网络出版时间:2021 - 05 - 14 15:11 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210513.1449.013.html

ORP8 对结直肠癌 DLD-1 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

潘琪伟,陈韦璁,裴冬生,王庆苓

摘要 **目的** 观察和分析氧化固醇结合蛋白相关蛋白 8(ORP8)蛋白对人结直肠癌 DLD-1 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响,并初步探究其影响机制。**方法** 通过在结直肠癌 DLD-1 细胞中转染 ORP8 表达质粒或特异性沉默 siRNA 上调和下调 ORP8 的表达,采用 CCK-8、Transwell 实验检测干扰或过表达 ORP8 对 DLD-1 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响;采用 Western blot 检测了 ORP8 对 DLD-1 细胞细胞外蛋白调节激酶(ERK1/2)的总蛋白及其磷酸化(p-ERK1/2)水平和上皮-间质转化(EMT)相关分子标志物蛋白上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)、神经型钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)表达的影响。**结果** 干扰 DLD-1 细胞 ORP8 表达,细胞增殖、迁移和侵袭能力均升高($P<0.01$),EMT 相关分子标志物中上皮标志物 E-cadherin 蛋白表达水平下降,间质标志物 Vimentin 和 N-cadherin 蛋白表达水平升高,ERK1/2蛋白的磷酸化水平也升高;相反,过表达 ORP8,细胞增殖、迁移和侵袭能力均下降($P<0.01$,$P<0.01$,$P<0.05$),上皮标志物 E-cadherin 蛋白表达水平升高,间质标志物 Vimentin 和 N-cadherin 蛋白表达水平降低,p-ERK1/2 水平也降低。**结论** ORP8 蛋白能够抑制结直肠癌细胞增殖、迁移和侵袭,其机制可能与阻断 EMT 和抑制 ERK1/2 磷酸化有关。

关键词 ORP8;结直肠癌;上皮间质转化;增殖;迁移;侵袭
中图分类号 R 735
文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2021)06 - 0904 - 05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2021.06.013

结直肠癌(colorectal cancer,CRC)是常见的消化道恶性肿瘤,在全球范围内,结直肠癌是男性和女性的第三大癌症,每年超过 69 万例死亡,且该病的患者群逐渐趋向年轻化[1]。因此,深入探讨结直肠癌发病及转移的分子机制,寻找新的治疗靶点,对治疗结直肠癌具有重要的意义。氧化固醇结合蛋白相关蛋白 8(oxysterol binding protein-related protein 8,ORP8)隶属于一类存在于真核细胞内的参与脂质代谢的非囊泡运输蛋白质——氧化固醇结合蛋白(oxysterol binding protein,OSBP)家族,已有研究[2-4]表明,ORP8 在肝癌、胃癌、非小细胞型肺癌等肿瘤中介导的信号转导在肿瘤细胞的增殖、凋亡的过程中起着重要作用,然而至今,结直肠癌患者中 ORP8 的表达水平及其对结直肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力影响的研究尚无报道。该研究旨在通过从体外低表达或过表达 ORP8 在结直肠癌细胞中的水平来探讨其对结直肠癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其分子机制。

2021 - 04 - 06 接收
基金项目:国家自然科学基金(编号:81872080)
作者单位:徐州医科大学基础医学院病理教研室,徐州 221004
作者简介:潘琪伟,男,硕士研究生;
王庆苓,女,博士,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:qlwang@xzhmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验细胞 人结直肠癌 DLD-1 细胞购自中国科学院细胞研究所。

1.2 ORP8 表达质粒和 ORP8 siRNA 片段 针对人 ORP8 mRNA 的表达质粒 pcDNA3.1-ORP8 由本科室保存。针对人 ORP8 mRNA 的 siRNA 片段 5′-GAGUGGUCUUGCAAAUUAUTT-3′及无关序列 siRNA 购自吉玛生物科技有限公司。

1.3 实验试剂 兔抗人细胞外蛋白调节激酶(extracellular regulated protein kinases,ERK1/2)多克隆抗体、兔抗人磷酸化细胞外蛋白调节激酶(phosphorylated-extracellular regulated protein kinases,p-ERK1/2)多克隆抗体、兔抗人 Vimentin 多克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;鼠抗人 ORP8 单克隆抗体、鼠抗人 p-ERK1/2 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司;鼠抗人 β-actin、山羊抗鼠二抗、山羊抗兔二抗、鼠抗人 E-cadherin 多克隆抗体、兔抗人 N-cadherin 多克隆抗体购自美国 proteintech 公司;转染试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司;CCK-8 试剂盒购自美国 APExBio 公司;Transwell 小室和 Matrigel 胶购自美国 Corning 公司;RIPA 裂解液和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自江苏凯基生物技术有限公司;ECL 购自美国 Millipore 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养及分组 人结直肠癌细胞系 DLD-1 细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 于 37 ℃、5% CO_2 恒温培养箱内培养。细胞转染的操作按照

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Lipofectamine 2000试剂盒操作说明书进行，转染48 h后收样。将细胞分为转染空载质粒的Vector组、转染ORP8表达质粒的ORP8组、转染无关序列siRNA的siCtrl组以及转染ORP8干扰序列siRNA的siORP8组。

1.4.2 Western blot检测ERK1/2、p-ERK1/2以及上皮-间质转化（epithelial-mesenchymal transition，EMT）相关分子标志物的蛋白的表达 提取总蛋白，进行SDS-PAGE电泳，然后转印到PVDF膜，5%脱脂牛奶封闭2 h，一抗4 ℃孵育过夜，二抗室温孵育2 h，然后用ECL试剂检测目的条带。

1.4.3 CCK-8检测细胞增殖能力 取对数生长期的细胞，调整细胞密度为3×10^3个/孔，接种至96孔板，培养24、48、72 h，每孔加入10 μl CCK-8试剂，37 ℃孵育2 h，酶标仪检测450 nm处的吸光度值（OD值）。

1.4.4 Transwell法检测细胞迁移和侵袭能力 取对数生长期的细胞进行细胞计数，每孔加入6×10^4个细胞到Transwell小室的上层，小室下层加入0.6 ml的10%血清的培养液，每组3个复孔，其中，侵袭组实验前小室内加入基质凝胶（无血清培养基∶Matrigel胶=9∶1），置于37 ℃培养箱中过夜。迁移组培养24 h、侵袭组培养48 h后取出Transwell小室，用100%甲醇固定30 min，结晶紫染液染色15 min，于倒置显微镜10倍镜下每个小室随机取10个视野拍照计数。

1.5 统计学处理 采用SPSS 16.0软件和Graph-Pad Prism 8对数据进行统计分析、制图，数据用$\bar{x}\pm s$表示。两组比较采用t检验。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ORP8表达质粒和siRNA转染DLD-1细胞后ORP8蛋白的表达 ORP8表达质粒、siRNA转染DLD-1细胞48 h后，采用Western blot法检测转染效果，ORP8组ORP8表达高于Vector组，siORP8组ORP8表达低于siCtrl组，如图1中所示。

2.2 过表达ORP8对DLD-1细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

2.2.1 过表达ORP8对DLD-1细胞增殖的影响 CCK-8法检测结果如图2所示，72 h时ORP8组的细胞OD450值低于Vector组，差异有统计学意义（72 h t值为5.709，$P<0.01$）。以上实验结果提示，过表达ORP8能够抑制DLD-1细胞的增殖。

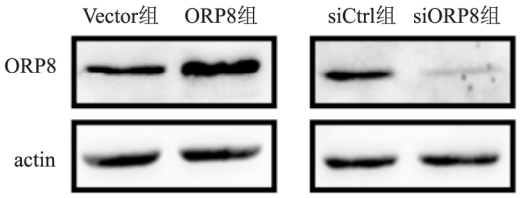

图1 ORP8过表达质粒和siRNA转染DLD-1细胞后ORP8蛋白表达情况

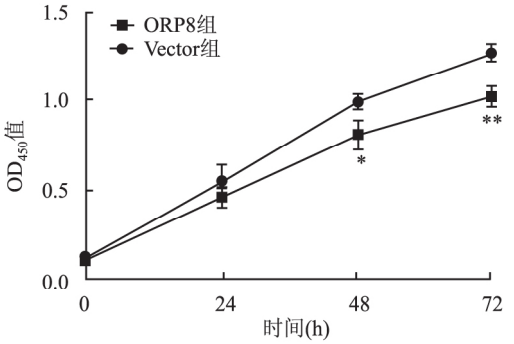

图2 过表达ORP8对DLD-1细胞增殖能力的影响

与Vector组比较：* $P<0.05$， $P<0.01$**

2.2.2 过表达ORP8对DLD-1细胞迁移和侵袭的影响 Transwell法检测结果如图3所示，与Vector迁移组相比，ORP8迁移组DLD-1细胞的迁移细胞

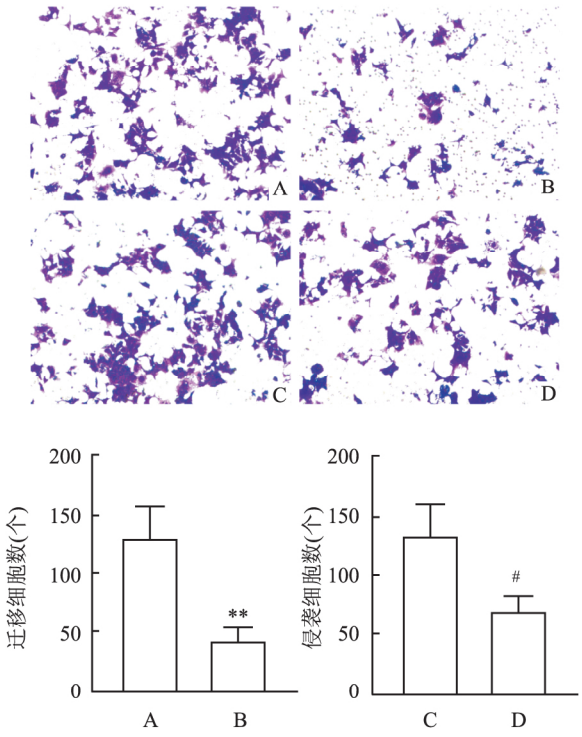

图3 过表达ORP8对DLD-1细胞迁移和侵袭能力的影响 结晶紫染色 ×100

A：Vector迁移组；B：ORP8迁移组；C：Vector侵袭组；D：ORP8侵袭组；与Vector迁移组比较： $P<0.01$；与Vector侵袭组比较：# $P<0.05$**

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

数量减少(t 值为 5.508，$P<0.01$)；与 Vector 侵袭组相比，ORP8 侵袭组 DLD-1 细胞的侵袭细胞数量减少(t 值为 3.823，$P<0.05$)。以上实验结果提示，过表达 ORP8 能够抑制结直肠癌细胞的迁移和侵袭。

2.3 干扰 ORP8 对 DLD-1 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

2.3.1 干扰 ORP8 对 DLD-1 细胞增殖的影响 CCK-8 法检测结果如图 4 所示，72 h 时 siORP8 组的细胞 OD450 值高于 siCtrl 组，差异有统计学意义(72 h 时 t 值为 7.394，$P<0.01$)。以上实验结果提示，干扰 ORP8 能够增强结直肠癌 DLD-1 细胞的增殖能力。

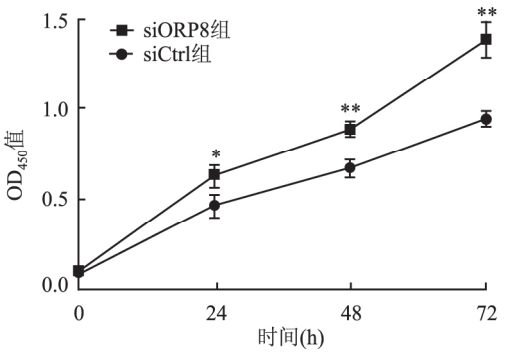

图 4 干扰 ORP8 对 DLD-1 细胞增殖能力的影响
与 siCtrl 组比较： $^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

2.3.2 干扰 ORP8 对 DLD-1 细胞迁移和侵袭的影响 Transwell 法检测结果如图 5 所示，与 siCtrl 迁移组相比，siORP8 迁移组 DLD-1 细胞的迁移细胞数量增多(t 值为 7.103，$P<0.01$)；与 siCtrl 侵袭组相比，siORP8 侵袭组 DLD-1 细胞的侵袭细胞数量增多(t 值为 7.646，$P<0.01$)。以上实验结果提示，干扰 ORP8 能够增强 DLD-1 细胞的迁移和侵袭能力。

2.4 过表达、干扰 ORP8 表达对 DLD-1 细胞 ERK1/2、p-ERK1/2 以及 EMT 相关分子标志物的蛋白表达情况的影响

Western blot 检测结果显示：相较于 Vector 组，ORP8 组上皮标志物 E-cadherin 蛋白表达增高，间质标志物 Vimentin、N-cadherin 蛋白以及 p-ERK1/2 蛋白表达下降；相较于 siCtrl 组，siORP8 组上皮标志物 E-cadherin 蛋白表达下降，间质标志物 Vimentin、N-cadherin 蛋白以及 p-ERK1/2 蛋白表达增高。见图 6。

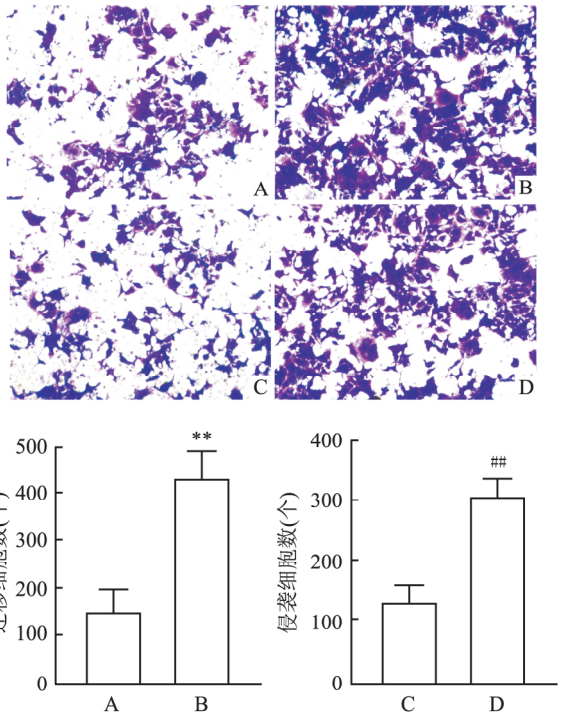

图 5 干扰 ORP8 对 DLD-1 细胞迁移和侵袭能力的影响 结晶紫染色 ×100
A：siCtrl 迁移组；B：siORP8 迁移组；C：siCtrl 侵袭组；D：siORP8 侵袭组；与 siCtrl 迁移组比较： $^{**}P<0.01$；**与 siCtrl 侵袭组比较：** $^{\#\#}P<0.01$

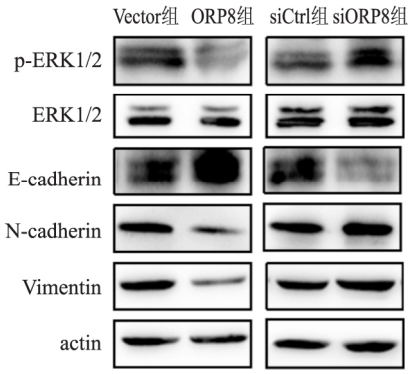

图 6 过表达和干扰 ORP8 对 DLD-1 细胞 ERK1/2、p-ERK1/2 及 EMT 相关分子标志物蛋白表达情况的影响

3 讨论

ORP8 主要存在于内质网与质膜或者线粒体的膜接触位点上，其主要功能目前被证明是从内质网到细胞膜或者线粒体运输磷脂酰丝氨酸，并从细胞膜或者线粒体向内质网反方向运输磷脂酰肌醇 4-磷酸，导致磷脂酰肌醇 4-磷酸被磷脂酰肌醇 3-磷酸酶水解[5-7]。Zhong et al[2] 报道了 ORP8 在临床人类肝癌组织中下调，而 miR-143 则被报道上调 ORP8 的表达，ORP8 可能通过介导细胞表面死亡受体的易位参与调控了原发性肝癌细胞的凋亡。Guo et al[3] 报道了过表达 ORP8 在体内抑制胃癌细胞的增殖和移植瘤的生长。内质网应激的诱导、Wnt 信号

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的抑制和凋亡细胞的死亡与 ORP8 诱导的胃癌细胞增殖的抑制有关。最新的研究[4]结果显示，ORP8 过表达通过释放细胞色素 c 从线粒体进入细胞质诱导非小细胞肺癌细胞凋亡。上述研究提示 ORP8 在肿瘤中可能具有重要作用。本实验旨在探讨 ORP8 表达水平的改变对结直肠癌细胞 DLD-1 增殖、迁移和侵袭的影响，结果显示，过表达 ORP8 可抑制结直肠癌 DLD-1 细胞增殖、迁移和侵袭的能力，反之，干扰了结直肠癌 DLD-1 细胞 ORP8 之后，癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力增强，提示 ORP8 对结直肠癌细胞增殖、迁移和侵袭的能力具有重要的抑制作用。

本研究显示，在与细胞迁移侵袭实验条件相同的情况下，干扰 ORP8 可促进上皮标志物 E-cadherin 蛋白含量减少，而间质标志物 Vimentin、N-cadherin 蛋白含量增高；过表达 ORP8 后结果与之相反。上述研究也进一步证实了 ORP8 参与调控 EMT，影响结直肠癌细胞迁移侵袭。

已有多项研究[8-10]表明，在结直肠癌中，通过影响 ERK 信号传导可以调控 EMT，另外也有研究[11]表明，ERK 信号通路激活与否影响着细胞的迁移能力，而且在 Kattan et al[12]的报道中，提及了 ORP8 与 ERK 信号通路的联系。本研究检测了 ORP8 对 ERK1/2 磷酸化水平的影响，结果显示，ORP8 的过表达和沉默确实引起了 ERK1/2 磷酸化水平的变化，提示 ERK 信号通路在 ORP8 抑制结直肠癌细胞增殖、迁移和侵袭的过程中扮演了一个重要的角色，然而其具体机制仍有待探索。

综上所述，ORP8 抑制了结直肠癌细胞 DLD-1 的增殖、迁移和侵袭，其作用机制可能与抑制 EMT 和 ERK1/2 磷酸化水平有关。

参考文献

[1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. Int J Cancer, 2015, 136(5): E359-86.

[2] Zhong W, Qin S, Zhu B, et al. Oxysterol-binding protein-related protein 8 (ORP8) increases sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to Fas-mediated apoptosis [J]. J Biol Chem, 2015, 290(14): 8876-87.

[3] Guo X, Zhang L, Fan Y, et al. Oxysterol-binding protein-related protein 8 inhibits gastric cancer growth through induction of ER stress, inhibition of Wnt signaling, and activation of apoptosis [J]. Oncol Res, 2017, 25(5): 799-808.

[4] Li J, Cui J, Li Z, et al. ORP8 induces apoptosis by releasing cytochrome c from mitochondria in non-small cell lung cancer [J]. Oncol Rep, 2020, 43(5): 1516-24.

[5] Chung J, Torta F, Masai K, et al. INTRACELLULAR TRANSPORT. PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts [J]. Science, 2015, 349(6246): 428-32.

[6] Sohn M, Korzeniowski M, Zewe J P, et al. PI(4,5)P2 controls plasma membrane PI4P and PS levels *via* ORP5/8 recruitment to ER-PM contact sites [J]. J Cell Biol, 2018, 217(5): 1797-813.

[7] Galmes R, Houcine A, Van Vliet A R, et al. ORP5/ORP8 localize to endoplasmic reticulum-mitochondria contacts and are involved in mitochondrial function [J]. EMBO Rep, 2016, 17(6): 800-10.

[8] Wang H, Liu S, Kong F, et al. Spred2 inhibits epithelial mesenchymal transition of colorectal cancer cells by impairing ERK signaling [J]. Oncol Rep, 2020, 44(1): 174-84.

[9] Chen Y, Deng G, Fu Y, et al. FOXC2 promotes oxaliplatin resistance by inducing epithelial-mesenchymal transition *via* MAPK/ERK signaling in colorectal cancer [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 1625-35.

[10] Ding C, Luo J, Li L, et al. Gab2 facilitates epithelial-to-mesenchymal transition *via* the MEK/ERK/MMP signaling in colorectal cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2016, 35: 5.

[11] 程琢玉，严尚学，魏 伟. CP-25 抑制 GRK2-ERK 信号调节血管内皮细胞迁移和成管功能 [J]. 安徽医科大学学报，2019，54(11)：1667-71.

[12] Kattan W E, Chen W, Ma X, et al. Targeting plasma membrane phosphatidylserine content to inhibit oncogenic KRAS function [J]. Life Sci Alliance, 2019, 2(5): e201900431.

Effect of ORP8 on proliferation, migration and invasion of colorectal cancer cells DLD-1

Pan Qiwei, Chen Weicong, Pei Dongsheng, et al

(*Dept of Pathology, College of Basic Medicine, Xuzhou Medical University, Xuzhou* 221004)

Abstract ***Objective*** To observe and analyze the effect of ORP8 protein on the proliferation, migration and invasion ability of human colorectal cancer DLD-1 cells, and to preliminarily explore the mechanism of its influence. ***Methods*** The expression levels of ORP8 in colorectal cancer were up-regulated and down-regulated by transfection

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

网络出版时间: 2021 - 05 - 14 16:22 **网络出版地址:** https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210513.1449.014.html

裸鼠异种移植急性 T 淋巴细胞白血病模型的建立

张爱君,潘文文,胡晓曦,吴育晶,魏 伟

摘要 **目的** 比较尾静脉注射和皮下注射人 Jurkat 细胞建立异种移植急性 T 淋巴细胞白血病模型的优缺点。**方法** 雌性 BALB/c 裸鼠随机分为正常组、尾静脉移植组和皮下移植组。除正常组外,其余裸鼠造模前连续 2 d 给予环磷酰胺(2 mg/只),尾静脉移植组连续 2 d 尾静脉接种 5×10^6 个 Jurkat 细胞,皮下移植组连续 2 d 皮下接种 5×10^6 个 Jurkat 细胞,正常组裸鼠尾静脉注射相同体积 PBS 缓冲液。观察并记录裸鼠体质量、弓背以及精神状态。第 7 天和第 14 天通过流式细胞术检测 Jurkat 细胞在裸鼠外周血中浸润情况。第 28 天待尾静脉移植组和皮下移植组裸鼠出现衰竭体征濒临死亡时处死裸鼠,记录裸鼠体质量,瑞氏 - 吉姆萨染色检测外周血和骨髓中 Jurkat 细胞的浸润情况,流式细胞术检测脾脏和骨髓中 Jurkat 细胞的百分比,HE 染色、免疫组化法检测肝脏和脾脏中浸润的 Jurkat 细胞表达,ELISA 检测血清中 Jurkat 细胞分泌 IL-2 水平。**结果** 与正常组相比,尾静脉移植组和皮下移植组裸鼠均逐渐出现体质量下降、弓背、食欲减退等表现,肝脏、脾脏及骨髓中均有人 Jurkat 细胞表达。尾静脉移植组成模率 73%,皮下移植组成模率 40%。**结论** 尾静脉注射和皮下注射异种移植 Jurkat 细胞两种方法均可成功建立急性 T 淋巴细胞白血病动物模型,尾静脉注射移植效果更佳。

关键词 急性 T 淋巴细胞白血病细胞; BALB/c 裸鼠; 异种移植; 动物模型; 尾静脉注射; 皮下注射

中图分类号 R 73.35; R 73.352

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2021)06 - 0908 - 07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2021.06.014

2021 - 03 - 30 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81973332、81603121)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,抗炎免疫药物安徽省协同创新中心,合肥 230032

作者简介:张爱君,女,硕士研究生;

魏 伟,男,博士,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:wwei@ahmu.edu.cn;

吴育晶,女,博士,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:wyj@ahmu.edu.cn

急性 T 淋巴细胞白血病(acute T-cell lymphoblastic leukemia,T-ALL)是一种来源于骨髓的侵袭性恶性肿瘤[1]。近年来,我国 T-ALL 发病率呈升高趋势,部分患者出现耐药和复发等现象导致预后不佳[2],因此 T-ALL 的相关病理机制和药理学研究有着重要意义。目前对 T-ALL 疾病发病机制的认识很大程度上来源于对人体以及原代人 T-ALL 细胞的体外研究,在研发治疗 T-ALL 新药的药理学研究中,实验动物模型的选择和建立至关重要。目前的

of ORP8 expression plasmid or ORP8 siRNA in colorectal cancer DLD-1 cell. The effects of interference or overexpression on the proliferation, migration and invasion of colorectal cancer cell DLD-1 were detected by CCK-8 test, transwell test and wound healing test. Western blot was used to detect the total protein and phosphorylation levels of ORP8 in the extracellular regulated protein kinases (ERK1/2) and the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) related molecular markers protein E-cadherin, N-cadherin and Vimentin are studied. ***Results*** In colorectal cancer cell line DLD-1, when ORP8 was silenced, the cell proliferation, migration and invasion capacity significantly increased($P<0.01$), the expression levels of epithelial marker E-cadherin decreased, the expression levels of mesenchymal marker Vimentin and N-cadherin increased, and the expression level of p-ERK1/2 also increased. On the contrary, when ORP8 was overexpressed, the cell proliferation, migration and invasion capacity significantly decreased, the expression levels of epithelial marker E-cadherin increased($P<0.01$、$P<0.01$、$P<0.05$), the expression levels of mesenchymal marker N-cadherin and Vimentin protein decreased, and the expression level of p-ERK1/2 also decreased. ***Conclusion*** ORP8 protein can inhibit the proliferation, migration and invasion of colorectal cancer cell DLD-1, and its molecular mechanism may be related to blocking EMT transformation and inhibition of phosphorylation of p-ERK1/2.

Key words ORP8; colorectal cancer; epithelial-mesenchymal transition; proliferation; migration; invasion

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net