

◆ 医学前沿与研究 ◆

结直肠癌细胞过表达 tricellulin 促进人脐静脉内皮细胞侵袭转移^{*}彭 鹏, 张金秀, 李梦诗, 覃蒙斌, 孙 娟, 吴晴茹, 程若溪, 刘诗权, 黄杰安^{**}

(广西医科大学第二附属医院消化内科, 广西南宁 530007)

摘要:三细胞间紧密连接蛋白 tricellulin 在结直肠癌组织中高表达, 且与结直肠癌的不良预后相关。血管生成是肿瘤侵袭转移的重要因素之一, 血管内皮细胞在血管新生过程中起决定作用。研究 tricellulin 与内皮细胞的关系对探索肿瘤侵袭转移机制具有重要意义。本研究通过 western blot 观察结直肠癌细胞株与正常结肠上皮细胞株中 tricellulin 的差异表达, 通过基因工程技术调控结直肠癌细胞 HCT116 中 tricellulin 的表达, transwell 小室检测过表达 tricellulin 前后结直肠癌细胞侵袭能力变化及其上清液对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)侵袭能力的影响, ELISA 实验检测过表达 tricellulin 前后 MMP2、MMP7 的表达变化。结果显示: 过表达 tricellulin 可增强 HCT116 细胞的侵袭能力, 并且其上清液可增强 HUVEC 细胞的侵袭能力; 过表达 tricellulin 可增加 MMP2、MMP7 的表达。说明人结直肠癌细胞过表达 tricellulin 可促进结直肠癌细胞侵袭迁移, 并通过影响 MMP2、MMP7 的表达调控 HUVEC 细胞的侵袭转移。

关键词:结直肠癌 tricellulin 人脐静脉内皮细胞 血管生成 侵袭转移

中图分类号: R73-37 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2022)03-0476-06

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20220720.010

结直肠癌(Colorectal Cancer, CRC)是一种常见的消化道肿瘤。在全球人类肿瘤中, 结直肠癌的总发病率排名第三, 死亡率排名第二。虽然多种治疗手段可应用于结直肠癌的治疗, 但是其预后仍然不理想, 尤其是在疾病晚期^[1]。因此, 研究结直肠癌侵袭转移的分子机制和寻找更有效的生物分子标记物具有重

要意义。Tricellulin, 也称为 TRIC、MARVELD2, 是 2005 年科学家通过免疫电镜技术首次发现的存在于三细胞连接处的紧密连接蛋白, 是第一个被发现分布于三细胞连接处的分子^[2]。它为细胞最终构成各种立体结构提供支点, 是构成和维持细胞间黏附功能的重要结构^[3]。近年来的研究发现, tricellulin 与肿

收稿日期: 2022-02-22

^{*} 国家自然科学基金地区基金项目(81760516), 广西自然科学基金面上项目(2019GXNSFAA185030)和广西医药卫生自筹经费科研课题(Z20181003, Z20191096)资助。

【作者简介】

彭 鹏(1986-), 男, 主治医师, 在读博士研究生, 主要从事结直肠癌侵袭转移分子机制研究。

【**通信作者】

黄杰安(1965-), 男, 教授, 主要从事结直肠癌侵袭转移分子机制研究, E-mail: hjagxmu@163.com。

【引用本文】

彭鹏, 张金秀, 李梦诗, 等. 结直肠癌细胞过表达 tricellulin 促进人脐静脉内皮细胞侵袭转移[J]. 广西科学, 2022, 29(3): 476-481.

PENG P, ZHANG J X, LI M S, et al. Overexpression of Tricellulin in Colon Cancer Cells Promotes Invasion and Metastasis of Human Umbilical Vein Endothelial Cells [J]. Guangxi Sciences, 2022, 29(3): 476-481.

瘤的发生发展、侵袭转移密切相关,有可能成为评估肿瘤进展和治疗的新靶点^[4,5]。研究发现, tricellulin 在结直肠癌组织中高表达,且与结直肠癌肿瘤浸润深度、TNM 分期、淋巴结转移和远处转移有关^[6],但是其中的分子机制尚不清楚。血管生成是肿瘤侵袭转移的重要因素之一。血管内皮细胞是构成血管内膜的基本元素,在血管新生过程中起决定作用。基质金属蛋白酶(MMPs)在介导肿瘤血管新生、转移和侵袭等过程中发挥重要作用。因此,研究 tricellulin 和内皮细胞的联系对于探索其与肿瘤血管生成、侵袭转移具有重要作用。本研究通过慢病毒转染结直肠癌细胞 HCT116 过表达 tricellulin,检测转染前后结直肠癌细胞 MMP2、MMP7 的表达及侵袭能力的变化,检测转染前后细胞上清液对人脐静脉内皮细胞 HUVEC 侵袭能力的影响,以探索 tricellulin 影响结直肠癌侵袭转移能力的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与慢病毒载体

人结直肠癌细胞株 HCT-116、SW620、HCT8,正常人结肠黏膜上皮细胞系 NCM460,人脐静脉内皮细胞 HUVEC 均购于中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所细胞资源中心。根据 tricellulin 基因(GeneID:NM_001038603.2)设计的重组慢病毒过表达载体 LV-tricellulin 和空载体 LV-GFP(阴性对照)购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司。

1.1.2 主要仪器

CO₂ 恒温细胞培养箱购自美国赛默飞世尔科技公司;移液器购自德国 eppendorf 公司;倒置相差显微镜、倒置荧光显微镜购自日本 Nikon 公司;垂直电泳仪、湿转转膜仪购自美国 Bio-Rad 公司;Odyssey 双色红外荧光成像仪购自美国 LI-COR 公司。

1.1.3 主要材料与试剂

Transwell 小室、细胞培养皿及 24 孔细胞培养板购自美国 Corning 公司;10%胎牛血清、DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;青霉素-链霉素溶液(100×)购自北京索莱宝科技有限公司;结晶紫购自大连美仑生物技术有限公司;tricellulin 兔抗人多克隆抗体购自美国赛默飞世尔科技公司;GAPDH 抗体购自美国 Proteintech Group 公司;IRDye® 680RD Goat anti-Rabbit 购自美国 LI-COR 公司;硝酸纤维素膜购自美国 Millipore 公司;Matrigel 胶购自美国

B&D 公司;嘌呤霉素购自北京索莱宝科技有限公司;MMP2、MMP7 ELISA kits 购于美国 CLOUD-CLONE 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人结直肠癌细胞株 HCT-116、SW620、HCT8,正常人结肠黏膜上皮细胞系 NCM460 以及人脐静脉内皮细胞 HUVEC 分别用含有 10%胎牛血清 DMEM 培养基放置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.2.2 慢病毒转染

选取处于对数生长期的 HCT116 细胞进行慢病毒转染,待细胞铺满孔 50%时,按照说明书将编码人 tricellulin 的过表达慢病毒载体(TRIC-OE)及空载慢病毒(NC)分别转染 HCT116 细胞,运用嘌呤霉素筛选后获得稳定转染细胞株。采用 western blot 验证转染效率。

1.2.3 Western blot

将 40 μg 细胞蛋白和上样缓冲液混合并变性后,上样在 12%分离胶/5%积层胶上进行 SDS-PAGE。应用电转移将电泳分离后的蛋白转移至 PVDF 膜上,滤膜经 5%脱脂奶粉-TBS 溶液于室温封闭 1 h 后,一抗孵育过夜。滤膜经 TBST 缓冲液清洗 3 次后,再与荧光二抗于室温孵育 1 h。滤膜经 TBST 缓冲液清洗 3 次后,应用 Odyssey 双色红外荧光扫描成像系统显影。GAPDH 设置为内参对照。

1.2.4 Transwell 小室检测 HCT116 细胞侵袭能力

将 Matrigel 胶用无血清 DMEM 培养基按照 1:8 的比例稀释,吸取 50 μL 铺于上室,将铺好的基质胶放置到 4℃冰箱包被过夜。分别将 TRIC-OE、NC 组细胞悬液种在上室,下室加入含 20%胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)的 DMEM 培养基,放置到培养箱中培养 24 h。使用适量甲醇将小室底膜上的细胞固定后置于 0.1%结晶紫中染色。清洗后倒置风干,倒置显微镜下随机选取 5 个视野进行拍照计数。

1.2.5 Transwell 小室检测 TRIC-OE 上清液对 HUVEC 细胞侵袭能力的影响

TRIC-OE 在 10 cm 培养皿中长至约 80%汇合度时,换成 6 mL 新鲜的完全培养基。24 h 后收集细胞培养上清液,3 000 r/min 离心 5 min 后,将上清液转移到新的 15 mL 离心管中。使用 TRIC-OE 上清液配制条件培养基(TRIC-OE-CM),上清液:20%

FBS=8:2。当 HUVEC 细胞达到约 60% 汇合度时,将培养基换成条件培养基继续培养,48 h 后消化、离心并收集 HUVEC 细胞。铺胶方法同 1.2.4 节,将 HUVEC 细胞悬液种在上室,使用无血清培养基培养,下室加入培养条件培养基。培养 24 h 后,固定、染色、拍照方法同 1.2.4 节。

1.2.6 ELISA 法检测 MMP2、MMP7 的表达

各组细胞培养 24 h 后收集细胞上清液。根据 ELISA 试剂盒操作说明检测 TRIC-OE、NC 两组细胞上清液中 MMP2、MMP7 的表达含量。根据标准品浓度及 A 值绘制标准曲线,计算每孔待测品浓度。

1.3 统计学方法

所有统计数据通过 SPSS 17.0 分析,图形采用 GraphPad Prism 7.0 构建。计量资料以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用 *t* 检验 ($P < 0.05$ 差异具有统计学意义)。

2 结果与分析

2.1 Tricellulin 在人结直肠癌细胞系中的表达

Tricellulin 蛋白在人结直肠癌细胞系 HCT116、SW620、HCT8 的表达量均高于人结肠黏膜上皮细胞系 NCM460(图 1),说明 tricellulin 在人结直肠癌细胞中高表达。选择中等量表达内源性 tricellulin 蛋白及侵袭能力中等的 HCT116 细胞株,以进行下一步实验。

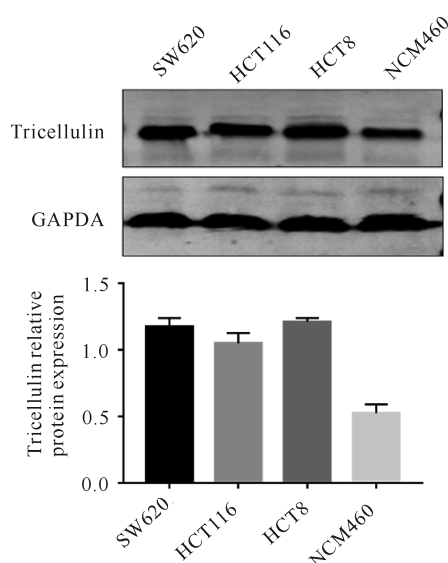


图 1 Tricellulin 在人结直肠癌细胞系及人结肠黏膜上皮细胞系的表达

Fig. 1 Expression of tricellulin in human colorectal cancer cell lines and human colonic mucosal epithelial cell lines

2.2 过表达 tricellulin 的鉴定

过表达慢病毒转染结直肠癌细胞 HCT116,经过筛选后获得稳定过表达 tricellulin 的细胞株,荧光显微镜下可见绿色荧光表达大于 70%(图 2)。提取总蛋白进行 western blot 实验,以 GAPDH 为参照基因,结果如图 3。Western blot 的验证实验结果说明,

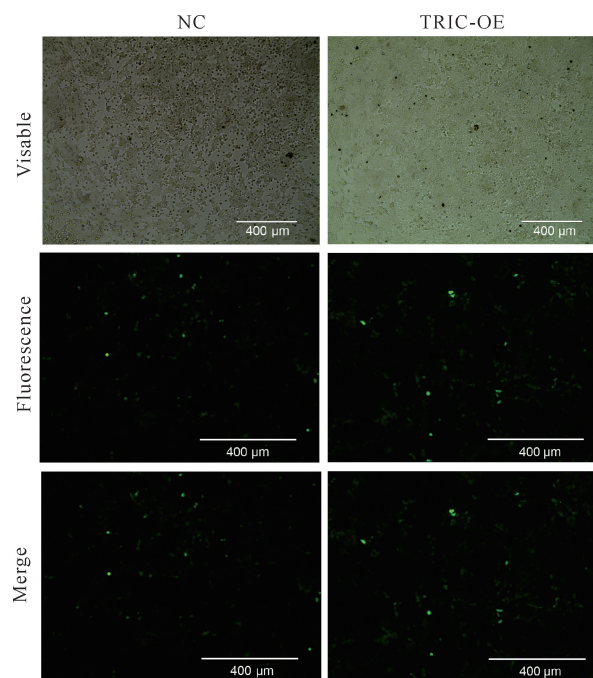
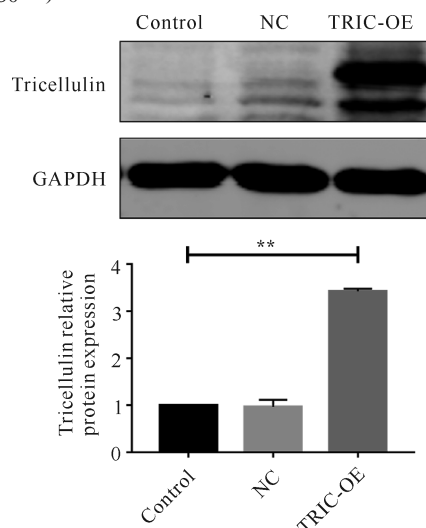


图 2 慢病毒转染 tricellulin (TRIC-OE) 与阴性对照组细胞 (NC) 内绿色荧光蛋白表达 (250 $\times$)

Fig. 2 Green fluorescent protein expression in lentivirus-transfected tricellulin (TRIC-OE) and negative control cells (NC) (250 $\times$)



* * indicates significant difference at $P < 0.01$

图 3 过表达 tricellulin 前后 tricellulin 蛋白的相对表达量

Fig. 3 Relative expression of tricellulin protein before and after overexpression of tricellulin

稳定过表达 tricellulin 的 HCT116 细胞株成功构建, 此细胞株可用于后续实验。

2.3 过表达 tricellulin 对人结直肠癌细胞侵袭能力的影响

通过 Transwell 小室实验检测各组细胞对人结直肠癌细胞的侵袭能力的影响, 结果显示, 与 NC 组相比, TRIC-OE 组的侵袭细胞数量明显增加(图 4, $P < 0.01$), 说明过表达 tricellulin 可增强人结直肠癌细胞的侵袭能力。

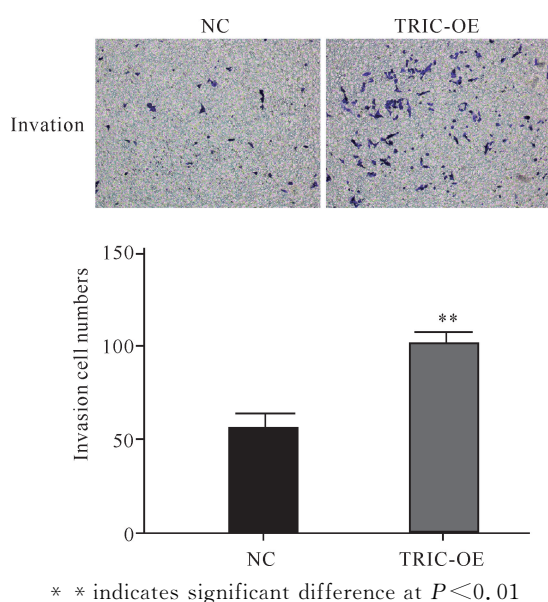


图 4 过表达 tricellulin 对 HCT116 细胞侵袭能力的影响(100×)

Fig. 4 Effect of overexpression of tricellulin on the invasive ability of HCT116 cells (100×)

2.4 过表达 tricellulin 细胞上清液对 HUVEC 细胞侵袭能力的影响

通过 Transwell 小室实验检测各组细胞上清液对 HUVEC 细胞的侵袭能力的影响。与 NC 组相比, 使用 TRIC-OE 上清液配制条件培养基 (TRIC-OE-CM 组) 可使 HUVEC 细胞侵袭数量明显增加 (图 5, $P < 0.01$), 说明过表达 tricellulin 人结直肠癌细胞上清液可增强 HUVEC 细胞的侵袭能力。

2.5 过表达 tricellulin 细胞上清液对 MMP2、MMP7 表达的影响

ELISA 法检测各组细胞上清液中 MMP2、MMP7 的表达, 结果显示 TRIC-OE 组中 MMP2、MMP7 的含量明显升高 (图 6, $P < 0.01$), 说明 tricellulin 可能通过 MMP2、MMP7 影响 HUVEC 的侵袭

能力。

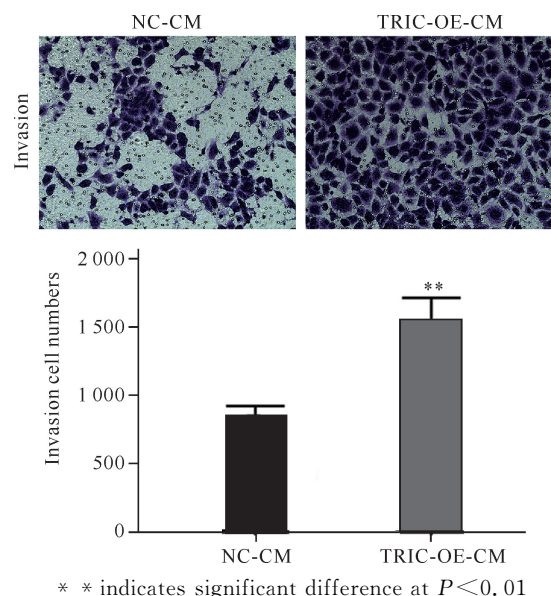


图 5 过表达 tricellulin 细胞上清液对 HUVEC 细胞侵袭能力的影响(200×)

Fig. 5 Effect of overexpression of tricellulin cell supernatant on the invasiveness of HUVEC cells (200×)

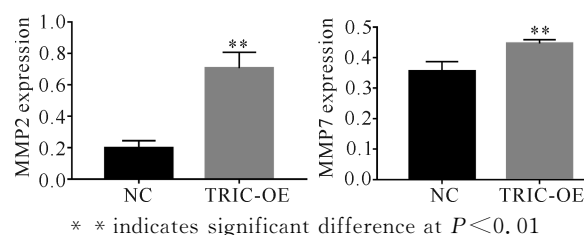


图 6 过表达 tricellulin 对 HCT116 细胞 MMP2、MMP7 表达的影响

Fig. 6 Effects of overexpression of tricellulin on the expression of MMP2 and MMP7 in HCT116 cells

3 讨论

虽然多种治疗手段可应用于结直肠癌的治疗, 如手术、放化疗、免疫治疗、靶向治疗等, 但是结直肠癌的预后仍不佳^[7]。在所有肿瘤中, 结直肠癌的转移率位居第三, 是消化内科临床患者的常见死亡原因。目前结直肠癌侵袭转移的分子机制尚未完全阐明。肠上皮屏障由单层细胞和细胞间连接组成, 细胞间连接包括紧密连接、黏附连接、桥粒、缝隙连接^[8]。越来越多的研究表明, 紧密连接蛋白在肿瘤的发生、侵袭转移中扮演着重要角色^[9-11]。Tricellulin 作为紧密连接蛋白中的一员, 其主要表达在三细胞连接处。笔者在前期研究工作中发现, tricellulin 在结直肠癌组织中高表达, 且与结直肠癌肿瘤浸润深度、TNM 分期、淋巴结转移和远处转移有关^[6], 但是其异常表达对肿瘤

的生物学行为产生影响,目前作用机制尚不明确。

肿瘤的侵袭转移是一个复杂的、多阶段的过程^[12]。内皮细胞构成了血管的内层,参与了血管生成的关键环节,是肿瘤治疗的重要靶点之一^[13]。血管生成与肿瘤细胞侵袭转移密切相关。肿瘤细胞生长必须依赖血管的生成来提供必要的营养物质和氧气^[14],此外,肿瘤细胞可分泌蛋白降解酶类(如 MMPs),降解细胞外基质(ECM)后形成肿瘤细胞移动的通道,肿瘤细胞穿透 ECM,并穿透血管壁的基底膜进入血液循环,从而实现远处转移^[15]。MMPs 作为目前已知能降解细胞外基质的重要酶类,在介导肿瘤血管新生、转移和侵袭等过程中发挥重要作用^[16]。本研究通过基因工程技术调控 tricellulin 的表达发现,过表达 tricellulin 可增强结直肠癌细胞 HCT116 的侵袭能力,并且其上清液可增加 HUVEC 细胞的侵袭能力,可能是通过增加 MMP2、MMP7 的表达来实现的。综上所述,结直肠癌细胞过表达 tricellulin 可能通过调控 MMP2、MMP7 的表达促进 HUVEC 细胞的侵袭能力。本研究为探索 tricellulin 调控结直肠癌侵袭转移提供了新的理论依据,但仍需更深入的探索。

4 结论

结直肠癌中过表达 tricellulin 可能通过 MMP2、MMP7 调控 HUVEC 细胞的侵袭能力,可能与肿瘤血管生成密切相关。Tricellulin 有望成为结直肠癌治疗的分子靶点。

参考文献

- [1] BROWN K G M, SOLOMON M J, MAHON K, et al. Management of colorectal cancer [J]. *British Medical Journal*, 2019, 366: l4561. DOI:10.1136/bmj.l4561.
- [2] IKENOUCHI J, FURUSE M, FURUSE K, et al. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2005, 171(6): 939-945.
- [3] KRUG S M, BOJARSKI C, FROMM A, et al. Tricellulin is regulated via interleukin-13-receptor $\alpha 2$, affects macromolecule uptake, and is decreased in ulcerative colitis [J]. *Mucosal Immunology*, 2018, 11(2): 345-356.
- [4] ZHANG J X, QIN M B, YE Z, et al. Association of tricellulin expression with poor colorectal cancer prognosis and metastasis [J]. *Oncology Reports*, 2020, 44(5): 2174-2184.
- [5] TAKASAWA A, MURATA M, TAKASAWA K, et al. Nuclear localization of tricellulin promotes the oncogenic property of pancreatic cancer [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 33582. DOI:10.1038/srep33582.
- [6] 李思漫, 张金秀, 朱晔, 等. 结直肠癌组织中 Tricellulin、LC3 和 Beclin1 的表达及意义 [J]. *山东医药*, 2018, 58(41): 1-5.
- [7] MESSERSMISTH W A. NCCN guidelines updates: Management of metastatic colorectal cancer [J]. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 2019, 17(5.5): 599-601.
- [8] GARCIA M A, NELSON W J, CHAVEZ N. Cell-cell junctions organize structural and signaling networks [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2018, 10(4): a029181. DOI:10.1101/cshperspect.a029181.
- [9] WU Z, SHI J, SONG Y, et al. Claudin-7 (CLDN7) is overexpressed in gastric cancer and promotes gastric cancer cell proliferation, invasion and maintains mesenchymal state [J]. *Neoplasma*, 2018, 65(3): 349-359.
- [10] ZHANG W N, LI W, WANG X L, et al. CLDN1 expression in cervical cancer cells is related to tumor invasion and metastasis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(52): 87449-87461.
- [11] CHENG B, RONG A M, ZHOU Q B, et al. CLDN8 promotes colorectal cancer cell proliferation, migration, and invasion by activating MAPK/ERK signaling [J]. *Cancer Management and Research*, 2019, 11: 3741-3751.
- [12] SUHAIL Y, CAIN M P, VANAJA K, et al. Systems biology of cancer metastasis [J]. *Cell Systems*, 2019, 9(2): 109-127.
- [13] VIALARD C, LARRIVEE B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: Alternative therapeutic targets [J]. *Angiogenesis*, 2017, 20(4): 409-426.
- [14] LUGANO R, RAMACHANDRAN M, DIMBERG A. Tumor angiogenesis: Causes, consequences, challenges and opportunities [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2020, 77(9): 1745-1770.
- [15] VANHARANTA S, MASSAGUE J. Origins of metastatic traits [J]. *Cancer Cell*, 2013, 24(4): 410-421.
- [16] WINER A, ADAMS S, MIGNATTI P. Matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy: Turning past failures into future successes [J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2018, 17(6): 1147-1155.

Overexpression of Tricellulin in Colorectal Cancer Cells Promotes Invasion and Metastasis of Human Umbilical Vein Endothelial Cells

PENG Peng, ZHANG Jinxiu, LI Mengshi, QIN Mengbin, SUN Juan, WU Qingru, CHENG Ruoxi, LIU Shiquan, HUANG Jie'an

(Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530007, China)

Abstract: The three-cell tight junction protein tricellulin is highly expressed in colorectal cancer tissues, and is associated with the poor prognosis of colorectal cancer. Angiogenesis is one of the important factors in tumor invasion and metastasis. Vascular endothelial cells play a decisive role in the process of angiogenesis. The study on the relationship between tricellulin and endothelial cells is of great significance to explore the mechanism of tumor invasion and metastasis. In this study, the differential expression of tricellulin in colorectal cancer cell lines and normal colon epithelial cell lines was observed by western blot. The expression of tricellulin in colorectal cancer cells HCT116 was regulated by genetic engineering technology, and the changes in the invasion ability of colorectal cancer cells before and after overexpression of tricellulin and the effect of supernatant on the invasion ability of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were detected by transwell chamber. The expression changes of MMP2 and MMP7 before and after overexpression of tricellulin were detected by ELISA. The results showed that overexpression of tricellulin could enhance the invasion ability of HCT116 cells, and its supernatant could enhance the invasive ability of HUVEC cells. Overexpression of tricellulin could increase the expression of MMP2 and MMP7. It indicated that the overexpression of tricellulin in human colorectal cancer cells could promote the invasion and migration ability of colorectal cancer cells, and regulate the invasion and metastasis of HUVEC cells by affecting the expression of MMP2 and MMP7.

Key words: colorectal cancer; tricellulin; HUVEC; angiogenesis; invasion and metastasis

责任编辑: 陆媛峰



微信公众号投稿更便捷

联系电话: 0771-2503923

邮箱: gxxk@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxxk.ijournal.cn/gxxk/ch>