

# 浅析影响直肠癌细胞增值的因素

## 一、细胞培养

人结肠癌细胞系 CaCo2、HT29、HCT116、SW480、SW620、SW1116、LoVo 均购自 ATCC，并由上海消化外科研究所传代保存。LoVo 采用含 10%胎牛血清的 F-12K 培养传代；CaCo2、HT29、HCT116、SW480、SW620、SW1116 均使用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液，置于 37°C、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中，以 1:2 至 1:4 的比例传代培养。

## 二、方法

1.样本收集及免疫组化染色：结肠直肠肿瘤标本取自上海市微创外科临床医学中心手术室。手术标本切除后生理盐水清洗，打开肠腔，剔除瘤体表面坏死及炎性肉芽组织；取肿瘤中心部位及距肿瘤 5cm 以上的正常肠黏膜全层组织，切成 1cm 块状后置入样本管。组织标本经 4%甲醛溶液充分固定后，制作蜡块，切片、贴片。随后采用链霉素亲和素-过氧化酶复合物( SP )法进行免疫组化染色，DAB 显色。TMPRSS4 多克隆抗体购自美国 Proteintech 公司，1:50 稀释。

2.半定量 RT-PCR：采用 Trizol 试剂 ( Invitrogen，美国 ) 提取细胞总 RNA。电泳鉴定 RNA 完整性，分光光度计 260nm 处测定 RNA 浓度，使用逆转录试剂盒 ( Takara，日本 ) 在 ABIPrismSDS7000 中进行逆转录 cDNA 合成。上海吉玛生物有限公司合成如下引物：

TMPRSS4 上游引物 5'-TCCAAGGACCGATCCACACT-3'，下游引物 5'

-AAGTTGTCGAAACAGGCAGAG-3'；GAPDH 上游引物 5'

-GACATCAAGAAGGTGGTGAA-3'，下游引物 5'-TGTCATACCAGGAAATGAGC-3'。

cDNA 在 PCR 仪(AppliedBiosystems，美国)中进行反应，50°C2min、95°C10min、95°C

15s、60°C30s、72°C30s，共 35 个循环；然后，72°C10min，扩增产物于 1%琼脂糖凝胶中，130V、30min 条件下电泳并在紫外灯下摄片，成像保存。

3. Western 印迹法：细胞在 10cm 培养皿（Corning，美国）中生长融合约 90%时，PBS 清洗 2 次后加入 300 $\mu$ L RIPA 置冰上 30min 裂解充分后煮沸 10min 随后 13000r/min 离心 5min。取上清液，BCA 法测定蛋白质浓度。每孔上样量 100 $\mu$ g，加入 5 $\times$ 上样缓冲液、去离子水至总体积一致后变性电泳（积层胶 80V，分离胶 120V），半干转法转膜（15V）70min 后脱脂牛奶室温封闭 2h，4°C 下一抗（兔抗人 TMRSS4 多抗，112831-AP，Proteintech，美国，1:600 稀释）孵育过夜。TBST 洗膜 3 遍后加入一定比例稀释的相应二抗室温孵育 1h，TBST 洗膜 2 次，PBS 洗膜 1 次后荧光发光显色。

4. siRNA 瞬时转染：细胞生长至 70%融合时胰酶消化，计数后按每孔  $3 \times 10^5$  细胞铺 6 孔板，过夜。24h 后按照 Lipofectamine2000（Invitrogen，美国）说明书操作进行细胞转染。由上海吉玛生物有限公司设计并合成 TMRSS4-siRNA 序列：5'-AAGUUGUCGAAACAGGCAGAGAACC-3'（si 组）。仅转染 Lipo2000 的细胞为空白对照组，转染阴性对照序列的细胞为阴性对照组（NC 组）。转染 48h 后用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA，72h 提取总蛋白质。

5. CCK-8 测细胞增殖：取转染后 SW480 细胞计数后铺于 96 孔板，每孔 100 个；设干扰组、阴性对照组和空白对照组，每组 6 个复孔。在第 0、24、48、72、96 和 120h，分别于各孔加入 CCK-8 试剂（cellcountingkit-8，Dojindo,日本）10 $\mu$ L，37°C 孵育 2.5h，酶标仪测定各孔在 450nm 的吸光度值。以时间为横坐标、吸光度值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

6. Annexin V/PI 流式检测细胞凋亡：转染 48h 后收细胞，取 100 $\mu$ L 细胞悬液（ $1 \times 10^6$  个/mL）至流式管，用 PBS 洗涤 1 次，离心后加入 300 $\mu$ L 结合缓冲液，混匀，再加入 5 $\mu$ L 的 Annexin V-FITC 和 5 $\mu$ L 的 PI，孵育 15min 后用流式细胞仪（BD，美国）上机检测。

7. 划痕试验：6 孔板转染，待细胞铺满后，用无菌枪头每孔笔直划线，PBS 清洗 3 次，加入无血清培养液置培养箱孵育。24h 后在显微镜下每孔随机选取视野观察摄片。

8. transwell 迁移试验：取转染 24h 后细胞，无血清 RPMI1640 培养液重悬后计数，调至终密度为  $5 \times 10^5$  个/mL。24 孔板每孔内加入 900 $\mu$ L 含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液，随后置入 transwell 小室（Corning，美国），小室内加入 200 $\mu$ L 细胞悬液（ $10^5$  个细胞）。培养箱孵育 24h 后取出，棉签拭去内室面细胞，甲醇固定小室外穿出细胞 10min，1%结晶紫染色 10min，PBS 清洗 3 遍后，显微镜下观察摄片。

### 三、统计学方法

采用 SPSS11.0 软件进行统计学分析，计数资料采用 $\chi^2$  检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

1. 免疫组化检测 TMPRSS4 蛋白在结肠直肠癌组织和正常肠上皮中表达标本免疫组化染色显示，TMPRSS4 蛋白定位于细胞膜上，在肿瘤组织和转移淋巴结中均染色阳性，且转移淋巴结中 TMPRSS4 蛋白染色更强。表明 TMPRSS4 表达可能与肿瘤细胞迁移能力有一定相关性。

2. 半定量 RT-PCR 和 Western 印迹检测 TMPRSS4 在结肠癌细胞株中的表达通过半定量 RT-PCR 检测发现，TMPRSS4 基因在 7 株结肠癌细胞中有不同程度的表达，其中在 HT29、SW480、SW620、SW1116 中的表达相对较高。Western 印迹检测亦有类似结果，有细胞均不同程度表达 TMPRSS4 蛋白，而 HCT116、SW480 和 SW1116 蛋白表达量相对较高。因此，本研究决定选用 SW480 细胞进行下一步试验。三、siRNA 瞬时转染后 SW480

细胞中 TMPRSS4 蛋白表达下调在转染 siRNA48h 后，Western 印迹法检测发现，与空白对照组和 NC 组相比，siRNA 干扰组（si 组）的 TMPRSS4 蛋白表达明显下降。

3. TMPRSS4 下调可显著抑制 SW480 细胞的增殖能力 siRNA 处理 SW480 细胞株后，采用 CCK-8 法测定细胞增殖能力。在第 1、2、3、4、5 天不同时间点分别测定吸光度值，吸光度值可间接反映细胞增殖能力的强弱。与空白对照组和 NC 组相比，si 组细胞增殖能力在 48~96h 时受到明显抑制（ $P < 0.05$ ）。

4. 下调 TMPRSS4 诱导 SW480 细胞凋亡 SW480 细胞株转染 TMPRSS4siRNA 后孵育 48h，收集细胞，用 Annexin V/PI 双染色法检测细胞周期，si 组细胞凋亡比值为 14.0%，而空白对照组和 NC 组分别为 10.4%和 10.1%，有统计学差异（ $P < 0.05$ ）。提示下调 TMPRSS4 可能有诱导结肠癌细胞凋亡的作用。

5. siRNA 干扰 TMPRSS4 表达显著影响 SW480 细胞的迁移能力采用 siRNA 处理 SW480 细胞后，进行细胞划痕及 transwell 迁移试验。结果显示，si 组的 SW480 细胞在划痕试验中的运动能力比对照组显著降低（ $P < 0.05$ ）；si 组在 transwell 试验中的穿膜细胞数亦比对照组显著降低（ $P < 0.05$ ）。

#### 四、讨论

II 型跨膜丝氨酸蛋白酶是一类新近发现的特殊蛋白酶，具有明显的组织表达特异性，且与耳聋、贫血、高血压和肿瘤等的发生相关。本研究探讨该家族成员 TMPRSS4 在结肠直肠癌组织中的表达及其对增殖、凋亡、迁移等方面的影响。采用 siRNA 干扰 TMPRSS4 表达后，发现肿瘤细胞的增殖能力减弱，同时细胞运动迁移能力也降低，这与 Jung 等先前的研究结果相一致。针对该蛋白质的其他研究表明，TMPRSS4 可能通过作用于细胞间黏附分子或激活其他蛋白酶在组织发育和细胞分化中发挥重要作用；并通过发挥其蛋白酶的水解作用裂解病毒表面的红细胞凝集素，促进病毒在肺部的扩散而致病。因此，推测该基因可能通

过靶向作用于细胞外基质及细胞-细胞间连接分子而在调控 SW480 细胞的增殖及迁移中发挥作用，具体机制尚有待后续研究来揭示。同时，流式细胞凋亡检测显示，在 siRNA 干扰后，SW480 细胞的凋亡比例明显增加，这与干扰后细胞的增殖能力降低相一致，表明敲除 TMPRSS4 基因可能通过诱导细胞凋亡而抑制增殖。最近有研究表明，乳腺癌中 TMPRSS4 表达与淋巴结转移、病理分期差、肿瘤体积大以及总生存率和无病生存率低相关。本研究初步显示，TMPRSS4 在结肠直肠癌组织和转移淋巴结中有不同程度表达，且转移淋巴结染色强度略高。因此，有必要进一步探讨 TMPRSS4 与结肠直肠癌病理分期、分级、淋巴结转移及病人预后间的相关性，为其作为预后预测因素提供依据。我们将继续探讨 TMPRSS4 对于结肠癌细胞增殖、凋亡、侵袭方面的具体作用机制，揭示这一基因对于结肠直肠癌发生、发展的作用。

作者：黄傲 周厚民 赵红超 全应军 金润森 乐飞 马君俊 冯波 郑民华 单位：上海交通大学青岛市市立医院