



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2020.04.007  
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2020.04.007  
Chinese Journal of General Surgery, 2020, 29(4):440-448.

· 基础研究 ·

# PRRX1 在胃癌细胞增殖与转移中的作用及其与 TGF- $\beta$ /Smad2 介导的上皮间质转化的关系

杨忠<sup>1,2</sup>, 黄婉霞<sup>1,2</sup>, 王尚<sup>2,3</sup>, 邓维博<sup>1,2</sup>, 姚继彬<sup>2</sup>, 达明绪<sup>2</sup>

(1. 宁夏医科大学临床医学院, 宁夏银川 750004; 2. 甘肃省人民医院 肿瘤外科, 甘肃兰州 730000; 3. 甘肃中医药大学临床医学院, 甘肃兰州 730000)

## 摘要

**背景与目的:** 上皮间质转化 (EMT) 在恶性肿瘤进展与转移中发挥着重要的作用, 近年来研究显示配对相关同源框 1 (PRRX1) 是促进 EMT 的重要转录因子。笔者前期研究表明, PRRX1 在胃癌中表达增加, 并与患者的不良预后密切相关。本研究进一步探讨 PRRX1 促胃癌细胞增殖、转移与 EMT 及相关信号通路的关系, 为胃癌复发转移的防治提供研究思路。

**方法:** 用 Western blot 法检测人正常胃黏膜细胞 GES-1 和胃癌细胞 SGC7901、MNK45 中 PRRX1 表达。将 MNK45 细胞分别转染 PRRX1 过表达慢病毒 (PRRX1 过表达组) 及空载慢病毒 (阴性对照组), 以无处理的 MNK45 细胞作为空白对照, 用 Transwell 实验检测细胞的迁移能力, Western blot 检测细胞 PRRX1、TGF- $\beta$  1、Smad2 及 EMT 标志物的表达, 以及 TGF- $\beta$ /Smad2 通路阻断剂 SB-431542 干预后以上蛋白表达的变化。将 8 只裸鼠皮随机均分为两组, 分别皮下接种转染 PRRX1 过表达慢病毒的 MNK45 细胞 (PRRX1 过表达组) 与转染空载慢病毒 MNK45 细胞 (阴性对照组), 比较两组裸鼠皮下移植瘤的生长情况。

**结果:** PRRX1 在胃癌 SGC7901 与 MNK45 细胞中表达均明显高于正常胃黏膜细胞 GES-1 且在 SGC7901 细胞中高于 MNK45 (均  $P < 0.05$ )。与空白对照组比较, PRRX1 过表达组 MNK45 细胞的迁移能力明显增强, PRRX1、TGF- $\beta$  1、Smad2、间质标志物 vimentin 蛋白表达明显增加, 而上皮标志物 E-cadherin 表达明显降低 (均  $P < 0.05$ ); 阴性对照组 MNK45 细胞无以上变化 (均  $P > 0.05$ )。用 SB-431542 处理后, PRRX1 过表达组 MNK45 细胞的 PRRX1 和 TGF- $\beta$  1 表达未受影响 (均  $P > 0.05$ ), 但 Smad2 和 vimentin 表达的升高与 E-cadherin 表达的降低被明显抑制 (均  $P < 0.05$ )。PRRX1 过表达组裸鼠移植瘤的体积生长速度与瘤体质量均明显大于阴性对照组 (均  $P < 0.05$ )。

**结论:** PRRX1 过表达能促进胃癌细胞的增殖与转移, 机制可能与其诱导 TGF- $\beta$ /Smad2 通路活化促进 EMT 有关。对过表达 PRRX1 及 TGF- $\beta$ /Smad2 通路的干预可能是胃癌复发转移防治的新途径。

## 关键词

胃肿瘤; 配对相关同源框 1; 上皮-间质转化; 衔接蛋白质类, 信号转导

中图分类号: R735.2

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (81560391); 甘肃省人民医院内科研基金资助项目 (19SYPYA-7)。

**收稿日期:** 2019-10-26; **修订日期:** 2020-03-13。

**作者简介:** 杨忠, 宁夏医科大学临床医学院硕士研究生, 主要从事胃癌增殖与转移机制方面的研究。

**通信作者:** 达明绪, Email: hxdamingxu@hotmail.com

## Function of PRRX1 in proliferation and metastasis of gastric cancer cells and its association with TGF- $\beta$ /Smad2-mediated epithelial mesenchymal transition

YANG Zhong<sup>1,2</sup>, HUANG Wanxia<sup>1,2</sup>, WANG Shang<sup>2,3</sup>, DENG Weibo<sup>1,2</sup>, YAO Jibin<sup>2</sup>, DA Mingxu<sup>2</sup>

(1. College of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Department of Surgical Oncology, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, China; 3. College of Clinical Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

### Abstract

**Background and Aims:** The epithelial mesenchymal transition (EMT) is an important mechanism for cancer progression and metastasis, and the recent studies have shown that paired related homeobox 1 (PRRX1) is a critical transcription factor of promoting EMT. The previous studies of the authors demonstrated that the PRRX1 expression is increased in gastric cancer, which is closely related to the poor prognosis of patients. This study was conducted to further investigate the relations of PRRX1 promoting proliferation and metastasis of gastric cancer cells with the EMT and associates signaling pathway, so as to provide approaches for prevention and treatment of the recurrence and metastasis of gastric cancer.

**Methods:** The PRRX1 expressions in normal human gastric mucosal GES-1 cells, and gastric cancer SGC 7901 and MNK45 cells were detected by Western blot analysis. The MNK45 cells were infected with PRRX1 overexpression lentivirus (PRRX1 overexpression group) or empty lentivirus (negative control group), with the untreated MNK45 cells as blank control, and then, the migration ability of the cells was detected by Transwell assay, and the expressions of PRRX1, TGF- $\beta$ 1, Smad2 and EMT markers, as well as the changes in these protein expressions after intervention of the TGF- $\beta$ /Smad2 pathway inhibitor SB-431542 were determined by Western blot analysis. Eight nude mice were randomized into two groups, and then subcutaneously transplanted with PRRX1 overexpression lentivirus infected MNK45 cells (PRRX1 overexpression group) or empty lentivirus infected MNK45 cells (negative control group), and then, the growth properties of the tumor xenografts in the two groups of mice were observed.

**Results:** The PRRX1 expression in either gastric cancer SGC7901 or MNK45 cells was significantly higher than that in normal gastric mucosal GES-1 cells, and in SGC7901 cells was higher than that in MNK45 cells (all  $P < 0.05$ ). Compared with blank control group, the migration ability was significantly enhanced, the protein expressions of PRRX1, TGF- $\beta$ 1, Smad2 and the mesenchymal marker vimentin were significantly increased, while the expression of epithelial marker E-cadherin was significantly decreased in PRRX1 overexpression group (all  $P < 0.05$ ); no significant changes in expressions of above proteins were noted in negative control group (all  $P > 0.05$ ). In MNK45 cells of the PRRX1 overexpression group after SB-431542 treatment, the expressions of PRRX1 and TGF- $\beta$ 1 were unaffected (both  $P > 0.05$ ), but the increasing in Smad2 and vimentin expressions and the decreasing in E-cadherin expression were significantly suppressed (all  $P < 0.05$ ). Both volume growth rate and weight of tumor xenograft in nude mice of PRRX1 overexpression group were greater than those of negative control group (all  $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** Overexpression of PRRX1 can promote the growth and metastasis of gastric cells, and the mechanism may be probably associated with its inducing the activation of TGF- $\beta$ /Smad2 pathway and thereby promoting the EMT process. The interventions on PRRX1 overexpression and TGF- $\beta$ /Smad2 pathway may be new approaches for prevention and treatment of the recurrence and metastasis of gastric cancer.

### Key words

Stomach Neoplasms; Paired Related Homeobox 1; Epithelial-Mesenchymal Transition; Adaptor Proteins, Signal Transducing

**CLC number:** R735.2

胃癌是消化道常见的恶性肿瘤之一，最新统计2017年全世界胃癌新增发病约122万例，造成了86.5万人死亡，而我国胃癌新发病例和死亡病例约占全球近50%，发病率和病死率居恶性肿瘤第2位<sup>[1-3]</sup>。虽然医疗诊治水平和模式明显改善，但胃癌患者的5年生存率却仍低于30%<sup>[4]</sup>。胃癌的预后与复发和转移密切相关，但具体机制尚未明确。研究<sup>[5-8]</sup>证实上皮间质转化（epithelial mesenchymal transition, EMT）是诱导恶性肿瘤发生增殖与远处转移的重要机制，EMT的发生过程不仅涉及TGF- $\beta$ /Smad、Wnt/ $\beta$ -catenin、PI3K/Akt、Notch等主要信号通路，也受Snail、Twist1、Slug、NF- $\kappa$ B、Zeb等重要转录因子诱导调控，其表现为上皮细胞表型标志物E-cadherin、Laminin1、ZO-1等下调和间质细胞表型标志物N-cadherin、vimentin、 $\beta$ -catenin等表达上调，最终使肿瘤细胞获得间质表型特性，容易脱离原发病灶向远处迁移。

近年来研究<sup>[9-16]</sup>报道配对相关同源框1（paired related homeobox 1, PRRX1）是表达于细胞核内可诱导肿瘤发生EMT的重要转录因子，在胃癌、胰腺癌、乳腺癌、神经母细胞瘤、胶质母细胞瘤、甲状腺癌、头颈部鳞癌和口腔鳞癌等肿瘤中PRRX1表达明显增加，并且促进肿瘤的EMT过程，与患者的预后不良密切相关。但有研究<sup>[17-19]</sup>表明在大肠癌、肝癌、肺癌中PRRX1低表达可诱导肿瘤的增殖与转移，并与肿瘤的转移灶的定植密切相关。Guo等<sup>[7]</sup>研究表明过表达的PRRX1可诱导Wnt/ $\beta$ -catenin通路促进胃癌的EMT过程，使得胃癌细胞的增殖、侵袭和转移能力明显增强。研究<sup>[11, 13-15, 20-21]</sup>表明PRRX1可与TGF- $\beta$ /Smad协同作用促进肿瘤的EMT过程。笔者前期研究<sup>[22]</sup>表明，在人胃癌组织中PRRX1表达水平明显高于癌旁正常胃黏膜组织和转移淋巴结与患者的预后不良正相关。而PRRX1与TGF- $\beta$ /Smad通路在胃癌中的作用机制研究尚未见报道，本研究旨在探究PRRX1表达上调与TGF- $\beta$ /Smad2通路在胃癌细胞增殖与转移中的作用机制，为早期干预胃癌的复发转移提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

人正常胃黏膜细胞GES-1和胃癌细胞SGC7901、MNK45由甘肃省人民医院消化道肿瘤重点实验室提供。PRRX1过表达慢病毒及空

载慢病毒（携绿色荧光）由中国汉恒生物科技（上海）有限公司构建。胎牛血清、RPMI-1640培养基、0.25%胰酶、青-链霉素双抗、PBS购于以色列Biological Industries（BI）公司。兔抗人PRRX1一抗购自美国Abcam公司，兔抗人一抗TGF- $\beta$ 1、Smad2、E-cadherin、vimentin、GAPDH购自美国SAB公司，兔抗人辣根过氧化物酶HRP标记亲和纯化山羊抗兔IgG（H+L）二抗购自美国Proteintech公司；TGF- $\beta$ /Smad2通路阻断剂SB-431542购自美国MCE公司。RIPA裂解液、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒购自北京索莱宝公司，Transwell小室购自美国康宁公司，25 mL培养瓶购自中国香港耐思生物科技有限公司，Western blot转膜仪、电泳仪、电源购自北京六一生物科技公司，酶标仪购自美国Bio Rad公司，Tanon-2500R全自动数据凝胶图像分析系统购自上海天能科技有限公司。

### 1.2 细胞培养

GES-1、SGC7901和MNK45细胞均采用10%胎牛血清和1%青-链霉素双抗的RPMI-1640培养液置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养，每1~2 d换液1次，2~3 d传代1次，选取对数生长期细胞进行实验。待细胞长至25 mL培养瓶80%弃去培养基用PBS清洗，1 mL 0.25%胰酶消化待细胞相互分离后并轻吸去，加入1 mL的冻存液（900  $\mu$ L血清+100  $\mu$ L DMSO）轻轻吹打混匀转移至冻存管，4℃ 10 min，-20℃ 2 h，-80℃过夜后液氮长期保存。

### 1.3 细胞转染

取对数生长期胃癌细胞MNK45胰酶消化收集细胞，PBS清洗2次后计数，接种于6孔板中，37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h，待细胞于6孔板中生长至50%时，加入转染慢病毒30  $\mu$ L+聚凝胺5  $\mu$ L（转染效果最佳），每孔慢病毒+聚凝胺+完全培养基共1 mL，4 h后补加共1 mL的完全培养基，24 h后更换新鲜完全培养液，72 h镜下观察转染效果较好。转染慢病毒后的细胞待长满六孔板后收集于25 mL培养瓶中继续培养传代，于正常培养的25 mL培养瓶中加入嘌呤霉素的体积8  $\mu$ L（效果最佳），作用24 h后更换新鲜的完全培养基继续培养。将MNK45细胞分别转染PRRX1过表达慢病毒（PRRX1过表达组）与空载慢病毒（阴性对照组），将无处理的MNK45细胞作为空白对照组。

### 1.4 Transwell 迁移实验

取对数生长期的胃癌细胞，分别胰酶消化离心（做好标记），PBS清洗3次后计数，RPMI-1640培

培养基分别配成等浓度细胞混匀液 ( $5 \times 10^5/\text{mL}$ ), 分别取200  $\mu\text{L}$ 细胞悬浮液接种于Transwell上室, 下室加入含10%胎牛血清的培养基500  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 培养箱中培养48 h, 取出小室, 棉签轻轻擦去上室培养基及细胞, 4%多聚甲醛固定下室膜上细胞15 min, PBS清洗3次, 1%结晶紫染色30 min, PBS再次冲洗小室3次, 干燥后倒置显微镜下观察计数并采图。

### 1.5 Western blot 实验

取对数期生长细胞, 冰PBS清洗2~3次, 吸干残余液体, 根据细胞裂解液说明书操作收集总蛋白, BCA法进行蛋白定量, 加入蛋白上样缓冲液, 水浴锅 100  $^{\circ}\text{C}$  10 min。迅速置于冰上, 冰浴5 min, 置于-20  $^{\circ}\text{C}$ 备用。每孔20  $\mu\text{g}$ 蛋白样品上样, 10%SDS-PAGE进行蛋白分离, 80 V电泳约30 min, 目标蛋白跑至分离胶时, 电压调至120 V, 直至目标蛋白所在位置上下两条Marker条带分开, 停止电泳。半干湿式转膜(恒流200 mA 2 h), 冰浴条件下转膜, 转膜完成后, 5%脱脂牛奶室温摇床封闭2 h, 加入一抗PRRX1 (1:1 000)、TGF- $\beta$ 1 (1:500)、Smad2 (1:1 000)、E-cadherin (1:1 000)、vimentin (1:1 000)、GAPDH (1:2 000), 4  $^{\circ}\text{C}$ 慢摇孵育过夜, TBST清洗3次, 每次10 min, 加入二抗 (1:2 000), 室温摇床孵育2 h, TBST清洗3次, 每次10 min, 化学发光试剂蛋白显影, GAPDH作为内参蛋白。

### 1.6 SB-431542 抑制实验

取对数期长满25 mL培养瓶50%的转染PRRX1过表达慢病毒的MNK45细胞分为两组: 加有TGF- $\beta$ /Smad2通路阻断剂SB-431542组(最佳浓度为10  $\mu\text{mol/L}$ )的培养液作为实验组, 加有溶剂DMSO的培养液为对照组, 作用24 h后提取蛋白, Western blot法检测PRRX1、TGF- $\beta$ 、Smad2和

EMT标志物表达差异(步骤同前)。

### 1.7 动物实验

8只5周龄BALB/c雌性裸鼠, 平均质量( $18.3 \pm 0.64$ ) g, 购自北京维通利华公司, 饲养于甘肃中医药大学SPF级动物中心。将裸鼠随机分2组, 每组4只, 分别皮下注射转染PRRX1过表达慢病毒的MNK45细胞(PRRX1过表达组)与转染空载慢病毒MNK45细胞(阴性对照组)。注射方法: 取对数期生长期的细胞, 0.9%生理盐水重悬细胞并计数, 调整细胞浓度为 $1.0 \times 10^7/\text{mL}$ , 选裸鼠左侧后背部皮下为注射部位, 75%酒精消毒皮肤, 1 mL注射器吸取细胞悬液, 按0.1 mL/只注入皮下, 棉签轻轻按压15 s以防细胞悬液溢出。每周测量瘤体的长径和短径, 并计算瘤体的体积。计算瘤体体积公式为( $V = \text{长} \times \text{宽}^2/2 \text{ cm}^3$ ), 以瘤体体积为纵轴, 生长时间为横轴, 绘制皮下瘤的生长曲线。8周后脱臼法处死裸鼠并取下瘤体, 称重并采图后, 瘤体于-80  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 动物尸体按照实验室规定处理。

### 1.8 统计学处理

所有数据采用SPSS 22.0统计软件进行处理, 其中计数资料显著性比较采用 $\chi^2$ 检验, 组间两两比较采用t检验, 多组间比较采用方差分析,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 GES-1、SGC7901和MNK45细胞中PRRX1表达情况

PRRX1在胃癌细胞SGC7901和MNK45中表达明显高于人正常胃黏膜细胞GES-1, 并且SGC7901表达高于MNK45细胞, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ ) (图1)。

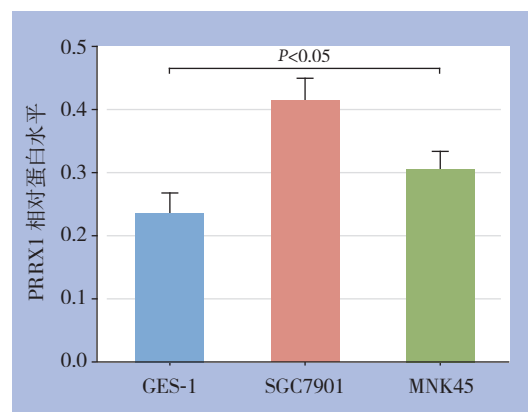
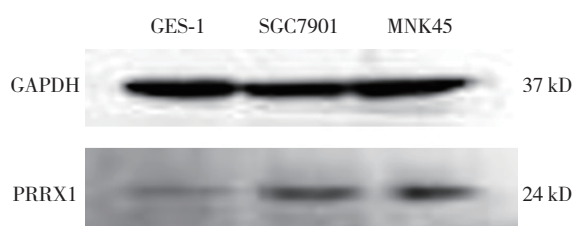


图1 Western blot 检测 GES-1、SGC7901 和 MNK45 细胞中 PRRX1 蛋白表达

Figure 1 The PRRX1 protein expressions in GES-1, SGC7901 and MNK45 cells determined by Western blot analysis

### 2.2 细胞转染及形态观察

荧光倒置显微镜下观察慢病毒转染的两组 MNK45 细胞生长良好，均可见明显的绿色荧光

(图2A)；在普通倒置显微镜下观察到空白对照组与阴性对照组细胞形态近圆形，PRRX1过表达组细胞形态变为不规则或梭形(图2B)。

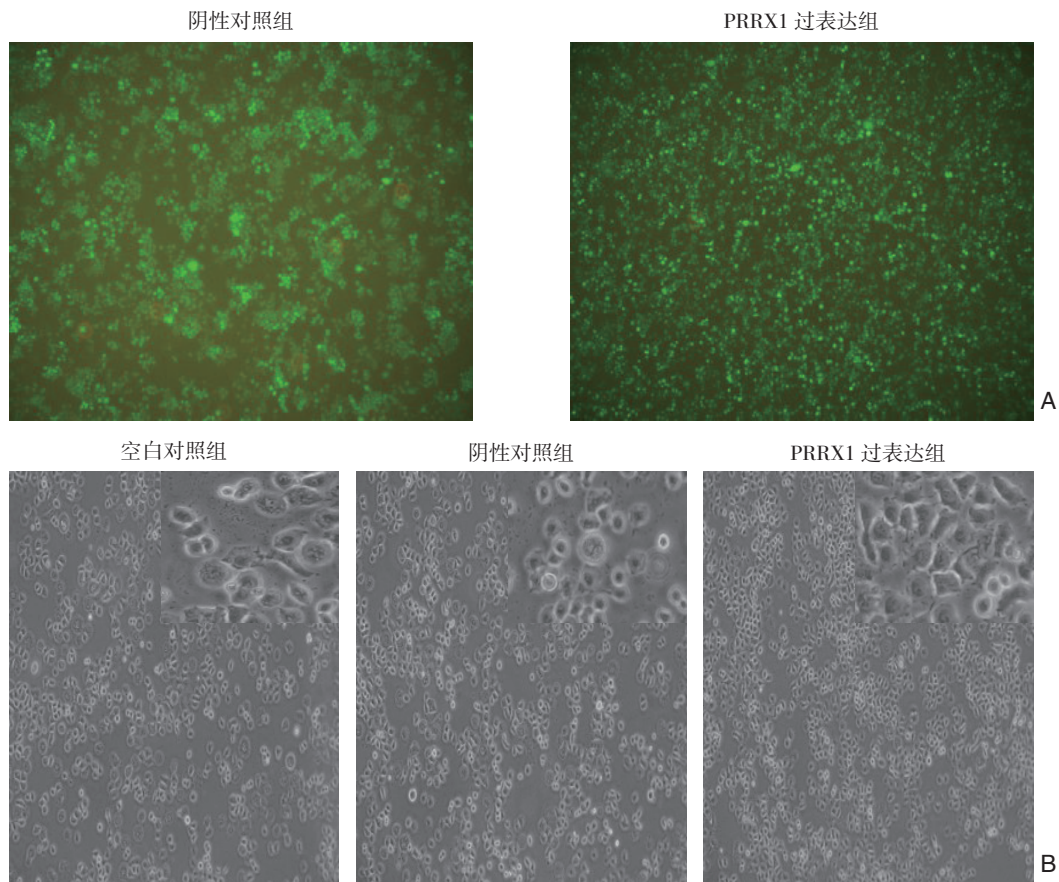


图 2 细胞转染情况及形态观察 A: 荧光显微镜观察慢病毒转染后的 MNK45 细胞 (×4); B: 普通倒置显微镜下的各组细胞 (×20)

Figure 2 Observation of the transfection efficiency and cell shapes A: The MNK45 cells after lentiviral transfection under fluorescence microscope (×4); B: Cells of each group under ordinary inverted microscope (×20)

### 2.3 Transwell 实验检测细胞迁移能力

Transwell实验结果显示，PRRX1过表达组 MNK45细胞迁移的细胞数较空白对照组与阴性对

照组明显增多(均 $P < 0.05$ )，但后两组间无统计学差异( $P > 0.05$ ) (图3)。

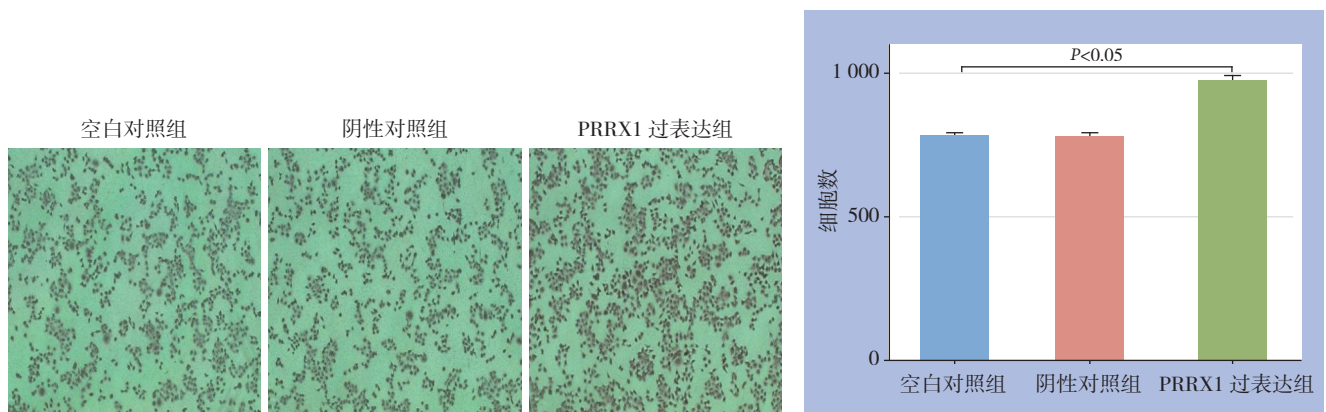


图 3 Transwell 迁移实验检测各组细胞迁移能力

Figure 3 The migration abilities of each group of cells detected by Transwell migration assay

### 2.4 Western blot 检测各组细胞中相关蛋白表达

与空白对照组与阴性对照组比较, PRRX1过表达组中间质表型标志物vimentin蛋白表达、TGF-β 1和Smad2蛋白表达明显增加(均

$P < 0.05$ ), 而上皮表型标志物E-cadherin蛋白表达明显减低(均 $P < 0.05$ ); 空白对照组与阴性对照组上述蛋白表达水平均无统计学差异(均 $P > 0.05$ ) (图4)。

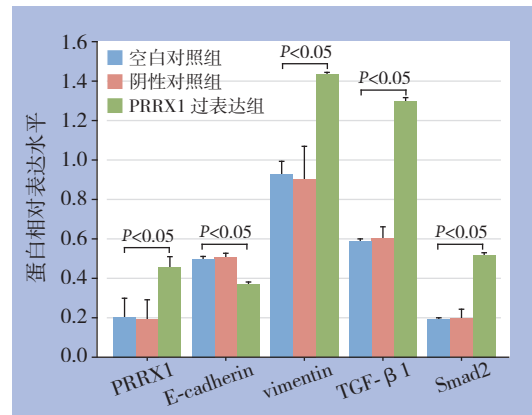
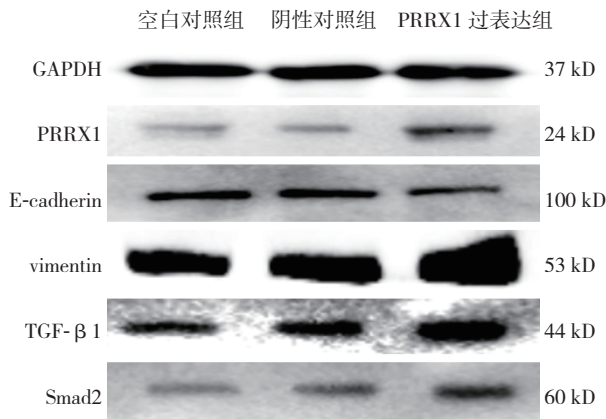


图4 Western blot 法检测各组细胞中 PRRX1、TGF-β 1、Smad2 和 EMT 相关蛋白表达

Figure 4 The protein expression levels of PRRX1, TGF-β1, Smad2, and the EMT markers in each group of cells determined by Western blot

### 2.5 TGF-β /Smad2 通路阻断剂 SB-431542 对相关蛋白表达的影响

与给予溶剂DMSO处理比较, 给予阻断剂SB-431542处理的PRRX1过表达组MNK45细胞上皮

表型标志物E-cadherin蛋白表达明显增加, 而间质表型标志物vimentin和Smad2明显减低降低(均 $P < 0.05$ ), 但PRRX1和TGF-β 1无统计学差异(均 $P > 0.05$ ) (图5)。

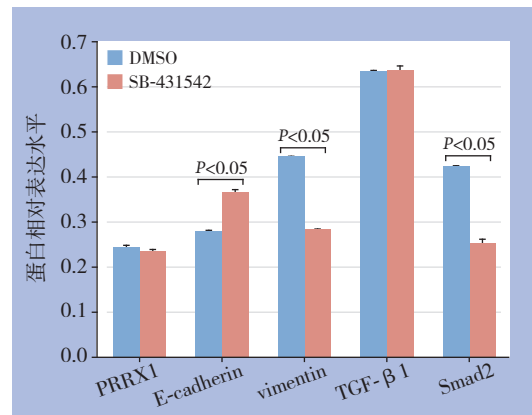
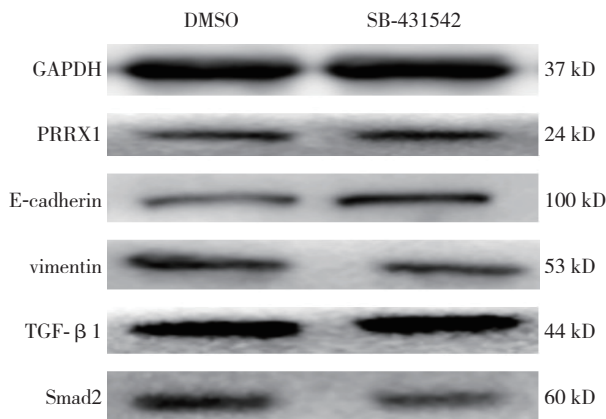


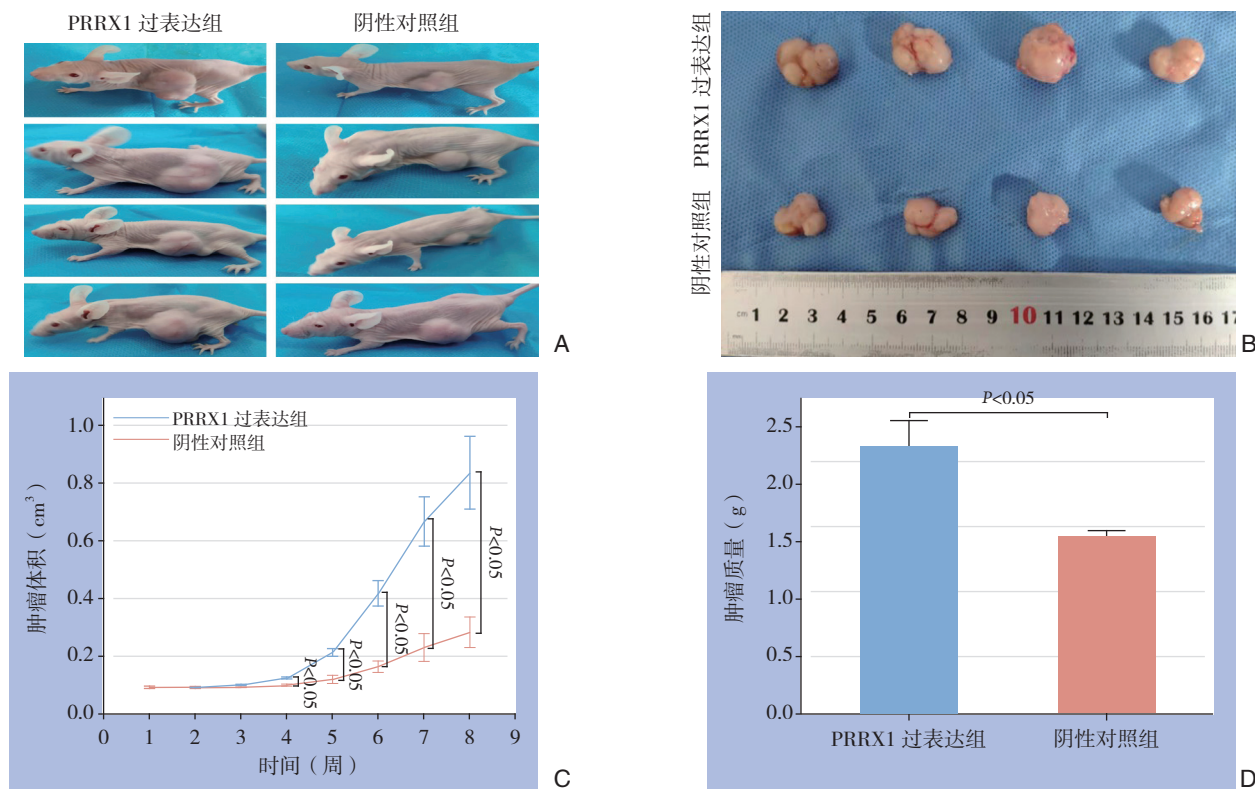
图5 Western blot 法检测 SB-431542 对 PRRX1、TGF-β 1、Smad2 和 EMT 相关蛋白表达的影响

Figure 5 The influence of SB-431542 on protein expressions of PRRX1, TGF-β1, Smad2, and EMT markers determined by Western blot

### 2.6 裸鼠皮下移植瘤生长情况

两组裸鼠的皮下移植瘤均构建成功。从第4周后各时间点, PRRX1过表达组皮下移植瘤体积增长明显大于阴性对照组(均 $P < 0.05$ ); 第8周时 PRRX1过表达组皮下移植瘤体积、质量分别为

( $0.82 \pm 0.14$ )  $\text{cm}^3$ 、( $2.33 \pm 0.23$ ) g, 阴性对照组皮下移植瘤体积、质量分别为( $0.21 \pm 0.06$ )  $\text{cm}^3$ 、( $1.54 \pm 0.05$ ) g, PRRX1过表达组皮下移植瘤体积和瘤重明显大于阴性对照(均 $P < 0.05$ ) (图6)。



**图6 裸鼠皮下移植瘤的生长实验结果** A-B: 两组移植瘤情况; C: 两组移植瘤生长曲线; D: 两组移植瘤瘤重比较  
**Figure 6 Results of the subcutaneously implanted tumor model in nude mice** A-B: The xenografts in the two groups of mice; C: Growth curves of the implanted tumors in the two groups of mice; D: Comparison of the weight of the implanted tumors between the two groups of mice

### 3 讨论

近年来胃癌的发病率在我国虽有下降的趋势,但早期因缺乏特异性表现,绝大多数患者确诊时已属于进展期,肿瘤病灶已经发生局部侵犯、淋巴转移或是远处转移<sup>[2-4]</sup>。胃癌的增殖与转移是一个涉及多因素、多阶段、多通路的复杂过程,具体机理不清。EMT过程在恶性肿瘤的增殖与转移过程中起着关键性的作用<sup>[5-8]</sup>。E-cadherin是一种有效的肿瘤抑制蛋白质,典型上皮型标志物,在上皮源性的表达丧失时,其介导的细胞间的黏附性减弱或者逐渐消失,使得恶性肿瘤细胞获得侵袭性和迁移能力,E-cadherin表达减低与胃癌患者的临床分期晚和预后差密切相关<sup>[7, 22-24]</sup>。vimentin是典型的间质型标志物,是表达于间质细胞和间叶源性肿瘤的一种中间丝蛋白,在维持细胞骨架形态和黏附性,参与细胞凋亡的调控,在肿瘤的侵袭、迁移、新生血管生成和淋巴管形成中发挥着重要的作用<sup>[25-26]</sup>。

PRRX1家族包括PRRX1a、PRRX1b和PRRX2,其中PRRX1编码的蛋白主要表达于细胞核,是促进肿瘤发生EMT的重要转录因子<sup>[7, 9]</sup>。

PRRX1在多种肿瘤中异常表达,可诱导TGF- $\beta$ /Smad、Wnt/ $\beta$ -catenin、p53等信号通路调节上皮型标志物E-cadherin表达减低,vimentin、 $\beta$ -catenin等间质标志物表达增加,从而促进肿瘤的侵袭和迁移,并通过调节免疫抑制和血管生成来调控恶性肿瘤的EMT过程<sup>[7, 9, 11, 13-16, 18-19, 26-28]</sup>。

TGF- $\beta$ /Smad信号通路是细胞内信号转导的重要通路,在肿瘤的发生发展过程中起着双重作用,肿瘤发生早期起抑制作用,但在肿瘤进展时可通过Wnt等信号通路直接抑制E-cadherin表达,同时可激活 $\beta$ -catenin/TCF/LEF复合物,间接导致vimentin等间质标志物的表达来激活VEGF-C的产生促进胃癌的淋巴转移调节其EMT过程<sup>[29-34]</sup>。Smad2是TGF- $\beta$ /Smad信号通路的关键,它可以直接把TGF- $\beta$ 信号透过细胞膜传入细胞核内,激活核内基因表达<sup>[35]</sup>。胃癌中Smad2表达增高与其分化差、分期晚和患者的不良结局相关<sup>[32-34]</sup>。相关研究表明PRRX1可与TGF- $\beta$ /Smad协同作用促进肿瘤的EMT过程<sup>[11, 13-15, 20-21]</sup>。

本研究表明,PRRX1在胃癌细胞SGC7901和MNK45中表达明显高于正常胃黏膜细胞GES-1,且SGC7901表达高于MNK45,PRRX1在胃癌

组织中表达明显高于癌旁正常组织,因此PRRX1在胃癌中表达明显增高,并调节胃癌的EMT过程<sup>[7, 22]</sup>。为了明确观察PRRX1过表达对胃癌细胞的侵袭与转移的影响,所以选择了PRRX1相对表达低的MNK45胃癌细胞进行慢病毒转染。转染PRRX1过表达慢病毒的MNK45细胞,形态由近圆形变为不规则或梭形,而阴性对照组与空白对照组细胞形态未见明显差异,这可能是上皮表型细胞向间质表型细胞转化时的形态学改变<sup>[32]</sup>。Transwell迁移实验结果显示,PRRX1过表达组细胞的迁移能力明显增加;移植瘤实验结果表明,PRRX1过表达组移植瘤增长速度明显增快,这与PRRX1过表达可以促进胃癌细胞的增殖与转移的相关报道<sup>[7]</sup>一致。Western blot显示,PRRX1过表达组细胞中PRRX1、间质型标志物vimentin、TGF- $\beta$  1和Smad2表明增加,而上皮型标志物E-cadherin表达降低,有研究<sup>[14]</sup>表明甲状腺癌乳头状中TGF- $\beta$  1可与PRRX1协同作用增强其癌细胞的增殖与转移能力。而本实验中给予TGF- $\beta$  1受体激酶抑制剂SB-431542作用PRRX1过表达组胃癌细胞后,PRRX1和TGF- $\beta$  1表达水平无明显变化,但vimentin和Smad2表达减低,而E-cadherin表达增加,提示给予TGF- $\beta$  /Smad2通路抑制剂可以逆转PRRX1过表达诱导的EMT过程。有研究表明在头颈部鳞状细胞癌中上调PRRX1过表达时,TGF- $\beta$  1、p-Smad2和p-Smad3表达增加,而给予TGF- $\beta$  受体激酶抑制剂后,p-Smad2、p-Smad3和vimentin表达减低,但E-cadherin表达增加,细胞的侵袭和迁移能力明显减弱<sup>[15]</sup>。有报道过表达的PRRX1可以促进脂肪组织中的TGF- $\beta$  活性,从而导致肥胖期间脂肪细胞功能异常<sup>[36]</sup>。

总之,过表达的PRRX1可以促进胃癌细胞向着梭形或不规则形的间质细胞形态转化,从而有利于胃癌细胞的增殖和迁移,上调TGF- $\beta$  1、Smad2和间质型标志物vimentin表达,下调上皮型标志物E-cadherin表达,而TGF- $\beta$  /Smad信号通路抑制剂可以逆转过表达的PRRX1所诱导的EMT过程,提示过表达的PRRX1可以诱导TGF- $\beta$  /Smad2通路促进胃癌细胞的增殖与转移,这可能是早期干预治疗胃癌复发转移的潜在靶点。

#### 参考文献

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018,

68(6):394–424. doi: 10.3322/caac.21492.

[2] Yang L, Zheng R, Wang N, et al. Incidence and mortality of stomach cancer in China, 2014[J]. Chin J Cancer Res, 2018, 30(3):291–298. doi: 10.21147/j.issn.1000-9604.2018.03.01.

[3] GBD 2017 Stomach Cancer Collaborators. The global, regional, and national burden of stomach cancer in 195 countries, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease study 2017[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020, 5(1):42–54. doi: 10.1016/S2468-1253(19)30328-0.

[4] Katai H, Ishikawa T, Akazawa K, et al. Five-year survival analysis of surgically resected gastric cancer cases in Japan: a retrospective analysis of more than 100000 patients from the nationwide registry of the Japanese Gastric Cancer Association (2001–2007)[J]. Gastric Cancer, 2018, 21(1):144–154. doi: 10.1007/s10120-017-0716-7.

[5] Jolly MK, Ware KE, Gilja S, et al. EMT and MET: necessary or permissive for metastasis?[J]. Mol Oncol, 2017, 11(7):755–769. doi: 10.1002/1878-0261.12083.

[6] Savagner P. Epithelial-mesenchymal transitions: from cell plasticity to concept elasticity[J]. Curr Top Dev Biol, 2015, 112:273–300. doi: 10.1016/bs.ctdb.2014.11.021.

[7] Guo J, Fu Z, Wei J, et al. PRRX1 promotes epithelial-mesenchymal transition through the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in gastric cancer[J]. Med Oncol, 2015, 32(1):393. doi: 10.1007/s12032-014-0393-x.

[8] Diepenbruck M, Christofori G. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe?[J]. Curr Opin Cell Biol, 2016, 43:7–13. doi: 10.1016/j.ceb.2016.06.002.

[9] Jiang YP, Tang YL, Wang SS, et al. PRRX1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in salivary adenoid cystic carcinoma activates the metabolic reprogramming of free fatty acids to promote invasion and metastasis[J]. Cell Prolif, 2020, 53(1):e12705. doi: 10.1111/cpr.12705.

[10] Takano S, Reichert M, Bakir B, et al. Prrx1 isoform switching regulates pancreatic cancer invasion and metastatic colonization[J]. Genes Dev, 2016, 30(2):233–247. doi: 10.1101/gad.263327.115.

[11] Lv ZD, Yang ZC, Liu XP, et al. Silencing of Prrx1b suppresses cellular proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition in triple-negative breast cancer[J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(9):1640–1650. doi: 10.1111/jcmm.12856.

[12] van Groningen T, Koster J, Valentijn LJ, et al. Neuroblastoma is composed of two super-enhancer-associated differentiation states[J]. Nat Genet, 2017, 49(8):1261–1266. doi: 10.1038/ng.3899.

[13] Sugiyama M, Hasegawa H, Ito S, et al. Paired related homeobox 1 is associated with the invasive properties of glioblastoma cells[J]. Oncol Rep, 2015, 33(3):1123–1130. doi: 10.3892/or.2014.3681.

[14] Hardin H, Guo Z, Shan W, et al. The roles of the epithelial-mesenchymal transition marker PRRX1 and miR-146b-5p in papillary thyroid carcinoma progression[J]. Am J Pathol, 2014, 184(8):2342–2354. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.04.011.

[15] Jiang J, Zheng M, Zhang M, et al. PRRX1 Regulates Cellular



- Phenotype Plasticity and Dormancy of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Through miR-642b-3p[J]. *Neoplasia*, 2019, 21(2):216–229. doi: 10.1016/j.neo.2018.12.001.
- [16] Libório TN, Acquafreda T, Matizonkas-Antonio LF, et al. In situ hybridization detection of homeobox genes reveals distinct expression patterns in oral squamous cell carcinomas[J]. *Histopathology*, 2015, 58(2):225–233. doi: 10.1111/j.1365–2559.2011.03751.x.
- [17] Takahashi Y, Sawada G, Kurashige J, et al. Paired related homeobox 1, a new EMT inducer, is involved in metastasis and poor prognosis in colorectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2013, 109(2):307–311. doi: 10.1038/bjc.2013.339.
- [18] Fan M, Shen J, Liu H, et al. Downregulation of PRRX1 via the p53-dependent signaling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(2):1083–1090. doi: 10.3892/or.2017.5785.
- [19] Zhu H, Sun G. Loss of PRRX1 induces epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties in A549 cells[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(4):1641–1650.
- [20] Chen W, Ren X, Wu J, et al. HSP27 associates with epithelial-mesenchymal transition, stemness and radioresistance of salivary adenoid cystic carcinoma[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(4):2283–2298. doi: 10.1111/jcmm.13510.
- [21] Fazilaty H, Rago L, Kass Youssef K, et al. A gene regulatory network to control EMT programs in development and disease[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):5115. doi: 10.1038/s41467–019–13091–8.
- [22] 刘天祥, 温宵雄, 祝成楼, 等. 配对相关同源框1基因与胃癌淋巴结转移的相关性[J]. *兰州大学学报: 医学版*, 2019, 45(5):73–78. Liu TX, Wen XX, Zhu CL, et al. Correlation between paired related homeobox 1 gene and lymph node metastasis of gastric cancer[J]. *Journal of Lanzhou University: Medical Sciences*, 2019, 45(5):73–78.
- [23] Loh CY, Chai JY, Tang TF, et al. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges[J]. *Cells*, 2019, 8(10): pii: E1118. doi: 10.3390/cells8101118.
- [24] 肖磊, 黄昌浩, 袁伟杰, 等. 胃癌组织YAP1、E-cadherin、N-cadherin表达及临床意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2018, 27(4):442–448. doi:10.3978/j.issn.1005–6947.2018.04.009. Xiao L, Huang CH, Yuan WJ, et al. Expressions of YAP1, E-cadherin and N-cadherin in gastric cancer tissue and their clinical significance [J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2018, 27(4):442–448. doi:10.3978/j.issn.1005–6947.2018.04.009.
- [25] Zhang H, Wu XS, Xiao Y, et al. Coexpression of FOXK1 and vimentin promotes EMT, migration, and invasion in gastric cancer cells[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2019, 97(2):163–176. doi: 10.1007/s00109–018–1720-z.
- [26] Yeo SY, Lee KW, Shin D, et al. A positive feedback loop bistably activates fibroblasts[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):3016. doi: 10.1038/s41467–018–05274–6.
- [27] Khirade MF, Lal G, Bapat SA. Derivation of a fifteen gene prognostic panel for six cancers[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:13248. doi: 10.1038/srep13248.
- [28] Aparicio LA, Blanco M, Castosa R, et al. Clinical implications of epithelial cell plasticity in cancer progression[J]. *Cancer Lett*, 2015, 366(1):1–10. doi: 10.1016/j.canlet.2015.06.007.
- [29] Otsuru T, Kobayashi S, Wada H, et al. Epithelial-mesenchymal transition via transforming growth factor beta in pancreatic cancer is potentiated by the inflammatory glycoprotein leucine-rich alpha-2 glycoprotein[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(3):985–996. doi: 10.1111/cas.13918.
- [30] Pak KH, Park KC, Cheong JH. VEGF-C induced by TGF- $\beta$ 1 signaling in gastric cancer enhances tumor-induced lymphangiogenesis[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1):799. doi: 10.1186/s12885–019–5972-y.
- [31] Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition[J]. *Cell Res*, 2009, 19(2):156–172. doi: 10.1038/cr.2009.5.
- [32] Shinto O, Yashiro M, Toyokawa T, et al. Phosphorylated smad2 in advanced stage gastric carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10:652. doi: 10.1186/1471–2407–10–652.
- [33] Noda S, Yashiro M, Toyokawa T, et al. Borrmann's macroscopic criteria and p-Smad2 expression are useful predictive prognostic markers for cytology-positive gastric cancer patients without overt peritoneal metastasis[J]. *Ann Surg Oncol*, 2011, 18(13):3718–3725. doi: 10.1245/s10434–011–1768–2.
- [34] Wang JK, Wang WJ, Cai HY, et al. MFAP2 promotes epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cells by activating TGF- $\beta$ /SMAD2/3 signaling pathway[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11:4001–4017. doi: 10.2147/OTT.S160831.
- [35] Budi EH, Duan D, Derynck R. Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptors and Smads: Regulatory Complexity and Functional Versatility[J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27(9):658–672. doi: 10.1016/j.tcb.2017.04.005.
- [36] Du B, Cawthorn WP, Su A, et al. The transcription factor paired-related homeobox 1 (Prrx1) inhibits adipogenesis by activating transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ) signaling[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(5):3036–3047. doi: 10.1074/jbc.M112.440370.

( 本文编辑 姜晖 )

**本文引用格式:** 杨忠, 黄婉霞, 王尚, 等. PRRX1在胃癌细胞增殖与转移中的作用及其与TGF- $\beta$ /Smad2介导的上皮间质转化的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2020, 29(4):440–448. doi:10.7659/j.issn.1005–6947.2020.04.007

**Cite this article as:** Yang Z, Huang WX, Wang S, et al. Function of PRRX1 in proliferation and metastasis of gastric cancer cells and its association with TGF- $\beta$ /Smad2-mediated epithelial mesenchymal transition[J]. *Chin J Gen Surg*, 2020, 29(4):440–448. doi:10.7659/j.issn.1005–6947.2020.04.007