



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.11.017
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.11.017
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(11):1587–1591.

· 基础研究 ·

CTHRC1 在胰腺癌中的表达及其意义

孟犁南

(河南省南阳市中心医院 特需二病区, 河南 南阳 473009)

摘要

目的: 观察胶原三股螺旋重复蛋白 1 (CTHRC1) 在胰腺癌组织中的表达及其对胰腺癌细胞生物学行为的影响。

方法: 采用实时定量 PCR (RT-PCR) 方法检测 40 例胰腺患者癌组织与癌旁组织中 CTHRC1 的表达。胰腺癌 Panc28 细胞转染 pcDNA3.1-CTHRC1 或 CTHRC1 siRNA 后, 以未转染的 Panc28 细胞为对照, 采用克隆形成实验检测 CTHRC1 对胰腺癌 Panc28 细胞增殖, 伤口愈合实验和 Boyden 小室检测细胞迁移和侵袭能力。

结果: RT-PCR 结果显示, 胰腺癌组织 CTHRC1 mRNA 表达水平明显高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。与对照组 Panc28 细胞比较, 转染 pcDNA3.1-CTHRC1 上调 CTHRC1 后, Panc28 细胞克隆形成数明显增加、伤口宽度百分比明显减少、侵袭的细胞数明显增多, 而转染 CTHRC1 siRNA 下调 CTHRC1 表达后, Panc28 细胞以上指标呈反向变化, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

结论: 胰腺癌组织在 CTHRC1 表达升高, CTHRC1 可能通过促进胰腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力而参与胰腺癌的发生与发展。

关键词

胰腺肿瘤; 胶原三股螺旋重复蛋白 1; 细胞增殖; 肿瘤浸润
中图分类号: R735.9

CTHRC1 expression in pancreatic cancer and its significance

MENG Li'nan

(The Second Department of Special Treatment, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan 473009, China)

Abstract

Objective: To investigate the expression of collagen triple helix repeat containing 1 (CTHRC1) in pancreatic cancer tissue, and its influence on biobehavior of pancreatic cancer cells.

Methods: The expression of CTHRC1 mRNA in the specimens of cancer and adjacent tissue from 40 pancreatic cancer patients was detected by real time PCR (RT-PCR). Pancreatic cancer Panc28 cells were transfected with pcDNA3.1-CTHRC1 or CTHRC1 siRNA using untransfected Panc28 cells as control, and then the cell proliferation, migration and invasion ability were determined by colony formation assay, wound healing assay and Boyden chamber assay, respectively.

Results: Results of the RT-PCR showed that CTHRC1 expression level in pancreatic cancer tissue was significantly higher than that in adjacent tissue ($P < 0.05$). Compared with control Panc28 cells, the number of colony formation was increased, percentage of wound width was reduced and number of invaded cells was increased significantly in Panc28 cells with up-regulated CTHRC1 expression after

收稿日期: 2015-07-02; 修订日期: 2015-08-11。

作者简介: 孟犁南, 河南省南阳市中心医院住院医师, 主要从事普通外科方面的研究。

通信作者: 孟犁南, Email: tougao500@126.com

pcDNA3.1-CTHRC1 transfection, while the opposite changes were seen in those with down-regulated CTHRC1 expression after CTHRC1 siRNA transfection, and all the differences had statistical significance (all $P < 0.05$).

Conclusion: CTHRC1 expression is increased in pancreatic cancer tissue, which may contribute to the occurrence and development of pancreatic cancer through promoting cell proliferation, and migration and invasion ability of the pancreatic cancer cells.

Key words Pancreatic Neoplasms; Collagen Triple Helix Repeat Containing 1; Cell Proliferation; Neoplasm Invasiveness
CLC number: R735.9

胰腺癌 (pancreatic cancer) 是临床常见的恶性肿瘤之一, 胰腺癌具有恶性程度高、诊断和治疗困难的特点, 约90%的胰腺癌为起源于腺管上皮的导管腺癌^[1-4]。胰腺癌通常发现时已处于肿瘤晚期, 致使只有10%~20%的患者可采用手术治疗。而手术治疗外的化学治疗对胰腺癌的治疗效果并不理想。因此, 寻找可影响胰腺癌细胞生长的靶向分子是目前临床迫切需要的。胶原三股螺旋重复蛋白1 (collagen triple helix repeat containing 1, CTHRC1) 是一个25 kDa的分泌性糖蛋白, 最初是在寻找大鼠动脉球囊损伤相关基因时发现^[5]。CTHRC1广泛表达于多种细胞中, 如成纤维细胞和平滑肌细胞, 且在多种肿瘤细胞中均存在CTHRC1的异常表达, 包括黑色素瘤、胃肠道癌、乳腺癌、甲状腺癌、肝癌和胰腺癌^[6-11]。CTHRC1过表达可通过促进细胞迁移和抑制胶原基质合成而促进损伤组织修复^[12]。目前关于CTHRC1对胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响研究还不是很多, 据此, 本研究通过转染方法将pcDNA3.1-CTHRC1和CTHRC1 siRNA转入胰腺癌Panc28细胞中, 观察CTHRC1对Panc28细胞增殖、迁移和侵袭的影响, 以探讨CTHRC1在胰腺癌发病中的作用。

1 材料与方法

1.1 临床资料

2012年12月—2015年3月入住我院胰腺外科并行胰腺癌根治术的胰腺癌患者40例, 其中男29例, 女11例; 年龄25~68岁, 平均(45.82 ± 22.72)岁。收集胰腺癌患者的癌组织与癌旁组织。本研究包括的所有胰腺癌患者在术后均经病理医生证实为胰腺癌; 且所有癌旁组织术后均经病理医生证实未见胰腺癌浸润。患者术前

均未接受放射治疗或化学治疗。

1.2 试剂及细胞

胰腺癌Panc28细胞购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。细胞培养于含10%胎牛血清 (FBS) 的RPMI-1640培养基中。RPMI-1640培养基及FBS购自美国Gibco公司; CTHRC1引物序列和转染试剂Lipofectamin2000购自Invitrogen公司; SYBR Green PCR试剂盒购自Ambion公司; CTHRC1抗体、HRP标记山羊抗鼠二抗、pcDNA3.1-CTHRC1和CTHRC1 siRNA购自Santa Cruz公司; 侵袭实验用Boyden小室购自美国Millipore公司; PVDF膜购自GE Healthcare公司; 牛血清白蛋白购自Sigma公司。

1.3 RT-PCR方法

采用RT-PCR方法检测胰腺癌组织、癌旁组织中CTHRC1的表达。CTHRC1上游引物: 5'-GCA TGC TGT CAG CGT TGG TA-3'; 下游引物: 5'-TCA ATG GGA AGA GGT CCT GAA-3'; GAPDH引物上游物: 5'-ATT CCA TGG CAC CGT CAA GGC TGA-3'; 下游引物: 5'-TTC TCC ATG GTG GTG AAG ACG CCA-3'。反应条件: 94 °C预变性5 min, 进入下列循环: 94 °C 30 s, 57 °C 40 s, 72 °C 40 s, 共40个循环, 最后72 °C延伸10 min。采取GAPDH片段作为内参对照。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计数CTHRC1的相对表达量。

1.4 细胞转染方法

严格按Lipofectamin2000说明书进行操作。将pcDNA3.1-CTHRC1和CTHRC1 siRNA转入Panc28细胞中, 对照组为只经Lipofectamin2000处理为未转入任何物质的细胞。

1.5 Western blot方法

根据文献^[13], 采用Western blot方法分析胰腺癌细胞中CTHRC1的表达情况, 具体操作方法参见

文献报道。

1.6 克隆形成实验

转染pcDNA3.1-CTHRC1和CTHRC1 siRNA的Panc28细胞各 5×10^3 接种于6孔板中, 培养72 h后, 形成的克隆用甲醇固定, 并用含0.1%结晶紫的20%甲醇染色30 min, 计数形成的克隆数。

1.7 侵袭能力检测

根据文献^[14-15], 采用Boyden小室分析CTHRC1对胰腺癌Panc28细胞侵袭能力的影响, 具体操作方法参见文献报道。

1.8 统计学处理

采用SPSS 16.0统计软件进行数据分析。两组数据间比较采用t检验, 多组数据间比较采用ANOVA检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 胰腺癌组织 CTHRC1 表达

RT-PCR结果显示, 与癌旁组织比较, 胰腺癌组织中CTHRC1 mRNA表达水平明显升高 ($P < 0.01$); 差异有统计学意义 (图1)。

2.2 Western blot 胰腺癌 Panc28 细胞 CTHRC1 表达

Western blot验证转染效果显示, 转染pcDNA3.1-CTHRC1可明显上调胰腺癌Panc28细胞中CTHRC1的表达水平; 转染CTHRC1 siRNA可明显抑制胰腺癌Panc28细胞中CTHRC1的表达水平 (图2)。

2.3 胰腺癌 Panc28 细胞增殖能力检测

对照组、pcDNA3.1-CTHRC1转染组和

CTHRC1 siRNA转染组Panc28细胞克隆形成数分别为 (216.56 ± 22.83) 个、(287.45 ± 31.93) 个、(136.83 ± 18.74) 个, 与对照组比较, pcDNA3.1-CTHRC1转染组细胞克隆形成数明显增加, 而CTHRC1 siRNA转染组细胞克隆形成数明显减少, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图3)。

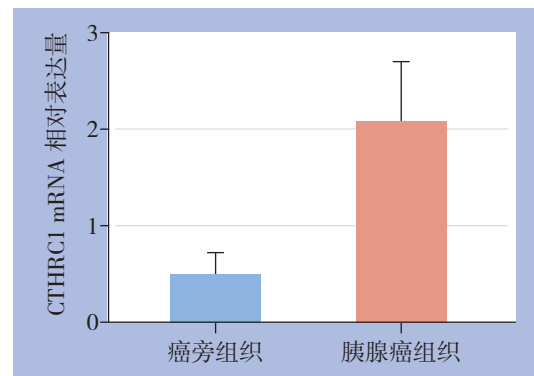


图 1 RT-PCR 方法检测 CTHRC1 mRNA 表达
Figure 1 CTHRC1 mRNA expression detected by RT-PCR

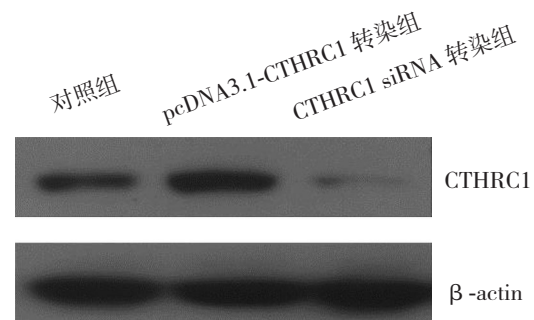


图 2 Western blot 方法检测 CTHRC1 表达
Figure 2 CTHRC1 expression determined by Western blot analysis

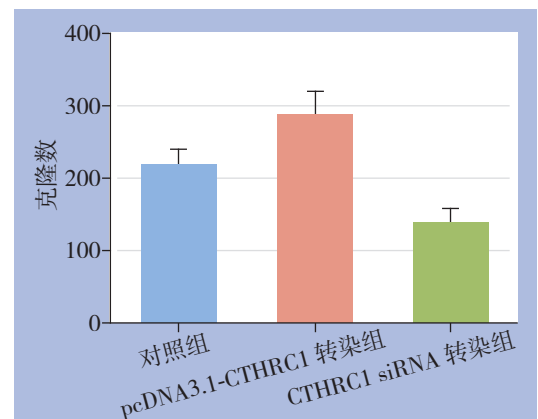
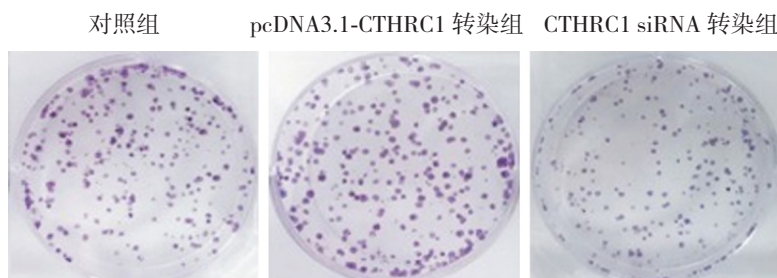


图 3 克隆形成实验检测细胞增殖能力
Figure 3 Cell proliferation measured by colony formation assay

2.4 胰腺癌 Panc28 细胞迁移能力检测

对照组、转染 pcDNA3.1-CTHRC1 和 CTHRC1 siRNA 的胰腺癌 Panc28 细胞在培养 24 h 后, 伤口宽度百分比分别为 $(1.00 \pm 0.00)\%$ 、 $(0.17 \pm 0.09)\%$ 、 $1.65 \pm 0.28\%$, 与对照组比较, pcDNA3.1-CTHRC1 转染组伤口宽度百分比明显减少, 而 CTHRC1 siRNA 转染组伤口宽度百分比明显增加, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 4)。

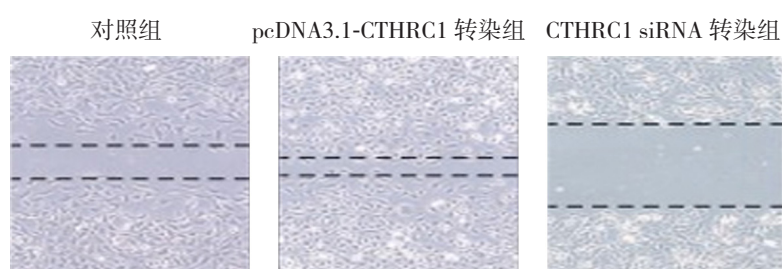


图 4 伤口愈合实验检测细胞迁移能力

Figure 4 Cell migration ability detected by wound healing assay

2.5 胰腺癌 Panc28 细胞侵袭能力检测

对照组、转染 pcDNA3.1-CTHRC1 和 CTHRC1 siRNA 的胰腺癌 Panc28 细胞发生侵袭的细胞数分别为 (138.45 ± 39.64) 个、 (286.35 ± 48.36) 个、 (79.45 ± 22.73) 个, 与对照组比较, pcDNA3.1-CTHRC1 转染组侵袭细胞数明显增多, 而 CTHRC1 siRNA 转染组侵袭细胞数明显减少, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 5)。

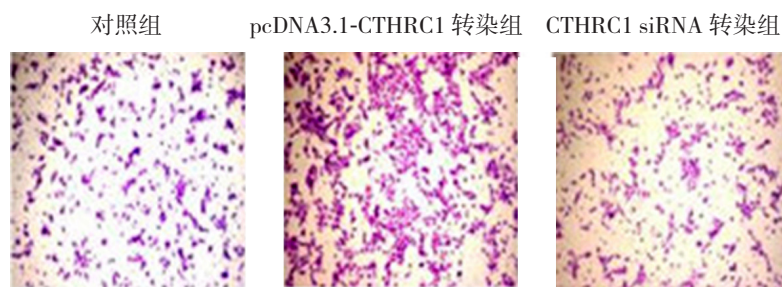
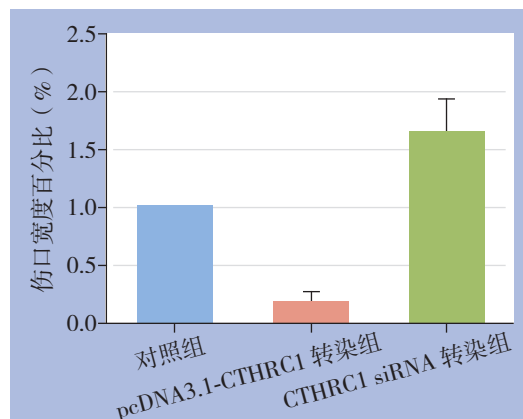
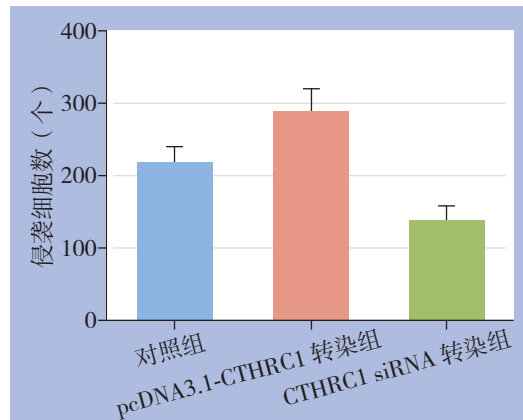


图 5 Boyden 小室检测细胞侵袭能力

Figure 5 Cell invasion ability measured by Boyden chamber assay



3 讨论

大量文献报道 CTHRC1 与肿瘤的侵袭和转移密切相关。采用免疫组织化学染色的方法, Tang 等^[9]发现, 在良性痣或黑色素瘤的无创阶段 (原位黑色素瘤) CTHRC1 是不表达的, 而在具有高度侵袭性和转移性的黑色素瘤中 CTHRC1 的表达是显著升高的。Ke 等^[16]发现 CTHRC1 的过表达与非小细胞肺癌的侵袭和预后不良相关。同时, Liu 等^[17]发现 CTHRC1 单独即可作为评估非小细胞肺癌预后的生

物标志物。Tameda 等^[18]发现 CTHRC1 在肝癌中的表达是显著升高的, 且 CTHRC1 具有促进肝癌细胞增殖和侵袭的功能。因此, CTHRC1 在癌症的发生和发展中具有重要的作用, 并且是癌细胞获得药物抗性表型的一种可能的机制。而关于 CTHRC1 分子在胰腺癌组织中的表达情况及其与胰腺癌发生发展的关系目前还很少有文献报道。

本研究首先观察了 CTHRC1 在胰腺癌组织及癌旁组织中的表达情况。结果显示, 与癌旁组织比较, 胰腺癌组织中 CTHRC1 mRNA 的表达显著

升高。这一结果初步提示,胰腺癌组织中CTHRC1的高表达可能与胰腺癌的发生和发展密切相关。为进一步验证CTHRC1在胰腺癌的发生和发展中的作用,随后本研究采用RNA干扰的方法和CTHRC1过表达的方法敲低或过表达胰腺癌细胞中CTHRC1分子,进一步观察了CTHRC1分子对胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。结果显示,转染CTHRC1 siRNA的胰腺癌Panc28细胞中CTHRC1的表达被显著抑制,转染pcDNA3.1-CTHRC1的胰腺癌Panc28细胞中CTHRC1的表达显著升高。当敲低胰腺癌Panc28细胞中CTHRC1的表达后,胰腺癌Panc28细胞的增殖、迁移和侵袭能力均显著降低;而上调胰腺癌Panc28细胞中CTHRC1的表达后,胰腺癌Panc28细胞的增殖、迁移和侵袭能力均显著升高。

综上所述,本研究结果表明CTHRC1在胰腺癌组织和细胞系中的表达水平显著升高,同时CTHRC1具有促进胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的作用,胰腺癌组织中CTHRC1表达水平的升高可能与胰腺癌的发生和发展相关。本研究为临床寻找新的胰腺癌治疗靶标提供一定的科学理论依据,CTHRC1促进胰腺癌细胞增殖和侵袭能力的机制仍需进行深入的探讨。

参考文献

- [1] Damaskos C, Karatzas T, Nikolidakis L, et al. Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors: Current Evidence for Therapeutic Activities in Pancreatic Cancer[J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(6):3129-3135.
- [2] Nipp RD, Ryan DP. Predicting a response to FOLFIRINOX in pancreatic cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2015, 107(8). pii: djv175. doi: 10.1093/jnci/djv175.
- [3] Hofmann BT, Schlüter L, Lange P, et al. COSMC knockdown mediated aberrant O-glycosylation promotes oncogenic properties in pancreatic cancer[J]. *Mol Cancer*, 2015, 14(1):109.
- [4] Vennin C, Pajic M, Timpson P. Imaging fibrosis in pancreatic cancer using second harmonic generation[J]. *Pancreatology*, 2015, 15(2):200-201.
- [5] Pyagay P, Heroult M, Wang Q, et al. Collagen triple helix repeat containing 1, a novel secreted protein in injured and diseased arteries, inhibits collagen expression and promotes cell migration[J]. *Circ Res*, 2005, 96(2):261-268.
- [6] Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(12):6025-6030.
- [7] Durmus T, LeClair RJ, Park KS, et al. Expression analysis of the novel gene collagen triple helix repeat containing-1 (Cthrc1)[J]. *Gene Expr Pattern*, 2006, 6(8):935-940.
- [8] LeClair R, Lindner V. The role of collagen triple helix repeat containing 1 in injured arteries, collagen expression, and transforming growth factor beta signaling[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2007, 17(6):202-205.
- [9] Tang L, Dai DL, Su M, et al. Aberrant expression of collagen triple helix repeat containing 1 in human solid cancers[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(12):3716-3722.
- [10] Turashvili G, Bouchal J, Baumforth K, et al. Novel markers for differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas by laser microdissection and microarray analysis[J]. *BMC Cancer*, 2007, 7:55.
- [11] Ip W, Wellman-Labadie O, Tang L, et al. Collagen triple helix repeat containing 1 promotes melanoma cell adhesion and survival[J]. *J Cutan Med Surg*, 2011, 15(2):103-110.
- [12] Pyagay P, Heroult M, Wang Q, et al. Collagen triple helix repeat containing 1, a novel secreted protein in injured and diseased arteries, inhibits collagen expression and promotes cell migration[J]. *Circ Res*, 2005, 96(2):261-268.
- [13] Lu Z, Jiao D, Qiao J, et al. Restin suppressed epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis in breast cancer cells through upregulating mir-200a/b expression via association with p73[J]. *Mol Cancer*, 2015, 14:102. doi: 10.1186/s12943-015-0370-9.
- [14] Pisano M, Triacca V, Barbee KA, et al. An in vitro model of the tumor-lymphatic microenvironment with simultaneous transendothelial and luminal flows reveals mechanisms of flow enhanced invasion[J]. *Integr Biol (Camb)*, 2015, 7(5):525-533.
- [15] Jin UH, Kim SB, Safe S. Omeprazole Inhibits Pancreatic Cancer Cell Invasion through a Nongenomic Aryl Hydrocarbon Receptor Pathway[J]. *Chem Res Toxicol*, 2015, 28(5):907-918.
- [16] Ke Z, He W, Lai Y, et al. Overexpression of collagen triple helix repeat containing 1 (CTHRC1) is associated with tumour aggressiveness and poor prognosis in human non-small cell lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(19):9410-9424.
- [17] Liu X, Liu B, Cui Y, et al. Collagen triple helix repeat containing 1 (Cthrc1) is an independently prognostic biomarker of non-small cell lung cancers with cigarette smoke[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(11):11677-11683.
- [18] Tameda M, Sugimoto K, Shiraki K, et al. Collagen triple helix repeat containing 1 is overexpressed in hepatocellular carcinoma and promotes cell proliferation and motility[J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(2):541-548.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 孟犁南. CTHRC1在胰腺癌中的表达及其意义[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(11):1587-1591. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.11.017

Cite this article as: MENG LN. CTHRC1 expression in pancreatic cancer and its significance[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(11):1587-1591. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.11.017