

## 核心蛋白聚糖、甲磺酸伊马替尼、苹果酸舒尼替尼对胃肠道间质瘤细胞恶性表型的影响

唐珊<sup>1</sup>, 贾钧凯<sup>2</sup>, 马鸿滢<sup>2</sup>, 赵滢<sup>2</sup>, 张天彪<sup>3</sup>

(1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院麻醉科, 上海 200011; 2. 中国医科大学附属盛京医院胃肠营养外科, 沈阳 110004; 3. 中国医科大学生命科学学院生物化学与分子生物学教研室, 沈阳 110122)

**摘要** **目的** 探究核心蛋白聚糖(DCN)、甲磺酸伊马替尼、苹果酸舒尼替尼对胃肠道间质瘤(GIST)细胞恶性表型的影响及其分子机制。**方法** 采用Western blotting检测过表达DCN以及甲磺酸伊马替尼和苹果酸舒尼替尼单独或联合用药后,GIST细胞(GIST-882)中DCN及其下游相关蛋白表达水平的变化。采用CCK-8实验、划痕实验、Transwell实验验证过表达DCN以及甲磺酸伊马替尼和苹果酸舒尼替尼单独或联合用药后,GIST-882细胞增殖、迁移和侵袭能力的变化。**结果** 与对照组比较,过表达DCN以及甲磺酸伊马替尼和苹果酸舒尼替尼单独或联合用药后,GIST-882细胞中DCN蛋白表达水平升高,表皮生长因子受体(EGFR)、磷酸化EGFR(p-EGFR)、胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)、磷酸化ERK1/2(p-ERK1/2)蛋白表达水平降低,细胞增殖、迁移和侵袭能力显著降低。**结论** 过表达DCN以及甲磺酸伊马替尼或苹果酸舒尼替尼单独或联合用药,可以通过下调EGFR的表达参与MAPK信号传导通路,进而调控GIST细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

**关键词** 胃肠道间质瘤; 核心蛋白聚糖; 表皮生长因子受体; 甲磺酸伊马替尼; 苹果酸舒尼替尼

中图分类号 R735 文献标志码 A 文章编号 0258-4646(2024)11-0961-06

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20241120.1421.014>

DOI:10.12007/j.issn.0258-4646.2024.11.001

### Effects of decorin, imatinib mesylate, and sunitinib malate on the malignant phenotype of gastrointestinal stromal tumor cells

TANG Shan<sup>1</sup>, JIA Junkai<sup>2</sup>, MA Hongying<sup>2</sup>, ZHAO Ying<sup>2</sup>, ZHANG Tianbiao<sup>3</sup>

(1. Department of Anesthesiology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; 2. Department of Gastrointestinal Nutrition, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China. 3. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Life Sciences, China Medical University, Shenyang 110122, China)

**Abstract** **Objective** To investigate the effects and molecular mechanisms of decorin (DCN), imatinib mesylate, and sunitinib malate on the malignant phenotype of gastrointestinal stromal tumor cells. **Methods** Western blotting was used to detect changes in the expression of DCN and its downstream proteins after DCN overexpression and treatment with imatinib mesylate and sunitinib malate alone or in combination in gastrointestinal stromal tumor cells (GIST-882). Cell counting kit-8, scratch, and Transwell assays were performed to validate the changes in cell proliferation, migration, and invasion abilities after DCN overexpression and treatment with imatinib mesylate and sunitinib malate alone or in combination in GIST-882 cells. **Results** Compared with the control group, DCN overexpression and treatment with imatinib mesylate and sunitinib malate alone or in combination in GIST-882 cells increased the expression levels of DCN protein, decreased the expression levels of epidermal growth factor receptor (EGFR), phosphorylated EGFR (p-EGFR), extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), and phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2) proteins, and significantly reduced cell proliferation, migration, and invasion abilities. **Conclusion** DCN overexpression and treatment with imatinib mesylate and sunitinib malate alone or in combination affect the MAPK signaling pathway by downregulating the expression of EGFR, thereby regulating the proliferation, migration, and invasion abilities of gastrointestinal stromal tumor cells.

**Keywords** gastrointestinal stromal tumor; decorin; epidermal growth factor receptor; imatinib mesylate; sunitinib malate

基金项目:国家自然科学基金(61973316)

作者简介:唐珊(1993-),女,医师,硕士。

通信作者:张天彪, E-mail: tbzhang@emu.edu.cn

收稿日期:2024-08-02

网络出版时间:2024-11-21 10:34:51

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumor, GIST)是存在于胃肠道间叶组织的肿瘤,是发生率最高的间质肿瘤<sup>[1]</sup>。GIST多发生于胃和小肠,由于早期症状不典型,诊断主要依赖影像学检查、内镜和活体组织检查。其发病机制主要是GIST细胞能表达一种

具有酪氨酸激酶活性的生长因子受体KIT, 细胞发生变异时, 会引起酪氨酸激酶持续激活和自身磷酸化, 导致细胞增殖失控<sup>[2]</sup>。因此, KIT抑制剂甲磺酸伊马替尼为目前治疗GIST的一线药物<sup>[3]</sup>, 苹果酸舒尼替尼也可用于治疗GIST<sup>[4]</sup>。

核心蛋白聚糖(decorin, DCN) 为含亮氨酸小蛋白聚糖, 参与生物信息的传递, 其与细胞外基质成分、生长因子和酪氨酸激酶受体相互作用<sup>[5]</sup>, 可引起细胞周期阻滞和凋亡, 有抗转移和抗血管生成的作用<sup>[6]</sup>。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR) 参与调控生长发育, 维持细胞稳定状态, 并与炎症和肿瘤的发生紧密相关<sup>[7]</sup>。本研究基于细胞水平检测过表达DCN以及甲磺酸伊马替尼和苹果酸舒尼替尼单独或联合用药对GIST细胞恶性表型的影响, 探讨其分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、试剂和分组

GIST细胞株GIST-882(上海富雨生物科技有限公司); 甲磺酸伊马替尼片剂(瑞士NOVARTIS公司); 苹果酸舒尼替尼胶囊(意大利Pfizer公司); 转染试剂GP-transfect-mate、过表达质粒OE-DCN和OE-NC(苏州吉玛基因股份有限公司); EGFR、磷酸化EGFR(phosphorylated EGFR, p-EGFR) 抗体(英国abcam公司); 胞外信号调节激酶1/2(extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2)、磷酸化ERK1/2(phosphorylated ERK1/2, p-ERK1/2) 抗体[艾比玛特医药科技(上海)有限公司]。

用胰蛋白酶消化处于对数生长期的GIST-882细胞, 细胞计数后按照 $1.5 \times 10^5$ /孔接种于6孔板中。将加有转染试剂的混合物轻轻滴加至含质粒DNA的混合物溶液中, 轻轻混匀, 室温静置20 min, 立即转染。将6孔板呈米字晃动, 使转染复合物均匀分布。CO<sub>2</sub>培养箱中孵育, 转染6 h后换液, 进行下一步操作。

实验分为空白对照组、DCN过表达组、甲磺酸伊马替尼组、苹果酸舒尼替尼组、甲磺酸伊马替尼+苹果酸舒尼替尼组(联合用药组)和DCN过表达+甲磺酸伊马替尼组、DCN过表达+苹果酸舒尼替尼组、DCN过表达+甲磺酸伊马替尼+苹果酸舒尼替尼组(DCN过表达+联合用药组)。其中, 甲磺酸伊马替尼

浓度为31.25 μmol/L, 苹果酸舒尼替尼浓度为15.63 μmol/L。

### 1.2 CCK-8实验

在96孔板的每孔中加入细胞悬液, 设置空白对照, 加入完全培养基。24 h后显微镜下观察细胞贴壁情况, 每孔加入单独用药或联合用药的培养基, 继续孵育; 在加药后24 h进行检测。将完全培养基和CCK-8溶液按照10 : 1配制并混匀。细胞培养箱中避光孵育1~3 h, 直到颜色变为橙色。使用酶标仪在450 nm波长处测定吸光度, 并记录。

### 1.3 划痕实验

6孔板中轻轻划痕, PBS清洗细胞2~3次, 使用含2%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的RPMI 1640培养液配制不同浓度药物培养基, 继续培养。光学显微镜下拍照, 通过Image-Pro Plus 6.0软件计算划痕的平均宽度和细胞迁移程度, 实验独立重复3次。

### 1.4 Transwell实验

1.4.1 细胞迁移: 应用胰蛋白酶消化细胞, 计数细胞。取100 μL无血清细胞悬液铺于Transwell小室的上室; 取600 μL含15%胎牛血清的培养基加入Transwell小室的下室。24 h后取出小室, 擦除室内残余细胞, PBS清洗, 置于600 μL 4%多聚甲醛中固定30 min, 固定完成后, PBS清洗2次。将小室放置于600 μL 0.1%结晶紫染液染色20 min, PBS清洗2次。显微镜下观察小室并照相, 采用ImageJ软件计数每个视野穿过膜的细胞数。

1.4.2 细胞侵袭: 将基质胶提前放入4 ℃冰箱过夜, 预冷无菌枪头和离心管。将无血清培养基和基质胶按照8 : 1的比例混匀。取100 μL稀释好的基质胶均匀涂于上室, 放入培养箱静置1 h。后续步骤同Transwell细胞迁移实验。

### 1.5 实时荧光定量PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)

使用2X SG Fast qPCR Master Mix试剂盒(英国BBI Solutions公司)进行RT-qPCR, 严格按照实验说明书进行操作。引物序列: DCN, 正向5'-TTCCGCTGTCAATGCCATCTTCG-3', 反向5'-GCAGGTCTAGCAGATTGTGTCAG-3'; EGFR, 正向5'-TACTTGGAGGACCGTCGCTTGG-3', 反向5'-CTCTTCCGCACCCAGCAGTTTG-3'; RPS18, 正向5'-ATCCTCAGTGAGTTC TCCC-3', 反向5'-CTTTGCCATCACTGCCATTA-3'。

### 1.6 Western blotting

制备蛋白标准溶液,用酶标仪测定562 nm波长的吸光度。绘制标准曲线,计算样品的蛋白浓度;加热,使蛋白完全高温变性。

配胶、上样、电泳、转膜、封闭、洗膜后,分别加入EGFR、p-EGFR、ERK1/2、p-ERK1/2蛋白抗体,经一抗孵育、二抗孵育、化学显影,ImageJ软件处理收集的图像信息。

### 1.7 统计学分析

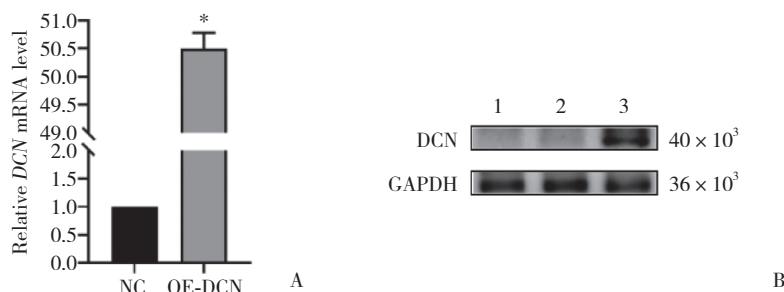
应用SPSS 22.0软件进行统计学分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,满足正态性和方差齐性的数据采用两独

立样本t检验进行比较,不满足的数据采用两独立样本非参数检验进行比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 GIST-882细胞过表达DCN后DCN mRNA和蛋白表达水平的变化

在GIST-882细胞中过表达DCN,采用RT-qPCR和Western blotting验证过表达效果。结果表明,过表达效果显著,DCN mRNA和蛋白表达水平均升高(图1)。



A, results of RT-qPCR; B, results of Western blotting. NC, normal control; OE, overexpression; DCN, decorin. Compared with NC group,  $*P < 0.05$ . 1, blank control; 2, normal control; 3, OE-DCN.

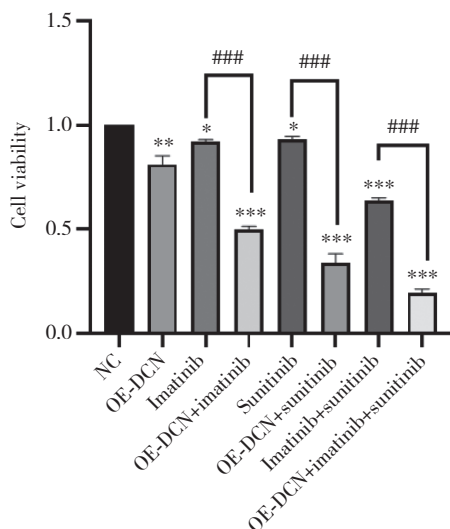
图1 过表达DCN后GIST-882细胞中DCN mRNA和蛋白的表达水平

Fig.1 DCN mRNA and protein expression levels after DCN overexpression in GIST-882 cells

### 2.2 过表达DCN后甲磺酸伊马替尼、苹果酸舒尼替尼单独或联合用药对GIST-882细胞增殖能力的影响

CCK-8实验表明,过表达DCN以及甲磺酸伊马

替尼、苹果酸舒尼替尼单独或联合用药均能抑制细胞的增殖能力,DCN过表达+联合用药组中抑制细胞增殖的能力显著强于联合用药组(图2)。



NC, normal control; OE, overexpression; DCN, decorin. Compared with NC group,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ .  $###P < 0.001$ .

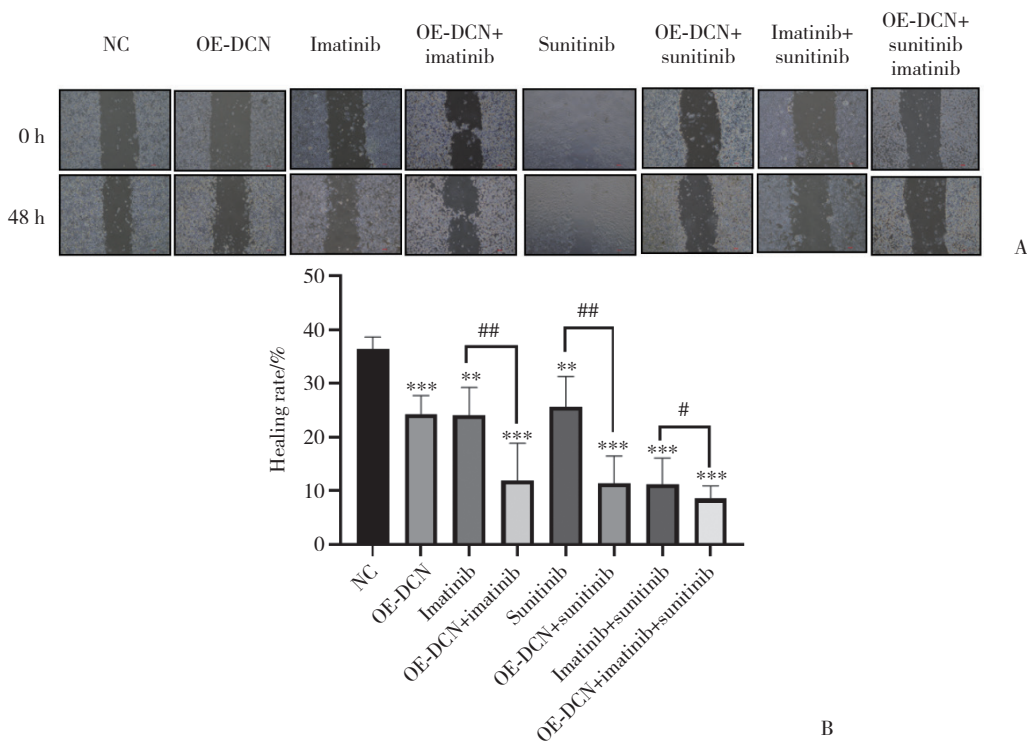
图2 过表达DCN、甲磺酸伊马替尼、苹果酸舒尼替尼对GIST-882细胞增殖能力的影响

Fig.2 Effects of DCN overexpression and imatinib mesylate and sunitinib malate treatment on the proliferation of GIST-882 cells

### 2.3 过表达DCN后甲磺酸伊马替尼、苹果酸舒尼替尼单独或联合用药对GIST-882细胞迁移和侵袭能力的影响

划痕实验结果(图3)显示,过表达DCN以及甲磺酸伊马替尼、苹果酸舒尼替尼单独或联合用药均

能抑制细胞的迁移能力。Transwell实验结果(图4)显示,过表达DCN以及甲磺酸伊马替尼、苹果酸舒尼替尼单独或联合用药均能显著抑制细胞的迁移和侵袭能力,DCN过表达+联合用药组中抑制细胞迁移和侵袭的能力显著强于联合用药组。



A, migratory ability of GIST-882 cells detected using the wound healing assay (×40); B, statistical results. NC, normal control; OE, overexpression; DCN, decorin. Compared with NC group, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . #  $P < 0.05$ ; ##  $P < 0.01$ .

图3 过表达DCN、甲磺酸伊马替尼、苹果酸舒尼替尼对GIST-882细胞迁移能力的影响

Fig.3 Effects of DCN overexpression and imatinib mesylate and sunitinib malate treatment on the migration of GIST-882 cells

### 2.4 DCN通过下调EGFR的表达参与MAPK信号传导通路

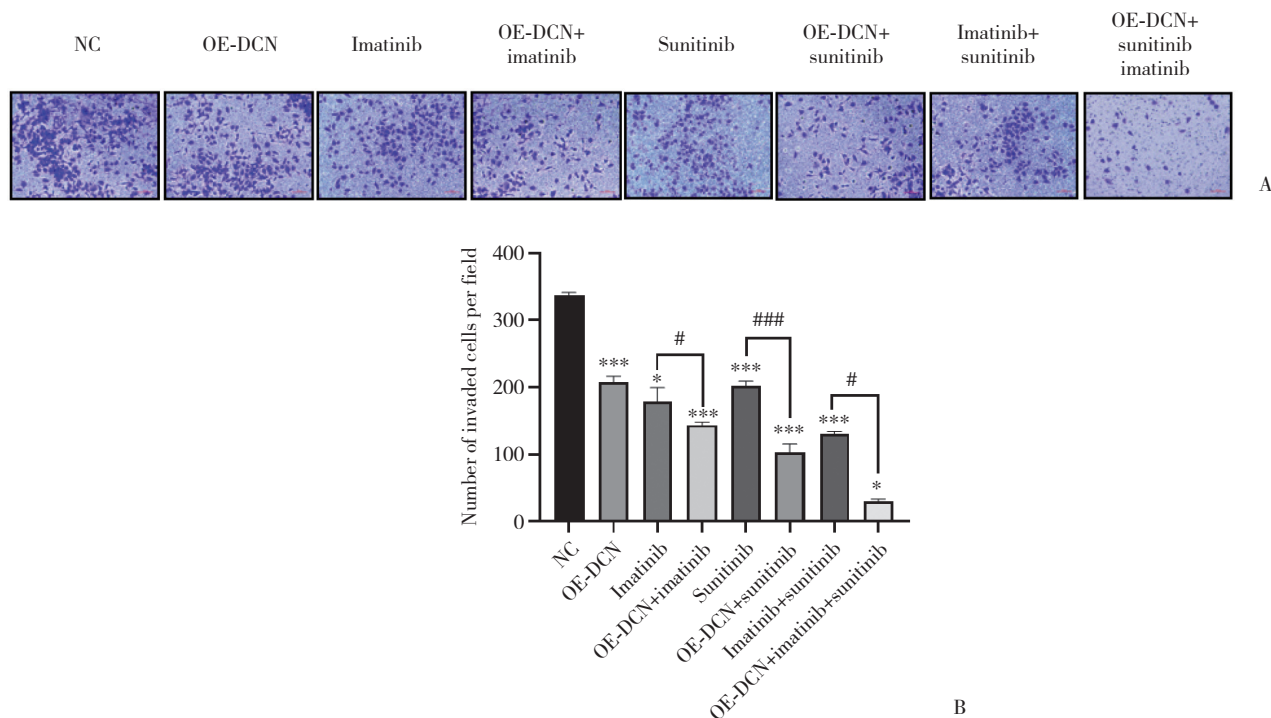
为了进一步探究DCN参与GIST细胞迁移、侵袭的分子机制,采用RT-qPCR和Western blotting检测EGFR、p-EGFR、ERK1/2和p-ERK1/2的mRNA和蛋白的表达情况。

RT-qPCR结果(图5)表明,过表达DCN以及甲磺酸伊马替尼、苹果酸舒尼替尼单独或联合用药均使EGFR mRNA表达水平下调,DCN过表达+联合用药的效果强于单独用药。Western blotting结果(图6)显示,过表达DCN以及甲磺酸伊马替尼、苹果酸舒尼替尼单独或联合用药均使EGFR、p-EGFR、ERK、p-ERK1/2蛋白表达水平降低。提示DCN可能通过下调EGFR的表达参与MAPK信号传导通路,进而调控

GIST细胞的迁移、侵袭能力。

### 3 讨论

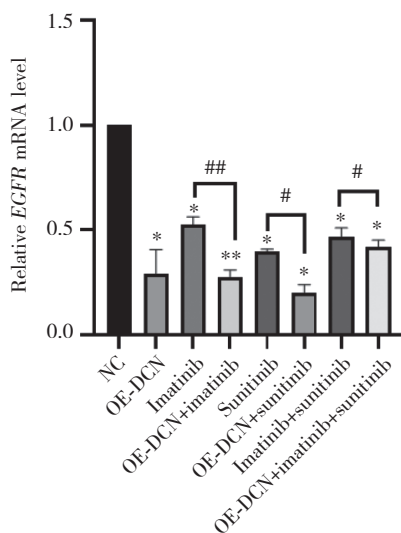
GIST是较常见的间质肿瘤,与人类健康密切相关,亟需解决<sup>[8]</sup>。随着对疾病发生机制的研究不断深入,针对肿瘤细胞中蛋白或基因片段设计的相应治疗药物也投入使用,被称为靶点治疗<sup>[9]</sup>。目前,GIST的临床一线靶向药物是甲磺酸伊马替尼,可针对各种ABL受体、C-KIT受体以及血小板衍化生长因子受体<sup>[10]</sup>。肿瘤细胞的增殖伴随着突变,但甲磺酸伊马替尼不能覆盖所有的突变,所以治疗效果存在明显的个体差异<sup>[11]</sup>。因此,寻找GIST细胞中的更多靶点,对为临床提供更加有效的治疗方案有重要的意义<sup>[12]</sup>。



A, invasion ability of GIST-882 cells detected using transwell assay (×100); B, statistical results. NC, normal control; OE, overexpression; DCN, decorin. Compared with NC group, \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . #  $P < 0.05$ ; ###  $P < 0.001$ .

图4 过表达DCN、甲磺酸伊马替尼、苹果酸舒尼替尼对GIST-882细胞侵袭能力的影响

Fig.4 Effects of DCN overexpression and imatinib mesylate and sunitinib malate treatment on the invasion of GIST-882 cells



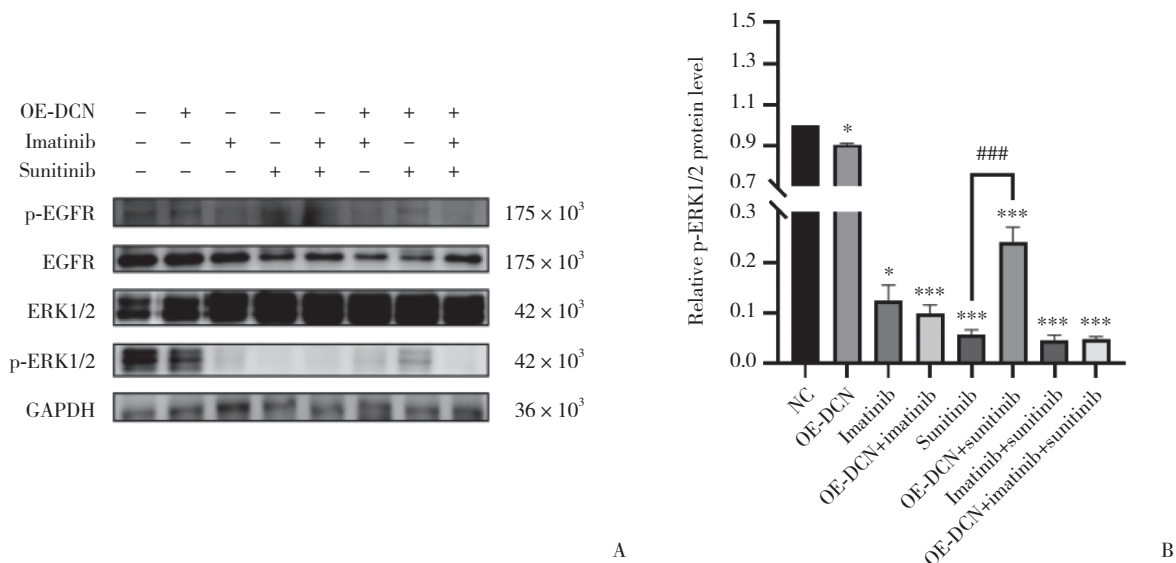
NC, normal control; OE, overexpression; DCN, decorin. Compared with NC group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ . #  $P < 0.05$ ; ##  $P < 0.01$ .

图5 过表达DCN、甲磺酸伊马替尼、苹果酸舒尼替尼对EGFR mRNA表达的影响

Fig.5 Effects of DCN overexpression and imatinib mesylate and sunitinib malate treatment on the expression of EGFR mRNA

本研究探究过表达DCN后,甲磺酸伊马替尼、苹果酸舒尼替尼单独或联合用药对GIST细胞生物学行为的影响及其分子机制。结果显示,过表达DCN以及甲磺酸伊马替尼、苹果酸舒尼替尼单独或联合用药均能抑制细胞的增殖、迁移和侵袭能力,且

DCN过表达+联合用药的抑制能力显著强于单独用药。根据既往研究,本研究通过RT-qPCR检测过表达DCN对EGFR mRNA表达的影响,结果显示,过表达DCN会使EGFR mRNA表达水平下调,也会影响EGFR的磷酸化。



A, results of Western blotting; B, statistical results. NC, normal control; OE, overexpression; DCN, decorin. Compared with NC group, \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . ###  $P < 0.001$ .

图6 过表达DCN、甲磺酸伊马替尼、苹果酸舒尼替尼对相关蛋白表达的影响

Fig.6 Effects of DCN overexpression and imatinib mesylate and sunitinib malate treatment on the expression of related proteins

另外,通过Western blotting检测DCN对EGFR、p-EGFR、ERK、p-ERK1/2蛋白表达的影响,结果显示,过表达DCN使其表达均降低。由于DCN本身不具备激酶活性<sup>[13]</sup>,因此推测可能是通过某些分子调控MAPK信号传导通路。

综上所述,本研究表明,过表达DCN可以抑制GIST细胞增殖、迁移和侵袭能力,且与甲磺酸伊马替尼、苹果酸舒尼替尼联合用药效果更佳,DCN可以通过下调EGFR的表达参与MAPK信号传导通路,进而调控GIST细胞增殖、迁移和侵袭等生物学行为。

参考文献:

[1] SCHAEFER IM, DEMATTEO RP, SERRANO C. The GIST of advances in treatment of advanced gastrointestinal stromal tumor [J]. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2022, 42: 1-15. DOI: 10.1200/EDBK\_351231.

[2] LOSTES-BARDAJI MJ, GARCÍA-ILLESCAS D, VALVERDE C, et al. Ripretinib in gastrointestinal stromal tumor: the long-awaited step forward [J]. Ther Adv Med Oncol, 2021, 13: 1758835920986498. DOI: 10.1177/1758835920986498.

[3] HISANAGA M, NONAKA T, MARUTA H, et al. Transanal approach after preoperative imatinib treatment of a rectal gastrointestinal stromal tumors with external anal sphincter invasion: a case report [J]. Int J Surg Case Rep, 2021, 85: 106217. DOI: 10.1016/j.ijscr.2021.106217.

[4] CHANG YR, HUANG WK, WANG SY, et al. A nomogram predicting progression free survival in patients with gastrointestinal stromal tumor receiving sunitinib: incorporating pre-treatment and post-treatment parameters [J]. Cancers, 2021, 13 (11): 2587. DOI: 10.3390/cancers13112587.

[5] WU ML, DOWNIE LE, GROVER LM, et al. The neuroregenerative effects of topical decorin on the injured mouse cornea [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17 (1): 142. DOI: 10.1186/s12974-020-01812-6.

[6] BALNE PK, GUPTA S, ZHANG J, et al. The functional role of decorin in corneal neovascularization in vivo [J]. Exp Eye Res, 2021, 207: 108610. DOI: 10.1016/j.exer.2021.108610.

[7] QI ZP, CHEN ZH, HE DL, et al. RNA binding protein CUGBP1 mediates the liver metastasis of colorectal cancer by regulating the ErbB signal pathway [J]. Transl Cancer Res, 2021, 10 (7): 3373-3388. DOI: 10.21037/tcr-21-311.

[8] XU YW, ZHANG BC, WANG J. Gastrointestinal stromal tumour with liver metastasis presenting as gastric cancer [J]. Diagnostics, 2023, 13 (3): 376. DOI: 10.3390/diagnostics13030376.

[9] DANESHI N, BAHMAIE N, ESMAEILZADEH A. Cell-free treatments: a new generation of targeted therapies for treatment of ischemic heart disease [J]. Cell J, 2022, 24 (7): 353-363. DOI: 10.22074/cellj.2022.7643.

[10] EVERS MAN A, FATIMA S, HONDA K, et al. Imatinib-induced acquired dermal melanocytosis [J]. J Skin, 2021, 5 (1): 75-77. DOI: 10.25251/skin.5.1.18.

[11] HSIEH YP, NALER LB, MA S, et al. Cell-type-specific epigenomic variations associated with BRCA1 mutation in pre-cancer human breast tissues [J]. NAR Genom Bioinform, 2022, 4 (1): lqac006. DOI: 10.1093/nargab/lqac006.

[12] SUN YN, LIANG YQ, DAI WB, et al. Peptide-drug conjugate-based nanocombination actualizes breast cancer treatment by maytansinoid and photothermia with the assistance of fluorescent and photoacoustic images [J]. Nano Lett, 2019, 19 (5): 3229-3237. DOI: 10.1021/acs.nanolett.9b00770.

[13] CABELLO-VERRUGIO C, BRANDAN E. A novel modulatory mechanism of transforming growth factor- $\beta$  signaling through decorin and LRP-1 [J]. J Biol Chem, 2007, 282 (26): 18842-18850. DOI: 10.1074/jbc.M700243200.

(编辑 陈 姜)