

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00249

· 论 著 ·

人类新血小板反应素 R-spondin 3 的细胞定位及其对肿瘤细胞功能的影响

杨伟志^{1,4}, 孙庆莉², 陈金中³, 胡志前^{4*}

1. 同济大学附属上海市第十人民医院骨科, 上海 200072
2. 微创医疗器械(上海)有限公司研发部, 上海 201203
3. 复旦大学生命科学院基因治疗课题组, 上海 200433
4. 第二军医大学长征医院普通外科, 上海 200003

[摘要] **目的** 观察人类新血小板反应素 R-spondin 3(Rspo 3)的细胞定位,并探讨其在肿瘤发生发展中的可能作用。**方法** 利用荧光显微成像法观察 EGFP-Rspo 3 在 HEK293 细胞中的分布。将重组质粒 pcDNA-Rspo 3 转染结肠癌细胞 HT-29、LoVo,采用流式细胞术观察 Rspo 3 基因过表达对肿瘤细胞周期与凋亡的影响;采用 Matrigel、Transwell 实验分别检测 Rspo 3 基因过表达对肿瘤细胞黏附及侵袭能力的影响。**结果** 荧光显微成像法观察发现,EGFP-Rspo 3 融合蛋白在细胞核表达,呈弥散点状分布。流式细胞术观察发现,Rspo 3 基因过表达对肿瘤细胞生长周期没有明显影响;Rspo 3 基因过表达不影响低恶性的 HT-29 细胞凋亡,但诱导高恶性的 LoVo 细胞凋亡($P<0.01$)。Rspo 3 基因过表达增强肿瘤细胞黏附性($P<0.01$),降低肿瘤细胞的侵袭力($P<0.01$),对肿瘤细胞移行有一定抑制作用。**结论** Rspo 3 有核定位功能,能诱导部分肿瘤细胞凋亡并抑制其转移扩散。

[关键词] R-spondin 3;亚细胞定位;细胞周期;细胞凋亡;细胞黏附;肿瘤侵袭

[中图分类号] R 73-37 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)03-0249-05

Cellular localization of a novel human thrombospondin R-spondin 3 and its effects on tumor cells

YANG Wei-zhi^{1,4}, SUN Qing-li², CHEN Jin-zhong³, HU Zhi-qian^{4*}

1. Department of Orthopedics, Tenth People's Hospital of Shanghai, Tongji University, Shanghai 200072, China
2. Department of Research and Development, MicroPort Medical (Shanghai) Co., Ltd, Shanghai 201203, China
3. Department of Gene Therapy, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China
4. Department of General Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To study the cellular localization of a novel human thrombospondin R-spondin 3 and its role in the development and progression of tumors. **Methods** The subcellular localization of R-spondin 3 was investigated in HEK293 cells by fluorescence micrography. Colon carcinoma cell lines HT-29 and LoVo were transfected with pcDNA-Rspo 3 recombinant expression plasmid; and the cell cycle and apoptosis were detected by Flow Cytometry (FCM). Cell adhesion and invasion ability were determined by Matrigel reagents and Transwell system, respectively. **Results** Fluorescence micrography showed that EGFP-Rspo 3 fusion protein was mainly localized in nuclei as dispersed particles. Overexpression of R-spondin 3 showed no effect on cell cycle in both colon carcinoma cell lines. Overexpression of R-spondin 3 induced apoptosis of LoVo cells with high malignancy ($P<0.01$) although it showed no effect on the apoptosis of HT-29 cells with low malignancy. The overexpression also promoted the adhesion ability ($P<0.01$), restrained invasion ability ($P<0.01$) and motility of both colon carcinoma cell lines. **Conclusion** Our research indicates that R-spondin 3 localize in the nuclei; it can induce apoptosis and restrain metastatic potential of some tumor cells.

[Key words] R-spondin 3; subcellular location; cell cycle; apoptosis; cell adhesion; neoplasm invasiveness

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(3):249-253]

血小板反应素蛋白家族(thrombospondin protein family, TSPs)参与细胞-基质间的信号转导

[收稿日期] 2010-12-24 **[接受日期]** 2011-02-13

[基金项目] 上海市科委自然科学基金(044119655). Supported by Natural Science Foundation of Shanghai Science and Technology Committee (044119655).

[作者简介] 杨伟志, 博士, 主治医师. E-mail: youngweight@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885591, E-mail: huzq62@163.com

和相互作用^[1-2],在胚胎发育^[3]、血管生成^[4]、疾病发生尤其是肿瘤^[5]发生发展过程中发挥重要作用。Chen等^[6]研究发现的人类含血小板反应素重复结构的蛋白(human protein with thrombospondin type I repeat domain, hPWTSR)属于TSP家族,被归入TSP家族A亚群的1个新类别——R-反应素蛋白家族(R-spondin protein family, RSPO),被命名为R-spondin 3(Rspo 3)^[7],在哺乳动物中参与Wnt/ β -catenin信号通路^[8],但其在细胞内的分布情况、功能特性及与肿瘤的关系尚不明确。因此,本研究采用亚细胞定位分析Rspo 3在细胞内的分布特征,并观察其过表达对细胞周期与凋亡、细胞黏附及侵袭特性的影响,探讨其可能的功能特性及在肿瘤发生发展过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 质粒:pEGFP-N3绿色荧光蛋白质粒购自Clontech公司,pcDNA4/myc-HisB表达质粒购自Invitrogen公司。细胞株:结肠癌细胞株HT-29、LoVo和人胚肾成纤维细胞HEK293由复旦大学遗传所细胞库提供。cDNA模板:Multiple-tissue cDNA (MTC) panels 购自Clontech公司。试剂与酶:Lipofectamine 2000真核转染试剂为美国Invitrogen公司产品。Transwell细胞培养小室为美国Costar公司产品,Matrigel胶与纤维连接蛋白(fibronectin, FN)为美国BD生物科学公司产品。T₄ DNA连接酶及限制性核酸内切酶BamH I、EcoR I和Hind III为英国Biolabs公司产品。

1.2 Rspo 3的亚细胞定位研究

1.2.1 pEGFP-Rspo 3重组质粒的构建 根据Rspo 3基因的mRNA序列(GenBank: AF251057)设计引物。以MTC panels混合cDNA做模板,PCR扩增Rspo 3全长ORF,引物序列F:5'-GAG AAT TCA TGC ACT TGC GAC TGA TTT CTT GGC-3'(含EcoR I酶切位点),R:5'-GAG GAT CCG TGT ACA GTG TCG ACT GAT ACC G-3'(含BamH I酶切位点),扩增片段长度0.82 kb。PCR扩增条件:94℃ 3 min 预变性,94℃ 30 s 解链,55℃ 30 s 退火,72℃ 2 min 延长,反应35个循环后,72℃ 10 min 补充延长。EcoR I-BamH I双酶切PCR扩增产物,插入质粒pEGFP-N3,构建重组质粒pEGFP-Rspo 3。重组质粒经酶切鉴定,测序分析确定序列与读框正确性。

1.2.2 pEGFP-Rspo 3转染HEK293细胞 玻片法培养HEK293细胞,细胞达75%~85%融合即可进行转染试验。使用真核转染试剂Lipofectamine 2000,按照Invitrogen公司说明书操作,重组质粒pEGFP-Rspo 3转染HEK293细胞。同时将载体质粒pEGFP-N3转染HEK293细胞作对照。

1.2.3 Rspo 3亚细胞定位观察 细胞转染24 h后,多聚甲醛固定,DAPI细胞核染色,制备观察片。在荧光显微镜下观察细胞的绿色荧光分布,确定亚细胞定位情况。

1.3 Rspo 3基因过表达对肿瘤细胞功能的影响

1.3.1 构建重组质粒pcDNA-Rspo 3 PCR扩增体系参照1.2.1项下,引物序列F:5'-CTC AAG CTT ACT ATG GAC TTG CGA CTG ATT TCT TGG C-3'(含Hind III酶切位点),R:5'-GCG AAT TCT GTA CAG TGC TGA CTG ATA CCG ATT TCT G-3'(含EcoR I酶切位点)。Hind III-EcoR I双酶切PCR扩增产物,插入质粒pcDNA4/myc-HisB,构建重组质粒pcDNA-Rspo 3。重组质粒经酶切鉴定,测序分析确定序列与读框正确性。

1.3.2 Rspo 3基因过表达对肿瘤细胞周期及凋亡的影响 培养结肠癌细胞株HT-29、LoVo至对数生长期,按1.2.2项下方法分别转染重组质粒pcDNA-Rspo 3,转染载体质粒pcDNA4/myc-HisB作对照。转染后36~48 h收获细胞,用Becton Dickinson公司的Cycle test plus DNA reagent kit在流式细胞仪上检测细胞周期变化情况。转染后48~72 h收获细胞,用Becton Dickinson公司的APO-BRDU kit在流式细胞仪上检测细胞凋亡变化情况。所有实验重复3次。

1.3.3 Rspo 3基因过表达对肿瘤细胞黏附力、侵袭力的影响 转染后24~36 h收获细胞,按如下方法检测细胞黏附力与侵袭力,所有实验重复8次。在96孔培养板每孔上覆盖Matrigel胶,室温下干燥,按 4×10^4 个/孔接种肿瘤细胞悬液,每组设置8个平行孔,置于37℃、5%CO₂培养箱内孵育2 h。取出培养板,倾去生长液,每孔加结晶紫100 μ l, PBS洗涤3次,每次5 min。每孔加醋酸乙醇(1:3, V/V)100 μ l,酶标仪检测D₅₇₀的光密度值,以D₅₇₀均值表示黏附能力大小。按公式计算黏附率:黏附率(%)=(实验组D₅₇₀值/对照组D₅₇₀值)×100%。

在Transwell小室内加入200 μ g/ml Matrigel胶50 μ l,风干。用预热的培养液注满上室,置摇床

中振摇 90 min,弃去培养液。在 24 孔培养板每孔中加入含 10 μg/ml 纤黏蛋白的培养液 600 μl。将计数好的 2×10⁴/ml 肿瘤细胞悬液分别加入 Transwell 小室,每室 100 μl,每组设置 8 个平行 Transwell 小室。将小室浸入 24 孔板的培养液中,37℃、5% CO₂ 培养箱内孵育 24 h。取出小室,滤膜用甲醇:丙酮(1:1,V/V)固定 10 min。小心擦去未侵袭的滤膜表面细胞,H-E 染色,用中性树脂封片。在光镜下随机挑选 5 个视野,计数细胞,以侵袭细胞的相对数来表示肿瘤细胞的侵袭能力。按公式计算侵袭率与侵袭抑制率:侵袭率(%)=(实验组侵袭细胞相对数/对照组侵袭细胞相对数)×100%,侵袭抑制率(%)=(1-侵袭率)×100%。

1.4 统计学处理 采用 SAS 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 Rspo 3 的亚细胞定位 在 HEK293 细胞检测 Rspo 3 的亚细胞定位。转染 pEGFP-N3 质粒作为对照,EGFP 蛋白绿色荧光在整个细胞内弥散分布。EGFP- Rspo 3 融合蛋白绿荧光主要位于细胞核,呈弥散颗粒状分布,转染细胞与非转染细胞间没有发现明显的形态差异(图 1)。

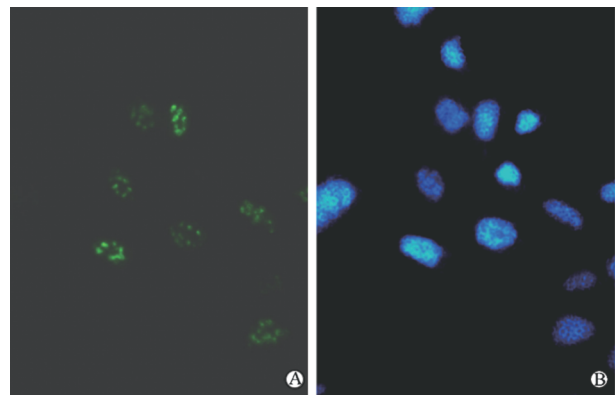


图 1 R-spondin (Rspo 3)在 HEK293 细胞内的分布特征
Fig 1 Subcellular localization of Rspo 3 in HEK293 cells

A: HEK293 cells transfected with EGFP-Rspo 3 fusion expression plasmid; B: HEK293 cells transfected with EGFP-Rspo 3 plasmid were dyed with DAPI in the nuclei. It was the same vision field of Fig 1A and was merged with Fig 1A. The green fluorescence of EGFP-Rspo 3 fusion protein was observed in the background of blue fluorescence in the nuclei. Original magnification: ×250

2.2 Rspo 3 基因过表达对结肠癌细胞周期影响 在结肠癌细胞系 HT-29、LoVo 检测 Rspo 3 基因过表达对细胞周期的影响,以转染 pcDNA4/myc-

HisB 质粒作为对照,结果(图 2)未发现 Rspo 3 基因过表达对结肠癌细胞周期有影响。

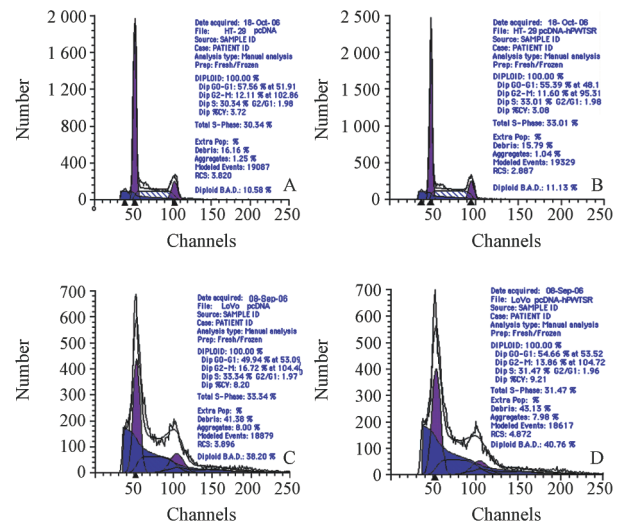


图 2 R-spondin 3 (Rspo 3)基因过表达对细胞周期的影响
Fig 2 Effects of Rspo 3 overexpression on cell cycle of colon carcinoma cell lines HT-29 and LoVo

A: Control group. HT-29 cells transfected with vector plasmid pcDNA4/myc-HisB. B: Experiment group. HT-29 cells transfected with recombinant expression plasmid pcDNA-Rspo 3. C: Control group. LoVo cells transfected with vector plasmid pcDNA4/myc-HisB. D: Experiment group. LoVo cells transfected with recombinant plasmid pcDNA-Rspo 3

2.3 Rspo 3 基因过表达对结肠癌细胞凋亡的影响 结果(图 3)表明:Rspo 3 基因过表达对低恶性细胞 HT-29 的凋亡无影响[M₂期细胞:(0.05%±0.01%) vs (0.06%±0.01%), *P*>0.05)],但诱导高恶性 LoVo 细胞凋亡[M₂期细胞:(12.21%±0.45%) vs (26.51%±4.69%), *P*<0.01]。

2.4 Rspo 3 基因过表达对结肠癌细胞黏附力的影响 结果(表 1)表明:转染 pcDNA-Rspo 3 的结肠癌细胞 HT-29 的黏附率为 213.66%,与对照组比较,Rspo 3 基因过表达组 HT-29 细胞黏附力增强(*P*<0.01);转染 pcDNA-Rspo 3 结肠癌细胞 LoVo 的黏附率为 252.60%,与对照组比较,Rspo 3 过表达组 LoVo 细胞黏附力增强(*P*<0.01)。结果表明:Rspo 3 过表达能增强结肠癌细胞黏附能力,抑制细胞移行。

2.5 Rspo 3 基因过表达对结肠癌细胞侵袭力的影响 结果(表 2)表明:转染 pcDNA-Rspo 3 的结肠癌细胞 HT-29 的侵袭抑制率为 58.33%,与对照组比较,Rspo 3 基因过表达组 HT-29 细胞侵袭力下降(*P*<0.01)。转染 pcDNA-Rspo3 的结肠癌细胞LoVo

的侵袭抑制率为 65.61%,与对照组比较,Rspo 3 基因过表达组 LoVo 侵袭力下降($P<0.01$)。结果表明:Rspo 3 基因过表达能降低结肠癌细胞侵袭能力,抑制细胞移行。

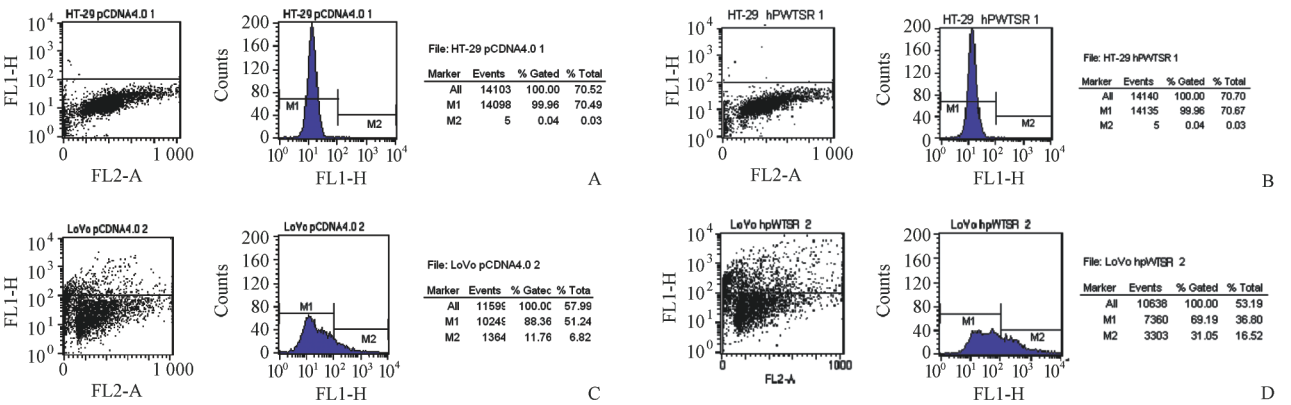


图 3 R-spondin (Rspo 3) 基因过表达对结肠癌细胞凋亡的影响

Fig 3 Effects of Rspo 3 overexpression on apoptosis of colon carcinoma cell lines HT-29 and LoVo

A: Control group. HT-29 cells transfected with vector plasmid pcDNA4/myc-HisB. B: Experiment group. HT-29 cells transfected with recombinant expression plasmid pcDNA-Rspo 3. C: Control group. LoVo cells transfected with vector plasmid pcDNA4/myc-HisB. D: Experiment group. LoVo cells transfected with recombinant plasmid pcDNA-Rspo 3

表 1 R-spondin (Rspo 3) 基因过表达对两株结肠癌细胞黏附力的影响

Tab 1 Effects of Rspo 3 overexpression on adhesion ability of colon carcinoma cell lines HT-29 and LoVo

($n=8, \bar{x} \pm s$)

Cell line	Control group		Experiment group	
	D_{570} value	Adhesion rate (%)	D_{570} value	Adhesion rate (%)
HT-29	0.725 ± 0.083	100	1.549 ± 0.136	213.66^{**}
LoVo	0.192 ± 0.045	100	0.485 ± 0.047	252.60^{**}

** $P<0.01$ vs control group

表 2 R-spondin (Rspo 3) 基因过表达对两株结肠癌细胞侵袭力的影响

Tab 2 Effects of Rspo 3 overexpression on invasion ability of colon carcinoma cell lines HT-29 and LoVo

($n=8, \bar{x} \pm s$)

Cell line	Control group		Experiment group		Inhibition rate (%)
	Invasive cells per 100 cells	Invasion rate (%)	Invasive cells per 100 cells	Invasion rate (%)	
HT-29	48 ± 6	100	20 ± 3	41.67	58.33^{**}
LoVo	189 ± 12	100	65 ± 7	34.39	65.61^{**}

** $P<0.01$ vs control group

3 讨 论

RSPO 类蛋白主要是细胞表面蛋白和分泌性蛋白,参与细胞-基质间的相互作用,但其在细胞中的分布特征目前仍不明确[9-13]。生物信息学分析 RSPO 类蛋白的分子结构,推测 Rspo 3 细胞定位信号——信号肽前导序列位于蛋白 N 端。因此,本研究构建了重组质粒 pEGFP-Rspo 3,表达 N 端游离的 EGFP 融合蛋白。将该重组质粒转染 HEK293 细胞后发现,融合蛋白在细胞核内呈弥散颗粒状分

布,提示 Rspo 3 的核定位功能。虽然含有 TSR 功能域的蛋白大多数是分泌性蛋白,但 Rspo 1 同时具有核蛋白与分泌性蛋白两种分布形式[9];且本实验结果也与 Rspo 3 蛋白 C 端含有核定位信号的生物信息学推测相符合。本研究发现 Rspo 3 的核定位功能,提示其可能具有独特的、不同于 TSP 家族其他成员的生物学功能及作用机制。本研究没有发现 Rspo 3 的分泌特性,要确定 Rspo 3 在组织细胞的天然分布情况,还有待于特异性抗体进行进一步检测。

Rspo 3 是一个多组织多器官广泛低水平表达

的蛋白,提示其参与生物体的基本生命活动过程^[6]。在多数肿瘤细胞中 Rspo 3 表达下调,提示其表达与肿瘤发生发展有一定关系^[6]。细胞无限增殖和转移是肿瘤的主要特征,前者涉及细胞周期和凋亡异常,后者主要涉及细胞黏附和侵袭能力改变。因此,本实验研究 Rspo 3 过表达对两株结肠癌细胞上述特性的影响,初步探讨 Rspo 3 在结肠癌发病机制中的可能作用。

流式细胞仪检测细胞凋亡发现,与对照质粒转染的细胞比较,Rspo 3 基因过表达不影响低恶性结肠癌细胞 HT-29 的凋亡过程,但其诱导高恶性 LoVo 细胞凋亡。结果表明 Rspo 3 能通过促进高恶性的肿瘤细胞凋亡,抑制恶性肿瘤生长。这提示 Rspo 3 基因表达异常(下调),影响细胞的正常凋亡过程,可能导致了部分结肠癌的发生发展。然而,在同样过表达情况下,本研究却没有观察到 Rspo 3 对细胞周期的影响,提示该蛋白可能与细胞生长增殖无关,与 Aoki 等^[11]的基因敲除实验结果并不一致。Aoki 等^[11]敲除小鼠 Rspo 3 基因后小鼠胎盘发育异常,导致胚胎死亡。本研究结果尚不能完全排除 Rspo 3 对细胞周期的影响,肿瘤细胞往往伴随多个涉及细胞周期的途径异常,导致通过这些途径影响有关性状的因素不能发挥作用。因此,本研究的结果仍需要在原代培养细胞中进一步验证。

本研究发现,在 Rspo 3 过表达情况下,结肠癌细胞系 HT-29、LoVo 的黏附能力提高,侵袭能力被抑制。结果表明 Rspo 3 参与了结肠癌细胞黏附和转移等生物学过程,对细胞移行有一定抑制作用,提示 Rspo 3 是一个肿瘤细胞转移相关蛋白。因此,Rspo 3 基因表达下调可能是部分肿瘤细胞黏附能力下降、脱落及转移的分子基础之一。以上体外实验的结果还需要动物实验进一步验证。

[参考文献]

[1] Bein K, Simons M. Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity[J]. J Biol Chem, 2000, 275: 32167-32173.

[2] Crawford S E, Stellmach V, Murphy-Ullrich J E, Ribeiro S M, Lawler J, Hynes R O, et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 *in vivo* [J]. Cell, 1998, 93: 1159-1170.

[3] Adams J C, Tucker R P. The thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily: diverse proteins with related roles in neuronal development[J]. Dev Dyn, 2000, 218: 280-299.

[4] de Fraipont F, Nicholson A C, Feige J J, Van Meir E G. Thrombospondins and tumor angiogenesis[J]. Trends Mol Med, 2001, 7: 401-407.

[5] Gutierrez L S, Suckow M, Lawler J, Ploplis V A, Castellino F J. Thrombospondin 1—a regulator of adenoma growth and carcinoma progression in the APC^{-/+} mouse model[J]. Carcinogenesis, 2003, 24: 199-207.

[6] Chen J Z, Wang S, Tang R, Yang Q S, Zhao E, Chao Y, et al. Cloning and identification of a cDNA that encodes a novel human protein with thrombospondin type I repeat domain, hP-WTSR[J]. Mol Biol Rep, 2002, 29: 287-292.

[7] Kim K A, Zhao J, Andarmani S, Kakitani M, Oshima T, Binnerts M E, et al. R-Spondin proteins: a novel link to beta-catenin activation[J]. Cell Cycle, 2006, 5: 23-26.

[8] Kim K A, Wagle M, Tran K, Zhan X, Dixon M A, Liu S, et al. R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism[J]. Mol Biol Cell, 2008, 19: 2588-2596.

[9] Kamata T, Katsube K, Michikawa M, Yamada M, Takada S, Mizusawa H. R-spondin, a novel gene with thrombospondin type 1 domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in Wnts mutants[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1676: 51-62.

[10] Kazanskaya O, Glinka A, del Barco Barrantes I, Stannek P, Niehrs C, Wu W. R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis[J]. Dev Cell, 2004, 7: 525-534.

[11] Aoki M, Mieda M, Ikeda T, Hamada Y, Nakamura H, Okamoto H. R-spondin3 is required for mouse placental development[J]. Dev Biol, 2007, 301: 218-226.

[12] Blaydon D C, Ishii Y, O'Toole E A, Unsworth H C, Teh M T, R schendorf F, et al. The gene encoding R-spondin 4 (RSPO4), a secreted protein implicated in Wnt signaling, is mutated in inherited anonychia[J]. Nat Genet, 2006, 38: 1245-1247.

[13] Nam J S, Turcotte T J, Smith P F, Choi S, Yoon J K. Mouse cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression[J]. J Biol Chem, 2006, 281: 13247-13257.

[本文编辑] 贾泽军