

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.04.005

• 基础研究 •

外源性AES对结直肠癌细胞恶性生物学行为的影响

陈柳¹, 陈亮², 李荣惠¹, 夏洪伟², 唐秋琳², 毕锋^{1,2}**Effect of Exogenous AES on Malignant Behaviors of Colorectal Cancer Cells**CHEN Liu¹, CHEN Liang², LI Ronghui¹, XIA Hongwei², TANG Qiulin², BI Feng^{1,2}

1.Department of Abdominal Tumor, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China, 2.Department of Signal Transduction and Molecular Target Therapy of State Key Laboratory of Biotherapy

Corresponding Author: BI Feng, E-mail: bifeng@medmail.com.cn

Abstract: Objective To study the influence of amino-terminal enhancer of split(AES) on malignant behaviors of colorectal cancer(CRC). **Methods** LoVo has a lower expression of AES than other CRC cell lines conserved by our laboratory. The pEGFP-aes construct was transfected into LoVo cells by lipofectamineTM2000 (pEGFP-AES). Cell Counting Kit-8 was applied to analyze cell proliferation. The cell invasion and migration abilities were examined by Transwell assay and wound healing assay respectively. **Results** Contrast to pEGFP-N1(transfect pEGFP-N1 into LoVo cells), AES can significantly repress cancer cells invasion and migration($P<0.05$), but had no influence in cell growth and proliferation. **Conclusion** AES effects CRC's malignancy by repressing its invasion and migration.

Key words: Amino-terminal enhancer of split(AES); Colorectal cancer; Invasion; Migration

摘要: 目的 研究外源性AES(amino-terminal enhancer of split)对结直肠癌(colorectal cancer, CRC)细胞增殖、侵袭及迁移能力的影响。 **方法** 将构建好的pEGFP-aes载体转染入AES表达相对较低的CRC细胞系LoVo(pEGFP-AES)细胞, Cell Counting Kit-8(CCK-8)检测细胞增殖活力; 划痕实验检测细胞迁移能力; Transwell检测 AES 对细胞侵袭能力。 **结果** pEGFP-N1组(转染空载质粒pEGFP-N1的LoVo)AES可显著抑制LoVo的侵袭和迁移能力($P<0.05$), 但不影响LoVo的生长及细胞增殖。 **结论** AES主要通过抑制侵袭迁移能力影响CRC恶性表型。

关键词: 分裂的氨基末端增强子(AES); 结直肠癌; 侵袭; 迁移**中图分类号:** R73-37; R735.3⁺5 **文献标识码:** A

0 引言

肿瘤复发或转移是结直肠癌患者死亡的主要原因。肿瘤转移过程包括一系列步骤: 局部浸润、进入循环系统管腔、转运、外渗、定居、生长^[1]。因此肿瘤转移的分子机制及预防转移的靶点成为当前研究热点。

转录调控因子TLE/GRG家族是一类无DNA结合位点, 但能与转录因子结合调控下游基因蛋白表达的转录调节蛋白^[2]。TLE/GRG家族根据表达的蛋白分子量大小可分为两类: 一类为TLE1-4/

GRG1-4, 另一类为AES/GRG5。目前研究发现AES在眼睛^[3]、骨骼^[4]、腹侧神经管等发育^[5]过程中起重要作用。也有报道结直肠癌原发灶AES表达较高, 而肝脏转移灶中表达缺失, 且可能是通过活化NOTCH通路实现肿瘤转移^[6]。以上研究表明AES可能参与肿瘤的发生发展, 但遗憾的是AES在肿瘤中的研究甚少。本研究检测了CRC细胞系中AES表达情况, 并将外源性AES质粒转染表达较低的LoVo细胞系, 观察其对CRC细胞系增殖、侵袭、迁移能力的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人CRC细胞系LoVo、Colo320、sw480、sw620、sw1116、人胚胎肾HEK293、质粒pEGFP-N1为本实验室保存。细胞培养液RPMI-1640、小牛血清、转染试剂 LipofectamineTM2000、Opti-MEM购于

收稿日期: 2012-12-20; 修回日期: 2013-04-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81071640)

作者单位: 1. 610041成都, 四川大学华西医院腹部肿瘤科, 2. 生物治疗国家重点实验室 信号转导及分子靶向治疗研究室

通信作者: 毕锋, E-mail: bifeng@medmail.com.cn

作者简介: 陈柳(1987-), 女, 硕士, 住院医师, 主要从事信号转导及分子靶向治疗相关研究

Invitrogen 公司, 兔抗人AES抗体购于 Sigma 公司, 鼠抗人 α -tubulin抗体购于博士德公司, CCK-8 试剂盒购于Dojindo公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒的构建和细胞转染 通过premier 5.0设计aes(NM_001130)上游引物Hind III 5'-CC CAAGCTTCCGCGATTGACATGAT-3'、下游引物Kpn I 5'-GGGGTACCGTATCCGACTTCT CGCCAT-3', 扩增aes片段, 双酶切目的片段和载体, 连到pEGFP-N1, 酶切、测序验证。通过lipofectamine™2000 分别将 pEGFP-N1和pEGFP-aes转入CRC细胞系LoVo, 实验分两组: pEGFP-N1组和pEGFP-AES组。

1.2.2 RT-PCR检测aes mRNA的表达 设计aes上游引物: 5'-CACCAGGAGGATGATGGCGAG-3', 下游引物: 5'-GGCGTGGAGGTGTCTGGAACTA-3', 扩增产物为 560 bp。内参GADPH上游引物序列: 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTG-3', 下游引物序列: 5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'。Trizol试剂提取待测细胞的总 RNA, 反转录后进行半定量 PCR 扩增: 95℃ 3 min; 95℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环, 72℃ 5 min。琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.3 Western blot检测AES的表达 收集对数期待测细胞, RIPA裂解液重悬细胞超声破碎后, 13 400g, 4℃, 离心15 min。BCA法测定蛋白浓度。取蛋白样品40 μ g, 进行12% SDS-PAGE; 260 mA横流, 湿转90 min至PVDF膜, 5%脱脂奶粉封闭 2 h, 一抗 4℃过夜, PBS 洗涤3次, 二抗避光温育, 摇床 2 h, TBST 洗涤 2次, 以 Odyssey红外激发扫描成像系统扫描成像结果。

1.2.4 细胞增殖能力检测实验 以每孔 1×10^3 细胞接种于96孔板中, lipofectamine™2000 转染, 每天每组 3 孔, 每孔避光加 10 μ l CCK-8, 37℃培养箱温育2~4 h, Micro-ELISA仪读取光密度, 490 nm波长, 测定各孔吸光值(A), 连续 5天, 记录结果。实验重复 3次。

1.2.5 细胞迁移能力检测实验 以每孔 2×10^5 细胞接种于6孔板中, lipofectamine™2000转染pEGFP-N1和pEGFP-aes, 用移液枪头分别在培养板底部呈一字形划痕单层培养细胞, 每天镜下记录划痕区的迁移情况, 软件分析划痕区的相对距离, 并计算其相对迁移率: (d0记录的相对距离-d3记录的相对距离) \div d0记录的相对距离 \times 100%。实验重复 3次。(注: 划痕单层培养细胞

时间为d0, 划痕单层培养细胞后24小时d1, 以此类推。)

1.2.6 细胞侵袭能力检测实验 将 BD 悬浮细胞培养小室置入 24 孔板中, 将 BD 基底膜基质胶按 1:3 的比例用无血清培养液稀释, 取 35 μ l 铺入小室底层, 37℃放置 2 h使其凝固; 收集转染 48 h的细胞, 无血清培养液重悬, 将 2×10^5 细胞250 μ l加入小室, 下层培养板中加入700 μ l含20%小牛血清的RIPM 1640培养液。培养 48 h后用棉签拭去小室上层细胞, HE染色, 显微镜下观察侵袭的细胞数目, 计数15个视野细胞数。实验重复3次。

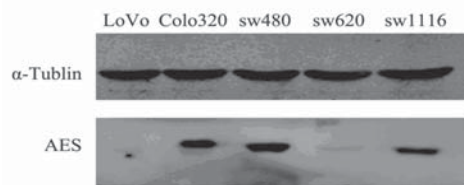
1.3 统计学方法

所有数据采用SPSS 18.0统计软件分析, 样本间均数比较采用独立样本 *t*检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AES在不同结直肠癌细胞系中的表达情况

Western blot表明AES在LoVo、sw620细胞中表达较低, 而在Colo320、sw480、sw116细胞中表达较高, 见图1。故选择LoVo作为靶细胞进行下一步相关生物学行为的研究。



AES: amino-terminal enhancer of split; CRC: colorectal cancer

图1 CRC 细胞系LoVo、Colo320、sw480、sw620、sw1116中AES表达差异

Figure1 The differential expression levels of AES in CRC cell line LoVo, Colo320, sw480, sw620 and sw1116

2.2 pEGFP-aes重组表达载体的构建、鉴定

从HEK293中提取总RNA, PCR扩增aes目的片段。构建pEGFP-aes载体, 用限制性内切酶Hind III 和 Kpn I 酶切, 电泳可见 593 bp的aes编码片段, 见图2。

2.3 外源性pEGFP-AES转染鉴定

RT-PCR、Western blot检测LoVo对照、pEGFP-N1、pEGFP-AES三组中外源性AES表达情况。图3A中可见pEGFR-AES组反转录后可扩增出AES目的片段。图3B中显示, 三组皆有内源性AES表达; 但与前两组比较, pEGFP-AES组表达外源性pEGFP-AES融合蛋白。

2.4 AES对CRC细胞系LoVo的增殖的影响

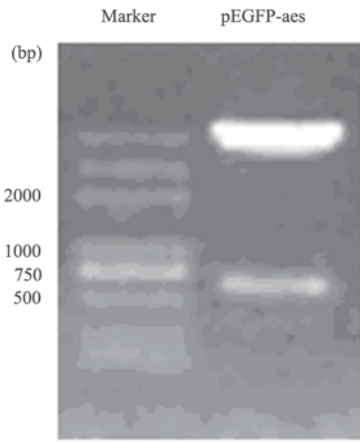
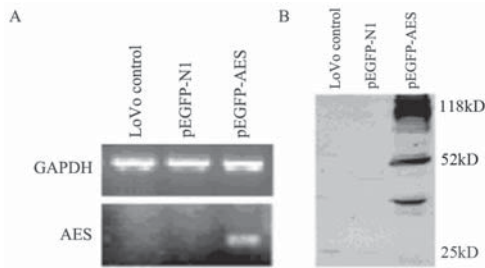


图2 pEGFP-aes重组质粒酶切鉴定图

Figure2 Restrictive enzyme digestion analysis of constructed vector pEGFP-aes



A:mRNA level; B:protein level

图3 LoVo中外源性pEGFP-aes在RNA及蛋白水平表达

Figure3 mRNA and protein level of exogenous pEGFP-aes expression in LoVo

将 pEGFP-N1、pEGFP-AES分别转染LoVo后，CCK-8 检测细胞增殖活性，pEGFP-AES与LoVo 对照组、pEGFP-N1的增殖活性差异并无统计学意义，见图4。

2.5 AES对CRC细胞系LoVo侵袭能力的影响

与LoVo 对照组、pEGFP-N1组比较，pEGFP-AES组中穿过transwell小室基质胶的细胞数目明显减少 ($P<0.05$)，说明转染aes的LoVo细胞穿过基质胶的能力减弱，可见AES可显著抑制结直肠癌细胞LoVo的侵袭能力，见图5。

2.6 AES对CRC细胞系LoVo迁移能力的影响

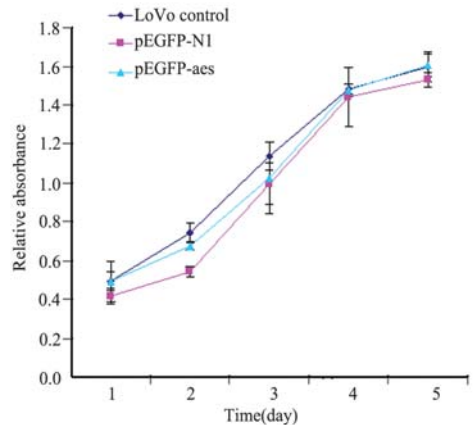


图4 AES对CRC细胞LoVo增殖能力的影响

Figure4 The effect of AES on the proliferation of CRC cells LoVo

分别以各组第1天的划痕距离为基准，pEGFP-aes组第2天未见明显变化，而LoVo对照组、pEGFP-N1组第2天的划痕距离明显变窄 ($P<0.05$)，且随着时间延长，该差异愈加明显。图6显示，第3天时，pEGFP-AES组划痕距离是第1天划痕距离的94%~98% (LoVo control组40%，pEGFP-N1组76%)。可见AES可明显抑制CRC细胞LoVo的迁移能力。

3 讨论

本研究发现外源性的AES在结直肠癌细胞的侵袭、迁移过程中发挥抑制作用。众所周知，AES在发育过程中扮演着重要的负性调节作用。首先，研究发现GRG5活性的缺失能够明显抑制Runx2+/-GRG5-/-小鼠体内颅缝和凶门的骨化，并造成严重的长骨生长缺陷^[7]。AES/GRG5还可能通过Tcf4和Lef1调节出生后的骨生长^[8]。通过GST Pulldown和酵母双杂交实验Zhu等^[9]发现Six3和Six6需与AES结合从而发挥转录抑制作用；过表达Six3的鸡胚则影响晶状体的发育。AES也可促进神经细胞凋亡^[10]，介导神经管内神经细胞形态的退化^[5]。

近年来有观点指出AES也是一个肿瘤转移抑

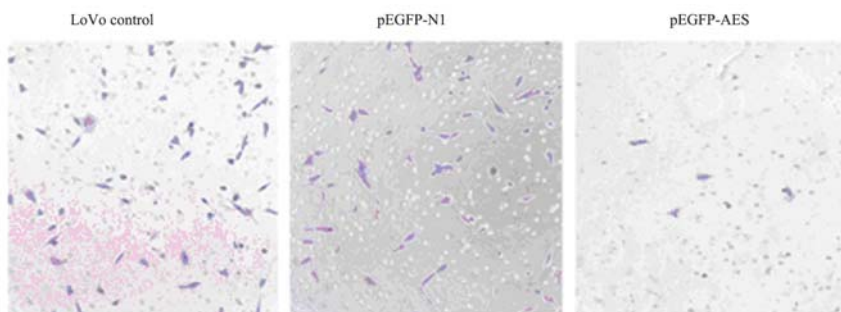


图5 AES对CRC细胞LoVo的侵袭能力的影响 (×200)

Figure5 The effect of AES on the invasion of CRC cells LoVo (×200)

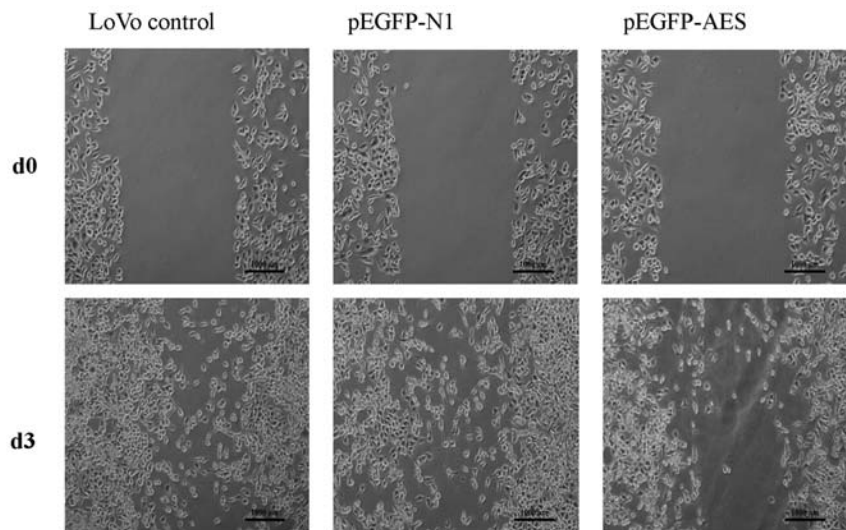


图6 AES对CRC细胞系LoVo迁移能力的影响 (×100)

Figure6 The effect of AES on the migration of CRC cells LoVo (×100)

制因子。本实验在体外证明外源性AES表达增高可抑制肿瘤的侵袭、转移。Jan等^[11]以宫颈癌细胞系HeLa为研究对象,发现线粒体蛋白Bit1可与AES结合形成功能性复合物,抑制细胞与胞外基质粘连,介导细胞凋亡。且来自ONCOMINE数据显示(<http://www.oncomine.org/>)众多肿瘤(如前列腺癌、膀胱癌、乳腺癌等)的转移与AES表达下调相关。结直肠癌肝肺转移灶AES较原发灶表达降低,且AES可抑制鼠的结直肠癌移植瘤肝肺转移^[7]。

图3B中, pEGFP-AES组中出现额外两个条带, 40 kD疑为断裂重组质粒, 而118 kD条带究竟是什么? AES可与大分子NF-κB、AR等形成复合体抑制后者的活性^[12-13]。本实验室研究也发现在肝癌细胞系中可观察到点状浓积物^[14]。核内化的AES同NOTCH通路信号分子Rbpj/NICD/Mam1复合物形成点状浓积物,抑制肠多发息肉鼠肿瘤细胞侵袭和血管内渗, AES并不能抑制其通路活性^[8]。因此, AES抑制肿瘤转移的其他机制仍是我们研究努力方向。实验中我们发现的AES不能影响CRC细胞系LoVo的增殖与肝癌细胞中的研究结果一致^[14]。体内实验也证实AES上调或下调的结直肠癌移植瘤原发灶大小较对照组都无明显差异^[7], 而流式细胞仪比较实验组与对照组细胞凋亡得出了阴性结果。

综上, 本实验研究发现在体外AES可抑制结直肠癌侵袭转移。AES该抑制肿瘤转移的作用可为结直肠癌的转移研究提供一个新的靶点和视角, 也是晚期结直肠癌治疗的和预后预测一个新的导向。

参考文献:

[1] Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges [J]. Nat Med, 2006, 12(8): 895-904.
 [2] Beagle B, Johnson GVW. AES/GRG5: More than just a dominant-negative TLE/GRG family member [J]. Dev Dyn, 2010, 239(11): 2795-805.

[3] Lopez-Rios J, Tessmar K, Loosli F, et al. Six3 and Six6 activity is modulated by members of the groucho family [J]. Development, 2003, 130(1): 185-95.
 [4] Bajoghli B, Aghaallaei N, Czerny T. Groucho corepressor proteins regulate otic vesicle outgrowth [J]. Dev Dyn, 2005, 233(3): 760-71.
 [5] Muhr J, Andersson E, Persson M, et al. Groucho-mediated transcriptional repression establishes progenitor cell pattern and neuronal fate in the ventral neural tube [J]. Cell, 2001, 104(6): 861-73.
 [6] Sonoshita M, Aoki M, Fuwa H, et al. Suppression of colon cancer metastasis by Aes through inhibition of Notch signaling [J]. Cancer Cell, 2011, 19(1): 125-37.
 [7] Wang W, Wang YG, Reginato AM, et al. Groucho homologue Grg5 interacts with the transcription factor Runx2-Cbfa1 and modulates its activity during postnatal growth in mice [J]. Dev Biol, 2004, 270(2): 364-81.
 [8] Beagle B, Johnson GV. Differential modulation of TCF/LEF-1 activity by the soluble LRP6-ICD [J]. PLoS One, 2010, 5(7): e11821.
 [9] Zhu CC, Dyer MA, Uchikawa M, et al. Six3-mediated auto-repression and eye development requires its interaction with members of the Groucho-related family of co-repressors [J]. Development, 2002, 129(12): 2835-49.
 [10] Zhang X, Chen HM, Jaramillo E, et al. Histone deacetylase-related protein inhibits AES-mediated neuronal cell death by direct interaction [J]. J Neurosci Res, 2008, 86(11): 2423-31.
 [11] Jan Y, Matter M, Pai JT, et al. A Mitochondrial Protein, Bit1, Mediates Apoptosis Regulated by Integrins and Groucho/TLE Corepressors [J]. Cell, 2004, 116(5): 751-62.
 [12] Tetsuka T, Uranishi H, Imai H, et al. Inhibition of nuclear factor-kappaB-mediated transcription by association with the amino-terminal enhancer of split, a Groucho-related protein lacking WD40 repeats [J]. J Biol Chem, 2000, 275(6): 4383-90.
 [13] Yu X, Li P, Roeder RG, et al. Inhibition of androgen receptor-mediated transcription by amino-terminal enhancer of split [J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(14): 4614-25.
 [14] Li MX, Chen L, Yuan DD, et al. The effect of Aes on the malignant behaviors of hepatocellular carcinoma cells [J]. Zhongguo Ai Zheng Za Zhi, 2012, 22(7): 481-5. [李明星, 陈亮, 袁丹丹, 等. Aes对肝癌细胞恶性生物学行为的影响 [J]. 中国癌症杂志, 2012, 22(7): 481-5.]