

DDR1 低表达对结肠癌细胞增殖转移的影响

程 凰 傅晓娟 何建新

义乌市中心医院 检验科, 浙江 义乌 322000

摘要: 目的 探究 DDR1(Discoidin domain receptor 1,DDR1)对结肠癌细胞增殖转移的影响及可能机制。方法 使用公共数据库 GEPIA(Gene Expression Profiling Interactive Analysis)分析 DDR1 在人结肠癌组织和癌旁组织中的表达情况, 蛋白质印迹实验(Western blot)检测 DDR1 在正常结肠上皮细胞 FHC 和结肠癌细胞(DLD-1、SW480、SW620 和 HCT-15) 中蛋白表达量, 使用平板克隆形成实验检测细胞增殖能力, Transwell 小室迁移和侵袭实验检测细胞转移能力, 蛋白质印迹实验检测 MEK-ERK 通路的变化。结果 DDR1 在人结肠癌组织中表达水平高于癌旁组织(* $P<0.05$), shCon 组(阴性对照组)的增殖转移能力明显强于 shDDR1 组(DDR1 低表达组) (** $P<0.01$, *** $P<0.001$), Western blot 结果显示, 与 shCon 组相比, shDDR1 组 p-MEK1/2(S217/221)和 p-ERK1/2(T202/Y204)的蛋白表达水平下降。结论 DDR1 在人结肠癌组织和细胞中高表达, 且 DDR1 促进人结肠癌细胞 DLD-1 和 SW480 增殖转移, 这可能是与 MEK-ERK 通路的磷酸化调控相关。

关键词: 结肠癌; DDR1; 迁移; 侵袭

结肠癌 (Colon cancer) 是全球第三大常见癌症, 也是全世界癌症相关死亡的主要原因^[1]。然而, 结肠癌发病机制目前尚未完全阐明, 大多数结肠癌患者被诊断时已经发生转移。目前, 结肠癌的治疗以手术治疗为主, 辅以放疗、化疗等辅助治疗方案。然而, 约 3%-50% 的患者术后出现局部转移复发^[2], 造成患者预后较差, 影响常规治疗的疗效。因此, 探索结肠癌转移的分子机制从而有效的靶向其转移机制能为结肠癌治疗提供新策略。盘状蛋白结构域受体 1 (DDR1) 是一种单遍跨膜蛋白, 属于受体酪氨酸激酶 (RTKs) 超家族

盘状结构域受体1(Discoidin domain receptor 1,DDR1), 是类属于酪氨酸激酶受体 (Receptor tyrosine kinases , RTKs) 超家族的单次跨膜蛋白, 该基因位于6p21, 也被称为CAK 、 CD167、RTK6、MCK10、PTK3等。同时在哺乳动物中DDR1还有功能较为类似的旁系同源基因DDR2, 它主要表达于间质起源细胞, 例如肌肉、结缔组织等。与DDR2不同的是, DDR1表达仅限于上皮细胞, 特别是在肾脏、肺、胃肠道和大脑^[3]。此外, 在多种癌症细胞系中报道了DDR1介导细胞迁移, 其中包括胶质瘤、肝癌、肺癌、胰腺癌、结肠直肠癌和乳腺癌等^[4,5-9]。然而, DDR1对癌细胞的迁移调控依赖于细胞类型, 有研究表明使用IV型胶原激活MDA-MB-231乳腺癌细胞后, 能够通过DDR1和CD9的途径诱导细胞迁移^[5], 但在MDA-MB-468乳腺癌细胞中DDR1对细胞迁移促进作用是依赖于其对酪氨酸蛋白激酶

(syk)活性的调节^[10]。因此, 在同一肿瘤不同细胞系中DDR1对癌细胞的迁移调控机制仍有差别, 本文研究了在结肠癌细胞DLD-1和SW480中低表达DDR1后其迁移和侵袭能力的改变, 并通过蛋白印迹实验初步探索引起这种变化的可能原因。

1 材料和方法

1.1 细胞和主要试剂

人结直肠癌细胞(DLD-1、SW480、SW620、HCT-15) 和人正常结直肠上皮细胞FHC来源于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。细胞培养使用的胎牛血清来自Lonsa Science SRL公司(乌拉圭)。细胞培养所使用的培养基RPMI-1640源自美国Grand Island Biological 公司。细胞保存使用的二甲基亚砜源自西格玛奥德里奇公司。细胞胰蛋白酶消化液、蛋白RIPA裂解液、PMSF试剂、测定蛋白浓度试剂盒 (BCA方法)、吐温20和GAPDH兔多克隆抗体等试剂来源于上海碧云天生物技术有限公司。化学发光显影试剂、细胞转染试剂Lipofectamine 3000、抗生素嘌呤霉素、DDR1单克隆抗体(D1G6)、Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) 单克隆抗体和Phospho-MEK1/2单克隆抗体源自美国赛默飞公司。HRP标记的山羊抗小鼠或抗兔(IgG)抗体来自杭州联科生物科技公司。30%APS来自索莱宝科技有限公司。Transwell小室、细胞培养需要的六孔及十二孔板培养皿等来自美国康尼公司。基质胶购自美国Becton,Dickinson公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

使用内含5%灭活新生小牛血清的RPMI-1640培养基, 放在37 ° C、5% CO₂的细胞无菌培养箱中培养人结肠癌细胞DLD-1和SW480。

1.2.2 细胞转染

DDR1 敲低质粒的载体为 pLKO.1-TRC-copGFP-2A-PURO,shRNA 序列:CTGGTAGCTGTCAAGATCTTA 和 GTGTGGCTCGCTTTCTGCAGT,使用慢病毒转染技术构建DDR1 敲低的稳转细胞株, 其中结肠癌细胞 DLD-1 和 SW480 使用嘌呤筛选的浓度分别为 3 μg/ml 和 2 μg/ml

1.2.3 Western blot检测相关蛋白的表达水平

根据实验设置, 使用RIPA裂解液提取蛋白后, 采用BCA试剂盒测定蛋白浓度, 使用5X SDS Loading Buffer 在金属浴将蛋白变性 (100° C, 5 min)。使用浓缩胶(5% SDS-PAGE)以恒压80V运行半小时, 分离胶(12% SDS PAGE)以恒压90V运行一个半小时分离蛋白, 将已分离的蛋白以恒流300mA运行一个半小时转移至硝酸纤维膜(PVDF膜)上, 使用TBST配置的5%脱脂牛奶在摇床室温封闭一个半小时, 将条带置于对应抗体中在4 ° C摇床过夜。将条带置于对应的二抗(辣根过氧化物标记的山羊抗兔或抗小鼠IgG)中25° C摇床一小时。使用Bio-Rad成像仪成像, Image J软件分析。

1.2.4 Transwell小室迁移实验

依据实验需要选择稳定转染细胞重悬于无血清培养基中。在上室加入200 μL细胞悬液(DLD-1细胞 3×10^4 个/200 μL, SW480细胞 4×10^4 个/200 μL), 在下室加入600 μL含有20% 胎牛血清的RPMI-1640培养基, 放入37 ° C、5% CO₂二氧化碳培养箱中继续培养。48 h后, 去除上室中细胞, 把小室放到4%多聚甲醛中15 min, 再把小室放入结晶紫中15 min。在显微镜下随机选择5个视眼, 使用Image Pros Plus软件分析。

1.2.5 Transwell小室侵袭实验

将基质胶、实验使用的Transwell小室、枪头和细胞培养板等放入4 ° C冰箱, 基质胶和细胞培养基原液以1: 10的比例配置, 取40 μL加入小室内放入无菌二氧化碳培养箱(37 ° C、5% CO₂)中孵育 7~10 h, 弃去小室内的液体, 加入40 μL培养基原液放入无菌二氧化碳培养箱(37 ° C、5% CO₂)中30 min。其他步骤同1.2.4。

1.2.6 细胞平板克隆形成实验

体外培养细胞株, 使用牛鲍计数板计数1000个肿瘤细

胞(参考文献), 均匀铺到六孔板后体外培养两周, 使用4%多聚甲醛固定15分钟, 使用结晶紫染色15分钟后用PBS缓冲液清洗。

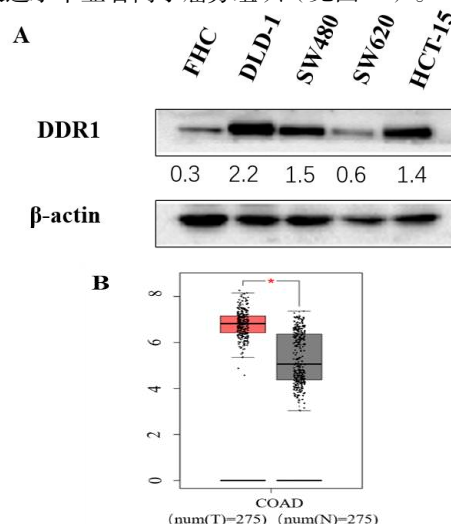
1.3 统计学分析

每个试验都有三次以上的重复, 独立样本分析采用 t 检验, P<0.05 时, 差异具有统计学意义, 使用Graph Pad Prism 7.0软件进行统计学分析和绘图。

2 结果

2.1 DDR1在结肠癌细胞和组织中的蛋白表达情况

使用蛋白印迹实验检测DDR1在结肠癌细胞(DLD-1、SW480、SW620、HCT-15)和正常结肠上皮细胞FHC中的蛋白表达水平, DDR1在结肠癌细胞中的蛋白表达水平远高于正常结肠上皮细胞(见图1A), 使用网页<http://gepia.cancer-pku.cn/>在TCGA数据库中分析DDR1在结肠癌组织和癌旁组织中的表达水平, DDR1在结肠癌组织中表达水平显著高于癌旁组织(见图1B)。



A: 结肠癌细胞株中DDR1蛋白水平表达情况; B: TCGA数据库分析DDR1在结肠癌组织中表达情况

图1 DDR1在结肠癌细胞和组织中高表达

2.2 稳定转染后结直肠癌细胞DDR1的蛋白表达水平变化

使用DDR1敲低质粒及其对照质粒构建DDR1低表达的稳转细胞株, 通过Western blot实验进行验证且具有统计学意义(见图2)

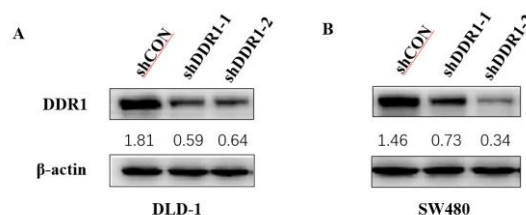
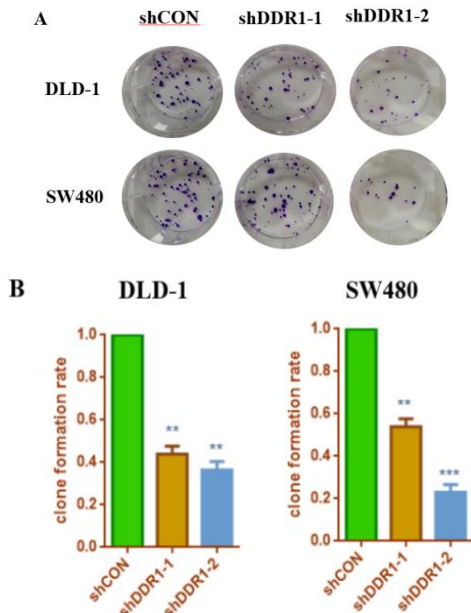


图2 蛋白印迹实验检测稳定转染后结肠癌细胞的DDR1蛋白表达

2.3 DDR1促进结肠癌细胞增殖

通过细胞平板克隆形成实验检测细胞的增殖能力,结果显示 DDR1 促进结肠癌细胞 DLD-1 和 SW480 增殖(图 3A),且具有统计学意义(图 3B)。

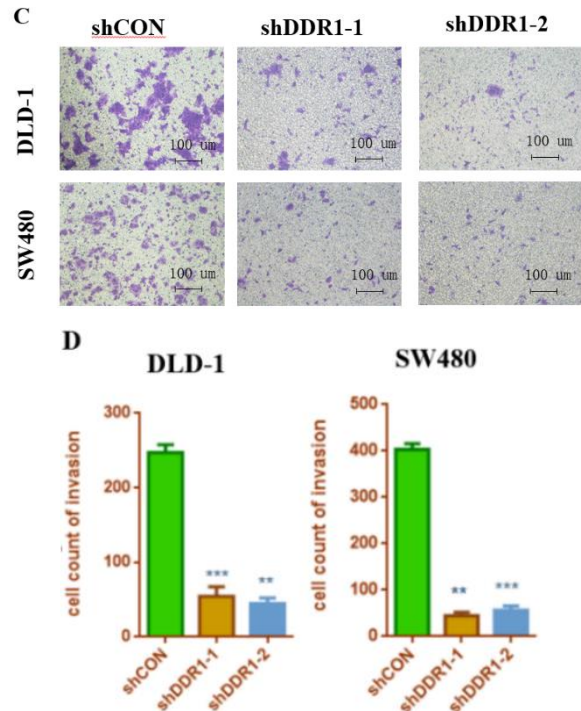
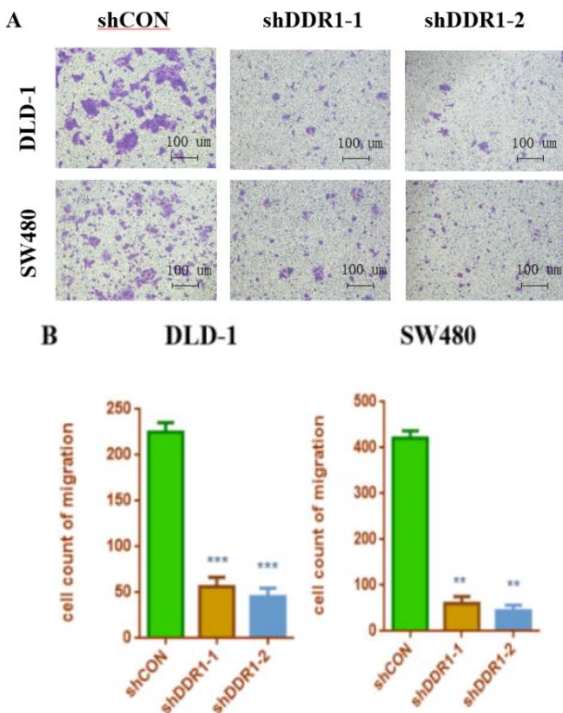


A: 平板克隆形成实验检测结肠癌细胞增殖水平。B: 结直肠癌细胞增殖能力相对定量柱状图 ($P<0.05$)。

图3 DDR1促进结直肠癌细胞增殖

2.4 DDR1促进结肠癌细胞转移

使用 Transwell 细胞体外迁移和侵袭实验进行检测,结果显示 DDR1 促进结肠癌细胞 DLD-1 和 SW480 转移,且具有统计学意义(图 4A-D)。



A、C: Transwell 实验检测结肠癌细胞转移水平。B、D: 结直肠癌细胞转移能力相对定量柱状图 ($P<0.05$)。

图4 DDR1促进结直肠癌细胞转移

2.5 DDR1低表达对结直肠癌细胞MEK-ERK信号通路的影响

使用蛋白印迹实验检测 DDR1 低表达后 MEK 和 ERK 蛋白磷酸化的表达水平,与对照组相比,shDDR1 组 MEK 和 ERK 的蛋白表达水平明显升高(图 5A)。

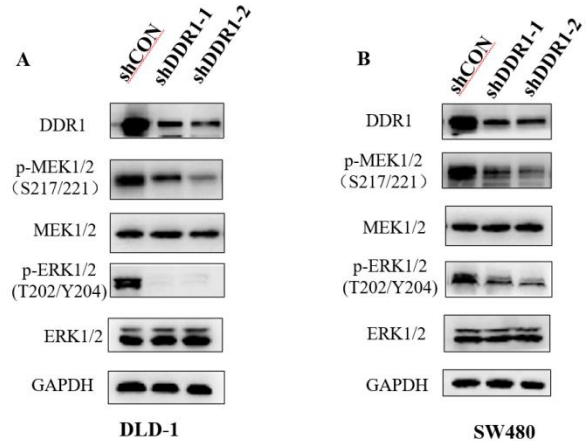


图 5 Western blot 检测 p-MEK1/2(S217/221) p-ERK(T202/Y204)的蛋白表达水平

3 讨论

盘状蛋白域受体(DDRs)是一类可与胶原结合并被其激活的酪氨酸激酶受体,它们参与很多的生物学过程,如细胞粘附、迁移、增殖和细胞外基质重构^[11]。

有研究表明在体外使用 siRNA 靶向胶质瘤中的 DDR1

或 shRNA 靶向胰腺癌细胞株 DDR1 可抑制肿瘤细胞增殖^[12,13]; DDR1 抑制后会导致乳腺癌细胞和胶原治疗的霍奇金淋巴瘤细胞的凋亡水平增加^[14]。本实验研究发现与上述一致,在结肠癌细胞 DLD-1 和 SW480 中使用 shRNA 低表达 DDR1 能够抑制其增殖和转移,但是有研究结论与上述研究结果相悖逆:DDR1 也可以抑制肿瘤细胞生长,在胶原三维培养系统中,DDR1 通过诱导与促凋亡蛋白 BCL-2 相互作用的杀伤蛋白(BCL-2 interacting killer,BIK)促发腔内乳腺癌细胞的凋亡^[15]。综上所述 DDR1 在不同的肿瘤类型和微环境中对肿瘤增殖和凋亡的影响不尽相同,所以关于 DDR1 对细胞增殖和存活的影响是促进还是抑制目前还存在较大的争议。

当 DDR1 与胶原结合时,存在于 DDR1 酪氨酸激酶结构域激活环中的特定酪氨酸残基会被磷酸化,激酶结构域中被激活的酪氨酸可作为多个适配器蛋白的对接位点,如含有 SH2 结构域的转化蛋白 1(She1)^[16]、Nck2^[17]、NF- κ B^[18]等。此外,也有研究表明,某些蛋白与 DDR1 的结合不依赖 DDR1 的磷酸化,如 DARPP32^[19]、多巴胺、E-钙黏蛋白、Syk、肾脏表达蛋白和 Par3/Par6 等^[20]。本实验研究发现 DDR1 对结肠癌细胞 DLD-1 和 SW480 增值转移的调控可能不一定依赖于胶原蛋白的刺激。

有关 DDR1 下游信号通路的报道有很多,在大肠癌中,DDR1 通过与 Notch1 相互作用,从而促进 Hes1 和 Hey2 促存活蛋白的表达^[21]。由于细胞背景的不同,胰腺癌细胞中激活 DDR1 后可以和与整合素协同作用导致 JNK 通路的激活,进而使 N-钙黏蛋白水平上调并促进 EMT 的发生^[22],而在犬肾细胞中激活 DDR1 可以抑制 STAT1/3 信号和下调 Cdc42 的表达来阻碍整合素介导的肿瘤细胞的转移,进而稳定 E-钙黏蛋白并抑制 EMT 的发生^[23]。DDR1 在血管平滑肌细胞中可以激活 ERK 通路^[24],但是在肾小球系膜细胞中则是抑制 ERK 通路的,而在乳腺癌中并不调节 ERK 通路^[25],本实验研究发现 DDR1 在结肠癌细胞 DLD-1 和 SW480 中可以激活 MEK-ERK 通路。

综上所述,本研究在细胞层面探究了 DDR1 对结肠癌细胞增殖转移的影响。结果显示 DDR1 在结肠癌细胞和组织中表达升高,且 DDR1 可能通过激活 MEK-ERK 通路促进结直肠癌细胞侵袭。

利益冲突声明:本文所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献:

[1]王玲玲,杨明,陈海鹏,等.早发性结直肠癌临床病理特征、诊治及筛查研究进展[J].肿瘤研究与临

床,2021,33(11): 801-804.

[2]Adams R B, Haller D G, Roh M S. Improving resectability of hepatic colorectal metastases : expert consensus statement by Abdalla et al[J].Annals of Surgical Oncology,2006,13(10):1281-3.

[3]Ambrogio C,Gómez-López G Falcone M, et al. Combined inhibition of DDR1 and Notch signaling is a therapeutic strategy for KRA-driven lung adenocarcinoma [J]. Nat Med, 2016, 22(3): 270-7.

[4]Hu Y Liu J, Jiang B, et al. MiR-199a-5p loss up-regulated DDR1 aggravated colorectal cancer by activating epithelial-to-mesenchymal transition related signaling [J].Dig Dis Sci,2014, 59(9): 2163-72.

[5]Ram R, Lorente G,Nikolich K,et al. Discoidin domain receptor-1a (DDR1a) promotes glioma cell invasion and adhesion in association with matrix metalloproteinase-2 [J].J Neurooncol,2006,76(3): 239.48.

[6]Park H S,Kim K R, Lee H J, et al. Overexpression of discoidin domain receptor 1 increases the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells in association with matrix metalloproteinase [J]. Oncol Rep,2007,18(6): 1435-41.

[7]Yang SH, Baek HA. Lee H J,et al. Discoidin domain receptor 1 is associated with poor prognosis of non-small cell lung carcinomas [J]. Oncol Rep,2010,24(2): 311-9.

[8]Richters A, Nguyen H D, Phan T, et al. Identification of type II and III DDR2 inhibitors [J].J Med Chem,2014, 57(10):4252-62.

[9]Neuhaus B,Bahren S, Bock B,et al. Migration inhibition of mammary epithelial cells by Syk is blocked in the presence of DDR1 receptors [J]. Cell Mol Life Sci,2011, 68(22): 3757-70.

[10]Saby C, Collin G, Sinane M, et al. DDR1 and MT1-MMP Expression Levels Are Determinant for Triggering BIK-Mediated Apoptosis by 3D Type I Collagen Matrix in Invasive Basal-Like Breast Carcinoma Cells [J]. Front Pharmacol,2019,10:462.65

[11]Lu P, Weaver V M, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression [J]. J Cell Biol,2012, 196(4): 395-406.

[12]Yamanaka R, Arai T, Yajima N,et al. Identification of

- expressed genes characterizing long-term survival in malignant glioma patients [J]. *Oncogene*,2006,25(44): 5994–6002.
- [13]Huang H, Svoboda R A, Lazenby A J, et al. Up-regulation of N-cadherin by Collagen I-activated Discoidin Domain Receptor 1in Pancreatic Cancer Requires the Adaptor Molecule Shc [J]. *J Biol Chem*,2016,291(44):23208–23.
- [14]Cader FZ,Vockerodt M,Bose S, et al. The EBV oncogene LMP1 protects lymphoma cells from cell death through the collagen-mediated activation of DDR1 [J]. *Blood*,2013,122(26):4237–45.
- [15]Vogel W, Abdulhussein R, Ford C. Sensing extracellular matrix: an update on discoidin domain receptor function [J]. *Cellular signalling*,2006,18(8): 1108–16
- [16]Ikeda K, Wang L H, Torres R,et al. Discoidin domain receptor 2 interacts with Src and Shc following its activation by type I collagen [J]. *J Biol Chem*,2002, 277(21): 19206–12.
- [17]Koo D H, McFadden C,Huang Y,et al. Pinpointing phosphotyrosine-dependent interactions downstream of the collagen receptor DDR1 [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(1): 15–22.
- [18]Das S, Ongusaha P P, Yang Y S, et al. Discoidin domain receptor 1 receptor tyrosine kinase induces cyclooxygenase-2 and promotes chemoresistance through nuclear factor-kappaB pathway activation [J]. *Cancer Res*,2006,66(16): 8123–30.
- [19]Hansen C, Greengard P, Naim A C, et al. Phosphorylation of DARPP-32 regulates breast cancer cell migration downstream of the receptor tyrosine kinase DDR1 [J]. *Exp Cell Res*,2006,312(20): 4011–8.
- [20]肖忠盛,龙泓,丁成明,等.IMP3基因沉默介导Notch信号通路对结直肠癌上皮间质转化及血管生成的影响[J]. *中国免疫学杂志*,2020,36(14):1714•1719.
- [21]Ongusaha P P, Kim JI, Fang L, et al. p53 induction and activation of DDR1 kinase counteract p53-mediated apoptosis and influence p53 regulation through a positive feedback loop [J]. *Embo j*,2003,22(6):1289–301.
- [22]Sweeney S M, Orgel JP, Fertala A, et al. Candidate cell and matrix interaction domains on the collagen fibril, the predominant protein of vertebrates[J]. *J Biol Chem*,2008,283(30):21187–97.
- [23]Shintani Y, Fukumoto Y, Chaika N, et al. Collagen I-mediated up-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor 1 [J]. *J Cell Biol*, 2008,180(6): 1277–89.
- [24]Yeh Y C, Wang C Z, Tang MJ. Discoidin domain receptor 1 activation suppresses alpha2beta1 integrin-dependent cell spreading through inhibition of Cdc42 activity[J]. *J Cell Physiol*,2009,218(1):146–56.
- [25]钟轩,王红钰,蒋涛,马等.干扰ZEB1表达对结直肠癌细胞上皮间质转化与增殖、凋亡与迁移的影响[J]. *实用医学杂志*,2019,35(21):3290-3295.
- 作者简介:**程凰(1996–),女,浙江义乌,汉族,硕士研究生学历,导师:吕建新教授,义乌市中心医院,职称:检验师,研究方向:肿瘤增值转移机制研究。
基金项目:金华市公益性技术应用研究课题(编号:2023-4-259)。