

DOI:10.13267/j.cnki.syzlzz.2024.022

· 基础研究 ·

# 潜在转化生长因子β结合蛋白4影响肿瘤细胞伪足形成抑制结直肠癌转移的分子机制研究

及松涛<sup>1</sup>, 王好甲<sup>1</sup>, 李昂<sup>2</sup>, 孙亚盟<sup>3</sup>, 卢媛媛<sup>2</sup>, 赵晓迪<sup>2</sup>, 王新<sup>1</sup>

1. 空军军医大学唐都医院消化内科, 陕西 西安 710038; 2. 空军军医大学西京医院, 国家消化系统疾病临床医学研究中心和消化系肿瘤整合防治全国重点实验室, 陕西 西安 710032; 3. 海军第 971 医院军事医学与特种学科, 山东 青岛 266000

通信作者: 王新, E-mail: wangx@fmmu.edu.cn

**摘要:** **目的** 探究潜在转化生长因子β结合蛋白4 (latent transforming growth factor beta binding protein 4, LTBP4) 通过影响肿瘤细胞伪足形成从而遏制结直肠癌细胞转移的分子机制。**方法** 在结直肠癌细胞株 DiFi 中使用小干扰 si-LTBP4 敲减 LTBP4, 在结直肠癌细胞株 HCT15 中使用 LTBP4 过表达质粒过表达 LTBP4。使用人源慢病毒在 DiFi 细胞株中稳定敲减 / 不敲减 LTBP4 构建稳转细胞株 shLTBP4 和 shNC。Western blot 法检测 LTBP4、原肌球蛋白 4 (tropomyosin 4, TPM4)、金属基质蛋白酶 14 (matrix metalloproteinase-14, MMP14) 及酪氨酸激酶底物 5 (tyrosine kinase substrate 5, TKS5) 等蛋白。实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 检测 LTBP4 及 TPM4 的表达。Transwell 迁移实验检测敲低 / 过表达 LTBP4 后结直肠癌细胞的体外转移能力。使用裸鼠尾静脉注射 shLTBP4 或 shNC 稳转细胞株构建裸鼠肺转移模型及阴性对照, 检测结直肠癌细胞敲减 LTBP4 后的体内转移能力。转录组测序检测差异基因表达情况。鬼笔环肽染色观察敲低 LTBP4 后细胞骨架改变及侵袭性伪足形成情况。**结果** qPCR 实验检测发现, LTBP4 在 DiFi、HCT8 和 KM12C 细胞株中均高表达 (均  $P < 0.05$ ), 在 HCT15 和 KM12SM 细胞株中均低表达 (均  $P < 0.01$ )。Western blot 检测发现, LTBP4 在 DiFi、HCT8 和 KM12C 细胞株中均高表达 (均  $P < 0.01$ ), 在 HCT15、KM12SM 及 RKO 细胞株中均低表达 (均  $P < 0.05$ )。在高表达 LTBP4 的 DiFi 细胞株中感染小干扰 si-LTBP4, 敲低 LTBP4, 转染后 72 h 后进行 transwell 迁移实验发现, 肿瘤细胞迁移能力增强 ( $P < 0.01$ ); 而在低表达 LTBP4 的 HCT15 细胞株中过表达 LTBP4, 72 h 后肿瘤细胞迁移能力减弱 ( $P < 0.01$ )。裸鼠肺转移模型在通过尾静脉注射稳转细胞株 shLTBP4 以及 shNC 5 周后进行小动物活体荧光成像发现, 敲低 LTBP4 后, 小鼠肺部荧光信号增强 ( $P < 0.01$ )。高通量转录组测序发现, 在 DiFi 细胞株中敲减 LTBP4 使细胞骨架蛋白 TPM4 的表达量增加 ( $P < 0.01$ ), 维持细胞运动功能 (如肌动蛋白丝束收缩、应力纤维改变和肌动蛋白束的调节) 相关通路显著富集 (均  $P < 0.05$ ) 以及细胞形态改变相关通路 (如轴突伸展调节、突触前膜、核孔和活性离子跨膜传输等) 显著富集 (均  $P < 0.05$ )。Western blot、qPCR 及免疫荧光实验验证 DiFi 细胞株中敲减 LTBP4 促进细胞运动相关蛋白 TPM4 的表达 (均  $P < 0.01$ )。**结论** LTBP4 可以通过调控 TPM4 的方式抑制侵袭性伪足的形成从而遏制结直肠肿瘤细胞的转移。

**关键词:** 结直肠癌; 潜在转化生长因子β结合蛋白4; 肿瘤转移; 转录组测序; 免疫荧光; 侵袭性伪足

## Molecular mechanism of latent transforming growth factor beta binding protein 4 inhibiting metastasis of colorectal cancer by affecting pseudopod formation in tumor cells

Ji Songtao<sup>1</sup>, Wang Haojia<sup>1</sup>, Li Ang<sup>2</sup>, Sun Yameng<sup>3</sup>, Lu Yuanyuan<sup>2</sup>, Zhao Xiaodi<sup>2</sup>, Wang Xin<sup>1</sup>

1. Department of Gastroenterology, Tangdu Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710038, China; 2. State Key Laboratory of Holistic Integrative Management of Gastrointestinal Cancers and National Clinical Research Center for Digestive Diseases, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China; 3. Department of Military Medicine and Special Medicine, 971<sup>st</sup> Hospital of Navy, Qingdao 266000, China  
Corresponding to: Wang Xin, E-mail: wangx@fmmu.edu.cn

**Abstract: Objective** To investigate the molecular mechanism of latent transforming growth factor beta binding protein 4 (LTBP4) inhibiting the metastasis of colorectal cancer cells by influencing pseudopod formation in tumor cells. **Methods** In colorectal cancer DiFi <https://www.academax.com/doi/10.13267/j.cnki.syzlzz.2024.022>

cells, si-LTBP4 was used to knock down *LTBP4*, while in colorectal cancer HCT15 cells, *LTBP4* was overexpressed. Stable cell lines shLTBP4 and shNC were constructed using *LTBP4*-knockdown and empty lentiviral vectors, respectively. Western blot was used to detect the expression of *LTBP4*, tropomyosin 4 (TPM4), matrix metalloproteinase-14 (MMP14), tyrosine kinase substrate 5 (TKS5), etc. Quantitative real-time PCR (qPCR) was used to measure *LTBP4* and TPM4 expressions. Transwell migration assay was performed to assess the *in vitro* migration ability of colorectal cancer cells with altered *LTBP4* expression. A lung metastasis mouse model was constructed by injecting shLTBP4 cells into the tail vein of nude mice to detect the *in vivo* metastasis ability of colorectal cancer cells after knocking down *LTBP4*, and mice injected with shNC cells was used as control. Transcriptome sequencing was conducted to analyze the changes in gene expression. Immunofluorescence staining was used to observe cytoskeleton changes and invadopodia formation in *LTBP4*-knockdown cells. **Results** qPCR results showed that *LTBP4* was highly expressed in the DiFi, HCT8, and KM12C cell lines (all  $P < 0.05$ ), and was expressed at low levels in the HCT15 and KM12SM cell lines (both  $P < 0.01$ ). Western blot assay revealed high expression of *LTBP4* in the DiFi, HCT8, and KM12C cell lines (all  $P < 0.01$ ), and low expression in the HCT15, KM12SM, and RKO cell lines (all  $P < 0.05$ ). Transfection of small interfering si-LTBP4 in the DiFi cell line which had high *LTBP4* expression resulted in the knockdown of *LTBP4*. Transwell migration assay conducted 72 hours post-transfection showed enhanced migration ability of cells ( $P < 0.01$ ). Conversely, *LTBP4* overexpression in the HCT15 cell line which had low *LTBP4* expression led to weakened migration 72 hours after transfection ( $P < 0.01$ ). For the lung metastasis mouse model, *in vivo* fluorescence imaging in small animals performed 5 weeks after injecting shLTBP4 or shNC cells via the tail vein revealed increased fluorescence in the lungs of the mice with *LTBP4* knockdown ( $P < 0.01$ ). High-throughput transcriptome sequencing indicated that *LTBP4* knockdown in the DiFi cell line increased the expression of the cytoskeletal protein TPM4 ( $P < 0.01$ ) and significantly enriched pathways related to the maintenance of cell motility functions, such as the contraction of actin filament bundles, regulation of actin filament polymerization and alteration of stress fibers (all  $P < 0.05$ ), and pathways related to the alteration of cellular morphology, including the regulation of axon stretch, presynaptic membranes, nuclear pore and transmembrane transport of active ions (all  $P < 0.05$ ). Western blot, qPCR, and immunofluorescence experiments confirmed that *LTBP4* knockdown in the DiFi cell line promoted TPM4 expression (all  $P < 0.01$ ). **Conclusions** *LTBP4* inhibits colorectal cancer cell metastasis by regulating TPM4 and suppressing invadopodia formation.

**Key words:** colorectal cancer; latent transforming growth factor beta binding protein 4; tumor metastasis; transcriptome sequencing; immunofluorescence; invadopodia

2020 年全球约有 190 万结直肠癌新发病例和 90 万死亡病例, 其发病率和死亡率分别位居常见恶性肿瘤的第 3 位和第 2 位<sup>[1-2]</sup>。虽然近年来, 得益于治疗手段及个体防范意识的提升, 结直肠癌总体发病率有所下降, 但死亡率仍然位居所有癌症的前 3 位<sup>[2]</sup>。不同地区的结直肠癌疾病负担和筛查现状存在显著差异。有 15%~25% 的结直肠癌患者确诊时即合并肝转移, 而另有 15%~25% 的患者在结直肠癌原发灶根治术后发生肝转移, 其中 80%~90% 的肝转移灶初始无法获得根治性切除<sup>[3]</sup>。转移是造成结直肠癌患者预后差和生存期短的重要原因。因此, 抑制结直肠肿瘤转移非常重要。分子靶向治疗和免疫治疗是近年来出现的治疗方式, 以靶向性好和不良反应小为特点<sup>[4]</sup>。

潜在转化生长因子  $\beta$  结合蛋白 4 (latent transforming growth factor beta binding protein 4, *LTBP4*) 属于 *LTBP*/纤维蛋白超家族, 是一种细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 糖蛋白, 在肿瘤增殖和转移的多个环节中, 均能发挥调控作用。研究表明, 在导管原位癌和浸润性乳腺癌中, *LTBP4*

表达下调能促进肿瘤细胞的增殖发展<sup>[5-6]</sup>。胃肠道上皮来源的恶性肿瘤与相同器官的正常组织比较, *LTBP4* 的表达量较低; 在食管癌细胞株中重新表达 *LTBP4* 降低肿瘤细胞的运动能力<sup>[7]</sup>。在肝癌细胞株中敲除 *LTBP4*, 可以促进肿瘤细胞增殖, 激活细胞周期, 增加肿瘤细胞的上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 行为, 并进一步诱导肿瘤细胞的运动<sup>[8]</sup>。在非小细胞肺癌中, *LTBP4* 也与较低的全因死亡率相关<sup>[9]</sup>。

然而, *LTBP4* 在结直肠癌中的作用机制尚不明确。本研究旨在探讨 *LTBP4* 对结直肠癌细胞运动的影响, 并初步探讨其分子机制, 为寻找结直肠癌的癌前筛查位点、预后预测标志物和靶向治疗潜在靶点提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株及主要试剂

人结直肠癌细胞株 DiFi、HCT15、RKO、HCT8 以及 HCT116 均从美国模式菌种收集中心 (American Type Culture Collection, ATCC) 获得。

KM12SM 和 KM12C 从美国范德堡大学 Coffey 实验室获得。以上细胞株均保存于肿瘤生物学国家重点实验室的细胞样本库中。

DMEM 细胞培养液、胎牛血清、双抗（青霉素 + 链霉素）、胰酶和 PBS 购自美国 Gibco 公司。实时定量 PCR 引物购自北京擎科生物有限公司。兔抗人 LTBP4 购自德国 Thermo 公司。兔抗人原肌球蛋白 4（tropomyosin 4, TPM4）购自武汉 Proteintech 公司。兔抗人金属基质蛋白酶 14（matrix metalloproteinase-14, MMP14）、酪氨酸激酶底物 5（tyrosine kinase substrate 5, TKS5）、磷酸化细胞皮质区肌动蛋白结合蛋白（P-cortical actin-binding protein, P-Cortactin）和甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH）以及鼠抗人 Cortactin 购自美国 Cell Signalling Technology 公司。Transwell 迁移实验小室购自美国 Corning 公司。携带人类 LTBP4 基因识别位点并稳定敲减 LTBP4 的慢病毒购自上海 Genepharma 公司。RNA 提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司。mRNA 反转录相关试剂盒购自日本 Takara 公司。PCR 相关试剂盒购自上海 Yeasen 公司。

## 1.2 主要仪器

细胞培养箱购自德国 Thermo 公司。倒置光学显微镜购自日本 Olympus 公司。台式低温高速和常温低速离心机购自美国 Caliper 公司。RNA 反转录仪、实时荧光定量 PCR（quantitative real-time PCR, qPCR）仪和细胞电子计数仪购自美国 Bio-Rad 公司。Agilent 2100 生物分析仪（Agilent 2100 Bioanalyzer）购自美国安捷伦（Agilent）公司。Qubit 荧光仪购自德国 Thermo 公司。高通量转录组测序平台 Illumina NovaSeq 6000 为美国 Illumina 公司产品。

## 1.3 实验动物

4~6 周龄的雌性裸鼠由空军军医大学（第四军医大学）实验动物中心提供，在无病原体条件下培养。动物研究由第四军医大学动物护理委员会批准。

## 1.4 细胞培养

细胞在含 10% 胎牛血清、1% 二抗、1% 谷氨酰胺和 1% 非必需氨基酸溶液的 DMEM 培养液中培养，培养条件 5%CO<sub>2</sub>、37℃，待细胞生长至 85%~95% 时消化传代。

## 1.5 Western blot 实验

使用 100 μL 补充有蛋白酶抑制剂和磷

酸酶抑制剂的放射免疫沉淀法裂解缓冲液（radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA）裂解细胞 20 min，并用 BCA 蛋白测定试剂盒测定浓度。变性蛋白质通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分馏并转移到硝酸纤维素膜上。在混合 Tween-20 的 Tris 缓冲液（Tris buffered saline with Tween 20, TBST）中用 10% 脱脂牛奶（150 mM NaCl、120 mM Tris-HCl、pH 7.4 和 0.05% Tween-20）封闭后，将膜与一级和二级辣根过氧化物酶（horse radish peroxidase, HRP）偶联抗体一起孵育。

使用的抗体如下：兔抗人 LTBP4、兔抗人 TPM4、兔抗人 MMP14、兔抗人 TKS5、鼠抗人 Cortactin、兔抗人 P-Cortactin、兔抗人 GAPDH（以上抗体稀释浓度为 1:1 000）以及山羊抗兔和山羊抗小鼠 IgG（这 2 种抗体稀释浓度为 1:2 000）。GAPDH 作为内参。使用分子成像仪 ChemiDox XRS+ 成像系统获得蛋白凝胶数字图像。Bio-Rad 图像实验室软件扫描印迹。

## 1.6 RNA 提取和 qPCR 检测

使用 RNeasy Plus 通用组织迷你试剂盒从细胞株中提取总 RNA。使用紫外分光光度计检测 RNA 样品浓度及 260 nm 与 280 nm 处的吸光度（absorbance, *A*）值比值，之后进行 RNA 浓度标化，按说明书配置反转录体系，条件为 37℃ 反转录 15 min，85℃ 灭活反转录酶 15 s。反转录后模板用两步法进行扩增，扩增条件：95℃ 预热 30 s；95℃ 变性 5s，60℃ 退火延伸 30 s，循环 45 次。LTBP4 上游引物：5'-TTCCAGTGCAGGACCTGTCCTT-3'；下游引物：5'-GAAGGAGCCTTCGGTGTAGTG-3'。TPM4 上游引物：5'-GAGGTAGCTCGTAAGCTGGTC-3'；下游引物：5'-ACCGTTCTCTCTGCAAATTCAG-3'。GAPDH 上游引物：5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'；下游引物：5'-TGGTGAAGACGCCAGTGA-3'。PCR 分析使用 LightCycler 480 系统。GAPDH 作为内参，2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 方法用于确定每个样品相对于参考样品的 RNA 相对表达水平。每个样品分 3 份测定。

## 1.7 瞬时转染和慢病毒感染

设计合成针对 LTBP4 的小干扰 RNA（5'-AUU-CAGGAAUCUCAGGACCTT-3'）和阴性对照 siRNA（5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'）。通过瞬时转染的方法使用 DharmaFECT 转染试剂将 siRNA-LTBP4 转染入 DiFi 细胞中，构建 LTBP4 敲低的 si-LTBP4 细胞；将阴性对照 siRNA 转染入 DiFi 细

胞中, 构建相应的阴性对照 si-NC 细胞。

使用 DharmaFECT 转染试剂将 *LTBP4* 模拟物 [由中国上海吉玛公司使用 pcDNA3.1 (+) 构建过表达质粒] 及其阴性对照 pcDNA3.1 (+) 空载体分别转染入 HCT15 细胞, 获得 *LTBP4* 过表达 (overexpression, OE) 的 OE-*LTBP4* 细胞和相应阴性对照 OE-NC 细胞。

分别使用空的慢病毒载体 [绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) Marker] 转染野生型 DiFi 细胞作为阴性对照 (shNC 细胞), 使用敲减 *LTBP4* 的 sh*LTBP4* 慢病毒 (GFP Marker) 转染野生型 DiFi 细胞构建 *LTBP4* 低表达结直肠癌细胞株 (sh*LTBP4* 细胞)。转染 48 h 后, 用 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  嘌呤霉素筛选 DiFi 细胞 2 周。然后使用 GFP 荧光验证转染效率 (GFP 荧光有/无), 以获得具有稳定性状的细胞株。

### 1.8 体外迁移实验

通过 transwell 迁移实验评估细胞迁移能力。通过具有 8  $\mu\text{m}$  孔、24 孔跨孔板的跨孔测定法评估细胞迁移能力。对于迁移测定, 将 si-NC、si-*LTBP4*、OE-NC 和 OE-*LTBP4* 细胞按  $1.0 \times 10^5$  接种在衬有未包被膜的顶部小室中。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵育后, 在适当的时间内, 先用无水乙醇固定细胞, 后用 0.1% 结晶紫染色对已迁移的细胞进行染色, 并在显微镜下计数以确定其相对数量。

### 1.9 尾静脉转移试验

10 只裸鼠随机分为 shNC 组 (阴性对照) 和 sh*LTBP4* 组 (敲减 *LTBP4*), 每组 5 只。将 GFP 标记的 sh*LTBP4* 细胞和 shNC 细胞按  $1.0 \times 10^6$  分别重悬于 200  $\mu\text{L}$  PBS 中, 分别通过尾静脉注射到 sh*LTBP4* 组和 shNC 组裸鼠体内。注射 5 周后, 使用小动物活体光学成像系统 (*In Vivo* Imaging System, IVIS) 光谱体内成像系统评估生物发光强度。

### 1.10 免疫荧光

细胞爬片生长 24 h 后, 使其密度达到 50%~60%。吸掉培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$  预热的 1 $\times$  PBS (pH7.4) 清洗细胞 3 次。接着使用溶于 PBS 的 4% 多聚甲醛溶液进行细胞固定, 室温固定 10~30 min。再次用 PBS 清洗细胞 2~3 次, 每次 3 min。用 0.5% Triton X-100 溶液透化处理 5 min。用 PBS 清洗细胞 2~3 次, 每次 10 min。取 200  $\mu\text{L}$ /孔 (24 孔板) 配制好的 Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 标记鬼笔环肽工作液, 覆盖住盖玻片上的细胞, 室温避光孵育 30 min。使用带 4',6'-二脒基-2 苯基吲 (4',6'-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染料

的防淬灭剂进行封固。使用共聚焦显微镜 10 $\times$ /0.30 NA 物镜和 FluoView 4.3 软件进行荧光观察。

### 1.11 转录组测序

使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 精确检测 RNA 完整性和总量, 进行文库构建与质检库构建。文库构建完成后使用 Qubit 荧光仪进行初步定量, 随后对文库的 insert size 进行检测。Insert size 符合预期后, 用 Illumina NovaSeq 6000 进行测序。

基因表达水平定量使用转录组定量工具 featureCounts 进行计算用于映射到每个基因的读数。根据基因长度计算每个基因的每百万次映射读取的转录物每千碱基片段数 (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads, FPKM), 并计算映射到该基因的读数。差异表达分析对于有生物学重复的样本, 使用 DESeq2 软件 (1.20.0) 进行两个比较组合之间的差异表达分析。DESeq2 提供统计程序用于使用基于负二项式分布的模型来确定数字基因表达数据中的差异表达。使用 Benjamini-Hochberg 法调整  $P$  值 ( $P_{adj}$ ) 以控制错误发现率。 $P_{adj} \leq 0.05$  且  $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$  设为差异表达具有统计学意义。

通过 clusterProfiler (3.8.1) 软件实现差异表达基因的基因本体论 (Gene Ontology, GO) 富集分析, 其中修正了基因长度偏差。 $P_{adj} < 0.05$  的 GO term 通过差异表达基因显著富集。

### 1.12 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。定量资料符合正态分布, 采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。多组间比较采用单因素方差分析。进一步两两比较采用 LSD。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 体外敲低/过表达 *LTBP4* 后结直肠癌细胞运动能力发生变化

qPCR 实验检测发现, *LTBP4* 在 DiFi、HCT8 和 KM12C 细胞株中均高表达 (均  $P < 0.05$ ), 在 HCT15 和 KM12SM 细胞株中均低表达 (均  $P < 0.01$ , 图 1A)。Western blot 检测发现, *LTBP4* 在 DiFi、HCT8 和 KM12C 细胞株中均高表达 (均  $P < 0.01$ ), 在 HCT15、KM12SM 及 RKO 细胞株中均低表达 (均  $P < 0.05$ , 图 1B)。qPCR 及 Western Blot 法验证 si*LTBP4* 细胞中 *LTBP4* 表达下调和 OE-*LTBP4* 细胞中 *LTBP4* 过表达 (图 1C)。

Transwell 迁移实验发现, si-*LTBP4* 细胞转

移并透过 transwell 小孔的细胞数量较 si-NC 细胞增多 ( $P<0.01$ )；而 OE-LTBP4 细胞转移并透过 transwell 小孔的细胞数量较 OE-NC 细胞减少 ( $P<0.01$ , 图 1D)。

### 2.2 体内抑制 LTBP4 表达促进结直肠癌细胞转移

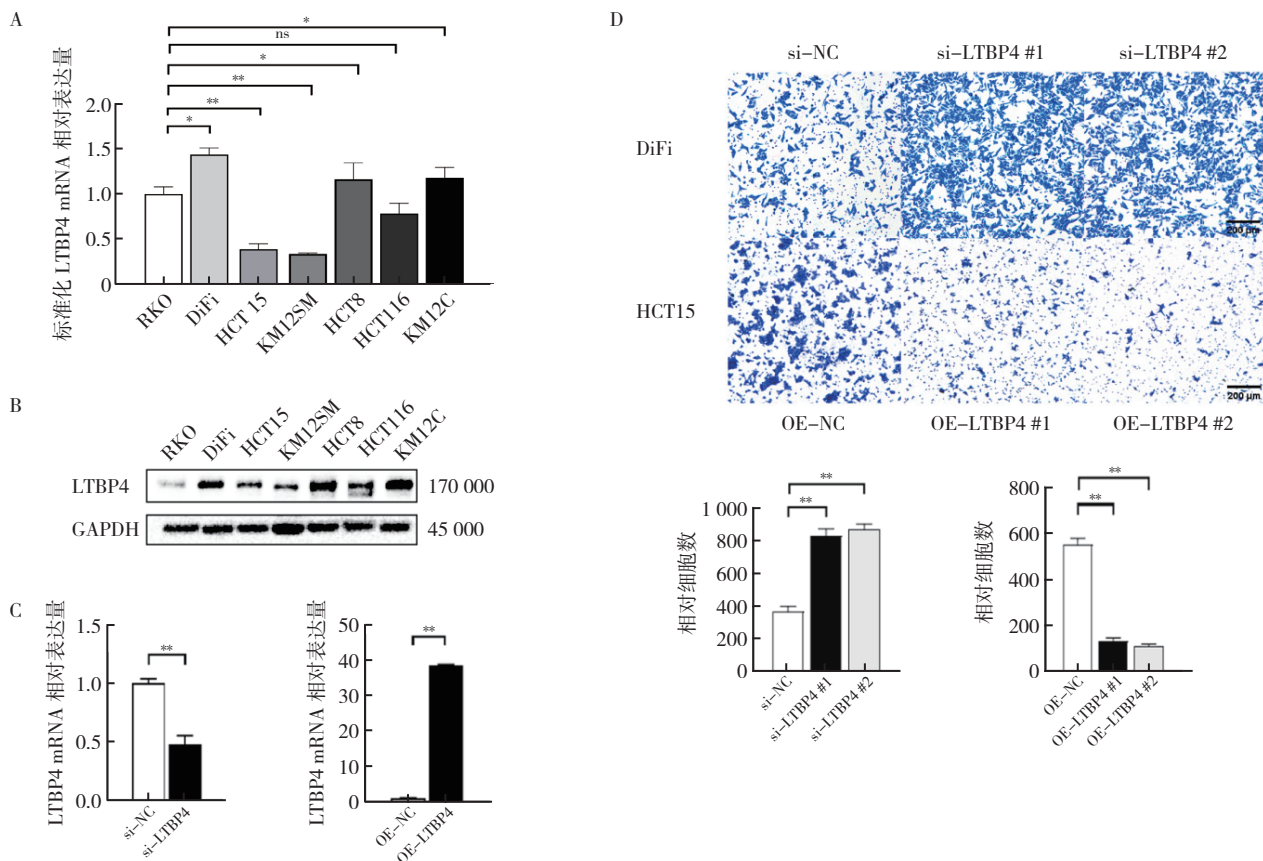
通过携带 *LTBP4* 载体 (GFP Marker) 及对应空载体 (GFP Marker) 的慢病毒转染结直肠癌细胞株 DiFi 构建 *LTBP4* 低表达细胞株 (shLTBP4 细胞) 及阴性对照 (shNC 细胞), 并应用 qPCR 实验验证 shLTBP4 细胞中 *LTBP4* 表达降低 (图 2C)。

经尾静脉将 200  $\mu$ L PBS 重悬的  $1.0 \times 10^6$  个 shLTBP4 或 shNC 细胞分别注入裸鼠体内 ( $n=5$ )；分别于注射 2、3、4 和 5 周后用小动物活体荧光成像系统 PerkinElmer 观察肿瘤, 在 2、3 和 4 周后未发现小鼠肺和肝等部位有显著荧光强度改变；5 周后进行荧光成像发现, 与注射 shNC 细胞的裸鼠比

较, 注射 shLTBP4 细胞的裸鼠转移部位荧光强度明显升高 (图 2A~2B)。

### 2.3 通过 RNA-seq 发现敲低 *LTBP4* 促进细胞骨架蛋白 TPM4 的表达

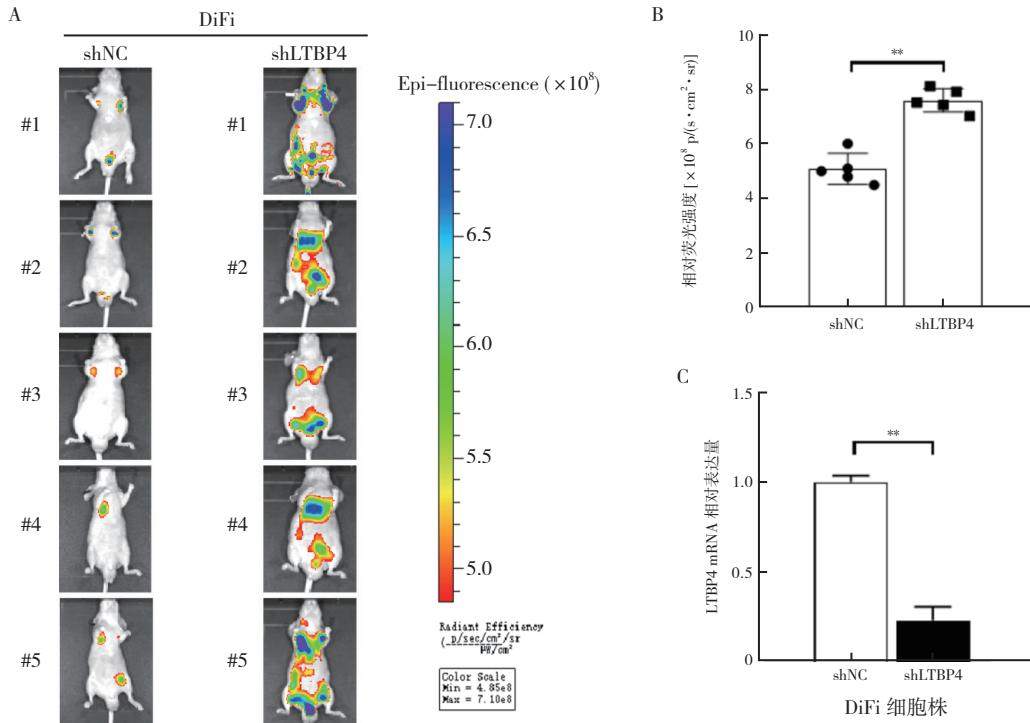
为了探究 *LTBP4* 抑制结直肠癌转移的具体机制, 通过 RNA-Seq 比较 si-LTBP4 和 si-NC 细胞的基因表达谱, 以 fold change  $\geq 2$  且  $P<0.05$  为标准, 并考虑 mRNA 表达丰度, 共获得 267 个差异表达的基因, 其中在 si-LTBP4 细胞中 153 个基因表达上调, 114 个基因表达下调 (图 3A)。结合以上数据分析发现, 敲减 *LTBP4* 后发生变化的基因中前 5 位变化最显著的是 *TPM4*、过氧化物还蛋白 3 (peroxiredoxin 3, *PRDX3*)、甲基甾醇单加氧酶 1 (methylsterol monooxygenase 1, *MSMO1*)、桥粒芯蛋白 2 (desmoglein 2, *DSG2*) 和线粒体外膜的转位酶 20 (translocase of outer mitochondrial



注 A : *LTBP4* 在多个结直肠癌细胞株中的 mRNA 表达水平 ; B : *LTBP4* 在多个结直肠癌细胞株中的蛋白表达水平 ; C : qPCR 实验检测敲低或过表达质粒转染结直肠癌细胞后 48 h 的 *LTBP4* 敲低或过表达效率 ; D : 结直肠癌细胞中敲低或过表达 *LTBP4* 后 72 h 的 transwell 迁移实验结果 ; *LTBP4* : 潜在转化生长因子  $\beta$  结合蛋白 4 (latent transforming growth factor beta binding protein 4) ; NC : 阴性对照 (negative control) ; OE : 过表达 (overexpression) ; si-LTBP4 : siRNA 敲低 *LTBP4* 的 DiFi 细胞 ; OE-LTBP4 : 过表达 *LTBP4* 质粒转染的 HCT15 细胞 ; \* $P<0.05$  ; \*\* $P<0.01$  ; ns : not significant ( $P>0.05$ )

图 1 LTBP4 可在体外影响结直肠癌细胞 DiFi 和 HCT15 的迁移

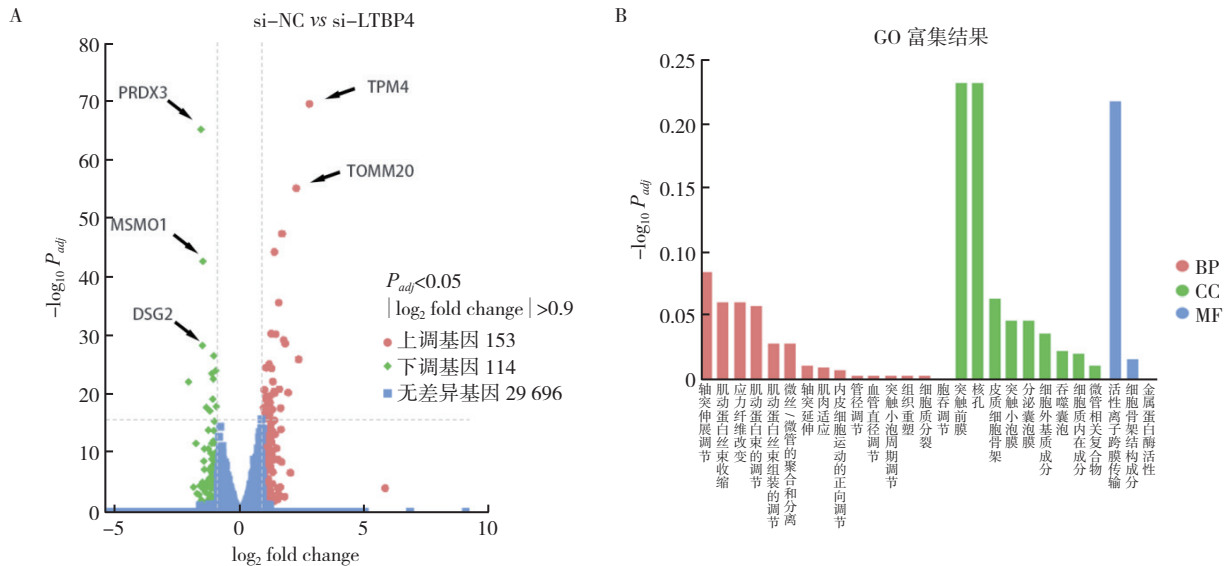
Fig.1 LTBP4 affected the migration of colorectal cancer DiFi and HCT15 cells in vitro



注 A: 通过尾静脉注射稳定敲减 *LTBP4* 的 shLTBP4 细胞 ( $n=5$ ) 或阴性对照 shNC 细胞 ( $n=5$ ) 的 10 只裸鼠 5 周后小动物活体荧光成像结果; B: 注射 shNC 或 shLTBP4 细胞的裸鼠 5 周后总体 GFP 荧光强度比较; C: qPCR 实验验证稳转 DiFi 细胞株 shLTBP4 的 *LTBP4* 敲减效率; *LTBP4*: 潜在转化生长因子  $\beta$  结合蛋白 4 (latent transforming growth factor beta binding protein 4); shLTBP4: 慢病毒稳定敲低 *LTBP4*; NC: 阴性对照 (negative control); Epi-fluorescence: 落射荧光; \*\* $P<0.01$

图 2 *LTBP4* 在体内影响结直肠癌细胞的迁移

Fig.2 *LTBP4* affected the migration of colorectal cancer cells *in vivo*



注 A: 结直肠癌 DiFi 细胞株 si-NC 和 si-LTBP4 的差异基因分布情况; B: 敲减 *LTBP4* 的 si-LTBP4 细胞较 si-NC 细胞富集显著的 GO 富集分析结果; fold change: 差异倍数; *PRDX3*: 过氧化物还蛋白 3 (peroxiredoxin 3); *MSMO1*: 甲基固醇单加氧酶 1 (methylsterol monooxygenase 1); *DSG2*: 桥粒芯蛋白 2 (desmoglein 2); *TPM4*: 原肌球蛋白 4 (tropomyosin 4); *TOMM20*: 线粒体外膜的转位酶 20 (translocase of outer mitochondrial membrane 20); BP: 生物进程 (biological process); CC: 细胞成分 (cellular component); MF: 分子功能 (molecular function)

图 3 结直肠癌细胞中敲减 *LTBP4* 促进 TPM4 的表达并影响细胞运动功能

Fig.3 Knockdown of *LTBP4* in colorectal cancer cells promoted TPM4 expression and affected cell motility function

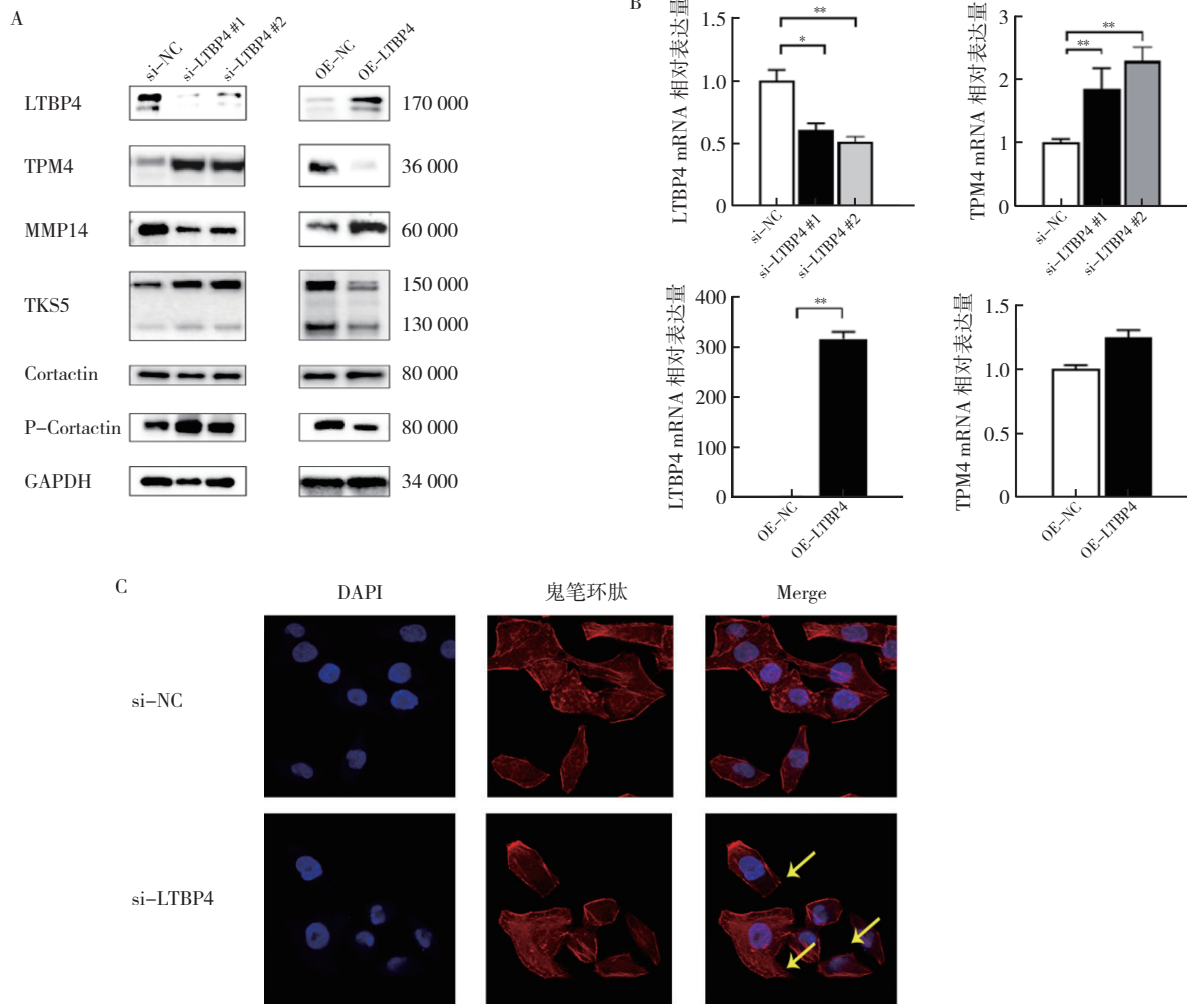
membrane 20, *TOMM20*), 其中 *TPM4* 和 *TOMM20* 基因表达上升, 其余基因表达下调。

通过 GO 功能富集进一步发现, si-LTBP4 细胞的生物进程 (biological process, BP) 富集主要在轴突伸展调节、肌动蛋白丝束收缩、应力纤维改变和肌动蛋白束的调节 (均  $P < 0.05$ ); 细胞成分 (cellular component, CC) 富集主要集中在突触前膜和核孔 (均  $P < 0.01$ ); 分子功能 (molecular function, MF) 富集主要集中在活性离子跨膜运输和细胞骨架结构成分 (均  $P < 0.05$ , 图 3B)。因此

本研究聚焦于基因改变倍数大且与细胞运动功能密切相关的 *TPM4*, 并推测 *LTBP4* 可通过 *TPM4* 影响细胞骨架及运动, 从而抑制肿瘤细胞的转移。

### 2.4 *LTBP4* 调控细胞骨架蛋白 *TPM4* 控制侵袭性伪足功能

Western blot 法检测 si-LTBP4、si-NC、OE-LTBP4 和 OE-NC 细胞中 *TPM4* 表达显示, 结直肠癌细胞中下调 *LTBP4* 表达后, *TPM4* 表达上升; 而过表达 *LTBP4* 后 *TPM4* 表达下降 (均  $P < 0.01$ , 图 4A)。qPCR 检测示, 结直肠癌细胞敲减 *LTBP4* 造



注 A : 结直肠癌细胞中敲低或过表达 *LTBP4* 后, 伪足相关分子及骨架蛋白 *TPM4* 在翻译后水平的改变; B : qPCR 检测结直肠癌细胞敲低或过表达 *LTBP4* 后 *TPM4* 表达的改变情况; C : si-NC 和 si-LTBP4 细胞的鬼笔环肽免疫荧光染色结果, 箭头示侵袭性伪足改变; NC : 阴性对照 (negative control); *LTBP4* : 潜在转化生长因子  $\beta$  结合蛋白 4 (latent transforming growth factor beta binding protein 4); OE : 过表达 (overexpression); si-LTBP4 : siRNA 敲低 *LTBP4* 的 DiFi 细胞; OE-LTBP4 : 过表达 *LTBP4* 质粒转染的 HCT15 细胞; *TPM4* : 原肌球蛋白 4 (tropomyosin 4); MMP14 : 金属基质蛋白酶 14 (matrix metalloproteinase-14); TKS5 : 酪氨酸激酶底物 5 (tyrosine kinase substrate 5); Cortactin : 细胞皮质区肌动蛋白结合蛋白 (cortical actin-binding protein); P-Cortactin : 磷酸化细胞皮质区肌动蛋白结合蛋白 (P-cortical actin-binding protein); GAPDH : 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase); DAPI : 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole); Merge : 合并; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$

图 4 *LTBP4* 通过调控 *TPM4* 影响结直肠癌细胞侵袭性伪足的形成

Fig.4 *LTBP4* affected the invadopodia formation of colorectal cancer cells by modulating *TPM4*

成 TPM4 表达改变 ( $P < 0.01$ , 图 4B), 而过表达 *LTBP4* 对 TPM4 表达无影响 ( $P > 0.05$ )。LTBP4 表达在蛋白互作水平影响 TPM4 表达。

Western blot 实验检测侵袭性伪足相关分子的表达发现, 结直肠癌细胞中敲低 *LTBP4* 后, MMP14 表达减少 ( $P < 0.01$ ), TKS5 表达增加 ( $P < 0.05$ ), Cortactin 表达未发生变化 ( $P > 0.05$ ) 而 P-Cortactin 表达上调 ( $P < 0.01$ ); 过表达 *LTBP4* 后, MMP14 表达增加 ( $P < 0.01$ ), TKS5 表达减少 ( $P < 0.01$ ), Cortactin 表达未发生变化 ( $P > 0.05$ ) 而 P-Cortactin 则下调 ( $P < 0.05$ , 图 4A)。免疫荧光共聚焦成像发现, 敲低 *LTBP4* 后, 肿瘤细胞骨架改变行为增加, 丝状伪足、片状伪足及侵袭性伪足发生增加, 细胞侵袭性增强 (图 4C)。

### 3 讨论

在因 *LTBP4* 基因突变导致的常染色体隐性遗传性皮肤松弛症中, *LTBP4* 与转化生长因子  $\beta$  受体 2 (transforming growth factor beta receptor 2, TGF $\beta$ 2) 之间存在分子相互作用。*LTBP4* 基因敲除降低 TGF- $\beta$  受体的丰度, 导致 TGF- $\beta$ 1 水平升高<sup>[10]</sup>。而在肝癌细胞株中, 体外实验验证, 敲除 *LTBP4* 降低活性 TGF- $\beta$ 1 的丰度水平, 但总体 TGF- $\beta$ 1 水平无明显变化; 而在体内实验中, 总体 TGF- $\beta$ 1 的丰度水平也会发生变化<sup>[8]</sup>。而在 *LTBP4* 与 TGF- $\beta$ 1 的结合是否能够调节 TGF- $\beta$ 1 的问题上, 有研究团队使用 *LTBP4* 基因发生突变的小鼠模型发现, TGF- $\beta$ -LTBP 复合体的形成能影响 TGF- $\beta$ 1 功能<sup>[11]</sup>。综上所述, 笔者猜测 *LTBP4* 可能通过影响 TGF- $\beta$  通路的方式影响肿瘤细胞的运动功能, 但目前没有关于 *LTBP4* 如何通过 TGF- $\beta$  依赖或非依赖途径调节肿瘤细胞的运动的报道。

上皮来源肿瘤转移的另一个关键步骤是通过基底膜 (basement membrane, BM) 进行侵袭。在转移过程中, 为了穿过 BM, 肿瘤细胞被认为利用一种由肌动蛋白构成的特殊细胞亚结构突起——侵袭性伪足, 在化学和物理上创造开口, 以便通过 BM 进行细胞运动<sup>[12]</sup>。先前的研究表明, 侵袭性伪足会分泌 MMP 来化学降解 BM 层<sup>[12-13]</sup>。虽然还有研究表明, 在不依赖于蛋白水解酶的情况下, 侵袭性伪足也可以通过施加突起和收缩的力量, 机械地在 BM 层中打开孔洞<sup>[14]</sup>。但其效率低下, 且仍需要膜 I 型金属基质蛋白酶 (membrane-type I matrix metalloproteinase, MT1-MMP) 来降解基质并加宽基

质孔来产生侵袭途径<sup>[15]</sup>。还有研究证实, 在三维 (three-dimension, 3D) 空间和 BM 丰富的环境中, 增加基质环境的刚性能在物理上限制侵袭性伪足的扩展和运动<sup>[16]</sup>。因此, 侵袭性伪足主要是通过分泌 MMP 和物理上对 BM 的机械重塑来完成运动功能的; 而抑制 MMP 的释放并增强细胞外基质的物理刚性 (即增加基质密度及基底膜厚度) 能有效抑制侵袭性伪足的功能。本研究初步证明, *LTBP4* 可以通过调控细胞骨架蛋白 TPM4 的方式, 调控肿瘤细胞侵袭性伪足的形成及功能, 从而抑制结直肠癌细胞的远处转移。而 *LTBP4* 影响肿瘤细胞运动的方式可能是多方面的, 这需要进一步探讨研究。

### 参考文献:

- [1] 杨宗明, 朱章航, 徐李莎, 等. 全球结直肠癌疾病负担与筛查比较[J]. 实用肿瘤杂志, 2023, 38(3): 211-217.
- [2] Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A, et al. Cancer statistics, 2024[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(1): 12-49.
- [3] 朱德祥, 任黎, 许剑民. 中国结直肠癌肝转移诊断和综合治疗指南 (2023 版) [J]. 消化肿瘤杂志: 电子版, 2023, 15(2): 86-99.
- [4] 陆依儿, 翁姗姗, 袁瑛. 2023 年 ASCO 转移性结直肠癌免疫治疗和靶向治疗进展[J]. 实用肿瘤杂志, 2023, 38(4): 312-317.
- [5] Kretschmer C, Conradi A, Kemmner W, et al. Latent transforming growth factor binding protein 4 (LTBP4) is downregulated in mouse and human DCIS and mammary carcinomas[J]. Cell Oncol, 2011, 34(5): 419-434.
- [6] Mauel S, Kruse B, Etschmann B, et al. Latent transforming growth factor binding protein 4 (LTBP-4) is downregulated in human mammary adenocarcinomas *in vitro* and *in vivo* [J]. APMIS, 2007, 115(6): 687-700.
- [7] Bultmann I, Conradi A, Kretschmer C, et al. Latent transforming growth factor  $\beta$ -binding protein 4 is downregulated in esophageal cancer via promoter methylation[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e65614.
- [8] Yang XO, Ye XJ, Zhang LY, et al. Disruption of LTBP4 induced activated TGF $\beta$ 1, immunosuppression signal and promoted pulmonary metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 7007-7017.
- [9] Shin KM, Hong MJ, Lee SY, et al. Regulatory variants in cancer-related pathway genes predict survival of patients with surgically resected non-small cell lung cancer[J]. Gene, 2018, 646: 56-63.
- [10] Su CT, Huang JW, Chiang CK, et al. Latent transforming growth factor binding protein 4 regulates transforming

growth factor beta receptor stability[J]. Hum Mol Genet, 2015, 24(14): 4024–4036.

[11] Licandro SA, Crippa L, Pomarico R, et al. The pan HDAC inhibitor Givinostat improves muscle function and histological parameters in two Duchenne muscular dystrophy murine models expressing different haplotypes of the LTBP4 gene[J]. Skelet Muscle, 2021, 11(1): 19.

[12] Huang JC, Zhang LL, Wan DL, et al. Extracellular matrix and its therapeutic potential for cancer treatment[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 153.

[13] Poincloux R, Lizárraga F, Chavrier P. Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1–MMP trafficking to invadopodia[J]. J Cell Sci, 2009, 122(Pt 17): 3015–3024.

[14] Wisdom KM, Adebowale K, Chang JL, et al. Matrix mechanical plasticity regulates cancer cell migration through confining microenvironments[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 4144.

[15] Ferrari R, Martin G, Tagit O, et al. MT1–MMP directs force–producing proteolytic contacts that drive tumor cell invasion[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 4886.

[16] Chang JL, Pang EM, Adebowale K, et al. Increased stiffness inhibits invadopodia formation and cell migration in 3D[J]. Biophys J, 2020, 119(4): 726–736.

(收稿日期：2023–07–06)



### 《实用肿瘤杂志》致谢审稿专家

(以姓名拼音为序)

下列审稿专家在 2023 年度为《实用肿瘤杂志》的学术质量付出了辛勤劳动，作出了无私奉献，特此致谢！

- |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 蔡 宇 | 曹 江 | 陈 铭 | 陈雪琴 | 陈益定 | 陈忠平 | 程 文 |
| 崔久崑 | 丁 强 | 傅小龙 | 高玉堂 | 高远红 | 葛蕙心 | 郭剑明 |
| 郭元彪 | 何 健 | 胡 坚 | 黄 强 | 来茂德 | 李 峰 | 李 健 |
| 李 进 | 李茹恬 | 梁志清 | 廖 琼 | 林 稔 | 林胜友 | 刘苓霜 |
| 刘士新 | 刘陶文 | 刘银坤 | 刘 云 | 楼寒梅 | 陆 舜 | 吕卫国 |
| 彭卫军 | 钱可大 | 秦叔逵 | 邵志敏 | 盛伟琪 | 石一复 | 孙立峰 |
| 孙伟劲 | 滕理送 | 王海明 | 王海涛 | 王晓稼 | 魏启春 | 吴 斌 |
| 吴 明 | 谢秋萍 | 熊 斌 | 徐 农 | 徐瑞华 | 徐云华 | 许晶虹 |
| 杨迪生 | 杨建华 | 杨邵瑜 | 杨治力 | 袁 瑛 | 曾昭冲 | 占宏伟 |
| 张苏展 | 张振东 | 张智慧 | 周水洪 | 周宇红 | 朱益民 |     |