

论 著

迁移侵袭抑制蛋白抑制胃癌细胞增殖迁移及侵袭

张梦雪¹, 王迪^{2#}, 张航瑜¹, 柳山泉², 高香红^{3*}, 郑洁^{1*}

(潍坊医学院¹临床病理系, ²临床医学院, ³人体解剖学教研室, 山东潍坊 261053)

〔摘要〕目的 检测迁移侵袭抑制蛋白(migration and invasion inhibitory protein, MIIP)基因在胃癌中的表达情况及其在胃癌发生发展过程中起到的作用,为探究胃癌发生的分子机制和靶向治疗提供实验依据。方法 Western blot 和免疫组织化学法检测 MIIP 在胃癌组织的表达。胃癌 SGC7901 细胞中转染 MIIP 过表达质粒及其空质粒,应用细胞功能学实验检测 MIIP 过表达对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。结果 MIIP 在胃癌组织标本中的表达低于癌旁正常胃粘膜;细胞功能实验结果显示,MIIP 过表达可抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。结论 过表达 MIIP 可以抑制胃癌 SGC7901 细胞增殖、迁移和侵袭的能力。

〔关键词〕MIIP; 人胃癌 SGC7901 细胞; 增殖; 迁移和侵袭

〔中图分类号〕R735.2 〔文献标识码〕A DOI: 10.16705/j.cnki.1004-1850.2020.02.001

Migration and invasion inhibitory protein inhibits cell proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells

Zhang Mengxue^{1#}, Wang Di^{2#}, Zhang Hangyu¹, Liu Shanquan², Gao Xianghong^{3*}, Zheng Jie^{1*}

(¹Department of Clinical Pathology; ²Clinical Medicine College; ³Department of Human Anatomy, Weifang Medical University, Weifang 261053, China)

〔Abstract〕Objective To investigate the expression of migration and invasion inhibitory protein (MIIP) and its role in the development of gastric cancer (GC) so as to provide a experimental basis for exploring the molecular mechanism and therapeutic target of GC. Methods The expression of MIIP in GC tissues was detected by Western blot and immunohistochemistry. MIIP over-expression plasmid and its empty plasmid were transfected into the SGC7901 cells. The proliferation, migration and invasion assay were performed to detect the effects of MIIP over-expression on GC cells. Results The expression of MIIP was decreased in GC tissues. Up-regulated expression of MIIP suppressed the proliferation, migration and invasion abilities of GC cells *in vitro*. Conclusion MIIP expression is decreased in GC. Over-expression of MIIP inhibits the proliferation, migration and invasion abilities of GC cells.

〔Keywords〕MIIP; human gastric cancer SGC7901 cells; proliferation; migration and invasion

迁移侵袭抑制蛋白(migration and invasion inhibitory protein, MIIP)是一种抑癌基因蛋白,其

分子量为 45KD,又称为侵袭抑制蛋白 45(invasion inhibitory protein 45, IIP45)^[1]。编码 MIIP 的基因位于 1p36.22 染色体上,该染色体区域在多种类型的肿瘤中缺失,包括少突胶质细胞瘤(81%),星型细胞瘤(25%),神经母细胞瘤(30%),前列腺癌(40%),乳腺癌(61%),结直肠癌(55%)等^[2]。已有的研究发现,MIIP 蛋白能够抑制结直肠癌^[3]、胶质瘤^[4]、乳腺癌^[5]、子宫内膜癌^[6]的发展。但目前尚未有研究证明 MIIP 对胃癌发展的影响。本研究对胃癌 SGC7901 细胞进行 MIIP 质粒过表达转染,并进行一系列体外细胞功能实验,观察其生物学行为变化。为进一步确定 MIIP 蛋白可作为肿瘤抑制蛋白和临床肿瘤靶向治疗提供理论依据。

〔收稿日期〕2019-12-08 〔修回日期〕2020-04-10

〔基金项目〕国家自然科学基金(81802474);国家级大学生创新训练项目(201910438024);山东省自然科学基金(ZR2015HL091);潍坊医学院大学生科技创新基金(KX2019065);本成果(论著)得到潍坊医学院教师公派教师国内访学项目经费资助

〔作者简介〕张梦雪,女(1993年),汉族,硕士生
王迪,女(1998年)汉族,本科生

为共同第一作者

* 通讯作者(To whom correspondence should be addressed):

blx@wfmec.edu.cn; zj1978824@163.com

材料和方法

1 临床病例资料、主要试剂及细胞株

收集 2016 年 1 月至 2018 年 5 月潍坊医学院附属医院胃癌手术切除标本 60 例, 标本病理诊断均为胃腺癌。60 例标本的发病年龄为 36~78 岁, 平均年龄为 63.4 岁。所有患者术前均未接受放疗和化疗(表 1)。

免疫组织化学 SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥), 抗 MIIP 抗体(Abcam), 抗 GAPDH 抗体(Proteintech), Lipofectamine[®]2000 Reagent(Invitrogen), Cell-Light[™] EdU Apollo[®]488 细胞增殖试剂盒(广州锐博), Transwell 小室(Corning), Matrigel 基质胶(BD), 细胞裂解液 RIPA(碧云天), MIIP 过表达质粒委托上海吉玛基因有限公司设计合成, 胃癌 SGC7901 细胞株购自中国科学院细胞库-上海肿瘤研究所。

2 免疫组织化学染色

收集的临床胃癌手术切除及癌旁正常胃粘膜标本制作石蜡切片, 切片用抗 MIIP 多克隆抗体(1:100)进行免疫组织化学 SP 法染色, 苏木素复染切片。按二级计分法判读 MIIP 蛋白的表达情况。

3 细胞培养与转染

将胃癌 SGC7901 细胞置于 RPMI-1640 培养液中, 置于 37 °C, 5% 的 CO₂ 培养箱中培养, 并进行常规换液及传代培养。取处于对数生长期的胃癌 SGC7901 细胞, 消化后重悬细胞并计数、铺板。待次日长到细胞密度的 70%~80% 时利用 Lipofectamine[®]2000 Reagent 进行 MIIP 过表达质粒及其空载体质粒的转染。质粒转染的细胞均分为转染 MIIP 过表达质粒组(实验组, OverMIIP)、转染空载体质粒组(对照组, Control)和空白对照组(Blank)。

4 Western blot 分析

质粒转染胃癌 SGC7901 细胞 48h 后, 每孔加入 60μl RIPA, 冰上裂解 20min 提取蛋白质以备后续实验。BCA 测蛋白浓度后用 5× 缓冲液调至 3μl/μg, 按等浓度等体积蛋白加于聚丙烯酰胺凝胶上样, 电泳后将蛋白转移至 PVDF 膜上, 牛奶封闭加入一抗(均为 1:1000 稀释)并 4°C 孵育过夜。次日, 牛奶封闭后滴加二抗置摇床孵育 2h, 配制 ECL 化学发光液显影、拍片。利用 Image J 软件进行光密度分析。

5 EdU 实验

在 96 孔板中质粒转染胃癌 SGC7901 细胞, 24h 后利用 Cell-Light[™] EDU Apollo[®]488 细胞增殖试剂盒检测细胞增殖情况。具体操作步骤参考 Cell-Light[™] EdU Apollo[®]488 细胞增殖试剂盒说明书。

6 MTS 实验

按照每孔 4000 个细胞种植于 96 孔板中, 每组设立 5 个复孔。分别于接种后 24h、48h、72h 加入 MTS (20μl/孔), 细胞培养箱孵育 3h 后, 酶标测吸 490 nm 光度值。

7 细胞迁移和侵袭实验

实验具体步骤参考文献^[7]。细胞迁移实验: 转染后的胃癌 SGC7901 细胞用无血清的 1640 培养基重悬计数, 小室上层接种 1×10⁵ 个细胞, 下层加入含 10%FBS 1640 培养基, 置培养箱培养 16h, 取出小室 4% 的多聚甲醛固定后结晶紫染色, 镜下观察; 侵袭实验需先将 100μl 基质胶稀释液均匀铺入小室上层后置 37°C 培养箱中 2~4h, 在基质胶完全凝固后, 在小室上层接种细胞, 余步骤同迁移实验。

8 统计学分析

应用 SPSS17.0 分析统计学数据, GraphPad Prism 5 制作统计图表; 实验数据以均数±标准差表示, 两组间定量资料采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 相关性分析采用 χ^2 检验, 以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

结果

1 MIIP 在胃癌组织中低表达且与肿瘤大小、TNM 分期及淋巴结转移呈负相关

免疫组织化学染色显示, MIIP 主要表达于细胞胞质中。MIIP 在胃癌组织中表达的阳性率为 43.3% (26/60), 在癌旁正常组织中表达的阳性率为 80.0% (48/60), MIIP 在胃癌组织中的表达明显低于癌旁正常胃粘膜组织(图 1A); Western blot 结果亦显示 MIIP 在胃癌组织中低表达(图 1B)。相关分析显示, MIIP 的表达水平与瘤体大小、TNM 分期以及淋巴结转移情况呈负相关, 而与患者年龄大小、性别及 Lauren's 分型和分化程度无相关性(表 1)。

2 MIIP 抑制胃癌 SGC7901 细胞的增殖

利用 EdU 和 MTS 实验检测胃癌 SGC7901 细胞增殖能力显示: 转染 MIIP 过表达质粒的细胞其增殖

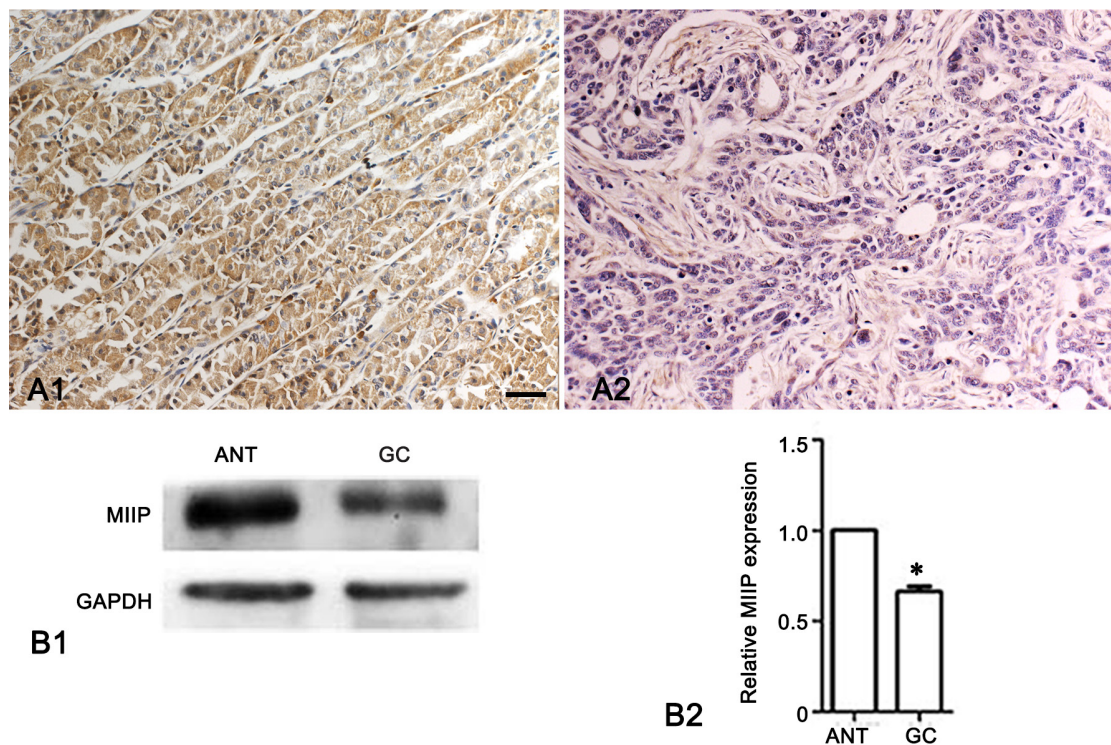


图 1 胃癌组织和癌旁正常胃粘膜中 MIIP 表达水平的免疫组织化学 (A) 和 Western blot (B) 检测。A1, 癌旁正常胃粘膜; A2, 胃癌组织; 比例尺, 50 μ m。B1, 代表性 Western blot 检测结果; B2, Western blot 检测结果的统计学分析; ANT, 癌旁正常胃黏膜; GC, 胃癌组织; 与癌旁正常组织相比, *0.01<P<0.05 (n=12)

Fig 1. Immunohistochemical (A) and Western blot (B) detection of MIIP expression levels in gastric cancer tissue and normal gastric mucosa adjacent to the cancer. A1, normal gastric mucosa adjacent to cancer; A2, gastric cancer tissue; scale bar, 50 μ m. B1, representative Western blot test results; B2, statistical analysis of Western blot test results; ANT, normal tissue adjacent to cancer; GC, gastric cancer tissue; compared with normal tissue adjacent to cancer, *0.01<P<0.05 (n=12)

率明显低于转染空载体的对照组 (图 2), 表明 MIIP 能够抑制胃癌 SGC7901 细胞的增殖。

3 MIIP 抑制胃癌 SGC7901 细胞迁移和侵袭

Transwell 细胞迁移实验结果显示, 胃癌 SGC7901 细胞转染 MIIP 过表达质粒后细胞通过滤膜的数量 (176 \pm 7.8) 明显低于对照组细胞 (248 \pm 8.9); 细胞侵袭实验结果显示, 过表达 MIIP 的胃癌 SGC7901 细胞透过 Matrigel 胶和滤膜的数量 (151 \pm 7.2) 亦少于对照组细胞 (229 \pm 6.9) (图 3), 表明 MIIP 能抑制胃癌细胞迁移和侵袭。

讨 论

胃癌是全球常见的恶性肿瘤之一, 其病死率位居第 3 位^[8], 据国家癌症中心数据显示: 胃癌在我国的发病率及死亡率均位居恶性肿瘤的第 2 位^[9], 仅次于肺癌。因此, 研究胃癌发生发展的分子机制, 寻找新的治疗靶点具有重要意义。

迁移侵袭抑制蛋白 (MIIP) 是一种抑癌蛋白,

由 388 个氨基酸组成。MIIP 基因含有 10 个外显子, 跨越 12.6kb 的基因组 DNA, 转录全长为 1588bp, 含有 3 个低成分复杂性片段 (SEG) 和 RGD 序列, 是一种亲水蛋白^[2]。MIIP 最早是作为胰岛素样生长因子结合蛋白 (Insulin-like growth factor binding protein 2, IGFBP2) 的调节因子被发现的^[1]。先前的研究发现在胶质瘤中, MIIP 可以通过抑制 IGFBP2 介导的下游通路而减弱胶质瘤的侵袭能力^[1]; 而后的研究发现, 在胶质瘤中 MIIP 结合到组蛋白去乙酰化酶 6 (histone deacetylases 6, HDAC6) 两个催化域, 从而减少蛋白质 HDAC6 稳定性, 抑制细胞脱乙酰酶的活动, 导致 α -tubulin 乙酰化作用的增加和细胞活性的降低, 从而抑制其介导的细胞侵袭能力^[10]。Ji P 等研究发现 MIIP 可与 Cdc20 相互作用反向调控 APC/Cdc20, 并抑制细胞周期蛋白 B1 的降解, 导致有丝分裂转变的衰减和有丝分裂突变的增加进而引起长期的生长抑制^[4]。Wang^[6] 等的研究结果表明 MIIP 的低表达与子宫肌层深部浸润、淋巴结转移及

表 1 胃癌中 MIIP 表达与临床病理参数的相关性

Tab. 1 Correlation between MIIP expression and clinicopathological parameters in gastric cancer

parameters	n	Expression of MIIP		P value
		Low or none	High	
Age(years)	60			
>60	32	19	13	0.651
≤60	28	15	13	
Gender	60			
male	34	19	15	0.889
female	26	15	11	
Tumor size(cm)	60			
<5	23	9	14	0.031
≥5	37	25	12	
TNM stage	60			
I + II	25	10	15	0.028
III + IV	35	24	11	
Lauren's classification	60			
Intestinal	26	14	12	0.700
Diffuse	34	20	14	
Differentiation degree	60			
Well/moderate	27	14	13	0.496
Poor	33	20	13	
Lymph node metastasis	60			
Negative	26	10	16	0.013
Positive	34	24	10	

较高的临床分期存在显著正相关, 细胞学实验发现 MIIP 能抑制子宫内膜癌细胞的迁移和侵袭, 进一步的机制研究发现 MIIP 能与特异性效应器 p21 活化激酶 1 (p21-activated kinase 1, PAK1) 直接结合, 减弱 Rac1 信号通路, 导致细胞骨架重构、片状伪足减少, 从而引起肿瘤细胞的迁移能力降低。MIIP 在各种恶性肿瘤中发挥不同的作用, 虽然 MIIP 在胶质瘤、子宫内膜癌等多种恶性肿瘤中发挥肿瘤抑制作用, 但是亦有 MIIP 作为癌基因促进肿瘤发生发展的报道。Wen^[11]等研究发现 MIIP 在食管鳞状细胞癌组织中表达高于癌旁正常上皮, 而且 MIIP 低表达的患者总体生存率和无病生存率更佳。这说明目前 MIIP 在恶性肿瘤的功能尚未明确, 需要进一步研究。

本研究利用免疫组织化学染色和 Western blot 对临床胃癌患者的 MIIP 蛋白进行检测, 发现 MIIP 蛋白在胃癌组织表达下降, 进一步分析 MIIP 蛋白的表达水平与胃癌患者临床病理参数的相关性, 发现 MIIP 蛋白高表达的患者瘤体相对较小、TNM 分期较低、无或少有淋巴结转移。细胞功能学实验结果显示在胃癌 SGC7901 细胞中过表达 MIIP 基因能降低胃癌细胞的增殖能力, 抑制其生长; 同时, 过表达 MIIP 基因亦能抑制胃癌细胞迁移、侵袭能力, 降低其运动能力。

综上所述, 本研究表明 MIIP 在胃癌组织中低表达, MIIP 能够抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。这为明确胃癌发生的分子机制和靶向治疗提供

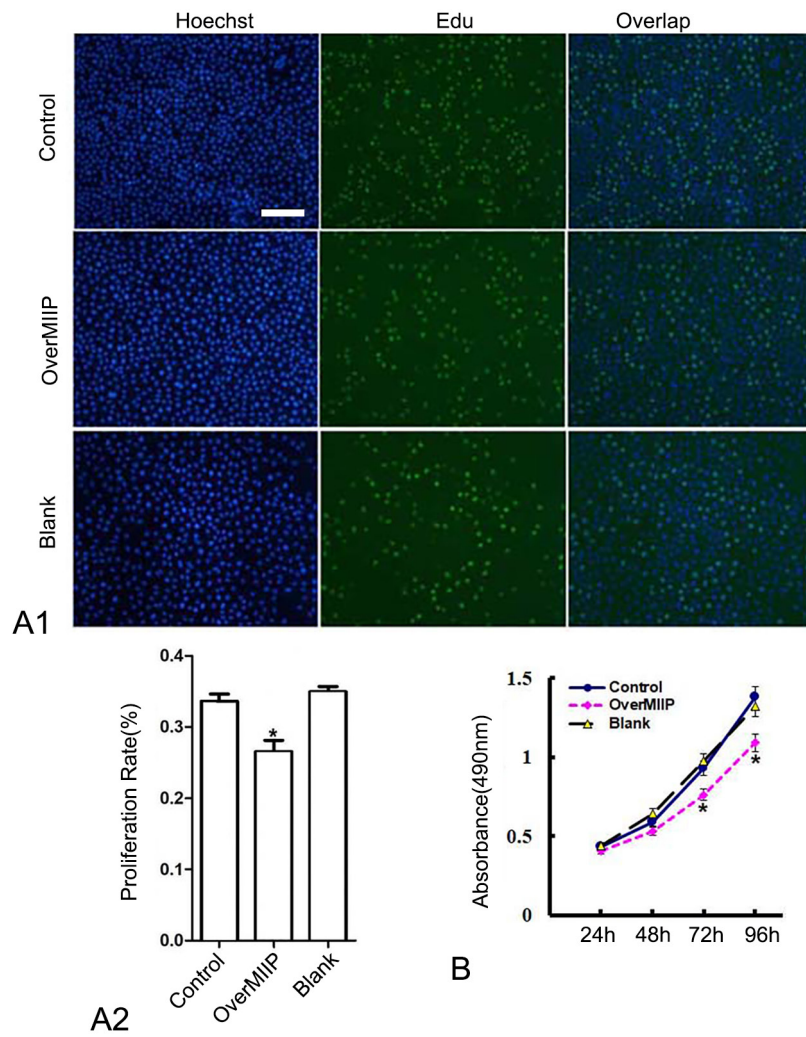


图 2 过表达 MIIP 对 SGC7901 细胞增殖的影响。A1, EDU 染色检测细胞增殖 (比例尺, 50 μ m); A2, EDU 染色检测细胞增殖的统计学分析。B, MTS 法检测细胞增殖的统计学分析; 与对照组 (Control) 及空白组 (Blank) 比较, *0.01<P<0.05 (n=3)

Fig.2 The effect of MIIP overexpression on cell proliferation of SGC7901 cells. A1, EdU staining detection for cell proliferation (scale bar, 50 μ m); A2, statistical analysis of EDU staining. B, statistical analysis of MTS assay,*0.01<P<0.05, compared with control group or blank group (n=3)

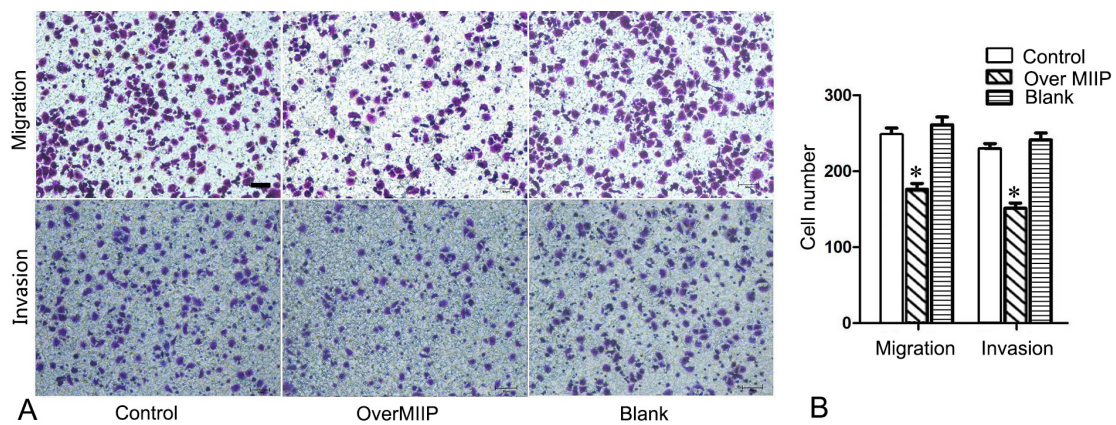


图 3 MIIP 对 SGC7901 细胞迁移和侵袭能力的影响。A, 代表性迁移和侵袭实验检测结果; 比例尺, 50 μ m。B, 迁移和侵袭实验结果的统计学分析; 与对照组或空白组相比, *0.01<P<0.05(n=3)

Fig.3 The effects of MIIP on the cell migration and invasion abilities in the SGC7901 cells. A, representative results of migration and invasion assays results; scale bar, 50 μ m. B, statistical analysis of migration and invasion assays;*0.01<P<0.05, compared with the control group (n=3)

一定的实验依据,但是 MIIP 具体的作用机制还需深入研究。

参 考 文 献

- [1] Song SW, Fuller GN, Khan A, et al. Iip45, an insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) binding protein, antagonizes IGFBP-2 stimulation of glioma cell invasion. *Proc Natl AcadSci USA*, 2003, 100(24): 13970-13975.
- [2] Wang Y, Wen J, Zhang W. MIIP, a cytoskeleton regulator that blocks cell migration and invasion, delays mitosis, and suppresses tumorigenesis. *Current Protein Peptide Sci*, 2011,12(1): 68-73.
- [3] Chen T, Li J, Xu M, et al. PKC ϵ phosphorylates MIIP and promotes colorectal cancer metastasis through inhibition of RelA deacetylation. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 939.
- [4] Ji P, Smith SM, Wang Y, et al. Inhibition of gliomagenesis and attenuation of mitotic transition by MIIP. *Oncogene*, 2010, 29(24): 3501-3508.
- [5] Song F, Zhang L, Ji P, et al. Altered expression and loss of heterozygosity of the migration and invasion inhibitory protein (MIIP) gene in breast cancer. *Oncol Rep*, 2015, 33(6): 2771-2778.
- [6] Wang Y, Hu L, Ji P, et al. MIIP remodels Rac1-mediated cytoskeleton structure in suppression of endometrial cancer metastasis. *J Hematol Oncol*, 2016, 9(1): 112.
- [7] Zheng J, Liu Y, Qiao Y, et al. miR-103 promotes proliferation and metastasis by targeting KLF4 in gastric cancer. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5): pii: E910.
- [8] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *A Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [9] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015. *A Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [10] Wu Y, Song SW, Sun J, et al. Iip45 inhibits cell migration through inhibition of HDAC6. *Biol Chem*, 2010, 285(6): 3554-3560.
- [11] Wen J, Liu QW, Luo KJ, et al. MIIP expression predicts outcomes of surgically resected esophageal squamous cell carcinomas. *Tumour Biol*, 2016, 37(8): 10141-10148.