

eIF4E 在 CXCL12 诱导的胃癌转移中的作用和机制

吴丹丹,倪 萍,孙 更,何文萍,翟溯澜,李 萍,邹美娟,王雪融

(南京医科大学基础医学院药理学系,江苏 南京 210029)

[摘要] 探讨 eIF4E 在 CXCL12 诱导胃癌细胞形态学改变和迁移中的作用和机制. 在胃癌细胞株 (SGC7901, MGC803) 上给予 CXCL12 处理,显微镜下观察细胞形态的改变;通过 transwell 实验检测 CXCL12 对胃癌细胞迁移能力的影响;在 SGC7901 上给予 CXCL12 处理,用 Western blot 检测 eIF4E 磷酸化和总蛋白水平的变化;用脂质体转染 eIF4E 的小干扰 RNA,检测 eIF4E 对胃癌细胞形态学和迁移的影响;以及用 qRT-PCR 检测与肿瘤侵袭转移密切相关的因子 MMP9 的 mRNA 水平的表达. 结果显示,给予 CXCL12 处理,胃癌细胞形态由上皮表型向长梭形的间叶样表型转变,细胞的迁移能力提高. 在相同浓度的 CXCL12 处理情况下,转染 eIF4E siRNA 抑制 eIF4E 的表达,可抑制 CXCL12 诱导的细胞的形态学改变和迁移能力. 另外, CXCL12 引起与肿瘤转移密切相关因子 MMP9 的 mRNA 水平的表达升高,而用 siRNA 抑制 eIF4E 的表达,可下调 MMP9 的 mRNA 表达水平. 结论: CXCL12 激活了 eIF4E,阻抑 eIF4E 的表达抑制 CXCL12 诱导的形态学改变和细胞迁移,其作用机制可能与上调 MMP9 的表达有关.

[关键词] CXCL12, eIF4E, 形态学改变, 迁移, 胃癌, MMP9

[中图分类号] R739.91 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2015)02-0093-05

eIF4E Promotes CXCL12 Induced Metastasis of Gastric Cancer

Wu Dandan, Ni Ping, Sun Geng, He Wenping, Zhai Sulan, Li Ping, Zou Meijuan, Wang Xuerong

(Department of Pharmacology, School of Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract: To study of eIF4E in CXCL12 induced morphological changes and migration mechanism in gastric cancer cells. In gastric cancer cell lines (SGC7901, MGC803), cell morphological changes with CXCL12 treatment were observed under microscopy. The effect of CXCL12 on gastric cancer cell migration was determined by transwell assay. Western blot analysis was used to detect the eIF4E phosphorylation and total protein levels in SGC7901 treated with CXCL12. MMP9 mRNA expression was determined by qRT-PCR assay. Results show that, CXCL12 induced gastric cancer cells from epithelial morphology to mesenchymal morphology as well as increased migration. Morphological changes and migratory capacity induced by CXCL12 were inhibited by eIF4E siRNA transfection in SGC7901 cells. In addition, CXCL12 induced upregulation of MMP9 mRNA level. Conclusion: eIF4E is involved in CXCL12 induced the morphological changes and cell migration of gastric cancer cells possibility through upregulation of MMP9.

Key words: CXCL12, eIF4E, morphological changes, migration, gastric cancer, MMP9

胃癌是世界上第五个最常见的恶性肿瘤,超过 70%的病例发生在发展中国家,其中 50%发生在东亚(主要是中国),它是导致死亡的第三大癌症^[1]. 近年来,尽管世界范围内胃癌的发病率和死亡率有所下降,但是由于多数患者确诊时已处于晚期和缺乏有效的治疗,其 5 年存活率仍然很低^[2,3]. 了解分子机制是胃癌早期诊断和治疗的关键,因此迫切需要识别在胃癌发生发展中起着重要作用的关键分子.

CXCL12 (C-X-C chemokine ligand 12) 又称基质细胞源性因子-1 (stromal cell-derived factor 1, SDF-1), 属于 CXC 类趋化因子亚家族成员. CXCL12 与其受体在包括多种肿瘤的生长、侵袭、转移中发挥重要作用^[4-7], 并且发现胃癌腹水中转移的癌细胞 CXCL12 高表达^[8]. CXCL12 与其受体结合通过何种方式作用于肿瘤细胞,促进肿瘤细胞侵袭转移,目前在胃癌研究中少见报道. 故研究 CXCL12 通过调节下游哪些关

收稿日期: 2014-12-15.

基金项目: 国家自然科学基金 (81473241、81102458、811172004)、基础医学院优势学科、校引进人才启动基金.

通讯联系人: 王雪融, 博士, 教授, 研究方向: 肿瘤药理. E-mail: wangxrwn@hotmail.com

键分子完成信号转导显得尤为重要。

真核翻译起始因子4E(Eukaryotic translation initiation factor 4E, eIF4E)是真核生物蛋白质合成翻译起始步骤中生成翻译起始复合物的必需因子,可以与mRNA 5'端帽子结构结合,是真核生物蛋白质合成翻译起始的限速因子^[9,10]。同时,eIF4E是一种原癌基因,它在恶性肿瘤中高表达,并且与包括胃癌在内的多种肿瘤的发生、浸润和转移密切相关^[11,12]。

本文首先研究了CXCL12对胃癌细胞形态学改变和迁移的影响,接着证明CXCL12是否通过eIF4E诱导胃癌细胞的转移,并研究了与肿瘤转移密切相关因子MMP9在CXCL12诱导下的变化以及eIF4E对它的调控。探讨侵袭转移的可能分子机制,为药物的靶向治疗提供有效依据。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

SDF-1 α /CXCL12(350-NS-010)购自美国R&D公司;eIF4E siRNA购自上海吉玛公司;LipofectamineTM 2000购自美国Invitrogen;transwell小室购自美国Millipore公司。细胞培养箱为Thermo Queue Q2711型;超净工作台(bio-X)为新加坡ESCO公司产品;显微镜(IX-51)为日本Olympus公司产品;蛋白电泳、电转装置(9204355 Rev A)为美国Bio-Rad公司产品。

1.2 细胞培养

人胃癌细胞株(SGC7901中分化腺癌,MGC803低分化粘液腺癌)均来源于上海生命科学研究院,细胞都使用RPMI1640,培养基的胎牛血清含量均为5%。置于CO₂孵箱,37℃、5% CO₂条件下培养,细胞生长融合度达80%~90%时,用0.25%胰酶消化传代,3 d传一代。

1.3 肿瘤细胞迁移实验

按transwell小室说明书操作,细胞消化重悬于无血清培养基,并以 5×10^4 密度接种于24孔板transwell上室(体积为0.4 mL),下室中加入0.6 mL分别含0.5% FBS培养基和加入100 ng/mL CXCL12的0.5% FBS的培养基。继续培养24 h后,取出小室,PBS洗3次,用棉签擦去小室上侧的细胞,干燥后用甲醇固定20 min,晾干后0.1%结晶紫染色20 min,在光镜下观察穿过滤膜位于膜下侧的(发生迁移的细胞)细胞数并拍照。

1.4 Western blot 检测蛋白表达

细胞提取总蛋白,考马斯亮蓝法测蛋白浓度,SDS-PAGE电泳,恒定电压150 V,转膜(PVDF膜)3 h,5%脱脂牛奶封闭1.5 h。一抗37℃孵育2 h,再4℃平摇过夜,次日,待一抗孵育结束后把膜用PBST洗涤3次,每次10 min,后孵育二抗,室温孵育2 h。二抗孵育结束后,PVDF膜用PBST洗涤3次,每次10 min。ECL发光和显影。具体方法见文献[13]。

1.5 定量反转录PCR(Quantitative reverse transcriptional PCR, qRT-PCR)检测 mRNA 水平的表达

细胞接种于6孔板,加入400 μ L Trizol,提取总RNA并进行逆转录,具体方法见文献[13]。用SYBR Green 荧光染料进行靶基因相对定量检测。引物序列参照文献设计^[14,15],序列如下:eIF4E F:5'-CCTACA-GAACAGATGGGCACTC-3'; R: 5'-GCCCAAAAGTCTTCAACAGTATCA-3'。反应条件:50℃ 2 min; 95℃ 10 min; 95℃ 15 s; 60℃ 1 min,共40个循环。

1.6 细胞 siRNA 瞬时转染实验

转染前一天将细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于6孔板(用无抗生素的完全培养基),待细胞融合度达80%~90%时按LipofectamineTM 2000说明书进行转染。4 h~6 h后换正常培养液。转染24 h后将细胞消化后进行肿瘤细胞迁移实验或再接种于培养皿中进行培养,转染48 h后提取细胞内总蛋白,采用western blot的方法进行蛋白水平的表达。

1.7 统计学分析

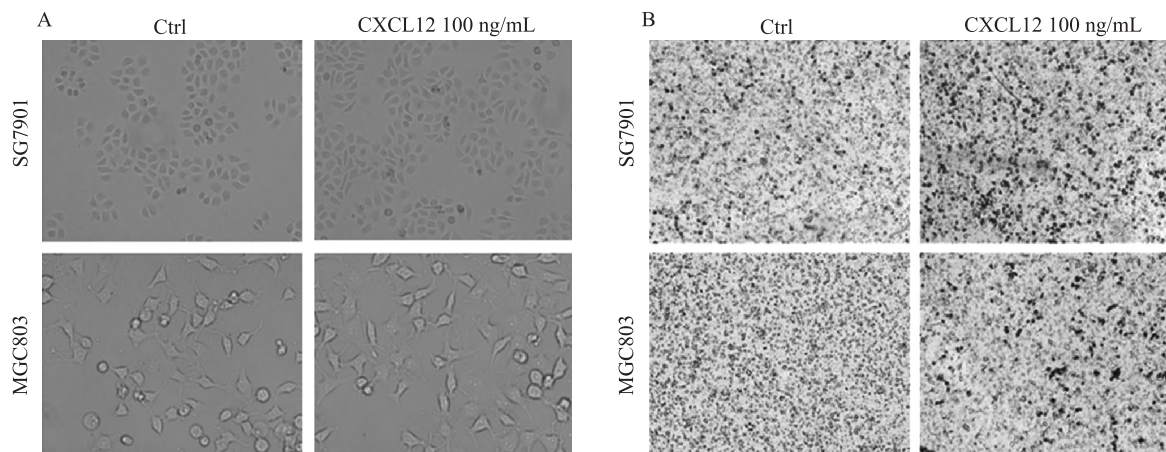
数据均采用GraphPadInStat 3统计软件进行统计。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CXCL12 诱导胃癌细胞形态改变和迁移

我们发现在SGC7901和MGC803细胞上给予CXCL12 100 ng/mL处理24 h,细胞形态向长梭形发展,提

示胃癌细胞形态由上皮表型向间叶样表型转变,细胞的迁移能力提高(图 1A). 在 SGC7901 和 MGC803 细胞上的 transwell 实验均发现 CXCL12 诱导细胞迁移到有微孔膜的另一侧的细胞数增多(图 1B),提示 CXCL12 诱导胃癌细胞迁移. 上述结果提示 CXCL12 可能促进了胃癌细胞的侵袭转移,这与已有的研究报道一致^[16,17].



A, 细胞贴壁后饥饿处理 18 h,再给予 CXCL12 100 ng/mL 处理 24 h. B, 细胞重悬于无血清培养基,并以 5×10^4 密度接种于 24 孔板 transwell 上室(体积为 0.4 mL),下室中加入 0.6 mL 分别含 0.5% FBS 培养基和加入 100 ng/mL CXCL12 的 0.5% FBS 的培养基,继续培养 24 h 后固定,染色

图 1 CXCL12 诱导胃癌细胞形态改变和迁移

Fig. 1 CXCL12 induced morphological changes and migratory capacity of gastric cancer cells

2.2 CXCL12 激活 eIF4E

已有报道称 CXCL12 与其受体结合激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路^[17,18],同时 mTOR 依次调节下游多个信号分子,4E-BP1 是已知的 mTORC1 的底物. 4E-BP1 通过调节信号分子 eIF4E 来完成生物功能,然而 CXCL12 与其受体结合后是否通过 PI3K/AKT/mTOR 调节 4E-BP1 及下游信号分子 eIF4E 来诱导胃癌细胞转移报道较少. 因此,我们在 SGC7901 细胞上,给予 CXCL12 100 ng/mL,处理 0 min、15 min、30 min 和 60 min,检测了 p-eIF4E (S209) 的表达,发现 p-eIF4E 蛋白水平明显增高(图 2),这与预期的结果一致,并在大约 30 min 时达高峰. 结果提示, CXCL12 激活 eIF4E.

2.3 阻抑 eIF4E 的表达抑制 CXCL12 诱导的胃癌细胞形态改变和细胞迁移

上述结果提示 CXCL12 可能通过调节 eIF4E 诱导胃癌细胞转移. 为了进一步证明这一推论,我们通过下调 eIF4E 的表达,研究其对细胞形态和迁移的影响. 我们在 SGC7901 细胞瞬时转染 eIF4E siRNA 和对照 siRNA,再分别给予 CXCL12 100 ng/mL 处理 24 h,结果显示,转染 eIF4E siRNA 组和对照组相比,eIF4E 的蛋白水平表达明显降低(图 3(a)),降低了约 90%,说明阻抑较为成功. 在转染对照 siRNA 组并给予 CXCL12 处理后可上调 p-eIF4E 的蛋白水平(图 3(a)),与之前短时处理实验结果一致(图 2). 在给予 CXCL12 100 ng/mL 处理 24 h,显微镜下观察发现,转染 eIF4E siRNA 组和对照组相比,阻抑 eIF4E 的表达可以抑制 CXCL12 诱导的胃癌细胞形态向长梭形改变(图 3(b)). Transwell 实验结果发现,eIF4E siRNA 组减少了 CXCL12 诱导细胞迁移到有微孔膜的另一侧的细胞数目(图 3(c)).

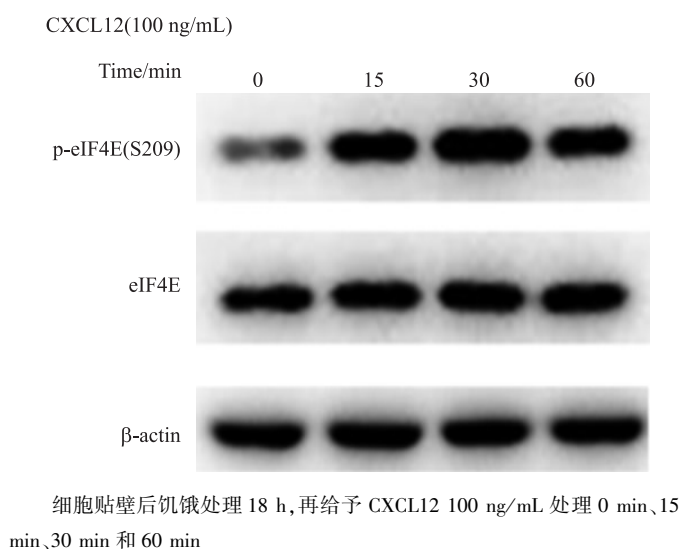
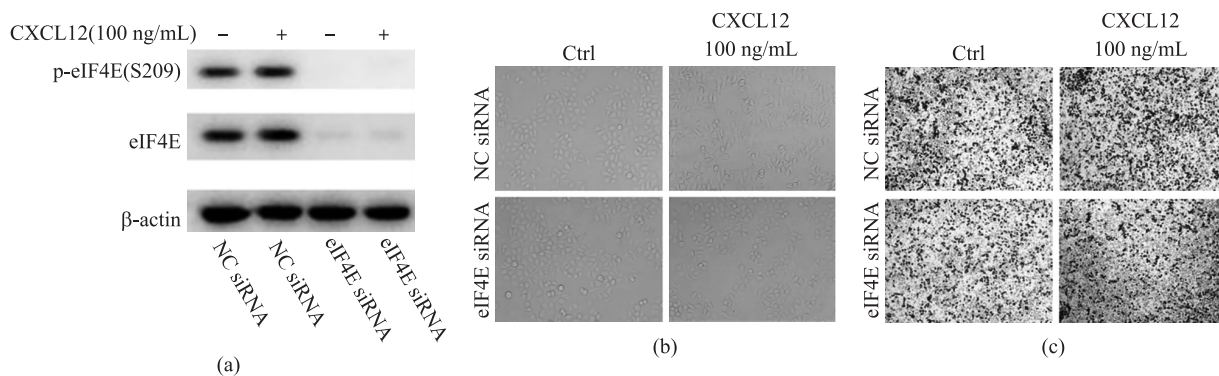


图 2 CXCL12 激活 eIF4E

Fig. 2 CXCL12 induced activation of eIF4E in gastric cancer cells



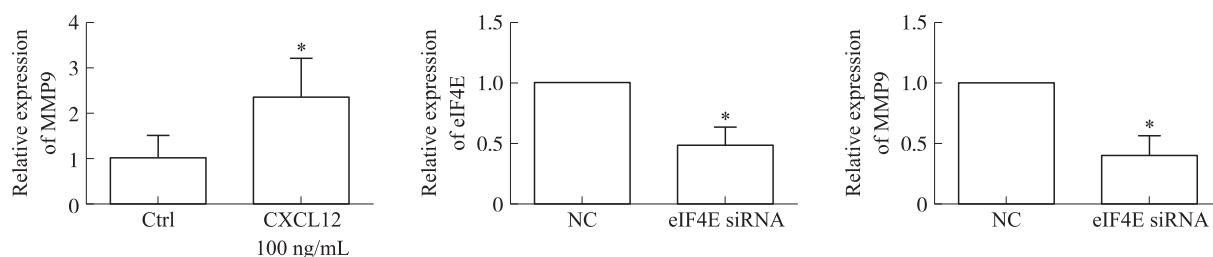
(a) 接种细胞的第二天转染,6 h 后换回 5% FBS 培养基培养 24 h,饥饿处理 18 h,再给予 CXCL12 100 ng/mL 处理 24 h。(b) SGC7901 细胞贴壁后饥饿处理 18 h,再给予 CXCL12 100 ng/mL 处理。(c) SGC7901 细胞重悬于无血清培养基,并以 5×10^4 密度接种于 24 孔板 transwell 上室(体积为 0.4 mL),下室中加入 0.6 mL 分别含 0.5% FBS 培养基和加入 100 ng/mL CXCL12 的 0.5% FBS 的培养基,继续培养 24 h 后固定,染色

图 3 阻抑 eIF4E 的表达抑制 CXCL12 诱导的胃癌细胞形态改变和细胞迁移

Fig. 3 Knockdown of eIF4E expression inhibited the CXCL12 induced morphological changes and migratory capacity of gastric cancer cells

2.4 CXCL12 通过激活 eIF4E 上调 MMP9 的 mRNA 水平诱导胃癌细胞的转移

MMP9 是 MMPs 中的水解细胞外基质(ECM)重要的蛋白水解酶,与胃癌浸润、转移密切相关^[19]。我们发现在 SGC7901 细胞上,给予 CXCL12 100 ng/mL 处理,检测到 MMP9 的 mRNA 水平增高(图 4(a))。在 MGC803 细胞瞬时转染 eIF4E 的 siRNA 后,qRT-PCR 检测到 eIF4E 的 mRNA 水平降低了约 50%(图 4(b))。而且与转染对照 siRNA 组相比,MMP9 的 mRNA 水平明显降低(图 4(b))。结果提示 CXCL12 可能通过激活 eIF4E 上调了 MMP9 的表达,诱导胃癌细胞的转移侵袭。



(a) CXCL12 上调 MMP9 的 mRNA 水平。SGC7901 细胞贴壁后饥饿处理 18 h,再给予 CXCL12 100 ng/mL 处理 6 h,qRT-PCR 检测 MMP9 的 mRNA 水平,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。(b) 接种 MGC803 细胞的第二天转染,6 h 后换回 5%FBS 培养基培养 48 h,qRT-PCR 检测 MMP9 和 eIF4E 的 mRNA 水平,差异具有统计学意义($P < 0.05$)

图 4 CXCL12 上调 MMP9 的表达,阻抑 eIF4E 下调 MMP9 的表达

Fig. 4 CXCL12 induced upregulation of MMP9 mRNA level and knockdown of eIF4E expression inhibited MMP9 mRNA level

3 讨论

研究表明,趋化因子及其受体在肿瘤的发生及发展中具有重要的作用,肿瘤组织局部的趋化因子网络直接影响肿瘤细胞的生长、浸润转移及血管生成^[20]。趋化因子 CXCL12 有受体 CXCR4 和 CXCR7, CXCL12/CXCR4/CXCR7 生物轴在许多类型的癌症中介导转移,它们可以作为肿瘤行为的标记物^[5],因此研究 CXCL12 促进肿瘤发生发展的作用机制至关重要,为肿瘤的治疗提供有力依据。我们的研究首先证明了 CXCL12 诱导胃癌细胞转移,这与其他研究者的报道一致。接着我们证明了 CXCL12 通过上调 eIF4E 的磷酸化激活了 eIF4E,诱导了胃癌细胞的转移。

基膜和细胞外基质是肿瘤转移的屏障,因此 MMPs 对它们的降解在肿瘤的侵袭转移中起着重要作用。MMP9 是 MMPs 中的明胶酶类,MMPs 中 ECM 重要的蛋白水解酶在体内参与炎症、血管形成、肿瘤转移等生物学行为,其表达增加与肿瘤侵袭、转移有关^[19]。研究发现 CXCL12 上调了 MMP9 的表达,提示 MMP9 可能介导了 CXCL12 诱导的胃癌细胞的形态学改变和迁移能力的增强。另外,阻抑 eIF4E 的表达也可以下调 MMP9 的表达,提示 eIF4E 参与了 MMP9 的调控。因此,推测 CXCL12 可能通过调节 eIF4E 上调 MMP9

的表达,从而诱导胃癌细胞的迁移侵袭.然而eIF4E上调MMP9表达的分子机制仍不明确,有待进一步研究.

[参考文献]

- [1] International Agency For Research on Cancer. GLOBOCAN 2012: Estimated incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012[EB/OL]. [2014-10-25] <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/stomach-new.asp>.
- [2] Milne A N, Carneiro F, O' Morain C, et al. Nature meets nurture: molecular genetics of gastric cancer[J]. Hum Genet, 2009, 126(5): 615-628.
- [3] Orditura M, De Vita F, Muto P, et al. Adjuvant chemoradiotherapy in patients with stage III or IV radically resected gastric cancer: a pilot study[J]. Arch Surg, 2010, 145(3): 233-238.
- [4] Lee H J, Kim S W, Kim H Y, et al. Chemokine receptor CXCR4 expression, function, and clinical implications in gastric cancer[J]. Int J Oncol, 2009, 34(2): 473-480.
- [5] Sun X, Cheng G, Hao M, et al. CXCL12/CXCR4/CXCR7 chemokine axis and cancer progression[J]. Cancer Metastasis Rev, 2010, 29(4): 709-722.
- [6] Teicher B A, Fricker S P. CXCL12(SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(11): 2 927-2 931.
- [7] Ying J, Xu Q, Zhang G, et al. The expression of CXCL12 and CXCR4 in gastric cancer and their correlation to lymph node metastasis[J]. Med Oncol, 2012, 29(3): 1 716-1 722.
- [8] Yasumoto K, Koizumi K, Kawashima A, et al. Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer[J]. Cancer Res, 2006, 66(4): 2 181-2 187.
- [9] De Benedetti A, Graff J R. eIF4E expression and its role in malignancies and metastases[J]. Oncogene, 2004, 23(18): 3 189-3 199.
- [10] Martineau Y, Azar R, Bousquet C, et al. Anti-oncogenic potential of the eIF4E-binding proteins[J]. Oncogene, 2013, 32(6): 671-677.
- [11] Graff J R, Konicek B W, Carter J H, et al. Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4E for cancer therapy[J]. Cancer Res, 2008, 68(3): 631-634.
- [12] Thumma S C, Kratzke R A. Translational control: a target for cancer therapy[J]. Cancer Lett, 2007, 258(1): 1-8.
- [13] Ma Z, Zhu L, Luo X, et al. Perifosine enhances mTORC1-targeted cancer therapy by activation of GSK3 β in NSCLC cells[J]. Cancer Biol Ther, 2012, 13(11): 1 009-1 017.
- [14] Mathis J M, Williams B J, Sibley D A, et al. Cancer-specific targeting of an adenovirus-delivered herpes simplex virus thymidine kinase suicide gene using translational control[J]. J Gene Med, 2006, 8(9): 1 105-1 120.
- [15] Nowak D E, Tian B, Jamaluddin M, et al. RelA Ser276 phosphorylation is required for activation of a subset of NF-kappaB-dependent genes by recruiting cyclin-dependent kinase 9/cyclin T1 complexes[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(11): 3 623-3 638.
- [16] Chen G, Chen S M, Wang X, et al. Inhibition of chemokine (CXC motif) ligand 12/chemokine (CXC motif) receptor 4 axis (CXCL12/CXCR4)-mediated cell migration by targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway in human gastric carcinoma cells[J]. J Biol Chem, 2012, 287(15): 12 132-12 141.
- [17] Hashimoto I, Koizumi K, Tatematsu M, et al. Blocking on the CXCR4/mTOR signalling pathway induces the anti-metastatic properties and autophagic cell death in peritoneal disseminated gastric cancer cells[J]. Eur J Cancer, 2008, 44(7): 1 022-1 029.
- [18] Monterrubio M, Mellado M, Carrera A C, et al. PI3Kgamma activation by CXCL12 regulates tumor cell adhesion and invasion[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 388(2): 199-204.
- [19] Sampieri C L, de la P S, Ochoa-Lara M, et al. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in human gastric cancer and superficial gastritis[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(12): 1 500-1 505.
- [20] Balkwill F R. The chemokine system and cancer[J]. J Pathol, 2012, 226(2): 148-157.

[责任编辑:黄敏]