

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.05.001

· 基础研究 ·

蛋白酶活化受体 2 促进结肠癌细胞与基质粘附 *

马怡茗 赵新华 包 韩 乌 云 韩文晓 汪红英[△]

(北京协和医学院中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室 北京 100021)

摘要 目的:蛋白酶活化受体 2 激活对结肠癌细胞 HT29 粘附能力的影响。**方法:**通过激活多肽活化细胞膜表面的蛋白酶活化受体 2,检测对结肠癌细胞与 FN 和 Matrigel 粘附能力的影响。建立蛋白酶活化受体 2 敲降的结肠癌细胞,检测对结肠癌细胞与基质粘附能力的影响。**结果:**蛋白酶活化受体 2 激活,能够促进结肠癌细胞与基质的粘附能力;而蛋白酶活化受体敲降则抑制粘附。**结论:**蛋白酶活化受体 2 参与对结肠癌细胞粘附能力的调控,其激活能够促进结肠癌细胞与基质的粘附能力。

关键词:蛋白酶活化受体 2;细胞粘附;结肠癌

中图分类号:R735.35;R730.23;Q75 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)05-801-03

Activation of Proteinase Activated Receptor 2 Promotes Adhesion between Colorectal Cancer Cell and ECM*

MA Yi-ming, ZHAO Xin-hua, BAO Han, WU Yun, HAN Wen-xiao, WANG Hong-ying[△]

(State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute and Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing, 100021, China)

ABSTRACT Objective: To determine the role of PAR2 in adhesion between colorectal cancer cell and extracellular matrix. **Methods:** Adhesion assay was performed to study the role of PAR2 in adhesion between colorectal cancer cell and fibronectin or Matrigel. PAR2 was either activated with the activating peptide or knocked down with shRNA in cancer cell lines. **Results:** Activation of PAR2 significantly increased the adhesion ability of cancer cell with extracellular matrix. And PAR2 knocking down impaired the adhesion between cancer cell and extracellular matrix. **Conclusion:** PAR2 plays an important role in cancer cell adhesion.

Key words: Proteinase activated receptor 2; Cell adhesion; Colorectal cancer

Chinese Library Classification(CLC): R735.35; R730.23; Q75 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)05-801-03

前言

蛋白酶活化受体(Proteinase Activated Receptors, PARs)是一种有 7 段跨膜区的 G 蛋白结合受体(G protein-coupled receptors),N 末端暴露于细胞外。该家族共有四个成员,PAR1、PAR2、PAR3 和 PAR4^[1,2]。PARs 有着非常独特的激活方式,细胞外的丝氨酸蛋白酶水解受体的 N 末端,新产生的 N 末端可以搭合到受体的细胞外结构上,从而激活细胞内的 G 蛋白及其相关的信号通路^[3]。

PAR2 是 PARs 家族中唯一不能被凝血酶激活的受体。它可以被胰蛋白酶特异性地激活。此外还有多种内源性蛋白酶可以激活 PAR2,例如肿瘤细胞来源的 Matrilysin^[4],炎症细胞来源的 Trypsin^[5,6],以及来源于肠道内细菌的类胰蛋白酶。这些内源性的蛋白酶通过激活 PAR2,参与调节肿瘤细胞生长^[7],血管及淋巴管的形成以及肿瘤细胞的浸润和转移,在肿瘤的发展过程中发挥着重要作用^[8-10]。我们在前期研究中发现 PAR2 在发生

淋巴结转移的结肠癌组织中表达上升^[11]。这些都强烈提示 PAR2 参与结肠癌细胞的侵袭转移。

细胞-细胞间和细胞-基质之间粘附能力与肿瘤转移间存在非常重要的联系。因此,本研究将关注 PAR2 激活对结肠癌细胞粘附能力的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂

PAR2 稳转敲降质粒购于傲锐东源公司,PAR2 激活多肽(SLIGRL)由上海楚泰生物科技有限公司合成;PAR2 抗体为 Santa cruz 公司产品,β-actin 抗体为 sigma 公司产品;细胞培养液为 Hyclone 公司产品;SDS-PAGE 试剂均购自伯乐公司;MTT 及 DMSO 等生化试剂购于上海生工生物工程股份有限公司。

1.2 Western Blot

RIPA 法提取细胞总蛋白,取 50 μg 蛋白质以 10%

* 基金项目:国家重点基础研究发展 973 规划项目(2012CB967000);国家自然科学基金青年科学基金项目(81201966)

作者简介:马怡茗(1983-),女,博士,中级,主要研究方向:分子肿瘤,电话:010-87787384,E-mail: removal@163.com

△通讯作者:汪红英,E-mail: hongyingwang@cicams.ac.cn

(收稿日期:2014-08-13 接受日期:2014-09-09)

SDS-PAGE 电泳进行分离。随后,通过湿转法将蛋白转至 0.45 μ M 孔径 PVDF 膜。用 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,并与一抗进行杂交。4℃ 过夜孵育后,用 HRP 标记二抗进行杂交后反应底物进行显色。

1.3 RNA 提取和实时定量 PCR

TRIzol 法提取细胞总 RNA, 去除 DNA 污染后使用 invitrogen 公司的 Superscript First-Strand Synthesis System 试剂盒逆转录为 cDNA。采用伯乐公司 SYBR Green supermix 检测 PAR2 的表达水平,以 GAPDH 作为内参,商售引物购自于复能基因。

1.4 稳定敲降细胞系的构建

以 HT29 细胞作为亲本, 利用脂质体 lipofectamin2000 转染细胞,6 小时后换液。继续培养 24 小时后,消化细胞按 1:6 分瓶,并向培养液中加入 1 ng/mL 嘌呤霉素筛选持续选 10 天,每 3 天更换培养液。挑去单克隆,扩大培养,并提取 RNA 和细胞总蛋白,采用 real-time PCR 和 Western Blot 鉴定干扰效率。

1.5 细胞粘附实验

分别选择 Matrigel 和 Fn 处理细胞培养板, 模拟体内基质环境。Matrigel 组:将 Matrigel 以 1:3 稀释后涂 0.5 mm 图层于 96 孔板底部,无菌吹干;Fn 组:配置浓度为 50 g/L 的 Fn,取 50 μ l 加入 96 孔板底,室温孵育过夜,PBS 洗三次后,加入 2 mg/BSA 封闭 2 h,备用。

每孔分别种入 10^4 细胞,分别粘附 0.5 h,1 h 和 1.5 h 后,洗去上层未贴壁细胞,以 MTT 法检测贴壁细胞量。

1.6 统计学方法

采用 t test 对结果进行统计学分析, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 PAR2 激活促进 HT29 细胞与基质的粘附

无血清培养液饥饿细胞 1h 后, 向细胞培养液中加入终浓度为 50 M 的激活短肽 (SLI),继续培养 12 h。采用 Invitrogen 公司的无酶消化液分散细胞,进行细胞粘附实验。结果如图所示,PAR2 激活的细胞对 Matrigel 和 FN 的粘附能力显著提高,且细胞与 Matrigel 的粘附能力更强。

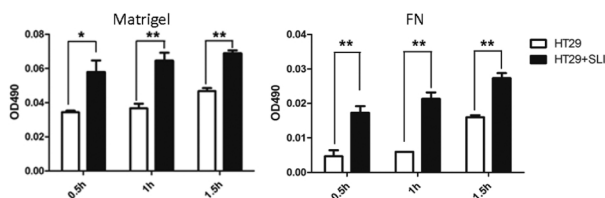


图 1 PAR2 激活提高结肠癌细胞与基质的粘附能力

Fig. 1 Activation of PAR2 increased colorectal cancer cell- ECM adhesion
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.2 PAR2 敲降效率检测

建立 PAR2 稳定敲降的 HT29 细胞株,同时以转染无干扰效果片段作为对照。Realtime PCR 和 Western blot 检测结果显示,HT29-PAR2i 细胞中 PAR2 的敲降效率为 67.4%。

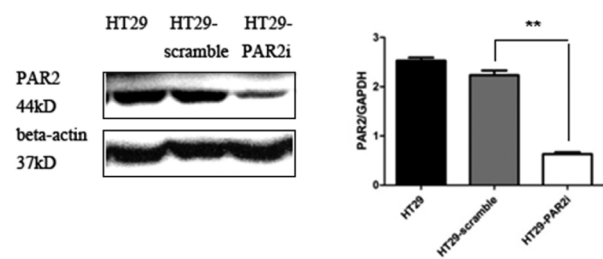


图 2 Western blot 和 real-time PCR 检测 PAR2 的敲降效率

Fig. 2 Western blot and real-time PCR detection of PAR2 knock down efficiency

2.3 PAR2 敲降降低 HT29 细胞与基质的粘附

利用 PAR2 敲降细胞, 检测 PAR2 对细胞粘附作用的影响。结果如图所示,PAR2 敲降显著降低细胞与 Matrigel 和 FN 的粘附作用。

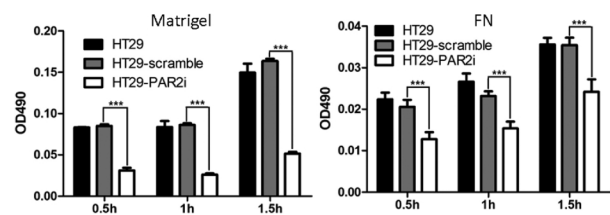


图 3 PAR2 敲降降低肿瘤细胞与基质的粘附作用

Fig. 3 Deficiency of PAR2 inhibited adhesion between cancer cell and ECM

3 讨论

肿瘤的转移是一个多步骤、复杂的过程,包括肿瘤细胞侵袭,对周围组织、血管及淋巴的浸润,转移后的增生等步骤^[12]。肿瘤转移是导致癌症患者死亡的主要原因,但肿瘤细胞转移的确切机制仍被完全阐明^[13,14]。一个关键问题是肿瘤细胞如何从原位组织脱离,然后锚定于新的组织并起始增殖形成转移灶^[15]。人体内的细胞通常与称作细胞外基质的结构支持系统相连接,细胞外基质可帮助调节细胞的行为。因此本研究将研究重点放在肿瘤细胞与基质的粘附作用。

转移的早期发生在肿瘤及其癌旁组织,这一区域内包括肿瘤细胞、正常上皮细胞、间质细胞和免疫细胞等多种细胞。在肿瘤与癌旁相交的微环境中,富集了细胞代谢、或分泌产生的各种物质,它们在细胞间的相互作用中发挥着重要的传递信息的作用^[16]。而蛋白酶是肿瘤微环境中重要的成分之一。在肿瘤组织中,胰蛋白酶分布于浸润生长的前端,而且胰蛋白酶的多少与肿瘤浸润深度和距离成正比,并且与预后密切相关^[17,18]。肥大细胞也参与肿瘤的侵袭和转移,它同时可以释放另一种 PAR2 激活剂 Tryptase。在这一阶段,PAR2 激活有助于肿瘤细胞获得更高运动能力,促进肿瘤细胞转移。

而当癌细胞具有转移性时,细胞可以通过一些粘附分子粘附到正常健康组织。然后,肿瘤细胞在这些组织中继续生长形成新的转移灶,研究显示转移性肿瘤选择性粘附于细胞外基质分子 fibronectin 和 galectin-3^[19,20]。在肿瘤转移灶中,上述两个分子的表达显著上升,这有助于细胞与粘附蛋白相结合,使其成功定植于正常组织。

本研究显示, PAR2 激活能够提高肿瘤细胞与 Fibronectin 和细胞基质的粘附能力。这一结果提示 PAR2 激活能够促进转移灶中肿瘤细胞与正常细胞的粘附, 促进转移灶的形成。该结果同时提示我们, 通过阻断转移灶中肿瘤细胞与正常细胞的粘附, 可能阻断肿瘤转移灶的形成, 为肿瘤治疗提供可能的靶点。

参考文献(References)

- [1] Soh U, Dores M, Chen B, et al. Signal transduction by protease-activated receptors [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2010, 2(160): 191-203
- [2] Elste A, Petersen I. Expression of proteinase-activated receptor 1-4 (PAR 1-4) in human cancer[J]. *J Mol Hist*, 2010, 2-3(41): 89-99
- [3] Macfarlane S, Seatter M, Kanke T, et al. Proteinase-Activated Receptors[J]. *Pharmacol Rev*, 2001, 2(53): 245-282
- [4] Takeuchi T, Harris J L, Huang W, et al. Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(34): 26333-26342
- [5] Steinhoff M, Corvera C U, Thoma M S, et al. Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase [J]. *Exp Dermatol*, 1999, 8 (4): 282-294
- [6] Sendo T, Sumimura T, Itoh Y, et al. Involvement of proteinase-activated receptor-2 in mast cell tryptase-induced barrier dysfunction in bovine aortic endothelial cells[J]. *Cell Signal*, 2003, 15(8): 773-781
- [7] Darmoul D, Gratio V, Devaud H, et al. Protease-activated receptor 2 in colon cancer: trypsin-induced MAPK phosphorylation and cell proliferation are mediated by epidermal growth factor receptor transactivation[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(20): 20927-20934
- [8] Su S, Li Y, Luo Y, et al. Proteinase-activated receptor 2 expression in breast cancer and its role in breast cancer cell migration[J]. *Oncogene*, 2009, 28(34): 3047-3057
- [9] Shi X, Gangadharan B, Brass L F, et al. Protease-activated receptors (PAR1 and PAR2) contribute to tumor cell motility and metastasis[J]. *Mol Cancer Res*, 2004, 2(7): 395-402
- [10] Dutra-Oliveira A, Monteiro R Q, Mariano-Oliveira A. Protease-activated receptor-2 (PAR2) mediates VEGF production through the ERK1/2 pathway in human glioblastoma cell lines [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 421(2): 221-227
- [11] Ma Y, Bao-Han W, Lv X, et al. MicroRNA-34a mediates the autocrine signaling of PAR2-activating proteinase and its role in colonic cancer cell proliferation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72383
- [12] Li S, Li Q. Cancer stem cells and tumor metastasis (Review)[J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(6): 1806-1812
- [13] Gupta G P, Massague J. Cancer metastasis: building a framework[J]. *Cell*, 2006, 127(4): 679-695
- [14] Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(6): 449-458
- [15] Metastasis: a therapeutic target for cancer[J]. *Nature clinical practice Oncology*, 2008: 206-219
- [16] Quail D F, Joyce J A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis[J]. *Nat Med*, 2013, 19(11): 1423-1437
- [17] Yamamoto H, Iku S, Adachi Y, et al. Association of trypsin expression with tumour progression and matrilysin expression in human colorectal cancer[J]. *J Pathol*, 2003, 199(2): 176-184
- [18] Soreide K, Janssen E A, Korner H, et al. Trypsin in colorectal cancer: molecular biological mechanisms of proliferation, invasion, and metastasis[J]. *J Pathol*, 2006, 209(2): 147-156
- [19] Reticker-Flynn N E, Malta D F, Winslow M M, et al. A combinatorial extracellular matrix platform identifies cell-extracellular matrix interactions that correlate with metastasis[J]. *Nat Commun*, 2012, 3: 1122
- [20] Kwon M J, Kim Y, Choi Y, et al. The extracellular domain of syndecan-2 regulates the interaction of HCT116 human colon carcinoma cells with fibronectin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 431 (3): 415-420