

· 论 著 ·

沉默 IGF1R 表达对胃癌细胞侵袭与迁移能力的影响及机制

罗玉政¹, 陈波², 李红樱¹

1. 重庆市第九人民医院普外科, 重庆 400700; 2. 重庆医科大学北碚附属医院普外科, 重庆 400700

摘要: **目的** 探讨胰岛素样生长因子 1 受体 (IGF1R) 表达量降低对胃癌细胞侵袭、迁移能力的影响及其作用机制。**方法** 体外培养胃癌 GC9811-P 细胞, 取对数生长期细胞, 采用 RNA 干扰技术进行 GC9811-P 细胞转染。干扰组细胞转染靶向 IGF1R 的小干扰 RNA (IGF1-siRNA); 阴性组细胞转染 siRNA-NC; 对照组细胞不做任何处理。Transwell 法检测细胞的迁移、侵袭能力, Western Blot 检测转染细胞中 IGF1R、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (AKT)、磷酸化 AKT (p-AKT)、磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K)、磷酸化 PI3K (p-PI3K) 蛋白的相对表达水平。**结果** 干扰组细胞中 IGF1R 蛋白的相对表达水平显著低于对照组和阴性组 (P 均 < 0.05)。干扰组细胞的迁移、侵袭数目显著低于对照组和阴性组 (P 均 < 0.05)。对照组、阴性组、干扰组细胞中 AKT、PI3K 蛋白的表达水平无显著差异 (P 均 > 0.05)。干扰组细胞中 p-AKT、p-PI3K 蛋白的表达水平较对照组和阴性组降低, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.05)。**结论** 沉默 IGF1R 的表达可以降低胃癌细胞的侵袭、迁移能力, 其作用机制可能是通过影响经典 PI3K/AKT 信号通路发挥作用。

关键词: 胰岛素样生长因子 1 受体; 胃癌; PI3K/AKT 信号通路; 侵袭; 迁移

中图分类号: R 735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2018)02-0163-04

Effect of silencing IGF1R expression on invasion and migration abilities of gastric cancer cells and its mechanism

LUO Yu-zheng*, CHEN Bo, LI Hong-ying

* Department of General Surgery, Chongqing Ninth People's Hospital, Chongqing 400700, China

Corresponding author: LI Hong-ying, E-mail: 675825389@qq.com

Abstract: Objective To investigate the effect of lowering insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) expression on invasion and migration abilities of gastric cancer cells and its mechanism. **Methods** The gastric cancer GC9811-P cells were cultured in vitro, and logarithmic phase cells were used for the transfection of GC9811-P cells by RNA interference technique. The cells in interfering group were transferred by small interference RNA targeting IGF1R (IGF1-siRNA). The cells in negative group were transferred by siRNA-NC. No any treatment was given for the cells in the control group. Transwell test was used to detect cell invasion and migration abilities. Western Blot method was used to detect the relative expression levels of IGF1R, serine/threonine protein kinase (AKT), phosphorylated AKT (p-AKT), phosphoinositide3-kinase (PI3K) and phosphorylated PI3K (p-PI3K) proteins in transferred cells. **Results** The relative expression level of IGF1R protein in cells in interfering group was significantly lower than those in cells of negative group and control group (all $P < 0.05$). The number of cells of invasion and migration in interfering group was significantly lower than those in cells of negative group and control group (all $P < 0.05$). There were no significant differences in the expression levels of AKT and PI3K proteins among three groups (all $P > 0.05$). The relative expression levels of p-AKT and p-PI3K proteins in cells of interfering group were significant lower than those in cells of negative group and control group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Silencing IGF1R expression can decrease the invasion and migration abilities of gastric cancer cells, and the mechanism may be through the classic PI3K/AKT signaling pathway.

Key words: Insulin-like growth factor 1 receptor; Gastric cancer; PI3K/AKT signaling pathway; Invasion; Migration

胃癌是常见的恶性肿瘤,中国胃癌的发病率占全球第 5 位,死亡率占第 6 位,总发病率和死亡率约占到全球 45%^[1]。胃癌主要采用放化疗及药物治疗,疗效较差,易复发,5 年存活率较低。肿瘤细胞的侵袭、迁移是肿瘤恶化、复发的主要原因,这一过程受多种分子调控,研究其分子机制有助于更好的了解胃癌的发生、发展过程。胰岛素样生长因子 1 受体 (insulin-like growth factor 1 receptor, IGF1R) 是酪氨酸蛋白激酶家族的成员之一,调节细胞增殖、凋亡、血管内皮生长因子的表达等^[2]。研究表明,IGF1R 在多种肿瘤组织中高表达,参与肿瘤的发生发展过程,因此抑制 IGF1R 的过表达成为研究癌症基因治疗的热点之一^[3]。近年研究发现,干扰 IGF1R 的表达能够显著抑制肝癌细胞、肾癌细胞、子宫内膜癌细胞等的生长、凋亡、侵袭能力^[4-6],但 IGF1R 对胃癌细胞的影响及作用机制的相关研究较少。本文在前人研究的基础上,通过靶向 IGF1R 的小干扰 RNA (siRNA) 对胃癌细胞侵袭、迁移的影响,进一步探讨其作用机制,以期对胃癌的诊断、治疗提供参考。

1 材料与与方法

1.1 实验材料 人胃癌 GC9811-P 细胞系由重庆医科大学生命科学研究院保存,RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司,Lipofectamine 2000 转染试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,胰蛋白酶购自美国 Hyclone 公司,Transwell 小室购自美国 BD 公司,细胞蛋白裂解液购自上海生工生物有限公司,一抗、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗均购自美国 abcam 公司。

1.2 细胞培养 细胞培养于新鲜的 RPMI-1640 培养基中,培养基中含有 10% 的胎牛血清和 100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素,在温度为 37 ℃、5% CO₂ 恒温、恒湿的培养箱中培养。每天在倒置显微镜下观察细胞的生长状态,0.25% 胰酶消化传代,每 2~3 天更换一次培养基,取生长状态良好的对数期细胞用于后续实验。

1.3 细胞转染 使用胰蛋白酶将细胞消化成单细胞悬液,接种到 6 孔板中,每孔接种 1×10^6 个细胞,放置在 37 ℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养 24 h,转染前 1 h 更换为不含双抗的细胞培养基。待细胞融合度约为 80%~90% 时,按照 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书的指示进行转染,每天在显微镜下观察细胞状态。实验分为 3 组,对照组:不做任何处理的细胞;阴性组:加入 Lipofectamine 2000、siRNA-NC;干扰组:加入 Lipofectamine 2000、靶向 IGF1R-siRNA。转染后

各组细胞置于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 6 h 然后更换为含 10% 胎牛血清的双抗培养基培养 48 h,Western Blot 检测转染效果。

1.4 Transwell 实验检测细胞的迁移能力 0.25% 胰蛋白酶将转染后的各组细胞消化为单细胞悬液,用含 10% 胎牛血清的培养基调整细胞密度;将 Transwell 小室置于 24 孔板上,上室中每孔加入 1×10^5 个细胞悬液,下室中加入 600 μl 含 10% 胎牛血清的培养基作为趋化因子,培养箱中孵育 24 h 后,取出 Transwell 小室,倒掉培养基,PBS 缓冲液清洗 3 次,95% 乙醇固定 5 min,0.5% 结晶紫染色 10 min,PBS 缓冲液清洗 3 次,用棉签轻轻拭去小室滤膜上层的细胞,显微镜下随机取上、下、左、右、中 5 个视野进行细胞计数,用平均数表示细胞侵袭、迁移力,每组 5 个复孔。

1.5 Transwell 实验检测细胞的侵袭能力 将 Matrigel 胶置于 4 ℃ 中过夜后与新鲜培养基以 1:6 的比例稀释,将小室放入 24 孔板中,加入 50 μl Matrigel 凝胶稀释液以包被小室基底膜,待稀释液晾干以备后续实验使用。剩余步骤与迁移实验相同。

1.6 Western Blot 检测转染细胞中磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)、丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 (serine threonine protein kinase, AKT)、磷酸化 PI3K (p-PI3K)、磷酸化 AKT (p-AKT) 蛋白的表达水平 取各组转染细胞,分别加入 200 μl 细胞裂解液,置于冰上 20 min 左右,离心取上清,用二辛宁可酸 (BCA) 法测定蛋白的浓度。蛋白样品中加入等体积的 10%~15% 十二烷基丙磺酸钠-聚丙烯酰胺电泳 (SDS-PAGE) 上样缓冲液,煮沸变性 5 min,在 SDS-PAGE 胶的加样孔中电泳,当溴酚蓝到达分离胶底部时停止电泳,将凝胶转移至硝酸纤维素膜上,使用 5% 的脱脂牛奶封闭 30 min,加入适当比稀释的一抗,4 ℃ 过夜孵育后,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,加入二抗,室温孵育 2 h,加入电化学发光液 (ECL) 发光液,置于凝胶成像系统中显影,以目的条带灰度值与内参 β-actin 灰度值的比值为各目的蛋白的相对表达量。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,组间差异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 转染效果的检测 Western Blot 检测转染后胃癌细胞中 IGF1R 蛋白的相对表达量,结果显示,对照组、阴性组、干扰组细胞中 IGF1R 蛋白的相对表达量分别为 0.638 ± 0.072 、 0.633 ± 0.061 、 0.195 ± 0.031 。三组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。两两比较

显示,阴性组细胞中 IGF1R 蛋白的表达量与对照组细胞相比无统计学差异 ($P = 0.931$),但干扰组细胞中 IGF1R 蛋白的表达量显著低于对照组与阴性组 ($P = 0.001, 0.001$),说明 siRNA 干扰可使胃癌细胞中 IGF1R 蛋白的表达量降低。见图 1。

2.2 转染后细胞迁移能力的变化 Transwell 迁移实验检测转染后细胞迁移能力,结果显示,对照组、阴性组、干扰组细胞的迁移数目分别为 (82.612 ± 9.733) 个、(83.150 ± 7.465) 个、(35.498 ± 4.716) 个。阴性组细胞的迁移数与对照组比较无统计学差异 ($P = 0.943$),干扰组细胞的迁移数显著低于对照组和阴性组 ($P = 0.000, 0.000$)。说明抑制 IGF1R 的表达可以降低细胞迁移能力。

2.3 转染后细胞侵袭能力的变化 Transwell 侵袭实验检测转染后细胞侵袭能力,结果显示,对照组、阴性组、干扰组细胞的侵袭数目分别为 (73.465 ± 6.332) 个、(70.896 ± 5.721) 个、(18.547 ± 2.593) 个。阴性组细胞的侵袭数与对照组相比无统计学差异 ($P = 0.630$),干扰组细胞的侵袭数显著降低 ($P = 0.000$),说明抑制 IGF1R 的表达可以降低细胞侵袭能力。

2.4 转染后细胞中 PI3K、AKT、p-PI3K、p-AKT 蛋白的表达水平 Western Blot 检测各组细胞中 PI3K、AKT、p-PI3K、p-AKT 蛋白的表达量,结果如图 2、表 1 所示。与对照组相比,阴性组细胞中 PI3K、AKT、p-PI3K、p-AKT 蛋白的表达量无统计学差异 ($P_1 = 0.837, 0.666, 0.604, 0.621$),干扰组细胞中 PI3K、AKT 的表达量无显著变化 ($P_2 = 0.790, 0.457$),但 p-PI3K、p-AKT 的水平均显著降低 ($P_2 = 0.000, 0.000$)。

表 1 干扰 IGF1R 的表达对细胞中 PI3K、AKT、p-PI3K、p-AKT 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	PI3K	AKT	p-PI3K	p-AKT
对照组	0.954 ± 0.070	0.935 ± 0.068	0.784 ± 0.043	0.624 ± 0.040
阴性组	0.968 ± 0.085	0.912 ± 0.052	0.767 ± 0.030	0.611 ± 0.013
干扰组	0.937 ± 0.076	0.891 ± 0.063	0.314 ± 0.012	0.257 ± 0.033
P_1 值	0.837	0.666	0.604	0.621
P_2 值	0.790	0.457	0.000	0.000

注:1 为对照组与阴性组比较;2 为对照组与干扰组比较。

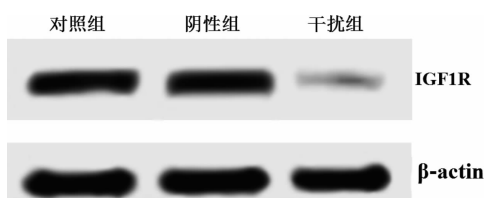


图 1 转染后胃癌细胞中 IGF1R 蛋白的相对表达的电泳图

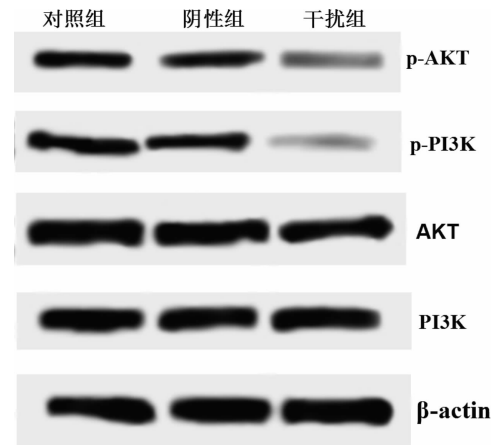


图 2 干扰 IGF1R 的表达对细胞中 PI3K、AKT、p-PI3K、p-AKT 蛋白表达的电泳图

3 讨论

在我国胃癌的发病率较高,位于常见肿瘤的第二位^[7]。胃癌早期症状不明显,发现时多为晚期或者已经转移,手术治疗效果不理想,现多采用手术和化疗相结合的方法,但化疗易产生耐药性且药物毒性较强,对机体损伤较大^[8]。胃癌晚期的患者细胞多发生侵袭、转移,严重影响胃癌的治疗效果,因此研究胃癌细胞的侵袭、转移的分子机制对胃癌诊断和治疗具有重要意义。IGF1R 是细胞表面的酪氨酸激酶,通过细胞信号传导通路作用于肿瘤细胞的增殖过程,是近几年来治疗肿瘤的一个靶点,参与多种肿瘤的发生、发展。在恶性肿瘤中 IGF1R 的表达量明显增高,已成为判断恶性肿瘤的标志之一^[9]。研究显示,IGF1R 是体内重要的促有丝分裂原,促进细胞从 G1 期向 S 期转化,调节机体的发育和肿瘤组织、细胞的生长、凋亡、等生理过程^[6]。IGF1R 信号通路对肿瘤细胞侵袭、迁移、增殖和肿瘤的发生发展等过程发挥重要作用^[10-12]。但在胃癌中,IGF1R 对细胞侵袭和转移的影响还不完全清楚,所以本研究通过转染 IGF1R siRNA,发现可以明显抑制胃癌细胞中 IGF1R 的表达,抑制细胞的侵袭、迁移能力,为胃癌的潜在靶向治疗提供明确的方向。

PI3K/AKT 信号通路是调控肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移的重要通路之一,对多种肿瘤的演进、预后发挥重要作用^[13-14]。PI3K 和 AKT 是这一信号通路的关键信号因子,PI3K 可催化细胞内的 3,4-二磷酸磷脂酰肌醇转变为有活性的物质,激活下游关键的靶基因 AKT 磷酸化,从而使 AKT 从细胞质中转移到细胞膜,在胞浆内传递生物学信号,调控肿瘤细胞的增殖、凋亡、分裂周期以及侵袭和迁移等过程^[15]。PI3K/AKT 信号通路过度活化可促进肿瘤细胞的恶

性增殖^[16]。研究证明在多种肿瘤中如乳腺癌^[17]、胃癌^[18]、肺癌^[19]等 PI3K/AKT 信号通路可激活糖原合酶激酶-3 β 参与细胞侵袭、迁移过程。IGF1R 能与 IGF1 和 IGF2 这两个配体结合,活化细胞内的酪氨酸激酶,促进细胞 G1/S 期转换,启动 PI3K/AKT 信号通路,从而促进细胞有丝分裂,增强细胞的增殖能力,促使肿瘤恶化^[20]。为研究 IGF1R 影响胃癌细胞侵袭、迁移的作用机制,本实验检测了转染 IGF1R siRNA 的细胞中 PI3K、AKT、p-PI3K、p-AKT 蛋白的表达量,发现抑制细胞中 IGF1R 的表达对 PI3K、AKT 蛋白的影响较小,但可降低 p-PI3K、p-AKT 蛋白的表达量,说明 IGF1R 可能是通过影响 PI3K/AKT 信号通路调节细胞的侵袭、迁移。

总之,IGF1R 基因的表达量下降可降低胃癌细胞的侵袭、迁移能力,其作用机制可能是通过影响 PI3K/AKT 信号通路的活性,说明 IGF1R 基因可作为一种新的分子治疗靶点,为胃癌的诊断治疗提供理论依据。

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 - E386.

[2] Habib R, Akhtar J, Taqi M, et al. Lentiviral vector-mediated survivin shRNA delivery in gastric cancer cell lines significantly inhibits cell proliferation and tumor growth [J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(2): 859 - 867.

[3] 李晨阳, 张文彦, 张祎, 等. 慢病毒介导的 IGF-1R 基因沉默对肝细胞癌的增殖和迁移的影响 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2017, 16(11): 1056 - 1060.

[4] 万璟, 李小毛, 舒珊荣, 等. 慢病毒介导的靶向沉默胰岛素样生长因子 1 型受体的 siRNA 对子宫内癌膜细胞迁移和侵袭能力的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(8): 1352 - 1357.

[5] 别彩群, 黄秋燕, 颜英, 等. 转染沉默 IGF1R 基因的肝癌细胞株增殖、迁移及侵袭能力观察 [J]. *山东医药*, 2016, 56(11): 1 - 4.

[6] 崔笠, 郝博, 王敏, 等. IGF-1R 表达下调抑制肾癌 786-0 细胞的增殖、迁移、侵袭和细胞周期 G1/S 期转变 [J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(8): 1208 - 1213.

[7] 李妍, 孟凡东, 付立业, 等. 沉默 AFAP-1L2 对胃癌 MKN-28 细胞

的生物学影响 [J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(11): 1691 - 1694.

[8] 赵明, 王喆, 王福光, 等. IGF-1R 抑制剂 OSI-906 对鼻咽癌细胞 SUNE-1 放射增敏作用的研究 [J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(2): 167 - 171.

[9] 王悦超, 亓文骞, 赵平. 胰岛素样生长因子 1 受体在胰腺癌治疗中的机制及进展 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2017, 33(4): 790 - 794.

[10] Li H, Xu L, Li C, et al. Ubiquitin ligase Cbl-b represses IGF-I-induced epithelial mesenchymal transition via ZEB2 and microRNA-200c regulation in gastric cancer cells [J]. *Mol Cancer*, 2014, 13: 136.

[11] 张巍, 吴杨, 龚玲, 等. 靶向抑制胰岛素样生长因子 I 型受体对裸鼠恶性胸腔积液的治疗作用 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2016, 38(8): 565 - 571.

[12] Haisa M. The type 1 insulin-like growth factor receptor signalling system and targeted tyrosine kinase inhibition in cancer [J]. *J Int Med Res*, 2013, 41(2): 253 - 264.

[13] Rahmani M, Aust MM, Attkisson E, et al. Dual inhibition of Bcl-2 and Bcl-xL strikingly enhances PI3K inhibition-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells through a GSK3-and bim-dependent mechanism [J]. *Cancer Res*, 2012, 73(4): 1340 - 1351.

[14] Fresno Vara JA, Casado E, De CJ, et al. PI3K/Akt signalling pathway and cancer [J]. *Cancer Treat Rev*, 2004, 30(2): 193 - 204.

[15] Cho TM, Kim WJ, Moon SK. AKT signaling is involved in fucoidan-induced inhibition of growth and migration of human bladder cancer cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 64: 344 - 352.

[16] 周炳刚, 魏昌晟, 张颂, 等. 苦参碱逆转人乳腺癌 MCF-7/ADR 细胞株耐药性及对 PI3K/AKT 信号通路下游因子的影响 [J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(1): 9 - 13.

[17] Zhang X, Jiang G, Sun M, et al. Cytosolic THUMPDI promotes breast cancer cells invasion and metastasis via the AKT-GSK3-Snail pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(8): 13357 - 13366.

[18] Dai J, Qian C, Su M, et al. Gastrokine-2 suppresses epithelial mesenchymal transition through PI3K/AKT/GSK3 β signaling in gastric cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(9): 12403 - 12410.

[19] 吴爱兵, 黎明春, 麦宗炯, 等. CK2 α 通过 PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路调控肺腺癌 A549 细胞的侵袭及迁移 [J]. *中国肺癌杂志*, 2017, 20(4): 233 - 238.

[20] Yan XD, Yao M, Wang L, et al. Overexpression of insulin-like growth factor-I receptor as a pertinent biomarker for hepatocytes malignant transformation [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(36): 6084 - 6092.

收稿日期: 2017-09-07 修回日期: 2017-10-20 编辑: 王国品