

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.28.007
文章编号: 1005-8982 (2017) 28-0036-05

新进展研究 · 论著

SRPX2 在胃癌中的表达及对细胞侵袭的影响

李婷, 彭波

[武汉大学附属同仁医院 (武汉市第三医院) 消化内科, 湖北 武汉 430070]

摘要: **目的** 探讨含 sushi 重复蛋白 X 连锁 2 (SRPX2) 在人胃癌 (GC) 中的表达及对胃癌 MGC-803 细胞侵袭能力的影响。**方法** 收集 2014 年 3 月 1 日-2015 年 3 月 1 日于该院消化内科行手术切除的 45 例胃癌及对应癌旁组织。检测 SRPX2 mRNA 及蛋白在胃癌及癌旁组织中的表达情况, 分析胃癌组织中 SRPX2 蛋白表达对肿瘤临床表型的影响。通过 siRNA 下调胃癌 MGC-803 细胞中 SRPX2 的表达, 通过 Transwell 侵袭小室检测沉默 SRPX2 之后 MGC-803 细胞侵袭能力的变化; 同时检测沉默 SRPX2 后 MGC-803 细胞内基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 表达水平的改变。**结果** SRPX2 在胃癌组织中表达升高, 胃癌组织高表达 SRPX2 与肿瘤淋巴结转移及高 TNM 分期 (Ⅲ + Ⅳ期) 相关 ($P < 0.05$); 沉默 SRPX2 表达可抑制胃癌 MGC-803 细胞的侵袭能力并同时下调了 MGC-803 细胞中 MMP-2 的表达。**结论** 胃癌组织中高表达的 SRPX2 与肿瘤转移表型关系密切, 沉默 SRPX2 可能通过下调 MMP-2 的表达而抑制胃癌细胞侵袭。

关键词: 含 sushi 重复蛋白 X 连锁 2; 胃癌; 表达; 侵袭

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

Expression of SRPX2 in human gastric carcinoma and its role in cell invasion

Ting Li, Bo Peng

[Department of Gastroenterology, Tongren Hospital of Wuhan University
(the Third Wuhan Hospital), Wuhan, Hubei 430070, China]

Abstract: **Objective** To detect the expression of Sushi Repeat Containing Protein X Linked 2 (SRPX2) in human gastric carcinoma (GC) and its role in cell invasion. **Methods** qRT-PCR and immunohistochemistry were applied to detect the expression of SRPX2 in GC ($n = 45$) and matched tumor-adjacent tissues. The correlations between SRPX2 expression and clinical features were analyzed by Pearson chi-square test. siRNA was used to silence the expression of SRPX2 in MGC-803 cells. The effect of SRPX2 on cell invasion was measured by transwell assay. MMP-2 expression was detected after silencing SRPX2 expression. **Results** The expression of SRPX2 was significantly up-regulated in the GC tissues, and the high expression of SRPX2 was associated with the lymphatic metastasis and advanced TNM stages (stage Ⅲ and Ⅳ) ($P < 0.05$). Silencing SRPX2 could inhibit cell invasion and MMP-2 expression in the MGC-803 cells. **Conclusions** The expression of SRPX2 is significantly higher in GC tissues, which is correlated to tumor metastases. Silencing SRPX2 could achieve an anti-cancer role through inhibition of cell invasion.

Keywords: Sushi Repeat Containing Protein X Linked 2; gastric carcinoma; expression; invasion

胃癌 (gastric carcinoma, GC) 是最常见的上消化道恶性肿瘤之一, 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 感染是导致胃癌发生的主要危险因素之一^[1]。由于胃癌早期无特异性表现, 许多患者就诊时已失去根

治性手术机会, 而全身系统化疗及生物靶向治疗对部分患者效果较差^[2]。因而找到新的胃癌标志物及生物治疗靶点对改善我国胃癌治疗现状具有重要意义。

含 sushi 重复蛋白 X 连锁 2 (sushi repeat containing

收稿日期: 2016-12-01

[通信作者] 彭波, E-mail: 1530424244@qq.com

protein x linked 2, SRPX2) 是一种硫酸软骨素蛋白聚糖^[3], 既往研究显示 SRPX2 对细胞黏附^[4]、血管新生^[5]及癫痫发作^[6]中都有重要影响。新近研究^[7]表明 SRPX2 可能参与了肿瘤的发生及进展过程, 但 SRPX2 在胃癌中的表达及其对胃癌细胞侵袭表型的影响尚不清楚。

本研究在胃癌组织中检测了 SRPX2 的表达情况, 并探究 SRPX2 表达与肿瘤临床表型间的相关性。利用基因沉默技术抑制胃癌 MGC-803 细胞中 SRPX2 的表达, 检测下调 SRPX2 后细胞侵袭及细胞内 MMP-2 表达的变化。旨在为 SRPX2 成为胃癌诊断生物学标志物及治疗靶点提供一定的研究依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本研究共收集 2014 年 3 月 1 日-2015 年 3 月 1 日间行手术切除的胃癌及对应癌旁组织 45 对。其中, 男 30 例, 女 15 例; 年龄 41 ~ 69 岁, 中位年龄 51 岁。所有入组患者均签署研究知情同意书。所得标本于 4% 多聚甲醛溶液或液氮中保存。

1.2 试剂

RNA 提取试剂盒及转染试剂 Lipofectamine™ 2000 均购自美国 Invitrogen 公司。逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒 (FastQuant RT Super Mix, KR108), 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 试剂盒 (FastFire qPCR PreMix, SYBR Green) 购自北京天根生化科技有限公司。SRPX2 引物 (正向: 5'-ACTGGATTTGCGGCA TGTGA-3', 反向: 5'-CCATGTTGAAGTAGGAGCGAGT GA-3'), MMP-2 引物 (正向: 5'-AGACATACATCTTTGC TGGAGACA-3', 反向: 5'-CTTGAAGAAGTAGCTGTGA CCG-3') 及 β -actin 引物 (正向: 5'-CTC CATCCTGGC CTCGCTGT-3', 反向: 5'-GCTGTCACCTTCACCGTTC C-3') 由上海生工生物科技有限公司合成。SP 免疫组织化学检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司, SRPX2 特异性 siRNA 及阴性对照 (negative control, NC) siRNA、兔抗人 SRPX2 多克隆抗体、兔抗人 MMP-2 多克隆抗体和小鼠抗人 β -actin 单克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司, 人胃癌 MGC-803 细胞由本院实验室保存, Transwell 小室购自美国康宁公司, 基质胶购自美国 BD 公司, 胎牛血清 (fetal bovine

serum, FBS) 及 DMEM 液体细胞培养基购自美国 Gibco 公司。

1.3 方法

1.3.1 qRT-PCR 按试剂说明书采用氯仿-苯酚抽提法提取胃癌、癌旁组织及 MGC-803 细胞总 RNA。定量 500 ng 细胞总 RNA, 按逆转录说明书配置逆转录体系, 42 °C 孵育 15 min 后 95 °C 孵育 30 min 合成 cDNA。取 2 μ l cDNA 为模板, 按说明书配制 qPCR 反应体系, 使用 Bio-Rad Real-time PCR 扩增仪进行 PCR 扩增 SRPX2 及 β -actin。以 β -actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 SRPX2 mRNA 的相对表达量。

1.3.2 免疫组织化学染色 石蜡包埋的组织切片首先脱蜡、水化, 进而行高压抗原修复。通过 3% 双氧水灭活内源性氧化酶, 10% 山羊血清封闭非特异性位点结合; 以 1 $\times$ PBS 溶液配制 1 : 100 兔抗人 SRPX2 抗体工作液充分覆盖组织切片; 4 °C 摇晃孵育过夜后洗净未结合之一抗, 滴加生物素标记的山羊抗兔二抗; 洗去多余二抗后滴加辣根过氧化物酶-链酶卵白素复合物进行结合反应后使用 DAB 进行显色。每张切片在 $\times 400$ 放大下随机选取 10 个视野观察阳性表达细胞数量, 按 0 分 <5%, 1 分 6% ~ 25%, 2 分 26% ~ 50%, 3 分 51% ~ 75% 及 4 分 >75% 的方法计分^[8]。以每张切片的平均得分为最终得分。

1.3.3 siRNA 转染 MGC-803 细胞在含 10% FBS 的 1 $\times$ DMEM 培养基中培养至稳定传代 2 ~ 3 代。按过夜增殖至愈合度达 70% 之密度接种 6 孔细胞培养板。达到预定培养密度后移除培养基, 1 $\times$ PBS 溶液充分洗涤细胞。转染分组: SRPX2 组每孔加入 200 pmol SRPX2 siRNA 及 5 μ l 转染试剂, 对照组每孔加入 200 pmol NC siRNA 及 5 μ l 转染试剂。以无血清 DMEM 培养基调整终体积至每孔 2 ml。培养 6 h 后, 更换含血清培养基继续培养。

1.3.4 Western blot 检测 提取转染 72 h 后的 MGC-803 细胞总蛋白。SDS-PAGE 胶垂直电泳分离蛋白, 采用 BIO-RAD 湿转系统, 70 V 恒压转膜 150 min, 5% BSA 室温封闭 1 h; 以 1 : 1 000 稀释的 SRPX2 抗体、MMP-2 抗体及 β -actin 抗体 4 °C 下孵育相应条带过夜。洗去残余一抗后采用 1 : 5 000 稀释的 HRP 标记山羊抗兔或抗鼠二抗室温孵育条带 1 h。于暗室内, ECL 法发光观察蛋白表达。

1.3.5 Transwell 侵袭小室检测 按 1 : 8 比例采

用 DMEM 培养液稀释基质胶后, 每孔 $100\mu\text{l}$ 包被 Transwell 小室膜的上室面, 取转染 72 h 后的 MGC-803 细胞, 使用无血清培养基重悬细胞至 5×10^5 个 /ml, 上层小室每室加入 $250\mu\text{l}$ 细胞悬液, 下层小室中加入含 10%FBS 的培养基, 置于 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养 12 h。用棉签擦净上室面细胞, 4% 多聚甲醛固定下室面细胞, Giemsa 染液染色。100 倍光镜下随机选择 10 个视野计数下室面的细胞个数。以每个小室的平均细胞数为最终计数。

1.4 统计学方法

采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用两独立样本 t 检验比较组间差异, 采用配对样本的 t 检验比较配对资料的差异, 计数资料采用 Pearson χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌及癌旁组织中的 SRPX2 的表达

胃癌组织中 SRPX2 mRNA 的相对表达量 (5.029 ± 1.333) 与癌旁组织 (3.083 ± 1.006) 比较, 差异有统

计学意义 ($P < 0.05$, 见图 1A), 胃癌组织高于癌旁组织。免疫组织化学染色发现 SRPX2 蛋白主要定位于胃癌细胞及正常胃腺细胞的细胞质中 (见图 1B), 且胃癌组织中 SRPX2 蛋白表达与癌旁组织比较, 差异有统计学意义 ($t = 5.211$, $P = 0.000$, 见图 1C), SRPX2 蛋白在胃癌组织中表达增高。

2.2 胃癌组织 SRPX2 表达的临床意义

以胃癌组织中 SRPX2 免疫组织化学染色的平均分为界, 将 45 例胃癌组织分为 SRPX2 高表达组 ($n = 31$) 及低表达组 ($n = 14$)。统计结果表明, 淋巴结转移及高 TNM 分期 (III + IV 期) 较多出现在 SRPX2 高表达的胃癌组织中, 提示 SRPX2 蛋白可能与肿瘤侵袭转移相关。见附表。

2.3 沉默 SRPX2 抑制 MGC-803 细胞侵袭及 MMP-2 表达

向 MGC-803 细胞内成功瞬时转染入 SRPX2 特异性 siRNA 及 NC siRNA 后, qRT-PCR 及 Western blot 检测发现 SRPX2 特异性 siRNA 下调了 SRPX2 mRNA 及蛋白的表达 (见图 2A、2B)。沉默 MGC-803 细胞内 SRPX2 表达后采用 Transwell 侵袭小室检测发

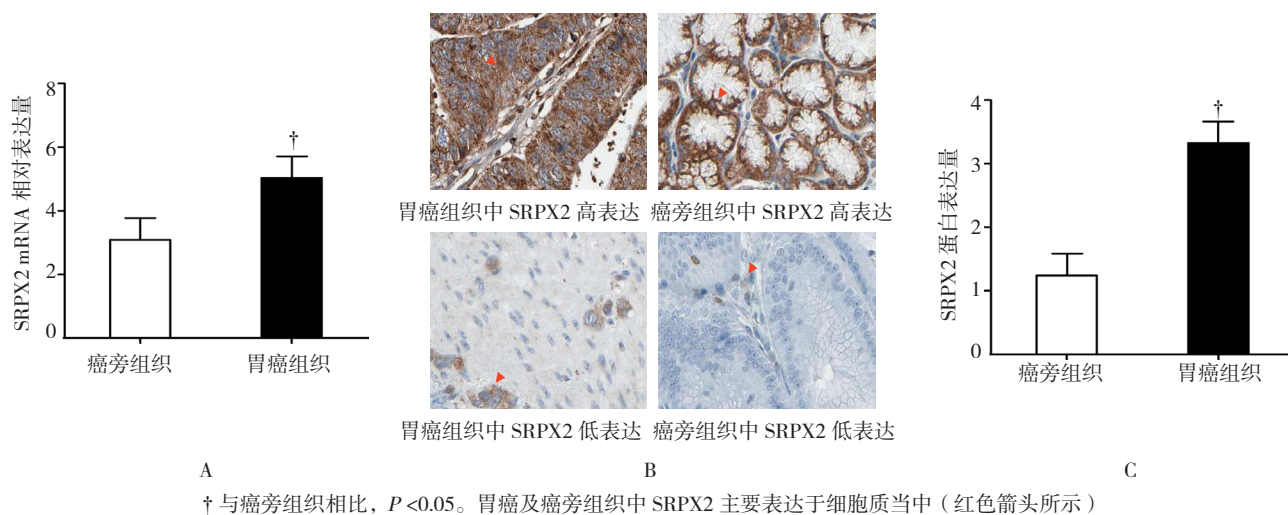


图 1 SRPX2 在胃癌及癌旁组织中的表达

附表 SRPX2 表达与 GC 患者临床病理特征的关系 例

组别	年龄		男 / 女	Hp 感染		肿瘤体积		淋巴结转移		TNM 分期	
	<50 岁	≥ 50 岁		有	无	<3 cm	≥ 3 cm	无	有	I、II	III、IV
SRPX2 高表达 ($n = 31$)	17	14	20/11	15	16	12	19	10	21	14	17
SRPX2 低表达 ($n = 14$)	6	8	10/4	8	6	8	6	9	5	11	3
χ^2 值	0.554		0.207	0.296		1.327		4.055		4.36	
P 值	0.457		0.649	0.586		0.249		0.044 [†]		0.037 [†]	

注: [†] $P < 0.05$

现 SRPX2 组侵袭细胞数量 (63.338 ± 8.371) 与 NC siRNA 组 (43.374 ± 4.357) 比较, 差异有统计学意义 ($t=9.461$, $P=0.000$), SRPX2 组侵袭细胞数量明显减

少 (见图 2C)。进一步研究发现, 沉默 SRPX2 后肿瘤细胞内基质金属蛋白酶 MMP-2 的 mRNA 及蛋白表达量也相应降低 ($P<0.05$, 见图 2D 和 2E)。

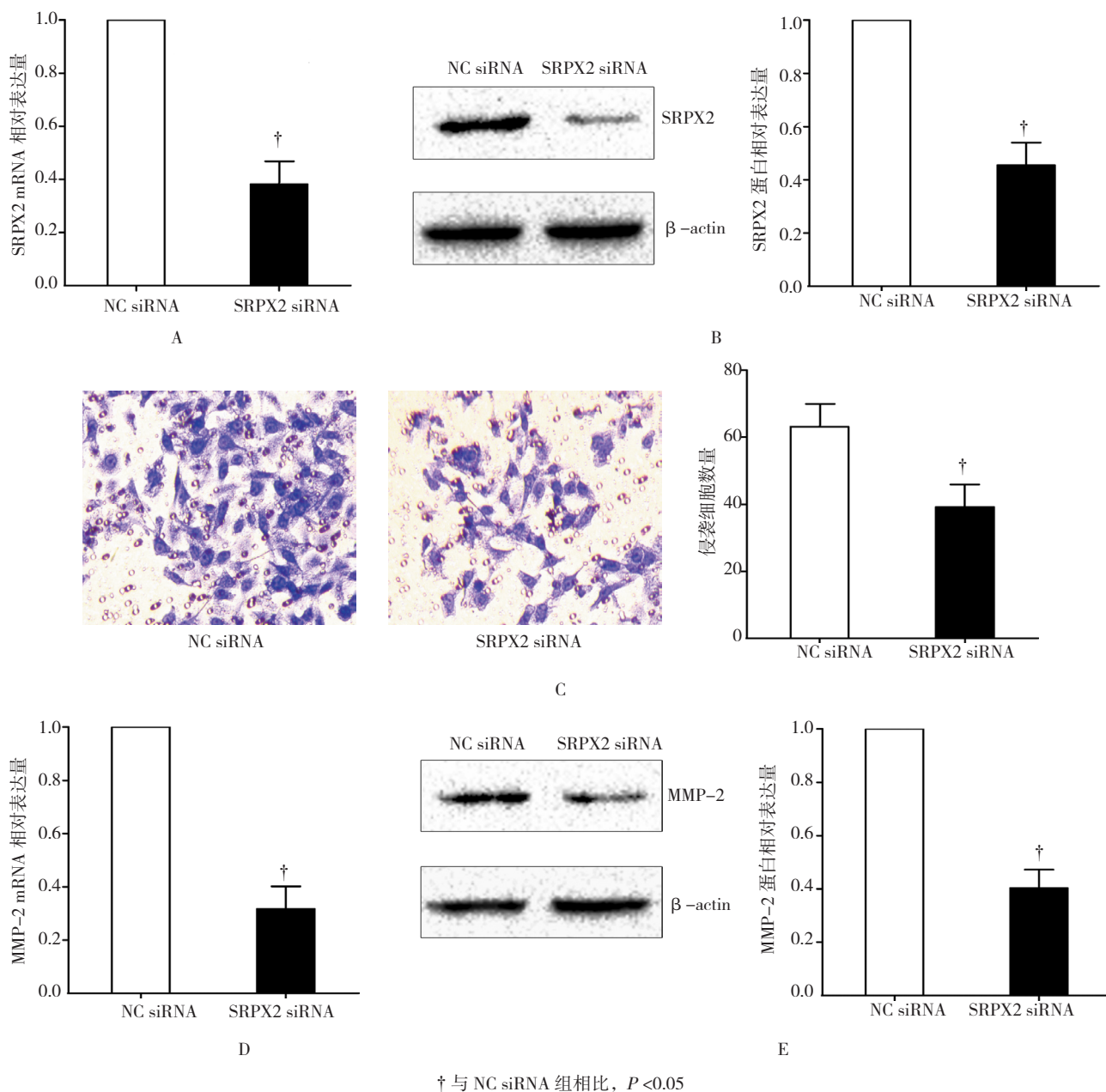


图 2 沉默 SRPX2 对 MGC-803 侵袭及 MMP-2 表达的影响

3 讨论

目前, 胃癌的生物学诊断标志物及治疗靶点仍较少, 尚不能满足临床需要^[9]。因而, 研究新的胃癌生物靶标具有重要的理论与实践意义。

SRPX2 定位于染色体 Xq22 上, 最早被 KURAOSAWA 等在白血病中发现, 随后的研究确认, SRPX2 在心、肺、脑等正常组织中均有表达, 但表达量相对较低^[10]。

LIU 等^[11]对 88 例结肠癌及对应的癌旁组织进行通过免疫组织化学染色发现 SRPX2 蛋白在肿瘤组织中升高, 并与患者的恶性临床表型及不良预后密切相关, 提示 SRPX2 蛋白在癌组织中的高表达, 并具有相当的临床意义。本研究通过对 45 对胃癌及癌旁组织检测发现, SRPX2 在胃癌组织中的表达升高, 并且与肿瘤淋巴结转移、高 TNM 分期等与肿瘤侵袭、转移相关

的恶性表型关系密切,提示 SRPX2 可能通过增强胃癌细胞侵袭而促进肿瘤发展。

SRPX2 作为一种硫酸软骨素蛋白聚糖(chondroitin sulfate proteoglycan, CSPG)能够通过介导蛋白-蛋白或蛋白-碳水化合物间的相互作用而影响细胞黏附。例如,研究发现 SRPX2 能够与尿激酶型纤溶酶原复合物受体(urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR)、半胱氨酸蛋白酶组织蛋白酶 B(cysteine protease cathepsin B, CTSB)以及金属蛋白酶 ADAMTS4 结合,并影响其对细胞外基质(extracellular matrix, ECM)蛋白的水解^[12]。而 ECM 结构的改变是影响细胞的迁移与侵袭的重要因素之一^[13]。本研究通过基因干扰技术沉默胃癌 MGC-803 细胞中 SRPX2 的表达,通过 Transwell 侵袭小室模型发现,下调 SRPX2 的表达能够抑制 MGC-803 细胞的侵袭能力。本文进一步研究了沉默 SRPX2 后细胞内 MMP-2 的表达变化,结果显示细胞内 MMP-2 的表达水平在沉默 SRPX2 后也降低。MMP-2 是参与分解 ECM 的蛋白酶之一^[14],其表达的改变从分子水平解释了干扰 SRPX2 后细胞侵袭能力变化的原因。GAO 等^[15]在胰腺癌中的研究还表明,SRPX2 可以通过介导黏着斑激酶信号通路的激活而促进胰腺癌细胞的迁移及侵袭。另外,上皮细胞间质化改变(epithelial to mesenchymal transition, EMT)也是影响细胞迁移侵袭能力的重要机制之一,TANG 等^[16]证实恶性胶质瘤细胞中 SRPX2 能够通过 MAPK 信号通路而促进胶质瘤细胞发生 EMT 进而促进细胞的迁移及侵袭。

综上所述,SRPX2 在胃癌中表达升高并与胃癌侵袭转移相关表型关系密切。在体外,SRPX2 能够通过促进 MMP-2 的表达来增强胃癌细胞的侵袭能力,最终促进胃癌进展。

参 考 文 献:

- [1] VOHLONEN I, PUKKALA E, MALILA N, et al. Risk of gastric cancer in *Helicobacter pylori* infection in a 15-year follow-up[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2016, 51(10): 1159-1164.
- [2] LI Y, ZHOU Y F, LIANG H, et al. Chinese expert consensus on cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for peritoneal malignancies[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(30): 6906-6916.
- [3] BAHİ-BUISSON N, GUERRINI R. Diffuse malformations of cortical development[J]. *Handb Clin Neurol*, 2013, 111: 653-665.
- [4] HUNG N A, EIHOLZER R A, KIRS S, et al. Telomere profiles and tumor-associated macrophages with different immune signatures affect prognosis in glioblastoma[J]. *Mod Pathol*, 2016, 29(3): 212-226.
- [5] 樊江浩, 刘揆亮, 周跃, 等. 细胞外基质蛋白 SRPX2 促进 HUVECs 血管生成能力[J]. *基础医学与临床*, 2015, 35(10): 1336-1340.
- [6] REINTHALER E M, LAL D, JURKOWSKI W, et al. Analysis of ELP4, SRPX2, and interacting genes in typical and atypical rolandic epilepsy[J]. *Epilepsia*, 2014, 55(8): e89-93.
- [7] MEREDITH L J, WANG C M, NASCIMENTO L, et al. The key regulator for language and speech development, FOXP2, is a Novel substrate for sumoylation[J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117(2): 426-438.
- [8] LI C, YANG W, ZHANG J, et al. SREBP-1 has a prognostic role and contributes to invasion and metastasis in human hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(5): 7124-7138.
- [9] LAZĂR D C, TĂBAN S, CORNIANU M, et al. New advances in targeted gastric cancer treatment[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(30): 6776-6799.
- [10] ZHU Y, ZHENG M, SONG D, et al. Global comparison of chromosome X genes of pulmonary telocytes with mesenchymal stem cells, fibroblasts, alveolar type II cells, airway epithelial cells, and lymphocytes[J]. *J Transl Med*, 2015, 13: 318.
- [11] LIU K L, WU J, ZHOU Y, et al. Increased sushi repeat-containing protein X-linked 2 is associated with progression of colorectal cancer[J]. *Med Oncol*, 2015, 32(4): 99.
- [12] ROYER-ZEMMOUR B, PONSOLÉ-LENFANT M, GARA H, et al. Epileptic and developmental disorders of the speech cortex: ligand/receptor interaction of wild-type and mutant SRPX2 with the plasminogen activator receptor uPAR[J]. *Hum Mol Genet*, 2008, 17(23): 3617-3630.
- [13] MUÑOZ-FÉLIX J M, FUENTES-CALVO I, CUESTA C, et al. Absence of K-ras reduces proliferation and migration but increases extracellular matrix synthesis in fibroblasts[J]. *J Cell Physiol*, 2016, 231(10): 2224-2235.
- [14] LI W, LING W, TENG X, et al. Effect of advanced glycation end products, extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinases on type-I collagen metabolism[J]. *Biomed Rep*, 2016, 4(6): 691-693.
- [15] GAO Z, ZHANG J, BI M, et al. SRPX2 promotes cell migration and invasion via FAK dependent pathway in pancreatic cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(5): 4791-4798.
- [16] TANG H, ZHAO J, ZHANG L, et al. SRPX2 enhances the epithelial-mesenchymal transition and temozolomide resistance in glioblastoma cells[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36(7): 1067-1076.

(张蕾 编辑)