

OCT4 基因在胃癌细胞系中的表达及其意义*

黄正接^{1,2}, 王锐², 罗维远¹, 易文城², 曾岳岳², 罗琪^{1,2△}

1. 厦门大学附属第一医院 肿瘤外科(厦门 361003); 2. 福建医科大学第一临床医学院(福州 350004)

【摘要】 目的 检测八聚体结合蛋白-4(octamer-binding protein-4, OCT4)基因在不同分化程度的胃癌细胞株(MKN-28、SGC-7901、BGC-823)及正常胃黏膜细胞株 GES-1 中的表达情况,研究 OCT4 基因表达水平与胃癌细胞分化程度和侵袭力的相关性。**方法** RT-PCR 确定 GES-1、MKN-28、SGC-7901、BGC-823 中 OCT4 基因的表达水平, OCT4 siRNA 转染 BGC-823 细胞,分别通过荧光定量 PCR 和 Western blot 检测干扰 OCT4 基因表达的效果,并利用 Transwell 小室法研究 OCT4 在 BGC-823 细胞侵袭力中的作用。**结果** 正常人胃黏膜细胞中未检测到 OCT4 的表达,人胃癌细胞系分化程度越低, OCT4 基因表达量越高,低分化人胃癌细胞系 BGC-823 中 OCT4 基因表达最高,转染 OCT4 siRNA 的 BGC-823 细胞内的 OCT4 mRNA 和 OCT4 蛋白表达量明显下降($P < 0.05$)。干扰胃癌细胞 BGC-823 中 OCT4 基因的表达,穿膜细胞数量减少($P < 0.05$),侵袭力下降。**结论** OCT4 基因表达量与胃癌细胞的分化程度有关, OCT4 基因可能在胃癌细胞的分化中起重要作用,影响胃癌细胞的侵袭能力,其表达程度有望成为胃癌患者恶性度预测的参考指标之一。

【关键词】 八聚体结合蛋白-4 基因 胃癌细胞系 RNAi 分化程度

Expression of OCT4 in Gastric Cancer Cell Lines and Its Significance HUANG Zheng-jie^{1,2}, WANG Rui², LUO Wei-yuan¹, YI Wen-cheng², ZENG Yue-yue², LUO Qi^{1,2△}. 1. Department of Surgical Oncology, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China; 2. The First Clinical Medical College, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China

△ Corresponding author, E-mail: luoqixmzsh@126.com

【Abstract】 Objective To detect the expression of octamer-binding protein-4 (OCT4) in gastric cancer cell lines with different differentiation (MKN-28, SGC-7901, BGC-823) and normal gastric mucosal cells line GES-1, and further assess the relationship between OCT4 expression and the differentiation grade of gastric carcinoma cells. **Methods** Expression level of OCT4 in GES-1, MKN-28, SGC-7901 and BGC-823 was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and OCT4 siRNA was employed to interfere OCT4 expression in BGC-823 cell lines. Detect the quantity of OCT4 mRNA and OCT4 protein by fluorescent quantitative PCR and Western blot respectively. In addition, the invasion ability was analyzed via Transwell chamber. **Results** The normal gastric mucosal cells did not express OCT4 and there was higher expression of OCT4 in gastric cancer cell lines with poorly differentiation ($P < 0.05$). The expression of OCT4 in BGC-823 cells was the highest. The expression of OCT4 mRNA and OCT4 protein were decreased distinctly in BGC-823 cells after being interfered by OCT4 siRNA ($P < 0.05$). After being interfered by OCT4, BGC-823 cells were less aggressive, and the number of penetrating cells was decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** The OCT4 expression level is associated with gastric cancer differentiation. OCT4 may play an important role in the differentiation and invasion of gastric cancer cell and it may serve as a reference index in predicting the malignant grade of gastric cancer.

【Key words】 Octamer-binding protein-4 gene Gastric cancer cell lines RNAi Malignant grade

近年来,八聚体结合蛋白-4(octamer-binding protein-4, OCT4)基因作为维持干细胞多潜能性和自我更新的关键基因之一,成为干细胞相关研究的焦点^[1,2]。OCT4 基因除了在维持细胞自我更新上起着重要作用外,还在髓细胞白血病、膀胱癌、胃癌

等肿瘤组织中高表达^[3-5], 研究显示胃癌组织的 OCT4 基因表达水平明显高于癌旁和正常组织^[5]。然而, OCT4 与肿瘤细胞分化程度的关系及其对肿瘤侵袭力等病理生物学行为的作用,目前尚在探索中。有报道称,通过慢病毒载体转染并沉默特定基因在胃癌细胞的表达,可以抑制胃癌细胞的生长^[6]。本研究检测 OCT4 基因在正常胃黏膜细胞和不同分化程度胃癌细胞株中的表达情况,并采用 RNA 干扰(RNAi)技术沉默 OCT4 基因的表达,以研究其表达水平对胃癌细胞侵袭力的影响。

* 福建省科技计划重点项目(No. 2010D026)、福建省医学创新课题(No. 2012-CXB-29)和厦门市科技计划项目(No. 3502Z20124018)资助

△ 通讯作者, E-mail: luoqixmzsh@126.com

1 材料和方法

1.1 材料

MKN-28、SGC-7901、BGC-823 分别为高、中、低分化人胃癌细胞系, GES-1 为胃黏膜正常细胞, 均由厦门大学附属第一医院肿瘤中心保存, TRNzol 总 RNA 提取试剂及定量 PCR RealMasterMix (SYBR Green) 试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, RT-PCR 试剂盒购自 Fermentas, 细胞蛋白 RIPA 裂解液及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司, OCT4 siRNA (human) 序列及干扰转染 (siRNA) 启动装购自 Qiagen 公司, ECM 胶、OCT3/4 及 GAPDH 兔抗人抗体购自 Sigma 公司, 侵袭性小室购自 Corning 公司, 荧光定量 PCR 及 RT-PCR 的引物均由 Invitrogen 公司合成。

1.2 细胞培养及 BGC-823 细胞的转染

GES-1 和各胃癌细胞株在含有 10% 胎牛血清和青、链霉素双抗的 RPMI1640 培养基中培养, 37 °C、100% 湿度、5% CO₂ 孵育箱中传代培养。当胃癌 BGC-823 细胞生长密度至 70%~80% 时, 按照转染启动装内的说明书进行转染。依据转染类型, 将 BGC-823 细胞分为 3 组: OCT4 siRNA 组 (干扰 OCT4 表达的 siRNA 转染 BGC-823 细胞)、阴性 siRNA 组 (不具有任何干扰作用的 siRNA 转染 BGC-823 细胞)、对照组 (未转染任何 siRNA 的 BGC-823 细胞)。

1.3 总 RNA 的提取及逆转录

根据 TRNzol 总 RNA 提取试剂盒说明分别对 GES-1、MKN-28、SGC-7901、BGC-823 细胞以及转染 OCT4 siRNA 或 siRNA 60 h 后的 BGC-823 细胞提取总 RNA, 并各取总 RNA 1 μg, 加 Oligod(T) 引物将抽提的细胞总 RNA 逆转录成 cDNA。

1.4 RT-PCR 检测各细胞株中 OCT4 mRNA 表达

以 GES-1、MKN-28、SGC-7901、未转染 BGC-823 细胞的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。OCT4 引物设计参考文献^[7], 引物序列: 上游 5'-GTGGA GGAAGCTGACAACAATGAAA-3', 下游 5'-GACCGAGGAGTACAGTGCAGTGAAG-3'; 选择 GAPDH 为内参, 引物序列: 上游 5'-GAAGGTG AAGGTCGGAGTC-3', 下游 5'-GAAGATGGTG ATGGGATTTC-3'。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 30 s, 64.2 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。扩增产物

以 25 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 恒压 100 V, 20 min 后, X 线凝胶成像系统下成像。以目的基因和内参基因灰度值比值作为目的基因的相对表达量。

1.5 OCT4 siRNA 转染 BGC-823 细胞后干扰 OCT4 表达效果检测

1.5.1 荧光定量 PCR 法 荧光定量 PCR 的引物设计参考文献^[8], 其中 OCT4 的引物上游序列: 5'-AGCAAACCCGGAGGAGT-3', 下游序列: 5'-CCACATCGGCCTGTGTATATC-3', GAPDH 内参引物序列同 1.4。配置试剂盒内说明书提供的 20 μL 反应体系, 在 ABI 7500 system 仪器上进行两步法反应, 反应条件为 95 °C 起始模板变性 90 s, 95 °C 变性 10 s, 62 °C 退火 35 s, 68 °C 延伸 1 min, 循环 40 次。实验中分别以对照组、阴性 siRNA 组以及 OCT4 siRNA 组的 BGC-823 细胞的 cDNA 为模板, 同时设等体积水为模板空白组, 重复实验 3 次。实验结果经 ABI 7500 system 计算机软件分析, 采用 2^{-ΔΔCt} 方法计算 OCT4 mRNA 相对表达量。

1.5.2 Western blot 检测 将转染 60 h 后的 OCT4 siRNA 组、阴性 siRNA 组和对照组 BGC-823 细胞进行蛋白提取, 测定蛋白浓度。按照总蛋白 30 μg 的量在上样缓冲 Buffer 中煮沸 10 min, 进行 120 g/L SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 然后通过电转将目的蛋白及内参蛋白 GAPDH 转至 PVDF 膜上。PVDF 膜在含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液中封闭 90 min 后, 分别用 OCT4 抗体及内参一抗 4 °C 孵育过夜, 然后用 TBST 洗涤 10 min×3 次, 随后加二抗室温反应 90 min, 再次洗涤 10 min×3 次, 曝光处理后进行灰度值计算, 以目的蛋白和 GAPDH 灰度值比值作为目的蛋白相对表达量。

1.6 侵袭性实验 (Transwell 小室法)

对照组、阴性 siRNA 组以及 OCT4 siRNA 组的 BGC-823 细胞, 每组各设 6 个侵袭小室个体。将固态 ECM 胶放置在 4 °C 冰箱内过夜融化, 用无血清的预冷培养基 1640 稀释 ECM 胶溶液一倍 (10 mg/mL 稀释成 5 mg/mL), 取 100 μL 稀释胶加入到 transwell 的上室中, 将加入胶的小室放置 37 °C 温箱内孵育, 7~8 h 后将小室取出, 再加入 200 °C 无血清培养基轻洗水化基底膜后备用。转染 siRNA 72 h 后, 0.25% 胰酶消化各组 BGC-823 细胞 2 min 后, 用无血清 1640 培养基洗涤细胞 3 遍, 然后用含 1% FBS 的 1640 培养基重悬细胞, 调整细胞密度为 2×10⁵/mL。取 600 μL 含 20% FBS 的 1640 培养基放置于 transwell 下室内, 在小室内加

入 200 μL 细胞悬液, 放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中培养 24 h, 取出小室, 用 PBS 轻洗小室膜 2~3 次, 再放至无培养基的新孔中, 加入 0.1% 结晶紫 500 μL 浸染细胞 0.5 h(37 $^{\circ}\text{C}$) 后在显微镜下观察计数并拍照(采用小室膜的上、下、左、右及中间视野位置计算)。

1.7 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多样本均数间的比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK 检验, $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各细胞株中 OCT4 mRNA 的表达

OCT4 基因的 PCR 扩增产物长度为 390 bp(图 1)。正常胃黏膜细胞株 GES-1 中未检测到 OCT4 mRNA 的表达, 高、中、低分化的胃癌细胞株间 OCT4 mRNA 相对表达量差异有统计学意义($F = 39.81, P < 0.05$), 与高分化的 MKN-28 细胞(0.68 ± 0.05)和中分化的 SGC-7901 细胞(0.95 ± 0.06)比较, 低分化的 BGC-823 细胞 OCT4 mRNA 相对表达量(1.16 ± 0.10)最高($P < 0.05$); 中分化的 SGC-7901 细胞 OCT4 mRNA 相对表达量大于高分化的 MKN-28 细胞($P < 0.05$)。

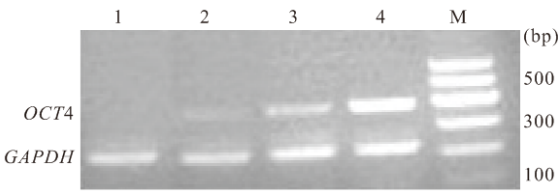


图 1 RT-PCR 检测 OCT4 在各细胞株中的 mRNA 水平

Fig 1 RT-PCR analysis of OCT4 mRNA in each cell line

1:GES-1 cell lines; 2:MKN-28 cell lines; 3: SGC-7901 cell lines; 4: BGC-823 cell lines; M: DNA marker

2.2 转染后 BGC-823 细胞中 OCT4 mRNA 的表达

与对照组(2.76 ± 1.01)和阴性 siRNA 组

(2.68 ± 0.77)比较, OCT4 siRNA 组 BGC-823 细胞内 OCT4 mRNA 相对表达量(0.48 ± 0.30)下降($P < 0.05$), 而对照组与阴性 siRNA 组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 转染后 BGC-823 细胞中 OCT4 蛋白的表达

Western blot 结果显示(图 2), OCT4 蛋白有两种亚型: OCT4A, 相对分子质量为 46×10^3 ; OCT4B-190, 相对分子质量为 24×10^3 。OCT4 siRNA 组 BGC-823 细胞的 OCT4A 蛋白相对表达量(0.98 ± 0.08)与阴性 siRNA 组(1.20 ± 0.07)、对照组(1.22 ± 0.07)比较下降($P < 0.05$), OCT4 siRNA 组 BGC-823 细胞的 OCT4B-190 蛋白相对表达量(0.25 ± 0.06)较阴性 siRNA 组(0.44 ± 0.03)、对照组(0.45 ± 0.04)下降更明显($P < 0.05$)。

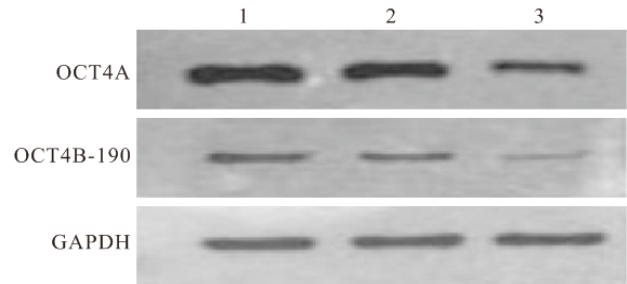


图 2 Western blot 检测 OCT4 蛋白表达

Fig 2 Expression levels of OCT4 protein detected by Western blot

1:Control group; 2:Negative siRNA group; 3:OCT4 siRNA group

2.4 干扰 OCT4 基因表达对 BGC-823 细胞侵袭力的影响

结果见图 3、附表。与对照组和阴性 siRNA 组比较, 转染 72 h 后, OCT4 siRNA 组 BGC-823 细胞穿膜数量下降($P < 0.05$), 而对照组和阴性 siRNA 组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

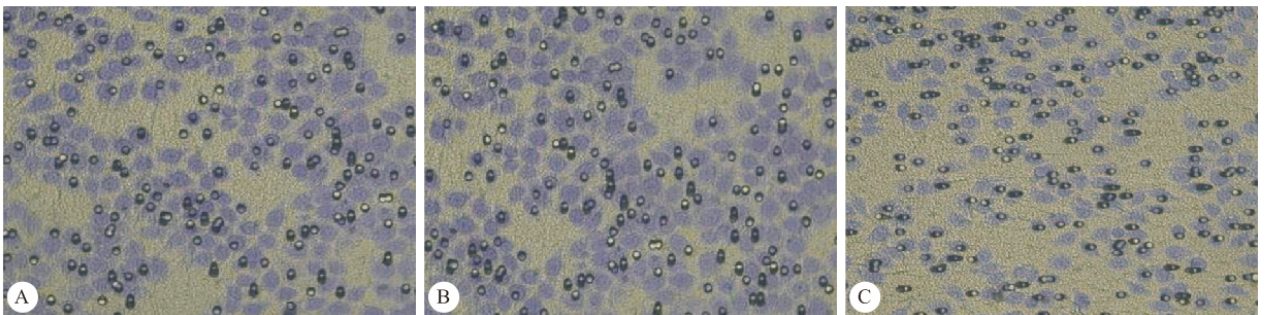


图 3 结晶紫染色的穿膜细胞图。×100

Fig 3 Cells invaded through the membrane stained by crystal violet. ×100

A: Control group; B: Negative siRNA group; C: OCT4 siRNA group

附表 各组 BGC-823 细胞穿膜数量($\bar{x} \pm s, n=6$)Table Quantity of BGC-823 cells invaded through the membrane in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Group	Top filed	Bottom filed	Left filed	Right filed	Middle filed	Average
Control	161.00±5.29	163.33±1.53	157.00±4.36	149.33±9.07	157.00±11.36	157.53±7.85
siRNA	153.30±1.53	153.67±4.93	151.00±5.29	152.67±4.93	157.67±2.08	153.67±4.13
OCT4 siRNA	96.33±3.06*	92.00±2.00*	95.00±3.61*	93.33±1.52*	95.00±1.00*	94.33±2.58*

* $P < 0.05$, vs. control and negative siRNA groups

3 讨论

OCT4 基因最初定义为干细胞的标志基因之一,其主要作用是维持细胞自我更新,保持细胞处于未分化状态^[1,2]。然而,很多研究^[3-5]表明 OCT4 基因在一些肿瘤细胞内高表达,提示 OCT4 基因在维持肿瘤细胞的低分化状态以及异常增生上有一定的作用。肿瘤的基本特征之一是细胞的异常分化,肿瘤细胞的恶性度与其分化程度有直接关联,一般来说,分化越低的肿瘤细胞,其恶性度越高。本研究在正常胃黏膜细胞中未检测到 OCT4 基因的表达,而高、中、低分化的胃癌细胞株间 OCT4 基因表达变化明显,其表达随着恶性肿瘤分化程度的升高而降低,即肿瘤分化越低,OCT4 基因表达量越高,表明 OCT4 基因的表达与胃癌细胞的分化程度密切相关,在影响胃癌细胞恶性度方面起着一定的作用。进一步对 OCT4 基因表达量高的低分化胃癌细胞株 BGC-823 行 siRNA 转染,转染 OCT4 siRNA 的 BGC-823 细胞内 OCT4 mRNA 相对表达量及 OCT4 蛋白表达量明显下降。在侵袭性实验中发现,转染 OCT4 siRNA 后 BGC-823 细胞穿膜数量下降,表明 OCT4 基因表达下降导致胃癌细胞的侵袭能力下降,降低了胃癌细胞的恶性度。

多项研究发现^[9,10] OCT4 蛋白有 OCT4A、OCT4B 两种亚型,OCT4A 蛋白一般定位在细胞核内,在维持干细胞的自我更新中起着重要作用,而 OCT4B 蛋白定位在细胞质中,随着在 AUG 和 CUG 的翻译起始位点的不同,OCT4B mRNA 可以翻译出 OCT4B-190 等不同形式的蛋白,OCT4B 蛋白对于干细胞的自我更新影响甚微。本研究 Western blot 检测结果发现,BGC-823 细胞转染 OCT4 siRNA 后其 OCT4A 和 OCT4B-190 蛋白表达均有明显下降,与 OCT4A 比较,OCT4B-190 蛋白表达量下降更明显。侵袭性实验结果显示,与对照组和阴性 siRNA 组比较,转染了 OCT4 siRNA 的 BGC-823 细胞穿膜数量明显下降,由于 OCT4B-190 蛋白表达量比 OCT4A 下降更明显,因此我们推测

OCT4B 基因的表达在决定胃癌细胞 BGC-823 的侵袭能力中可能比 OCT4A 更重要。但是,OCT4B-190 对胃癌细胞 BGC-823 分化程度的确切影响及其机制尚需进一步实验验证。

本研究表明,OCT4 基因表达在胃癌细胞的分化中起重要作用,其表达量与胃癌细胞的分化程度有关,分化程度越低,OCT4 表达量越高。胃癌细胞转染 OCT4 siRNA 后,OCT4 基因表达减少,侵袭能力下降,提示 OCT4 基因的表达可能影响胃癌细胞的侵袭力,其表达程度有望成为胃癌患者恶性度预测的参考指标之一。当然,OCT4 蛋白调控哪些相关基因来影响胃癌细胞的分化,以及不同形式的 OCT4 蛋白在肿瘤细胞内的作用及其机制尚需进一步研究探索。

参 考 文 献

- 1 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*,2006;126(4):663-676.
- 2 Chambers I, Smith A. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene*,2004;23(43):7150-7160.
- 3 Park SW, Hu X, Gupta P, et al. SUMOylation of Tr2 orphan receptor involves Pml and fine-tunes Oct4 expression in stem cells. *Nat Struct Mol Bio*,2007;1(14):68-75.
- 4 Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, et al. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. *Int J Cancer*,2007;120(7):1598-1602.
- 5 Chen Z, Xu WR, Qian H, et al. Oct4, a novel marker for human gastric cancer. *J Surg Oncol*,2009;99(7):414-419.
- 6 蔡世荣,王昭,陈剑等.沉默 PRL-3 基因表达抑制胃癌生长研究. *中华外科杂志*,2008;46(8):618-621.
- 7 黄品助,卢灿亮,元云飞等. OCT4 在肝细胞中的表达及其临床意义. *癌症*,2010;29(1):111-116.
- 8 Miyoshi N, Ishii H, Nagai K, et al. Defined factors induce reprogramming of gastrointestinal cancer cells. *PNAS*,2010;107(1):40-45.
- 9 Lee J, Kim HK, Rho JY, et al. The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *J Biol Chem*,2006;281(44):33554-33565.
- 10 Wang X, Zhao Y, Xiao Z, et al. Alternative translation of OCT4 by an internal ribosome entry site and its novel function in stress response. *Stem Cells*,2009;27(6):1265-1275.

(2012-04-30 收稿,2012-09-03 修回)

编辑 余琳