

CD151 对甲状腺癌细胞迁移及侵袭能力的影响 *

吴勇军^{1,2} 唐 仪¹ 冯德云³ 李 箬¹ 张 漾¹ 赵 毅¹ 伍镇江¹ 苏 琦^{2△}

(1 南华大学湘潭临床学院 湖南 湘潭 411101; 2 南华大学肿瘤研究所 湖南 衡阳 421001;

3 中南大学湘雅医学院病理学教研室 湖南 长沙 410008)

摘要 目的 构建 CGTHW-1/pGenesil-1-CD151shRNA 稳转细胞系和空载体细胞系 CGTHW-1/pGenesil-1, 探讨 CD151 对人甲状腺癌 CGTHW-1 细胞迁移及侵袭的影响及其作用机制。**方法** 应用 Lipofectamine2000 将真核干扰载体 pGenesil-1-CD 151 shRNA 和空载体 pGenesil-1 导入甲状腺滤泡癌细胞 CGTHW-1, 经卡那霉素抗性筛选得到稳定的克隆并扩大培养成细胞系, Western blot 检测 CD151 在 CGTHW-1 细胞中的表达。划痕实验和 Transwell 实验分别观察 CD151 对细胞迁移和侵袭能力的影响。**结果** 成功建立了 CGTHW-1/pGenesil-1-CD151shRNA 稳转细胞系和空载体细胞系 CGTHW-1/pGenesil-1, Western blot 结果显示 CD151 在 CGTHW-1 细胞中表达, 干扰 CD151 基因后, CGTHW-1 细胞的迁移和侵袭能力明显降低。**结论** 将 CD151 基因干扰后可明显抑制甲状腺癌细胞的迁移和侵袭能力。CD151 可能是影响甲状腺癌侵袭转移的重要因子之一。

关键词 甲状腺癌细胞; CD151 迁移; 侵袭

中图分类号 R736.1 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)11-2071-04

Impact of CD151 on Migration and Invasion of Human Thyroid Cancer Cell Line CGTHW-1*

WU Yong-jun^{1,2}, TANG Yi¹, FENG De-yun³, LI Zheng¹, ZHANG Yang, ZHAO Yi¹, WU Zhen-jiang¹, SU Qi^{2△}

(1 Clinical Institute of Nanhua University, Xiangtan, Xiangtan 411101;

2 Cancer Institute, Nanhua University, Xiangtan 411101;

3 Department of Pathology, Xiangya Medical College, Changsha 410008)

ABSTRACT Objective: To construct the vector of CGTHW-1/pGenesil-1-CD151shRNA for interference and to investigate the impact of CD151 on the migration and invasion of CGTHW-1 cell in thyroid cancer. **Methods:** The eukaryotic interference plasmid pGenesil-1-CD151shRNA, and empty vector pGenesil-1 were transfected into CGTHW-1 cell. The cells were selected by kanamycin. After infection, CD151 expression in CGTHW-1 cells was observed by Western blot. Cell migration and invasion were detected by Wound Healing assay and Transwell assay. **Results:** CGTHW-1/pGenesil-1-CD151shRNA and CGTHW-1/pGenesil-1 cells were successfully set up. Western blot results showed that CD151 expression in CGTHW-1 cells. Wound Healing assay and Transwell assay showed that CD151 gene interfered, CGTHW-1 cells significantly reduced migration and invasion. **Conclusion:** The interference of CD151 gene can significantly inhibit the migration and invasion of thyroid cancer cells. CD151 is likely one of the important factors to affect invasion and metastasis of thyroid cancer.

Key words: Thyroid cancer cell; CD151; Migration; Invasion

Chinese Library Classification(CLC): R736.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)11-2071-04

甲状腺癌发病率为 1%-2%, 虽然恶性程度较低, 但容易发生局部及远处转移, 有些在早期即可发生。因此, 阐明其侵袭转移发生的机制, 是根治甲状腺癌的关键^[1]。CD151 是四跨膜蛋白家族(Tetraspanins, TM4SF)的重要成员, 最早在血小板表面被发现。研究证实, CD151 在多种人类肿瘤中表达水平显著高于正常组织且与肿瘤的预后密切相关。其与整合素形成 $\alpha 3 \beta 1$ TM4SF 复合物^[2,3], 在肿瘤细胞中可通过介导细胞肌动蛋白骨架重排与促进基质金属蛋白酶 22 的分泌两种途径促进肿瘤细胞的侵袭与转移^[4]。RNAi 是近几年发展起来的一种沉默

基因表达的新方法, 它是以双链 RNA 为中介降解具有相同序列 RNA^[5]。目前用 RNAi 特异性地抑制癌基因、癌相关基因或突变基因的过度表达, 使这类基因保持休眠状态, 这种新的方法有可能成为治疗各种恶性肿瘤的有效方法之一。本实验通过使用 siRNA 沉默 CD151, 采用 Western blot、细胞划痕实验、细胞侵袭实验等技术, 研究沉默 CD151 后对人甲状腺滤泡癌细胞 CGTHW-1 迁移和侵袭能力的影响, 并初步探索其作用机制。

1 材料与方法

* 基金项目 湘潭市科技计划项目 (JZ200704)

作者简介 吴勇军, 男, 硕士, 主任医师, 现工作单位 南华大学湘潭临床学院病理科。E-mail: wuyongjun2000@yahoo.com.cn

△通讯作者 苏琦, 男, 教授, 博士生导师, Tel 10734)8281547, E-mail: suqi1945@yahoo.com.cn

(收稿日期 2011-03-06 接受日期 2011-03-31)

1.1 材料

人甲状腺癌 CGTHW-1 细胞系由重庆医科大学病理生理实验室提供。真核干扰载体 pGenesil-1-CD151shRNA 和空载体为本室保存。阳离子脂质体转染试剂(LipofectamineTM2000)、兔抗人 CD151 蛋白多克隆一抗、卡那霉素均购自 Invitrogen 公司,兔抗人 β -actin 单克隆一抗、辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗均购自 Santa Cruz,Transwell 小室 (聚碳酸酯微孔膜孔径 $8\mu\text{m}$,美国 Costar 公司);BCA 蛋白定量试剂盒、胎牛血清、L15 无血清培养基分别购自 Gibco 和 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 细胞用含 10%胎牛血清的 L15 培养基, 37°C 、5% CO_2 培养箱中静置培养。取对数生长期细胞进行实验,将细胞分为 3 组:未转染组 (CGTHW-1)、空载体组 (CGTHW-1/pGenesil-1)、转染组 (CGTHW-1 /p Genesil - 1-CD151 shRNA)。

1.2.2 CD151shRNA 基因转染 CGTHW-1 细胞及其稳定干扰细胞系的建立采用 Lipofectamine2000 转染技术,具体方法参照厂家说明书。分别用 pGenesil-1 - CD 151shRNA 干扰质粒和 pGenesil-1 质粒转染 CGTHW-1 细胞,转染 24h 后换用含有 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的完全培养基筛选阳性克隆,连续筛选 4 周后阳性细胞克隆形成。

1.2.3 Western blot 检测 分别提取 3 组细胞总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒测定细胞蛋白浓度, 100°C 水浴 10min,取等量的总蛋白行 SDS-PAGE 凝胶电泳,并转至 PVDF 膜上。TBST 洗膜,用含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭 2h 后加入兔抗人 CD151 多克隆一抗 (1:1000) 4°C 封闭过夜。第二天去除一抗,TBST 洗膜 3 次,加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗 (1:2000), 37°C 孵育 1h,TBST 洗膜 3 次,暗室中用蛋白荧光检测试剂盒显示结果于 X 线片。

1.2.4 细胞划痕实验 将细胞按 1×10^6 个 / 孔接种于 6 孔培养板。当细胞长至 80%~90%,融合形成单层细胞层时,用 $200\mu\text{l}$ 无菌枪头在单层细胞上垂直划过,形成一个创伤伤口。用 PBS 洗 3 次以去除细胞碎片,剩余细胞继续培养,于 24h 时在倒置显微镜下观察伤口愈合情况。实验重复 3 次。

1.2.5 细胞侵袭实验 将 $10\text{mg}/\text{ml}$ 的 Matrigel 与无血清 RPMI1640 培养基以 1:5 的比例混合成 $60\mu\text{l}$ 溶液,每孔 $30\mu\text{l}$ 均匀

平铺于 Transwell 小室的聚碳酸酯微孔膜上制作人工基底膜,并置于超净台内紫外灯照射过夜。实验前 30min 重新成胶。将各组细胞悬液 $400\mu\text{l}$ (细胞数 2×10^5 个)接种到成胶 Transwell 小室内,将小室放入 24 孔板 24 孔板内加入含趋化因子的条件培养基 $600\mu\text{l}$,加盖后置于 37°C 、5% CO_2 饱和湿度条件下培养 24h。然后将小室内培养液吸出,用棉签将膜上层细胞完全擦掉,膜下层细胞以 95%乙醇固定 40min 后进行 HE 染色,倒置显微镜下计数下层的肿瘤细胞数。实验重复 3 次。肿瘤细胞的侵袭力定义为 10 个 400 倍视野下的平均细胞数。

1.3 统计学方法

上述实验均重复 3 次,实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间差异采用 t 检验,用 SPSS17.0 软件进行统计分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD151 在甲状腺癌细胞中稳定表达

Western blot 结果显示,与未转染细胞(CGTHW-1)和转染空载体的 pGenesil-1- CD151 细胞比较,在稳定转染 CD151 的细胞(CGTHW-1)中,CD151 在细胞总蛋白中的表达水平显著降低约 2.5 倍($P<0.05$) (见图 1)。

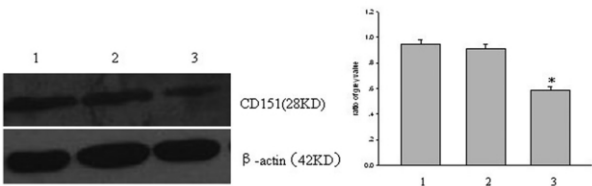


图 1 RNA 干扰对甲状腺癌细胞中 CD151 表达的影响

Lane 1 Effects of RNA Interference on CD151 Expression in Thyroid Cancer

* $P<0.05$, vs control

2.2 CD151 对 CGTHW-1 细胞迁移和侵袭的影响

2.2.1 CD151 对 CGTHW-1 细胞迁移的影响 与未转染细胞 (CGTHW-1)和转染空载体的 pGenesil-1-CD151 细胞比较,稳定转染 CD151shRNA 的细胞(CGTHW-1)的划痕伤口愈合速度明显减慢($P<0.05$) (见图 2)。

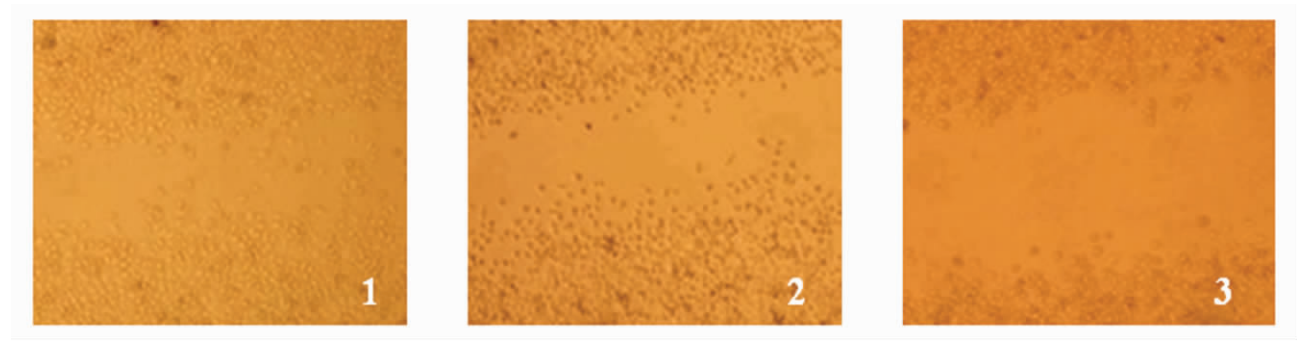


图 2 RNA 干扰 CD151 对甲状腺癌细胞迁移的影响

Figure 2 (1) CGTHW-1 cells; Figure 2 (2) CGTHW-1/pGenesil-1 cells;
Figure 2 (3) CGTHW-1/pGenesil-1-CD151shRNA * $P<0.05$,vs control

2.2.2 CD151 对 CGTHW-1 细胞侵袭的影响 稳定转染 CD151shRNA 的细胞 (CGTHW-1) 穿透聚碳酸酯膜的细胞数 (13.8 ± 3.03 个) 明显低于未转染细胞 (CGTHW-1) (41.6 ± 6.95

个)和转染空载体的 pGenesil-1-CD151 细胞(39.5 ± 6.65 个, $P < 0.05$) (见图 3)。

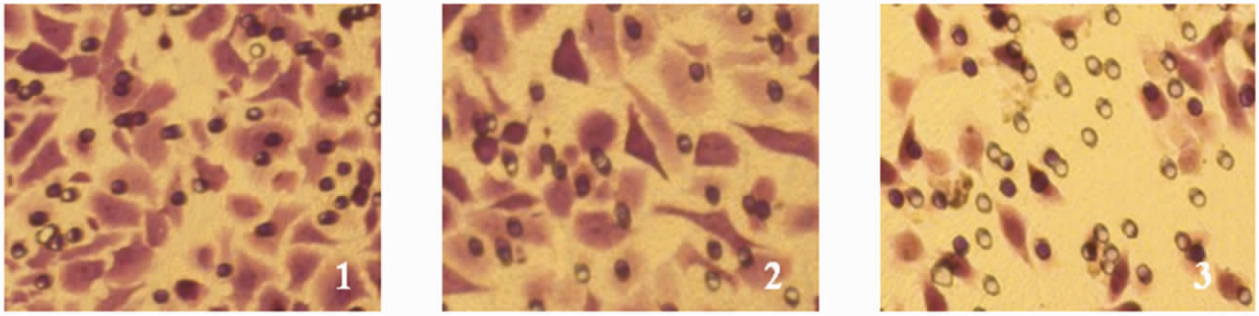


图 3 RNA 干扰 CD151 对甲状腺癌细胞侵袭的影响

Figure 3 (1) CGTHW-1 cells; Figure 3 (2) CGTHW-1/pGenesil-1 cells;

Figure 3 (3) CGTHW-1/pGenesil-1-CD151shRNA * $P < 0.05$, vs control

3 讨论

甲状腺癌是头颈部最常见的恶性肿瘤,约占全身恶性肿瘤的 1%-2%,占内分泌肿瘤的 90%以上,其中甲状腺乳头状癌约占甲状腺癌的 60%~70%^[6,7]。不同类型甲状腺癌的生物学行为具有显著性差异,乳头状癌易发生早期淋巴结转移,滤泡癌及其他类型癌几乎仅发生血道转移而罕见淋巴结转移,其机制至今未阐明。

RNA 干扰是近年来发现的一项可以快速、高效地降解体内特定基因的基因沉默的技术。它是将外源性或内源性双链 RNA 导入细胞后引起与该段 RNA 同源的 mRNA 产生特异性降解,其相应的基因受到抑制。它的出现为肿瘤的基因治疗开辟了一个更广阔的领域^[8]。

CD151 又被称作 SFA-1 或 PETA-3,是 TM4SF 新近发现的成员,其具有四跨膜蛋白的一般特征,如在结构上属于细胞膜糖蛋白的特殊家族,具有 4 个高度疏水的跨膜结构域。是 TM4SF 中唯一的癌基因,位于人染色体 11P15.5,由一大一小 2 个细胞外环和 2 个短的细胞内尾端构成,细胞外大环与多种整合素相结合,是将整合素接受到的各种生物信号转导到细胞内的重要结构基础。它参与多种病理生理过程,包括细胞的黏附、迁移、半桥粒结构的形成以及通过囊泡进行整合素的运输等,从而在肿瘤细胞的迁移,浸润和转移中起重要作用^[9,10]。最近的研究表明 CD151 在肿瘤组织中差异性表达,并且与肿瘤的转移和预后呈正相关,是 TM4SF 中唯一对肿瘤转移起促进作用的基因。体外实验已证实 CD151- $\alpha 3\beta 1$ 整合素复合体对上皮细胞增生起促进作用,可能促进血管生成和肿瘤细胞黏附^[11]。Robert 等报道^[12],抗 CD151 抗体和抗整合素 $\alpha 3\beta 1$ 抗体作用后的白细胞在纤维粘连蛋白上的迁移减少 88%-92%,表明 CD151-整合素 $\alpha 3\beta 1$ 复合体在促进细胞迁移中的关键作用。另有研究发现^[13],将 CD151 基因转染到不表达 CD151 的细胞株 NIH3T3 中,结果发现该细胞的迁移能力明显增强。Ang 等^[14]通过对前列腺癌与前列腺肥大的标本研究发现,CD151 在前列

腺癌细胞的表达明显高于前列腺肥大的细胞,且分化好的前列腺癌细胞 CD151 的表达明显低于分化差的前列腺癌细胞。越来越多的学者认为 CD151 可作为肿瘤预后不良的一个新指标^[15]。Tokuhara 等^[16]对非小细胞肺癌的 TM4SF 表达与患者预后的研究发现,CD151 过表达的患者预后较低表达者差。到目前为止,发现有 CD151 表达增高的恶性肿瘤还有黑色素瘤^[17]、乳腺癌^[18,19]等。国内张莹等^[20]研究发现 CD151 在正常甲状腺、滤泡性腺瘤及甲状腺癌中的表达呈递增趋势,提示 CD151 表达增高不仅是甲状腺癌发生过程中的一个早期事件,还可能在甲状腺肿瘤的发生发展中起促进作用,但未阐明其机制。

本研究成功构建了干扰 CD151 基因的甲状腺癌 CGTHW-1 细胞系,Western blot 结果显示 CD151 蛋白在人甲状腺癌 CGTHW-1 细胞表达。为了观察 CD151 干扰对甲状腺癌细胞运动能力的影响,我们进行了划痕实验和 Transwell 小室侵袭实验。实验结果显示 CD151 基因干扰可明显抑制甲状腺癌细胞的迁移和侵袭能力,说明 CD151 可能是影响甲状腺癌侵袭转移的重要因子之一。

综上所述,沉默 CD151 基因可以下调甲状腺癌细胞 CD151 基因的表达,而且还可以抑制甲状腺癌细胞迁移,降低其体外侵袭能力。我们推测 CD151 可能是影响甲状腺癌侵袭转移的重要因子之一,沉默 CD151 基因表达可能是治疗甲状腺癌的一个新途径,对 CD151 基因的更加深入的研究可为甲状腺癌的预防和治疗提供一个新的靶点。

参考文献(References)

- [1] Urken ML. Prognosis and management of invasive well-differentiated thyroid cancer[J]. Otolaryngol Clin North Am, 2010,43(2):301-328
- [2] Liu WF, Zuo HJ, Chai BL, et al. Role of tetraspanin CD151- $\alpha 3/\alpha 6$ integrin complex: Implication in angiogenesis CD151-integrin complex in angiogenesis [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2011,43(4):642-650
- [3] Romanska HM, Berditchevski F. Tetraspanins in human epithelial malignancies[J]. J Pathol, 2011,223(1):4-14
- [4] Yañez-Mó M, Barreiro O, Gonzalo P, et al. MT1-MMP collagenolytic activity is regulated through association with tetraspanin CD151 in

- primary endothelial cells[J]. Blood, 2008, 112(8):3217-3226
- [5] Berezikov E, Cuppen E, Plasterk RH. App roaches to microRNA discovery[J]. Nat Genet, 2006, 38 (Supp l) : S2-S7
- [6] Costa RV, Pakenham KI. Associations between benefit finding and adjustment outcomes in thyroid cancer[J]. Psychooncology, 2011, 17. doi: 10. 1002 /pon. 1960
- [7] Burns WR, Zeiger MA. Diffeentiated thyroid cancer [J]. Semin Oncol, 2010, 37(6): 557-566
- [8] Wei J, Jones J, Kang J, et al. RISC bound siRNA is a determinant of RNAi mediated gene silencing in mice[J]. Mol Pharmacol, 2011, 22
- [9] Yoo SH, Lee K, Chae JY, et al. CD151 expression can predict cancer progre- ssion in clear cell renal cell carcinoma [J]. Histopathology, 2011, 58(2):191-197
- [10] Wang HX, Li Q, Sharma C, Knoblich K, Hemler ME. Tetraspanin protein contribu- tions to cancer[J]. Biochem Soc Trans, 2011, 39(2): 547-552
- [11] Ke AW, Shi GM, Zhou J, et al. CD151 Amplifies Signaling by Integrin $\alpha 6 \beta 1$ to PI3K and Induces the Epithelial-Mesenchymal Transition in HCC Cells[J]. Gastroenterology, 2011, 12
- [12] Robert L Yauch, Fedor Berditchevski, Mary Beth Harlor, et al. Highly stoichiometric, stable, and specific association of integrin $\alpha 3 \beta 1$ with CD151 provides a major link to phosphatidy link to phosphatidy linositol4- kinase, and may regu- late cell migration [J]. Mol Biol Cell, 1998, 9(10) : 2751-2765
- [13] Kazarov AR, Yang X, Stipp CS, et al. An extracellular site on tetraspanin CD 151 determines alpha 3 and alpha 6 integrin-dependent cellular morphology[J]. J Cell Biol, 2002, 158 (7):1299-1309
- [14] Ang J, Lijovic M, Ashman LK, et al. CD151 protein expression predicts the clinical outcome of low-grade primary prostate cancer better than histologic grading: a new prognostic indicator? [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2004, 13(11 Pt 1):1717-1721
- [15] Liu WF, Zuo HJ, Cai BL, et al. Role of tetraspanin CD151- $\alpha 3 / \alpha 6$ integrin complex: Implication in angiogenesis CD151-integrin complex in angiogenesis [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2011, 43(4):642-650
- [16] Tokuhara T, Hasegawa H, Hattori N, et al. Clinical significance of CD151 gene expression in non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7: 4109 - 4014
- [17] Hong IK, Jin YJ, Byun HJ, et al. Homophilic interactions of Tetraspanin CD151 up-regulate motility and matrix metalloproteinase-9 expression of human mela- noma cells through adhesion-dependent c-Jun activation signaling pathways [J]. J Biol Chem, 2006, 281(34): 24279-27292
- [18] Klosek SK, Nakashiro K, Hara S, et al. CD151 regulates HGF-stimulated mor- phogenesis of human breast cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 379(4):1097-1100
- [19] Yang XH, Richardson AL, Torres-Arzayus MI, et al. CD151 accelerates breast cancer by regulating alpha 6 integrin function, signaling and molecular organization [J]. Cancer Res, 2008, 68(9):3204-3213
- [20] 杨燕初, 陆竞艳, 张莹, 等. 甲状腺乳头状癌 CD151 和 CK19 mRNA 表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2007, 23(3):331-333
- Yang Yan-chu, Lu Jin-yan, Zhang Ying, et al. The expression of CD151 and CK19 and the significance in thyroid papillary carcinoma [J]. J Clin Exp Pathol, 2007, 23(3):331-333