

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.23.004
文章编号: 1005-8982 (2018) 23-0016-05

CDH17 对那可丁耐药性结肠癌细胞 裸鼠移植瘤模型的影响 *

朱庆曦, 黄晓东, 刘蒙, 韩峥, 谭洁, 刘维洁, 陈巍, 田霞

[武汉大学同仁医院 (湖北省武汉市第三医院) 消化内科, 湖北 武汉 430060]

摘要: 目的 研究下调肝肠钙黏连蛋白 (*CDH17*) 基因对那可丁耐药的结肠癌细胞裸鼠移植瘤模型的影响。**方法** 以结肠癌细胞为研究材料, 复制结肠癌细胞裸鼠移植瘤模型。同时构建干扰质粒, 从基因和蛋白水平对 *CDH17* 进行干扰, 成功构建慢病毒载体。通过转移酶介导的末端标记法 (TUNEL) 检测下调 *CDH17* 基因对结肠癌细胞的影响。**结果** 实时聚合酶链反应和 Western blot 检测证实成功构建 *CDH17* 的干扰表达载体; TUNEL 检测表明下调 *CDH17* 基因可以促进那可丁耐药的结肠癌细胞裸鼠移植瘤模型细胞凋亡。**结论** 下调 *CDH17* 基因可以促进那可丁耐药性结肠癌细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞增殖。

关键词: *CDH17*; 那可丁; 耐药性; 结肠癌; 细胞凋亡

中图分类号: R735.35

文献标识码: A

Effect of *CDH17* on transplanted tumor model of Noscapine-resistant colon cancer cells in nude mice*

Qing-xi Zhu, Xiao-dong Huang, Meng Liu, Zheng Han, Jie Tan, Wei-jie Liu, Wei Chen, Xia Tian
[Department of Gastroenterology, Tongren Hospital of Wuhan University (Wuhan Third Hospital),
Wuhan, Hubei 430060, China]

Abstract: Objective To investigate the effect of down-regulation of *CDH17* gene on the growth of transplanted tumor model of Noscapine-resistant colon cancer cells in nude mice. **Methods** The transplanted tumor model of colon cancer cells was established in nude mice. At the same time, the interference plasmid was constructed to control the expressions of *CDH17* gene and protein. The effect of *CDH17* gene down-regulation on colon cancer cells was detected by TUNEL method. **Results** RT-PCR and Western blot confirmed that the *CDH17* interference expression vector was successfully constructed. TUNEL method showed that down-regulation of *CDH17* gene promoted the apoptosis of Noscapine-resistant colon cancer cells of transplantation tumor model in nude mice. **Conclusions** Down-regulation of *CDH17* gene can promote the apoptosis of Noscapine-resistant colon cancer cells and inhibit the proliferation of tumor cells.

Keywords: *CDH17*; Noscapine; drug-resistance; colon cancer; apoptosis

结肠癌是全球常见的消化道恶性肿瘤之一, 居世界癌症相关致死率的第 2 位, 每年约 70 万患者死于结肠癌。目前结肠癌的治疗是以手术切除为主的综合

治疗, 化学治疗为辅, 但是大多数患者在治疗后容易复发^[1]。市面上有多种抗肿瘤药物, 其中那可丁作为一种外周性镇咳药, 能抑制肺牵张反射引起的咳嗽^[2]。

收稿日期: 2018-02-21

* 基金项目: 湖北省武汉市科技局应用基础研究计划项目 (No : 2015060101010064); 湖北省武汉市卫计委项目 (No : WX15C09)

[通信作者] 田霞: E-mail : hewy100@163.com

其可通过与微管结合、线粒体途径诱导部分肿瘤或影响正常细胞周期进程, 从而促进细胞凋亡^[3-5]。尽管实验证实那可丁没有明显的毒副作用^[6-7], 但是肿瘤细胞存在对那可丁产生耐药性问题。本研究主要探索如何增强那可丁抗肿瘤的作用, 同时降低其耐药性。

1 材料与方法

1.1 材料

那可丁 (美国 Sigma-Aldrich 公司), 逆转录试剂盒、荧光染料 SYBR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司, Western blot 检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), Annexin V、碘化物 (propidium iodide, PI) 购自美国 BioVision 公司。

1.2 方法

1.2.1 载体构建 通过软件设计合成 4 组针对靶向基因肝肠钙黏连蛋白 (liver-intestine cadherin, CDH17) 的 pre-siRNA 干扰序列, 构建带有绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 基因的 siCDH17 干扰质粒, 鉴定正确后转染那可丁耐药性结肠癌细胞, 选出干扰效果最好的 RNA 干扰序列, 构建慢病毒表达载体。最终成功完成 siCDH17 (阳性干扰组) 和 siNC (非特异性对照组) 慢病毒表达载体的构建, 慢病毒载体感染细胞感染率高达 95%, 并且作用时间长。

1.2.2 实时聚合酶链反应 (real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) 以人 β -actin 作为内参, CDH17 正向引物: 5' -GGACAGAGAAGC CGGAAGTC-3'; 反向引物 5' -GAACAAGCCCGTG TAGTCCTT-3'。根据 SYBR Premix Taq 试剂盒说明书进行 real-time PCR 检测, PCR 反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 1 min, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 共 40 个循环, 72℃ 继续延伸 8 min, 最后保存于 4℃。

1.2.3 Western blot 检测 药物作用时间结束后, 收集细胞, 进行常规细胞裂解提取并测定总蛋白浓度。取 40 μ g 蛋白加热变性 10 min 后进行 SDS-PAGE 电泳, 然后转移到硝酸纤维素膜上。转膜结束后加脱脂奶粉封闭, 4℃ 过夜。使用 TBST 洗涤 3 次, 分别加入一抗 CDH17 (ab109190) (1 : 1 000) 和 GAPDH (ab9485) (1 : 2 500) 抗体, 4℃ 孵育过夜, TBST 洗涤, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗 IgG (1 : 5 000), 25℃ 孵育 1 h, 使用电化学发光试剂盒显色, X 射线片曝光。每份样品检测重复 3 次。

1.2.4 肿瘤异种移植模型 将裸鼠随机分成空白组、非特异性对照组、阳性干扰组, 每组 7 只。在裸鼠右侧背部皮下接种人结肠癌细胞悬液, 复制裸鼠移植瘤模型, 当瘤体积达 100 ~ 150 mm³ 时, 每 3 天注射 5 mg/kg 那可丁, 同时每 3 天观察移植瘤生长情况, 进行瘤重和瘤体积的比较。

1.2.5 末端标记法 (terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL) 采用 TUNEL 检测细胞凋亡。将材料用二甲苯浸洗 2 次, 5 min/次, 过梯度酒精, 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 漂洗 2 次, 用细胞通透液处理 8 min, PBS 漂洗 3 次, 加入蛋白酶 K, 双蒸水漂洗后用 3% 过氧化氢封闭, 加入 dUTP 和过氧化氢酶培养后进行观察。当基因组 DNA 断裂时, 在暴露的 3' 端加入异硫氰酸荧光素, 通过荧光显微镜或者流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, 两两比较用 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒载体干扰 CDH17 的表达

2.1.1 CDH17 mRNA 空白组、非特异性对照组、阳性干扰组的 CDH17 mRNA 相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较经 SNK- q 检验, 非特异性对照组与空白组 CDH17 mRNA 表达水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 阳性干扰组与空白组比较, CDH17 mRNA 表达量降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.1.2 CDH17 蛋白 空白组、非特异性对照组、阳性干扰组的 CDH17 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较经 SNK- q 检验, 阳性干扰组的 CDH17 蛋白表达受到抑制, 较空白组和非特异性干扰组降低 ($P < 0.05$); 非特异性对照组与空白组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。mRNA 和蛋白水平结果说明, 转染慢病毒表达载体成功干扰 CDH17 的表达。见表 1 和图 1。

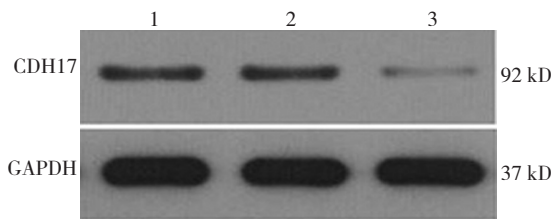
2.2 下调 CDH17 基因抑制结肠癌细胞增殖

2.2.1 肿瘤体积 空白组、非特异性对照组、阳性

表 1 各组 CDH17 mRNA 和蛋白的表达水平比较 (n=7, $\bar{x} \pm s$)

组别	CDH17 mRNA	CDH17 蛋白
空白组	1.002 ± 0.068	0.861 ± 0.006
非特异性对照组	0.910 ± 0.085	0.851 ± 0.008
阳性干扰组	0.217 ± 0.076 ¹⁾²⁾	0.229 ± 0.009 ¹⁾²⁾
F 值	94.676	4165.432
P 值	0.000	0.000

注: 1) 与空白组比较, P<0.05; 2) 与非特异性对照组比较, P<0.05



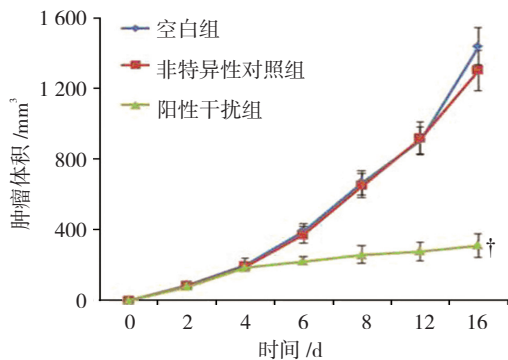
1: 空白组; 2: 非特异性对照组; 3: 阳性干扰组
图 1 慢病毒载体干扰 CDH17 蛋白的表达

干扰组肿瘤异种移植模型在移植后 2、4、6、8、12 和 16 d 的肿瘤体积比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点动物体内肿瘤体积有差别

表 2 各组不同时间点动物模型体内肿瘤体积比较 (n=7, mm³, $\bar{x} \pm s$)

组别	2 d	4 d	6 d	8 d	12 d	16 d
空白组	107.712 ± 17.371	206.997 ± 27.176	339.189 ± 32.375	614.772 ± 79.036	923.893 ± 80.393	1382.926 ± 92.188
非特异性对照组	106.418 ± 15.147	205.290 ± 26.383	333.373 ± 29.674	593.399 ± 64.778	912.509 ± 60.511	1299.444 ± 74.942
阳性干扰组	107.781 ± 14.307	207.926 ± 20.681	238.861 ± 25.701 ¹⁾²⁾	256.232 ± 49.584 ¹⁾²⁾	288.722 ± 58.979 ¹⁾²⁾	303.473 ± 56.529 ¹⁾²⁾

注: 1) 与空白组比较, P<0.05; 2) 与非特异性对照组比较, P<0.05



† 与空白组、非特异性对照组比较, P<0.05

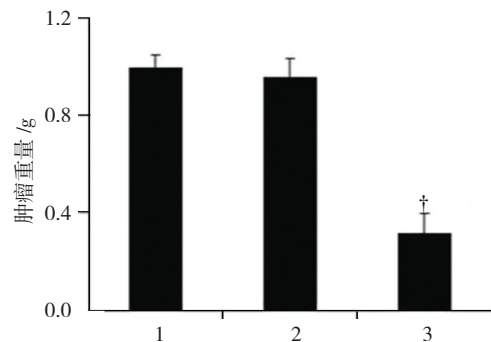
图 2 各组动物模型体内肿瘤体积不同时间点变化趋势 ($\bar{x} \pm s$)

(F=14.582, P=0.000)。从第 6 天开始, 阳性干扰组与空白组、非特异性对照组肿瘤体积比较, 差异有统计学意义 (P<0.05), 阳性干扰组肿瘤体积大于空白组和非特异性对照组。② 3 组动物体内肿瘤体积有差别 (F=189.081, P=0.000), 阳性干扰组较空白组、非特异性对照组动物体内肿瘤体积小 (P<0.05), 抑瘤效果较好; 非特异性对照组与空白组动物体内肿瘤体积比较, 差异无统计学意义 (P>0.05)。③ 3 组肿瘤体积变化趋势有差异 (F=5.731, P=0.018)。见表 2 和图 2。

2.2.2 肿瘤重量 移植后 16 d, 空白组、非特异性对照组、阳性干扰组动物模型体内肿瘤重量分别为 (0.956 ± 0.023)、(0.908 ± 0.026) 和 (0.321 ± 0.037) g, 经单因素方差分析, 差异有统计意义 (F=304.337, P=0.000), 阳性干扰组肿瘤重量低于空白组和非特异性对照组。见图 3。

2.3 下调 CDH17 基因促进细胞凋亡

利用慢病毒表达载体干扰结肠癌细胞, 与空白组结肠癌细胞和慢病毒干扰载体结肠癌非特异性对照组相比, TUNEL 检测发现阳性干扰组肿瘤异种移植模型体内结肠癌细胞凋亡数明显增多。见图 4。



1: 空白组; 2: 非特异性对照组; 3: 阳性干扰组。† 与空白组、非特异性对照组比较, P<0.05

图 3 各组动物模型体内肿瘤重量比较 (n=7, $\bar{x} \pm s$)

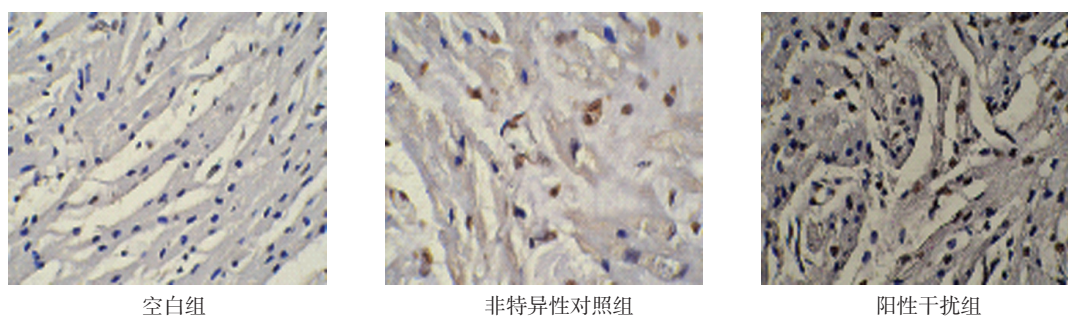


图 4 各组细胞凋亡情况 (×200)

3 讨论

近年来结肠癌患者的生存率无明显改善,且发病率呈上升趋势,每年新增 900 万确诊病例,其中东欧、南美和东亚地区发病率最高^[8]。我国结肠癌的发病率较高,其致死率高于其他恶性肿瘤^[9]。随着分子生物学的发展,以及人类对疾病与基因关系认识的提高,联合化学治疗的基因治疗得到越来越多的认可。化学基因治疗可以增加肿瘤细胞对化学药物的敏感性,而肿瘤基因治疗即针对肿瘤发生、发展过程中的遗传性背景,明确缺失、突变等缺陷基因的作用,过表达或者下调肿瘤细胞,以及其他体细胞中特定基因已补偿或者纠正错误基因,达到治疗肿瘤的目的。

细胞间的黏附机制在肿瘤侵袭转移过程中起双重作用。一方面肿瘤细胞必须先从其原发病灶黏附部位脱离,故黏附可抑制侵袭;另一方面,肿瘤细胞需要从连续的黏附和去黏附过程中获得牵引力来进行移动。细胞黏附分子与肿瘤的侵袭转移密切相关,起至关重要的作用。CDH17 是钙黏连蛋白超家族中结构特殊的一员,是对经典钙黏连蛋白和桥粒钙黏连蛋白功能的补充,CDH17 通常在人肠道上皮细胞及部分胰管上皮细胞中表达^[10-11]。目前还没有 CDH17 在正常人结肠癌中表达的报道,而其在胃癌、肝癌中都有表达^[12-14],这说明 CDH17 可能在肿瘤进程中扮演重要角色,与结肠癌的发生密切相关。

近几年国内针对那可丁对肿瘤细胞的影响有所研究,有研究者通过那可丁联合顺铂作用于体外培养人卵巢癌 SKOV3 细胞,结果显示那可丁可以协同顺铂作用于 SKOV3 细胞,并提高顺铂对 SKOV3 细胞的敏感性^[15]。在针对卵巢癌的研究过程中发现,那可丁可以通过抑制介导肿瘤生存的关键因子—低氧诱导因子-1,提高卵巢癌细胞对化疗药物的敏感性^[16]。已经证实,那可丁作为抗癌新药能通过线粒体途径促进肿

瘤细胞的凋亡,但具有耐药性,如何能增强那可丁抗肿瘤的作用,同时降低其耐药性是本实验的主要内容。

本实验从动物模型探讨下调 CDH17 基因表达对那可丁耐药的结肠癌细胞的抑制作用。实验结果从基因和蛋白水平分别验证 siCDH17 慢病毒载体的成功构建。小鼠模型是可以进行肿瘤临床和基础研究的主要方法,涉及各个领域。实验结果说明,siCDH17 对动物模型体内肿瘤的发生、发展有较好的抑制作用。为研究 siCDH17 对耐药性结肠癌细胞的影响,采用 TUNEL 结合 Annexin V/PI 双染色法检测细胞凋亡情况。TUNEL 检测结果显示,阳性干扰组细胞凋亡数量远多于其他两组。有研究发现,CDH17 的表达与人胃癌、肝癌、胰腺癌、结肠癌有相关性,CDH17 的表达水平在肠型癌症组织中比肝、胃型癌组织要高^[10]。

综上所述,本实验结果表明,下调 CDH17 基因对那可丁耐药的结肠癌细胞具有明显的抑制作用,主要表现在早期细胞的凋亡及后续发展上。本研究在分子水平上探讨 CDH17 在耐药性肿瘤中的作用,是对临床治疗肿瘤新药物耐药性的研究,也是对前人在肿瘤分子机制方面研究的基础上,在临床药物方面的延伸,为临床治疗耐药性肿瘤提供相关数据及研究方向。

参考文献:

- [1] HUANG B, FENG Y, MO S B, et al. Smaller tumor size is associated with poor survival in T4b colon cancer[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(29): 6726-6735.
- [2] JACKSON T, CHOUGULE M B, ICHITE N, et al. Antitumor activity of noscapine in human non-smallcell lung cancer xenograft model[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2008, 63(1): 117-126.
- [3] LANDEN J W, LANG R, MCMAHON S J, et al. Noscapine alters microtubule dynamics in living cells and inhibits the progression of melanoma[J]. Cancer Res, 2002, 62(14): 4109-4114.
- [4] KE Y, YE K, GROSSNIKLAUS H E, et al. Noscapine inhibits tumor growth with little toxicity to normal tissues or inhibition

- of immune responses[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2000, 49(4/5): 217-225.
- [5] LIU M, LUO X J, LIAO F, et al. Noscapine induces mitochondria-mediated apoptosis in gastric cancer cells in vitro and in vivo[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011, 67(3): 605-612.
- [6] SIDDIQUI M, RAJKUMAR S V. The high cost of cancer drugs and what we can do about it[J]. *Mayo Clin Proc*, 2012, 87(10): 935-943.
- [7] YARED J A, TKACZUK K H. Update on taxane development: new analogs and new formulations[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2012, 6: 371-384.
- [8] PAI P, RACHAGANI S, DHAWAN P, et al. MUC4 is negatively regulated through the Wnt/ β -catenin pathway via notch effector Hath1 in colorectal cancer[J]. *Genes Cancer*, 2016, 7(5/6): 154-168.
- [9] van ERNINQ F N, ZANDERS M M, KUIPER J G, et al. Drug dispensings among elderly in the year before colon cancer diagnosis versus matched cancer-free controls[J]. *J Clin Pharm Ther*, 2016, 41(5): DOI: org/10.1111/jcpt.12434.
- [10] LIU Q S, ZHANG J, LIU M, et al. Lentiviral-mediated miRNA against liver-intestine cadherin suppresses tumor growth and invasiveness of human gastric cancer[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(8): 1807-1812.
- [11] GESSNER R, TAUBER R. Intestinal cell adhesion molecules. Liver-intestine cadherin[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 915: 136-143.
- [12] HINOI T, LUCAS P C, KUICK R, et al. CDX2 regulates liver intestine-cadherin expression in normal and malignant colon epithelium and intestinal metaplasia[J]. *Gastroenterol*, 2009, 123(5): 1565-1577.
- [13] TAKAMURA M, ICHIDA T, MATSUDA Y, et al. Reduced expression of liver-intestine cadherin is associated with progression and lymph node metastasis of human colorectal carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2008, 212(2): 253-259.
- [14] KWAK J M, MIN B W, LEE J H, et al. The prognostic significance of E-cadherin and liver intestine-cadherin expression in colorectal cancer[J]. *Dis Colon Rectum*, 2007, 50(11): 1873-1880.
- [15] 申薇, 梁冰锋, 秦金金, 等. 那可丁联合顺铂对人卵巢癌 SKOV3 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2016, 1(36): 303-305.
- [16] 苏文敬. 那可丁通过抑制 HIF-1 α 提高低氧卵巢癌细胞化疗敏感性 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2010: 1-2.

(童颖丹 编辑)