

SPRED1 在结肠癌中的表达及意义

王海川, 蔡晓燕, 吕 强

(上海市浦东新区公利医院, 上海 200135)

摘要: [目的] 探讨 SPRED1 在结肠癌中的表达, 及其与结肠癌患者预后的相关性, 以及对结肠癌细胞增殖、迁移和凋亡的影响。[方法] 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 SPRED1 mRNA 在结肠癌细胞和组织标本中的表达, 免疫组织化学技术检测 SPRED1 蛋白在结肠癌组织中的表达。使用小干扰 RNA(siRNA)干扰结肠癌细胞内 SPRED1 表达后, CCK-8 试剂盒检测结肠癌细胞增殖能力变化, Transwell 小室检测结肠癌细胞迁移能力变化, Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒检测细胞凋亡水平。[结果] SPRED1 mRNA 在结肠癌细胞株和结肠癌组织中表达水平均显著上调(P 均 <0.001), 高表达 SPRED1 患者的总生存期短于低表达 SPRED1 患者($HR=2.326$, $95\%CI: 1.340\sim4.062$, $P<0.05$)。干扰 SPRED1 后, 干扰组结肠癌 SW480 和 SW620 细胞在 36h 和 48h 后增殖能力显著下降($P<0.05$), 侵袭能力显著下降(SW480: $t=42.05$, $P<0.0001$; SW620: $t=12.91$, $P=0.0002$), 且凋亡水平显著上升(SW480: $t=18.46$, $P<0.05$; SW620: $t=18.52$, $P<0.0001$)。[结论] SPRED1 在结肠癌中表达上调, 促进结肠癌的增殖和侵袭。

关键词: SPRED1; 结肠肿瘤; 增殖; 迁移; 凋亡

中图分类号: R735.3⁵ **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)08-0700-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.08.B008

Expression of SPRED1 in Colon Cancer and Its Significance

WANG Hai-chuan, CAI Xiao-yan, LYU Qiang

(Gongli Hospital of Pudong New District, Shanghai 200135, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of SPRED1 in colon cancer and its significance. [Methods] The expression of SPRED1 mRNA and protein in cancer tissue and adjacent tissue samples of 45 patients with colon cancer was detected with qRT-PCR and immunohistochemistry, respectively. The expression of SPRED1 mRNA and protein was detected in colon cancer SW480, SW620 cells and normal colon epithelial NCM460 cells with Real-time quantitative RT-PCR(qRT-PCR) and Western blot, respectively. The colon cancer SW480 and SW620 cells were transfected with small interference RNA(si-SPRED1). After down-regulation of SPRED1, cell proliferation, cell migration and cell apoptosis were determined by CCK8 assay, Transwell method and Annexin V-FITC/PI assay, respectively. [Results] The expression of SPRED1 mRNA and protein was higher in colon cancer tissues than that in adjacent tissues, in cancer cell lines than in normal colon epithelia cells (all $P<0.001$). The overall survival time of patients with high expression of SPRED1 was shorter than that of patients with low expression of SPRED1 ($HR=2.326$, $95\%CI: 1.340\sim4.062$, $P<0.05$). After down-regulation of SPRED1, cell proliferation was significantly suppressed($P<0.05$). Both SW480 and SW620 cells presented decreased cell migration after down-regulation of SPRED1 (SW480: $t=42.05$, $P<0.0001$; SW620: $t=12.91$, $P=0.0002$). colon cancer Cells transfected with si-SPRED1 showed higher apoptosis level (SW480: $t=18.46$, $P<0.05$; SW620: $t=18.52$, $P<0.0001$). [Conclusion] SPRED1 is upregulated in colon cancer, which is associated with the increased cell proliferation, cell invasion and decreased cell apoptosis.

Subject words: SPRED1; colon cancer; proliferation; migration; apoptosis

结肠癌是消化道常见恶性肿瘤。根据最新统计数据, 结肠癌在全球新发肿瘤中居第 3 位, 而致死率居第 2 位^[1]。早期结肠癌由于临床症状不典型, 确诊

时已为晚期, 结肠癌根治术后 5 年生存期也较低, 化疗对晚期结肠癌的生存期改善不显著。因此, 需继续探索新的治疗靶点, 提高晚期结肠癌患者预后。快速发育生长因子同源蛋白 1 (SPROUTY-related enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein homology 1 domain 1, SPRED1) 是快速发育生长因子家族中的一类蛋白, 它可以被酪氨酸激酶活化, 形成同源二聚

基金项目: 上海市浦东新区卫生系统特色专病建设资助——肠癌合并急性肠梗阻(PWZzb2017-19)

通信作者: 蔡晓燕, 主任医师, 博士; 上海市浦东新区公利医院普外科, 上海市浦东新区苗圃路 219 号(200135); E-mail: cxy6429@163.com

收稿日期: 2019-09-17; **修回日期:** 2020-01-29

体或者与 SPRED2 形成异质二聚体调控丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路的激活^[2-3]。关于 SPRED1 在肿瘤发生和进展中的研究较少, 目前仅有研究发现 SPRED1 在肝癌和骨肉瘤中表达水平下降, 可能发挥肿瘤抑制因子的作用^[4-5]。SPRED1 低表达与肝癌的高侵袭性和转移密切相关^[4], 但 SPRED1 在结肠癌中的研究尚少见报道。因此, 本研究主要探究 SPRED1 在结肠癌中的表达水平及其与结肠癌临床特征的相关性, 为 SPRED1 作为结肠癌预后因子或者治疗靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

结肠癌细胞株 SW480 和 SW620 和正常结肠上皮细胞株 NCM460 购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库/中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。SW480、SW620 和 NCM460 均培养于含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 RPMI-1640 (ATCC® 30-2001™) 培养基中。细胞接种于 6 孔培养板并贴壁后, 使用阳离子脂质载体 Lipofectamine 2000 将 SPRED1 小干扰 RNA (si-SPRED1) 转染入 SW480 和 SW620 细胞, 转染前细胞密度为 70%~85%, 对照组和 si-SPRED1 干扰组的转染终浓度均为 50nmol/L, 转染 48 h 后抽提总 RNA, 72h 后抽提总蛋白。

1.2 组织标本

选取上海市浦东新区公利医院于 2016 年 1 月至 2019 年 1 月的 45 例结肠癌标本和配对癌旁正常组织, 结肠癌标本经术后病理确诊为结肠癌, 其中男性 28 例, 女性 17 例, 平均年龄 64.7±16.4 岁。

1.3 实时荧光定量 PCR 检测 SPRED1 mRNA 表达水平

Trizol 法 (Invitrogen 公司) 提取各实验组 SW480 和 SW620 细胞以及液氮中冻存的结肠癌组织标本的总 RNA。总 RNA 进行反转录获取 cDNA 后进行 PCR 反应。PCR 反应条件为 95℃变性 3min; 按下列参数循环 40 次: 95℃变性 3 s, 60℃退火 20s。实时荧光定量 PCR 引物: SPRED1 Forward 5'-AAGGATGCC-CCGAATCAAAAA-3', Reverse 5'-GGCTTGGCTTTG-

CATGTAGAC-3'; GAPDH Forward 5'-CTGGGCTA-CACTGAGCACC-3'; Reverse 5'-AAGTGGTCGTTGAG-GGCAATG-3'。小干扰 RNA 由上海吉玛制药技术有限公司设计合成。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 相对表达量, 测定值以 $2^{-\Delta\Delta C_t} \geq 2$ 作为高表达, $2^{-\Delta\Delta C_t} < 2$ 作为低表达。

1.4 Western blot 检测 SPRED1 蛋白表达

转染 si-SPRED1 72h, 使用 RIPA 细胞裂解液 (江苏碧云天公司, 货号: P1003B) 提取蛋白, BCA 试剂盒 (江苏碧云天公司) 测定蛋白浓度, 并调整待测样本的蛋白质含量。每孔加 30~50μg 蛋白样品, 电泳、转膜、封闭, 按 1:1000 稀释一抗, 置 4℃孵育过夜。PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 分别按 1:1000 稀释二抗, 孵育 1 h, PBST 中洗膜 3 次, 每次 10 min。通过 ECL 显影曝光。SPRED1 抗体 (货号: #94063)、GAPDH 抗体 (货号: #3683) 购于 Cell Signal Technology 公司。

1.5 免疫组织化学染色

将石蜡包埋切片脱蜡、水化, PBS 洗 2 次各 5min, 3% H_2O_2 , 室温封闭 5~10min, 蒸馏水洗 3 次, 然后进行抗原修复, PBS 洗 5min, 滴加山羊血清封闭液, 室温封闭 20min。滴加一抗 4℃孵育过夜, PBS 洗 3 次每次 2min; 滴加生物素化二抗, 20℃~37℃ 20min, PBS 洗 3 次每次 2min, 滴加试剂 SABC, 20℃~37℃ 20min, PBS 洗 4 次每次 5min, 然后进行 DAB 显色试剂盒显色; 蒸馏水洗后使用苏木素复染 2min、盐酸酒精分化; 脱水、透明、封片、镜检。

1.6 Transwell

对照组和 si-SPRED1 干扰组细胞从 6 孔板中消化下来, 调整细胞密度为 4×10^5 个/ml, 取 0.2ml 接种到 Transwell 小室, 并将 Transwell 小室置于 24 孔板内, 上室内为含 1% 血清的培养基, 下室为含 10% 灭活血清的培养基。培养 20h 后用棉签头擦掉小室内细胞, 甲醇固定, 0.1% 结晶紫染色, 洗净风干后于 Leica 荧光倒置显微镜 200 倍视野下拍照, 随机选取 4 个视野拍照, 计算每个视野细胞总数。

1.7 CCK8 增殖实验

SW480 和 SW620 细胞转染 si-SPRED1 后, 将细胞按 1×10^3 个/ml 接种于 96 孔板中传代培养, 每组设置 6 个复孔。细胞贴壁后加入 CCK8, 1~3h 后酶标仪检测 A490nm 下吸光度值。

1.8 细胞凋亡

使用不含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化细胞, 预冷的 1×PBS(4℃) 洗涤细胞 1 次, 加入 300μl 的 1×Binding Buffer 悬浮细胞; 加入 5μl 的 Annexin V-FITC 混匀后, 避光, 室温孵育 15min; 上机前 5min 再加入 5μl 的 PI 染色; 上机前, 补加 200μl 的 1×Binding Buffer。

1.9 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件进行统计学分析, 计量数据用均数±标准差(Mean±SD)表示, 行 *t* 检验; 计数资料用百分比表示, 行 χ^2 检验; 两变量之间关系采用线性相关分析; 使用 Kaplan-Meier 法进行生存分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SPRED1 在结肠癌细胞株和组织中表达上调

通过使用实时荧光定量 PCR 检测 SPRED1 mRNA 在结肠癌细胞株和组织中表达水平。结果显示, 同正常结肠上皮细胞株 NCM460 (1.018 ± 0.072) 相比, SPRED1 mRNA 在结肠癌细胞株 SW480 (3.403 ± 0.656 , $P = 0.0007$) 和 SW620 (4.041 ± 0.228 , $P = 0.0002$) 中表达上调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, Figure 1A)。在 45 例结肠癌组织和配对癌旁组织中, SPRED1 mRNA 在结肠癌组织 (5.198 ± 2.738) 中的表达水平显著高于癌旁正常组织 (1.859 ± 1.925) ($t = 8.773$, $P < 0.0001$) (Figure 1B)。

2.2 SPRED1 表达水平与结肠癌患者预后相关

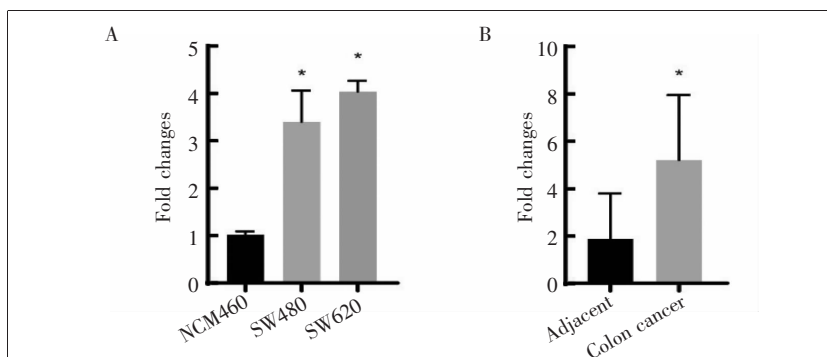
根据 SPRED1 mRNA 在结肠癌中的表达水平, 分为 SPRED1 低表达组 (10 例) 和高表达组 (35 例) (Figure 2)。Kaplan-Meier 分析显示, 高表达 SPRED1 患者的总生存期较低表达 SPRED1 组患者低, 低表达组中位生存期为 54 个月, 高表达组为 39 个月, 组间差异有统计学意义 ($HR = 2.326$, $95\%CI: 1.340 \sim 4.062$, $P < 0.05$) (Figure 3)。

2.3 干扰 SPRED1 抑制结肠癌细胞增殖

通过设计小干扰 siRNA 干扰 SW480 和 SW620

细胞中 SPRED1 表达水平。SW480 和 SW620 转染 si-SPRED1 后, 干扰组 SPRED1 mRNA (SW480: 0.393 ± 0.097 , SW620: 0.372 ± 0.039) 表达水平较对照组 SPRED1 mRNA (SW480: 1.014 ± 0.146 , SW620: 0.990 ± 0.089) 显著下降 (SW480: $t = 42.05$, $P = 0.004$; SW620: $t = 12.91$, $P = 0.0004$) (Figure 4)。

使用 CCK8 增殖实验检测 SW480 和 SW620 的增殖能力, 结果显示, 在 36h 和 48h, 转染 si-SPRED1 的干扰组 SPRED1 细胞在 A490 吸光度值低于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。同样, si-SPRED1



A: The expression level of SPRED1 mRNA in colon cancer cell lines detected by qRT-PCR (* $P < 0.05$)
B: The expression level of SPRED1 mRNA in colon cancer tissues detected by qRT-PCR (* $P < 0.05$)

Figure 1 Expression of SPRED1 mRNA in colon cancer cell lines and tissues

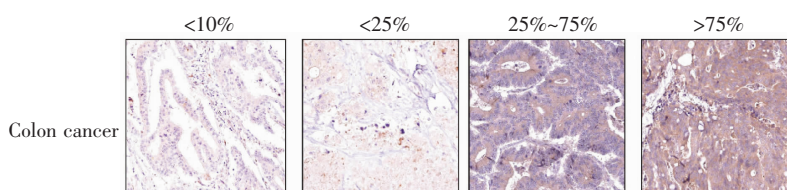


Figure 2 Expression of SPRED1 protein in colon cancer tissues detected by immunohistochemistry (200×)

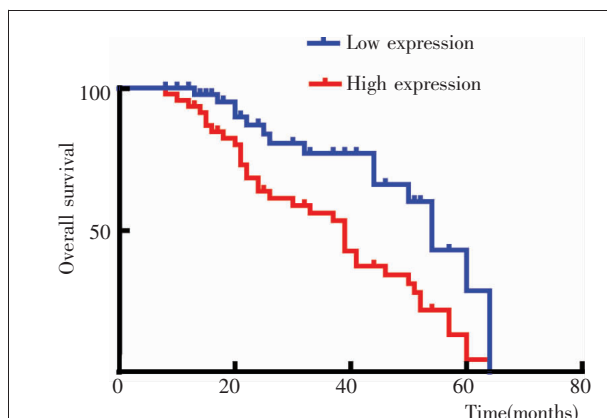


Figure 3 Correlation between SPRED1 mRNA expression level and prognosis

干扰组 SW620 细胞在 36h 和 48h 吸光度值也显著低于对照组 ($P<0.05$) (Figure 5)。

2.4 干扰 SPRED1 抑制结肠癌细胞迁移

干扰 SPRED1 表达后,使用 Transwell 小室检测 SW480 和 SW620 细胞的迁移能力的变化。结果显示,转染 si-SPRED1 的 SW480 干扰组穿透小室的细胞数量显著少于对照组 ($t=42.05, P<0.001$),SW620 细胞转染 si-SPRED1 后,干扰组穿透小室的细胞数量也显著少于对照组 ($t=12.91, P=0.0002$) (Figure 6)。

2.5 干扰 SPRED1 促进结肠癌细胞凋亡

干扰 SPRED1 表达后,使用流式细胞仪和 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒检测 SW480 和 SW620 细胞的凋亡水平变化。结果显示,转染 si-SPRED1 后,干扰组的 SW480 和 SW620 细胞在 48h 后,凋亡细胞数均高于对照组的 SW480 和 SW620 细胞,差异均有统计学意义 (SW480: $t=18.46, P<0.05$; SW620: $t=18.52, P<0.0001$) (Figure 7)。不过,尽管同对照组相比差异存在统计学意义,但干扰组凋亡水平升高的生物学差异并不明显,因此,SPRED1 对结肠癌细胞 SW480 和 SW620 具有一定程度的抗凋亡作用。

3 讨论

结肠癌是消化系统常见恶性肿瘤,并且预后较差。基因突

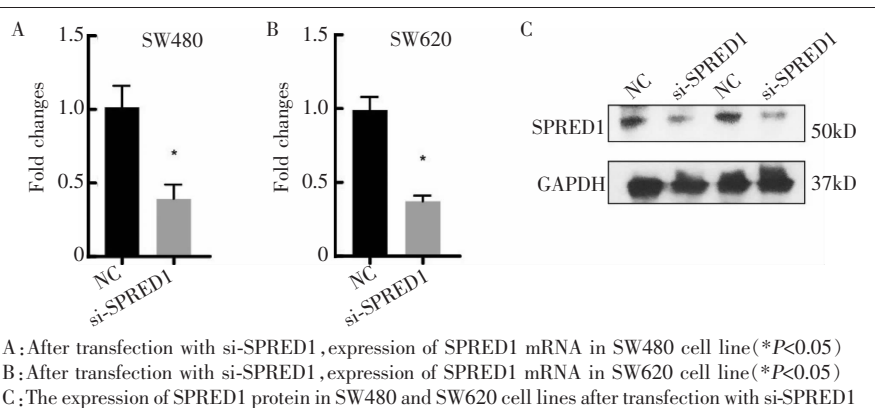
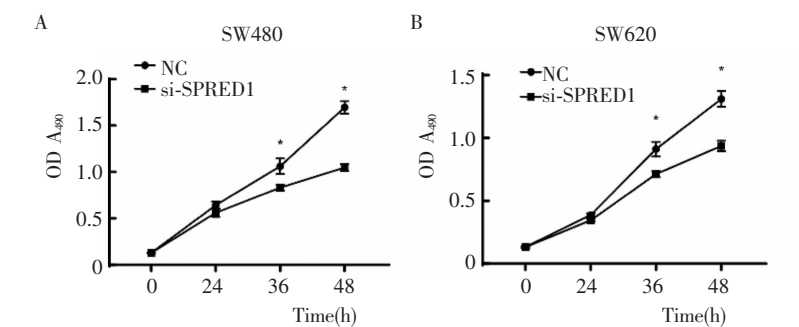
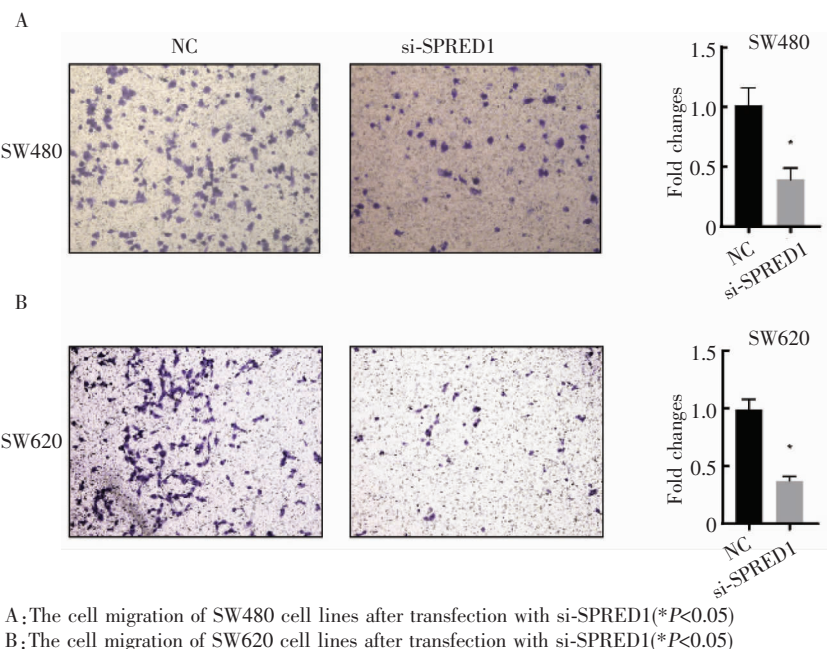


Figure 4 Expression of SPRED1 in colon cancer cell lines after knock-down of SPRED1



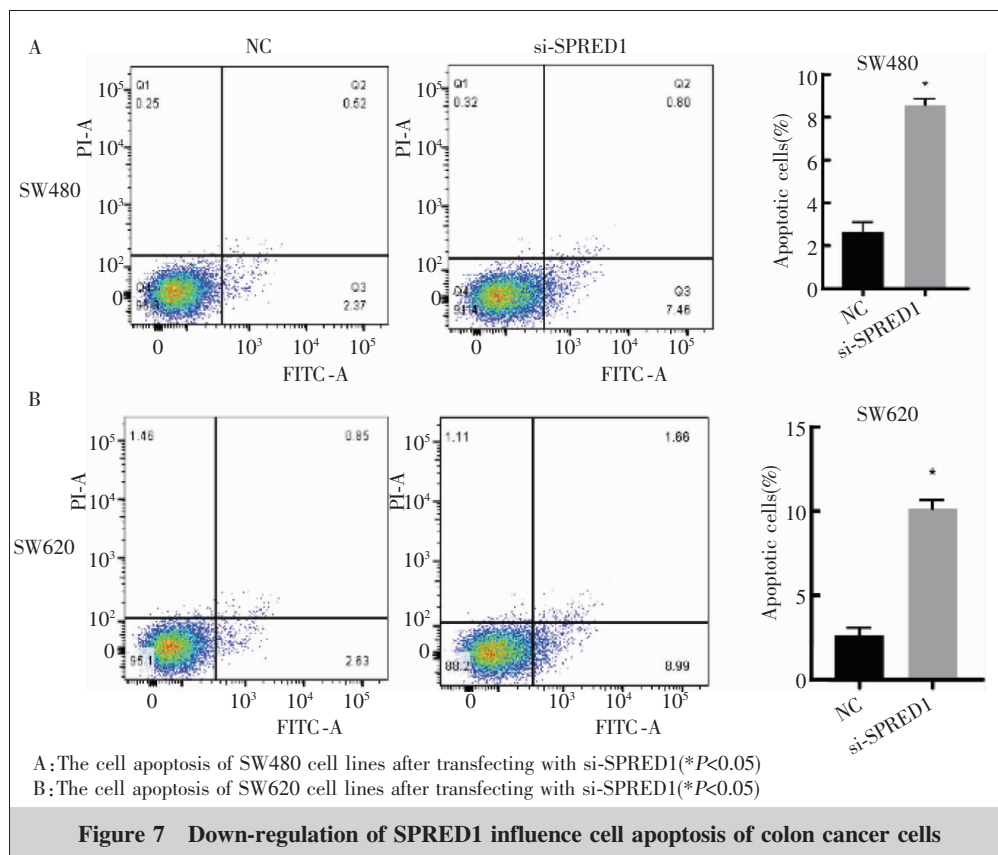
A: The cell proliferation of SW480 cell lines after transfection with si-SPRED1 ($*P<0.001$)
B: The cell proliferation of SW620 cell lines after transfection with si-SPRED1 ($*P<0.001$)

Figure 5 Down-regulation of SPRED1 influence cell proliferation of colon cancer cells



A: The cell migration of SW480 cell lines after transfection with si-SPRED1 ($*P<0.05$)
B: The cell migration of SW620 cell lines after transfection with si-SPRED1 ($*P<0.05$)

Figure 6 Down-regulation of SPRED1 influence cell migration of colon cancer cells



变、缺失以及原癌基因激活等都对肿瘤的发生和进展发挥多重调控作用。本研究结果显示,SPRED1在结肠癌中表达水平显著上调,高表达 SPRED1 的患者预后较低表达 SPRED1 患者总生存期明显缩短。干扰 SPRED1 后,结肠癌细胞的增殖和迁移能力显著下降,细胞凋亡水平显著上升。

SPRED1 是快速发育生长因子家族中的一类蛋白,通过形成同源二聚体或者与 SPRED2 形成异质二聚体,与 *c-kit* 原癌基因(*c-kit* proto-Oncogene Protein, *c-kit*)编码的蛋白结合,*c-kit* 是酪氨酸激酶受体蛋白家族的重要成员之一,其作为干细胞因子的受体,可以通过一系列信号通路参与造血干细胞增殖分化的调控^[6]。SPRED1 的突变与 Legius 综合征有关。Legius 综合征是指一组以多发性雀斑、腋部雀斑、轻度神经认知功能障碍、B 型大斑等临床表现的综合征,但 SPRED1 在肿瘤中的作用仍待阐明。最近有研究显示,SPRED1 在肝癌和小儿急性粒细胞白血病患者中表达水平下降,并且 SPRED1 的表达水平与肝癌的分期和分级具有相关性,细胞水平研究显示 SPRED1 与肝癌的侵袭和转移呈负相关^[4,7]。在骨肉瘤细胞系中过表达 SPRED1 后,可有效抑制骨

肉瘤细胞在裸鼠体内成瘤以及转移^[8]。而在本研究中,SPRED1 在结肠癌组织中表达上调,细胞水平实验显示 SPRED1 发挥癌基因作用,促进结肠癌细胞增殖、迁移和抗凋亡。

SPRED1 的异常表达受多种因素调控,如基因突变、甲基化和 miRNA。SPRED1 的突变与神经纤维瘤综合征密切相关,在 NIH (美国国立卫生院) 关于神经纤维瘤病 1 型(NF1)的诊断标准中,存在 SPRED1 种系突变但无神经纤维瘤蛋白 1 (Neurofi-

bromin1)突变的,即可诊断为神经纤维瘤病 1 型综合征^[9]。SPRED1 的低表达被认为是急性骨髓白血病(*acute myeloid leukemia*, AML)发生的重要因素,一项研究显示,同对照组(非急性早幼粒白血病)相比,在 AML 患者中,SPRED1 启动子呈高甲基化水平,SPRED1 启动子区的异常甲基化状态与 AML 基因转录的下调有关。SPRED1 启动子甲基化水平可能与 AML 的治疗反应有关^[10]。另外,miRNA 对 SPRED1 的异常表达也具有重要调节作用。miR-182 和 miR-196 都能靶向 SPRED1 的 3'-UTR,miR-182 靶向 SPRED1,促进口腔鳞癌增殖和侵袭^[11],miR-196 则靶向 SPRED1 促进乳腺癌细胞的增殖和转移^[12]。SPRED1 作为快速发育生长因子家族一类蛋白,被认为是生长因子信号通路中的负调控因子,SPRED1 与 Raf 形成复合物,可抑制 ERK 通路的激活^[4]。

尽管 SPRED1 在肿瘤中的功能存在差异,但明确 SPRED1 在不同肿瘤中发挥的作用有助于充分认识 SPRED1 的功能。在精准医学时代,更加有利于为肿瘤的靶向治疗明确靶点。因此,本研究发现 SPRED1 在结肠癌中发挥癌基因作用,并且与结肠癌预后显著相关,为将来其作为预后因子和治疗靶

点提供一定理论依据。

参考文献:

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Wakioka T, Sasaki A, Kato R, et al. Sprd is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling [J]. Nature, 2001, 412(6847): 647-651.
- [3] Hirata Y, Brems H, Suzuki M, et al. Interaction between a domain of a negative regulator of the RAS-ERK pathway, SPRED1, and the GTPase-activating protein-related domain of neurofibromin is implicated in Legius syndrome and neurofibromatosis type 1[J]. J Biol Chem, 2016, 291(7): 3124-3134.
- [4] Yoshida T, Hisamoto T, Akiba J, et al. Sprds, inhibitors of the Ras/ERK signal transduction, are dysregulated in human hepatocellular carcinoma and linked to the malignant phenotype of tumors[J]. Oncogene, 2006, 25(45): 6056-6066.
- [5] Miyoshi K, Wakioka T, Nishinakamura H, et al. The Sprouty-related protein, Sprd, inhibits cell motility, metastasis, and Rho-mediated actin reorganization [J]. Oncogene, 2004, 23(33): 5567-5576.
- [6] Tadokoro Y, Hoshii T, Yamazaki S, et al. Sprd1 safeguards hematopoietic homeostasis against diet-induced systemic stress[J]. Cell Stem Cell, 2018, 22(5): 713-725.
- [7] Pasmant E, Gilbert-Dussardier B, Petit A, et al. SPRED1, a RAS MAPK pathway inhibitor that causes Legius syndrome, is a tumour suppressor downregulated in paediatric acute myeloblastic leukaemia [J]. Oncogene, 2015, 34(5): 631-638.
- [8] Miyoshi K, Wakioka T, Nishinakamura H, et al. The Sprouty-related protein, Sprd, inhibits cell motility, metastasis, and Rho-mediated actin reorganization [J]. Oncogene, 2004, 23(33): 5567-5576.
- [9] Brems H, Chmara M, Sahbatou M, et al. Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1-like phenotype[J]. Nat Genet, 2007, 39(9): 1120-1126.
- [10] Sun J, Zhang J, Wang Y, et al. A pilot study of aberrant CpG island hypermethylation of SPRED1 in acute myeloid leukemia[J]. Int J Med Sci, 2019, 16(2): 324-330.
- [11] Wang J, Wang W, Li J, et al. miR182 activates the Ras-MEK-ERK pathway in human oral cavity squamous cell carcinoma by suppressing RASA1 and SPRED1[J]. Onco-Targets Ther, 2017, 10: 667-679.
- [12] Jiang CF, Shi ZM, Li DM, et al. Estrogen-induced miR-196a elevation promotes tumor growth and metastasis via targeting SPRED1 in breast cancer [J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 83.

《肿瘤学杂志》作者/通信作者校对文稿须知

作者/通信作者自校拟发排校样稿,是期刊出版工作中不可缺少的重要环节,也是确保期刊质量的重要手段。特此重申,请作者/通信作者务必按以下要求进行校对:

1. 首先全面校对全文,对编辑提出的校样稿中需特别注意校对及需补充的内容,必须予以改正或解释。

2. 所有需修改和补充的内容,均请用红笔将正确的字符书写清楚(避免使用不规范的汉字);必须改动的字符,直接在校样稿的空白处写出,所增删字数最好相符。

3. 文题、作者、单位名称、邮政编码、通信作者等信息,务必确认无误。

4. 对正文文字(包括外文字母及大小写)、标点符号、数据、图表、计量单位、参考文献等应认真细致逐一校对;请用规范的通用药品名称(不用商品名)和医学名词,认真核查并使用标准计量单位及药物剂量。

5. 参考文献缺项的部分,应按本刊规定的著录格式进行补充。请作者务必认真核实所引用文献是否正确,并核查正文中角码是否与文后所列参考文献序号对应。

6. 校对完毕请作者/通信作者签名,并在规定的日期内将校样稿寄回编辑部。如有要求补充的资料,也需一并寄回。

7. 由于出版周期的限制,如作者/通信作者不能在规定时间内校对寄回,请及时联系本刊编辑部说明原因,否则可能造成该文稿延期出版,或者取消刊发。