

# 干扰*LASP1*基因表达对胃癌细胞 BGC823增殖、迁移及侵袭能力的影响

刘玉珍, 张梦雪, 吕世军, 郑洁

潍坊医学院临床病理系, 神经疾病与再生修复实验室, 山东 潍坊 261053

**[摘要]** **背景与目的:** *LASP1*是一种新的肌动蛋白结合蛋白, 参与细胞骨架的重组调控及细胞迁移, 在多种恶性肿瘤中高表达, 并与肿瘤的增殖、侵袭和转移密切相关。但目前*LASP1*在胃癌发生、发展中的作用少见报道。该研究旨在探讨*LASP1*在胃癌增殖和侵袭中的作用及分子机制。**方法:** 利用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)和蛋白[质]印迹法(Western blot)检测*LASP1*在不同胃癌细胞系中的表达, 应用RNA干扰技术抑制BGC823细胞中*LASP1*的表达, 采用RTFQ-PCR和Western blot检测转染后*LASP1*的表达, 应用体外增殖、迁移和侵袭实验检测转染后细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 通过F-actin聚合实验检测细胞的F-actin的聚合能力, 采用Western blot检测转染前后BGC823细胞中Akt的磷酸化情况。**结果:** *LASP1*在胃癌BGC823细胞中高表达。RNA干扰技术沉默*LASP1*基因后, 干扰组与对照组相比, *LASP1*的mRNA和蛋白表达水平均明显下降。细胞增殖实验显示, 干扰组细胞的增殖率低于对照组( $P < 0.05$ ); Transwell迁移和侵袭实验发现, 与对照组相比, 干扰组细胞的迁移和侵袭能力均明显降低( $P < 0.05$ ); 在干扰组细胞内的F-actin聚合量比对照组减少( $P < 0.05$ ); 在干扰组细胞内Akt磷酸化受到抑制。**结论:** *LASP1*的表达降低可以抑制胃癌BGC823细胞的体外增殖、迁移和侵袭能力, *LASP1*通过调节F-actin的聚合和Akt磷酸化从而影响胃癌细胞的侵袭、转移。

**[关键词]** *LASP1*; 人胃癌BGC823细胞; 增殖; 迁移和侵袭

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2017.11.002

中图分类号: R735.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2017)11-0847-06

**Effect of silencing *LASP1* on proliferation, migration and invasion of human gastric cancer cell line BGC823** LIU Yuzhen, ZHANG Mengxue, LÜ Shijun, ZHENG Jie (Department of Clinical Pathology, Key Lab of Neurological Disease and Regeneration & Repair, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong Province, China)

Correspondence to: ZHENG Jie E-mail: zj1978824@163.com

**[Abstract]** **Background and purpose:** *LASP1* is a novel actin-binding protein and involved in the process of cytoskeleton reorganization and cell migration. Expression of *LASP1* is significantly up-regulated in several malignant tumors and is closely related to the tumor proliferation, invasion and metastasis. However, the specific mechanism of *LASP1* is not clear in gastric carcinogenesis. This study aimed to detect the effect and mechanism of *LASP1* in the proliferation and invasion of gastric cancer cells. **Methods:** Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR) and Western blot were employed to determine the expression of *LASP1* in gastric cancer cell lines, as well as human normal gastric epithelial cell line GES-1. RNA interference (RNAi) was used to silence the expression of *LASP1* in gastric cancer cell BGC823. RTFQ-PCR and Western blot were used to analyze the expression of *LASP1* after siRNA transfection. *In vitro* proliferation, migration and invasion assay were performed to detect the effect of *LASP1* on BGC823 cells. F-actin polymerization assay was used to detect F-actin recognition ability in cells. Western blot was used to analyze phosphorylation of Akt. **Results:** Overexpression of *LASP1* was detected in human gastric cancer BGC823 cells. Down-regulated expression of *LASP1* at both mRNA and protein level was detected after

siRNA transfection. Cell proliferation assay showed that the growth rate was significantly reduced in RNAi group ( $P < 0.05$ ). In transwell assay, the cell migration and invasion were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). F-actin content was reduced compared with the control group ( $P < 0.05$ ). The phosphorylation of Akt was significantly reduced after siRNA transfection. **Conclusion:** LASP1 was highly expressed in gastric cancer cells. Down-regulation of LASP1 suppressed the capacities of proliferation, migration and invasion of human gastric cancer BGC823 cells *in vitro*. LASP1 can induce migration and invasion of gastric cancer through regulation of F-actin polymerization and Akt phosphorylation.

[Key words] LASP1; Human gastric cancer BGC823 cells; Proliferation; Migration and invasion

LASP1最初是从乳腺癌转移性淋巴结(metastatic axillary lymph nodes, MLN)cDNA文库中筛选克隆得到的, 又名MLN50, 是近年来发现的一种新的肌动蛋白结合蛋白和斑黏蛋白支架蛋白<sup>[1]</sup>, 通过与肌动蛋白结合, 参与细胞骨架的重组调控及细胞迁移。目前多项研究发现, LASP1在前列腺癌、胆囊癌、非小细胞肺癌、结直肠癌、口腔癌及乳腺癌等多种恶性肿瘤中的表达明显升高, 并与多种肿瘤的增殖和侵袭相关<sup>[2-7]</sup>。我们的前期研究发现, LASP1在胃癌肿瘤组织中高表达, 且与肿瘤的淋巴结转移、肿瘤大小及浸润深度相关<sup>[8]</sup>, 但LASP1在胃癌细胞株BGC823中的功能目前尚不清楚。本研究应用RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术下调胃癌细胞株BGC823中LASP1的表达, 并在体外实验中观察肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭能力的变化。为探讨LASP1影响胃癌细胞的侵袭和运动能力的分子机制, 本研究采用F-actin聚合实验和蛋白[质]印迹法(Western blot)实验对转染前后BGC823细胞F-actin的聚合能力和Akt磷酸化的情况进行了检测, 从而探讨LASP1与胃癌发生、发展的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂及细胞株

胃癌细胞系(BGC823、SGC7901、MGC803和HGC27)和正常胃黏膜上皮GES-1细胞株购自美国ATCC公司。一抗LASP1购自美国Millipore公司, 一抗Akt、p-Akt(Ser473)购自美国Cell Signaling公司, RPMI-1640培养液和胎牛血清购自美国Hyclone公司, Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000和TRIzol试剂盒购自美国Invitrogen公司, 反

转录试剂盒购自日本东洋纺绩株式会社, 实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)试剂盒购自瑞士Roche公司, Cell-Light<sup>TM</sup> EdU Apollo<sup>®</sup> 488细胞增殖试剂盒购自广州市锐博生物科技有限公司, Transwell小室、细胞培养板购自美国Corning公司, Matrigel基质胶购自美国BD公司, 鬼笔环肽购自美国Invitrogen公司。

### 1.2 细胞培养与转染

LASP1 siRNA购自上海吉凯基因化学技术有限公司, 序列为: 5'-AAGGTGAACTGTCTGGATAAG-3', 阴性对照(negative control, NC)siRNA序列为: 5'-UATUCGCTTCGUUGACGCUAA-3'。将BGC823细胞培养于含有10%胎牛血清的RPMI-1640培养液中, 置于37℃、CO<sub>2</sub>体积分数为5%的培养箱中培养, 选取对数生长期的细胞进行试验。将细胞分为3组: ① siLASP1/BGC823细胞组, BGC823细胞瞬时转染LASP1 siRNA; ② NC组, BGC823细胞瞬时转染NC siRNA; ③ 空白对照组, BGC823细胞常规培养, 不进行任何处理。转染步骤按照转染试剂说明书操作。

### 1.3 RTFQ-PCR检测LASP1 mRNA的表达

收集各个实验组对数生长期的细胞, 用TRIzol提取总RNA, 按照反转录试剂盒说明书进行cDNA的合成。取2 μL cDNA, 总体系20 μL, 以SYBR Green染料法进行RTFQ-PCR, GAPDH为内参照。

### 1.4 Western blot检测LASP1蛋白的表达

各实验组细胞转染后培养48 h, 裂解细胞提取总蛋白, 各组加等量蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至PVDF膜。将膜封闭后加入

LASP1、Akt和p-Akt一抗(均为1:1 000稀释), 4 °C温育过夜, 二抗温育1 h, 并以ECL化学发光法显影、曝光。用Image J图像处理软件进行灰度分析。

### 1.5 细胞增殖实验

采用Cell-Light™ EdU Apollo® 488细胞增殖试剂盒检测。EdU是一种胸腺嘧啶核苷类似物, 是检测细胞增殖的标志物。取对数生长期的BGC823细胞铺于96孔板中, 转染24 h后加入50 μmol/L EdU工作液, 100 μL/孔, 温育3 h后按照试剂说明书进行操作。荧光显微镜拍照时, 3个实验组各孔在100倍视野下随机取3个视野采集图像。绿色荧光表示温育EdU溶液3 h内增殖的细胞, 蓝色荧光表示细胞总数。细胞增殖率=增殖细胞数/细胞总数, 再进行 $t$ 检验。

### 1.6 细胞迁移实验

将转染24 h实验组和对照组100 μL细胞悬液( $1 \times 10^6$  μL)加入Transwell小室上室, 下室加600 μL含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液, 置于37 °C、CO<sub>2</sub>体积分数为5%的培养箱中培养24 h, 4%多聚甲醛固定, PBS冲洗, 0.1%结晶紫染色15 min。在100倍视野下各取3个视野拍照, 计数, 计算平均值, 重复3次并进行 $t$ 检验。

### 1.7 细胞侵袭实验

将Matrigel基质胶与RPMI-1640培养基按1:3比例稀释, 然后铺在8 μm Transwell小室滤膜上面以覆盖微孔, 放入培养箱约2 h待其干燥。之后的实验操作及统计分析同迁移实验。

### 1.8 肌动蛋白聚合实验

参照参考文献[9]的实验步骤进行操作, 用与F-actin特异性结合的荧光染料鬼笔环肽染色, 检测F-actin聚合的变化。用下列公式计算F-actin的相对含量: 刺激时间荧光值=刺激时间F-actin值/未刺激F-actin值。实验重复3次, 取 $\bar{x} \pm s$ 作为实验结果。

### 1.9 Akt磷酸化的检测

将siLASP1/BGC823和NC组细胞用10 μg/L的表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)刺激10 min后, 用冷PBS终止反应, 裂解细胞提取蛋白做Western blot实验, 将所得结果进行分析。

### 1.10 统计学处理

应用GraphPad Prism 5进行统计学分析,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 LASP1 mRNA和蛋白在胃癌细胞中的表达

RTFQ-PCR结果显示, LASP1基因在4株胃癌细胞中均有表达, 且均高于在正常胃黏膜上皮GES-1细胞中的表达, 其中BGC823和SGC7901表达相对较高(图1)。因此, 我们选择BGC823细胞进行后续的体外实验研究。

### 2.2 转染LASP1 siRNA对胃癌细胞LASP1表达水平的影响

转染后RTFQ-PCR检测结果显示, siRNA对BGC823细胞LASP1 mRNA和蛋白的表达有显著的抑制作用(图2)。

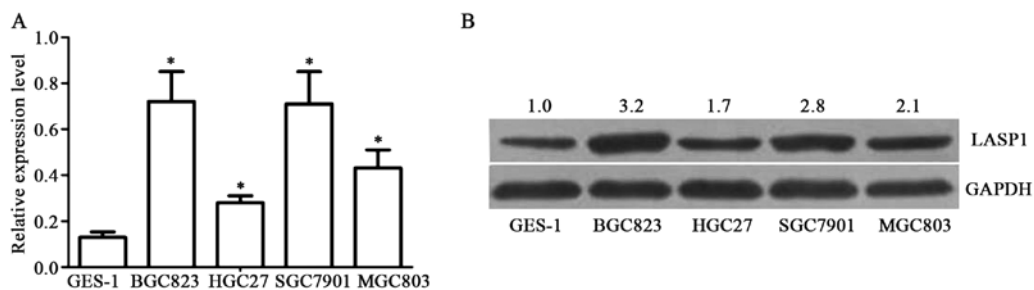


图1 LASP1 mRNA和蛋白在胃癌细胞株中的表达

Fig. 1 Expression of LASP1 mRNA and protein in different gastric cancer cell lines

A: RTFQ-PCR was used to detect the over-expression of LASP1 mRNA level in BGC823 cells; B: Western blot was used to detected the up-regulation of LASP1 protein level in BGC823 cells; GAPDH was used as a loading control. \*:  $P < 0.05$ , compared with GES-1 cells

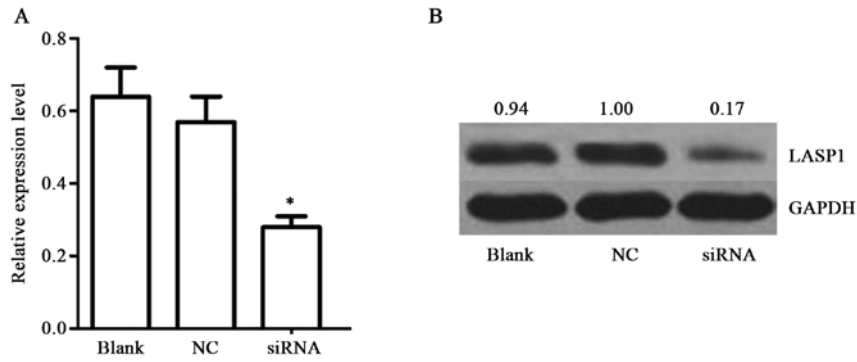


图2 转染后LASP1 mRNA和蛋白在胃癌细胞株BGC823中的表达

Fig. 2 Expression of LASP1 mRNA and protein in BGC823 cell lines after transfection

A: Compared with NC group, LASP1 siRNA transfection could significantly reduce the LASP1 mRNA expression detected by RTFQ-PCR in BGC823 cells; B: Western blot showed that LASP1 siRNA transfection led to dramatic reduction of LASP1 protein expression in BGC823 cells. GAPDH was used as a loading control. \*:  $P < 0.05$ , compared with blank group and NC group

### 2.3 LASP1抑制胃癌BGC823细胞的增殖

EdU细胞增殖实验能快速直观地检测细胞复制活性, siLASP1/BGC823细胞组细胞的增殖率( $0.307 \pm 0.010$ )低于NC组( $0.374 \pm 0.015$ )及空白对照组( $0.390 \pm 0.008$ ), 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 提示抑制LASP1的表达可降低BGC823细胞的增殖能力(图3)。

### 2.4 LASP1抑制胃癌BGC823细胞的迁移

转染LASP1 siRNA的BGC823细胞透过滤膜的数量( $238.0 \pm 8.9$ )明显低于NC组( $308.0 \pm 6.7$ )及空白对照组细胞( $335.0 \pm 9.6$ ), 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 提示LASP1的表达降低可抑制BGC823细胞的迁移能力(图4)。

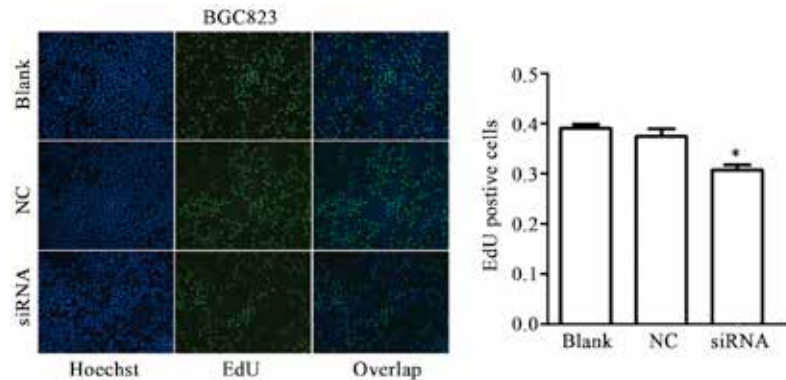


图3 EdU实验检测LASP1对BGC823细胞增殖的影响

( $\times 100$ )

Fig. 3 Effect of LASP1 on cell proliferation in BGC823 cell lines using EdU assay

\*:  $P < 0.05$ , compared with blank group and NC group

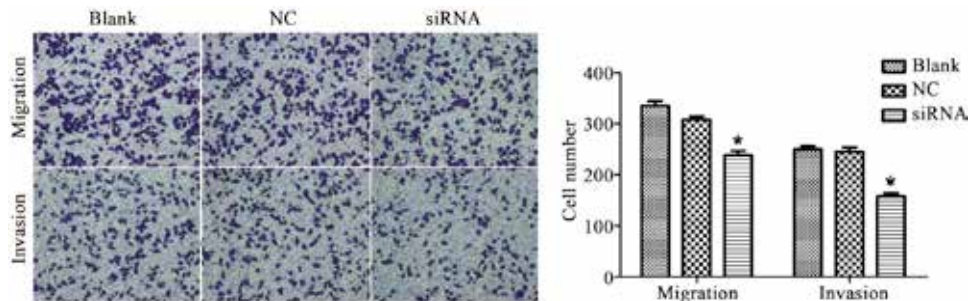


图4 Transwell小室实验检测LASP1对BGC823细胞迁移和侵袭的影响

( $\times 100$ )

Fig. 4 Influence of LASP1 on cell migration and invasion in BGC823 cell lines by transwell assay

\*:  $P < 0.05$ , compared with blank group and NC group

## 2.5 LASP1抑制胃癌BGC823细胞的侵袭

转染LASP1 siRNA的BGC823细胞透过Matrigel基质胶和滤膜的数量( $157.0 \pm 7.2$ )明显低于NC( $245.0 \pm 8.7$ )及空白对照组细胞( $250.0 \pm 6.4$ ), 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 提示LASP1的低表达可抑制BGC823细胞的侵袭能力(图4)。

## 2.6 F-actin聚合实验

F-actin聚合实验结果显示, LASP1 siRNA转染后的BGC823细胞在15~120 s时细胞内肌动蛋白聚合量比对照组细胞明显减少(图5)。

## 2.7 Akt磷酸化的检测

为研究LASP1在胃癌侵袭与转移中发挥作用的信号通路, 本实验采用10  $\mu\text{g/L}$  EGF无血清培养基分别刺激各组细胞10 min。结果显示, EGF刺激后, NC组Akt的磷酸化增强; 而siLASP1/BGC823细胞组中Akt的磷酸化明显受到抑制(图6)。

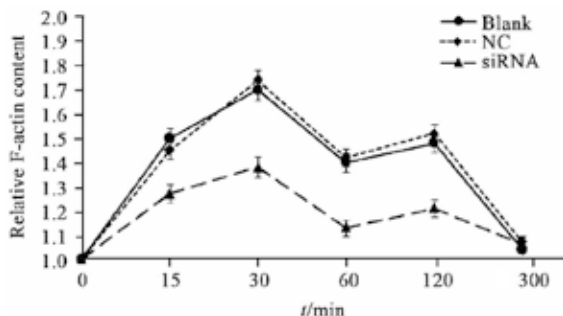


图5 F-actin聚合实验检测BGC823细胞在不同时间的F-actin聚合量

Fig. 5 Time course of relative F-actin content in BGC823 cells by F-actin polymerization assay

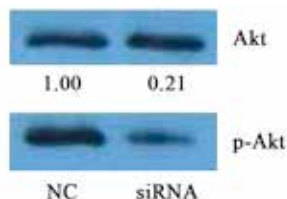


图6 Western blot检测BGC823转染后在EGF刺激下Akt的磷酸化结果

Fig. 6 Western blot analysis of the Akt phosphorylation induced by EGF in transfected BGC823 cells

## 3 讨论

LASP1基因染色体定位于17q11~q21.3,

所编码蛋白由261个氨基酸组成。LASP1蛋白N末端的LIM结构域可与CXCR2等趋化因子受体结合, 在细胞的趋化运动中发挥重要的调节作用。与LIM结构域相邻有R1和R2两段伴肌动蛋白样的重复序列, R1和R2序列介导LASP1与肌动蛋白F-actin和黏着斑蛋白Krp1结合, 从而参与细胞伪足延伸和运动的调节。LASP1蛋白C末端的SH3结构域为富含脯氨酸的序列, 能与细胞骨架蛋白Palladin、LPP、血管扩张刺激磷蛋白(VASP)和斑联蛋白Zyxin等蛋白相互作用, 从而调节细胞伪足形成、延伸和侵袭运动<sup>[9-10]</sup>。

已有研究发现, LASP1蛋白在前列腺癌、胆囊癌、非小细胞肺癌、结直肠癌、口腔癌及乳腺癌等肿瘤中高表达, 并与肿瘤的增殖、侵袭和转移密切相关。Li等<sup>[3]</sup>通过siRNA沉默胆囊癌细胞株中LASP1的表达后发现, 细胞增殖、侵袭和迁移能力降低, 细胞周期被阻滞在G<sub>2</sub>/M期, 进一步进行机制研究发现, LASP1是通过调节S100P的表达, 参与PI3K/AKT信号通路, 从而调节细胞的运动能力。Grunewald等<sup>[7]</sup>研究发现, LASP1在乳腺癌组织中过表达, 且与肿瘤大小和淋巴结转移相关。

本研究采用RNAi下调胃癌BGC823细胞中LASP1的表达, 并应用RTFQ-PCR和Western blot在mRNA和蛋白水平上验证了LASP1的低表达。细胞功能学研究显示, 下调LASP1的表达后, 细胞增殖能力显著下降, 说明抑制LASP1的表达可以抑制胃癌细胞的生长。有研究表明, 抑制LASP1的表达可使胆囊癌和口腔癌等多种肿瘤细胞的细胞周期被阻滞在G<sub>2</sub>/M期, 从而抑制细胞的生长<sup>[3,6]</sup>。

肿瘤细胞的迁移和侵袭是转移过程中的重要步骤, 细胞的迁移是肿瘤转移的限速环节, 而侵袭则是恶性肿瘤细胞从原发部位突破基底膜向周围组织浸润的过程, 是恶性肿瘤转移的前提和基础。在本研究中, 细胞迁移和浸润实验的结果均显示, 与阴性对照组和空白对照组比较, RNAi组穿膜进入Transwell小室下室的肿瘤细胞数量明显减少( $P < 0.05$ ), 提示下调LASP1的表达可使胃癌BGC823细胞的运动能力显著降

低, 说明LASP1在肿瘤晚期的侵袭和转移中起重要作用。

对于LASP1影响肿瘤侵袭和转移的机制, 国内外报道较少。LASP1蛋白在黏着斑、膜皱襞和片状伪足等多个肌动蛋白组装的部位集中, 可与相应的骨架蛋白结合, 参与细胞骨架和运动的调节。siRNA下调乳腺癌细胞中LASP1的表达后, 可通过抑制肿瘤细胞内肌动蛋白的形成和伪足的延伸来抑制肿瘤的侵袭和转移<sup>[7]</sup>。趋化运动与细胞的侵袭能力密切相关, 而F-actin聚合是细胞趋化运动的关键。本实验结果显示, siLASP1/BGC823细胞F-actin聚合明显减少, 说明胃癌BGC823细胞在干扰LASP1的表达后运动能力降低与F-actin聚合减少密切相关。Wang等<sup>[11]</sup>报道LASP1通过调控MAPK、PI3K/Akt和Smad信号通路介导上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transformation, EMT)发生, 从而促进结直肠癌转移。本实验用EGF刺激各组细胞10 min, Western blot检测结果显示, siLASP1/BGC823细胞组中Akt的磷酸化明显受抑制, 提示LASP1在胃癌细胞中通过参与PI3K/Akt信号转导通路而影响肿瘤侵袭和转移。

综上所述, 本实验应用siRNA转染胃癌BGC823细胞, 抑制LASP1的表达后发现, BGC823细胞的增殖、迁移和侵袭能力均降低, 并且可能是通过参与F-actin聚合和PI3K/AKT信号通路从而调控肿瘤的侵袭和转移。LASP1可作为新的胃癌标志物和治疗靶点。

#### [参 考 文 献]

[1] TOMASETTO C, MOOG-LUTZ C, REGNIER C H, et al. LASP1 (MLN 50) defines a new LIM protein subfamily characterized by the association of LIM and SH3 domains

[J]. FEBS Lett, 1995, 373(3): 245-249.

- [2] SUN W, GUO L, SHAO G, et al. Suppression of LASP1 attenuates the carcinogenesis of prostatic cancer cell lines: Key role of the NF- $\kappa$ B pathway [J]. Oncol Rep, 2017, 37(1): 341-347.
- [3] LI Z, CHEN Y, WANG X, et al. LASP1 induces proliferation, metastasis and cell cycle arrest at the G<sub>2</sub>/M phase in gallbladder cancer by down-regulating S100P via the PI3K/AKT pathway [J]. Cancer Lett, 2016, 372(2): 239-250.
- [4] ZHENG J, WANG F, LU S, et al. LASP1, regulated by miR-203, promotes tumor proliferation and aggressiveness in human non-small cell lung cancer [J]. Exp Mol Pathol, 2016, 100(1): 116-124.
- [5] NIU Y, SHAO Z, WANG H, et al. LASP1-S100A11 axis promotes colorectal cancer aggressiveness by modulating TGF $\beta$ /Smad signaling [J]. Sci Rep, 2016, 6: 26112.
- [6] SHIMIZU F, SHIIBA M, OGAWARA K, et al. Overexpression of LIM and SH3 Protein 1 leading to accelerated G<sub>2</sub>/M phase transition contributes to enhanced tumorigenesis in oral cancer [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e83187.
- [7] GRUNEWALD T G, KAMMERER U, SCHULZE E, et al. Silencing of LASP1 influences zyxin localization, inhibits proliferation and reduces migration in breast cancer cells [J]. Exp Cell Res, 2006, 312(7): 974-982.
- [8] ZHENG J, YU S, QIAO Y, et al. LASP1 promotes tumor proliferation and metastasis and is an independent unfavorable prognostic factor in gastric cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2014, 140(11): 1891-1899.
- [9] LU S, NIU N, GUO H, et al. ARK5 promotes glioma cell invasion, and its elevated expression is correlated with poor clinical outcome [J]. Eur J Cancer, 2013, 49(3): 752-763.
- [10] LI B, ZHUANG L, TRUEB B. Zyxin interacts with the SH3 domains of the cytoskeletal proteins LIM-nebulette and LASP1 [J]. Biol Chem, 2004, 279(19): 20401-20410.
- [11] WANG H, SHI J, LUO Y, et al. LIM and SH3 protein 1 induces TGF $\beta$ -mediated epithelial-mesenchymal transition in human colorectal cancer by regulating S100A4 expression [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(22): 5835-5847.

(收稿日期: 2017-06-02 修回日期: 2017-10-15)