

# 沉默 $\beta$ -catenin 表达对胃癌 MGC-803 细胞生物学行为的影响与作用机制研究

潘安萍 朱建伟 王忻妍

**【摘要】目的** 探讨  $\beta$ -链蛋白( $\beta$ -catenin)表达下调对胃癌 MGC-803 细胞生物学行为的影响,并分析其作用机制。**方法** 将 RNA 干扰慢病毒( $\beta$ -catenin-RNAi 慢病毒)及空载体慢病毒( $\beta$ -catenin-Neg)分别感染 MGC-803 细胞,分为实验组(MGC-803-RNAi 细胞)、阴性对照组(MGC-803-Neg 细胞)、空白对照组(未处理的 MGC-803 细胞)。Western blot 检测验证转染效率;双染流式细胞术检测细胞凋亡率,单染流式细胞术分析细胞周期,Transwell 法检测细胞侵袭能力;Western blot 检测细胞 Bax、Bcl-2、cyclin D1 及基质金属蛋白酶(MMP)-7 蛋白表达水平。**结果** MGC-803-RNAi、MGC-803-Neg 细胞中显示绿色荧光的细胞约占 80%,MGC-803 细胞不显示荧光;与 MGC-803-Neg、MGC-803 细胞相比,MGC-803-RNAi 细胞  $\beta$ -catenin 表达水平明显下调( $P<0.05$ ),细胞凋亡率升高( $P<0.05$ ),出现 G<sub>1</sub>/S 期阻滞现象( $P<0.05$ ),侵袭能力明显减弱( $P<0.05$ ),Bcl-2、cyclin D1 及 MMP-7 蛋白表达水平下调(均  $P<0.05$ ),而 Bax 蛋白表达水平上调( $P<0.05$ )。**结论** 沉默  $\beta$ -catenin 表达可促进胃癌 MGC-803 细胞凋亡,阻滞其细胞周期进程,减弱其侵袭转移力,其作用机制可能与影响 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路下游靶蛋白表达有关。

**【关键词】** 胃癌 MGC-803 细胞  $\beta$ -catenin 生物学行为

Effect of Silencing  $\beta$ -catenin expression on biological behaviors of gastric cancer MGC-803 cells and related molecular mechanisms  
PAN Anping, ZHU Jianwei, WANG Xinyan. Department of Medical Oncology, Hangzhou Cancer Hospital, Hangzhou 310002, China

**【Abstract】Objective** To investigate the effect of silencing  $\beta$ -catenin gene expression on biological behaviors of gastric carcinoma cells and the related molecular mechanisms. **Methods** Human gastric cancer MGC-803 cells were infected with  $\beta$ -catenin-RNAi lentivirus (study group) and  $\beta$ -catenin-negative lentivirus (negative control group), respectively. The expression of  $\beta$ -catenin, Bax, Bcl-2, cyclin and MMP-7 proteins was detected by Western blotting. The apoptosis, cell cycle and migration of infected and non-infected (normal control group) MGC-803 cells were determined by flow cytometry and Transwell assay, respectively. **Results** The expression levels of  $\beta$ -catenin in study group was lower than that of the other two groups ( $P<0.05$ ). Cell apoptosis was increased ( $P<0.05$ ), cell cycle was blocked at G<sub>1</sub>/S phase ( $P<0.05$ ) and the migration ability was inhibited in MGC803 cells after infected with  $\beta$ -catenin-RNAi lentivirus ( $P<0.05$ ). The expression of Bcl-2, cyclin D1 and MMP-7 proteins was inhibited but the expression of Bax was increased in MGC cells after  $\beta$ -catenin expression was silenced. **Conclusion** The silence of  $\beta$ -catenin gene expression can lead to increasing cell apoptosis, inhibiting cell cycle and migration ability in gastric cancer MGC-803 cells, which are associated with the down-regulation of Bax, Bcl-2, cyclin D1 expression and up-regulation of MMP-7 expression.

**【Key words】** Gastric cancer MGC-803 cell  $\beta$ -catenin Biological behavior

$\beta$ -链蛋白( $\beta$ -catenin)是一种多功能的蛋白质。在正常细胞内, $\beta$ -catenin 多数位于细胞膜,与 E 钙黏蛋白及  $\alpha$ -catenin 一起在细胞间的黏附中发挥关键作用<sup>[1]</sup>。 $\beta$ -catenin 若脱离细胞膜进入细胞质,易被降解,但当

$\beta$ -catenin 在细胞内发生降解异常时, $\beta$ -catenin 会在细胞内堆积,进入细胞核促进下游靶基因的转录,即  $\beta$ -catenin 的另一重要功能-参与 Wnt 信号通路<sup>[2]</sup>。 $\beta$ -catenin 下游靶基因编码许多调节细胞生物学行为的相关蛋白,如 c-Myc、cyclin D1、Bcl-2、Bax、基质金属蛋白酶(MMP)-7 等,即  $\beta$ -catenin 作为转录因子有可能影响细胞增殖、分化、侵袭、转移等多种生物学行为,且有研究发现  $\beta$ -catenin 在多种肿瘤细胞中明显高表达<sup>[3]</sup>。

doi:10.12056/j.issn.1006-2785.2018.40.9.2017-3058

作者单位:310002 杭州市肿瘤医院肿瘤内二科

通信作者:朱建伟,E-mail:309182776@qq.com

基于此,本研究应用干扰慢病毒感染  $\beta$ -catenin 相对高表达的胃癌细胞株 MGC-803,沉默其细胞内  $\beta$ -catenin 表达,而后通过多种实验方法观察  $\beta$ -catenin 表达下调对 MGC-803 细胞增殖、凋亡、侵袭、转移等生物学行为的影响,同时检测沉默  $\beta$ -catenin 表达后的 MGC-803 细胞中 Bcl-2、Bax、cyclin D1 和 MMP-7 等蛋白表达水平的变化,初步探讨  $\beta$ -catenin 下调影响胃癌 MGC-803 细胞生物学行为可能的作用机制,现报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 细胞与主要试剂** MGC-803 细胞株购自上海博谷生物科技有限公司。 $\beta$ -catenin-RNAi 慢病毒液、 $\beta$ -catenin-Neg 慢病毒液购于上海吉玛公司;凋亡检测 Annexin V-PE/7-AAD 试剂盒、细胞周期碘化丙啶(PI)染色试剂盒购于南京凯基生物有限公司;Matrigel 胶购于美国 BD 公司;兔抗人  $\beta$ -catenin 单克隆抗体购于美国 Santan Cruz 公司;鼠抗人  $\beta$ -actin、羊抗鼠 IgG-HRP、羊抗兔 IgG-HRP 单克隆抗体均购于中杉金桥公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验分组** 分别将购买的  $\beta$ -catenin-RNAi 慢病毒及  $\beta$ -catenin-Neg 慢病毒感染 MGC-803 细胞,实验分组:实验组(感染  $\beta$ -catenin-RNAi 慢病毒的 MGC-803-RNAi 细胞)、阴性对照组(感染空载慢病毒的 MGC-803-Neg 细胞)、空白对照组(未处理的 MGC-803 细胞)。

**1.2.2 病毒感染与细胞培养** 根据预实验得知该病毒对 MGC-803 细胞的感染复数约为 100,将 MGC-803 细胞接种于 6 孔板,待细胞贴壁后实验组与阴性对照组细胞分别滴加相应慢病毒液,空白对照组加等体积培养基。24h 后换液,3d 后荧光倒置显微镜下观察细胞荧光染色情况。感染效率=带绿色荧光细胞数/总细胞数 $\times$ 100%。

**1.2.3 Western blot 检测细胞  $\beta$ -catenin、Bcl-2、Bax、cyclin D1 及 MMP-7 表达水平** 用蛋白提取试剂盒提取各组细胞内的总蛋白,分别取 20 $\mu$ l 进行聚丙烯酰胺电泳,结束后目的蛋白条带转移至硝酸纤维素(NC)膜,5%的脱脂奶粉封闭 1h,一抗(1:1 000)4 $^{\circ}$ C 封闭过夜,二抗(1:2 500)室温封闭 1h。暗室内用发光液进行曝光、显影、定影,得到目的蛋白条带的胶片,用 Image J 软件检测各组细胞  $\beta$ -catenin、Bcl-2、Bax、cyclin D1 及 MMP-7 相对表达水平。实验重复 3 次取平均值。

**1.2.4 Annexin-V-PE/7-AAD 双染流式细胞术检测各组细胞凋亡率** 将各组细胞分别接种于 6cm 培养皿常

规培养。待细胞长至约 80%~90%融合度时收集细胞,PBS 洗涤 2 次,加入 500  $\mu$ l 的 Binding Buffer 悬浮细胞,加入 1  $\mu$ l Annexin V-PE 染液,室温、避光、反应 15min,加入 5  $\mu$ l 7-AAD 染液,室温、避光、反应 15min。过 300 目尼龙网后 1h 内进行流式细胞术检测细胞凋亡率。实验重复 3 次取平均值。

**1.2.5 PI 单染流式细胞术检测各组细胞周期** 取各组细胞分别接种于 6cm 培养皿常规培养,待细胞长至约 80%~90%融合度时收取细胞,每组细胞取约  $1\times 10^5$  个。用 PBS 清洗 2 次后用预冷的 75%乙醇溶液 1ml 重悬细胞沉淀,4 $^{\circ}$ C 固定过夜。第 2 天 1 000r/min 离心 5min 后去固定液,PBS 清洗 2 次,加入 100 $\mu$ l 的 RNase A 重悬细胞沉淀,置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅内 30 min,加入 PI 染料 400 $\mu$ l,4 $^{\circ}$ C 避光染色 30min。过 300 目尼龙网后,流式细胞术检测细胞周期。实验重复 3 次取平均值。

**1.2.6 Transwell 法检测细胞的侵袭能力** 将融好的 Matrigel 胶与含 10%BSA 的 1640 培养基按体积比 1:6 混合,后取 50 $\mu$ l 平铺于小室的上室面。收集各组细胞,PBS 清洗 2 次,用完全培养基稀释成  $1\times 10^5$  /ml 的细胞悬液。小室的下室面各加入含 10% FBS 的 1640 完全培养基 500 $\mu$ l,上室面加入 200 $\mu$ l 各组细胞悬液,培养 24h 后取出小室,擦拭上室面未穿膜的细胞后结晶紫染色,显微镜下计数穿膜细胞数分析细胞侵袭能力。实验重复 3 次取平均值。

**1.3 观察指标** 观察并比较 MGC-803、MGC-803-Neg、MGC-803-RNAi 细胞荧光染色情况、 $\beta$ -catenin 表达水平、细胞凋亡率、细胞周期、侵袭能力,以及 Bcl-2、Bax、cyclin D1、MMP-7 蛋白表达水平。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS 17.0 统计软件;计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,3 组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验; $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 MGC-803、MGC-803-Neg、MGC-803-RNAi 细胞荧光染色情况比较** 感染 4d 后,荧光显微镜下可见 MGC-803-Neg、MGC-803-RNAi 细胞显示强绿色荧光,且带绿色荧光的细胞数占总细胞数比例均超过 80%,而 MGC-803 细胞无绿色荧光,即 MGC-803-Neg、MGC-803-RNAi 细胞慢病毒感染效率 $>80\%$ 。MGC-803-RNAi 细胞荧光染色情况见图 1(插页)。

**2.2 MGC-803、MGC-803-Neg、MGC-803-RNAi 细胞  $\beta$ -catenin 表达水平比较** MGC-803、MGC-803-Neg、MGC-803-RNAi 细胞  $\beta$ -catenin 相对表达水平分别为

0.8725±0.0110、0.8593±0.0074、0.4220±0.0164,3组比较差异有统计学意义( $P>0.05$ ),MGC-803-RNAi细胞 $\beta$ -catenin表达水平较MGC-803、MGC-803-Neg细胞下调(均 $P<0.05$ ),而MGC-803-Neg细胞与MGC-803细胞间比较无统计学差异( $P>0.05$ )。MGC-803、MGC-803-Neg、MGC-803-RNAi细胞 $\beta$ -catenin蛋白电泳图比较见图2。

2.3 MGC-803、MGC-803-Neg、MGC-803-RNAi细胞凋亡率比较 MGC-803、MGC-803-Neg、MGC-803-RNAi细胞凋亡率分别为(1.20±0.26)%、(1.35±0.35)%、(8.52±0.82)% ,3组比较差异有统计学意义( $P>0.05$ ),MGC-803-RNAi细胞凋亡率高于MGC-803、MGC-803-Neg细胞(均 $P<0.05$ ),而MGC-803-Neg细胞与

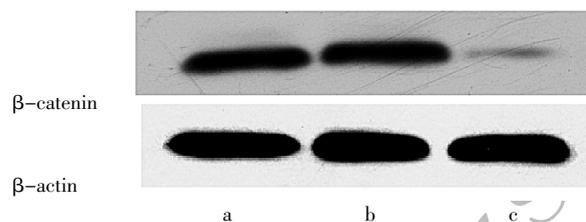


图2 MGC-803、MGC-803-Neg、MGC-803-RNAi细胞 $\beta$ -catenin蛋白电泳图比较(a:MGC-803细胞;b:MGC-803-Neg细胞;c:MGC-803-RNAi细胞)

MGC-803细胞间比较无统计学差异( $P>0.05$ )。流式细胞术检测MGC-803、MGC-803-Neg、MGC-803-RNAi细胞凋亡率比较见图3。

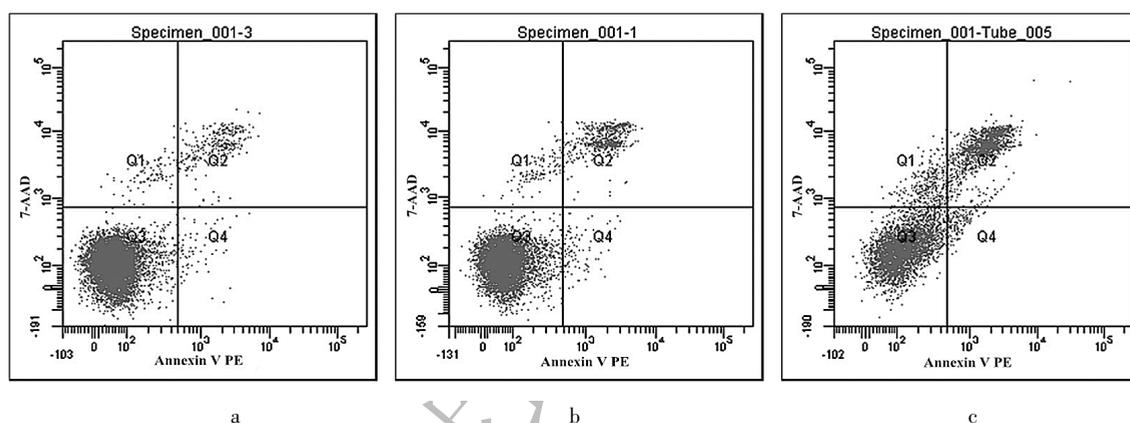


图3 MGC-803、MGC-803-Neg、MGC-803-RNAi细胞凋亡率比较(a:MGC-803细胞;b:MGC-803-Neg细胞;c:MGC-803-RNAi细胞)

2.4 MGC-803、MGC-803-Neg、MGC-803-RNAi细胞周期比较以S/G<sub>1</sub>期细胞比例为观察指标,MGC-803、MGC-803-Neg、MGC-803-RNAi细胞分别为(1.11±0.05)%、(1.09±0.10)%、(0.78±0.08)% ,3组比较差异有统计学意义( $P>0.05$ ),MGC-803-RNAi细胞S/G<sub>1</sub>期比例低于MGC-803、MGC-803-Neg细胞(均 $P<0.05$ ),而MGC-803-Neg细胞与MGC-803细胞间比较无统计学差异( $P>0.05$ )。流式细胞术检测MGC-803、MGC-803-Neg、MGC-803-RNAi细胞周期结果比较见图4(插页)。

2.5 MGC-803、MGC-803-Neg、MGC-803-RNAi细胞侵袭能力比较 MGC-803、MGC-803-Neg、MGC-803-RNAi细胞穿膜染色数分别为(109.80±5.36)、(104.40±7.47)、(54.00±6.28)个,3组比较差异有统计学意义( $P>0.05$ ),MGC-803-RNAi细胞侵袭能力低于MGC-803、MGC-803-Neg细胞(均 $P<0.05$ ),而MGC-803-Neg细胞与MGC-803细胞间比较无统计学差异( $P>0.05$ )。Transwell法检测MGC-803、MGC-803-Neg、MGC-803-

RNAi细胞侵袭能力实验结果见图5(插页)。

2.6 MGC-803、MGC-803-Neg、MGC-803-RNAi细胞Bcl-2、Bax、cyclin D1及MMP-7蛋白表达水平比较 MGC-803、MGC-803-Neg、MGC-803-RNAi细胞Bcl-2、Bax、cyclin D1及MMP-7蛋白表达水平比较差异均有统计学意义(均 $P>0.05$ ),MGC-803-RNAi细胞Bcl-2、cyclin D1、MMP-7蛋白表达水平均低于MGC-803、MGC-803-Neg细胞(均 $P<0.05$ ),Bax蛋白表达水平高于MGC-803、MGC-803-Neg细胞(均 $P<0.05$ ),而MGC-803-Neg细胞与MGC-803细胞间比较无统计学差异( $P>0.05$ )。MGC-803、MGC-803-Neg、MGC-803-RNAi细胞Bcl-2、Bax、cyclin D1及MMP-7蛋白电泳图比较见图6。

### 3 讨论

$\beta$ -catenin是一种多功能、进化保守的蛋白质分子,在多细胞生物的胚胎发育及机体稳态中发挥至关重要

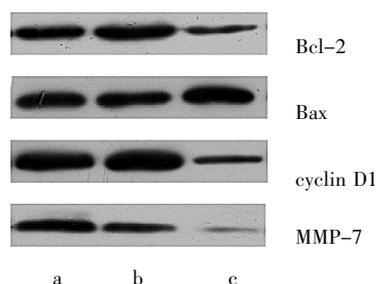


图 6 MGC-803、MGC-803-Neg、MGC-803-RNAi 细胞 Bcl-2、Bax、cyclin D1 及 MMP-7 蛋白电泳图比较(a:MGC-803 细胞;b:MGC-803-Neg 细胞;c:MGC-803-RNAi 细胞)

的作用。研究发现,在肿瘤的发生、发展过程中,一方面  $\beta$ -catenin 作为一种转录活化因子,能介导多种原癌基因与细胞周期调控基因的转录翻译,促进细胞增殖、侵袭及转移,抑制细胞分化、凋亡,还能诱导肿瘤耐药,另一方面,肿瘤细胞中  $\beta$ -catenin 在细胞质内的异常定位导致细胞膜上  $\beta$ -catenin 含量下降,易使癌细胞间黏附功能下降,致肿瘤细胞更易于脱离原发部位而发生远处转移<sup>[3]</sup>。 $\beta$ -catenin 参与调控上述生物学行为的靶基因编码蛋白包含 c-Myc、cyclin D1、Bcl-2、Bax、MMP-7、P-gp 等<sup>[3]</sup>。本研究选取  $\beta$ -catenin 相对高表达的胃癌 MGC-803 细胞进行实验,通过干扰慢病毒感染 MGC-803 细胞,经感染成功的 MGC-803 细胞在荧光显微镜下有明显的荧光显示;并通过 Western blot 法证实 MGC-803-RNAi 细胞  $\beta$ -catenin 表达水平明显下调。本研究再将此稳定穿代的 3 株细胞(MGC-803-RNAi、MGC-803-Neg 及 MGC-803 细胞)进行后续实验,以了解  $\beta$ -catenin 表达下调对 MGC-803 细胞生物学行为的影响及其可能的作用机制。

本研究采用 Annexin-V-PE/7-AAD 双染流式细胞术证实  $\beta$ -catenin 表达的下调可促进 MGC-803 细胞凋亡。这与在肠癌细胞中得到的结果一致<sup>[4]</sup>。细胞凋亡过程主要受 Bcl-2 蛋白家族所调控,其中最具代表性的为 Bax 及 Bcl-2 蛋白,Bax 促进细胞凋亡,而 Bcl-2 抑制细胞凋亡<sup>[5]</sup>。本研究检测到沉默  $\beta$ -catenin 表达之后的 MGC-803-RNAi 细胞 Bcl-2 表达水平明显下调,而 Bax 表达水平则相对上调,结果同预期。笔者推测, $\beta$ -catenin 表达异常对 MGC-803 细胞凋亡的影响,其机制与影响 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路下游靶蛋白 Bax 及 Bcl-2 的表达有关。cyclin 是一类在细胞周期中发挥关键调节作用的蛋白,其中 cyclin D1 能调细胞周期由 G<sub>1</sub> 期顺利进入到 S 期<sup>[6]</sup>。本研究干扰 MGC-803 细胞  $\beta$ -catenin 的表达后发现 MGC-803-RNAi 细胞 cyclin D1 表达水平也下

调,且出现明显的 G<sub>1</sub> 期阻滞,细胞增殖减弱。这与 Shtutman 等<sup>[7]</sup>研究结果相符。笔者推论,沉默  $\beta$ -catenin 表达使 MGC-803 细胞阻滞在 G<sub>1</sub> 期,其作用机制与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路下游靶蛋白 cyclin D1 表达下调有关。

胃癌细胞转移是胃癌患者治疗失败的主要原因。 $\beta$ -catenin 作为细胞黏附中的关键因子,当其在细胞膜中减少时,细胞间黏附功能下降,导致肿瘤细胞易脱离原发部位。但是游离出来的肿瘤细胞要在细胞间质中进行迁徙,必须能够分解细胞外基质。在细胞外基质的众酶中,MMP 起着关键的作用<sup>[8]</sup>。研究显示,MMP 家族蛋白酶的表达受 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路调控,其中 MMP-7 蛋白与肿瘤关系最密切,MMP-7 普遍被发现在肿瘤组织及细胞中明显高表达,且 MMP-7 在相对晚期的胃癌组织中阳性率明显高于相对早期的胃癌组织<sup>[9]</sup>。本研究通过 Transwell 实验方法发现,沉默  $\beta$ -catenin 表达之后,MGC-803-RNAi 细胞的侵袭力显著下降,且 MGC-803-RNAi 细胞内 MMP-7 的表达水平也明显下降。因此推论  $\beta$ -catenin 沉默抑制 MGC-803 细胞侵袭能力与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路下游靶蛋白 MMP-7 表达水平下调有关。这一结果与在肠癌、食管癌中的研究相似<sup>[10]</sup>。

综上所述,本研究结果显示, $\beta$ -catenin 表达下调可影响胃癌 MGC-803 细胞的增殖、凋亡、侵袭等多种生物学行为,其作用机制可能与影响 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路下游多种靶蛋白表达有关。

#### 4 参考文献

- [1] Archbold HC, Yang YX, Chen L, et al. How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J]. Acta Physiologica, 2012, 204(1):74.
- [2] Hecht A, Litterst CM, Huber O, et al. Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the 1'ATA-binding protein in vitro[J]. J Biol Chem, 1999, 274(25):18017-18025.
- [3] Polakis P. Wnt signaling and cancer[J]. Genes & Development, 2000, 14(15): 1837-1851.
- [4] Lu W, Jia G, Meng X, et al. Beta-catenin mediates the apoptosis induction effect of celastrol in HT29 cells[J]. Life sciences, 2012, 91(7): 279-283.
- [5] Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways[J]. Biochemical Society Transactions, 2001, 29(2): 345-349.
- [6] Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family[J]. Journal of cell science, 2009, 122(4): 437-441.

(下转第 918 页)