

*Scinderin*基因沉默对人胃癌细胞SGC-7901 增殖、转移的影响

陈晓敏¹ 乐东海^{2*} 李克强^{1,2*} 郭俊明¹ 陈平² 毛联刚² 冯伟云²

(¹宁波大学医学院, 宁波 315211; ²宁波市第二医院, 宁波 315010)

摘要 *Scinderin*是一种依赖Ca²⁺的肌动蛋白丝(F-actin)切割蛋白, 在细胞分泌过程中发挥着重要作用。目前, 针对*scinderin*在人类疾病尤其是肿瘤中的生物学功能研究报道的并不多。该实验通过构建*scinderin*-shRNA慢病毒载体并感染人胃癌细胞株SGC-7901, 于荧光显微镜下观测感染效率, 利用RT-qPCR和Western blot实验证实*scinderin*的沉默效果。运用实时细胞分析仪(RTCA)检测细胞的增殖能力, 流式细胞术检测细胞周期变化, Transwell小室检测细胞的迁移能力。结果显示, 将构建好的病毒载体成功转入了胃癌细胞SGC-7901。感染*scinderin*-shRNA病毒载体后, *scinderin*的mRNA和蛋白质表达水平均受到不同程度的抑制($P<0.01$), 细胞的增殖和迁移能力均显著降低($P<0.05$), 细胞周期阻滞在G₂/M期。该研究表明, 胃癌细胞SGC-7901中*scinderin*低表达能有效抑制细胞的增殖和转移能力, 这也为*scinderin*在胃癌演化过程中的机制研究奠定了实验基础。

关键词 *scinderin*; 胃癌; 增殖; 转移

Effects of *Scinderin* Silence on the Proliferation and Metastasis of Human Gastric Cancer Cell SGC-7901

Chen Xiaomin¹, Le Donghai^{2*}, Li Keqiang^{1,2*}, Guo Junming¹, Chen Ping², Mao Liangang², Feng Weiyun²

(¹Medical School of Ningbo University, Ningbo 315211, China; ²Ningbo No.2 Hospital, Ningbo 315010, China)

Abstract *Scinderin* is a Ca²⁺-dependent filamentous actin (F-actin) severing and capping protein, which plays a key role in secretion. But few researches about biological effects of *scinderin* on human disease especially neoplasm are currently reported. In this study, we transfected the shRNA targeting *scinderin* lentiviral vector into human gastric cancer cell line SGC-7901. The efficiency of transfection was observed under fluorescence microscope. Effects of gene silencing were confirmed by RT-qPCR and Western blot. The proliferation was analyzed by real-time cell analyzer (RTCA) and the cell cycle distribution was investigated by flow cytometer. The migration was analyzed by Transwell. Results showed that *scinderin*-shRNA was transfected into SGC-7901 successfully. After transfection, levels of *scinderin* mRNA and protein expression reduced significantly ($P<0.01$). The abilities of cell proliferation and migration decreased obviously ($P<0.05$), while cell cycle was arrested in the G₂/M phase. Consequently, we can draw the conclusion that silencing *scinderin* can effectively restrain the proliferation and metastasis of human gastric cancer cell SGC-7901, which will be an experiment support for the possible regulation of *scinderin* in gastric cancer evolvement.

Key words *scinderin*; gastric cancer; proliferation; metastasis

收稿日期: 2013-09-10 接受日期: 2013-10-23

浙江省自然科学基金(批准号: Y2110961)和宁波市自然科学基金(批准号: 2011A610051)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0574-87089582, E-mail: dhyue@foxmail.com; chasejxmc@163.com

Received: September 10, 2013 Accepted: October 23, 2013

This work was supported by Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Grant No.Y2110961) and Ningbo Natural Science Foundation (Grant No.2011A610051)

*Corresponding author. Tel: +86-574-87089582, E-mail: dhyue@foxmail.com; chasejxmc@163.com

网络出版时间: 2013-12-11 15:39

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.01.0292.html>

胃癌是一种常见的消化道恶性肿瘤。肿瘤的复发和转移可以说是导致进展期胃癌预后差的根本原因。目前在临床上,即使是根治性切除术,胃癌5年内复发率仍高达60%~70%,转移复发已成为提高胃生存率的主要障碍^[1]。胃癌的发生和发展是多基因参与的极为复杂的过程,目前已发现众多与胃癌演化密切相关的基因。因而,寻找新的差异表达基因,并确定其在胃癌中的作用,对于胃癌的诊断、治疗和预防具有非常重要的意义。

Scinderin(肌切割蛋白,也被称作adseverin)基因隶属gelsolin超家族,位于7号染色体上,可编码一种相对分子量为80 kDa的蛋白质。*Scinderin*是一种重要的肌动蛋白(actin)结合蛋白,存在2个Ca²⁺结合位点、3个actin结合位点和2个PIP₂结合位点,具有Ca²⁺依赖的肌动蛋白丝(filamentous actin, F-actin)即微丝(microfilament)切割活性^[2]。*Scinderin*的表达具有时空差异性,即人体的不同发育阶段和不同组织、细胞中,*scinderin*的表达存在一定的差异。研究发现,*scinderin*在人肾、十二指肠、空肠等器官中均有表达,而在大脑皮层、肝等器官中低表达或不表达。*Scinderin*调节F-actin的重组,参与细胞分泌、细胞分化以及调节细胞运动等,在慢性炎症、凝血过程、免疫性疾病以及肿瘤发生发展中发挥了重要作用^[3]。F-actin作为细胞骨架的重要组成成分,所形成的网络结构能显著地阻碍分泌小泡从储备池向释放池运动,而*scinderin*高表达可促进F-actin解聚,使分泌颗粒得以释放,从而增强了细胞分泌^[4-5]。研究发现,*scinderin*能够促进黏蛋白分泌,而黏蛋白是气道黏液的主要成分,这表明*scinderin*过表达与哮喘密切相关^[6-7]。另有报道,*scinderin*基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)位点的变化在多发性硬化(multiple sclerosis)发病中起着重要作用^[8]。Zunino等^[9]将携带*scinderin* cDNA的表达载体转染巨核母细胞性细胞株MEG-01,结果发现,*scinderin*高表达会促进巨核母细胞成熟、分化以及血小板形成,同时抑制巨核母细胞的增殖和肿瘤形成。*Scinderin*的异常表达与非小细胞肺癌的细胞毒T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)抵抗突变株对CTL杀伤作用的敏感性也密切相关:非小细胞肺癌抵抗突变株细胞中*scinderin*高表达会改变细胞的形态,同时降低CTL对肿瘤细胞的杀伤作用;沉默*scinderin*后,CTL对非小细胞肺癌抵抗突变株细胞

的杀伤作用明显增强^[10]。在抗cisplatin的膀胱癌细胞中发现,*scinderin*参与阻抑线粒体介导的细胞凋亡^[11]。复旦大学姚礼庆课题组通过基因芯片分析发现,*scinderin*基因在结直肠癌组织(包括结直肠癌肝转移组和无肝转移组)中较结直肠正常组织下调,同时*scinderin*基因在结直肠癌肝转移组织中较无肝转移组织表达上调。体外实验发现,沉默结直肠癌细胞株HCT116和SW480中的*scinderin*基因可有效降低肿瘤细胞的增殖和转移能力;而动物实验结果显示,HCT116细胞株中沉默*scinderin*基因的细胞株相对于对照组表现出较弱的转移能力,而在SW480细胞株中却没有看到类似的结果。

然而,目前关于*scinderin*在胃癌发生发展中的生物学功能和调控机制的研究鲜有报道。本研究应用RNAi技术,将构建好的*scinderin*特异性shRNA慢病毒载体感染高转移型胃癌细胞株SGC-7901(该胃癌细胞株中*scinderin*表达较高),达到沉默*scinderin*的目的后,观察其对SGC-7901细胞增殖、转移的影响,从而为后续探究*scinderin*在胃癌演化过程中的作用机制以及基因治疗奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人胃癌细胞株SGC-7901购于中国科学院上海细胞库;293T细胞由本院中心实验室保存;大肠杆菌菌株DH5 α 、Pfu-gw-006(kl2099)载体(携带GFP编码基因)、pHelper 1.0载体、pHelper 2.0载体购自上海吉凯基因技术有限公司;Hpa I、Xho I、T4 DNA ligase购自美国NEB公司;转染试剂Lipofectamine 2000、Trizol、Opti-MEM购自美国Invitrogen公司;M-MLV反转录酶、dNTPs购自美国Promega公司;Taq polymerase、SYBR Master Mixture购自日本TaKaRa公司;BCA Protein Assay Kit购自美国Hyclone-Pierce公司;兔抗人*scinderin*、鼠抗人GAPDH、羊抗兔IgG及羊抗鼠IgG抗体均购自美国Santa Cruz公司;ECL-Plus/Kit购自美国Amersham公司;dsDNA oligo由上海吉凯基因技术有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 *scinderin*-shRNA慢病毒质粒的构建 根据GenBank提供的*scinderin*基因序列(NM_033128),应用MIT的在线设计软件shRNA Selection Program,设计针对*scinderin*基因的特异性shRNA序列为:5'-

CGA GAT GAG CTG ACA ACA T-3'。在正义链和反义链5'端分别加入Hpa I和Xho I酶切位点, 确定shRNA序列为: 正义链5'-TCA CGA GAT GAG CTG ACA ACA TCT CGA GAT GTT GTC AGC TCA TCT CGT GTT TTT TC-3'; 反义链5'-TCG AGA AAA AAC ACG AGA TGA GCT GAC AAC ATC TCG AGA TGT TGT CAG CTC ATC TCG TGA-3', 引物退火形成带黏性末端的双链。Hpa I和Xho I双酶切Pfu-gw-006(kl2099)载体, 并与双链DNA连接后转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞, 挑选克隆进行PCR鉴定、DNA测序, 鉴定阳性的克隆即为构建成功的scinderin-shRNA慢病毒质粒。

1.2.2 慢病毒包装及滴度测定 按Lipofectamine 2000使用说明将制备的scinderin-shRNA慢病毒质粒与另外两种病毒包装辅助质粒(pHelper 1.0和pHelper 2.0)共转染293T细胞。转染8 h更换为完全培养液, 培养48 h后, 收集细胞上清并浓缩。利用逐孔稀释法在293T细胞中测定病毒滴度。测定前1 d, 将滴度测定所需的293T细胞接种于96孔板, 每孔加 4×10^4 细胞。用含10%血清的DMEM培养基培养, 体积为100 μ L。使用DMEM培养基对病毒原液进行1:10梯度稀释, 得到6个浓度梯度, 将稀释好的病毒液加入孔中, 在37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 的培养箱中培养。细胞感染72 h后, 于荧光显微镜下观察细胞的荧光表达情况并统计表达GFP的细胞数目, 计算病毒滴度。病毒滴度计算公式: 病毒滴度(TU/mL)=带荧光的细胞数目/稀释的浓度梯度 $\times 10^3$ 。

1.2.3 慢病毒感染SGC-7901细胞 取对数生长长期的SGC-7901细胞, 以 5×10^4 /孔接种到6孔板, 于37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 培养箱培养。待细胞融合度达到约30%, 按实验设计的组别加入慢病毒颗粒进行目的细胞的感染实验。实验分成3个组, 分别为CON组(空白对照组)、NC组(空病毒载体感染组)以及KD组(scinderin-shRNA病毒载体感染组)。预实验确定慢病毒感染细胞的最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI)值为10。参照最佳MOI值, 在细胞中加入适量病毒, 12 h后观察细胞状态: 如果没有明显的细胞毒性作用, 继续培养24 h后更换培养基; 如果有明显的细胞毒性作用, 立即更换培养基。感染4 d后在荧光显微镜下观察GFP的表达情况, 确定感染率。

1.2.4 感染细胞中scinderin基因水平的检测 采用RT-qPCR法检测mRNA水平上目的基因的表

达。SGC-7901细胞感染96 h后, 用Trizol试剂抽提总RNA, 以其为模板, 逆转录成cDNA, 再以cDNA为模板PCR扩增scinderin基因, 其引物为: 正义链5'-TCT GCG TTC CTG ACT GTT C-3', 反义链5'-GAC CTC CTT TCT TTG ATG TTC C-3'。GAPDH作为内参, 其引物为: 正义链5'-TGA CTT CAA CAG CGA CAC CCA-3', 反义链5'-CAC CCT GTT GCT GTA GCC AAA-3'。引物由上海Invitrogen公司合成。按SYBR Master Mixture试剂盒说明配置反应体系, 采用两步法反应: 预变性95 $^{\circ}$ C, 15 s; 之后每一步变性95 $^{\circ}$ C, 5 s, 退火延伸60 $^{\circ}$ C, 30 s, 共进行45个循环。标本之间的基因表达量差异通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ($\Delta\Delta C_t$ =各样品 ΔC_t 平均值-NC组 ΔC_t 平均值)法来进行解析。

1.2.5 感染细胞中scinderin蛋白水平的检测 采用Western blot法检测scinderin的蛋白表达情况。收集病毒感染96 h后的SGC-7901细胞, RIPA提取各组细胞总蛋白, BCA法检测蛋白浓度, 10% SDS-PAGE凝胶电泳, 转移蛋白至PVDF膜。兔抗人scinderin一抗孵育后加入HRP标记二抗, ECL显影。GAPDH作为内参, 凝胶扫描仪采集图像。

1.2.6 实时细胞分析仪(Roche SP real-time cell analyzer, RTCA)检测细胞增殖能力 在干净无菌的E-plate中, 每孔加入100 μ L完全培养液, 按要求放入实时细胞分析仪中, 读取培养液的背景数据。之后取出E-plate, 在超净工作台中接种预先制备的细胞悬液, 每孔接种 8×10^3 细胞, 每组细胞设置3个复孔, 将E-plate再次放入仪器静置30 min。设置实验参数, 共检测160 h, 每隔15 min检测一次。RTCA拥有基于阻抗分析的xCELLigence System, 可将各孔细胞贴壁产生的阻抗信号转化为细胞指数(cell index, CI)值, 并绘制出相应的细胞对数增长曲线, 从而间接反映细胞的增殖情况。CI值与细胞数量成正比: CI值越大, 孔内细胞数目越多, 细胞增殖能力越强。

1.2.7 流式细胞术检测细胞周期变化 将用于细胞周期检测实验的细胞用无血清培养液饥饿培养24 h, 使细胞周期同步在G $_0$ ~G $_1$ 期。然后改用含10%胎牛血清的培养基继续培养。24 h后, 用胰酶消化收集细胞于冻存管中。PBS洗涤, 1 000 r/min离心10 min。弃上清, 加入预冷的70%乙醇, -20 $^{\circ}$ C固定24 h。24 h后, 1 000 r/min离心10 min。弃上清, 加入2 mL预冷的PBS, 轻轻吹打混匀, 1 000 r/min离心10 min, 重复一次。去上清, 加入1 mL的PBS重悬细胞, 调整细胞浓

度到 1.0×10^6 细胞/mL。避光加入PI染料, 20 min后上机检测。实验重复3次。

1.2.8 Transwell小室检测细胞的迁移能力 取所需数量小室于一空24孔板中, 加100 μ L无血清培养基到小室内, 培养箱放置1~2 h。将处于对数生长期的各组细胞用胰酶消化下来, 用低血清培养基重悬, 制成细胞悬液, 用血球计数板进行细胞计数。小心移去小室内培养基, 加600 μ L含30% FBS的培养基到下室中。用无血清培养基按一定比例稀释细胞, 加该细胞悬液(含 2×10^5 细胞)100 μ L到每个小室中, 用镊子将小室转移入含30% FBS培养基的下室中, 在组织培养箱中培养24 h。倒扣小室于吸水纸上以去除培养基, 用棉拭子轻轻移去非迁移细胞, 加400 μ L染色液到24孔板的空孔中, 将小室浸泡在染色液中20 min, 在膜的下表面染色转移细胞, 浸泡小室在一个大的水杯中, 冲洗数次, 晾干后显微镜下观察。接着用10%醋酸脱色, 测量洗脱液 D_{570} 值。 D 值与穿膜的细胞数量成正比, 从而间接反映细胞的迁移能力: D 值越大, 穿膜的细胞数量越多, 细胞迁移力越强。实验重复3次。

1.2.9 统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 20.0软件进行统计学分析, 两样本均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

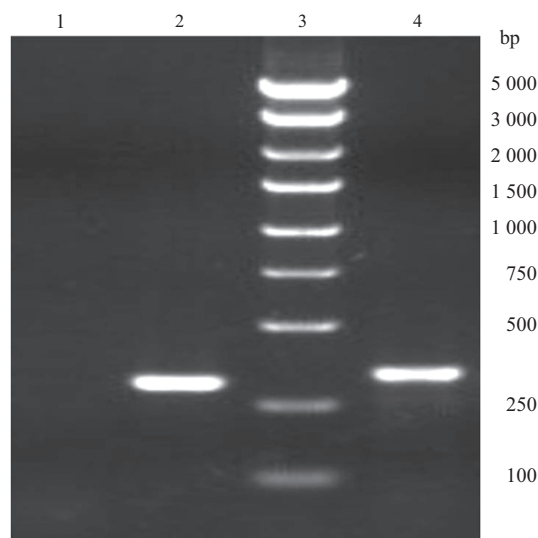
2 结果

2.1 *scinderin*-shRNA慢病毒质粒的构建

*scinderin*基因特异性shRNA的寡核苷酸序列经退火形成双链DNA, 与经Hpa I和Xho I双酶切线性化的Pfu-gw-006(kl2099)载体连接后进行PCR电泳: 阳性克隆PCR片段大小为343 bp, 而没有连接入shRNA片段的空载体克隆PCR片段大小为299 bp, ddH₂O阴性对照没有PCR条带产生(图1)。挑选含有目的片段的慢病毒载体经测序结果证明重组慢病毒质粒的插入序列与设计序列一致, 无基因突变, 这表明*scinderin*-shRNA慢病毒质粒构建成功。

2.2 慢病毒的包装及滴度测定

将构建成功的重组病毒质粒与另外两种辅助包装载体质粒共转染293T细胞, 采用逐孔稀释滴度测定法测定慢病毒滴度。病毒滴度测定实验证实成功完成慢病毒的包装, 细胞感染72 h后, 荧光显微镜下观察发现: 随着病毒稀释倍数的增加, 表达GFP的293T细胞数目越来越少。当稀释倍数为 10^{-5} 、视野中



1: 阴性对照(ddH₂O); 2: 空病毒质粒; 3: marker; 4: *scinderin*-shRNA慢病毒质粒。

1: negative control (ddH₂O); 2: no-shRNA lentiviral plasmids; 3: marker; 4: *scinderin*-shRNA lentiviral plasmids.

图1 *scinderin*-shRNA重组慢病毒质粒PCR电泳图

Fig.1 The electrophoresed PCR products of recombinant *scinderin*-shRNA lentiviral plasmids

有2个细胞表达GFP时, 滴度测定结果为 2×10^8 TU/mL, 即每毫升病毒浓缩液中含有 2×10^8 病毒颗粒。该方法测定的慢病毒滴度为 $(6 \sim 8) \times 10^8$ TU/mL。

2.3 慢病毒感染SGC-7901细胞

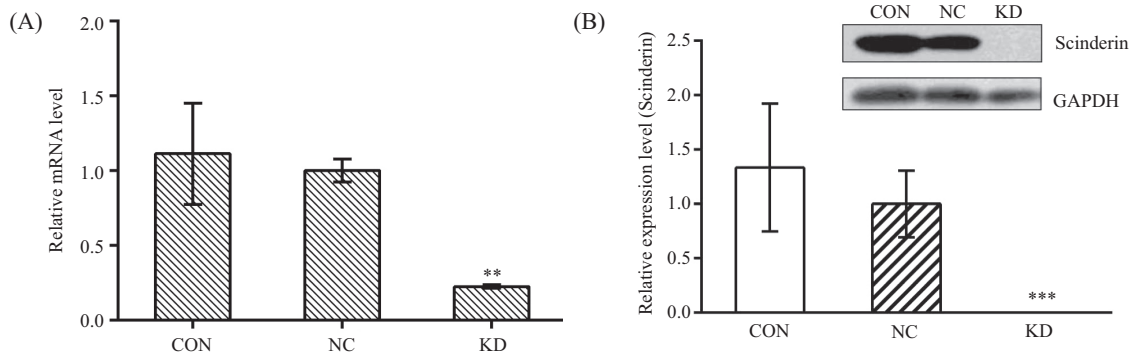
通过预实验确定慢病毒感染SGC-7901细胞的最佳MOI值为10。参照最佳MOI值感染SGC-7901细胞, 感染96 h后, 荧光表达趋于稳定, 荧光显微镜下观察并计数, 细胞的感染率>90%。

2.4 感染细胞的*scinderin*表达水平

从RT-qPCR结果(图2A)可以看出, SGC-7901细胞中, KD组的*scinderin*基因有显著的敲减效果, 相对NC组, KD组的*scinderin*基因沉默达到75%以上($P < 0.01$)。Western blot检测结果证实, KD组的*scinderin*蛋白质表达量较CON组和NC组表达量显著降低($P < 0.001$, 图2B), NC组和CON组间蛋白质表达量无明显差异($P > 0.05$)。这些实验结果表明, 我们成功建立了*scinderin*低表达的稳定细胞表达株, 并可进行以下实验。

2.5 RTCA增殖实验

RTCA增殖实验结果显示(图3), 初期三组代表细胞增殖能力的指标——CI值基本一致($P > 0.05$)。24 h后, 各组细胞的CI值差别逐渐增大, 其中CON组和NC组的CI值较为接近, 而KD组细胞的CI值较前两

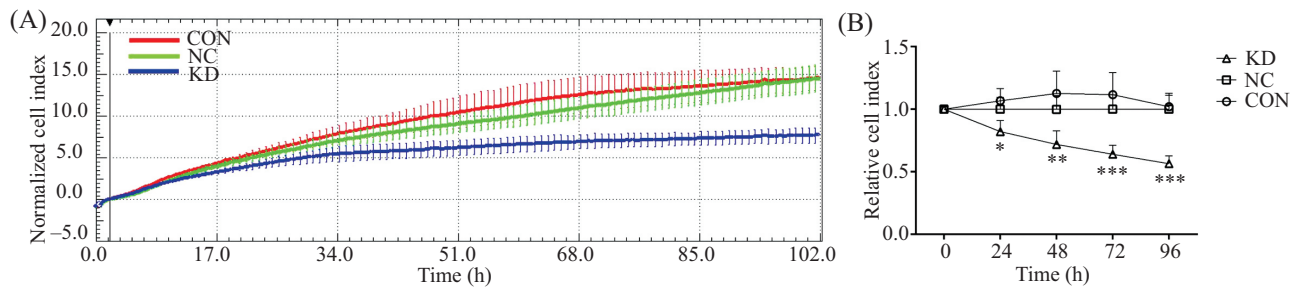


A: RT-qPCR检测*scinderin* mRNA的表达; B: Western blot检测*scinderin*蛋白质的表达。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与NC组比较。

A: the expression of *scinderin* mRNA in different groups analyzed by RT-qPCR; B: the expression of *scinderin* protein in different groups analyzed by Western blot. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with NC group.

图2 Scinderin内源验证结果

Fig.2 The demonstrated results of scinderin expression in different groups



A: RTCA增殖实验结果; B: RTCA增殖实验各不同处理组细胞24, 48, 72, 96 h的细胞指数(CI)比较(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与NC组比较)。

A: results of RTCA cell proliferation assay; B: cell index (CI) analyses of time point at 0, 24, 48, 72, 96 h in different groups by RTCA proliferation assay (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with NC group).

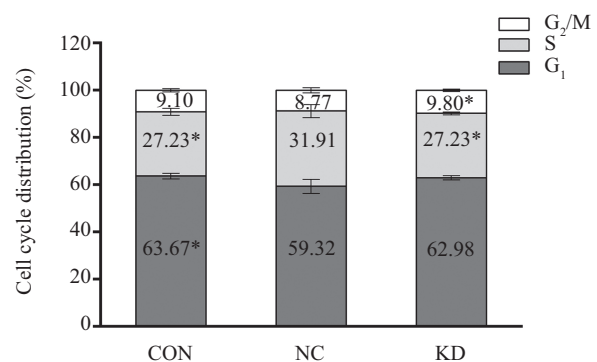
图3 RTCA增殖实验

Fig.3 The results of cell proliferation analyzed by RTCA

组增长明显缓慢($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 并提前进入增殖平台期。由此可以看出, 降低*scinderin*的表达水平可有效抑制胃癌细胞SGC-7901的增殖能力。

2.6 流式细胞术检测细胞周期的变化

利用流式细胞术检测各组细胞的细胞周期分布情况, 从而初步分析*scinderin*对SGC-7901细胞周期变化的影响。结果发现, KD组细胞的G₂/M期在细胞周期中的比例与NC组相比增加了1.03%, 差异有统计学意义($P = 0.036$, 图4), 由此表明*scinderin*低表达可改变SGC-7901的细胞周期分布。另外, 我们也发现, CON组细胞的G₁期比NC组增加了4.35% ($P = 0.031$)。理论上CON组细胞与NC组的生物指标应一致(差异无统计学意义), 而我们的实验结果却与预期结果矛盾, 这可能是样品制备和染色过程中人为因素导致的检测不精确, 但更可能是慢病毒载体引起的细胞机能变化, 即慢病毒载体干扰了SGC-



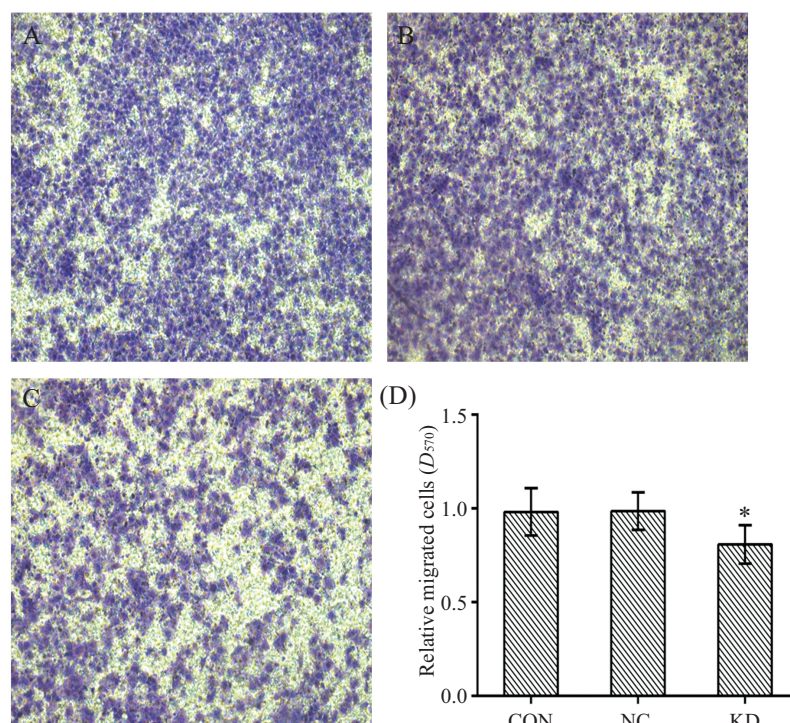
* $P < 0.05$, 与NC组比较。

* $P < 0.05$ compared with NC group.

图4 各组SGC-7901细胞的细胞周期分布

Fig.4 The cell cycle distribution of SGC-7901 cells in each group

7901细胞的G₁期和S期。排除慢病毒载体干扰因素, 依据实验结果可知(NC组和KD组比较), 沉默SGC-7901细胞中的*scinderin*基因会导致细胞周期阻滞在G₂/M期。



A~C: 结晶紫染色(A: CON组; B: NC组; C: KD组); D: 各不同处理组细胞的 D_{570} 比较(* $P < 0.05$, 与NC组比较)。

A~C: crystal violet staining (A: CON group; B: NC group; C: KD group); D: comparison of D_{570} value in different groups (* $P < 0.05$ compared with NC group).

图5 Transwell迁移实验(100×)

Fig.5 The results of cell migration analyzed by Transwell (100×)

2.7 Transwell迁移实验

细胞接种于上室培养24 h染色后于显微镜下观察, 三组均有细胞穿过小室滤膜, KD组与CON组和NC组相比, 穿膜细胞数明显减少, 差异具有显著性($P < 0.05$, 图5), NC组和CON组间穿膜细胞数无明显差异。该实验结果显示, 敲降*scinderin*基因能降低SGC-7901细胞的迁移能力。

3 讨论

本实验利用RNAi技术, 用构建好的*scinderin*-shRNA慢病毒载体感染人胃癌细胞株SGC-7901, 致使细胞内*scinderin*沉默。RTCA增殖实验结果显示沉默*scinderin*后, 胃癌细胞增殖受到明显抑制。另外, 我们通过流式细胞术(根据细胞DNA含量)检测分析了*scinderin*沉默对SGC-7901细胞周期的影响, 结果发现*scinderin*低表达能使癌细胞的细胞周期阻滞在G₂/M期。众所周知, 真核细胞有丝分裂过程中, 两个子细胞的胞质分离有赖于分裂末期微丝形成的收缩环, 而*scinderin*又是一种重要的F-actin切割蛋白。据此, 我们推测*scinderin*对胃癌细胞增殖

的影响与有丝分裂末期收缩环的形成也密切相关。Transwell迁移实验结果显示, *scinderin*低表达可减少SGC-7901细胞的穿膜数量, 有效降低细胞的迁移能力。细胞形态的改变是癌细胞转移的前提条件。研究发现, *scinderin*高表达导致的巨核母细胞白血病细胞株细胞形态学上的变化是通过调控Rac/PAK/MEKK、SEK/JNK/c-jun, c-fos和Raf/MEK/ERK等信号通路实现的。目前, 虽然不清楚*scinderin*调控胃癌细胞SGC-7901的转移机理, 根据现有的认识, 我们推测这可能与细胞内F-actin重塑引起的细胞骨架改变密切相关。细胞骨架蛋白(如actin)、catenin蛋白以及细胞黏附分子(主要是E-cadherin)三者间的平衡连接是维持正常上皮细胞极性和细胞间相互作用的基石, 而其中任一者的异常表达会导致细胞间的黏附连接遭到破坏, 细胞获得更强的运动性^[12]。因此, *scinderin*高表达可通过促进F-actin解聚重组细胞骨架, 改变上皮细胞的极性和细胞之间的连接作用, 促使细胞发生转移。针对上述推测, 我们将在后续实验中加以证实。由于*scinderin*的活性受Ca²⁺浓度、PIP₂以及细胞内pH值等因素的调节, 因而肿瘤微环

境为scinderin涉及的恶性肿瘤演化机理研究提供了新的思路。

Scinderin具有重要的细胞功能调节作用,但目前对其在细胞周期、分化、增殖以及凋亡等中的作用知之甚少。本研究表明, *scinderin* 基因沉默具有抑制胃癌细胞株SGC-7901增殖和转移的作用, 这为后续深入研究scinderin潜在的促进胃癌细胞增殖和转移的分子作用机制提供了实验基础, 为探索胃癌的发病机理提供了新的理论依据, 也为胃癌的基因治疗提供了新的靶点。

参考文献 (References)

- 1 Takeuchi H, Ueda M, Oyama T, Shimizu Y, Kitagawa Y. Molecular diagnosis and translymphatic chemotherapy targeting sentinel lymph nodes of patients with early gastrointestinal cancers. *Digestion* 2010; 82(3): 187-91.
- 2 Rodríguez Del Castillo A, Lemaire S, Tchakarov L, Jeyapragasan M, Doucet JP, Vitale ML, *et al.* Chromaffin cell scinderin: A novel calcium-dependent actin filament severing protein. *EMBO J* 1990; 9(1): 43-52.
- 3 来章超, 宋 鑫. 肌切蛋白的结构与功能多样性. *中国生物化学与分子生物学报* (Lai Zhangchao, Song Xin. Structure and diversified fnctions of sinderin. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*) 2012; 28(7): 617-23.
- 4 Zhang L, Marcu MG, Nau-Staudt K, Trifaró JM. Recombinant scinderin enhances exocytosis, an effect blocked by two scinderin-derived actin-binding peptides and PIP2. *Neuron* 1996; 17(2): 287-96.
- 5 Dumitrescu Pene T, Rosé SD, Lejen T, Marcu MG, Trifaró JM. Expression of various scinderin domains in chromaffin cells indicates that this protein acts as a molecular switch in the control of actin filament dynamics and exocytosis. *J Neurochem* 2005; 92(4): 780-9.
- 6 Ehre C, Rossi AH, Abdullah LH, De Pestel K, Hill S, Olsen JC. Barrier role of actin filaments in regulated mucin secretion from airway goblet cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288(1): C46-56.
- 7 Di Valentin E, Crahay C, Garbacki N, Hennuy B; Guéders M, Noël A, *et al.* New asthma biomarkers: Lessons from murine models of acute and chronic asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009; 296(2): L185-97.
- 8 Bush WS, McCauley JL, DeJager PL, Dudek SM, Hafler DA, Gibson RA, *et al.* A knowledge-driven interaction analysis reveals potential neurodegenerative mechanism of multiple sclerosis susceptibility. *Genes Immun* 2011; 12(5): 335-40.
- 9 Zunino R, Li Q, Rosé SD, Romero-Benítez MM, Lejen T, Brandan NC, Trifaró JM. Expression of scinderin in megakaryoblastic leukemia cells induces differentiation, maturation, and apoptosis with release of plateletlike particles and inhibits proliferation and tumorigenesis. *Blood* 2001; 98(7): 2210-9.
- 10 Abouzahr S, Bismuth G, Gaudin C, Carroll O, Van Endert P, Jalil A, *et al.* Identification of target actin content and polymerization status as a mechanism of tumor resistance after cytolytic T lymphocyte pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(5): 1428-33.
- 11 Miura N, Takemori N, Kikugawa T, Tanji N, Higashiyama S, Yokoyama M. Adseverin: A novel cisplatin-resistant marker in the human bladder cancer cell line HT1376 identified by quantitative proteomic analysis. *Mol Oncol* 2012; 6(3): 311-22.
- 12 Gheldof A, Berx G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013; 116: 317-36.