

DDR1 通过 NF- κ B 调控胃癌细胞转移的机制研究

李进¹, 何裕隆^{1,2}, 张常华¹, 魏哲威²

1. 中山大学附属第七医院消化病中心, 广东深圳 518107

2. 中山大学附属第一医院胃肠外科中心, 广东广州 510080

【摘要】 目的 探究 DDR1 促进胃癌细胞迁移侵袭的作用机制。方法 通过慢病毒转染法构建 SNU719 细胞 DDR1 过表达稳转株, 嘌呤霉素药筛后使用 RT-qPCR 和蛋白印迹法进行稳转效果验证。利用 Transwell 小室实验对比 DDR1 过表达细胞株和对照组细胞的迁移侵袭能力, 通过 Western Blot 和抑制剂探究 DDR1 过表达对 SNU719 下游信号通路的影响。结果 RT-qPCR 和蛋白印迹结果显示在 SNU719 过表达组细胞株中, DDR1 在 mRNA 水平和蛋白水平均有明显的升高。迁移侵袭实验示, 小室膜底面的过表达组 SNU719 细胞数量均显著高于对照组。Western Blot 结果表明过表达 DDR1 组 SNU719 核内 B-catenin 含量明显增加, 而 NF- κ B 抑制剂亦明显抑制 DDR1 过表达组细胞的迁移侵袭能力。结论 DDR1 通过上调 NF- κ B 通路促进胃癌细胞的迁移侵袭。

【关键词】 DDR1; 胃癌; 转移; NF- κ B

DDR1 promotes the migration and invasion of gastric cancer cell by up-regulation of NF- κ B pathway

LI Jin¹, HE Yu-long^{1,2}, ZHANG Chang-hua¹, WEI Zhe-wei²

1. Department of Gastrointestinal Surgery, the Seventh Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Shenzhen, 518107, China

2. Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou, 510080, China

【Abstract】 Objective To explore the mechanism underlying that DDR1 promotes the metastasis ability of gastric cancer cell line SNU719. **Methods** The DDR1 overexpression stable strain of SNU719 cells was constructed by lentiviral transfection and verified by RT-PCR and Western blotting after puromycin selection. Transwell chamber assay was used to compare the migration and invasion abilities of DDR1 overexpressing cells and control cells. The effects of DDR1 overexpression on the downstream signaling pathway of SNU719 were determined by Western Blot and inhibitors. **Results** RT-PCR and Western blot showed that DDR1 significantly increased in mRNA and protein levels in SNU719 overexpressing cell line. The migration and invasion assay showed that the number of SNU719 cells in the DDR1 group on the bottom of the small chamber membrane was significantly higher than that in the control group. The results of Western blot suggested that the content of b-catenin in SNU719 nucleus of over expressed DDR1 group increased significantly, and NF- κ B inhibitor also decreased the migration and invasion ability of cells in over expressed DDR1 group. **Conclusions** DDR1 promotes the migration and invasion of gastric cancer cells by up-regulating the NF- κ B pathway.

【Key words】 DDR1; gastric cancer; metastasis; NF- κ B

盘状结构域受体 (discoidin domain receptor, DDR) 属于酪氨酸激酶家族受体, 由两个成员 DDR1 和 DDR2 组成。DDR1 基因位于人 6 号染色

体的 p 臂(6p21.3), 其同源基因 DDR2 位于 1 号染色体的 q 臂(1q23.3)。它们由与配体相互作用的细胞外结构域、跨膜区和通过激酶结构域传递信

基金项目: 国家自然科学基金项目(81702325), 广东省自然科学基金博士启动纵向协同项目(2017A030310565)

通信作者: 魏哲威, 主治医师, E-mail: denisewei@126.com

号的细胞质内结构域组成^[1]。DDR1 可与 I、II、III、IV 型胶原结合,对 X 型胶原则亲和力较低^[2]。对于大多数酪氨酸激酶家族受体而言,酪氨酸残基的磷酸化激活发生在配体结合的几秒钟内,随后是由去磷酸化或者受体/配体内化降解所导致的活性的快速下调^[3]。而 DDR1 的磷酸化发生在同胶原结合后几分钟到几小时内发生,并可持续数天而没有明显的减弱。因此,胶原蛋白与 DDR1 结合的反应是持续、缓慢的,而不是通过酪氨酸激酶家族受体的信号传递相关的急性、快速反应^[4]。DDR1 主要表达于上皮细胞,平滑肌细胞、成纤维细胞、少突胶质细胞和巨噬细胞,且 DDR1 与肾脏、肝脏、肺组织的纤维化病变有关^[5]。此外,DDR1 在多种肿瘤中均有表达,如肺癌、乳腺癌、脑瘤、卵巢癌、食管癌、头颈部肿瘤、肝癌等,其高表达与肿瘤预后不良密切相关^[6-9]。但是关于 DDR1 激酶激活和信号传导的机制知之甚少。本文通过探索 DDR1 在胃癌 SNU719 细胞株中的发挥的作用,探究其下游的相关信号通路,为进一步寻找胃癌早期诊断和和放化疗的新靶点提供新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与稳转细胞株的构建 胃癌细胞 SNU719 用含 10% 胎牛血清及青链霉素(青霉素 100U/ml,链霉素 0.1 mg/ml)的 DMEM 培养基培养,并置于 37℃,5% CO₂ 饱和湿度的培养箱内,约 2-3 天换液,使用 0.25% 的胰酶消化细胞,每周传代 2-3 次。将 SNU719 细胞铺种 24 孔内过夜后,加入 10 ug/ml 的 polybrene 的完全培养基,按照说明书添加相应的病毒溶液,培养箱中继续培养 12 小时更换为新鲜培养基。转染 72 小时后观察荧光,并更换为含 3 ug/ml 嘌呤霉素的培养基进行药筛,2 周后对细胞进行 QPCR 和 Western Blot 的检测。

1.2 实时荧光定量 PCR Trizol 法提取细胞总 RNA,取 RNA 于紫外分光光度计下测其浓度及纯度,将配制好的反转录体系加入 RT-PCR 仪中进行反应(37℃ 15 min-85℃ 5 s),得到 cDNA 后行实时荧光定量 PCR。使用的反应体系为 SYBR 5 ul,引物各 0.4 ul,cDNA 1 ul,无酶水 3.2 ul。反应步骤为 95℃ 10 min;95℃ 15 s,60℃ 1 min,共 40 个循环。每个样设 3 个复孔,记录各孔 Ct 值,以 β -Actin 为内参,引物序列为 5'-AGAAAATCTGGCACCA

CACC-3'(上游),5'-CATCTT-TGCTGAAGTCC-3'(下游),DDR1 引物序列为 5'-AAGGGACATTTTG ATCCTGCC-3'(上游)5'-CCTTGGGAAACACCGA CCC-3',采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算基因表达水平。

1.3 Western Blot 胃癌细胞株传代种于六孔板内,待其汇合率至 80~90% 时收样。预冷 PBS 水迅速洗三次后,加入预制的含蛋白酶抑制剂,磷酸酶抑制剂和 PMSF 的蛋白提取液,冰上裂解 30 min 后收集至 EP 管离心保存,BCA 法测定样品浓度后 100 摄氏度加热 10 min 变性。根据所测定浓度计算上样体积,以每孔 30 ug 蛋白上样,在凝胶和相应的装置内进行电泳(90V,30 min;110V,90 min)和转膜(110V,60 min)。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 小时后,将膜放入一抗稀释液(稀释比例依据说明书)后置于 4℃ 摇床过夜,TBST 溶液浸洗后加入相应二抗,室温孵育 2 h 后,使用发光液进行曝光并拍照。

1.4 细胞侵袭迁移实验 将基质胶从 -20℃ 取出,置于 4℃ 冰箱内融化,将基质胶与无血清培养液按 1:10 比例稀释后冰上备用。在无菌操作箱内,将 Transwell 小室置于预冷的 24 孔板内,用预冷的枪头吸取 200 ul 稀释后的基质胶溶液均匀包被于 Transwell 小室底部膜上,注意避免产生气泡,于细胞培养箱内孵育 30 min,基质胶凝固后,向 24 孔板内加入 500 ul 含 15% FBS 的培养液。将各组细胞消化,收集,离心,用含 3% FBS 的培养基制成悬液,调整细胞密度为 5X10⁴/100 ul,接种于小室内,36 h 后取出小室,吸尽培养基后迅速用预冷 PBS 洗 3 遍,并加入 4% 多聚甲醛溶液固定 10 min,PBS 洗净后加入 1% 结晶紫溶液染色 20 min,PBS 漂洗 2-3 次后用棉签擦除上室面的细胞,于室温晾干后置于显微镜下观察并拍照,随机选取 5 个视野,计数平均每个视野的细胞数,每组细胞设 3 个复孔。Transwell 迁移实验除无需铺胶外,其余同上。

1.5 统计分析 采用 SPSS13.0 统计软件(SPSS Inc, Chicago, US) 进行统计分析,定量数据结果用 3 次实验的均数 \pm 标准差表示, $P < 0.05$ (双侧)为有统计学意义。两独立样本连续变量采用 t 检验检验,多组连续变量采用单因素方差分析法检测。

2 结果

2.1 构建 DDR1 过表达的胃癌细胞株 SNU719 利用复能公司设计的 DDR1 过表达慢病毒转染

MKN45, 药筛 2 周后观察对照组和实验组细胞荧光情况, 并利用 QPCR 和 Western Blot 检测 DDR1 的 mRNA 和蛋白质表达变化情况。结果显示, 在 SNU719 细胞中, 过表达 DDR1 分子效果良好。(图 1A-C)

2.2 过表达 DDR1 可以促进胃癌细胞 SNU719 的迁移侵袭能力 我们利用构建好的 SNU719Vector 和 SNU719DDR1 细胞株分别于 Transwell 小室内进行细胞迁移和侵袭实验, 将迁移和侵袭的细胞固定染色, 于显微镜下拍照并计数, 研究结果表明, 过表达 DDR1 的 SNU719 细胞相对于对照组细胞分布于小室外侧面数量明显增多, 差异具有统计学意义, 表明其体外迁移和侵袭能力明显增强。(图 2)

2.3 DDR1 通过 NF-κB 信号通路调控 SNU719 的迁移和侵袭 我们猜想 NF-κB 通路是胶原配体刺激 DDR1 后的重要下游通路, 且该通路在肿瘤炎症及转移中发挥重要作用。为了验证该通路是否介导过表达 DDR1 在 SNU719 细胞中的促迁移和侵袭的作用, 我们利用免疫印迹的方法发现过表达 DDR1, 细胞核内 b-catenin 表达(图 3A), 并

且利用 NF-κB 通路抑制剂作用于稳转株细胞后, SNU719DDR1 细胞的迁移侵袭能力明显下降(图 3B)。上述结果表明, DDR1 确实通过 NF-κB 通路调控胃癌细胞 SNU719 的迁移和侵袭。

3 讨论

转移是指肿瘤细胞获得侵袭表型的能力并扩散到远处器官, 是癌症的一个基本特征。这种恶性表型的获得伴随着肿瘤细胞与以细胞外基质(extracellular matrix, ECM)为主的微环境生理作用的破坏。ECM 中最主要的组成部分是 28 种不同类型的胶原, 它们不仅组成了脊柱动物中的支撑蛋白, 还可结合细胞表面特定的受体, 激活相关的信号通路活动^[10]。盘状结构域受体就是胶原蛋白最重要的受体之一。由于 DDRs 可作为致癌和抗肿瘤受体, 并且它们的作用高度依赖于癌症的类型和阶段, 具体作用机制复杂且尚未明晰^[11]。DDR1 已被发现高表达在侵袭性肿瘤中, 并作为细胞侵袭和肿瘤转移的调节因子。本研究通过慢病毒转染在 SNU719 胃癌细胞株中过表达 DDR1 分子, 证明了 DDR1 过表达促进肿瘤细胞的迁移和侵袭,

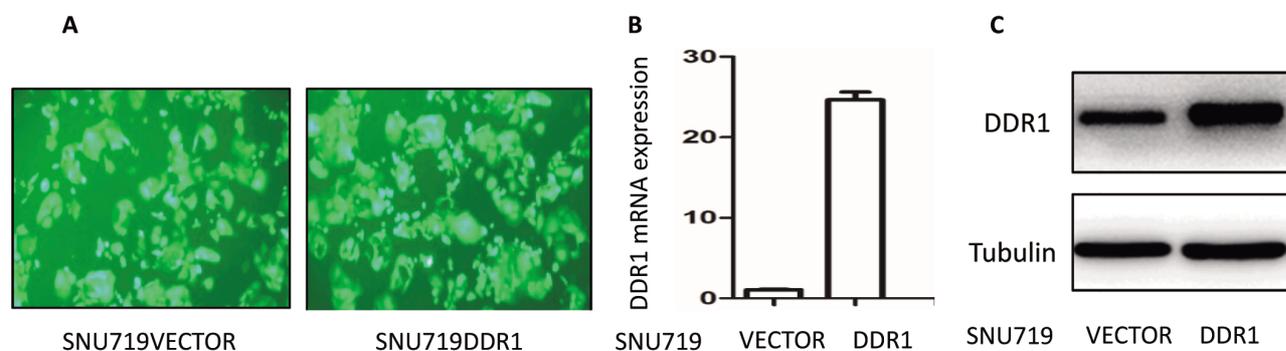


图 1 构建 SNU719DDR1 过表达稳转株

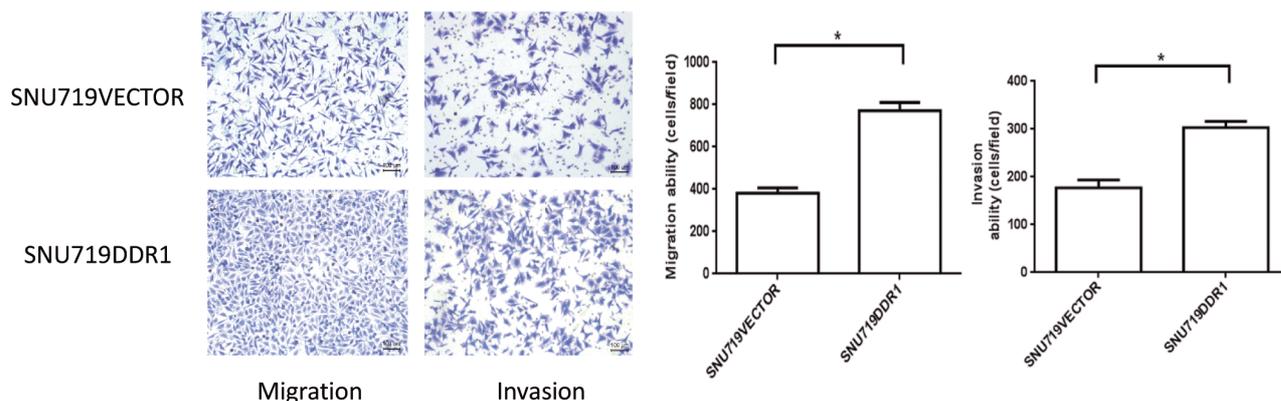


图 2 过表达 DDR1 可以促进胃癌细胞 SNU719 的转移能力

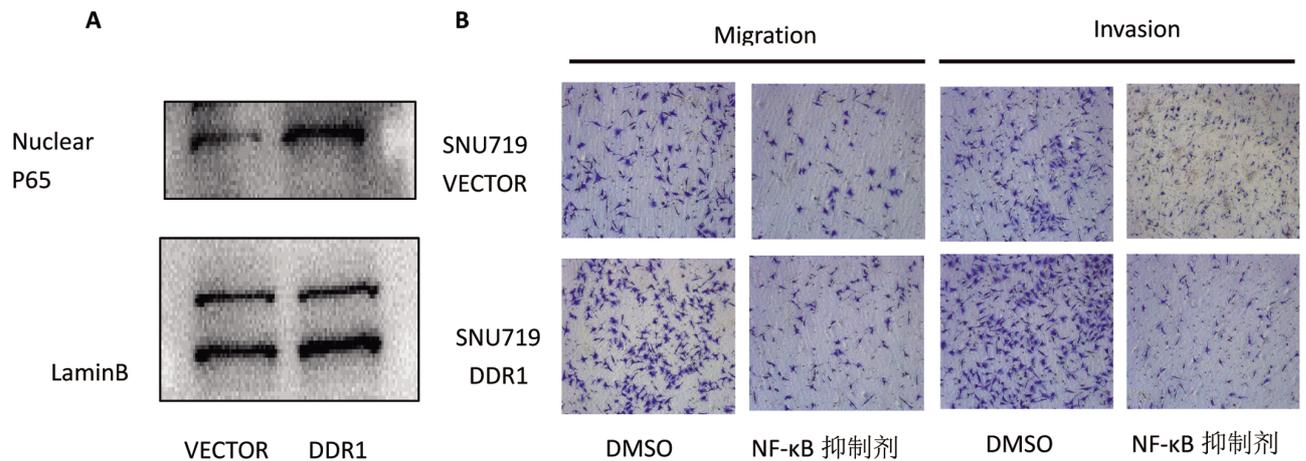


图3 NF- κ B 通路介导调控 DDR1 在 SNU719 细胞的促迁移作用

进一步巩固了 DDR1 的促癌作用理论。

Juin 等人研究显示 DDR1 对于线性侵入体的形成以及肿瘤细胞在胶原丰富微环境中的侵袭活动是至关重要的^[8], 并且该活动不需要胶原-DDR1 的激酶活性。其具体机制可能为胶原依赖于 DDR1 激活 Rho-GTP 酶 CDC4, 且 Cdc42 特异性鸟嘌呤核苷酸交换因子-Tuba 在该过程中起到重要作用。除了介导直接胶原依赖性信号, DDRs 还可以调节由其他基质受体(例如,整合素)、细胞因子(例如, TGF- β)和跨膜受体(例如, 胰岛素受体和 Notch1)启动的信号传导途径^[12]。NF- κ B 通路可以调节多种与肿瘤转移表型相关的细胞因子和黏附分子等蛋白的表达, 如金属基质蛋白酶, 白介素 8, 尿激酶型纤溶酶原活化因子等^[13, 14]。本研究通过蛋白印迹和抑制剂实验进一步证实 NF- κ B 通路作为 DDR1 重要的下游通路, 在肿瘤细胞的迁移和侵袭表型中发挥重要的作用。诚然, 本研究结果局限于单一细胞株的体外实验, 进一步的研究可增加其他细胞株的 DDR1 的敲低功能学和机制研究, 有待动物实验进一步完善得出结论, 为胃癌临床治疗提供新靶点建立坚实的理论基础。

参考文献

- [1] Mullenbach E, Walter L, Dressel R, et al. A novel discoidin domain receptor 1 (Ddr1) transcript is expressed in postmeiotic germ cells of the rat testis depending on the major histocompatibility complex haplotype [J]. *Gene*, 2006, 372: 53-61.
- [2] Juskaite V, Corcoran D S, Leitinger B, et al. Collagen induces activation of DDR1 through lateral dimer association and phosphorylation between dimers [J]. *eLife*, 2017, 6:e25716.
- [3] Lemmon M A, Schlessinger J, et al. Cell signaling by receptor tyrosine kinases [J]. *Cell*, 2010, 141(7): 1117-34.
- [4] Vogel W F, Abdullhussein R, Ford C E, et al. Sensing extracellular matrix: an update on discoidin domain receptor function [J]. *Cellular signalling*, 2006, 18(8): 1108-16.
- [5] Coelho N M, Mcculloch C A, et al. Contribution of collagen adhesion receptors to tissue fibrosis [J]. *Cell and tissue research*, 2016, 365(3): 521-38.
- [6] Sun X, Gupta K, Wu B, et al. Tumor-extrinsic discoidin domain receptor 1 promotes mammary tumor growth by regulating adipose stromal interleukin 6 production in mice [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2018, 293(8): 2841-9.
- [7] Hidalgo-Carcedo C, Hooper S, Chaudhry S I, et al. Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell-cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6 [J]. *Nature cell biology*, 2011, 13(1): 49-58.
- [8] Juin A, Di Martino J, Leitinger B, et al. Discoidin domain receptor 1 controls linear invadosome formation via a Cdc42-Tuba pathway [J]. *The Journal of cell biology*, 2014, 207(4): 517-33.
- [9] Gao H, Chakraborty G, Zhang Z, et al. Multi-organ Site Metastatic Reactivation Mediated by Non-canonical Discoidin Domain Receptor 1 Signaling [J]. *Cell*, 2016, 166(1): 47-62.
- [10] Huang H, Svoboda R A, Lazenby A J, et al. Up-regulation of N-cadherin by Collagen I-activated Discoidin Domain Receptor 1 in Pancreatic Cancer Requires the Adaptor Molecule Shc1 [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2016, 291(44): 23208-23.
- [11] Saby C, Rammal H, Magnien K, et al. Age-related modifications of type I collagen impair DDR1-induced apoptosis in non-invasive breast carcinoma cells [J]. *Cell adhesion & migration*, 2018, 12(4): 335-47.
- [12] Valiathan R R, Marco M, Leitinger B, et al. Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression [J]. *Cancer metastasis reviews*, 2012, 31(1-2): 295-321.

- [13] Jeitany M, Leroy C, Tosti P, et al. Inhibition of DDR1-BCR signalling by nilotinib as a new therapeutic strategy for metastatic colorectal cancer [J]. EMBO molecular medicine, 2018, 10(4):
- [14] Vella V, Nicolosi M L, Cantafio P, et al. DDR1 regulates thyroid cancer cell differentiation via IGF-2/IR-A autocrine signaling loop [J]. Endocrine-related cancer, 2019, 26(1): 197-214.

·读者·作者·编者·

本刊对来稿中统计学处理的有关要求

1. 统计学研究设计:应交代统计研究设计的名称和主要做法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或横断面调查研究);实验设计(应交代具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等);临床试验设计(应交代属于第几期临床试验,采用了何种盲法等)。主要做法应围绕4个原则:随机、对照、重复、均衡进行概要说明,尤其要交代如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

2. 资料的表达与描述:用 $(\bar{x}\pm s)$ 表达近似正态分布的定量资料,用 $M(Q_R)$ 表达呈偏态分布的定量资料;用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的意义表达清楚,可使用表注在表格下方进行详细说明;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上的刻度值的标法符合数学原则,可使用图注进行必要的说明;用相对数时,分母不宜少于20,要注意区分百分率和百分比。

3. 统计分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料条件和分析目的,选择合适的统计方法,不能盲目套用 t 检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件以及分析目的,选择合适的统计分析方法,不能盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析,应结合专业知识和散布图,选用合适的回归类型,不能盲目套用简单直线回归分析,对于具有重复实验数据的回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素,多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系进行全面和合理的解释和评价。

4. 统计结果的解释和表达:当 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 时应说明对比组之间的差异有统计学意义,而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)的差别;应写明所用统计分析方法的具体名称(如:成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间的两两比较的 q 检验等),统计量的具体值(如 $t=3.12, \chi^2=4.36, F=6.86$ 等)应尽可能给出具体的 P 值(如 $P=0.012$);当涉及到总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,再给出95%可信区间。