍后倒置于冰上干燥；待瓶底充分干燥后，加入适量的蛋白裂解液使其能覆盖在细胞表面，置于冰上静置 15~20 min，让细胞充分裂解；然后用细胞刮将裂解好的细胞刮下，转移到 EP 管中，在振荡器上充分振荡后置于 4 ℃离心机上，以转速为 12 000 r/min 离心 5 min，上清液即为蛋白。用 BCA 法测量蛋白浓度后，加入 1/5 体积的上样缓冲液混匀，于沸水中煮沸 5 min 后置于-20 ℃冰箱保存备用。取 60 μg/孔蛋白样品上样，经 10%SDS-PAGE 恒压 80 V 电泳使蛋白跑到胶的底端后，恒流 250 mA 将蛋白样品电转至 PVDF 膜上，用 5% BSA 室温封闭 2 h，按抗体分子量大小分别加入 GRASP65 抗体（1∶1 000）和 GAPDH 抗体（1∶1 000）4 ℃孵育过夜，次日洗膜后用 HRP 标记Ⅱ抗（1∶1 000）室温孵育 2 h，最后 ECL 化学发光显影。

1.2.5 CCK-8 实验 将生长于对数期的各组细胞常规消化制成单细胞悬液后计数为 5×10^4 个/mL，在 96 孔板中每孔接种 200 μL 于 37 ℃、5%CO_2 饱和湿度培养箱中培养过夜，每组设置 5 个复孔。96 孔板培养 24、48、72 h 后，每孔加入 20 μL CCK-8 试剂继续培养 1 h，注意不要在孔中形成气泡，随后使用酶标仪测定 450 nm 波长下的吸光度（absorbance，A）值。用 GraphPad Prism5 绘制细胞生长曲线，横坐标为时间，纵坐标为 A 值。根据实验结果选择抑制细胞生长的最佳药物作用浓度和作用时间。

1.2.6 流式细胞术 收集各组对数生长期的细胞，分别消化并计数大于 1×10^6 个/mL，PBS 洗 3 次，第 3 次离心后弃上清 PBS 液用 250 μL 结合缓冲液重新悬浮细胞，使其浓度为 1×10^5 个/mL。在容量为 5 mL 流式管中加入 100 μL 细胞悬液再在避光条件下每管加入 5μL Annexin V/FITC 和 5 μL 20 μg/mL 的碘化丙啶并混匀，标记 15 min。不加 Annexin V 作校正因子。在反应管中加入 400 μL PBS。用流式细胞仪检测，结果用随机软件分析。

1.2.7 Matrigel 细胞侵袭实验 将 Matrigel 胶和 RPMI1640 培养基置于 4 ℃冰箱过夜，在 24 孔 Transwell 上室的聚碳酸酯膜上紧贴小室底部每孔均匀铺一层经无血清 RPMI1640 培养基按 8∶1 稀释并混匀的 Matrigel 胶，防止气泡产生。将小室置于 37 ℃孵箱孵育 3 h 待 Matrigel 胶凝固后在上室接种各组用无血清 RPMI1640 培养基混匀的单细胞悬液每孔 200 μL，细胞数量为每孔 1.5×10^4 个。取 24 孔板任意一孔加入 600 μL 含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基，将小室置于其中在培养箱中培养 24 h 后取出。用棉签擦拭上室，擦去其中未穿过基质胶的细胞，并用 PBS 清洗上室 3 次，再往 24 孔板某一孔中加入 600 μL 甲醇，将小室放于其中 30 min，用以固定已穿过基质胶的细胞，再用 0.1%结晶紫染色 20 min，最后用蒸馏水冲洗小室上残留的结晶紫，室温风干。每孔在显微镜下随机取 5 个视野拍照计数。

1.2.8 Transwell 细胞迁移实验 收集各组细胞，消化后用无血清 RPMI1640 培养基制备成单细胞悬液，计数，将 1.5×10^4 个细胞/孔接种于上室，其余步骤同侵袭实验。

1.3 统计分析

以上每个实验均至少重复 3 次，所得结果采用 SPSS 19.0 统计分析，其中计量资料用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。多组均数间的比较用单因素方差分析，其组间两两比较采用 LSD-t 法；多个时间点的细胞增殖能力比较采用重复测量方差分析。检验水准 α=0.05。。

2 结 果

2.1 4 组细胞中 GRASP65 蛋白和 mRNA 的表达量

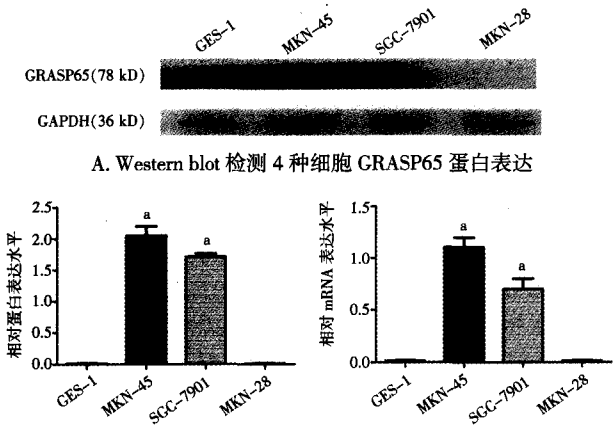
Western blot 和 qRT-PCR 结果显示，低分化胃癌细胞 MKN-45 和中分化胃癌细胞 SGC-7901 中 GRASP65 的蛋白（如图 1A、B，表 3）和 mRNA（如图 1C）表达量明显高于高分化胃癌细胞 MKN-28 和正常人胃黏膜细胞 GES-1（P<0.05）。

表 3 4 组细胞中 GRASP65 的蛋白和 mRNA 表达水平

Tab.3 Expression of GRASP65 protein and mRNA in each group

组别	蛋白相对表达量	mRNA
GES-1组	0.125 0±0.050 0	0.013 3±0.005 8
MKN-45组	2.047 5±0.148 6[a]	1.103 3±0.090 2[a]
SGC-7901组	1.710 0±0.509 9	0.720 0±0.110 0
MKN-28组	0.175 0±0.904 6	0.016 7±0.005 8
F 值	547.000	173.000
P 值	0.000	0.000

注：a，与 GES-1 和 MKN-28 相比，P<0.05



A. Western blot 检测 4 种细胞 GRASP65 蛋白表达

a：与高分化胃癌细胞 MKN-28 和正常人胃黏膜细胞 GES-1 比较；$P<0.05$

B. 各组中 GRASP65 蛋白相对表达水平

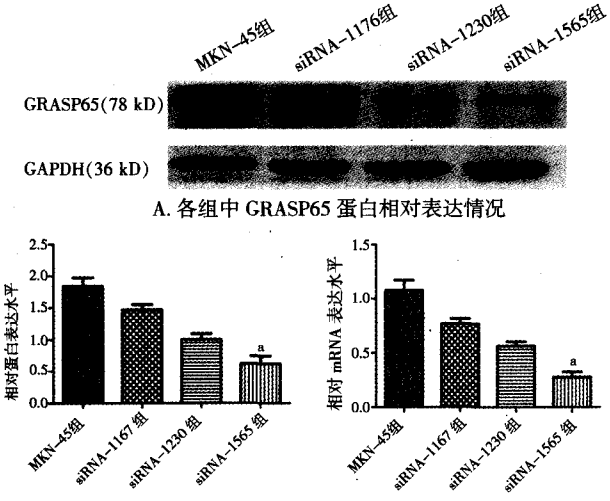
C. 各组中 GRASP65 mRNA 相对表达水平

图 1 Western blot 和 qRT-PCR 检测 4 组细胞中 GRASP65 蛋白和 mRNA 的表达

Fig.1 The protein and mRNA expression of GRASP65 in four group was detected by Western blot and qRT-PCR respectively

2.2 瞬时转染后 MKN-45 中 GRASP65 蛋白和 mRNA 的表达量明显下降

将 3 条 siRNA 干扰片段经 Lipo 2000 转染到 MKN-45 细胞后，Western blot 和 qRT-PCR 结果显示，与未转染的 MKN-45 相比，3 组转染组细胞中 GRASP65 的蛋白（如图 2A、B，表 4）和 Mrna（如图 2C）表达量明显低于未转染组。qRT-PCR 显示（如表 4），GRASP65-siRNA-1565 转染组 GRASP65 的 mRNA 表达量比未转染的 MKN-45 低 80%，故选择 GRASP65-siRNA-1565 干扰片段作为后续下调实验中的转染组。



A. 各组中 GRASP65 蛋白相对表达情况

B. 各组中 GRASP65 蛋白相对表达水平

C. 各组中 GRASP65 mRNA 相对表达水平

a：GRASP65-siRNA-1565 转染组 GRASP65 的 mRNA 表达量比未转染的 MKN-45 低 80%

图 2 Western blot 和 qRT-PCR 检测转染前后 GRASP65 蛋白和 mRNA 的表达

Fig.2 The protein and mRNA expression of GRASP65 in MKN-45 after transfected was detected by Western blot and qRT-PCR respectively

表 4 转染前后细胞中 GRASP65 的蛋白和 mRNA 表达水平

Tab.4 Expression of GRASP65 protein and mRNA after transfection

组别	蛋白相对表达量	mRNA
MKN-45组	1.840 0 ± 0.134 4	1.077 5 ± 0.093 2
siRNA-1167组	1.465 0 ± 0.834 7[a]	0.767 5 ± 0.045 7[a]
siRNA-1230组	1.002 5 ± 0.090 7[a]	0.562 5 ± 0.043 5[a]
siRNA-1565组	0.620 0 ± 0.119 2[a]	0.275 0 ± 0.050 7[a]
F 值	95.700	120.000
P 值	0.000	0.001

注：a，与 MKN-45 相比，$P<0.05$

2.3 CCK-8 检测转染后细胞增殖能力明显减弱

CCK-8 实验结果显示（如图 3、表 5），GRASP65-siRNA 转染组、阴性对照组和空白对照组 3 组之间细胞增殖力在 24 h 时无明显差异；在 48 h 和 72 h，GRASP65-siRNA 转染组细胞增殖能力明显低于阴性对照组和空白对照组，而后两者之间细胞增殖能力无明显差异。

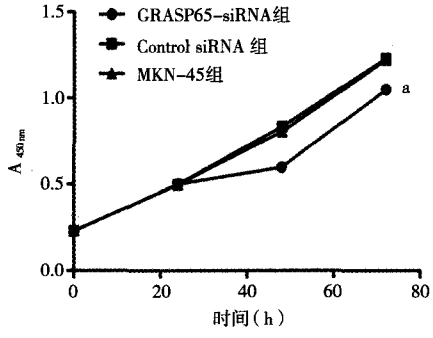


图 3 CCK-8 检测 3 组细胞的细胞增殖能力

Fig.3 The proliferation of MKN-45 in each group were detected by CCK-8 assay

表 5 各组细胞体外增殖情况

Tab.5 Cell proliferation of each group in vitro

组别	24 h	48 h	72 h
GRASP65 siRNA 组	0.500 6 ± 0.016 6	0.609 0 ± 0.044 2	1.048 0 ± 0.049 7[a]
Control siRNA 组	0.498 0 ± 0.289 7	0.723 0 ± 0.037 5	1.212 2 ± 0.025 7
MKN-45 组	0.497 6 ± 0.024 7	0.725 8 ± 0.038 7	1.220 0 ± 0.038 7

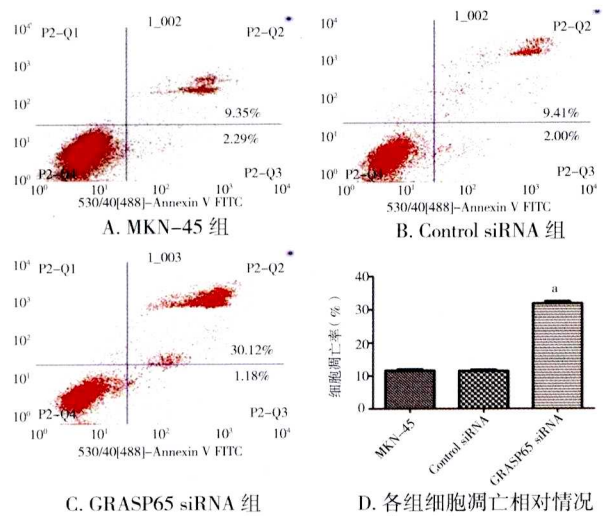
注：$F_{时间}=36.754$，$P_{时间}=0.000$；$F_{分组}=1\,462.061$，$P_{分组}=0.000$；$F_{交互}=10.726$，$P_{交互}=0.000$；a：与 MKN-45 和 Control siRNA 相比，$P<0.05$

2.4 流式细胞术检测转染后细胞凋亡明显增加

流式细胞术结果显示（如图 4、表 6），GRASP65-siRNA 转染组细胞凋亡明显高于阴性对照组和空白对照组，而后两组间细胞凋亡无明显差异。

2.5 Transwell 实验检测转染后细胞迁移和侵袭能力均下降

Transwell 实验结果显示，GRASP65-siRNA 转染组细胞迁移（如图 5A、B，表 7）和侵袭（如图 5A、C，表 7）能力均明显低于阴性对照组和空白对照组，而后两组间细胞无明显差异。



A. MKN-45 组　B. Control siRNA 组

C. GRASP65 siRNA 组　D. 各组细胞凋亡相对情况

图 4　流式细胞术检测细胞凋亡

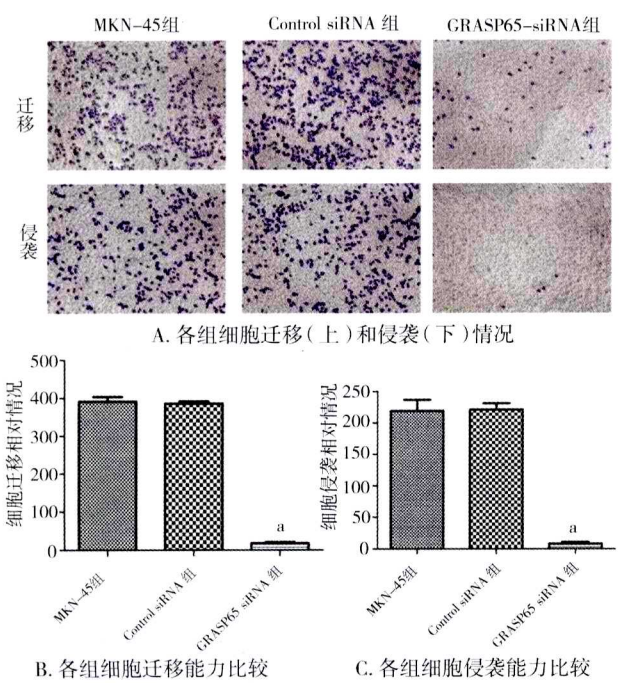
Fig.4　The apoptosis of MKN-45 in each group was detected by flow cytometry

表 6　各组细胞凋亡

Tab.6　Apoptosis of cells in each group

组别	凋亡百分比
MKN-45组	11.576 7 ± 0.438 4
Control siRNA 组	11.466 7 ± 0.388 1[b]
GRASP65 siRNA 组	31.826 7 ± 0.671 0[a]
F 值	1 559.584
P 值	0.000

注：a，与 MKN-45 和 Control siRNA 组相比，$P<0.05$；b：与 MKN-45 组相比，$P=0.802$



A. 各组细胞迁移（上）和侵袭（下）情况

B. 各组细胞迁移能力比较　C. 各组细胞侵袭能力比较

图 5　Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭

Fig.5　The migration and invation of MKN-45 in each group was detected by Transwell

表 7　各组细胞迁移和侵袭

Tab.7　Metastasis and invasion in each group

组别	迁移细胞数	侵袭细胞数
MKN-45组	391.330 ± 12.503	219.330 ± 17.559
Control siRNA 组	386.000 ± 6.083[b]	221.330 ± 10.017[b]
GRASP65 siRNA 组	17.670 ± 3.055[a]	8.000 ± 2.646[a]
F 值	2 037.765	325.418
P 值	0.000	0.000

注：a，与 MKN-45 和 Control siRNA 组相比，$P<0.05$；b：与 MKN-45 组相比，$P>0.05$

3　讨　论

高尔基体是一个参与包括蛋白质加工、分类、靶蛋白合成和运输等众多细胞功能的关键细胞器[8]。研究表明，高尔基体及其上的很多蛋白都参与了细胞的分化及细胞间的信号转导，在细胞周期中扮演着非常重要的角色，与多种肿瘤的发生发展都密切相关[9]。本课题组前期应用亚细胞比较蛋白质组学的方法，初步发现胃癌细胞内的高尔基体上主要有约 78 个差异蛋白，共鉴定出 39 个蛋白质，而这些差异表达的蛋白质经过初步鉴定涉及细胞能量代谢、肿瘤侵袭和转移、细胞周期调控等方面。本课题组拟在此基础上继续深入研究高尔基体上各种蛋白质在肿瘤中的作用及机制，必将增加我们对高尔基体新功能的认识。

高尔基体重组和堆叠蛋白（GRASPs）包括 GRASP65 和 GRASP55，它们有较高的序列相似性和组织结构，是高尔基体囊膜结构的重要组成部分。研究发现，GRASP65 参与了体内多个生理及病理生理过程，如维持体内高尔基体的完整性[10]、在细胞周期中调节高尔基体膜运动[11]、在有丝分裂进程中调节高尔基体堆叠[12]、参与调节高尔基体糖基化作用[13]等。此外，GRASP65 定位于高尔基体顺面，通过两种方式与高尔基体膜结合，一种是与 GM130 结合，另一种是通过 N 端的豆蔻酰化修饰锚定于膜上[14]。无论在分裂期还是分裂间期，GM130 和 GRASP65 都以稳定的复合物形式存在[15]，用于高尔基带形成时囊泡间的侧向融合[16]。在有丝分裂间期，GRASP65 中 277 位的丝氨酸能被磷酸化，由磷酸化引起的反式寡聚体的解聚对高尔基体的去堆叠和片段化起到很重要的作用，高尔基体带的切割对于细胞进入有丝分裂周期是必需的。已有研究表明，

GRASP65 与高尔基体基质蛋白 GM130 有协同作用[7]，而 GM130 在胃癌、肺癌等多种癌症中起重要作用，被认为是癌症治疗的新靶蛋白[17]。由此，本文拟探讨 GRASP65 在不同分化程度的胃癌细胞中 GRASP65 的表达量是否有差异？是否与癌细胞的生物学行为有关？

本实验通过 Western blot 和 qRT-PCR 检测 3 组不同分化程度的人胃癌细胞（MKN-45、SGC-7901 和 MKN-28）和正常的胃黏膜细胞（GES-1）中 GRASP65 蛋白和 mRNA 的表达，结果显示，低分化胃癌细胞 MKN-45 和中分化胃癌细胞 SGC-7901 中 GRASP65 的蛋白质及 mRNA 表达量均高于高分化胃癌细胞 MKN-28 和正常胃黏膜细胞 GES-1。由此猜想 GRASP65 的表达量是否跟胃癌体外的恶性程度有关？于是，本课题组筛选针对 GRASP65 基因有明显干扰作用的 siRNA 片段，运用 siRNA 技术下调人胃癌细胞 MKN-45 中 GRASP65 的表达，经 Western blot 和 qRT-PCR 验证转染成功后，对转染前后的细胞进行一系列生物学行为的实验。

正常细胞的增殖和凋亡都遵循一定的规律，而癌细胞由于受到致癌因子的作用可以无限增殖却无法进入正常的凋亡程序，从而导致癌细胞的“永生”。所以抑制癌细胞的增殖能力同时促进其凋亡是临床癌症治疗的关键。本次研究通过 CCK-8 和流式细胞术监测到，下调 GRASP65 表达的人胃癌 MKN-45 细胞的增殖能力明显低于阴性对照组和空白对照组的 MKN-45，而凋亡能力增强。迁移和侵袭是恶性肿瘤的基本特征，本研究中的 Transwell 细胞侵袭和迁移实验证明，转染组细胞的体外侵袭和迁移能力均较阴性对照组和阴性对照组低。

总之，本研究表明 GRASP65 的表达量与胃癌的体外恶性程度有密切的关系，下调 GRASP65 的表达可明显减弱胃癌细胞的体外增殖能力，同时促进胃癌细胞的凋亡、侵袭和迁移能力，但其具体机制尚待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. Int J Cancer, 2015, 136(5): E359-386.

[2] Mao Z, Zhou J, Luan J, et al. Tamoxifen reduces P-gp-mediated multidrug resistance via inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway in ER-negative human gastric cancer cells[J]. Biomed Pharmacother, 2014, 68(2): 179-183.

[3] Deng H, Huang X, Fan J, et al. A variant of estrogen receptor-alpha, ER-alpha36 is expressed in human gastric cancer and is highly correlated with lymph node metastasis[J]. Oncol Rep, 2010, 24(1): 171-176.

[4] Mowbrey K, Dacks JB. Evolution and diversity of the Golgi[J]. FEBS Letters, 2009, 583(23): 3738-3745.

[5] 冯阳阳，陈 婕，牟 玲，等. 抑制 GM130 表达对胃癌细胞增殖、侵袭及迁移能力的影响[J]. 第三军医大学学报，2015，37(12)：1217-1221.

[6] 苏琳茜，冯阳阳，管停宏，等. GM130 对胃癌细胞 O-糖基化及细胞粘附能力的影响[J]. 重庆医科大学学报，2016，41(6)：563-568.

[7] Hu F, Shi X, Li B, et al. Structural basis for the interaction between the Golgi reassembly-stacking protein GRASP65 and the Golgi matrix protein GM130[J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(44): 26373-26382.

[8] Farquhar MG, Palade GE. The Golgi apparatus (complex)-(1954-1981)-from artifact to center stage[J]. J Cell Biol, 1981, 91(3 Pt 2): 77-103.

[9] Koreishi M, Gniadek TJ, Yu S, et al. The golgin tether giantin regulates the secretory pathway by controlling stack organization within Golgi apparatus[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e59821.

[10] Zhang X, Wang Y. GRASPs in Golgi structure and function[J]. Front Cell Dev Biol, 2015, 3: 84.

[11] Tang D, Wang Y. Cell cycle regulation of Golgi membrane dynamics[J]. Trends Cell Biol, 2013, 23(6): 296-304.

[12] Wang Y, Seemann J, Pypaert M, et al. A direct role for GRASP65 as a mitotically regulated Golgi stacking factor[J]. EMBO J, 2003, 22(13): 3279-3290.

[13] Xiang Y, Zhang X, Nix DB, et al. Regulation of protein glycosylation and sorting by the Golgi matrix proteins GRASP55/65[J]. Nat Commun, 2013, 4: 1659.

[14] Sengupta D, Linstedt AD. Mitotic inhibition of GRASP65 organelle tethering involves Polo-like kinase 1 (PLK1) phosphorylation proximate to an internal PDZ ligand[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(51): 39994-40003.

[15] Barr FA, Puype M, Vandekerckhove J, et al. GRASP65, a protein involved in the stacking of Golgi cisternae[J]. Cell, 1997, 91(2): 253-262.

[16] Nakamura N. Emerging new roles of GM130, a cis-Golgi matrix protein, in higher order cell functions[J]. J Pharmacol Sci, 2010, 112(3): 255-264.

[17] Chang SH, Hong SH, Jiang HL, et al. GOLGA2/GM130, cis-Golgi matrix protein, is a novel target of anticancer gene therapy[J]. Mol Ther, 2012, 20(11): 2052-2063.

（责任编辑：方 济）