

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.10.004

TGM2 对胃癌细胞 BGC-823 增殖、迁移和侵袭能力的影响 *

雷志杰¹ 张莹¹ 田苗苗¹ 岳俊涛² 夏云龙³ 胡思隽¹ 吴开春^{1Δ}

(1 第四军医大学西京消化病医院·肿瘤生物学国家重点实验室 陕西 西安 710032;

2 第四军医大学西京医院泌尿外科 陕西 西安 710032; 3 第四军医大学西京医院心脏内科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:转谷氨酰胺酶-2(transglutaminase-2, TGM2)是一种多功能的蛋白,在乳腺癌,胰腺癌,黑色素瘤和前列腺癌等肿瘤中高表达,而且和肿瘤的增殖和转移密切相关。本研究旨在探索 TGM2 对胃癌细胞 BGC-823 的增殖、迁移和侵袭能力的影响。**方法:**qRT-PCR、蛋白质印迹及免疫组化检测 TGM2 在胃癌细胞及组织中的表达情况;慢病毒转染胃癌细胞 BGC-823 以干扰 TGM2 的表达,荧光显微镜下观察转染效率,蛋白质印迹检测 TGM2 表达干扰效果;CCK-8 法检测 TGM2 下调对 BGC-823 增殖能力的影响;Transwell 法检测 TGM2 下调对 BGC-823 的迁移和侵袭能力影响;蛋白质印迹检测 TGM2 下调对转移和凋亡相关蛋白表达的影响。**结果:**TGM2 在胃癌细胞和组织中均高表达, $P<0.01$ (qRT-PCR), $P<0.001$ (免疫组化);转染慢病毒后,荧光显微镜下观察结果显示转染效率超过 90%,蛋白质印迹结果显示实验组 shTGM2-1 的干扰效果最好,TGM2 明显下调,差异具有统计学意义, $P<0.0001$;CCK-8 结果表明 TGM2 下调后,从细胞铺板第 2d 开始,实验组(shTGM2-1)的细胞增殖倍数明显下降, $P<0.05$ (2d), $P<0.01$ (3d), $P<0.001$ (4d), $P<0.01$ (5d);Transwell 结果显示,TGM2 下调后,BGC-823 的迁移和侵袭能力明显减弱, $P<0.001$ (迁移), $P<0.01$ (侵袭);蛋白质印迹结果显示,TGM2 下调后,NF- κ B 和 Bcl-2 表达下调,而 Bax 表达上调, $P<0.05$ (NF- κ B), $P<0.001$ (Bcl-2)和 $P<0.0001$ (Bax)。**结论:**TGM2 下调能抑制胃癌细胞 BGC-823 的增殖、迁移和侵袭能力,并和 NF- κ B、Bcl-2 的下调以及和 Bax 的表达水平上调有关,为胃癌的临床治疗提供了新靶点。

关键词:胃癌;TGM2;细胞增殖;肿瘤转移

中图分类号:R-33;R735.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)10-1816-07

The Role of TGM2 on Cell Proliferation, Migration and Invasion of BGC-823 Cell in Gastric Cancer*

LEI Zhi-jie¹, ZHANG Ying¹, TIAN Miao-miao¹, YUE Jun-tao², XIA Yun-long³, HU Si-jun¹, WU Kai-chun^{1Δ}

(1 Xijing Hospital of Digestive Disease, State Key Laboratory of Oncology, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Urology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

3 Department of Cardiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: Transglutaminase-2 (TGM2) is a multifunctional protein that is overexpressed in tumors such as breast, pancreatic, melanoma and prostate cancer, and is closely related to tumor proliferation and metastasis. The purpose of this study was to explore the effect of TGM2 on the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cell line BGC-823. **Methods:** The expression of TGM2 in gastric cancer cells and tissues was detected by qRT-PCR, Western blotting and immunohistochemistry. The lentivirus was used to transfect BGC-823 to down-regulate the expression of TGM2 and the transfection efficiency was observed by fluorescence microscopy and Western blotting. The effect of TGM2 down-regulation on the proliferation of BGC-823 cells was detected by CCK-8 assay. The effect of down-regulation of TGM2 on the migration and invasion ability of BGC-823 was detected by Transwell assay. The down-regulation of TGM2 on the metastasis and apoptosis-related protein expression was detected by Western blotting. **Results:** TGM2 was highly expressed in gastric cancer cells ($P<0.01$) and tissues ($P<0.001$). The results of fluorescence microscopy showed that transfection efficiency was more than 90%. The results of Western blotting indicated that the interference effect of shTGM2-1 group was best obvious ($P<0.0001$). The results of CCK-8 showed that after TGM2 down-regulation, from the first day, cell proliferation in the experimental group (shTGM2-1) was significantly decreased. $P<0.05$ (2d), $P<0.01$ (3d), $P<0.001$ (4d) and $P<0.01$ (5d). Transwell assays showed that the migration ($P<0.001$) and invasion ($P<0.01$) ability of BGC-823 were suppressed after TGM2 down-regulation. Western blotting

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81421003,81627807,91542000,81672702,81701750)

作者简介:雷志杰(1992-),博士研究生,主要研究方向:胃癌靶向治疗研究,E-mail: 18700919916@163.com

Δ 通讯作者:吴开春(1961-),博士,教授,博士生导师,主要从事胃癌和炎症性肠病研究工作,

E-mail: kaicwu@fmmu.edu.cn,电话:86-29-84771502

(收稿日期:2018-02-05 接受日期:2018-03-02)

showed that, expression of NF- κ B ($P<0.05$) and Bcl-2 ($P<0.001$) were down-regulated while Bax ($P<0.0001$) was up-regulated in BGC-823 when TGM2 was down-regulated. **Conclusions:** The proliferation, migration and invasion abilities of gastric cancer cell BGC-823 are inhibited significantly after downregulation of TGM2, which is related to the down-regulation expression of NF- κ B, Bcl-2 and the up-regulation expression of Bax. These results provide a new target for the clinical treatment of gastric cancer.

Key words: Gastric cancer; TGM2; Cell proliferation; Tumor metastasis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)10-1816-07

前言

转谷氨酰胺酶-2(transglutaminase-2, TGM2)是一种多功能的蛋白^[1]。首先 TGM2 是一个钙依赖的蛋白交联酶,与钙离子结合后,能够发挥不可逆的蛋白交联作用,通过促进细胞外基质的交联而利于细胞粘附^[2,3];其次,TGM2 还具有 G 蛋白(Guanine nucleotide-binding proteins, G-protein)的功能,细胞内的 TGM2 与 GTP/GDP 结合后,随着 GTP 的去磷酸化和 GDP 的磷酸化,主要扮演信号分子的角色,在细胞生存和生长等过程中发挥重要作用^[1,4]。近期研究表明,TGM2 在早期癌症的转移环节起到重要作用^[5]。与非转移性癌细胞相比,TGM2 在转移性癌细胞中表达水平升高^[6-13]。细胞外 TGM2 与钙离子结合以后,其转酰胺酶活性被激活,可以促进细胞黏附和细胞外基质交联。上皮-间质化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)是细胞转移的第一步,也是关键的一步^[14]。获得 EMT 表型的肿瘤细胞具有极性消失和与邻近细胞连接分解特征,从而可以与邻近细胞分离,侵袭和转移到其他部位。所以具有 EMT 表型的肿瘤细胞则具有更大的侵袭和转移倾向^[15]。根据文献报道,包括胰腺癌,乳腺癌,前列腺癌,黑色素瘤和具有高转移潜能的卵巢癌在内的许多癌细胞表达高水平的 TGM2,并且显示 EMT 表型^[16-19]。总的来说,TGM2 在诸多肿瘤细胞中高表达,与肿瘤细胞 EMT 表型的获得密切相关。有研究发现,TGM2 能够通过激活 NF- κ B 来促进肿瘤细胞获得 EMT 表型^[20-22]。关于 TGM2 在胃癌中的相关文献报道较少,有研究表明 TGM2 可能通过 ERK1/2 通路增强胃癌细胞增殖、侵袭和转移能力^[18],但是其具体作用机制仍然阐释的不是很清楚。因此,探索 TGM2 在胃癌中的表达情况、TGM2 与胃癌转移的关系具有十分重要的意义。胃癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一,其发病率在世界范围内排名第四,死亡率则位列第三,严重危及人类健康^[23-25]。本研究旨在探索 TGM2 在胃癌中的表达,并初步研究 TGM2 表达下调对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响,从而为胃癌的治疗提供潜在的靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

正常人胃黏膜上皮细胞 GES 和人胃癌细胞 BGC823 细胞株由第四军医大学西京消化病医院肿瘤生物学国家重点实验室保存。Phosphate buffered solution(PBS)、RPMI1640 培养基、0.25% 胰酶和胎牛血清均购自美国 HyClone 公司, TGM2-shRNA 由上海吉凯基因制备, RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) 试剂盒以及

TGM2 和内参 GAPDH 引物均购自日本 TaKaRa 公司,蛋白质提取试剂盒和 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒购自日本株式会社同仁化学研究所,鼠抗人 TGM2 抗体购自英国 Abcam 公司,兔抗人 NF- κ B、兔抗人 Bcl-2 购自美国 ImmunoWay 公司,兔抗人 Bax 购自德国 MILLIPORE 公司,鼠抗人 β -actin 购自美国 Sigma 公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠及山羊抗兔 IgG(二抗)均购自北京中杉金桥生物技术公司,胃癌芯片由第四军医大学西京消化病医院制备, Transwell 小室购自美国 Corning 公司。

1.2 免疫组织化学及结果判定

根据王国栋等人的描述^[26],我们采用链霉卵白素-生物素法,其中鼠抗人 TGM2 抗体工作浓度为 1:100。免疫染色强度的评分为 0 至 3:阴性为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。染色范围评分为 0-100%:阴性为 0 分,<25% 为 1 分,26%-50% 为 2 分,51%-75% 为 3 分,76%-100% 为 4 分。最后的免疫染色评分是以上两项得分的乘积。

1.3 qRT-PCR 检测

采用 RT-PCR 的方法,以 GAPDH 为内参,检测 BGC823 和 GES 的 TGM2 mRNA 表达水平。TGM2 引物序列为 F: 5'ACCGCTGAGGAGTACGTCTG3'; R: 5'CAGAGAAAGGCTC-CAGGTTG3'), GAPDH 引物序列为 (F: 5'GCACCGTCAAG-GCTGAGAAC3', R: 5'TGGTGAAGACGCCAGTGA3')。

1.4 TGM2 shRNA 稳定表达细胞系的构建

对数期生长的 BGC823 以 1×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板,24 小时后,根据产品说明推荐的复感染指数(multiplicity of infection, MOI),将培养液更换为无血清培养液并加入相应剂量的慢病毒及 polybrene,继续放入孵箱培养,12 h 后更换为正常培养液。病毒转染 48 h 后利用荧光显微镜观察荧光强弱,评估转染效率,并提取蛋白验证 TGM2 低表达细胞模型是否构建成功。

1.5 蛋白质印迹法检测(western blotting)

用碧云天的蛋白提取试剂盒提取对数期的细胞总蛋白,利用 BCA 蛋白定量检测蛋白浓度,然后用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,半干法转移至 NC 膜,接着用 5%脱脂奶粉(TBST 稀释)室温封闭 1 h, TBST 冲洗后加入相应一抗稀释液,4℃摇床上孵育过夜, TBST 冲洗后用对应二抗稀释液室温孵育 1 h,再次洗涤后进行 ECL 显影,用 Image Lab 软件对条带进行定量分析。所使用的一抗及稀释比例:TGM2 (1:1000)、 β -actin(1:2000)、NF- κ B(1:1000)、Bcl-2(1:1000)和 Bax(1:8000);二抗及稀释比例:鼠抗人 IgG(1:5000)和兔抗人 IgG(1:5000)。

1.6 CCK-8 检测 TGM2 下调对 BGC823 增殖的影响

将对数期生长的 BGC-823-shTGM2-NC 和 BGC-823-shTGM2-1 以 2000 个/孔密度接种于 96 孔板,分别在孵箱里继续培养 1、2、3、4 和 5 天,每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,继续孵育 2.5 h 后用酶标仪检测 OD 值(450 nm),并绘制细胞生长曲线。每组设置 5 个复孔,重复 3 次。

1.7 Transwell 实验检测 TGM2 下调对 BGC-823 迁移和侵袭能力的影响

将对数期生长的 BGC-823-shTGM2-NC 和 BGC-823-shTGM2-1 用胰蛋白酶消化,并用 PBS 和无血清 RPMI1640 先后洗涤一次,接着用无血清的 RPMI1640 培养基重悬细胞,以 5×10^4 孔的密度接种到小室上层(侵袭小室预先用基质胶包被),小室下层加适量含 20%血清的 RPMI1640 培养液,然后放到孵箱中继续培养。分别在 24 h 和 48 h 后将迁移和侵袭小室从孵箱中取出,用棉签轻轻拭去没有迁移的细胞,然后用 4%多聚甲醛室温固定 20 min,PBS 冲洗 3 次,结晶紫染色 5 min,PBS 冲

洗 3 次,室温风干,倒置显微镜观察并在 20 倍物镜下拍照,使用 Image J 软件对图片进行细胞计数,并统计分析。

1.8 统计学方法

以上所有实验至少重复三次。所有数据由 GraphPad Prism 7.03 软件进行分析。所有数据均表示为平均值 $\pm$ S.D.用 Student's t-test 来分析各组之间的差异。 $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 TGM2 在胃癌细胞中高表达

qRT-PCR 和 western blotting 结果如图 1 所示;qRT-PCR: TGM2 在 GES 和 BGC-823 中的 mRNA 相对表达量分别为 1 ± 0 和 49.37 ± 1.571 , $P < 0.01$; western blotting: TGM2 在 GES 和 BGC-823 中的蛋白相对表达量分别为 1 ± 0 和 64.57 ± 10.3 , $P < 0.01$ 。和正常胃粘膜上皮细胞(GES)相比,胃癌细胞 BGC-823 中 TGM2 的 mRNA(A)和蛋白(B)水平平均明显上调,且具有统计学差异。

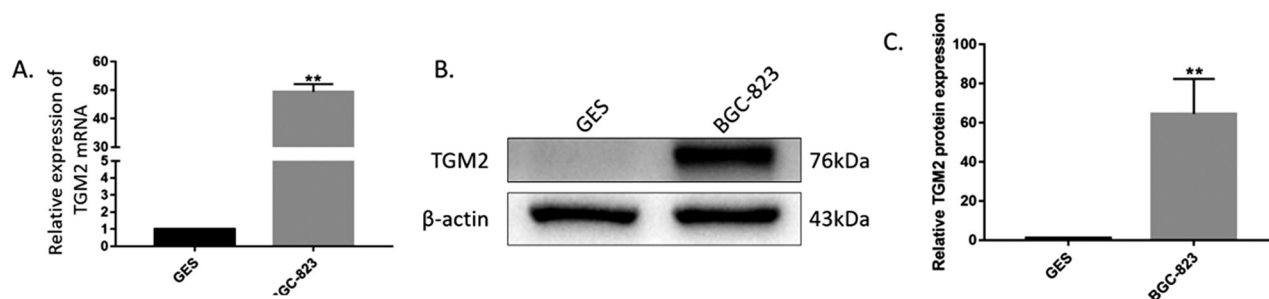


图 1 qRT-PCR 和 western blotting 检测 TGM2 在胃癌细胞的表达情况

Fig.1 Detection of TGM2 expression by qRT-PCR and western blotting

A: Results of qRT-PCR; B: Results of western blotting; C: Analysis of western results

2.2 TGM2 在胃癌组织中高表达

对 20 例胃癌及配对正常胃黏膜样品进行免疫组化染色分析,如图 2 所示,TGM2 在癌旁组织和胃癌组织的免疫组化

染色评分分别为: 1.75 ± 0.3393 和 5.5 ± 0.8351 , 配对 t 检验 $P < 0.001$,胃癌组的免疫组化染色评分明显高于癌旁对照组,且差异具有统计学意义。

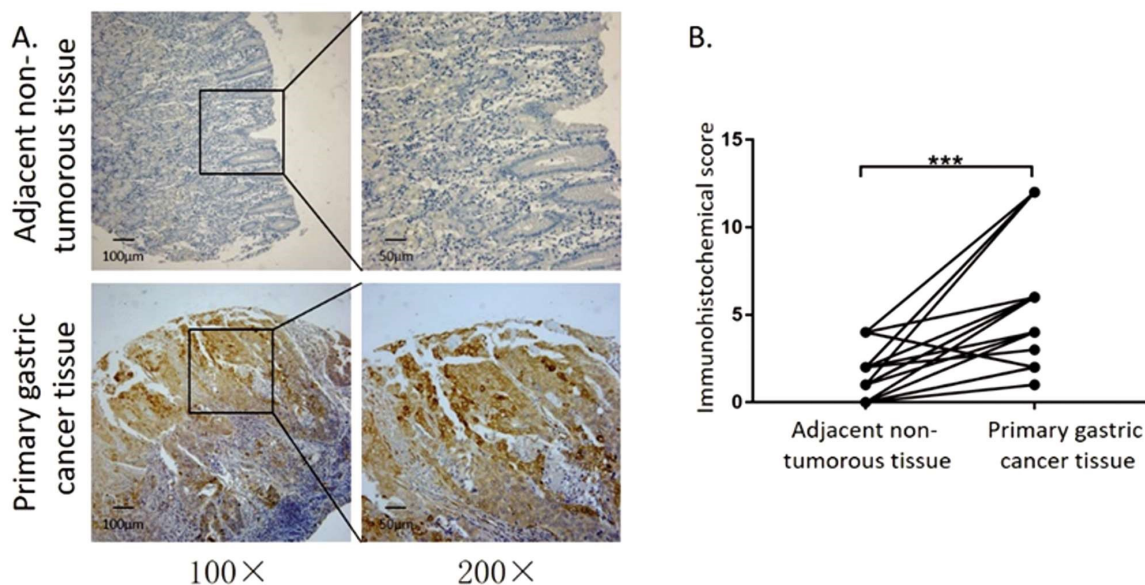


图 2 胃癌组织和癌旁正常胃黏膜组织的 TGM2 蛋白的表达对比

Fig.2 Comparison of TGM2 expression between adjacent non-tumorous tissue and primary gastric cancer tissue

A: Results of immunohistochemistry; B: Analysis of immunohistochemical score

2.3 TGM2 shRNA 稳定表达细胞系的构建和筛选

将慢病毒感染的 BGC-823 在 48 h 后在荧光显微镜下观察转染效率,图 3(A)显示,阴性对照组(shTGM2-NC)和实验组(shTGM2-1、shTGM2-2 和 shTGM2-3)的转染效率均超过 90%。然后我们提取了蛋白质检测慢病毒干扰后 TGM2 表达情况,图 3(B 和 C)的 western blotting 结果及灰度值分析显示,

shTGM2-NC、shTGM2-1、shTGM2-2 和 shTGM2-3 的 TGM2 相对表达量分别为: 1 ± 0 、 0.08428 ± 0.001491 、 0.7555 ± 0.06563 和 0.4878 ± 0.08329 , P 值均小于 0.05。和阴性对照组相比,三个实验组 TGM2 均下调,其中 shTGM2-1 下调最明显,且 $****P < 0.0001$,具有统计学差异。所以我们选择 shTGM2-1 作为实验组来进行后续的功能研究。

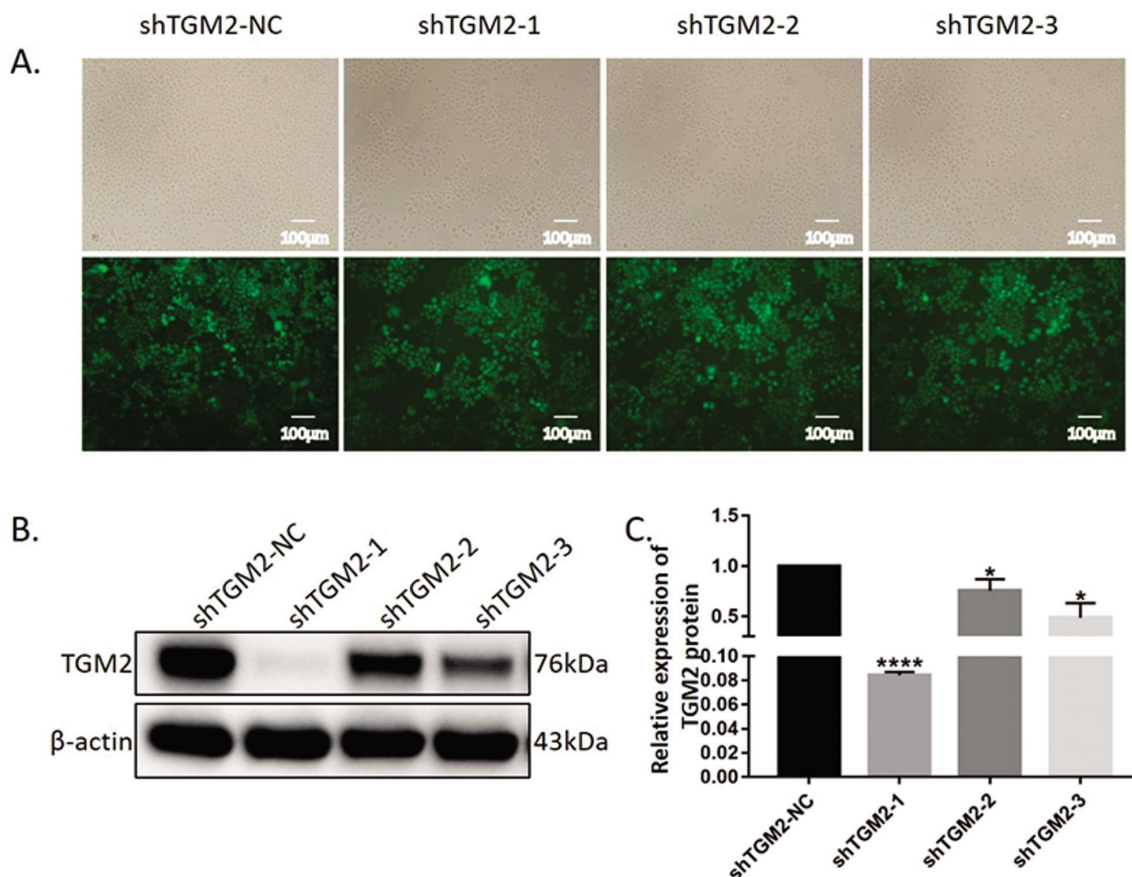


图 3 荧光显微镜和 western blotting 检测慢病毒转染及干扰效率

Fig.3 Detection of transfection and interfering efficiency by fluorescence microscope and western blotting

A: Results of fluorescence microscope; B: Results of western blotting; C: Analysis of gray value

Note: shTGM2-NC represents negative control; shTGM2-1, shTGM2-2 and shTGM2-3 represent experimental groups.

2.4 TGM2 下调对 BGC-823 增殖能力的影响

CCK-8 结果如图 4 所示, 阴性对照组(BGC-823-shTGM2-NC)和实验组(BGC-823-shTGM2-1)的相对 OD 值分别为: 1d(1 ± 0 vs 1 ± 0); 2d(1.762 ± 0.00598 vs 2.484 ± 0.2189); 3d(2.302 ± 0.05182 vs 3.254 ± 0.1051); 4d (3.219 ± 0.1246 vs 4.575 ± 0.04516); 5d(4.694 ± 0.02739 vs 5.666 ± 0.1526)。随着时间增加, 和阴性对照组 BGC-823-shTGM2-NC 相比, 实验组 BGC-823-shTGM2-1 的细胞增殖能力从第二天开始明显减慢, 且 $*P < 0.05$ (2d), $**P < 0.01$ (3d), $***P < 0.001$ (4d), $**P < 0.01$ (5d), 差异具有统计学意义。这些结果表明 TGM2 下调明显抑制了 BGC-823 的增殖能力。

2.5 TGM2 下调对 BGC-823 细胞迁移和侵袭能力的影响

Transwell 实验结果如图 5 所示, 相比对照组(shTGM2-NC)的迁移(201 ± 7.506)和侵袭(190.7 ± 12.25)细胞数目, 实验组(shTGM2-1)迁移(75.67 ± 9.684)和侵袭(86.33 ± 8.647)的细胞数目明显下降, 且 $***P < 0.001$ 和 $**P < 0.01$, 差异

具有统计学意义。这些结果表明 TGM2 下调明显抑制了 BGC-823 的迁移和侵袭能力。

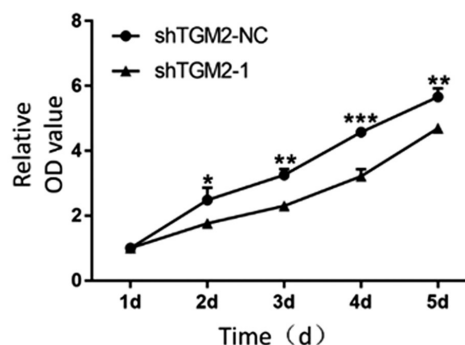


图 4 CCK-8 法检测 TGM2 下调对 BGC-823 增殖能力的影响

Fig.4 Detection the effect of TGM2 downregulation on BGC-823 proliferation by CCK-8 test

Note: shTGM2-NC represents negative control; shTGM2-1 represents experimental group.

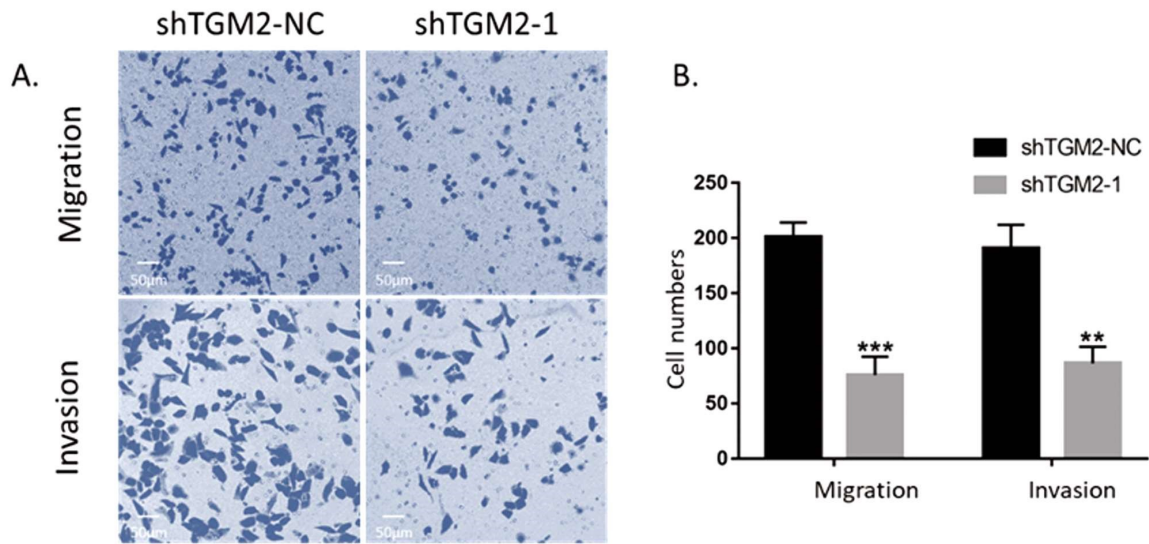


图 5 Transwell 法检测 TGM2 下调对 BGC-823 迁移和侵袭能力的影响(200×)

Fig.5 Detection the effect of TGM2 downregulation on BGC-823 migration and invasion by Transwell(200×)

A: Results of Transwell; B: Analysis of Transwell results

Note: shTGM2-NC represents negative control; shTGM2-1 represents experimental group.

2.6 Western blotting 检测 TGM2 下调后凋亡、迁移和侵袭相关蛋白表达改变

为探索 TGM2 下调后, BGC-823 增殖、迁移和侵袭能力被抑制的机制, 我们检测了 TGM2 下调后凋亡、迁移和侵袭相关蛋白的表达水平变化。如图 6 所示, 对照组(shTGM2-NC)和实验组(shTGM2-1)的相对灰度值分别为: NF-κB/β-actin(1 ± 0 vs

0.7792 ± 0.07334); Bcl-2/β-actin (1 ± 0 vs 0.8504 ± 0.01236); Bax/β-actin(1 ± 0 vs 0.8399 ± 0.05391)。和对照组(shTGM2-NC)相比, 实验组(shTGM2-1)的 NF-κB 和 Bcl-2 表达水平下调, 而 Bax 表达水平上调, 且 * $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 和 **** $P < 0.0001$, 差异均具有统计学意义。

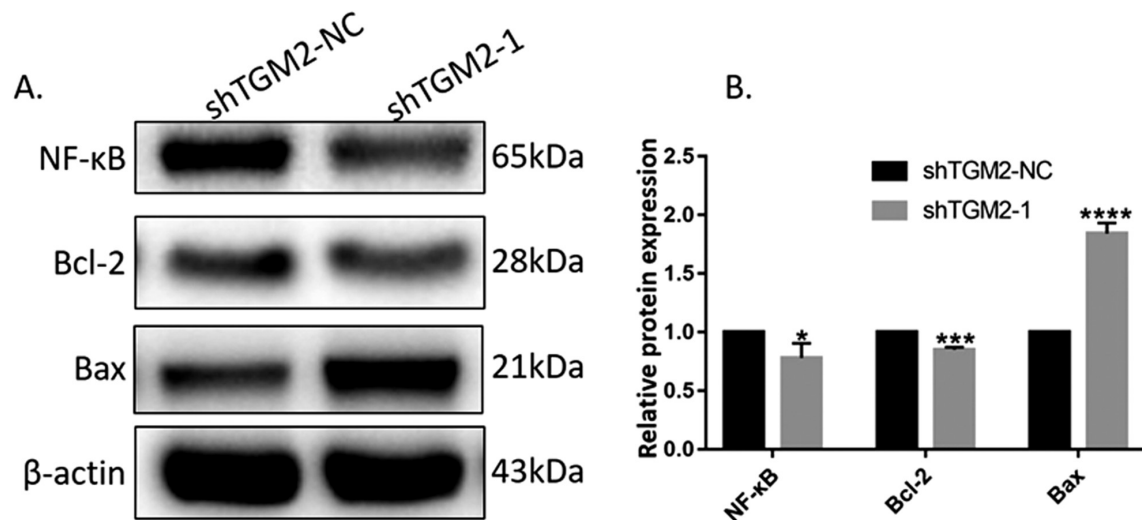


图 6 Western blotting 检测 TGM2 下调后凋亡、迁移和侵袭相关蛋白表达改变

Fig.6 Detection the effect of TGM2 downregulation on the expression of proteins associated with apoptosis, migration and invasion by western blotting

A: Results of western blotting; B: Analysis of gray value

Note: shTGM2-NC represents negative control; shTGM2-1 represents experimental group.

3 讨论

肿瘤转移, 顾名思义, 即肿瘤细胞从原发部位转移到其他器官的过程, 肿瘤的转移过程比较复杂, 受到多个环节和因素的调控^[27]。原发肿瘤转移所形成的转移灶难以通过外科手术进行彻底切除, 而且肿瘤转移更易导致抗药性的形成。肿瘤转移

与大多数的临床癌症患者死亡相关, 已经成为癌症治疗的主要绊脚石^[28,29], 为肿瘤患者自身、家庭以及社会公共卫生带来了沉重的负担。故而研究肿瘤转移的具体机制对于肿瘤患者的治疗则具有重要的临床意义。

最近研究表明, TGM2 在早期癌症的转移环节起到重要作用^[9]。与非转移性癌细胞相比, TGM2 在转移性癌细胞中表达水

平升高^[6-13]。前面我们提到的细胞外 TGM2 与钙离子结合以后,其转酰胺基酶活性被激活,可以促进细胞黏附和细胞外基质交联。上皮-间质化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)是细胞转移的第一步,也是关键的一步^[14]。获得 EMT 表型的肿瘤细胞具有极性消失和与邻近细胞连接分解特征,从而可以与邻近细胞分离,侵袭和转移到其他部位。所以具有 EMT 表型的肿瘤细胞则具有更大的侵袭和转移倾向^[15]。据文献报道,包括胰腺癌,乳腺癌,前列腺癌,黑色素瘤和具有高转移潜能的卵巢癌在内的许多癌细胞表达高水平的 TGM2,并且显示 EMT 表型^[16-19]。总的来说,TGM2 诸多肿瘤细胞中高表达,与肿瘤细胞 EMT 表型的获得密切相关。有研究发现,TGM2 能够通过激活 NF- κ B 来促进肿瘤细胞获得 EMT 表型^[20-22]。关于 TGM2 在胃癌中的相关文献报道较少,有研究表明 TGM2 可能通过 ERK1/2 通路增强胃癌细胞增殖、侵袭和转移能力^[18],但是其具体作用机制仍然阐释的不是很清楚。因此,探索 TGM2 在胃癌中的表达情况,TGM2 与胃癌转移的关系具有十分重要的意义。

我们的研究结果表明,TGM2 在胃癌细胞以及胃癌组织中高表达,而且下调 TGM2 表达能明显抑制胃癌细胞 BGC-823 的增殖、迁移和侵袭能力。本研究采用 qRT-PCR 和蛋白质印迹的方法检测了 TGM2 在 BGC-823 中的 mRNA 和蛋白水平,发现 TGM2 在 mRNA 和蛋白水平的表达均明显高于 GES;而且对胃癌组织芯片免疫组化染色结果分析显示,TGM2 在胃癌中的表达明显高于癌旁组织。同时,为了研究 TGM2 对胃癌细胞 BGC-823 增殖、迁移和增殖的影响,我们利用慢病毒包装的 shRNA 构建了 TGM2 低表达的 BGC-823 细胞系,荧光显微镜下观察结果显示转染效率均超过 90%,蛋白质印迹结果显示实验组 TGM2 表达水平明显低于对照组,提示 TGM2 低表达细胞系构建成功,我们选择了干扰效果最好的 BGC-823-shTGM2-1 进行后续的功能实验研究;利用 CCK-8 绘制胃癌细胞 BGC-823 增殖曲线,对曲线进行分析后我们发现,TGM2 下调后,BGC-823 的增殖速度明显减慢;分析 Transwell 实验结果我们发现,TGM2 下调以后,BGC-823 细胞的迁移和侵袭能力明显减弱。这些研究结果表明,TGM2 在胃癌细胞和胃癌组织中高表达,而且下调 TGM2 可以抑制胃癌细胞 BGC-823 的增殖、迁移和侵袭能力。

本研究还对 TGM2 影响胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力的分子机制进行了初步探索。蛋白质印迹结果显示,在 TGM2 下调后,相比阴性对照组,NF- κ B 和 Bcl-2 的蛋白表达水平明显下调,而 Bax 的蛋白表达水平明显上调。据文献报道,Bcl-2 家族与细胞凋亡密切相关,其表达和调控是影响细胞凋亡的关键因素之一。Bcl-2 家族根据功能主要分为两大类,其一是凋亡抑制蛋白,其二是凋亡促进蛋白。而 Bcl-2 和 Bax 则分别是 Bcl-2 家族典型的凋亡抑制蛋白和凋亡促进蛋白,Bcl-2 (凋亡抑制蛋白)和 Bax (凋亡促进蛋白)的表达水平改变与多种肿瘤的发生、发展密切相关^[30,31]。同时有研究提示,Bcl-2 与 Bax 的比值(Bcl-2/Bax 比值)与细胞凋亡也密切相关,当 Bcl-2 在细胞中表达上调时,Bcl-2/Bax 比值上升,Bcl-2 与 Bax 形成异源二聚体,主要发挥抗凋亡的作用;然而当 Bax 在细胞中表达上调时,Bcl-2/Bax 比值下降,Bax 自身形成大量同源二聚体,响应细胞死亡信号而加速细胞凋亡^[30]。前面文献回顾提示

TGM2 通过激活 NF- κ B 来促进肿瘤细胞获得上皮间充质转化(EMT)表型,从而促进肿瘤细胞的转移。结合文献回顾以及我们的实验结果,我们可以得到以下结论:在 TGM2 下调后,可能通过抑制 Bcl-2 (凋亡抑制蛋白)的表达,促进 Bax (凋亡促进蛋白)的表达,Bcl-2/Bax 比值下降,导致大量 Bax 同源二聚体形成,响应细胞死亡信号而促进胃癌细胞 BGC-823 的凋亡,从而抑制胃癌细胞的增殖;TGM2 表达下调后,可能通过抑制 NF- κ B 的表达,抑制胃癌细胞 BGC-823 上皮间充质转化表型(EMT)的获得,进而抑制了胃癌细胞的迁移和侵袭。

综上所述,本研究检测了 TGM2 在胃癌细胞以及胃癌组织中的表达情况,成功构建了 TGM2 低表达的胃癌 BGC-823 细胞模型,并在该模型上的基础上检验了 TGM2 对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响,接着初步探索了 TGM2 抑制胃癌细胞 BGC-823 增殖、迁移和侵袭的分子机制。结果表明 TGM2 下调能抑制胃癌细胞 BGC-823 的增殖、迁移和侵袭能力,并和 NF- κ B 的表达下调,以及 Bcl-2/Bax 比值下降有关。本研究成功构建了 TGM2 低表达的胃癌细胞系,为后续实验提供了基础;同时我们的实验结果为研究 TGM2 在胃癌中的具体作用提供了新证据,并且为胃癌的临床治疗提供了新靶点。但是本研究仍存在不足之处,首先我们的机制探索部分较为薄弱,仍需要更多的实验数据来支持;其次,我们研究尚停留在分子和细胞层面,我们的结论需要在动物实验以及临床实验中得到验证。我们将在后续实验中对 TGM2 在胃癌发生、发展所扮演的角色展开更加深入的研究。

参考文献(References)

- [1] Eckert R L, Kaartinen M T, Nurminskaya M, et al. Transglutaminase regulation of cell function[J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(2): 383-417
- [2] Király R, Demény M, Fésüs L. Protein transamidation by transglutaminase 2 in cells: a disputed Ca^{2+} -dependent action of a multifunctional protein[J]. *FEBS Journal*, 2011, 278(24): 4717-4739
- [3] Jung H J, Chen Z, Wang M, et al. Calcium blockers decrease the bortezomib resistance in mantle cell lymphoma via manipulation of tissue transglutaminase activities[J]. *BLOOD*, 2012, 119(11): 2568-2578
- [4] Liu S, Cerione R A, Clardy J. Structural basis for the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(5): 2743-2747
- [5] Mehta K, Fok J Y, Mangala L S. Tissue transglutaminase: from biological glue to cell survival cues[J]. *Front Biosci*, 2006, 11: 173-185
- [6] Mehta K, Fok J, Miller F R, et al. Prognostic significance of tissue transglutaminase in drug resistant and metastatic breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(23): 8068-8076
- [7] Shao M, Cao L, Shen C, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition and ovarian tumor progression induced by tissue transglutaminase[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(24): 9192-9201
- [8] Han A L, Kumar S, Fok J Y, et al. Tissue transglutaminase expression promotes castration-resistant phenotype and transcriptional repression of androgen receptor[J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(9): 1685-1696
- [9] Jeong J H, Cho B C, Shim H S, et al. Transglutaminase 2 expression predicts progression free survival in non-small cell lung cancer patients treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase

- inhibitor[J]. J Korean Med Sci, 2013, 28(7): 1005-1014
- [10] Miyoshi N, Ishii H, Mimori K, et al. TGM2 is a novel marker for prognosis and therapeutic target in colorectal cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17(4): 967-972
- [11] Leicht D T, Kausar T, Wang Z, et al. TGM2: a cell surface marker in esophageal adenocarcinomas[J]. J Thorac Oncol, 2014, 9(6): 872-881
- [12] Erdem S, Yegen G, Telci D, et al. The increased transglutaminase 2 expression levels during initial tumorigenesis predict increased risk of metastasis and decreased disease-free and cancer-specific survivals in renal cell carcinoma[J]. World J Urol, 2015, 33(10): 1553-1560
- [13] Verma A, Wang H, Manavathi B, et al. Increased expression of tissue transglutaminase in pancreatic ductal adenocarcinoma and its implications in drug resistance and metastasis [J]. Cancer Res, 2006, 66(21): 10525-10533
- [14] Shibue T, Weinberg R A. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2017, 14(10): 611-629
- [15] Thiery J P, Acloque H, Huang R Y, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease [J]. Cell, 2009, 139(5): 871-890
- [16] Pierce A, Whetton A D, Meyer S, et al. Transglutaminase 2 expression in acute myeloid leukemia: association with adhesion molecule expression and leukemic blast motility [J]. Proteomics, 2013, 13(14): 2216-2224
- [17] Eckert R L, Kaartinen M T, Nurminskaya M, et al. Transglutaminase regulation of cell function[J]. Physiol Rev, 2014, 94(2): 383-417
- [18] Mehta K. Biological and therapeutic significance of tissue transglutaminase in pancreatic cancer[J]. Amino Acids, 2009, 36(4): 709-716
- [19] Agnihotri N, Mehta K. Transglutaminase-2: evolution from pedestrian protein to a promising therapeutic target [J]. Amino Acids, 2017, 49(3): 425-439
- [20] Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer [J]. Oncogene, 2010, 29(34): 4741-4751
- [21] Kotiyal S, Bhattacharya S. Breast cancer stem cells, EMT and therapeutic targets [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 453(1): 112-116
- [22] Creighton C J, Chang J C, Rosen J M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in tumor-initiating cells and its clinical implications in breast cancer [J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010, 15(2): 253-260
- [23] Jun J K, Choi K S, Lee H Y, et al. Effectiveness of the Korean National Cancer Screening Program in Reducing Gastric Cancer Mortality[J]. Gastroenterology, 2017, 152(6): 1319-1328
- [24] Van Cutsem E, Sagaert X, Topal B, et al. Gastric cancer [J]. The Lancet, 2016, 388(10060): 2654-2664
- [25] 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
- [26] Wang G, Liu J, Cai Y, et al. Loss of Barx1 promotes hepatocellular carcinoma metastasis through up-regulating MGAT5 and MMP9 expression and indicates poor prognosis [J]. ONCOTARGET, 2017, 8(42): 71867-71880
- [27] Huang S, Ingber D E. A non-genetic basis for cancer progression and metastasis: self-organizing attractors in cell regulatory networks[J]. Breast Dis, 2006, 26: 27-54
- [28] Lambert A W, Pattabiraman D R, Weinberg R A. Emerging Biological Principles of Metastasis[J]. Cell, 2017, 168(4): 670-691
- [29] Steeg P S. Targeting metastasis [J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16(4): 201-218
- [30] Chao D T, Korsmeyer S J. BCL-2 family: regulators of cell death[J]. Annu Rev Immunol, 1998, 16: 395-419
- [31] Delbridge A R, Grabow S, Strasser A, et al. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies [J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16(2): 99-109

(上接第 1841 页)

- [62] Parikh D C, Amin A F. In vitro and in vivo techniques to assess the performance of gastro-retentive drug delivery systems: a review[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2008, 5(9): 951-965
- [63] Quispe-Condori S, Saldana M D A, Temelli F. Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying [J]. LWT-Food SciTechnol, 2011, 44(9): 1880-1887
- [64] Cam M, Icyer N C, Erdogan F. Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development [J]. LWT-Food SciTechnol, 2014, 55(1): 117-123
- [65] Sharma M, Kohli S, Dinda A. In-vitro and in-vivo evaluation of repaglinide loaded floating microspheres prepared from different viscosity grades of HPMC polymer [J]. Saudi Pharm J, 2015, 23(6): 675-682
- [66] Venkateswarlu V, Manjunath K. Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles [J]. J Control Release, 2004, 95(3): 627-638