

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.04.004

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.04.004

$\alpha 6$ 整合素通过激活 TGF β /Smad2 通路促进结直肠癌迁移与侵袭

祝子雯^{1,2,3}, 詹娜⁴, 董卫国^{1,2,3}

(武汉大学人民医院 1. 消化内科; 2. 消化系统疾病湖北省重点实验室; 3. 中心实验室; 4. 病理科, 武汉 430060)

[摘要] 目的: 探讨 $\alpha 6$ 整合素(integrin $\alpha 6$, ITGA6)在结直肠癌(colorectal cancer, CRC)中的表达及其对迁移与侵袭的影响。方法: 使用生物信息分析ITGA6在CRC中的表达, Western印迹法检测其在CRC组织及细胞中的表达; 使用瞬时转染方法建立ITGA6过表达SW480及HCT116细胞及对照细胞株; Transwell迁移及侵袭实验检测ITGA6对CRC细胞迁移及侵袭能力的影响。于倒置显微镜下观察CRC细胞形态的改变; Western印迹法及免疫荧光检测ITGA6过表达细胞及对照细胞中上皮-钙黏素(E-cadherin), 神经-钙黏素(N-cadherin)及波形蛋白(vimentin)的表达; 基因集合富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)与ITGA6相关的通路并通过Western印迹法验证。结果: ITGA6在CRC组织和细胞中的表达明显高于对照组织及肠上皮永生细胞; 过表达ITGA6后, SW480和HCT116细胞从圆形、短梭形变得更为细长, 整个细胞形态向长梭形转变。Transwell结果显示过表达ITGA6可促进CRC细胞迁移及侵袭能力; Western印迹法及免疫荧光显示过表达ITGA6后, E-cadherin表达下调, N-cadherin及vimentin的表达上调; GSEA发现ITGA6的过表达可上调TGF β 通路表达, Western印迹法检测显示过表达ITGA6可激活TGF β /Smad2通路。结论: ITGA6在CRC中高表达, 并可通过激活TGF β /Smad2通路促进CRC细胞上皮-间质转化和肿瘤转移。

[关键词] 结直肠癌; $\alpha 6$ 整合素; EMT; TGF β /Smad2通路

Effect of integrin $\alpha 6$ on migration and invasion ability of colorectal cancer via TGF β /Smad2 pathway

ZHU Ziwen^{1,2,3}, ZHAN Na⁴, DONG Weiguo^{1,2,3}

(1. Department of Gastroenterology; 2. Hubei Key Laboratory of Digestive System Disease; 3. Central Laboratory; 4. Department of Pathology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expression of integrin $\alpha 6$ (ITGA6) in colorectal cancer and explore the effect of ITGA6 on migration and invasion ability. **Methods:** Bioinformatics was used to analysis the expression of ITGA6 in colorectal cancer, Western blot was chosen to detect ITGA6 expression in colorectal cancer specimens and cell lines, transient transfection of ITGA6 and control plasmid was selected to construct SW480, HCT116 ITGA6 overexpressed cells and control cells, Transwell assays were used to detect colorectal cancer (CRC) cell migration and invasion ability, inverted microscope was used to analysis the morphology of cultured cell, the effect of ITGA6

收稿日期 (Date of reception): 2018-01-01

通信作者 (Corresponding author): 董卫国, Email: dongweiguo@whu.edu.cn

overexpression on epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers (E-cadherin, N-cadherin, vimentin) was obtained by Western blot and immunofluorescence assays. Gene set enrichment analysis (GSEA) was selected to explore ITGA6 related pathway and Western blot was further used to verify. **Results:** ITGA6 expression level was significantly higher in CRC tissues and CRC cells compared with paired normal mucosa and normal mucosa cell, after ITGA6 overexpression, morphology of SW480 and HCT116 cells changed from spheroid to spindle; Transwell assays showed ITGA6 overexpression enhanced migration and invasion ability; Western blot and immunofluorescence results showed ITGA6 overexpression reduced epithelial marker E-cadherin and upregulated mesenchymal markers N-cadherin, vimentin, GSEA analysis showed ITGA6 was positively related with TGFβ pathway, Western blot results confirmed ITGA6 could activate TGFβ/Smad2 pathway. **Conclusion:** ITGA6 was overexpresses in colorectal cancer and modulates TGFβ/SMAD2 pathway to induce EMT and promote metastasis.

Keywords colorectal cancer; integrin α6; epithelial-mesenchymal transition; TGFβ/Smad2 pathway

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是最常见的消化道恶性肿瘤之一, 其发病率居所有恶性肿瘤第4位, 病死率居第5位^[1], 而转移是导致CRC患者死亡的主要原因^[2]。研究^[3]证实: 肿瘤细胞上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是肿瘤转移的重要策略, 肿瘤细胞通过发生EMT, 失去上皮细胞极性, 向间质形态转变, 以获得更好的侵袭、迁移和治疗抵抗的能力, 并伴随着上皮标志物如上皮-钙黏素(E-cadherin), ZO-1等的减少和间质标志物如神经-钙黏素(N-cadherin), 波形蛋白(vimentin)等的增加。EMT的发生是个多级联复杂的过程, 而信号转导与EMT密切相关, 尤其是TGFβ/Smad2信号通路^[4]。因此, 针对EMT及其调控通路的研究有望为解决肿瘤转移提供新策略。

整合素是一类位于胞膜的信号转导受体, 通过与细胞外基质和肿瘤微环境相互作用, 激活胞内信号转导, 调控细胞骨架的改变, 促进肿瘤转移^[5]。α6整合素(integrin α6, ITGA6)是整合素家族的一员。ITGA6在乳腺癌^[6-7]、头颈部鳞状细胞癌^[8]、食管鳞状细胞癌^[9]等多种肿瘤中高表达, 并调控肿瘤增殖、转移、治疗抵抗等多种恶性生物学行为。但ITGA6在CRC中的功能及其潜在的分子机制尚不清楚。本研究拟探讨ITGA6在CRC中的表达及其对迁移与侵袭的影响, 为临床改善患者预后提供新方向。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株

人CRC细胞株HT29, HCT116, SW480, SW620, LOVO及人结肠上皮永生化细胞NCM460均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞

库。所有细胞用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基培养于37℃, 5%CO₂的培养箱中。

1.1.2 组织标本来源

8例经病理学检查确诊为CRC的新鲜CRC组织均取自武汉大学人民医院, 且患者术前均未接受过放化疗及免疫治疗。分别取无坏死癌组织及癌旁5 cm正常组织标本各1块, PBS冲洗后立即放入液氮中保存。

1.1.3 主要试剂

RPMI 1640培养基及胎牛血清购自美国Gibco公司, ITGA6单克隆抗体(1:1 000)购自美国Santa Cruz公司, GAPDH(1:1 000)单抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司, E-cadherin[1:1 000(Wb), 1:100(IF)], N-cadherin(1:500)及vimentin[1:500(Wb), 1:50(IF)]单克隆抗体购自美国Abcam公司。Transwell小室及基质胶购自美国BD公司, ITGA6过表达载体购自苏州吉玛基因股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 Western 印迹法

常规方法提取CRC及癌旁正常组织、CRC细胞总蛋白, 用10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶进行电泳, 转膜结束后5%脱脂奶粉封闭1 h, 人ITGA6(1:1 000), E-cadherin(1:1 000), N-cadherin(1:500)及vimentin(1:500)单克隆抗体孵育过夜, 次日加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000), 室温孵育1 h后常规显色发光。

1.2.2 免疫荧光

细胞消化计数后铺于共聚焦小皿中, 24 h后固定、漂洗, 一抗过夜, 次日加入荧光二抗(1:250)避光反应1 h, 漂洗后DAPI染色, 激光共聚焦显微

镜下观察拍照。

1.2.3 Transwell 迁移及侵袭试验

消化计数细胞, 将不含胎牛血清的细胞悬液加入Transwell上室, 下室加入含20%胎牛血清的RIPM 1640培养基, 培养箱中孵育48 h, 取出, 固定, 染色, 拍照并计算穿出细胞数。

1.2.4 Transwell 侵袭试验

于Transwell上室加入1:8稀释的基质胶(每孔60 μ L), 培养箱中孵育4 h, 消化计数细胞后加入不含胎牛血清的细胞悬液, 下室中加入含20%胎牛血清的RIPM 1640培养基, 置培养箱中孵育48 h, 取出, 固定, 染色, 用棉签刮除上室基质胶, 拍照并计算穿出细胞数。

1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0统计软件进行数据分析, 计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两样本均数比较采用 t 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ITGA6 在 CRC 中的表达

通过分析肿瘤相关数据库(Oncomine数据库), 发现与正常肠黏膜组织相比, ITGA6在CRC中表达明显上调(Fold=3.473, $P<0.001$; 图1A)。Western

印迹法结果显示: ITGA6在CRC细胞HT29, HCT116, SW480, SW620及LOVO中的表达均高于人结肠上皮永生细胞NCM460(图1B); 8对新鲜CRC组织中, 与癌旁配对正常组织相比, 7例ITGA6表达上调($P<0.01$; 图1C, 1D)。

2.2 ITGA6 对 CRC 细胞迁移和侵袭能力的影响

瞬时转染ITGA6过表达质粒, Transwell迁移及侵袭实验结果显示: 与对照细胞相比, 过表达ITGA6后, 侵袭和迁移出的CRC细胞SW480和HCT116数目明显增多, 差异有统计学意义(均 $P<0.001$; 图2A, 2B)。

2.3 ITGA6 对 CRC 细胞 EMT 的影响

通过形态学观察发现: 过表达ITGA6后, SW480和HCT116细胞从圆形、短梭形变得更为细长, 整个细胞形态向长梭形转变(图3A)。而细胞形态学改变又常常与EMT相关, 提示ITGA6可能诱导CRC细胞发生EMT。Western印迹法结果显示: 与对照细胞相比, 过表达ITGA6后, E-cadherin表达下调, N-cadherin及vimentin的表达上调(图3B)。免疫荧光结果显示: 过表达ITGA6后, E-cadherin表达下调, 而vimentin的表达上调(图3C)。

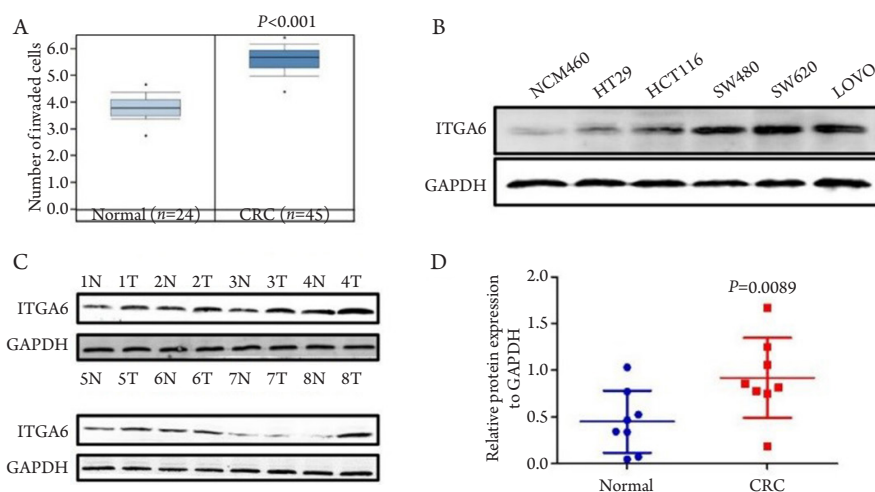


图1 ITGA6在CRC中的表达水平

Figure 1 Expression level of ITGA6 in CRC

(A) Oncomine数据库分析24例正常肠黏膜组织和45例CRC组织中ITGA6的表达; (B) Western印迹法检测ITGA6在永生结肠黏膜上皮细胞NCM460和5种CRC细胞中的表达水平; (C) Western印迹法检测ITGA6在8例CRC组织的表达; (D) Western印迹法检测ITGA6在8例CRC配对癌旁正常组织中的表达。

(A) Expression level of ITGA6 in 24 normal mucosa tissue specimens and 45 CRC tissues in Oncomine database; (B) ITGA6 expression in normal mucosa cell NCM460 and 5 CRC cells detected by Western bolt; (C) Expression of ITGA6 in 8 CRC tissues detected by Western bolt; (D) Expression of ITGA6 in 8 paired normal mucosa detected by Western bolt.

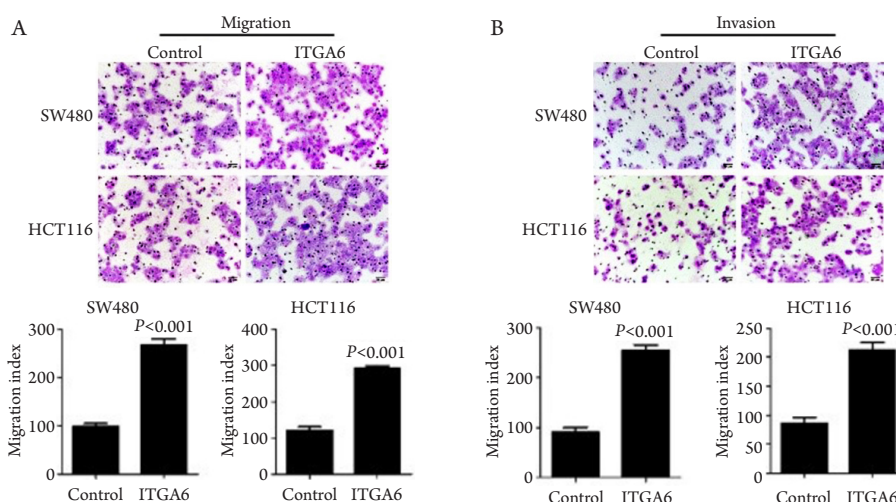


图2 Transwell检测过表达ITGA6对细胞迁移、侵袭能力的影响

Figure 2 Effect of ITGA6 overexpression on migration and invasion ability detected by Transwell assay

(A)过表达ITGA6后对SW480, HCT116细胞迁移能力的影响; (B)过表达ITGA6后对SW480, HCT116细胞侵袭能力的影响。
(A) Effect of ITGA6 on migration ability in SW480 and HCT116 cells; (B) Effect of ITGA6 on invasion ability in SW480 and HCT116 cells.

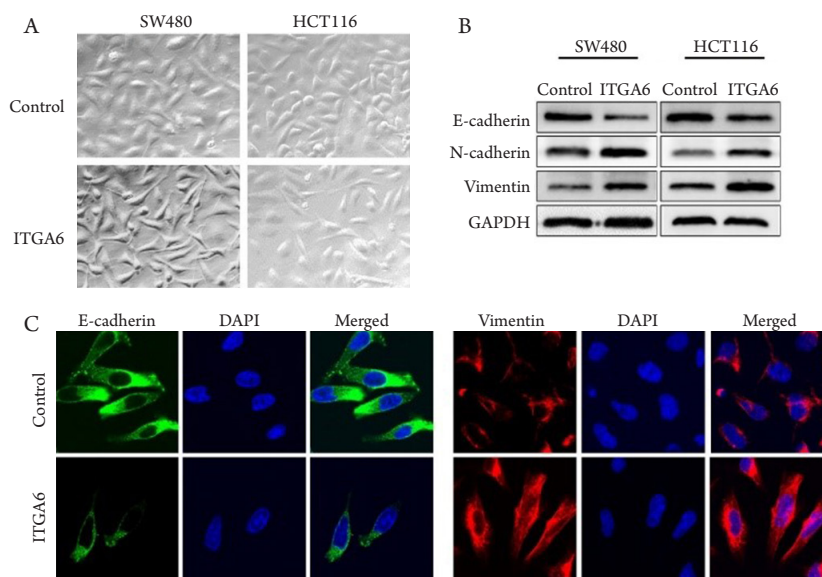


图3 ITGA6对CRC EMT的影响

Figure 3 Effect of ITGA6 overexpression on EMT

(A) 过表达ITGA6后对细胞形态学的影响; (B)Western印迹法检测过表达ITGA6对EMT标志物的改变; (C) 检测免疫荧光检测过表达ITGA6对EMT标志物的改变。
(A) Effect of ITGA6 overexpression on cell morphological feature; (B) Effect of ITGA6 overexpression of EMT markers detected by Western bolt; (C) Effect of ITGA6 overexpression of EMT markers detected by immunofluorescence assays.

2.4 ITGA6对TGFβ信号通路的影响

上述结果证实ITGA6通过调控EMT促进CRC侵袭转移, 而EMT的发生与肿瘤细胞内信号转导过程密切相关, 为挖掘ITGA6潜在调控的信号通路, 本研究通过基因集合富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)CRCGEO数据库

GSE8671, 在2个基因集中均发现ITGA6与TGFβ通路呈正相关, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$, 图4A)。Western印迹法检测发现: 过表达ITGA6后, p-Smad2表达增加, 证明TGFβ/Smad2通路被激活, 差异有统计学意义($P < 0.001$; 图4B, 4C)。

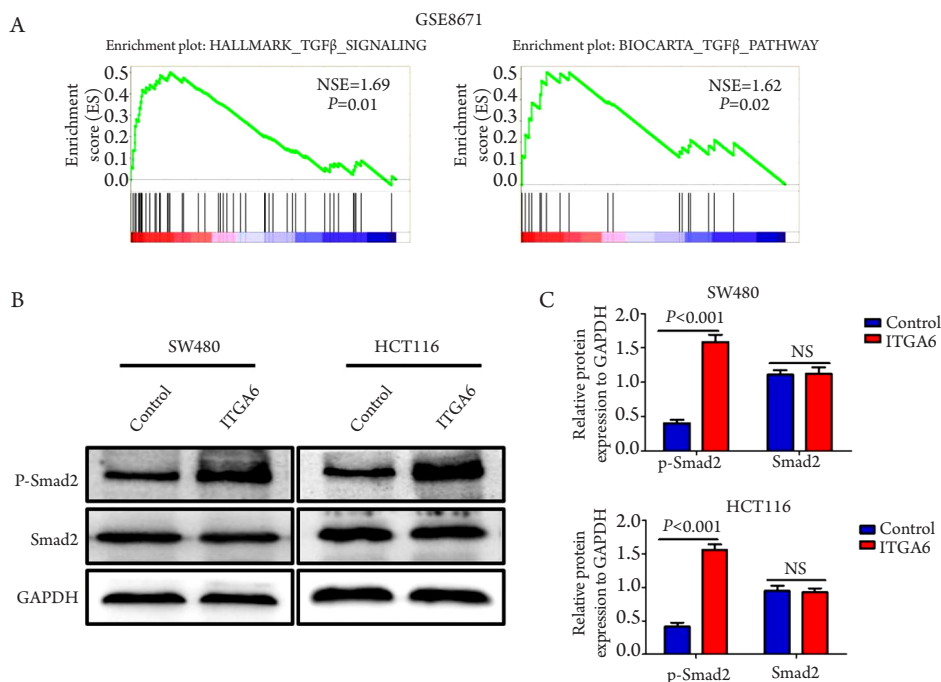


图4 ITGA6对TGF β 通路的影响

Figure 4 Effect of ITGA6 on TGF β pathway

(A) GSEA分析ITGA6相关信号通路; (B) Western印迹法检测ITGA6对TGF β 通路的作用; (C)图4B中SW480和HCT116蛋白的定量分析。

(A) Analysis of ITGA6 related pathway by GSEA; (B) Effect of ITGA6 on TGF β pathway activation detected by Western bolt; (C) Quantitative analysis of SW480 and HCT116 in Figure 4B.

3 讨论

CRC在我国呈现高发病率和 high 病死率的特征^[1], 其高发病率可能与人民生活水平改善、肉质类饮食增加有关, 而高病死率则与转移密切相关。研究^[10]显示: I期CRC 5年生存率高达90%以上, 而IV期仅约10%。因此, 探索CRC转移的分子机制, 可能为临床改善患者预后提供新方向。

生理情况下EMT是生物发育发展的重要过程^[11], 但在某些病理情况下, 如肿瘤发生时, 肿瘤细胞则可通过发生EMT获得更强的迁移侵袭能力和治疗抵抗能力^[3-4]。EMT的发生与细胞外基质、肿瘤微环境、肿瘤相关细胞等多种因素密切相关, 而整合素作为连接细胞外基质与肿瘤细胞通讯的桥梁, 在EMT的发生过程中显得尤为重要。研究^[12-14]报道: 多种整合素可调控EMT的发生, 如ITGB4通过FAK/SOX2/HIF-1 α 信号轴促进EMT, 诱导胃癌转移^[12]; 三阴性乳腺癌中, 靶向沉默ITGB3则削弱TGF β 诱导的EMT和肿瘤转移^[13]; 胶质瘤中, ITGASB1调控AKT/ β -catenin通路促进胶质瘤迁移与治疗抵抗^[14]。因此针对整合素家族成员的

研究有望进一步明确EMT发生的分子机制。

本研究通过Oncomine数据库的分析, 发现ITGA6在CRC中高表达。研究^[6-9]报道: ITGA6在乳腺癌^[6-7]、头颈部鳞状细胞癌^[8]、食管鳞状细胞癌^[9]等多种肿瘤也存在高表达。本研究通过细胞水平和组织水平的双重验证, 证实ITGA6在CRC中高表达, 提示ITGA6是个潜在的癌基因。当前针对ITGA6生物学功能的报道仍不多, 主要集中于乳腺癌的研究。Cariati等^[7]发现ITGA6能显著促进乳腺癌的成瘤能力, 是个潜在的抗癌靶点。Brooks等^[6]进一步研究发现: ITGA6是HIF-1 α 的下游靶点, 是HIF-1 α 促进干性和转移的重要桥梁。此外, ITGA6还能活化AKT/ERK信号通路, 介导乳腺癌放疗抵抗^[15]。Laudato等^[16]发现: 在CRC中, miR-30e-5p是肿瘤抑制因子P53的下游效应分子, 并成功鉴定出ITGB1和ITGA6为miR-30e-5p的靶基因, 但并未对ITGA6的表达模式、生物学行为和调控的分子机制进行深入研究。因此推测ITGA6是一个CRC相关的促癌基因。本研究的体外实验证明: ITGA6的过表达显著增加CRC细胞SW480和HCT116的迁移、侵袭能力; 而通过形态学观察发现: ITGA6过表

达的细胞具有更长梭的针刺样形态,提示ITGA6可能诱导肿瘤细胞EMT。有研究^[17]通过对模式细胞犬肾细胞进行研究发现:癌基因K-Ras介导的ITGA6表达能促使细胞发生EMT的改变。同时本研究通过对EMT标志物的改变,也证实ITGA6可下调E-cadherin,上调N-cadherin及vimentin,提示ITGA6在CRC中高表达,并调控EMT,介导肿瘤侵袭转移。

EMT的发生与细胞胞内信号转导密切相关,而整合素是介导信号转导的关键分子。本研究通过GSEA分析ITGA6潜在调控的信号通路,发现ITGA6与TGFβ信号通路密切相关。TGFβ通路是EMT最为相关的通路之一,一方面通过Smad依赖方式,磷酸化Smad2, Smad3,与Smad4形成转录复合体,调控EMT的发生;另一方面,通过Smad非依赖方式,直接或间接调控PI3K/AKT, MAPK, Rho GTPases等信号通路,介导肿瘤细胞发生EMT^[4]。本研究通过Western印迹检测证实:ITGA6的过表达能显著磷酸化Smad2,激活TGFβ通路,这也是ITGA6首次被证实是调控TGFβ通路的重要分子。

综上所述,本研究证实ITGA6在CRC中高表达,ITGA6的高表达通过活化TGFβ通路,诱导肿瘤细胞发生EMT,从而获得更好的迁移和侵袭能力,促进CRC转移。本研究为靶向干预EMT治疗肿瘤转移提供了一定的实验依据,未来针对ITGA6设计特异性抑制剂或拮抗剂有望成为抑制肿瘤转移的新方法。

参考文献

- Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis[J]. Science, 2011, 331(6024): 1559-1564.
- Singh M, Yelle N, Venugopal C, et al. EMT: mechanisms and therapeutic implications[J]. Pharmacol Ther, 2018, 182: 80-94.
- Derynck R, Muthusamy BP, Saeteurn KY. Signaling pathway cooperation in TGF-β-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. Curr Opin Cell Biol, 2014, 31: 56-66.
- Hamidi H, Pietila M, Ivaska J. The complexity of integrins in cancer and new scopes for therapeutic targeting[J]. Br J Cancer, 2016, 115(9): 1017-1023.
- Brooks DL, Schwab LP, Krutilina R, et al. ITGA6 is directly regulated by hypoxia-inducible factors and enriches for cancer stem cell activity and invasion in metastatic breast cancer models[J]. Mol Cancer, 2016, 15: 26.
- Cariati M, Naderi A, Brown JP, et al. Alpha-6 integrin is necessary for the tumorigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line[J]. Int J Cancer, 2008, 122(2): 298-304.
- Kinoshita T, Nohata N, Hanazawa T, et al. Tumour-suppressive microRNA-29s inhibit cancer cell migration and invasion by targeting laminin-integrin signalling in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Br J Cancer, 2013, 109(10): 2636-2645.
- Kwon J, Lee TS, Lee HW, et al. Integrin alpha 6: a novel therapeutic target in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Int J Oncol, 2013, 43(5): 1523-1530.
- Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer[J]. Lancet, 2014, 383(9927): 1490-1502.
- Nakaya Y, Sheng G. EMT in developmental morphogenesis[J]. Cancer Lett, 2013, 341(1): 9-15.
- Gan L, Meng J, Xu M, et al. Extracellular matrix protein 1 promotes cell metastasis and glucose metabolism by inducing integrin β4/FAK/SOX2/HIF-1α signaling pathway in gastric cancer[J]. Oncogene, 2018, 37(6): 744-755.
- Parvani JG, Gujrati MD, Mack MA, et al. Silencing β3 integrin by targeted ECO/siRNA nanoparticles inhibits EMT and metastasis of triple-negative breast cancer[J]. Cancer Res, 2015, 75(11): 2316-2325.
- Renner G, Noulet F, Mercier MC, et al. Expression/activation of α5β1 integrin is linked to the β-catenin signaling pathway to drive migration in glioma cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(38): 62194-62207.
- Hu T, Zhou R, Zhao Y, et al. Integrin α6/Akt/Erk signaling is essential for human breast cancer resistance to radiotherapy[J]. Sci Rep, 2016, 6: 33376.
- Laudato S, Patil N, Abba ML, et al. P53-induced miR-30e-5p inhibits colorectal cancer invasion and metastasis by targeting ITGA6 and ITGB1[J]. Int J Cancer, 2017, 141(9): 1879-1890.
- Zhang K, Myllymaki SM, Gao P, et al. Oncogenic K-Ras upregulates ITGA6 expression via FOSL1 to induce anoikis resistance and synergizes with αV-Class integrins to promote EMT[J]. Oncogene, 2017, 36(41): 5681-5694.

本文引用: 祝子雯, 詹娜, 董卫国. α6整合素通过激活TGFβ/Smad2通路促进结肠癌迁移与侵袭[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(4): 706-711. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.04.004

Cite this article as: ZHU Ziwen, ZHAN Na, DONG Weigu. Effect of integrin α6 on migration and invasion ability of colorectal cancer via TGFβ/Smad2 pathway[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2018, 38(4): 706-711. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.04.004