

# 四跨膜蛋白 CD151 调节结直肠癌 Notch 相关信号通路的研究

陈莘莘<sup>1</sup>, 刘玉杰<sup>2</sup>, 李威<sup>3</sup>, 韩雨<sup>4</sup>, 张文祺<sup>4</sup>, 张伟<sup>1</sup>, 王慧兵<sup>1</sup>, 张振亚<sup>5</sup>

(1.河北中医学院基础医学院,河北石家庄 050200;2.石家庄市中医院,河北石家庄 050000;3.河北大学附属医院,河北保定 071000;4.河北医科大学,河北石家庄 050017;5.河北医科大学第四医院,河北石家庄 050011)

**摘要:** [目的] 研究 CD151 在结直肠癌 Notch 信号通路中的调节作用。 [方法] 通过 Log-rank (Mantel-Cox) 分析 TCGA 数据库中 CD151 与结直肠癌患者生存期的关系,应用 Western blot 和实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 40 例结直肠癌及癌旁组织以及慢病毒低表达 CD151 的 HT29 细胞株中 Notch-1、Hes-1 和 Jagged-1 的蛋白和 mRNA 的表达。 [结果] 通过分析 TCGA 数据库的数据得出 CD151 高表达的结直肠癌患者的 2000d 之内生存期明显低于 CD151 低表达的患者。在结直肠癌患者组织中 CD151、Notch-1、Hes-1 和 Jagged-1 的蛋白和 mRNA 的表达均高于癌旁组织 ( $P$  均  $< 0.05$ )。在敲低 CD151 的 HT29-CD151-KD 人结肠癌细胞株中,Notch-1、Hes-1 和 Jagged-1 的蛋白和 mRNA 的表达明显降低 ( $P$  均  $< 0.05$ )。 [结论] CD151 表达情况影响结直肠癌患者的生存期,CD151 可明显下调结直肠癌 Notch 相关信号通路。

**关键词:** 结直肠癌;CD151;生存期;Notch 信号通路

中图分类号:R735.3 文献标识码:A 文章编号:1004-0242(2019)01-0069-05  
doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2019.01.A010

## Tetraspanin Protein CD151 Regulates Notch Signaling Pathway in Colorectal Cancer

CHEN Ping-ping<sup>1</sup>, LIU Yu-jie<sup>2</sup>, LI Wei<sup>3</sup>, HAN Yu<sup>4</sup>, ZHANG Wen-qi<sup>4</sup>, ZHANG Wei<sup>1</sup>, WANG Hui-bing<sup>1</sup>, ZHANG Zhen-ya<sup>5</sup>

(1. School of the Basic Medicine, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China; 2. Shijiazhuang Hospital of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050000, China; 3. The Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000, China; 4. Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 5. The Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

**Abstract:** [Purpose] To investigate the role of CD151 in Notch signal pathway of colorectal cancer. [Methods] The relationship between CD151 and survival of colorectal cancer patients in TCGA database was analyzed by Log-rank (Mantel-Cox) analysis. The expressions of CD151, Notch-1, Hes-1 and Jagged-1 proteins and mRNAs in 40 cases of colorectal cancer and CD151 knockdown human colon cancer HT29 cells were detected by qRT-PCR and Western blot methods. [Results] As the analysis of data from the TCGA database shown, the survival of colorectal cancer patients with high expression of CD151 were significantly lower than the survival of patients with low expression of CD151 within 2000d. The expressions of CD151, Notch-1, Hes-1 and Jagged-1 proteins and mRNAs in colorectal cancer tissues were higher than those in cancer adjacent tissues ( $P < 0.05$ ). The expressions of Notch-1, Hes-1 and Jagged-1 proteins and mRNAs were decreased in CD151 knockdown HT29 cells compared with HT29 cells ( $P < 0.05$ ). [Conclusion] High expression of CD151 can significantly reduce the survival of patients with colorectal cancer, and CD151 significantly down-regulates the Notch signal pathway in colorectal cancer.

**Key words:** colorectal cancer; CD151; survival; Notch signal pathway

研究表明,作为四跨膜蛋白 tetraspanin 家族成

员,CD151 参与多种实体瘤的浸润与转移过程,如结直肠癌、胃癌、乳腺癌、食管癌等<sup>[1-4]</sup>。在众多的致病因素中,信号通路的异常变化是早期癌变的重要途径。Notch 信号级联通路与肿瘤的发生发展密切相关<sup>[5-7]</sup>。在结直肠癌发生发展过程,CD151 是否参与

收稿日期:2018-08-02;修回日期:2018-10-15

基金项目:河北省科技厅国际技术合作计划项目(13397708D);河北省科技厅重点基础应用项目(15967730D);河北省 2017 年医学科学研究课题(20170859)

通信作者:张振亚,E-mail:383750878@qq.com

了 Notch 通路的调节作用至今仍然不明确。

本研究通过 TCGA 数据库分析 CD151 的表达与结直肠癌患者生存期间的关系;并在结直肠癌患者癌与癌旁组织和人结肠癌细胞系中,通过分子生物学方法研究 CD151 对 Notch 通路的作用及影响,以进一步阐明 CD151 在结直肠癌中的作用机制,为结直肠癌的临床诊治提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞

结肠癌细胞 HT29、HT29-MOCK(慢病毒空载体细胞)和 HT29-CD151-KD(低表达 CD151 慢病毒载体细胞)由美国俄克拉荷马大学医学中心惠赠。HT29-MOCK(慢病毒空载体细胞)中空白对照的 RNAi 序列为 GCGAGACCATGCCTCCAACAT, HT29-CD151-KD(低表达 CD151 慢病毒载体细胞)中低表达 CD151 的 RNAi 序列为 AGTACCTGCTGTTTACC-TACA<sup>[8]</sup>。

#### 1.1.2 临床资料

本实验中所用的 40 例大肠癌标本取自 2016 年 8~11 月于河北医科大学第四医院外二科确诊为结直肠癌的患者,男性 23 例,女性 17 例;中位年龄 64 岁。所有患者术前病理活检诊断均为结直肠癌。其中术后病理分期 I 期 2 例, II 期 18 例, III 期 16 例, IV 期 4 例。

#### 1.1.3 实验试剂

CD151、Notch-1、Hes-1、Jagged-1 抗体和  $\beta$ -actin 抗体购自美国 Abcom 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 癌症基因组图谱数据库(TCGA)中的 CD151 数据资料收集与处理

OncoLnc 网站 (<http://www.oncolnc.org>) 下载 TCGA 数据库 (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>) 并预处理结肠癌和直肠癌患者数据集的 mRNA 表达数据。通过 Log-rank (Mantel-Cox) 分析 CD151 表达水平与预后的相关性。

#### 1.2.2 对结直肠癌、癌旁组织和细胞进行 Western blot 分析

按每 20mg 组织加入 150~250 $\mu$ l RIPA 裂解液

比例加入冻存管中。将冻存管放入液氮冷冻 30min,待装有组织和裂解液的冻存管凝固时,取出加入研磨球后,放入高通量组织研磨器中,50Hz 研磨裂解 1min,裂解完全吸取溶液转移至另一离心管中,10 356r/min 离心 10min,取上清,-80 $^{\circ}$ C 保存。细胞直接用按每 20mg 加入 150~250 $\mu$ l RIPA 裂解液比例进行裂解提取蛋白。

将等量的变性完成的蛋白置于电泳槽中进行分离,观察分离胶中 Marker 的位置,当所需蛋白条带完全分离时,停止电泳。以蛋白 Marker 定位将样品所在凝胶切下,按照凝胶大小剪裁 PVDF 膜及 6 层滤纸,电转仪上自阴极至阳极依次铺制:海绵、三层滤纸、胶、PVDF 膜、三层滤纸、海绵,进行转印。转印完毕的 PVDF 膜浸泡在封闭缓冲液(5%脱脂奶粉)中,室温封闭 1h;对应蛋白条带的一抗(1:500 稀释)滴在 PVDF 膜的蛋白面上,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;1 $\times$ TBST 洗膜 3 次,每次 10min;再以对应一抗的荧光二抗(1:5000 稀释)孵育 PVDF 膜,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,1 $\times$ TBST 洗膜 3 次,每次 10min;用成像仪扫描成像保存,使用 Odyssey 软件进行灰度分析 CD151 以及 Notch 信号通路中的重要因子 Notch-1、Hes-1 和 Jagged-1 的蛋白表达。

#### 1.2.3 对结直肠癌、癌旁组织和细胞进行实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)

将细胞或者组织块加入 Trizol,室温放置 10min,使其充分裂解。按 300 $\mu$ l 氯仿/ml Trizol 量加入氯仿,震荡混匀后室温放置 15min,4 $^{\circ}$ C,10 356r/min 离心 15min。小心吸取上层水相,至另一离心管中,按 500 $\mu$ l 异丙醇/ml Trizol 量加入异丙醇混匀,室温放置 10min,4 $^{\circ}$ C,10 356r/min 离心 10min。弃上清,RNA 沉于管底,按 1ml 75%乙醇/ml Trizol 量加入 75%乙醇,温和震荡离心管,悬浮沉淀。4 $^{\circ}$ C,8460r/min 离心 5min,弃尽上清通风厨挥干 5min。25 $\mu$ l DEPC 水溶解,55 $^{\circ}$ C,5min,得到 mRNA。

选择纯度均在 260/280 在 1.8~2.0 之间的 mRNA 采用 Thermo 逆转录合成试剂盒合成 cDNA,再利用 SYBR qRT-PCR)试剂盒测定基因[引物序列详见表 1 (Table 1)] 的表达量,再用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法求算 CD151、Notch-1、Hes-1 和 Jagged-1 的基因表达量。 $\Delta CT = CT_{目的基因} - CT_{\beta-actin}$ ,  $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{实验组} - \Delta CT_{对照组}$ 。用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  表示实验组目的基因的表达相对于对照

组的变化倍数,当  $2^{-\Delta\Delta CT} > 1$  时,表明实验组目的基因表达上调,当  $2^{-\Delta\Delta CT} < 1$  时,表明实验组目的基因表达下降。

### 1.3 统计学处理

采用 Origin 7.5 软件进行统计分析,实验所有数据均以平均值±标准误来表示。采用单因素方差分析进行组间的比较。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义, $P < 0.01$  为差异有极显著统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 癌症基因组图谱数据库(TCGA)中 CD151 表达与结直肠癌患者生存关系分析

利用 OncoLnc 网站 (<http://www.oncolnc.org>) 下载 TCGA 数据库 (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>) 的结肠癌和直肠癌患者数据,通过数据的预处理,我们选择存活期在 2000d 之内的结肠癌和直肠癌患者共 559 例(高表达 CD151 的患者为 504 例)进行 CD151 表达与结直肠癌患者生存关系分析。Log-rank (Mantel-Cox) 分析表明高表达 CD151 的结直肠癌患者生存期显著低于低表达 CD151 的结直肠癌患者( $P=0.0017$ )(Figure 1)。

### 2.2 CD151、Notch-1、Jagged-1 和 Hes-1 在结直肠癌组织中的表达

Western blot (Figure 2)和 qRT-PCR(Figure 3)的结果表明,结直肠癌患者组织中 CD151、Notch-1、Jagged-1 和 Hes-1 的蛋白和 mRNA 的表达明显高于癌旁组织。qRT-PCR (Figure 3) 的结果表明,不同病理分期的结直肠癌组织中,CD151、Notch-1、Jagged-1 和 Hes-1 的 mRNA 水平均高于癌旁组织。

### 2.3 CD151、Notch-1、Jagged-1 和 Hes-1 在结肠癌细胞中的表达

Western blot (Figure

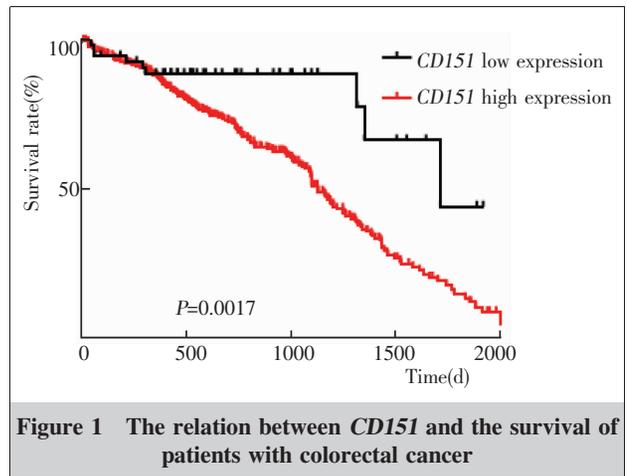
**Table 1 The sequence of primers**

Primers	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>Notch-1</i>	TTGAAAATCCAGCGTGGACA	TCGAGTCATTGCATACTGTC
<i>Hes-1</i>	CTACCCAGCCAGTGTCAAC	TCAGAGCATCCAAAATCAGTGT
<i>Jagged-1</i>	CGAGGACTATGAGGGCAAGA	CTTCAGGTGTGTCGTTGGAA
<i>CD151</i>	ATTGCCTGTGTGCAGGTCTT	TCAGTAGTTGGGTGCAGCAG
$\beta$ -actin	TGACGTGGACATCCGCAAAG	CTGGAAGGTGGACAGCGAGG

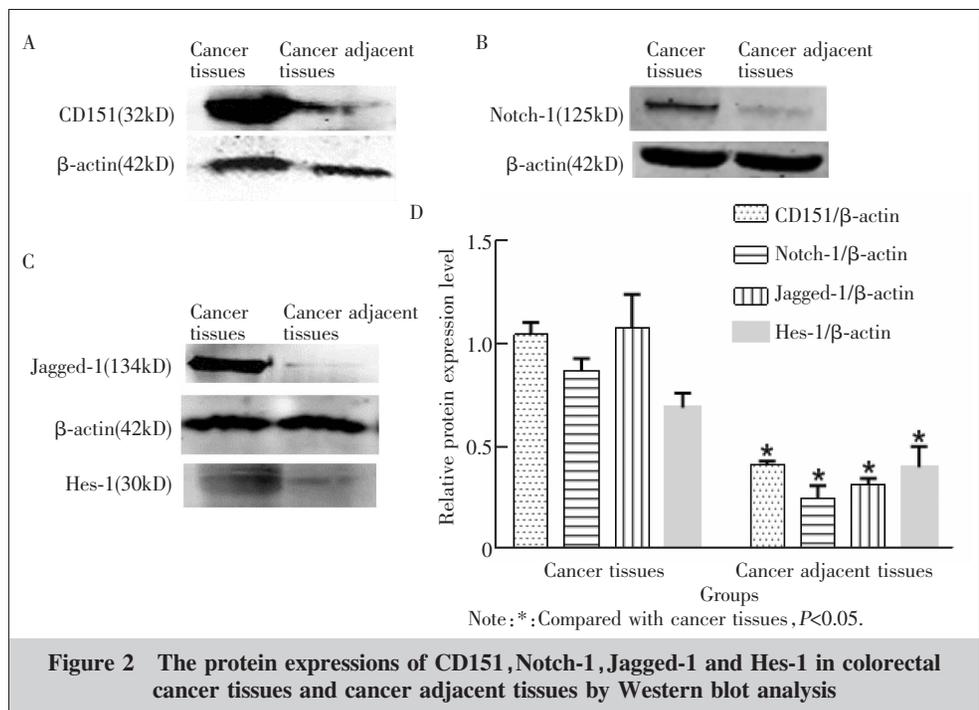
4)和 qRT-PCR (Figure 5)的结果表明,CD151 低表达的 HT29-CD151-KD 细胞中 Notch-1、Jagged-1 和 Hes-1 的表达量明显低于 HT29 和 HT29-MOCK 细胞。

## 3 讨论

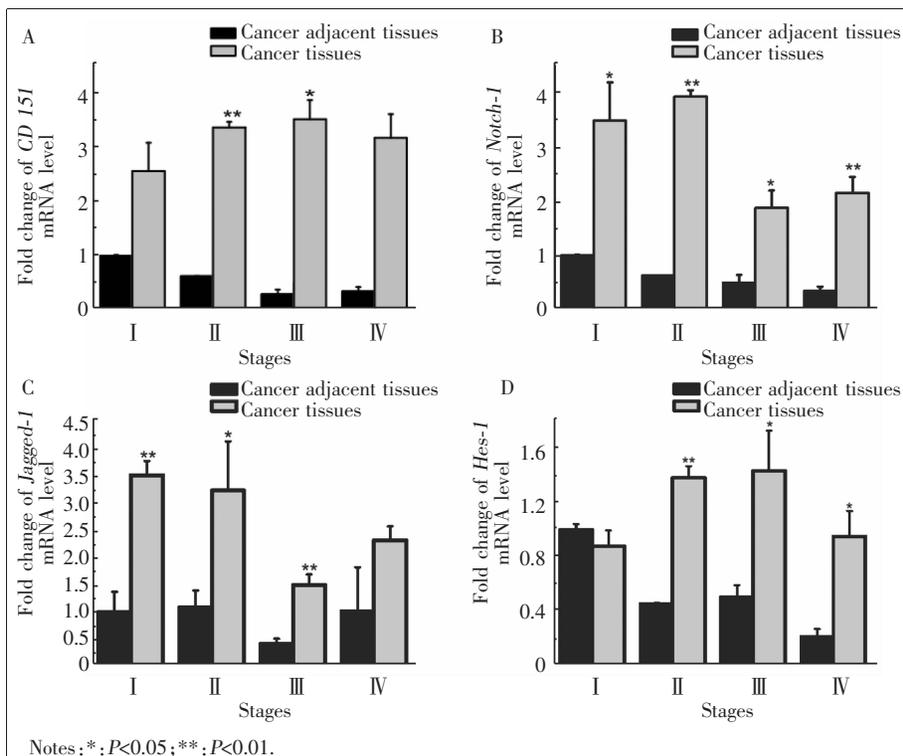
CD151 又名血小板内皮细胞四跨膜蛋白抗原3



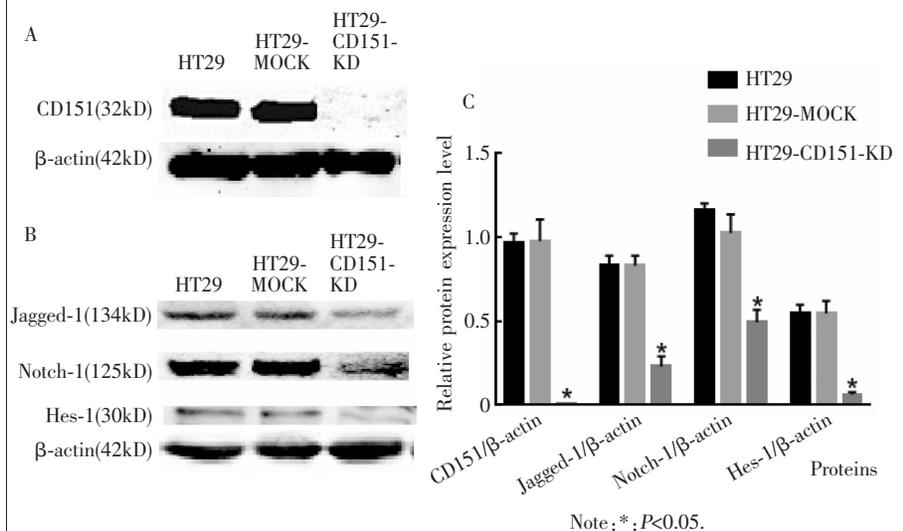
**Figure 1 The relation between CD151 and the survival of patients with colorectal cancer**



**Figure 2 The protein expressions of CD151, Notch-1, Jagged-1 and Hes-1 in colorectal cancer tissues and cancer adjacent tissues by Western blot analysis**



**Figure 3** The mRNA expressions of *CD151*, *Notch-1*, *Jagged-1* and *Hes-1* in colorectal cancer tissues and cancer adjacent tissues in patients with different pathological stages



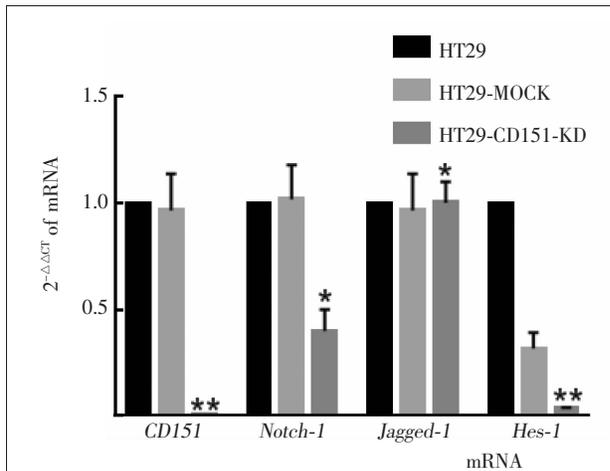
**Figure 4** Knockdown the expression of *CD151* downregulated protein expressions of *CD151*, *Notch-1*, *Jagged-1* and *Hes-1* in HT29 cells group compared with normal HT29 cells group and MOCK HT29 cells group examined by Western blot analysis

(platelet-endothelial cell tetraspanin antigen3, *PETA-3*) 或 *SFA-1*, 是首次被发现的四跨膜超家族蛋白 (TM4SF) 的癌基因。有研究发现, *CD151* 在不同组织与细胞中与不同的整合素 (α3β1、α5β1、α6β1、α6β4 等) 结合可促进多种实体肿瘤的浸润和转移, 如结直

肠癌、胃癌、乳腺癌、食管癌等 [2-4]。但具体机制尚未明确。研究表明, 多种信号通路参与了 *CD151* 有关的肿瘤作用机制。 *CD151* 可通过 PI3K/Akt/GSK-3β/Snail 信号通路调节 MMP9 对肝细胞癌的促进作用。 *CD151* 与整合素 α3β1 结合通过上皮间质转化作用和 Wnt 通路调节卵巢癌的生长 [3]。 *CD151* 通过促进血管生成及血运重建从而发挥其促进肿瘤侵袭及转移的作用 [4]。有研究发现, *Notch-1* 与其配体 *Jagged-1* 促进了肿瘤组织周围 VEGF 的表达, *Jagged-1*-*Notch* 信号通路参与了肿瘤新生血管的生成 [6]。 *Notch-1* 及其 mRNA 过表达可作为结直肠癌非依赖性预后指标。 *Notch-1* 的表达与结直肠癌的进展、肿瘤的病理分级、转移、抑制细胞凋亡、促进细胞增殖有关 [6,7]。

我们的研究发现, *CD151*、*Notch-1*、*Jagged-1* 以及 *Hes-1* 的蛋白和 mRNA 水平在结直肠癌患者癌组织中的表达明显高于癌旁组织, 推测 *CD151* 与 *Notch* 信号通路均可能参与了结直肠癌的侵袭过程。有研究表明, 在结直肠癌初期 *CD151* 的表达增加, 随着肿瘤的侵袭和转移, *CD151* 的表达下降, 其机制可能与整合素依赖的内皮细胞间作用和缺氧诱导因子 (HIF-1) 有关 [9,10]。我们的结果也表明随着病理分期

的进展, 在结直肠癌 IV 期, *CD151* mRNA 的表达略有下降。 *Notch-1*、*Jagged-1* 以及 *Hes-1* mRNA 的表达也呈类似下降的趋势。由于本实验患者样本有限, *CD151* 与 *Notch* 通路基因的表达仍需要增加临床患者的样本进一步证实。



Notes: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .

**Figure 5** Knockdown the expression of *CD151* down-regulated mRNA expressions of *CD151*, *Notch-1*, *Jagged-1* and *Hes-1* in HT29 cells group compared with normal HT29 cells group and MOCK HT29 cells group examined by qRT-PCR

同时,我们实验表明:在 CD151 低表达的 HT29 细胞株中 Notch-1、Jagged-1 以及 Hes-1 的蛋白和 mRNA 水平与对照组相比明显降低。提示,CD151 在结肠癌中可能对 Notch 通路起一定的调控作用。CD151 通过哪些关键环节作用于 Notch 通路以及 CD151 在结直肠癌的作用靶点还需更深入的研究。

## 参考文献:

- [1] Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells [J]. *Nature*, 2007, 445(7123): 111–115.
- [2] Zeng P, Wang YH, Si M, et al. Tetraspanin CD151 as an

emerging potential poor prognostic factor across solid tumors: a systematic review and meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(3): 5592–5602

- [3] Baldwin LA, Hoff JT, Lefringhouse J, et al. CD151- $\alpha 3\beta 1$  integrin complexes suppress ovarian tumor growth by repressing slug-mediated EMT and canonical Wnt signaling [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(23): 12203–12217.
- [4] Zhang F, Michaelson JE, Moshiah S, et al. Tetraspanin CD151 maintains vascular stability by balancing the forces of cell adhesion and cytoskeletal tension [J]. *Blood*, 2011, 118: 4274–4284.
- [5] Previs RA, Coleman RL, Harris AL, et al. Molecular pathways: translational and therapeutic implications of the notch signaling pathway in cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(5): 955–961.
- [6] Dufraigne J, Funahashi Y, Kitajewski J. Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms [J]. *Oncogene*, 2008, 27(38): 5132–5137.
- [7] Kathleen M. Capaccione KM, Pine SR. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(7): 1420–1430.
- [8] Zhang F, Michaelson JE, Moshiah S, et al. Tetraspanin CD151 maintains vascular stability by balancing the forces of cell adhesion and cytoskeletal tension [J]. *Blood*, 2011, 118: 4274–4284.
- [9] Lin PC, Lin SC, Lee CT, et al. Dynamic change of tetraspanin CD151 membrane protein expression in colorectal cancer patients [J]. *Cancer Invest*, 2011, 29(8): 542–547.
- [10] Chien CW, Lin SC, Lai YY, et al. Regulation of CD151 by hypoxia controls cell adhesion and metastasis in colorectal cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(24): 8043–8051.

## 致作者/通讯作者

本刊对所有来稿不收任何形式的审稿费,同行评议审稿费用由本刊承担。来稿刊登后即给作者/通讯作者通过邮局,以印刷品挂号形式寄赠当期杂志 2 册,如未能及时收到,请登录 <http://www.chinaoncology.cn> 在所在杂志页面信息公告栏目中查询该期杂志作者邮寄名单,凭“挂刷号”可在当地邮局查询。还将给作者/通讯作者寄赠当期杂志以后的 12 期杂志每期 1 册,或合订本。在此期间,如您的邮寄地址有变化,请及时联系本刊:QQ:729586420,电话/传真:0571-88122280,E-mail:zgzi\_09@126.com。