

皮层蛋白氨基端同源性多肽分子对大肠癌细胞迁移、内吞能力及侵袭性的抑制

朱建伟, 陆毅祥, 黄宝玉, 赵任, 秦婧

■背景资料

皮层蛋白 (Cortactin) 是 Arp2/3 重要的激活因子, 由 CTTN 基因编码, 位于染色体 11q13。皮层蛋白主要由氨基端 (A)、重复区域 (Repeat)、SH3 结构域等构成, 其中氨基端是激活 Arp2/3 的功能区。皮层蛋白通过 A 区域结合并激活 Arp2/3, 促进 Arp2/3 介导的肌动蛋白聚合, 带来细胞的运动实现, 包括迁移、内吞及侵袭活动等。

朱建伟, 黄宝玉, 南通大学附属医院普外科 江苏省南通市 226001
陆毅祥, 南通百奥-迈科生物技术公司 江苏省南通市 226016
赵任, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科 上海市 200025
秦婧, 南通大学医学院病理教研室 江苏省南通市 226001
朱建伟, 副主任医师, 硕士研究生导师, 从事于消化系统肿瘤的基础和临床研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30771126; No. 30772106
教育部出国留学人员启动基金资助项目, No. 2008-890
江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2006058
作者贡献分布: 本课题由朱建伟设计; 陆毅祥、黄宝玉、赵任及秦婧完成实验; 朱建伟收集资料及论文撰写。
通讯作者: 朱建伟, 副教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院普外科. usazhujianwei@yahoo.com.cn
电话: 0513-81161221
收稿日期: 2009-09-10 修回日期: 2009-10-27
接受日期: 2009-11-02 在线出版日期: 2009-11-18

A peptide homologous with the amino-terminus of cortactin inhibits the migrative, endocytic and invasive capacity of colon cancer cells

Jian-Wei Zhu, Yi-Xiang Lu, Bao-Yu Huang, Ren Zhao, Jing Qin

Jian-Wei Zhu, Bao-Yu Huang, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Yi-Xiang Lu, Biomix Biotechnologies, Nantong 226016, Jiangsu Province, China
Ren Zhao, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China
Jing Qin, Department of Pathology, School of Medicine, Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 30771126 and 30772106; the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry, No. 2008-890; and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2006058
Correspondence to: Professor Jian-Wei Zhu, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. usazhujianwei@yahoo.com.cn
Received: 2009-09-10 Revised: 2009-10-27
Accepted: 2009-11-02 Published online: 2009-11-18

Abstract

AIM: To examine the effects of a peptide homologous with the amino-terminus of cortactin (encoded by the CTTN gene) on the

migrative, endocytic and invasive capacity of colon cancer cells.

METHODS: A peptide homologous with the amino-terminus of cortactin was designed, prepared and designated as A-peptide (35 kDa). The peptide was then labeled with Cy5 and transfected into colon cancer HCT-8 cells. Cell migration was examined by scratch wound assay. Cell endocytosis was detected by capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Cell invasive capacity was evaluated by Transwell assay.

RESULTS: The A-peptide was successfully purified, labeled and transfected into HCT-8 cells. Compared to mock-transfected cells, cell migration, endocytosis and invasion were significantly attenuated in cells transfected with the A-peptide. The number of A-peptide-transfected cells migrating into the area of wound was reduced compared with mock-transfected cells. In transferrin internalization assay, the absorbance value was significantly lower in A-peptide-transfected cells than in mock-transfected cells (0.3 vs 1.2 , $P < 0.05$). Moreover, the number of invasive cells counted by Transwell assay was significantly lower in A-peptide-transfected cells than in mock-transfected cells (56 ± 1.3 vs 148 ± 2.5 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: The A-peptide has the potential to inhibit invasion and metastasis of colorectal cancer.

Key Words: Colorectal cancer; Cortactin; Peptide

Zhu JW, Lu YX, Huang BY, Zhao R, Qin J. A peptide homologous with the amino-terminus of cortactin inhibits the migrative, endocytic and invasive capacity of colon cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(32): 3302-3306

摘要

目的: 研究针对CTTN编码蛋白Cortactin功能的多肽分子对大肠癌细胞运动性的抑制作用。

方法: 设计和制备与Cortactin蛋白氨基端同源

■同行评议者

王晓艳, 副教授,
中南大学湘雅三
医院消化内科

性的多肽分子, 用荧光物Cy5标记并导入到大肠癌细胞HCT-8中. 采用细胞划痕法检测癌细胞的迁移、Capture-ELISA法检测癌细胞内吞作用, 并采用Boyden培养小室检测癌细胞的侵袭性的改变.

结果: 成功制备和纯化35 kDa多肽分子A, 并以Cy5标记, 有效导入到大肠癌细胞中. 与对照组比较, 导入多肽的大肠癌细胞迁移能力下降, 填充划痕的癌细胞数量减少; 以癌细胞摄取转铁蛋白数量反映的内吞作用同时下降, 摄取值多肽导入组为0.3, 对照组为1.2, 两组比较有统计学差异($P<0.05$); Transwell侵袭实验结果表明, 导入多肽的癌细胞迁移数目为 56 ± 1.3 个, 对照为 148 ± 2.5 个, 侵袭能力明显下降($P<0.05$).

结论: Cortactin氨基端同源性多肽可能对抑制大肠癌的侵袭转移具有潜在应用价值.

关键词: 大肠癌; 皮层蛋白; 多肽

朱建伟, 陆毅祥, 黄宝玉, 赵任, 秦婧. 皮层蛋白氨基端同源性多肽分子对大肠癌细胞迁移、内吞能力及侵袭性的抑制. 世界华人消化杂志 2009; 17(32): 3302–3306
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3302.asp>

0 引言

大肠癌等恶性肿瘤的侵袭和转移是一个多步骤的复杂过程, 一般包括癌细胞的局部增殖和扩展、分离和脱落、肿瘤组织新生血管形成、癌细胞进入循环、癌细胞降解脉管基膜逸出循环及随后的定位生长等. 然而, 这一系列复杂步骤都离不开癌细胞自身的运动能力. 癌细胞的运动, 包括细胞膜的伪足样伸展、膜流动性及细胞极性的变化等, 是癌细胞侵袭转移各步骤基本的共同的特征, 必须依赖于细胞膜下的肌动蛋白的装配过程^[1-4]. 这个过程需要Arp2/3复合物的激活^[5]. 皮层蛋白(Cortactin)是Arp2/3重要的激活因子^[6], 由CTTN基因编码, 位于染色体11q13. 皮层蛋白主要由氨基端(A)、重复区域(Repeat)、SH3结构域等构成, 其中氨基端是激活Arp2/3的功能区. 皮层蛋白通过A区域结合并激活Arp2/3, 促进Arp2/3介导的肌动蛋白聚合, 带来细胞的运动实现, 包括迁移、内吞及侵袭活动等^[7]. 本研究设计和制备与皮层蛋白氨基端同源性的多肽分子片段, 不依赖核酸载体, 将多肽导入到大肠癌细胞中, 观察对癌细胞运动性的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 大肠癌细胞株HCT-8购自上海中科

院细胞库. 质粒pGEX-4T-2及皮层蛋白编码基因CTTN的cDNA克隆, 由美国马里兰大学癌症中心惠赠. 主要试剂包括Pfu DNA聚合酶、dNTP、T4连接酶、限制性内切酶等购自NEB公司. 谷胱甘肽、考马斯亮蓝G250、小牛血清(BSA)、SDS、琼脂糖等购自上海生物工程技术服务有限公司; 亲和层析柱(GST)填料购自GE公司; ELISA试剂盒来自Sigma公司; Phalloidin, 标记蛋白的荧光染料Cy5, 蛋白导入细胞用试剂ProteoJuice Protein Transfection Reagent购自美国Novagen公司.

1.2 方法

1.2.1 皮层蛋白氨基端同源性片段(A蛋白)的制备、荧光标记及细胞导入: 以CTTN基因cDNA克隆为模板扩增获得母的DNA片段, 引物序列: 5'-CCG GAA TTC CCA TGT GGA AAG CTT C-3'及5'-CCG CTC GAG TTA AGC TTT TGG TCC-3', PCR反应程序: 94℃, 5 min; 94℃, 1 min; 58℃, 30 s; 72℃, 30 s; 72℃, 7 min, 30个循环. 琼脂糖凝胶回收酶切、连接、转化、表达、蛋白粗提, 最后用高效液相色谱(HPLC)纯化, -80℃保存备用. 该蛋白片段共80个氨基酸残基. 作蛋白标记时, 取5 mg蛋白溶液冻干成粉状, 将干粉状的蛋白加入1 mL的PBS溶液稀释成5 g/L, 加入1/10体积的Cy5标记试剂, 缓慢混匀, 4℃避光反应过夜, 反应后的溶液, 在4℃避光条件下, 用PBS透析至透析液无色, 蛋白保存于4℃备用. 作蛋白导入时, 5×10^4 /mL细胞接种于24孔板中, 次日细胞密度达到70%左右, 蛋白导入按照ProteoJuice说明书步骤进行.

1.2.2 癌细胞迁移能力的划痕实验: 细胞以 1×10^5 /mL密度接种6孔培养板中, 每孔2 mL(保证在蛋白导入前细胞融合70%左右), 次日用干净的吸头在培养板中间划一直线, 并换新鲜培养基. 每日观察划痕处细胞数目.

1.2.3 癌细胞内吞作用分析(capture-ELISA): 将细胞以1% BSA的无血清1640培养基, 在37℃ 50 mL/L CO₂培养箱中培养30 min, 然后加入生物素标记的转铁蛋白(Bio-Tfn)置于冰上30 min. 然后将细胞置于37℃ 5 min, 然后置于冰上终止细胞内吞活动. 用封闭缓冲液(1% BSA, 1% TritonX-100, 10 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 0.1% SDS, 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl)将细胞裂解, 再将细胞裂解物加到包被有抗-Tfn抗体的96孔ELISA板上, 在4℃孵育12 h, 于每孔中加入HRP标记二抗作用1 h, 加入显色剂, 最后检测A₄₅₀值.

1.2.4 癌细胞侵袭能力分析: 癌细胞以单细胞悬

■**研发前沿**
防治大肠癌转移的研究长久以来一直是医学界的热点和难点.

■相关报道

研究表明,在癌细胞的运动过程中,肌动蛋白的聚合(装配)是癌细胞运动性的力量来源。

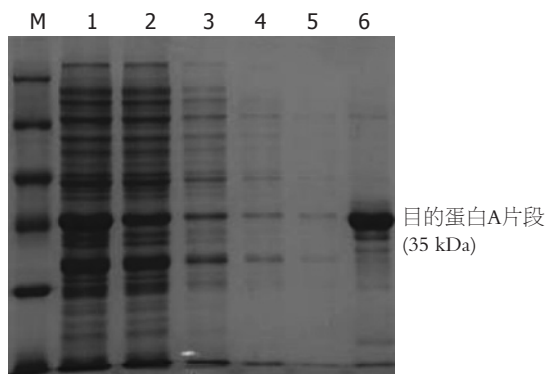


图1 目的蛋白纯化后电泳图。M: 蛋白分子量标记; 1: 粗蛋白; 2: 结合后流出液; 3-5: 洗涤液; 6: 纯化后的蛋白。

液接种在底膜涂有基质胶的带有8 μm 小孔的培养小室, 接种密度 0.5×10^5 , 加入含有10%小牛血清的DMEM培养液, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 100 mL/L CO_2 条件下培养6 h, 将膜上细胞用棉签拭去, 底膜剪下并在750 mL/L乙醇中固定30 min, 作苏木素染色并计数。

2 结果

2.1 皮层蛋白氨基端同源性多肽片段的制备 制备的用于细胞导入的目的多肽片段共有80个氨基酸残基, 我们将其命名为A肽, 其基本序列如下: MWKASAGHAV SITQDDGGAD DWETDP-DFVN DVSEKEQRWG AKTVQSGHQ EHINIH-KLRE NVFQEHQTLK EKELETGPKA。将HPLC纯化的多肽片段用10% PAGE胶电泳, 并用考马斯亮蓝做染色(图1)。蛋白的完整性和纯度良好。

2.2 多肽分子荧光染料标记和导入结肠癌细胞 为观察蛋白导入细胞的效果, 必须先将蛋白做荧光染料标记。所用Cy5染料为红色荧光染料小分子, 对蛋白的功能无实质性的影响。Cy5标记成功的目的蛋白片段顺利导入大肠癌细胞, 图2中可见, 癌细胞经过多肽分子导入后, 细胞未出现毒性反应, 无坏死等表现。

2.3 癌细胞多肽导入后的肌动蛋白骨架的改变 癌细胞伪足减少, 细胞边缘的皮层肌动蛋白(cortical actin)稀疏、松散; 而对照组癌细胞具有典型的细胞伪足, 数目较多, 皮层肌动蛋白致密(图3)。

2.4 癌细胞迁移能力检测 为了观察癌细胞迁移能力, 我们采用细胞划痕试验, 即在培养的癌细胞单层上划出空白区域, 并继续培养, 观察空白区域细胞填充情况。实验分2组细胞, 一组用转导试剂将A肽导入癌细胞, 另一组仅用转导试剂空转细胞, 作为对照。划痕后培养24 h, 比较两组的细胞层空白区域细胞填充情况, 发现转导A肽的癌细胞划痕区域填充数目明显少于对照组(图4), 结果提示A肽转导的癌细胞迁移能力下降。

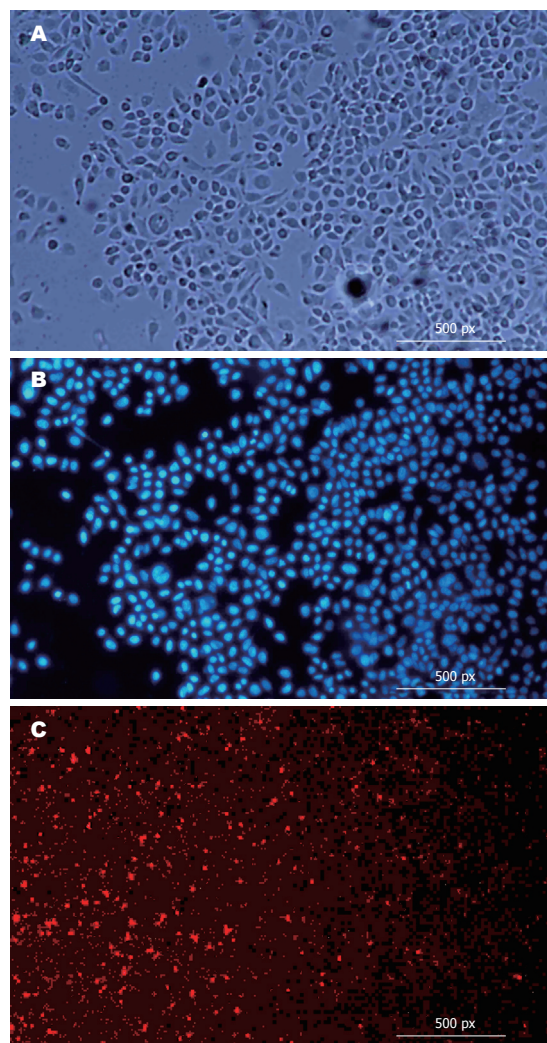


图2 Cy5-A多肽导入大肠癌细胞。A: 相差显微镜下癌细胞外观; B: 癌细胞核染色; C: 导入癌细胞的多肽分子, 发出红色荧光。

2.5 癌细胞内吞能力检测 细胞的内吞作用与癌细胞的侵袭转移能力有关。我们采用Capture-ELISA法检测癌细胞摄取转铁蛋白的能力变化, 以此标志癌细胞内吞作用的变化。结果显示, 转导A肽的癌细胞摄取转铁蛋白的能力明显下降(图5), 采用 t 检验比较两组摄取Tfn的绝对值的变化, 差异具有统计学意义($t = 3.84, P < 0.05$)。

2.6 癌细胞侵袭性检测 采用底膜带孔并涂胶的培养小室接种癌细胞, 观察迁移到底膜另一面的癌细胞数目, 以此来观察癌细胞的侵袭力的变化。结果发现, 转导多肽A的大肠癌细胞的穿膜平均数为 56 ± 1.3 个, 对照空转组癌细胞的穿膜平均数为 148 ± 2.5 个, 采用 t 检验做比较, 差异具有统计学意义($t = 4.17, P < 0.05$, 图6)。

3 讨论

侵袭、转移是大肠癌患者的主要死亡原因。迄今为止, 人们还缺乏有效的控制大肠癌转移的

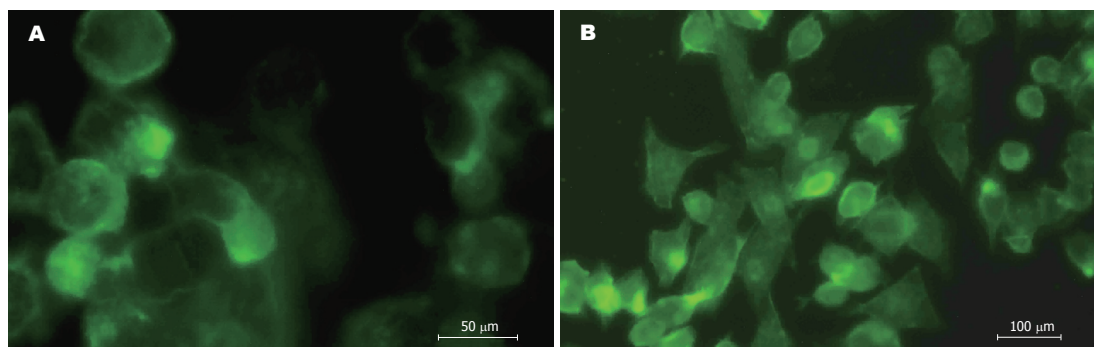


图 3 大肠癌细胞导入外源性多肽前后细胞肌动蛋白骨架的改变. A: 多肽导入后; B: 多肽导入前.

同行评价

本研究内容及方法较新颖, 设计基本合理, 是一篇比较好的论文.

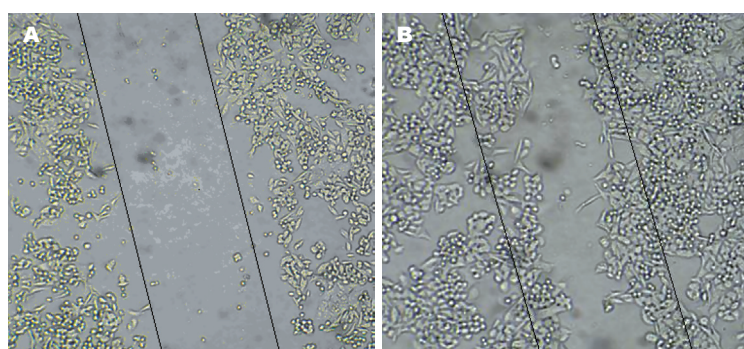


图 4 单层细胞划痕试验. 图中画线区域内细胞数量用于比较迁移能力. A: 导入多肽的癌细胞; B: 对照组癌细胞迁移情况.

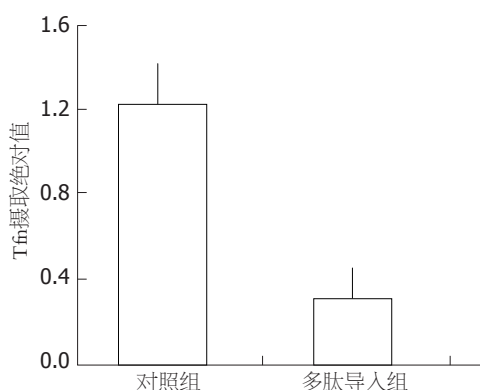


图 5 Capture-ELISA法检测癌细胞内吞作用情况, 摄取转铁蛋白TfR作为内吞能力标志.

方法. 防治大肠癌转移的研究长久以来一直是医学界的热点和难点. 大量的研究表明, 大肠癌等恶性肿瘤的侵袭和转移是一个多步骤的复杂过程, 然而, 这一系列复杂步骤都离不开癌细胞自身的运动能力. 癌细胞的运动性(motility)是癌细胞侵袭转移各步骤基本的共同的特征. 针对细胞运动性的对抗措施, 理论上可以避开癌细胞侵袭转移过程中纷繁复杂的诸多因素.

研究表明, 在癌细胞的运动过程中, 肌动蛋白的聚合(装配)是癌细胞运动性的力量来源^[1]. 研究表明, 肌动蛋白聚合依赖于Arp2/3复合物的催化作用, 而Arp2/3复合物需要CTTN编码产物Cortactin等分子的激活作用. 一般情况下, Arp2/3

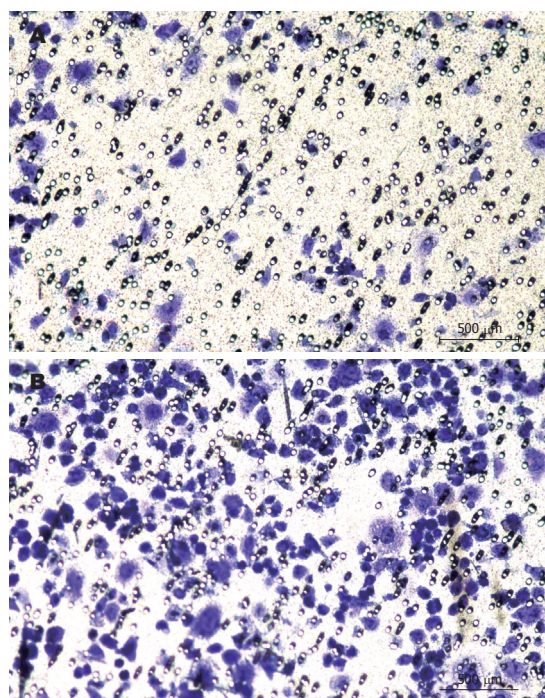


图 6 大肠癌细胞侵袭能力的改变; 迁移到底膜的癌细胞以苏木素染色并计数. 图中小点为底膜开孔, 癌细胞染成蓝色. A: 多肽A转导的癌细胞; B: 对照组.

复合物处于抑制或低活性状态, 需要Cortactin等因子的激活. Cortactin等蛋白结构域具有与其他信号分子相互作用传递细胞外信号的能力, 例如, Src癌基因蛋白可以磷酸化Cortactin, 并依赖Cortactin传递上游信号, 最终通过Cortactin将信

号传递到Arp2/3依赖的肌动蛋白骨架。

人们通过生化试验表明, Cortactin的氨基端是激活Arp2/3的主要结构域, 去除氨基端的Cortactin突变蛋白, 其激活Arp2/3的能力丧失。将Cortactin的突变体导入癌细胞, 细胞迁移能力受到影响^[5-8]。我们先前所作的体内研究表明, 采用RNAi在大肠癌细胞内抑制Cortactin的表达, 可以抑制癌细胞的运动性^[9]。将Cortactin的氨基端编码DNA克隆并通过质粒导入到大肠癌细胞中, 癌细胞的迁移能力受到抑制^[10]。

细胞迁移的实现, 需要细胞形成伪足、与基膜黏附等过程, Arp2/3介导的肌动蛋白聚合使得细胞膜形成突出(protrusion)以及黏附体等, 是迁移实现的必须要素。癌细胞的内吞作用是癌细胞摄取胞外营养及传递信号分子的重要过程。内吞的实现需要细胞膜的凹陷形成以及胞质内的运输, 肌动蛋白的聚合同样起到关键作用。肿瘤细胞的侵袭过程, 一种侵袭性伪足invadopodia形成使得基质破坏, 为肿瘤细胞的穿越提供条件。所用上述过程, Cortactin等Arp2/3激活因子起到重要调节作用^[11-17]。

研究表明, 大肠癌组织高表达Cortactin蛋白^[18], 我们的预实验也发现大肠癌细胞株HCT-8有丰富的胞质Cortactin表达。先前的工作表明, 采用Cortactin的小干扰RNA作用于大肠癌细胞, 结果发现癌细胞的运动性, 包括内吞作用、迁移、细胞贴壁伸展能力等下降。进一步采用Cortactin的结构域相应的DNA构建表达质粒, 导入大肠癌细胞, 发现癌细胞的迁移能力下降^[9-10]。本研究基于我们先前的工作, 体外合成Cortactin氨基端同源性多肽分子, 并导入癌细胞内, 观察癌细胞的运动性的变化。结果发现, 该小分子肽能抑制大肠癌细胞的迁移、内吞及侵袭能力。由于之前干扰Cortactin功能的方法都依赖核酸载体(DNA或RNA), 为将来临床应用的最终目的, 本研究开发出Cortactin的抑制性小分子多肽, 避开核酸载体可能存在的风险, 初步试验证明了该小分子肽在抑制大肠癌细胞运动性方面的有效性。综合先前的研究, 可以看到, Cortactin的氨基端可能是一个有效的药物靶点。我们将进一步做动物体内实验, 观察此多肽分子作为药物在对抗大肠癌侵袭、转移方面的可能作用。

4 参考文献

- Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2000; 29: 545-576

- 周燕红, 何小飞, 高卉, 王瑶芬. JNK信号通路在大肠癌侵袭和转移中的作用及机制. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2142-2146
- 李占霞, 张国锋. 大肠癌发展与肝转移的差异蛋白质组研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 508-512
- 魏学明, 顾国利, 任力, 熊梅, 王石林, 李德昌. 大肠癌EGFR、HER-2、VEGF表达特点及其对分子靶向治疗的指导意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1836-1841
- Higgs HN, Pollard TD. Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 649-676
- Uruno T, Liu J, Zhang P, Fan Yx, Egile C, Li R, Mueller SC, Zhan X. Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 259-266
- Bryce NS, Clark ES, Leysath JL, Currie JD, Webb DJ, Weaver AM. Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence. *Curr Biol* 2005; 15: 1276-1285
- Weaver AM, Karginov AV, Kinley AW, Weed SA, Li Y, Parsons JT, Cooper JA. Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr Biol* 2001; 11: 370-374
- 朱建伟, 赵任. 沉默Cortactin表达对大肠癌细胞伸展、迁移和侵袭的抑制. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1197-1201
- 丛刚, 徐美荣, 朱建伟, 周绍荣. 靶向抑制皮层肌动蛋白装配对大肠癌细胞侵袭作用的影响. *中华实验外科杂志* 2009; 26: 156-158
- Zhu J, Yu D, Zeng XC, Zhou K, Zhan X. Receptor-mediated endocytosis involves tyrosine phosphorylation of cortactin. *J Biol Chem* 2007; 282: 16086-16094
- Li Y, Tondravi M, Liu J, Smith E, Haudenschild CC, Kaczmarek M, Zhan X. Cortactin potentiates bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61: 6906-6911
- Ammer AG, Weed SA. Cortactin branches out: roles in regulating protrusive actin dynamics. *Cell Motil Cytoskeleton* 2008; 65: 687-707
- Luo ML, Shen XM, Zhang Y, Wei F, Xu X, Cai Y, Zhang X, Sun YT, Zhan QM, Wu M, Wang MR. Amplification and overexpression of CTTN (EMS1) contribute to the metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by promoting cell migration and anoikis resistance. *Cancer Res* 2006; 66: 11690-11699
- Artym VV, Zhang Y, Seillier-Moiseiwitsch F, Yamada KM, Mueller SC. Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res* 2006; 66: 3034-3043
- Huang C, Liu J, Haudenschild CC, Zhan X. The role of tyrosine phosphorylation of cortactin in the locomotion of endothelial cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 25770-25776
- Craig AW, Zirnigbl R, Williams K, Cole LA, Greer PA. Mice devoid of fer protein-tyrosine kinase activity are viable and fertile but display reduced cortactin phosphorylation. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 603-613
- Lee YY, Yu CP, Lin CK, Nieh S, Hsu KF, Chiang H, Jin JS. Expression of survivin and cortactin in colorectal adenocarcinoma: association with clinicopathological parameters. *Dis Markers* 2009; 26: 9-18