

MUC16 对胆囊癌细胞生物学行为的调控作用及机制分析

刘畅¹, 张珉¹, 田兴²

(1. 郑州大学附属肿瘤医院, 河南 郑州 450008;

2. 郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450008)

摘要: [目的] 探讨黏蛋白 16(MUC16) 对人胆囊癌细胞 NOZ 增殖、侵袭、转移的影响以及可能的分子机制。[方法] 通过慢病毒转染体系, 构建过表达 MUC16 的人胆囊癌细胞株 NOZ, 以及空病毒质粒转染细胞。MTT 实验检测过表达 MUC16 对细胞体外增殖能力的影响; 划痕实验和 Transwell 迁移小室实验检测过表达 MUC16 对细胞体外迁移和侵袭能力的影响; 黏附实验检测过表达 MUC16 对细胞黏附能力的影响; Western blot 检测 MUC16 调控 NOZ 细胞生物学行为可能的通路机制。[结果] MUC16 过表达细胞系生长速度明显高于对照组 ($P < 0.05$); 并且 MUC16 转染 NOZ 细胞系体外迁移能力、划痕愈合能力以及黏附能力均较空质粒对照组细胞增强 ($P < 0.05$); MUC16 可明显提高 MMP2、MMP7、p-Akt 蛋白的表达以及 PI3K 激酶的活性 ($P < 0.05$)。[结论] MUC16 可以通过激活 PI3K/Akt 信号通路, 增加胆囊癌细胞体外的增殖、侵袭以及转移能力。

关键词: 黏蛋白 16; 胆囊肿瘤; 增殖; 侵袭; PI3K/Akt 信号通路

中图分类号: R735.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)05-0436-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.05.B012

Effect of MUC16 on Biological Behavior of Gallbladder Carcinoma Cells and Its Mechanism

LIU Chang¹, ZHANG Min¹, TIAN Xing²

(1. The Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China;

2. The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect and mechanism of mucin16(MUC16) on the invasion and metastasis ability of gallbladder carcinoma cells. [Methods] MUC16 lentivirus vector was constructed and transfected into gallbladder carcinoma NOZ cells. The cell proliferation was measured by MTT method, cell invasion ability was determined by Transwell membrane assay, cell metastasis ability was detected by wound scratch assay, and cell adhesion was tested by fibronectin assay. The expression levels of MMP2 and MMP9 in NOZ cells were detected by Western blot. [Results] The proliferation, and invasion, metastasis and adhesion abilities in vitro of MUC16-transfected NOZ cells were increased compared to control cells ($P < 0.05$). The expressions of MMP2 and MMP7 protein and p-Akt protein in NOZ-MUC16 cells were higher than those in the NOZ control cells ($P < 0.05$). [Conclusion] MUC16 can increase the proliferation, and invasion, metastasis and adhesion abilities of gallbladder carcinoma cells in vitro by activating PI3K/Akt pathway.

Subject words: mucin16; gallbladder; proliferation; invasion; PI3K/Akt pathway

胆囊癌在西方国家较为少见, 但是我国胆囊癌尤其是女性胆囊癌的发病率一直居高不下, 甚至呈逐年上升趋势^[1]。由于胆囊癌早期临床症状不明显,

诊断较为困难, 易出现漏诊、误诊; 加之胆囊癌恶性程度高、病情发展迅速、预后差, 大多数患者确诊时已发生淋巴结转移, 错过了手术的最佳时机, 因此, 胆囊癌患者预后极差, 死亡率较高^[2]。迄今为止胆囊癌的发病机制仍不明确, 而且发病隐匿, 缺少特异性临床标志物, 大大增加了早期诊断和治疗的困难, 因此提高胆囊癌的早期诊断率一直是肿瘤学领域研究

基金项目: 国家自然科学基金(U1404820)

通信作者: 刘畅, 主治医师, 硕士; 郑州大学附属肿瘤医院重症医学科, 河南省郑州市金水区东明路 127 号(450008); E-mail: ddn810625@126.com

收稿日期: 2018-01-03; **修回日期:** 2018-02-12

的重点^[3]。近些年,黏蛋白(mucin,MUC)在肿瘤发生发展过程中的作用逐渐引起人们的关注^[4]。MUC是一类由分泌上皮细胞分泌的、具有单次跨膜结构的高度糖基化蛋白,在调控信号转导通路、免疫应答等生理病理过程中具有双重作用^[5]。MUC16基因是位于染色体19p13.2位点上的不均一黏蛋白,是卵巢癌特异性诊断标志物。目前关于胆囊癌细胞和MUC16之间的关系研究较少。本研究通过采用慢病毒系统,建立MUC16过表达及干扰细胞系,探讨MUC16对胆囊癌NOZ细胞株生物学行为的调控作用以及对磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositol3-kinase,PI3K)/Akt信号通路的调控作用,为胆囊癌诊断和治疗提供潜在的靶点。

1 材料与方法

1.1 受试细胞

人NOZ胆囊癌细胞来源于American Type Culture Collection(ATCC)细胞库。

1.2 主要试剂

小干扰RNA和PCR引物由上海生工生物工程有限公司合成并提供;BCA蛋白浓度测定试剂盒购自中国博士德生物工程有限公司;cDNA合成试剂盒、荧光定量PCR试剂盒购自美国Omega生物公司;人磷酸肌醇3-激酶活性ELISA检测试剂盒购自上海信然实业有限公司;Western blotting检测系统购自Amersham-Pharmacia公司。

DMEM高糖细胞培养基购自美国Gibco公司;胰蛋白酶-EDTA细胞消化液(0.25%)购自北京钮因华信科技发展有限公司;FBS胎牛血清和链霉素-青霉素双抗购自美国ThermoFisher公司;Trizol购自美国Invitrogen公司;DEPC购自美国Sigma公司;30% H₂O₂购自上海碧云天生物技术有限公司;磷酸盐缓冲液、氯仿、异丙醇、无水乙醇购自国药集团化学试剂有限公司;生理盐水购自安徽双鹤药业有限责任公司。

质粒pcDNA3.1-MUC16-myc、过表达慢病毒质粒pGC-FU-MUC16-GFP及MUC16过表达、干扰慢病毒均由上海吉凯基因化学有限公司构建并鉴定。

MMP-2、MMP-7、p-AKT/AKT、PTEN抗体购自Cell Signaling Technology公司; β -actin一抗购自美

国Sigma公司。

1.3 主要仪器

Eppendorf 5427 R台式高速冷冻离心机,德国Eppendorf;JB-CJ-1500FX超净工作台,苏州佳宝净化工程设备有限公司;实时定量PCR仪,美国MJ Research公司;UV-8000紫外分光光度计,上海精密仪器仪表公司;iMake多功能酶标仪,日本Bio-Rad公司;CX41倒置光学显微镜和OLS4100激光共聚焦显微镜,日本奥林巴斯医疗公司;电子分析天平,上海玉研科学仪器有限公司;Amersham电泳仪,瑞典Bioscience公司;恒温水浴摇床和YCZ-40D型转移电泳槽,北京六一仪器厂;FluorChem FC3凝胶成像数码分析系统,美国ProteinSimple公司。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养

将NOZ细胞培养在含有10%FBS的DMEM培养基中,将细胞置于37℃,5%CO₂细胞培养箱中进行培养。24~48h更换培养液,48h传代1次。

1.4.2 慢病毒载体构建

委托上海吉凯基因化学公司进行全长MUC16真核表达质粒(pcDNA3.1-MUC16-myc)和慢病毒表达质粒(lenti-MUC16-GFP)。

1.4.3 细胞转染

提前1d在相应备行转染的6孔板上接种 5×10^8 个细胞,培养24~48h后,在2ml EP管中分别加入适量生理盐水,然后按照PEI试剂说明书,分别加入相应质粒和PEI液,混匀,室温放置10min;随即在DNA溶液中加入PEI液,振荡混匀后,室温放置10min;将上述两种溶液吹打混匀,室温放置30min;并将混匀后的脂质体-质粒DNA复合液滴加至细胞表面,置于37℃,5%CO₂细胞培养箱中培养24~48h。提取细胞RNA及蛋白,验证目的基因表达情况及转染效率。

1.4.4 慢病毒感染

将NOZ细胞接种至6孔板中,待细胞汇合率为50%~60%时加入采用无血清的DMEM培养液稀释的慢病毒液(MOI=10~30)。8h后,更换细胞培养液,加入含有10%FBS的DMEM培养液。

1.4.5 MTT法检测MUC16过表达细胞系对NOZ细胞增殖活性的影响

将100 μ l慢病毒感染后MUC16稳转细胞和对

照 GFP 细胞接种至 96 孔板中,每孔 3 板,3 个细胞,每孔加入 100 μ l 含 10%FBS 的 DMEM 培养液,每隔 24h 选择 6 个重复孔加入 20 μ l MTT,置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 4h 后,弃除上清液,每孔加入 200 μ l DMSO,置于振荡器上震动 5min,置于显微镜下观察无紫色结晶物。将 96 孔板放置于 450 酶标仪上,检测波长为 570nm,参比波长为 450nm 处的吸光光度值(OD 值),计算平均值。

1.4.6 划痕实验

将 NOZ 细胞接种至 12 孔板中,待细胞汇合率为 50%~60%时,弃去培养基,用 200 μ l 黄枪尖划痕,加入新鲜培养基,每隔 24h 置于倒置显微镜下观察拍照。

1.4.7 迁徙与侵袭实验

采用胰蛋白酶消化细胞,将细胞置入离心管中,离心,弃上清;加入无血清的 DMEM 重悬;调整细胞浓度为 3×10^3 个/ml。将 1ml 人 NOZ 胆囊癌细胞单层接种到 6 孔板中由胶原包被的 transwell 小室中,内部小室中放入无血清的 DMEM,外部小室中放入含有 10%FBS 的 DMEM 培养液,置于 37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 细胞培养箱中孵育 72h;将侵袭小室用 4%多聚甲醛固定 30min,然后用 0.1%的结晶紫染色 30min,显微镜下观察穿过膜的细胞数,计算迁移率。

1.4.8 纤连蛋白黏附实验

(1)用无菌 PBS 缓冲液将 Fn 原液稀释为 20 μ g/ml,加入 96 孔板中,50 μ l/L,置于 37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 细胞培养箱中包被 2h;(2)用无菌 PBS 冲洗 2 遍后,每孔加入 100 μ l BSA 溶液,置于 37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 细胞培养箱中孵育 2h;(3)采用胰蛋白酶消化细胞,将细胞置入离心管中,离心,弃上清;加入无血清的 DMEM 重悬;调整细胞浓度为 3×10^5 个/ml,每孔加入 100 μ l 细胞,置于 37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 细胞培养箱中培养;(4)30min 和 90min 时分别取出 96 孔板,每个组选择 4 个平行对照孔,用 PBS 清洗,置于倒置显微镜下观察细胞黏附情况。

1.4.9 Western blot

①提取蛋白样品;②蛋白样品凝胶电泳;③转膜;④封闭;⑤加入一抗孵育;⑥加入二抗孵

育;⑦显影;⑧采用化学发光法检测膜上的蛋白表达条带,采用 FluorChem FC3 凝胶成像数码分析系统进行定量分析,以积分光密度(OD)表示灰度值。

1.5 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计学软件进行数据分析;采用卡方检验进行定性资料分析,定量资料组间比较采用 *t* 检验,方差不齐则采用秩和检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达 MUC16 对 NOZ 细胞体外增殖活性的影响

MTT 检测结果显示,随着细胞生长时间的延长,MUC16 过表达细胞系生长速度明显高于对照组;尤其是 96h 之后,两组细胞的 OD 值差异有统计学意义($t=3.273, 5.630, 8.524$; *P* 均<0.05)(Table 1)。

2.2 过表达 MUC16 对 NOZ 细胞转移能力的影响

过表达 MUC16 可明显提高 NOZ 细胞体外迁移能力,与对照组相比,差异有统计学意义($t=10.469$, *P*<0.05)(Figure 1)。

2.3 过表达 MUC16 对 NOZ 细胞侵袭能力的影响

经划痕实验结果显示,过表达 MUC16 可明显增加 NOZ 细胞体外划痕愈合能力,与对照组相比,差异有统计学意义($t=8.429$, *P*<0.05)(Figure 2)。

2.4 过表达 MUC16 对 NOZ 细胞黏附能力的影响

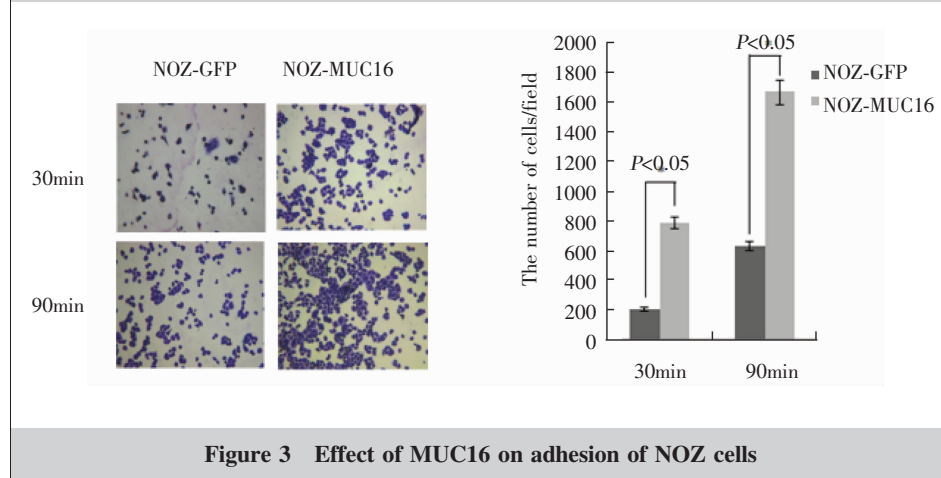
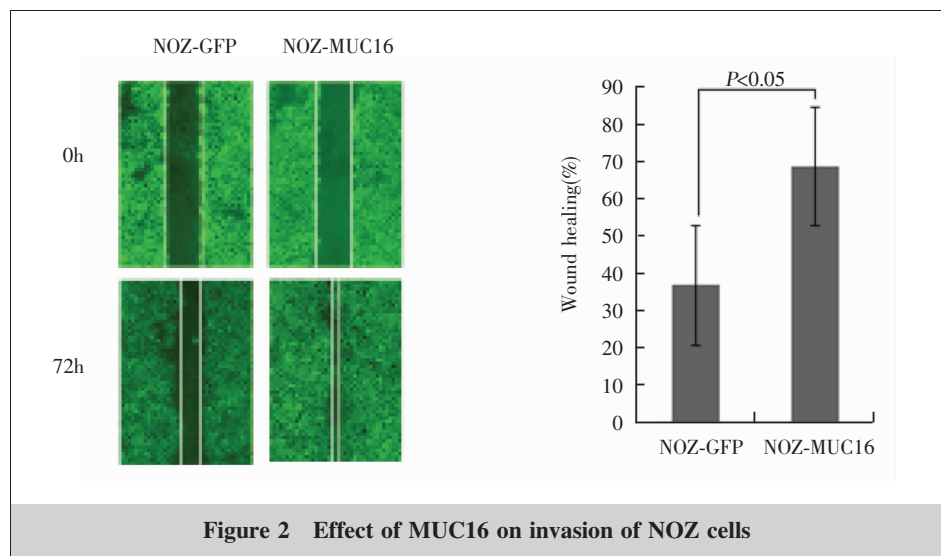
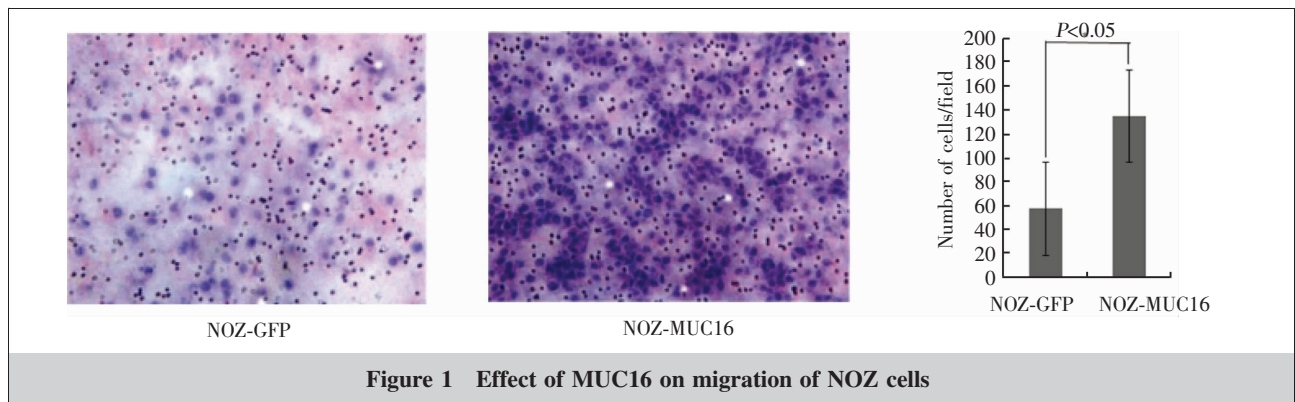
细胞 Fn 黏附实验结果显示,过表达 MUC16 可明显增加 NOZ 细胞体外对 ECM 的黏附能力,与对照组相比,30min、90min 差异均有统计学意义($t=16.435, 7.928$; *P*<0.05)(Figure 3)。

2.5 MUC16 对 MMP2 和 MMP7 mRNA 表达的影响

Western blot 结果显示,MUC16 可以明显提高 MMP2 和 MMP7 蛋白的表达,差异均有统计学意义($t=15.702, 23.901$, *P*<0.05)(Figure 4)。

Table 1 The effect of MUC16 on proliferation of NOZ cells in different time

OD	24h	48h	72h	96h	120h	144h
MUC16 trabsfected cells	0.137 $\pm$ 0.08	0.327 $\pm$ 0.07	0.587 $\pm$ 0.09	1.125 $\pm$ 0.11	1.489 $\pm$ 0.12	1.868 $\pm$ 0.12
Control cells	0.141 $\pm$ 0.10	0.315 $\pm$ 0.08	0.529 $\pm$ 0.10	0.964 $\pm$ 0.11	1.174 $\pm$ 0.13	1.371 $\pm$ 0.14
<i>t</i>	0.099	0.357	1.363	3.273	5.630	8.524
<i>P</i>	0.922	0.725	0.190	0.004	<0.001	<0.001



3 讨论

胆囊癌是临床上常见的肝外胆道恶性肿瘤,发病隐匿、恶性程度高、进展迅速,早期确诊率较低,因此患者预后较差,死亡率较高^[2]。目前临床上外科手术切除是治疗胆囊癌患者的最佳方案,但是由于胆囊癌发病初期缺乏敏感的诊断特异性分子标志物,早期确诊率较低,导致很多患者错过了手术的最佳时机,寻找早期诊断标志物以及新的治疗方向是临床上急需解决的难题。

近年,国内外对于黏蛋白与疾病发生发展关系的研究一直是肿瘤领域的热点^[4,6]。MUC 属于一种高分子量的跨膜糖蛋白,在癌变细胞中通常表达异常,但是目前关于 MUC 与胆囊癌的关系尚缺乏较深

2.6 MUC16 对 PI3K/Akt 信号通路的影响

Western blot 结果显示,MUC16 可明显上调 Akt 磷酸化蛋白的表达($t=15.767, P<0.05$)。MUC16 可明显激活 PI3K 酶活性,与对照组相比差异有统计学意义($t=5.660, P<0.05$);但是对 PTEN 蛋白表达水平无明显影响(Figure 5,6)。

入的研究^[7]。本项课题旨在探讨 MUC16 对人胆囊癌细胞 NOZ 增殖、侵袭、转移等生物学行为的影响。MUC16 高表达于消化道上皮细胞、子宫内膜等,大量研究显示,MUC16 在卵巢上皮细胞不表达或极低表达,而在卵巢癌细胞却高表达,因此 MUC16 一直被广泛用于卵巢癌的早期诊断^[8]。但是,最近越来越

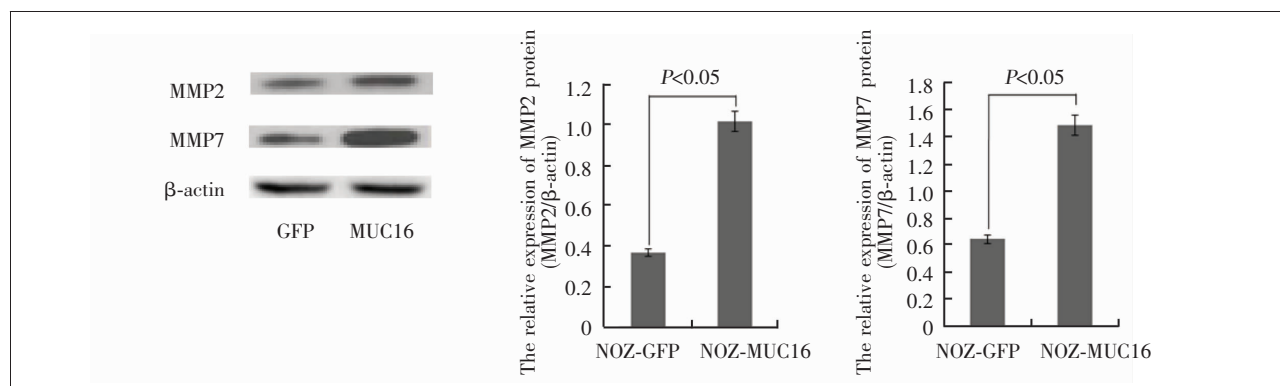


Figure 4 Effect of MUC16 on expression of MMP2 and MMP7

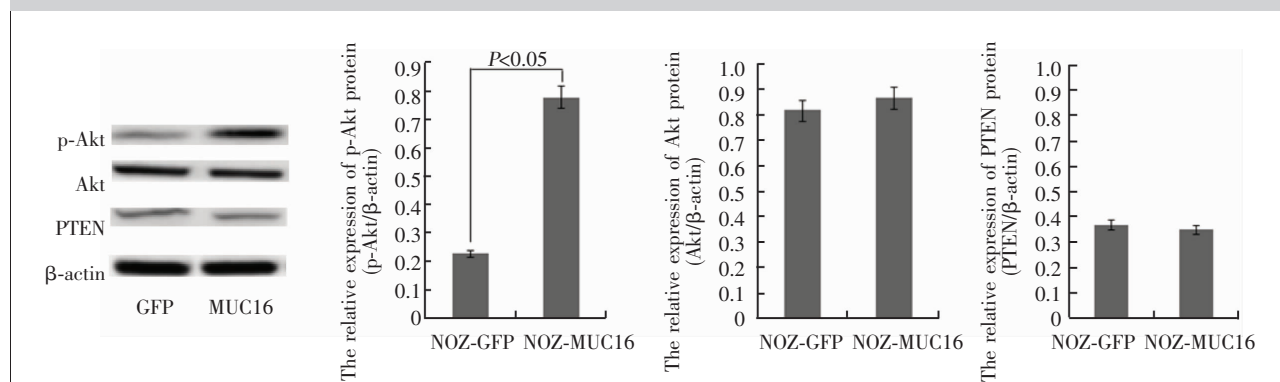


Figure 5 Effect of MUC16 on expression of p-Akt, Akt and PTEN

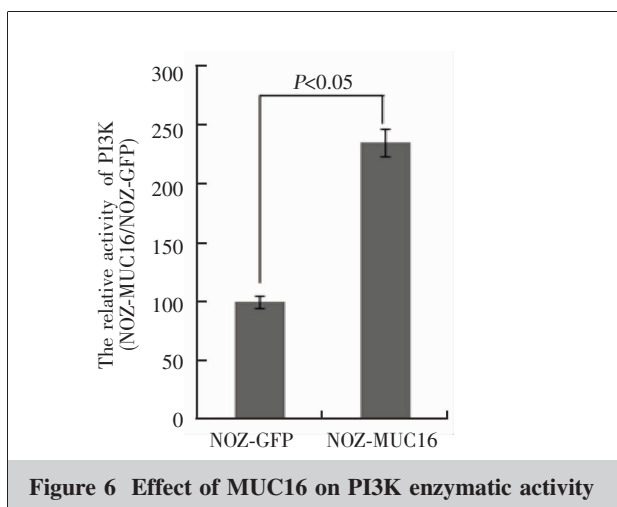


Figure 6 Effect of MUC16 on PI3K enzymatic activity

多的研究指出, MUC16 与肝外胆管癌的发生发展密切相关^[9]。Higashi 等^[10]研究发现 MUC16 在正常肝脏组织和肝内胆管组织中未见表达,但在肝外胆管癌细胞中 MUC16 呈高表达,且提示预后不良。说明 MUC16 可能与肝胆癌变有关。因此我们着重探讨了 MUC16 对胆囊癌细胞增殖、侵袭、转移的影响以及可能相关的分子机制,我们首先建立慢病毒转染体

系,经 MTT 法检测结果显示,随着细胞生长时间的延长, MUC16 过表达细胞系生长速度明显低于对照组;尤其是 96h 之后,两组细胞的 OD 值差异有统计学意义($P < 0.05$)。迁徙实验、划痕实验和黏附实验结果显示,过表达 MUC16 可明显增加 NOZ 细胞体外迁移能力、划痕愈合能力以及对 ECM 的黏附能力。

前期有研究曾证实,许多膜型黏蛋白可与酪氨酸激酶受体相互作用,调节 MARK 以及 PI3K/Akt 等信号通路^[11,12]。PI3K/AKT 通路 with 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs) 的表达有关^[13]。MUC16 是一种高分子量跨膜糖蛋白,其末端酪氨酸的磷酸化可以使 MUC16 与 PI3Kp85 调节亚基的 Scr 同源区(SH2)结构域结合,阻止 PI3Kp85 亚单位对 P110 催化亚基的抑制作用,从而激活 PI3K/Akt 信号通路^[14,15]。本项研究通过 Western blot 结果显示, MUC16 可以明显提高 MMP2 和 MMP7 蛋白的表达水平。为了进一步探讨 MUC16 对 PI3K/Akt 通路的影响,检测了 MUC16 转染 NOZ 细胞中 Akt 磷酸化水平,结果显示, MUC16 可明显上调 Akt 磷酸化蛋白的表达,并且同时激活 PI3K 激酶的活性,但是

对 PTEN 表达的影响不明显。

综上所述,本实验通过慢病毒转染获得稳定表达 MUC16 的人胆囊癌细胞株 NOZ,发现转染 MUC16 后,细胞体外增殖能力、侵袭能力以及转移能力均增强。初步探讨 MUC16 可能与 PI3K/AKT 信号通路的调控有关。本研究只是对 MUC16 对胆囊癌细胞生物学行为的影响及机制做了初步分析,需要更深入的研究进行继续探讨,以期为胆囊癌的靶向治疗提供新的研究方向。

参考文献:

- [1] Niculescu Z,Ulmeanu V,Ghinea MM,et al. Gallbladder carcinoma - a rare cause of pyloric-duodenalstenosis[J]. Rom J Morphol Embryol,2016,57(3):1165-1170.
- [2] Wong LL,Rademaker MT,Saw EL,et al. Identification of novel microRNAs in the sheepheartand their regulation in heart failure[J]. Sci Rep,2017,7(1):8250.
- [3] Wu S,He X,Li M,et al. MiRNA-34a overexpression inhibits multiple myeloma cancer stem cell growth in mice by suppressing TGIF2 [J]. Am J Transl Res,2016,8(12):5433-5443.
- [4] Taniguchi T,Woodward AM,Magnelli P,et al. Glycosylation affects the stability and barrier function of the MUC16 mucin [J]. J Biol Chem,2017,292 (26):11079-11090.
- [5] Lakshmanan I,Salfity S,Seshacharyulu P,et al. MUC16 regulates TSPYL5 for lung cancer cell growth and chemoresistance by suppressing p53[J]. Clin Cancer Res,2017,23(14):3906-3917.
- [6] Zhu T,Tao XC,Sun SB. Research progress of MUC1 and MUC16 in gallbladder carcinoma [J]. Journal of Practical Oncology,2016,30(6):568-571.[朱彤,陶宣辰,孙世波. MUC1 和 MUC16 在胆囊癌中的研究进展[J].实用肿瘤学杂志,2016,30(6):568-571.]
- [7] You Y,Bui K,Bui MM,et al. Histopathological and immunophenotypical features of intestinal-type adenocarcinoma of the gallbladder and its precursors[J]. Cancer Control,2014,21(3):247-250.
- [8] Cotton S,Azevedo R,Gaiteiro C,et al. Targeted O-glycoproteomics explored increased sialylationand identified MUC16 as a poor prognosis biomarker in advanced-stage bladder tumours[J]. Mol Oncol,2017,11(8):895-912.
- [9] Chen CY,Shiesh SC,Tsao HC,et al. The assessment of biliary CA125,CA199 and CEA in diagnosing cholangiocarcinoma—the influence of sampling time and hepatolithiasis[J]. Hepatogastroenterology,2002,49(45):616-620.
- [10] Higashi M,Yamada N,Yokoyama S,et al. Pathobiological implications of MUC16/CA125 expression in intrahepatic cholangio carcinoma-mass forming type [J]. Pathobiology,2012,79(2):101-106.
- [11] Kim SM,Oh SJ,Hur B,et al. Expression of MUC1 and MUC4 in gallbladder adenocarcinoma[J]. Korean J Pathol,2012,46(5):429-435.
- [12] Ghosh M,Kamma H,Kawamoto T,et al. MUC 1 core protein as a marker of gallbladder malignancy [J]. Eur J Surg Oncol,2005,31(8):891-896.
- [13] Takagawa M,Muguruma N,Oguri K,et al. Prediction of prognosis in gallbladder carcinoma by mucin and p53 immunohistochemistry[J]. Dig Dis Sci,2005,50(8):1410-1413.
- [14] Johnson MD. Do mesothelin/MUC16 interactions facilitate adenocarcinoma metastases to intracranial meningiomas? [J]. Surg Neurol Int,2016,7(Suppl 41):S1049-S1052.
- [15] Liang C,Qin Y,Zhang B,et al. Oncogenic KRAS targets MUC16/CA125 in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Mol Cancer Res,2017,15(2):201-212.