

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2023.07.005

· 基础研究 ·

DJ-1 过表达通过 PTEN/Akt 通路促进人胃癌 MGC803 细胞的增殖、迁移、侵袭与上皮间质转化

周娟^a, 夏红^a, 刘芳^a, 苏坚^b, 苏波^c, 苏琦^a (南华大学 a. 肿瘤研究所, 湖南省肿瘤细胞与分子病理学重点实验室; b. 附属第二医院 病理科, 湖南省胃癌防治临床研究中心; c. 药学与药理学研究所, 湖南省高校药物蛋白质组学重点实验室, 湖南 衡阳 421001)

[摘要] **目的:** 探讨 DJ-1 基因过表达对人胃癌 MGC803 细胞增殖、迁移、侵袭与上皮间质转化(EMT)的影响及其机制。**方法:** 利用基因转染技术构建 DJ-1 基因过表达 MGC803 细胞, 实验分为 MGC803、空载体和 DJ-1 过表达组。采用 MTT、平板克隆形成、细胞划痕和 Transwell 实验分别检测 DJ-1 过表达对 MGC803 细胞增殖、克隆形成、迁移与侵袭的影响; qPCR 和 WB 法检测 DJ-1 过表达对各组细胞 DJ-1、PTEN、Akt、p-Akt、Snail、vimentin、E-cadherin、MMP-9 与 TIMP-3 表达的影响, 相差显微镜下观察 MGC803 细胞形态学的变化。裸鼠荷瘤实验检测 DJ-1 过表达对 MGC803 细胞移植瘤体内生长的影响。**结果:** 成功构建 DJ-1 基因稳定过表达的 MGC803 细胞。与 MGC803 组和空载体组比较, DJ-1 过表达组细胞的增殖能力与克隆形成数均显著增加(均 $P < 0.05$), 细胞迁移距离明显增加、划痕距离明显缩短(均 $P < 0.05$), 迁移与侵袭细胞数显著增多(均 $P < 0.05$), DJ-1 mRNA 与蛋白表达明显上调、PTEN mRNA 与蛋白表达下调(均 $P < 0.05$), Akt 总蛋白各组比较无明显差异(均 $P > 0.05$), p-Akt 蛋白表达明显上调($P < 0.05$), Snail、vimentin 与 MMP-9 表达上调、E-cadherin 与 TIMP-3 表达下调(均 $P < 0.05$)。相差显微镜下见长梭形细胞数目增多, 圆形与椭圆形细胞减少, 异型性更为明显。荷瘤裸鼠体内实验结果表明, 与 MGC803 组相比较, DJ-1 过表达组 MGC803 细胞移植瘤生长速度明显加快、移植瘤质量显著增加(均 $P < 0.05$)。**结论:** DJ-1 过表达可通过 PTEN/Akt 通路在体内外抑制 MGC803 细胞的增殖、迁移、侵袭与 EMT。

[关键词] 胃癌; MGC803 细胞; DJ-1 基因; PTEN/Akt 通路; 增殖; 迁移; 侵袭; 上皮间质转化

[中图分类号] R735.2; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)07-0577-09

DJ-1 over-expression promotes proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transformation of human gastric cancer MGC803 cells through PTEN/Akt pathway

ZHOU Juan^a, XIA Hong^a, LIU Fang^a, SU Jian^b, SU Bo^c, SU Qi^a (a. Institute of Cancer Research, Hunan Provincial Key Laboratory of Cancer Cell and Molecular Pathology; b. Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital, Hunan Clinical Research Center for Gastric Cancer Prevention and Treatment; c. Institute of Pharmacy and Pharmacology, Key Laboratory for Pharmacoproteomics of Hunan Provincial University, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of DJ-1 gene over-expression on proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transformation (EMT) of human gastric cancer MGC803 cells and the underlying mechanism. **Methods:** MGC803 cells with DJ-1 over-expression were constructed by gene transfection technology. Three groups of cells, namely MGC803 group, empty vector group, and DJ-1 over-expression group were set. The effects of DJ-1 gene over-expression on proliferation, clone formation, migration and invasion of MGC803 cells were detected by MTT, plate cloning assay, cell scratch assay and Transwell invasion assay, respectively. The effects of DJ-1 over-expression on the expression levels of DJ-1, PTEN, Akt, p-Akt, Snail, vimentin, E-cadherin, MMP-9 and TIMP-3 were detected by qPCR and Western blot. The morphological changes of MGC803 cells were observed by phase contrast microscope. The effect of DJ-1 over-expression on the growth of MGC803 cell transplanted tumor *in vivo* was detected in nude mice. **Results:** MGC803 cells with stable DJ-1 over-expression were constructed successfully. The proliferation ability and number of clones in DJ-1 over-expression group were significantly increased compared with those in MGC803 cell group and empty vector

[基金项目] 国家自然科学基金(No.81973532); 湖南省教育厅科学研究项目(No.19C1610); 南华大学科研基金项目(No.220XNK002)

[作者简介] 周娟(1989—), 女, 硕士, 讲师, 主要从事胃癌发生与防治的分子机制, E-mail: 1261373756@qq.com

[通信作者] 苏琦, E-mail: suqi1945@163.com

group (all $P<0.05$); the cell migration distance was significantly increased while the scratch distance was significantly shortened in DJ-1 over-expression group compared with those in MGC803 cell group and empty vector group (all $P<0.05$); and the migrated and invaded cells of DJ-1 over-expression group were significantly more than those of MGC803 group and empty vector group (all $P<0.05$). Moreover, the expression of DJ-1 was significantly up-regulated while the expression of PTEN was significantly down-regulated at both the mRNA and protein levels in the DJ-1 over-expression group compared with those in MGC803 group and empty vector group (both $P<0.05$). There was no significant difference in total Akt protein among all groups ($P>0.05$), but the expression of p-Akt protein in DJ-1 over-expression group was significantly up-regulated compared with MGC803 group and empty vector group (all $P<0.05$). In addition, Snail, vimentin and MMP-9 were up-regulated in DJ-1 over-expression group, while E-cadherin and TIMP-3 were down-regulated (all $P<0.05$). Phase contrast microscopy showed that the number of long spindle cells increased while the number of round and oval cells decreased, and the atypia was more obvious in the DJ-1 over-expression group. *In vivo* experiments showed that the growth rate of transplanted tumor in DJ-1 over-expression group was significantly accelerated, and the weight of transplanted tumor was significantly increased (both $P<0.05$) as compared with MGC803 group. **Conclusion:** DJ-1 over-expression can inhibit the proliferation, migration, invasion and EMT of MGC803 cells both *in vitro* and *in vivo* through PTEN/Akt pathway.

[Key words] gastric cancer; MGC803 cell; DJ-1 over-expression; PTEN/Akt pathway; proliferation; migration; invasion; epithelial-mesenchymal transformation (EMT)

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(7): 577-585. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.07.005]

流行病学调查结果显示, 尽管胃癌发病率和病死率在近年来明显下降, 但是全球胃癌发病率与病死率仍然分别居肿瘤的第五位与第三位, 胃癌在中国的发病率与病死率均位于肿瘤的第三位^[1]。由于胃癌患者就诊时大多已发生侵袭与转移, 常规手术和化疗效果较差, 并且存在抗药性, 从而患者的5年生存率低, 严重危害着人们的健康与生命^[2]。因此, 研究胃癌侵袭与转移的分子机制, 开发新一代抗肿瘤药物与靶向干预治疗方法, 对胃癌的诊治具有十分重要的意义。DJ-1又称帕金森病相关蛋白7(Parkinson's disease-associated protein 7, PARK7), 是一种高度保守的蛋白质, 分子量为20 000, 其基因位于染色体1p36.12-1p36.33。DJ-1在多种恶性肿瘤中高表达, 与肿瘤的发生、生长、转移、复发和化疗耐药性密切相关, 可能是恶性肿瘤诊治的重要标志物^[3-4]。上皮间质转化(EMT)对恶性肿瘤进展至关重要, 在EMT过程中, 细胞-细胞和细胞-细胞外基质的相互作用被重塑, 导致上皮细胞和底层基底膜分离, 使肿瘤细胞的转移潜能增加^[5]。本研究探讨DJ-1基因过表达对胃癌MGC803细胞增殖、迁移与侵袭和EMT的影响, 旨在为靶向临床干预治疗胃癌提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RPMI 1640培养基购自美国Hyclone公司, 胎牛血清购自上海ExCell Biology公司, DJ-1(ab18257)、MMP-9(ab38898)、TIMP3(ab39184)、vimentin(ab92547)、E-cadherin(ab40772)、Snail(ab53519)、Ki-67(ab66155)、CD34(ab81289)和 β -actin(ab3280)等抗体购自英国Abcam公司, PTEN(#9188)、Akt(#4691)和p-Akt(#4046)抗体购自美国CST公司, Eastep™总RNA

提取试剂盒、qPCR试剂盒购自美国Promega公司, 逆转录试剂盒购自美国Thermo公司, 真核表达质粒pGFP-V-RS vector和pEGFP-DJ-1质粒购自美国Origene公司, Lipofectamine™ 2000购自美国Invitrogen公司, Transwell小室购自美国Corning公司, 羊抗兔二抗与FITC标记的羊抗兔二抗购自北京康维世纪公司。

1.2 细胞培养与建立稳定过表达DJ-1基因的MGC803细胞

人胃癌MGC803细胞由南华大学肿瘤研究所保存。细胞置于含10%新生牛血清的RPMI 1640培养液中, 于37℃、5%CO₂的恒湿培养箱中培养。取对数生长期MGC803细胞(1×10^5 个/mL)接种于24孔板, 用无血清RPMI 1640培养基与无血清Opti-MEM培养基洗涤3次, 放回培养箱中。0.8 μ g质粒DNA pGFP-V-RS vector用无血清的Opti-MEM稀释, 最终体积为250 μ L, 标记为A液。10 μ L Lipofectamine™ 2000加到无血清Opti-MEM培养基中混匀, 标记为B液。将A与B液混合得到C液, 将C液加到24孔板, 培养6 h, 吸弃原培养液, 更换为含10%胎牛血清的Opti-MEM培养液。48 h后将孔内细胞以1:10比例传代, 24 h后, 用含终质量浓度为500 μ g/mL G418的RPMI 1640完全培养基培养并筛选阳性克隆MGC803细胞, 培养14 d后, 挑取绿色荧光的阳性克隆至24孔板, 待形成阳性单克隆后再扩大培养, 以250 μ g/mL G418作为维持质量浓度, 反复3~4次, 最后移入培养瓶培养并冻存。实验分为MGC803组、空载体组与DJ-1过表达组。

1.3 qPCR法检测MGC803细胞中DJ-1、Snail、vimentin、MMP-9、TIMP-3 mRNA的表达

选取对数生长期的各组细胞, 用总RNA提取试剂盒提取各组细胞总RNA, 并用逆转录试剂盒将纯

化的RNA逆转录为第一链cDNA。qPCR引物序列:DJ-1上游引物为5'-CCTGGTGTGGGGCTTGTA-3',下游引物为5'-ACCACATCACGGCTACACTG-3';Snail上游引物为5'-CGTAGCTGATCGTGATGCTGAG-3',下游引物为5'-TAGCTGTAGTGCTGTAGCTGTA-3';vimentin上游引物为5'-ACACCCTGCAATCTTTCAGACA-3',下游引物为5'-AGAAATCCTGCTCTCCTCGCCT-3';E-cadherin上游引物为5'-CTCCCAATACATCTCCCTTCAC-3',下游引物为5'-CGCCTCCTTCTTCATCATAGTAA-3';MMP-9上游引物为5'-GTGCTGGGCTGCTGCTTTGCTG-3',下游引物为5'-TGGGGTTCGCATGGCCTTCA-3';TIMP-3上游引物为5'-AACTTGGGTGAAGGCTGAGTG-3',下游引物为5'-CATGAGGCAGGTCTGGAACG-3'; β -actin上游引物为5'-TCTACAATGAGCTGCGTGTGG-3',下游引物为5'-GGAACCGCTCATTGCCAATG-3'。qPCR反应条件:预变性95℃2min;热循环94℃15s、55℃30s、72℃30s,共计40个循环;熔解曲线分析定为60~95℃。RNA表达水平归一化到 β -actin对照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因mRNA的相对表达量。

1.4 WB法检测MGC803细胞中DJ-1、vimentin、E-cadherin、MMP-9、TIMP3、PTEN、p-Akt等蛋白的表达

收集对数生长期各组细胞并提取细胞中总蛋白质,BCA法测定蛋白质浓度,每组取等量样本进行SDS-PAGE,将蛋白质泳带转膜,在10%脱脂奶粉中室温下封闭1h,根据各抗体使用说明书,加入用TBST稀释的一抗(DJ-1、vimentin、E-cadherin、MMP-9和TIMP3抗体稀释度为1:500,PTEN抗体稀释度为1:1000,Snail抗体稀释度为1:1500,p-Akt抗体稀释度为1:2000; β -actin抗体稀释度为1:4000)4℃过夜,次日加入FITC标记的羊抗兔二抗(稀释度1:3000)室温下处理1h。最后采用ECL发光法显色,采集图像,Image J软件分析蛋白质条带的灰度值,计算蛋白的相对表达量。

1.5 MTT法检测MGC803细胞的增殖能力

取对数生长期各组细胞,制成单细胞悬液,以每孔 1×10^4 个细胞的密度接种到96孔板,每组设6个复孔,细胞贴壁4~6h后,更换为RPMI 1640完全培养基,加入20 μ L MTT溶液,培养4h后吸弃上清液,每孔加入150 μ L DMSO溶液,摇床上平摇10~15min,使结晶物充分溶解,酶联免疫检测仪测量各孔波长570nm处的光密度(D)值;细胞增殖抑制率=(1-实验组 D_{570} 值/对照组 D_{570} 值) $\times 100\%$ 。

1.6 平板克隆形成实验检测MGC803细胞克隆形成能力

取对数生长期各组细胞,常规胰酶消化为单细

胞悬浮液,接种到6孔板中(100个细胞/孔),每组设置3个复孔,轻轻摇匀后培养6h。10d后形成肉眼可见的克隆时即可结束培养,弃掉孔板中液体,PBS洗3遍,4%多聚甲醛溶液固定30min,弃掉液体,倒置沥干后加入0.5%结晶紫染色30min,PBS洗3次,自然干燥。观察、计数克隆形成数。

1.7 细胞划痕实验检测MGC803细胞的迁移能力

取对数生长期各组细胞,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL,吸1mL细胞悬液接种于6孔板,置于RPMI 1640培养液中37℃、5%CO₂下培养,直至形成细胞单层,用10 μ L移液器在细胞板上划痕,无血清培养液洗3次,加新鲜无血清培养基,光学显微镜下测量划痕区的距离。

1.8 Transwell实验检测MGC803细胞的迁移与侵袭能力

细胞迁移实验:取各组细胞,用胰蛋白酶消化细胞,离心后弃上清,加入无血清培养基,制成含 2×10^5 个/mL细胞的悬液,吸取200 μ L细胞悬液加入Transwell上室,在下室加入无血清的DMEM培养液,培养12h,取出Transwell小室,吸出下室的培养基,PBS清洗小孔3次,4%多聚甲醛固定,PBS清洗小室3次,0.5%结晶紫染色,擦掉上层细胞,PBS洗3次。将小室底部膜切割后放于载玻片上,甘油封片,倒置显微镜下随机观察10个视野,计数穿膜细胞数。细胞侵袭实验:除在Transwell上室中加入细胞悬液前预铺基质胶外,其余实验步骤同细胞迁移实验。

1.9 免疫荧光染色法检测MGC803细胞DJ-1、PTEN、p-Akt与Akt等蛋白的表达

实验分组同上,将对数生长期的各组细胞按每孔 5×10^5 个接种,待细胞贴壁,弃旧培养基,取出盖玻片,PBS3次(5min/次),多聚甲醛固定,PBS洗3次(5min/次),Triton覆盖细胞,PBS洗3次(5min/次),吸干PBS液,山羊血清封闭,37℃处理1h,吸净封闭液,加入一抗(稀释比率同WB),湿盒内4℃过夜培养。次日移置37℃复温1h,PBS洗3次(5min/次);在暗室中加入FITC标记的羊抗兔二抗(稀释度同WB),湿盒中处理1h,PBS清洗后,DAPI染核,甘油封片,荧光显微镜下观察。

1.10 裸鼠MGC803细胞移植瘤模型的建立与观察

经南华大学医学伦理委员会审查表批准后,从北京维通利华实验动物技术有限公司[生产许可证号SCXK(京)2012-0001]购买10只雄性、4周龄、质量为13~16g的BALB/c裸鼠,所有裸鼠在学校动物实验部SPF标准实验室喂养,以保证实验的安全性与可靠性。实验分为MGC803组与DJ-1过表达组,各组细胞密度调至 1×10^7 个/mL,分别取0.2mL细胞悬液接种于裸鼠腋部皮下,观察裸鼠进食、饮水、毛发、精神、活动等情况。

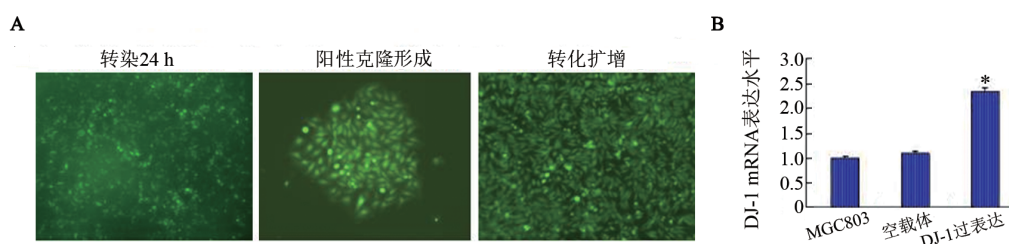
每隔1周测量移植瘤大小(长径a和短径b),计算肿瘤体积(V), $V=(a \times b^2)/2$ 。实验6周时麻醉处死裸鼠,剥离移植瘤称质量,将移植瘤组织固定于10%的中性甲醛中,石蜡包埋、切片。免疫组织化学染色参照文献[6]的方法,观察移植瘤组织中DJ-1、PTEN、Ki-67、vimentin、E-cadherin与CD-34蛋白的表达情况。

1.11 统计学处理

以上主要实验均独立重复3次。利用SPSS 18.0统计软件对实验数据进行分析,符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建DJ-1过表达的MGC803细胞



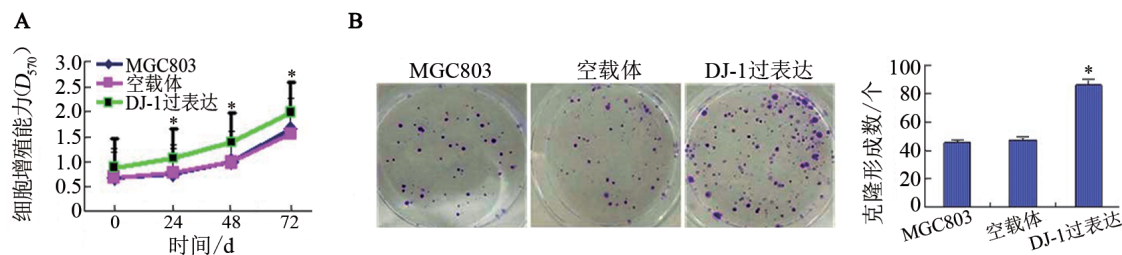
A: 荧光显微镜下观察DJ-1在MGC803细胞中的表达($\times 100$); B: qPCR法检测各组细胞中DJ-1 mRNA表达水平。与MGC803组或空载体组比较,* $P < 0.05$ 。

图1 成功构建DJ-1基因过表达的MGC803细胞

2.2 DJ-1过表达可增强MGC803细胞的增殖能力

MTT实验结果(图2A)显示,转染24、48和72 h后,DJ-1过表达组MGC803细胞增殖能力较MGC803细胞组和空载体组显著提高(均 $P < 0.05$)。

平板克隆形成实验结果(图2B)显示,DJ-1过表达组细胞克隆形成数较MGC803组和空载体组明显增加(均 $P < 0.05$)。结果表明,DJ-1过表达能可显著增强MGC803细胞在体外的增殖能力。



A: MTT法检测各组MGC803细胞的增殖能力; B: 平板克隆形成实验检测各组MGC803细胞的克隆形成能力(结晶紫染色, $\times 40$)。与MGC803组或空载体组比较,* $P < 0.05$ 。

图2 DJ-1过表达对MGC803细胞增殖的影响

2.3 DJ-1过表达可增强MGC803细胞的迁移与侵袭能力

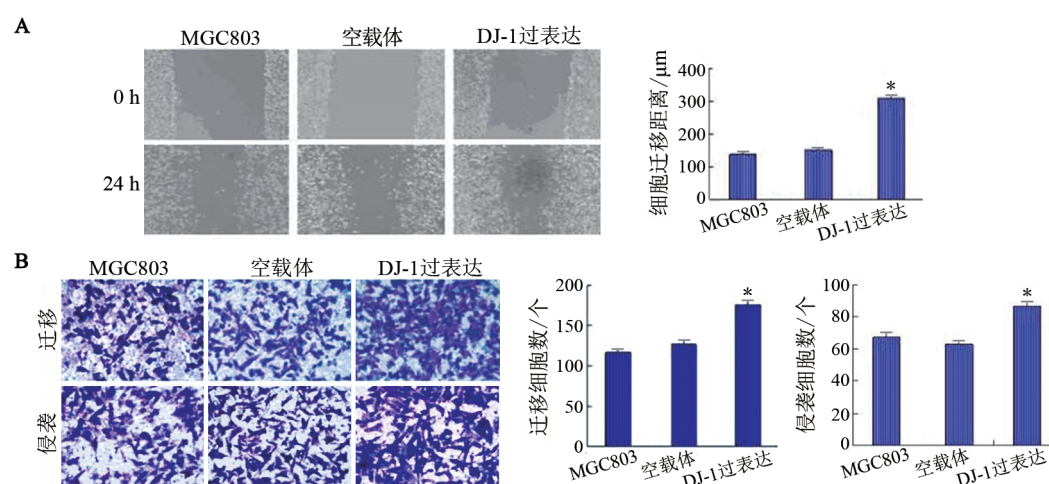
划痕实验结果(图3A)显示,转染24 h时,DJ-1过表达组MGC803细胞迁移距离较MGC803组和空载体组明显增加(均 $P < 0.05$),而划痕距离较MGC803

组与空载体组明显缩短(均 $P < 0.05$)。Transwell实验结果(图3B)显示,DJ-1过表达组MGC803细胞24 h后的迁移和侵袭细胞数均显著多于MGC803组及空载体组(均 $P < 0.05$)。结果表明,DJ-1过表达能显著增强MGC803细胞的迁移与侵袭能力。

2.4 DJ-1 过表达可负向调控PTEN/Akt 信号通路相关基因与蛋白的表达

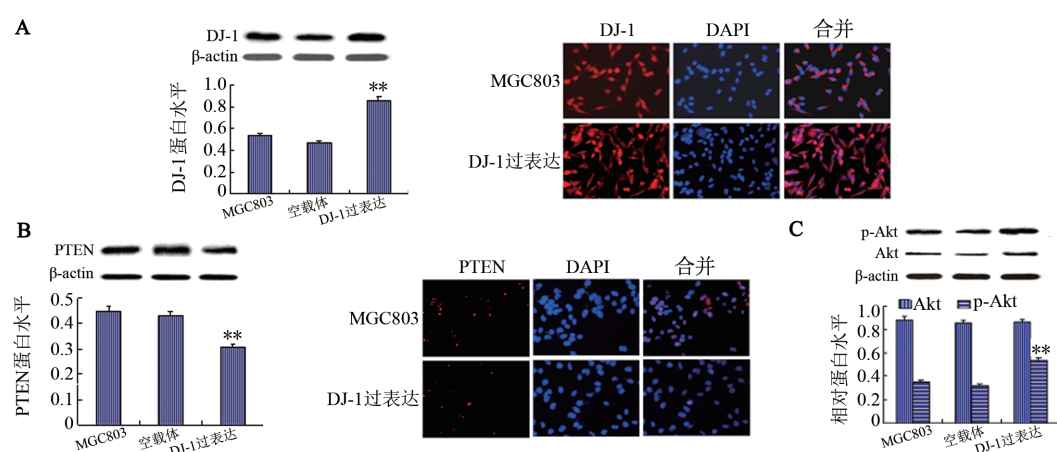
qPCR法(图1B)、WB法和免疫荧光染色法检测结果(图4)显示,与MGC803组和空载体组比较,DJ-1过表达组MGC803细胞中DJ-1 mRNA和蛋白表达明

显上调(均 $P<0.05$),PTEN mRNA和蛋白表达明显下调(均 $P<0.05$),p-Akt蛋白表达明显上调(均 $P<0.05$)。免疫荧光染色结果印证了qPCR法与WB法检测结果。结果表明,DJ-1过表达可负向调控PTEN/Akt信号通路相关基因与蛋白的表达。



A:划痕实验检测各组MGC803细胞的迁移能力($\times 100$);B:Transwell实验检测各组MGC803细胞的迁移与侵袭能力(结晶紫染色, $\times 400$)。与MGC803组或空载体组比较,* $P<0.05$ 。

图3 DJ-1 过表达对MGC803细胞迁移与侵袭的影响



A:WB法和免疫荧光染色法检测DJ-1蛋白的表达;B:WB法和免疫荧光染色法检测PTEN蛋白的表达;

C: WB法检测Akt和p-Akt蛋白表达。与MGC803组和空载体组比较,** $P<0.01$ 。

图4 DJ-1 过表达对PTEN/Akt信号通路相关蛋白表达的影响($\times 400$)

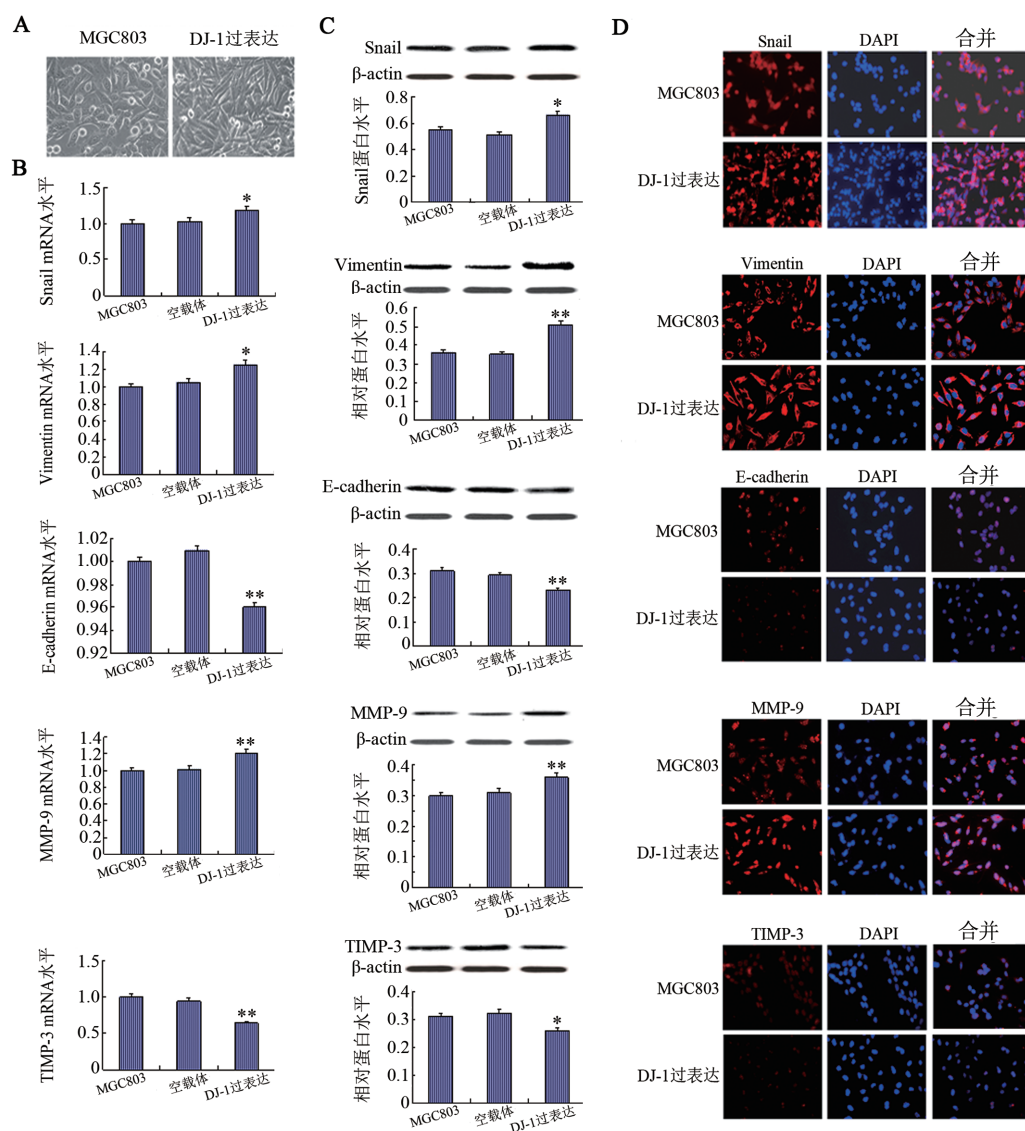
2.5 DJ-1 过表达可促进MGC803细胞的EMT进程

相差显微镜下见大多MGC803细胞呈成纤维细胞样长梭形,异型性明显;DJ-1过表达组成纤维细胞样长梭形细胞明显增多,异型性显著增加(图5A)。qPCR(图5B)、WB法(图5C)检测结果显示,与MGC803组和空载体组相比较,DJ-1过表达组MGC803细胞中Snail、vimentin与MMP-9 mRNA和蛋白表达均明显上调(均 $P<0.05$),E-cadherin与TIMP-3 mRNA和蛋白表达均明显下调(均 $P<0.05$)。免疫荧光染色结果(图5D)印证了qPCR、WB法检测结果。结果表明,DJ-1过表达可促进

MGC803细胞EMT进程。

2.6 DJ-1 过表达对MGC803细胞裸鼠移植瘤的影响

荷瘤实验结果显示,与MGC803组比较,DJ-1过表达组移植瘤体积明显增加(图6A, $P<0.05$),移植瘤质量明显增加(图6B, $P<0.05$)。免疫组化染色结果(图6C)发现,DJ-1过表达组移植瘤组织DJ-1、Ki-67、vimentin、CD-34阳性表达较MGC803组明显增强,而PTEN和E-cadherin表达明显减弱。结果表明,DJ-1过表达可促进裸鼠MGC803细胞移植瘤的生长与肿瘤细胞的EMT进程。



A: 相差显微镜观察细胞形态($\times 400$); B: qPCR法检测细胞中 Snail、vimentin、MMP-9、E-cadherin 和 TIMP-3 表达水平;
C、D: WB法(C)和免疫荧光染色法(D)检测细胞中 Snail、vimentin、MMP-9、E-cadherin 和 TIMP-3 蛋白表达($\times 400$)。
与 MGC803 组和空载体组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图5 DJ-1 过表达对 MGC803 细胞 EMT 相关基因与蛋白表达的影响

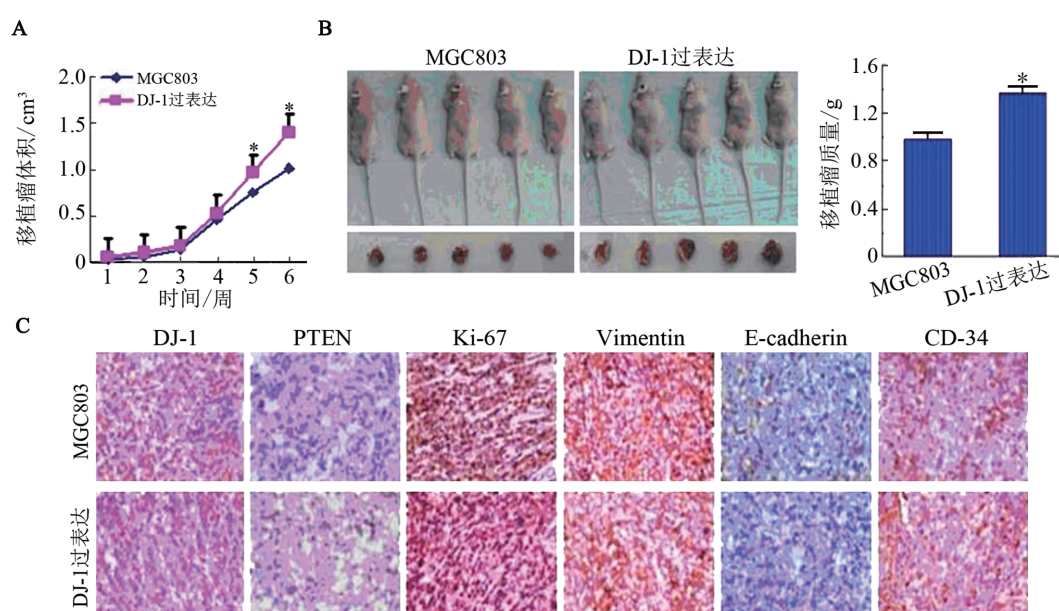
3 讨论

DJ-1 基因在多种恶性肿瘤中高表达,通过多种机制调控肿瘤的发生发展,且与 EMT 进程和化疗耐药性有关,其可能成为肿瘤诊断与治疗的靶点。研究结果^[7]显示,在结直肠癌(colorectal cancer, CRC)中,DJ-1 表达与 TNM 分期及淋巴结转移与预后密切相关,DJ-1 通过 cyclin D1/MDM2-p53 通路促进 CRC 细胞的增殖、迁移和侵袭,而敲除 DJ-1 可上调 p53 表达,抑制 CRC 细胞增殖与迁移侵袭。DJ-1 可激活 Wnt 信号上调 FGF9 与 vimentin 而下调 E-cadherin,促进 CRC 细胞侵袭与 EMT^[8]。最近研究^[9]发现,DJ-1 可调控 ERK1/2、PI3K/Akt 和 ASK1 通路,以及 Nrf2 和 p53 转录因子等相关通路活性。DJ-1 过表达通过

PI3K/Akt/p27/cyclin E、PI3K/Akt/mTOR 与 NF- κ B/Snail 信号通路,促进 CRC 细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT,并且 LFP 方案(奥沙利铂、5-FU 和四氢叶酸)治疗的 CRC 患者较仅接受手术治疗和 DJ-1 低表达患者的生存期延长,表明化疗对 CRC 患者具有良好的疗效^[10]。DJ-1 在 CRC 组织和血清中表达升高,敲低 DJ-1 可抑制 CRC 细胞增殖、迁移和集落形成,表明 DJ-1 可作为 CRC 患者 TNM 分期的血清和组织标志物^[11]。DJ-1 在肝癌中上调,而下调 DJ-1 可抑制异种移植瘤的生长,DJ-1 通过激活 Akt/mTOR、ERK1/2 和 STAT3 通路而促进血管生成和血管内皮细胞迁移^[12]。沉默乳头状甲状腺癌细胞 DJ-1 可下调 DJ-1/PTEN/PI3K/Akt 通路而抑制细胞的增殖、迁移和侵袭^[13]。在黑色素瘤中,PTEN 蛋白表达缺失,DJ-1 蛋白显著增加,沉

默 DJ-1 可诱导黑色素瘤细胞凋亡并抑制其增殖和迁移,并可增加 cleaved caspase-3、cleaved PARP、BAX、p53、Daxx 和 PTEN 表达,降低 survivin、caspase-3 和 PARP 表达及抑制 Akt 磷酸化,提示 DJ-1 可能是治疗黑色素瘤的靶点^[14]。沉默 DJ-1 可促进埃罗替尼(erlotinib)诱导胰腺癌细胞凋亡与抑制增殖,下调 K-RAS、H-RAS 和 N-RAS 并抑制 Akt 和 ERK1/2 磷酸化^[15]。在前列腺癌中 DJ-1 过表达可减少 LC3 转化和自噬体形成,抑制 JNK 和 Bcl-2 磷酸化与 Beclin 1 和

Bcl-2 的解离,而敲除 DJ-1 则效果完全相反,表明 DJ-1 通过 JNK-Bcl-2-Becclin 1 通路抑制自噬而促进前列腺癌细胞的生长^[16]。DJ-1 在食管癌中表达上调,与 EMT 生物标志物呈正相关, DJ-1 可通过激活 Wnt/ β -catenin 通路促进食管癌细胞增殖、侵袭、转移和 EMT^[17]。本课题组近期研究^[6]发现, DJ-1 过表达与胃癌的发生、淋巴结转移、TNM 分期和预后密切相关,其可能是胃癌诊断与预后的标志物。上述研究将为靶向 DJ-1 治疗恶性肿瘤提供实验基础。



A: 裸鼠移植瘤体积; B: 裸鼠移植瘤大体与质量; C: 免疫组化染色法检测移植瘤组织中 DJ-1、PTEN、Ki-67、vimentin、E-cadherin 与 CD-34 蛋白的表达($\times 400$)。与 MGC803 组比较, $P < 0.05$ 。

图6 DJ-1 过表达对 MGC803 细胞裸鼠移植瘤生长的影响

本研究成功构建 DJ-1 基因过表达的 MGC803 细胞,其 DJ-1 mRNA 与蛋白表达明显上调,而 PTEN 表达下调、p-Akt 表达上调。DJ-1 过表达可抑制 MGC803 细胞增殖、迁移与侵袭,成纤维细胞样细胞明显增多,EMT 标志物 Snail、vimentin 与 MMP-9 明显上调,而 E-cadherin 与 TIMP-3 明显下调;裸鼠实验结果证实 DJ-1 过表达可促进移植瘤的生长,移植瘤组织中 DJ-1、Snail、vimentin、Ki-67 和 CD-34 阳性表达增强,PTEN 和 E-cadherin 阳性表达较弱,表明 DJ-1 过表达可通过 PTEN/Akt 通路在体内外促进 MGC803 细胞的增殖、迁移、侵袭与 EMT 进程。

胃癌预后很差且化疗药物存在许多不良反应,因此,寻找新型低毒的中草药具有很好的应用前景。哈文韬等^[18]报道,白术水提物可通过 PI3K/Akt/NF- κ B 通路抑制人胃癌 SGC-7901 细胞增殖。此外,从冬凌草提取的四环二萜类化合物冬凌草甲素具有抑制胃癌、食管癌、结直肠癌等多种肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭与诱导凋亡的作用,并通过抑制黑色素瘤细胞自

噬增强顺铂的敏感性^[19]。这为中草药靶向治疗肿瘤提供了新的机遇。

目前,除采用沉默 DJ-1 抑制肿瘤细胞增殖与侵袭外,研发抑制 DJ-1 的药物成为新的策略。研究^[20]表明,紫杉醇可抑制乳腺癌细胞增殖,并且,褪黑素结合紫杉醇通过 DJ-1/KLF17/ID-1 通路明显抑制乳腺癌细胞的迁移、侵袭与转移,诱导 GSK3- β 核和 Snail 胞质定位,上调 E-cadherin,提示褪黑激素和紫杉醇的结合是抗乳腺癌的有效候选药物。姜黄素可通过下调 DJ-1 调控 PTEN/PI3K/Akt 通路抑制 CRC 细胞增殖并促进细胞凋亡^[21];下调 DJ-1,可提高 caspase-3 活性,通过 PTEN/PI3K/Akt 通路抑制肝癌细胞的增殖^[22]。并且,姜黄素可通过 DJ-1/PTEN/PI3K/Akt 通路抑制肝癌细胞增殖并诱导细胞凋亡^[23]。

大蒜的有效成分二烯丙基二硫醚(diallyl disulfide, DADS)可抑制食管癌、胃癌、结直肠癌、肝细胞癌、肺癌、宫颈癌、白血病、前列腺癌等肿瘤细胞的迁移、侵袭与 EMT^[24]。本研究在 DADS 诱导白血病 HL-60 细

胞分化的差异蛋白质组学时发现 DJ-1 明显下调^[25]。并且, DADS 可通过 Rac1-Pak1/Rock1 与 TGF- β 1/Rac1 通路下调 LIMK1、TGF- β 1、Rac1 与 β -catenin, 抑制胃癌细胞 EMT 与侵袭^[26-27]。最近发现, DADS 可通过 Wnt/ β -catenin 通路上调 ROR α 抑制胃癌细胞增殖、侵袭与 EMT^[28]。然而, DADS 是否可下调 DJ-1 通过负调控 PTEN/Akt 通路抑制胃癌细胞 EMT 与侵袭和抗药性, 尚待进一步研究。

综上所述, 本研究结果表明, DJ-1 基因过表达可通过 PTEN/Akt 信号通路促进人胃癌 MGC803 细胞增殖、迁移、侵袭与 EMT 进程。本研究结果为开发新一代抗肿瘤药物与靶向 DJ-1 干预治疗提供了实验基础。

[参 考 文 献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [2] YANG L, YING X J, LIU S, *et al.* Gastric cancer: Epidemiology, risk factors and prevention strategies[J/OL]. *Chin J Cancer Res*, 2020, 32(6): 695-704[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7797232/>. DOI: 10.21147/j.issn.1000-9604. 2020.06.03.
- [3] OLIVO E, LA CHIMIA M, CERAMELLA J, *et al.* Moving beyond the tip of the iceberg: DJ-1 implications in cancer metabolism[J/OL]. *Cells*, 2022, 11(9): 1432[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9103122/>. DOI: 10.3390/cells11091432.
- [4] JIN W. Novel insights into PARK7 (DJ-1), a potential anti-cancer therapeutic target, and implications for cancer progression[J/OL]. *J Clin Med*, 2020, 9(5): 1256[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7288009/>. DOI: 10.3390/jcm9051256.
- [5] DONGRE A, WEINBERG R A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(2): 69-84. DOI: 10.1038/s41580-018-0080-4.
- [6] 罗文, 夏红, 刘芳, 等. DJ-1 蛋白在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2021, 26(3): 206-209. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0460.2021.03.003.
- [7] ZHU X J, LUO C, LIN K, *et al.* Overexpression of DJ-1 enhances colorectal cancer cell proliferation through the cyclin-D1/MDM2-p53 signaling pathway[J]. *Biosci Trends*, 2020, 14(2): 83-95. DOI: 10.5582/bst.2019.01272.
- [8] LI L H, ZHANG C D, LI Y, *et al.* DJ-1 promotes epithelial-to-mesenchymal transition *via* enhancing FGF9 expression in colorectal cancer[J/OL]. *Biol Open*, 2020, 9(5): bio051680[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7325429/>. DOI: 10.1242/bio.051680.
- [9] NEVES M, GRÃOS M, ANJO S I, *et al.* Modulation of signaling pathways by DJ-1: an updated overview[J/OL]. *Redox Biol*, 2022, 51: 102283[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8928136/>. DOI: 10.1016/j.redox.2022.102283.
- [10] WANG W M, WANG H B, XIANG L L, *et al.* DJ-1 is a new prognostic marker and predicts chemotherapy efficacy in colorectal cancer[J/OL]. *Oncol Rep*, 2020, 44(1): 77-90[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7251759/>. DOI: 10.3892/or.2020.7593.
- [11] CHEN W T, YANG H B, KE T W, *et al.* Serum DJ-1 is a biomarker of colorectal cancer and DJ-1 activates mitophagy to promote colorectal cancer progression[J/OL]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(16): 4151[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8393356/>. DOI: 10.3390/cancers13164151.
- [12] CHEN X, YANG G H, GUO X H, *et al.* DJ-1/FGFR-1 signaling pathway contributes to sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 2543220[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9236769/>. DOI: 10.1155/2022/2543220.
- [13] QIU K, XIE Q J, JIANG S, *et al.* Silencing of DJ-1 reduces proliferation, invasion, and migration of papillary thyroid cancer cells *in vitro*, probably by increase of PTEN expression[J/OL]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(6): 2046-2055[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6949646/>.
- [14] LEE Y J, KIM W I, PARK T H, *et al.* Upregulation of DJ-1 expression in melanoma regulates PTEN/AKT pathway for cell survival and migration[J]. *Arch Dermatol Res*, 2021, 313(7): 583-591. DOI: 10.1007/s00403-020-02139-1.
- [15] HE X Y, SUN Y W, FAN R, *et al.* Knockdown of the DJ-1 (PARK7) gene sensitizes pancreatic cancer to erlotinib inhibition[J/OL]. *Mol Ther Oncolytics*, 2021, 20: 364-372[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7878983/>. DOI: 10.1016/j.omto.2021.01.013.
- [16] QIN X C, LU A M, KE M L, *et al.* DJ-1 inhibits autophagy activity of prostate cancer cells by repressing JNK-Bcl2-Becn1 signaling[J]. *Cell Biol Int*, 2020, 44(4): 937-946. DOI: 10.1002/cbin.11290.
- [17] JIN F, WANG H B, LI D, *et al.* DJ-1 promotes cell proliferation and tumor metastasis in esophageal squamous cell carcinoma *via* the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J/OL]. *Int J Oncol*, 2020, 56(5): 1115-1128[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7115355/>. DOI: 10.3892/ijo.2020.5005.
- [18] 哈文韬, 赵孙燕, 魏晓为, 等. 白术水提物通过 PI3K-Akt-NF- κ B 通路抑制人胃癌 SGC-7901 细胞的潜在机制[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2023, 30(3): 223-229. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.03.006.
- [19] 秦艳强, 晋佳路, 李娜, 等. 冬凌草甲素逆转黑色素瘤细胞顺铂耐药的作用及机制[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2023, 30(3): 217-222. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.03.005.
- [20] EL-SOKKARY G H, ISMAIL I A, SABER S H. Melatonin inhibits breast cancer cell invasion through modulating DJ-1/KLF17/ID-1 signaling pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3): 3945-3957. DOI: 10.1002/jcb.27678.
- [21] SHANG H, WANG T, SHANG F, *et al.* Over-expression of DJ-1 attenuates effects of curcumin on colorectal cancer cell proliferation and apoptosis[J/OL]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(14): 7567[2023-05-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32744672/>. DOI: 10.26355/eurrev_202007_22230.
- [22] HAN L N, WANG Y, SUN S L. Curcumin inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells through down regulation of DJ-1[J]. *Cancer Biomark*, 2020, 29(1): 1-8. DOI: 10.3233/cbm-190427.
- [23] ZHANG R Z, ZHONG L, SUN K W, *et al.* A study on curcuminol

- influencing proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through DJ-1/PTEN/PI3K/AKT pathway[J/OL]. Biomed Res Int, 2022, 2022: 9912776[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9142276/>. DOI: 10.1155/2022/9912776.
- [24] MITRA S, DAS R, BIN EMRAN T, *et al.* Diallyl disulfide: a bioactive garlic compound with anticancer potential[J/OL]. Front Pharmacol, 2022, 13: 943967[2023-05-08]. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.943967>. DOI: 10.3389/fphar.2022.943967.
- [25] LING H, HE J, TAN H, *et al.* Identification of potential targets for differentiation in human leukemia cells induced by diallyl disulfide [J]. Int J Oncol, 2017, 50(2): 697-707. DOI: 10.3892/ijo.2017.3839.
- [26] SU B, SU J, ZENG Y, *et al.* Diallyl disulfide suppresses epithelial-mesenchymal transition, invasion and proliferation by downregulation of LIMK1 in gastric cancer[J/OL]. Oncotarget, 2016, 7(9): 10498-10512[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4891135/>. DOI: 10.18632/oncotarget.7252.
- [27] SU B, SU J, ZENG Y, *et al.* Diallyl disulfide inhibits TGF- β 1-induced upregulation of Rac1 and β -catenin in epithelial-mesenchymal transition and tumor growth of gastric cancer[J]. Oncol Rep, 2018, 39(6): 2797-2806. DOI: 10.3892/or.2018.6345.
- [28] SU J, HE H, LI Y K, *et al.* Diallyl disulfide inhibits proliferation, epithelial-mesenchymal transition, and invasion through ROR α -mediated downregulation of Wnt1/ β -catenin pathway in gastric cancer cells[J]. J Food Drug Anal, 2022, 30(3): 479-492. DOI: 10.38212/2224-6614.3424.
- [收稿日期] 2023-05-10 [修回日期] 2023-05-30
[本文编辑] 党瑞山, 沈志超