

敲除 TSPAN1 抑制人结肠癌细胞的生长和侵袭

邢娜娜 张慧慧 谢佳琪 张泽延 杜润蕾 张晓东

摘要 **目的** TSPAN1 能够影响人结直肠癌细胞的增殖、扩散和侵袭。**方法** 用腺病毒同源重组的方法建立 TSPAN1 缺失的人结直肠癌 HCT116 细胞系, CCK-8、克隆形成、划痕和 Transwell 实验分别检测缺失 TSPAN1 的细胞生长速率、成瘤、迁移和侵袭能力。裸鼠成瘤实验检测 TSPAN1 对肿瘤扩散的影响。双荧光素酶实验验证 TSPAN1 对雌激素受体和 TGF- β 受体活性的影响。**结果** 缺失 TSPAN1 的 HCT116 细胞的生长速率、成瘤、迁移和侵袭能力显著降低。在裸鼠中分别注射野生型和缺失 TSPAN1 的 HCT116 细胞, 后者肿瘤扩散变慢, 并且裸鼠的成活率提高。过表达 TSPAN1 能够激活雌激素受体和 TGF- β 受体。**结论** TSPAN1 可能通过雌激素受体和 TGF- β 受体通路来调节细胞增殖和侵袭过程, 并且为治疗结直肠癌提供了潜在的新靶标。

关键词 TSPAN1 结直肠癌 迁移 侵袭 TGF- β

中图分类号 R73 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.01.008

Knockout of TSPAN1 Inhibits Tumor Growth and Metastasis of Human Colon Cancer. Xing Nana, Zhang Huihui, Xie Jiaqi, et al. *College of Life Sciences, Wuhan University, Hubei 430072, China*

Abstract **Objective** TSPAN1 affects human colon tumor cells on proliferation, migration and invasion. **Methods** We established a TSPAN1-deficient HCT116 cell line by adenovirus homologous recombination. Then we used CCK-8, colony formation, wound healing and Transwell assays to detect the rate of cell proliferation and the ability of tumor formation, migration and invasion of TSPAN1-deficient cells. With nude mouse tumorigenicity assay, we also tested the effect of TSPAN1 on the spread of tumor. Dual luciferase experiment validated that TSPAN1 effected the activity of estrogen receptor and TGF- β receptors. **Results** The rate of cell proliferation and the ability of tumor formation, migration and invasion were significantly reduced in TSPAN1-deficient cells. We also injected HCT116 and TSPAN1-deficient HCT116 cells into athymic nude mice via the tail vein, and found a dramatic reduction of tumor cell migration. Mice injected with TSPAN1-deficient cells showed prolonged survival. Overexpression of TSPAN1 could active estrogen receptor and transforming growth factor- β receptor. **Conclusion** TSPAN1 might regulate cell migration and invasion through these pathways. Thus, we suggest that TSPAN1 may be a novel therapeutic target for colon cancer treatment.

Key words TSPAN1; Colon cancer; Migration; Invasion; TGF- β

结直肠癌是世界上病死率第 4 高的癌症^[1-3]。癌症难以治愈的重要因素之一是癌细胞具有迁移能力, 能够在机体内扩散。细胞迁移在肿瘤分布、组织侵袭和扩散过程中具有重要的作用^[4]。研究表明某些基因以及其产物与肿瘤形成有关^[5,6]。但是, 肿瘤发生过程中纷繁复杂的分子机制目前仍有待深入研究。tetraspanins 是典型的具有 4 个跨膜区域的一类蛋白, 4 个跨膜结构域之间有 2 个细胞外环和 1 个细胞内小环, 一个细胞内大环^[7]。tetraspanins 家族蛋白参与诸如细胞周期、增殖、迁移、侵袭和凋亡的许多生理过程^[8-12]。目前为止, 研究已发现存在 26 个人源

tetraspanins 蛋白, 包括白细胞分化抗原 CD9、CD37、CD53、CD63、CD81/TAPA-1、CD82 和 CD151。其中 CD9、CD63 与细胞迁移有关^[13,14]。但是 tetraspanins 影响细胞迁移的具体机制仍不明确。TSPAN1 基因是 tetraspanins 家族的一员, 编码有 241 个氨基酸的蛋白, 先前的研究表明其是与肿瘤相关的基因^[7,9,11]。对 TSPAN1 蛋白的早期研究揭示其过量表达与包括肝癌、胃癌和前列腺癌在内的许多癌症有关^[9-17]。但是, TSPAN1 在结直肠癌中的功能尚未明确。本研究发现, TSPAN1 敲除的 HCT116 细胞系, 不论是在体外还是体内条件下, 其细胞迁移和侵袭能力较之野生型 HCT116 显著降低。

材料与方法

1. 材料: 人结肠癌细胞 HCT116 用 McCoy's 5A medium (AppliChem, Darmstadt, Germany) 10% 胎牛

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81270306, 30971499)

作者单位: 430072 武汉大学生命科学院

通讯作者: 张晓东, 电子信箱: zhangxd@whu.edu.cn

血清 (HyClone) 和青霉素 - 链霉素双抗 (Gibco 公司), 于 37℃、5% CO₂ 孵箱培养。Anti - TSPAN1 抗体购自于 Abnova 公司, GAPDH 抗体购自于 CWBIO 公司。

2. 方法: (1) 转染: 转染试剂为 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司)。根据说明书, Lipofectamine 2000 和 DNA 在无血清的 DMEM 培养基中混匀。转染时细胞密度 40% ~ 80%, 转染后 4 ~ 6h 更换新鲜培养基。(2) RT - PCR: 在野生型 HCT116 和缺失 TSPAN1 的 HCT116 细胞中提取总 RNA。用 first - strand cDNA synthesis kit (Roche 公司) 以 1 μg RNA 为模板合成 cDNA。引物: TSPAN1, 正向引物 5' - TGCAGTGCTTCAGCTTCATT - 3', 反向引物 5' - CAA - GAGCAAAGACCACAACG - 3'; β - actin, 正向引物 5' - ACTGTGCCCATCTACGAGGG - 3', 反向引物 5' - GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC - 3'。(3) 细胞增殖能力检测: 使用 Cell Counting Kit - 8 (CCK - 8, 日本) 检测细胞活力。在 96 孔板的每个孔中接种 1×10^4 个细胞。培养 24h 之后更换含有 10% CCK - 8 的新鲜培养基 100 μl, 继续培养 1h。用酶标仪在 450nm 激发光下检测吸光值。每个实验做 3 个复孔。(4) 平板克隆形成: 按照先前研究试验方法进行平板克隆形成实验是以测细胞的生长速率^[18]。在 6 孔板中分别接种野生型和敲除 TSPAN1 的 HCT116 (4×10^2) 细胞。培养 10 天之后用结晶紫染色并拍照计数, 每个实验设置 3 个复孔。(5) 免疫印迹: 用免疫印迹检测 TSPAN1 蛋白的表达。细胞在 6 孔板中生长到密度为 80% 左右, 用 1% SDS 裂解液裂解细胞, 95℃ 加热 10min, 离心收集上清并用 BCA protein assay kit (Thermo 公司) 检测蛋白浓度。样品 (60 μg) 进行 SDS - PAGE 电泳。电泳结束后将蛋白转移到 PVDF 膜, 用 5% 脱脂牛奶封闭, 于 4℃ 孵育一抗过夜。用 TBST 洗 3 次每次 5min, 室温孵育偶联 HRP 的二抗 1h, 用 TBST 洗 3 次每次 5min。化学发光剂显影。(6) 侵袭实验: 体外侵袭实验使用 Transwell (Costar 公司)。将含有 2.5×10^4 个细胞的 250 μl 无血清 McCoy's 5A 培养基加入 Transwell 上小室, 完全培养基加入下小室。细胞培养 24h 后以 4% 多聚甲醛固定并用结晶紫染色。上小室的细胞会迁移, 在显微镜下计数迁移的细胞。每个实验做 3 个复孔。(7) 划痕实验: 细胞接种在 6 孔板中并当细胞铺满时, 用 10 μl 无菌枪头在培养细胞的培养皿中划 3 条分开的划痕, 用 PBS 轻轻洗去细胞并加培养基在孵箱培养细胞。用显微镜在

同个划痕区域拍照, 连拍 6 天。(8) 体内实验: 体内实验用 8 周龄的雌性裸鼠, 每组 7 只, 每只注射 0.25ml 含 1×10^6 个细胞的 PBS。(9) 双荧光素酶报告基因实验: 将 HEK293 细胞接种于 24 孔板, 待细胞生长到密度为 40% ~ 80% 时转染。10ng pRL - TK 和报告基因质粒、TSPAN1 表达质粒各 100ng。细胞培养 24h 后用 $1 \times$ luciferase 裂解液裂解细胞, 荧光值用双荧光素酶实验试剂盒检测 (Promega 公司)。

结 果

1. TSPAN1 敲除细胞系的建立: 本实验用腺病毒重组的方法成功敲除了 TSPAN1 第 2 个外显子的 14 个碱基, 并且在蛋白水平进行验证 (图 1A)。HCT116 细胞感染包装病毒并测序的方法参照先前的报道^[19]。图 1B 显示不同缺失 PCR 之后的条带大小。因为 LoxP 序列和其他载体序列都是 100bp, 而要插入的序列 PCR 产物大约也是 100bp。为了进一步验证成功敲除 TSPAN1, 笔者用 RT - PCR 检测 mRNA 水平 (图 1C), 结果与 PCR 测序一致。另外, 笔者用免疫印迹的方法检测 TSPAN1 蛋白表达情况 (图 1D)。以上实验结果均表明, 在结肠癌细胞中成功敲除 TSPAN1 基因。

2. TSPAN1 影响细胞生长和克隆形成: 已有的研究表明, tetraspanin 家族的蛋白调节细胞增殖和迁移。使用 RNA 干扰降低 TSPAN1 表达水平能够抑制皮肤鳞状细胞癌细胞的生长和渗透^[16]。本实验用 CCK8 检测正常的和 TSPAN1 缺失的细胞分别对细胞增殖能力的影响。如图 2A 所示, 缺失 TSPAN1 的细胞生长速度比正常细胞慢, 并且其中 1 个缺失克隆几乎停止生长。为了进一步说明 TSPAN1 影响细胞活力, 笔者进行了平板克隆形成实验以检测细胞的生长。敲除 TSPAN1 的两种细胞形成的克隆数与野生型细胞相比明显减少 (图 2B)。这些研究结果表明, TSPAN1 的缺失在体外抑制了 HCT116 细胞生长。

3. TSPAN1 在体外实验中影响 HCT116 细胞的迁移和侵袭: 先前报道指出 tetraspanins 家族蛋白与细胞迁移调控相关。为了检测 TSPAN1 是否也具有这一生理特性, 笔者进行了划痕实验和 Transwell 实验。通过划痕实验笔者发现 TSPAN1 缺失的细胞迁移速度相较于野生型 HCT116 细胞迁移要慢 (图 3A)。Transwell 实验也得出相应结论, TSPAN1 缺失的细胞侵袭速度约为野生型 HCT116 细胞的一半 (图 3B)。此结果说明了 TSPAN1 调节细胞的迁移和侵袭。

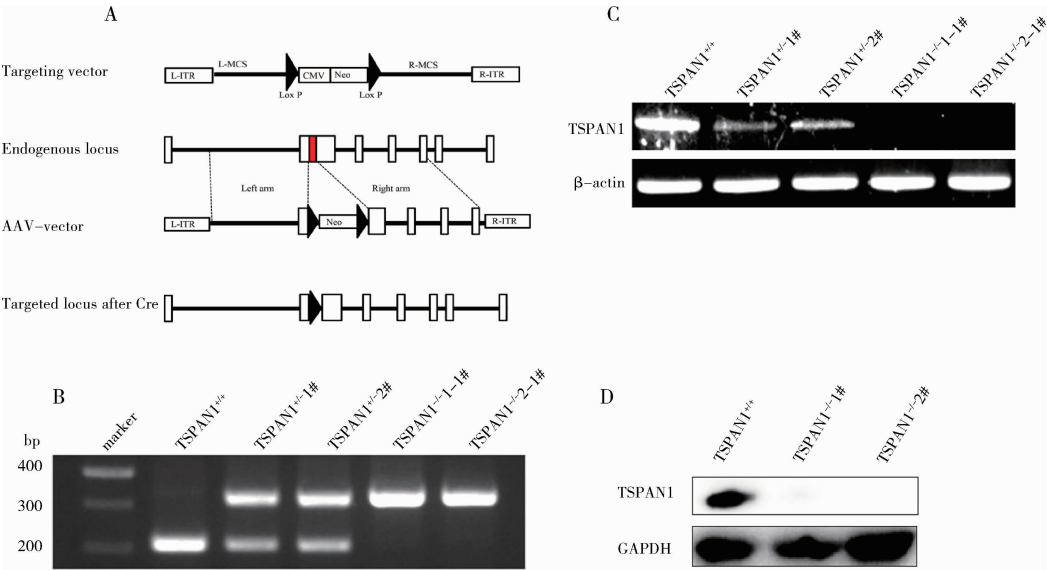


图 1 建立 TSPAN1 敲除细胞系

A. 同源重组左、右臂的构建 (rAAV - Neo - Lox P KO 质粒), 并用表达 Cre 重组酶的腺病毒感染细胞切除新霉素抗性基因; B. PCR 测序检验阳性克隆。TSPAN1^{+/+} 是野生型 HCT116 细胞, TSPAN1^{+/-} 是杂合细胞, TSPAN1^{-/-} 是纯合细胞; C. RT - PCR 检测野生型和敲除 TSPAN1 的细胞中 TSPAN1 的 mRNA 的表达; D. Western blot 法验证野生型和敲除细胞系的蛋白表达

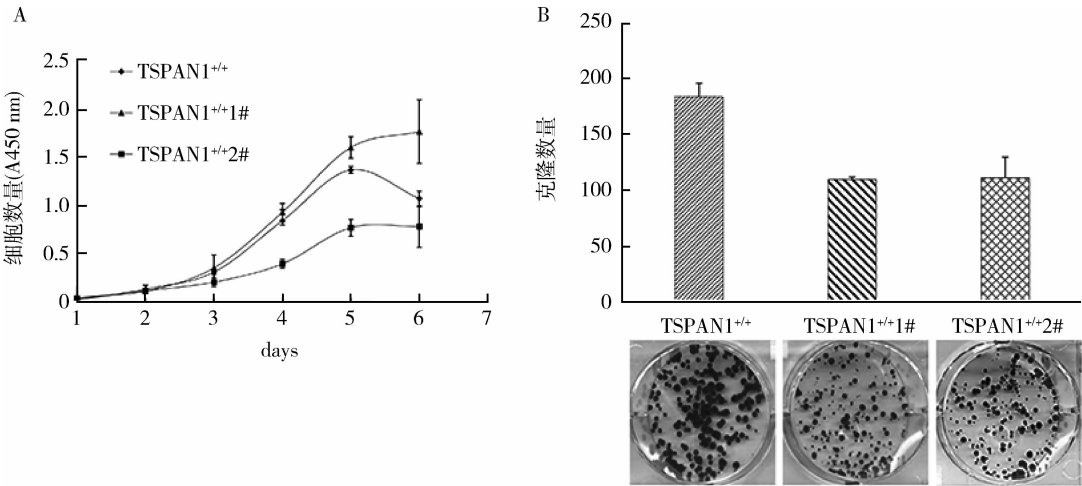


图 2 TSPAN1 影响细胞生长和克隆形成

A. CCK - 8 测细胞的生长曲线。野生型和 TSPAN1 敲除的 HCT116 细胞 (1 × 10⁴) 接种于 96 孔板, 从第 2 天开始用 CCK - 8 测的吸光度, 连续测量 6 天; B. 克隆形成实验。野生型和 TSPAN1 敲除的 HCT116 细胞 (1 × 10⁴) 接种于 6 孔板内, 用结晶紫染色并计数。所有实验做 3 个复孔

4. TSPAN1 在体内实验中影响肿瘤扩散: 为了进一步研究 TSPAN1 对体内细胞迁移的影响, 笔者向裸鼠体内分别注射 TSPAN1 敲除和野生型 HCT116 细胞。实验数据显示, 注射 TSPAN1 缺失细胞的裸鼠相比注射野生型 HCT116 细胞的裸鼠存活时间更长且肿瘤扩散速度显著下降 (图 4A)。2 个月之后, 注射野生型 HCT116 的裸鼠 4/7 体内有肿瘤形成, 成瘤裸鼠中有两只癌细胞扩散至头部并最终死亡。不同的

是, 注射 TSPAN1 敲除细胞的裸鼠只有 1/7 体内生成肿瘤 (图 4B), 并且在肛门成瘤。在实验阶段没有裸鼠死亡。上述实验数据证明 TSPAN1 的缺失可以降低体内癌细胞的扩散和侵袭。

5. TSPAN1 调节细胞迁移和侵袭的机制: 笔者的实验结果显示 TSPAN1 在结肠癌细胞的迁移和侵袭中扮演着重要的作用。因此, 笔者想了解 TSPAN1 调节细胞迁移和侵袭过程的具体分子机制。已经有报

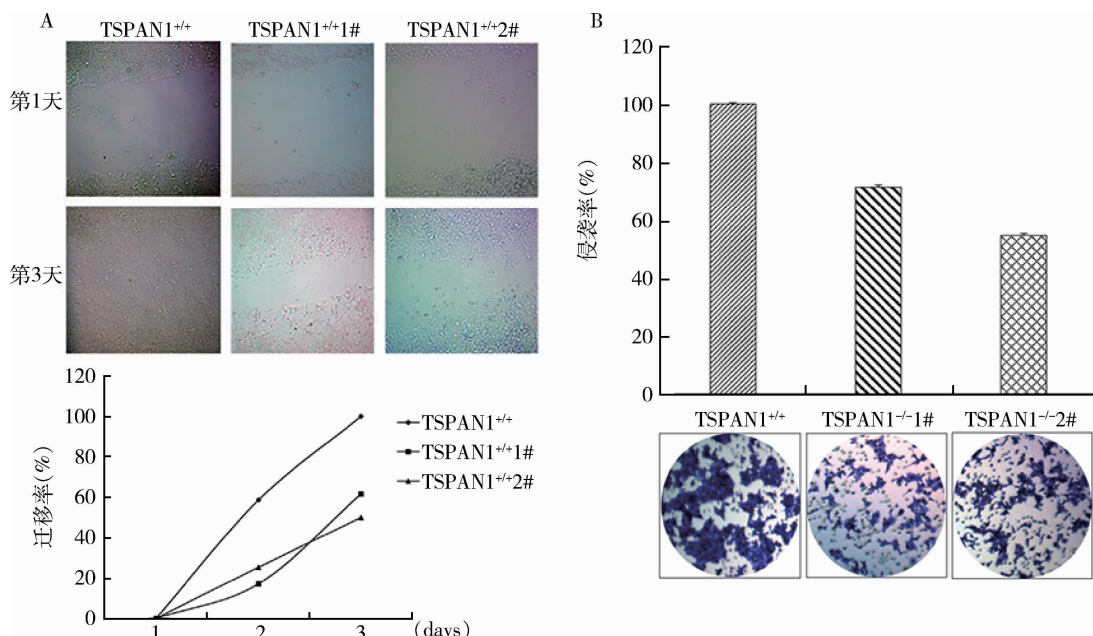


图3 TSPAN1 体外影响 HCT116 细胞的迁移和侵袭

A. 划痕实验; B. Transwell 实验

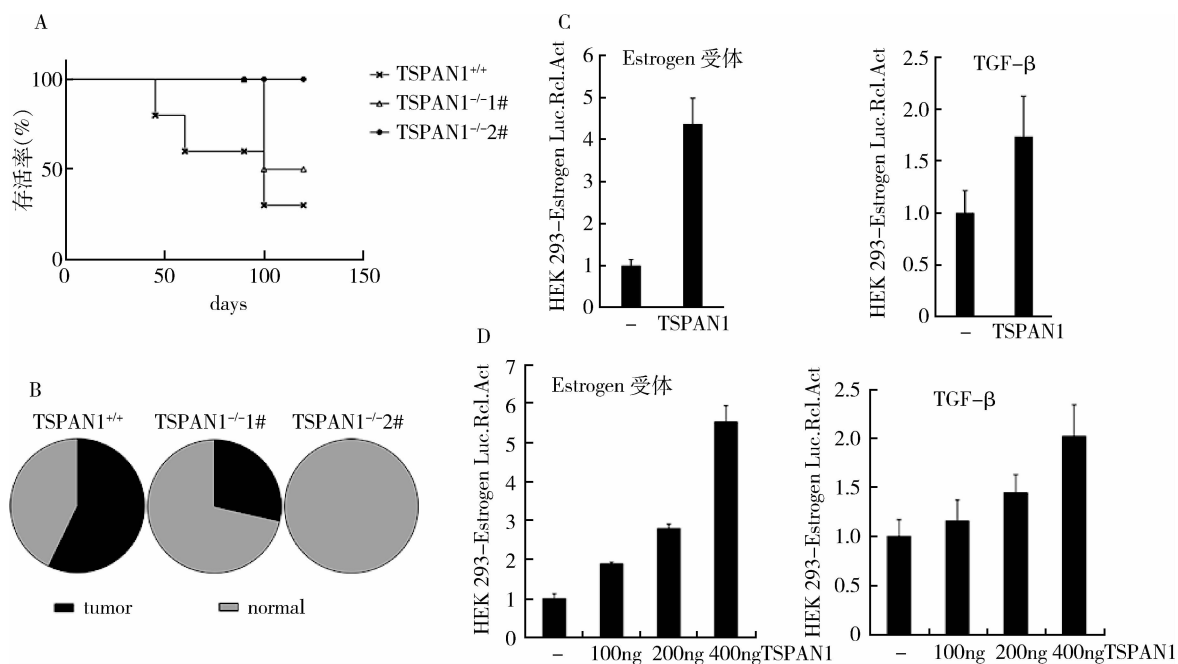


图4 TSPAN1 体内影响肿瘤扩散和侵袭

TSPAN1 敲除和野生型 HCT116 细胞 (1×10^6) 注射到裸鼠体内。A. 裸鼠存活率; B. 肿瘤生长;

C. 过表达激活雌激素受体和 TGF-β 通路; D. 激活是剂量依赖的

道称 TSPAN1 的过量表达, 会激活雌激素受体和 TGF-β 受体 (图 4C), 并且这种激活是 TSPAN1 剂量依赖 (图 4D)。所以笔者猜想 TSPAN1 可能是通过参与这两条信号通路从而调节细胞迁移和侵袭过程, 这有待进一步研究证实。

讨 论

结直肠癌是最常见的癌症之一, 随着生命科学研究发展及人类生活水平的提高, 结肠癌的预防和治疗在近些年来受到了更多的关注^[3]。细胞迁移对肿瘤细胞的扩散分布有着重要的作用。tetraspanins 家族

中的一些蛋白,如 CD82、CO-029 和 CD81 参与了有机体很多的生理过程,因而受到了越来越多的关注^[20]。有报道指出,在皮肤癌中,TSPAN1 与细胞的增殖和迁移有关^[16]。因此,TSPAN1 可能在结直肠癌影响了细胞的增殖和迁移。为了验证这一假设,笔者建立了 TSPAN1 缺失的 HCT116 细胞系。

在本次研究中,笔者采用 CCK8 和克隆形成的实验方法检测野生型和缺失 TSPAN1 细胞的增殖速度。敲除 TSPAN1 抑制 HCT116 细胞的增殖。此外笔者用划痕实验和 Transwell 实验检测肿瘤细胞的迁移和侵袭情况。结果表明,敲除 TSPAN1 之后,HCT116 细胞的迁移和侵袭能力明显下降。所以实验结果显示,在结肠癌中,TSPAN1 在细胞增殖、迁移和侵袭过程中发挥着至关重要的作用。为进一步扩展验证体外结果,笔者还进行了体内实验。与上述结果一致的是,注射 TSPAN1 敲除细胞的裸鼠壁注射野生型 HCT116 细胞的裸鼠存活时间更长,而且肿瘤扩散显著减少。

TGF- β 信号通路参与很多细胞过程包括细胞增殖、迁移和侵袭。为了探索 TSPAN1 是否影响 TGF- β 通路,笔者进行了双荧光素酶报告基因实验。结果表明,过表达 TSPAN1 可以激活 TGF- β 通路;同时还发现 TSPAN1 的过量表达也能激活雌激素受体通路。然而这一机制仍有待深入研究。综上所述,TSPAN1 在 HCT116 细胞增殖、迁移和侵袭过程中发挥了相当重要的作用,并且有望成为结直肠癌治疗的新分子靶标。

参考文献

- Bertuccio P, Chatenoud L, La Vecchia C, *et al.* Recent patterns in gastric cancer: a global overview[J]. *Int J Cancer*, 2009, 125 (3): 666-673
- Liu Y, Arai A, Tamashiro H, *et al.* Trends of gender gaps in life expectancy in Japan, 1947-2010: associations with gender mortality ratio and a social development index[J]. *Geriatr Gerontol Int*, 2012, 13(3):792-797
- Kan WLT, Yin C, Lin G, *et al.* Antitumor effects of novel compound, guttiferone K, on colon cancer by p21Waf1/Cip1-mediated G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis[J]. *Int J Cancer*, 2013, 132 (3): 707-716
- Seiki M. The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2002, 14(5): 624-632
- Bolós V, Peinado H, Cano A, *et al.* The transcription factor Slug re-

- presses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with snail and E47 repressors[J]. *J Cell Sci*, 2003, 116 (Pt):499-511
- Hartwell KA, Muir B, Weinberg RA, *et al.* The Spemann organizer gene, Goosecoid, promotes tumor metastasis[J]. *Proc Nat Acad Sci*, 2006, 103 (50): 18969-18974
- Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58 (9): 1189-1205
- Chen L, Li X, Zhu J, *et al.* Clinicopathological significance of over-expression of TSPAN1, Ki67 and CD34 in gastric carcinoma[J]. *Tumori*, 2008, 94 (4): 531-538
- Chen L, Wang Z, Zhu J, *et al.* Association of NET-1 gene expression with human hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Surg Pathol*, 2007, 15 (4): 346-353
- Maecker HT, Todd SC, Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators[J]. *FASEB J*, 1997, 11 (6): 428-442
- Richardson MM, Jennings LK, Zhang XA. Tetraspanins and tumor progression[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2011, 28(3): 261-270
- Zhang F, Kotha J, Jennings L. K, *et al.* Tetraspanins and vascular functions[J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 83(1): 7-15
- Miyake M, Koyama M, Seno M, *et al.* Identification of the motility-related protein (MRP-1), recognized by monoclonal antibody M31-15, which inhibits cell motility[J]. *J Exp Med*, 1991, 174 (6): 1347-1354
- Radford KJ, Thorne RF, Hersey P. Regulation of tumor cell motility and migration by CD63 in a human melanoma cell line[J]. *J Immunol*, 1997, 158 (7): 3353-3358
- Chen L, Li X, Zhu J, *et al.* Clinicopathological significance of over-expression of TSPAN1, K167 and CD34 in gastric carcinoma[J]. *Tumori*, 2008, 94 (4): 531-538
- Chen L, Zhu Y, Zhu J, *et al.* Knockdown of TSPAN1 by RNA silencing and antisense technique inhibits proliferation and infiltration of human skin squamous carcinoma cells[J]. *Tumori*, 2010, 96 (2): 289-295
- Chen L, Zhu YY, Zhu JW, *et al.* TSPAN1 protein expression: a significant prognostic indicator for patients with colorectal adenocarcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15 (18): 2270-2276
- Li SZ, Zhang HH, Zhang XD, *et al.* ALLN hinders HCT116 tumor growth through Bax-dependent apoptosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 437 (2):325-330
- Zhang X, Guo C, Wang Z, *et al.* Epitope tagging of endogenous proteins for genome-wide ChIP-chip studies[J]. *Nat Methods*, 2008, 5 (2): 163-165
- Guo Q, Xia B, Zhang XA, *et al.* Tetraspanin CO-029 inhibits colorectal cancer cell movement by deregulating cell-matrix and cell-cell adhesions[J]. *PLoS One*, 2012, 7 (6): e38464

(收稿日期:2015-06-01)

(修回日期:2015-07-07)