论著

文章编号:1000-5404(2012)19-1936-04

干扰结肠癌上皮细胞 Ascl2 的表达致其向杯状细胞表型分化

李晓桓,朱 蓉,田 音,汪荣泉 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军消化病研究所)

[摘要] **目的** 探讨转录因子 Ascl2 对结肠癌细胞分化的影响。**方法** 采用 Ascl2 分子干扰质粒和对照质粒对结肠癌 HT-29 和 LS174T 细胞进行转染,通过 G418 筛选建立稳定转染的细胞系,采用 RT-PCR 和 Western blot 方法检测干扰 Ascl2 分子表达对肠杯状细胞标志物 Muc2 和 TFF3 表达的影响。**结果** 成功构建了 shRNA-Ascl2/EGFP 质粒以及对照质粒 shRNA-control/EGFP,经测序与预期相符,G418 筛选获得 shRNA-Ascl2/HT-29、shRNA-Ctr/HT-29、shRNA-Ascl2/LS174T 和 shRNA-Ctr/LS174T 稳定转染细胞。RT-PCR 和 Western blot 检测证实干扰质粒能够有效地抑制 HT-29 和 LS174T 细胞内的 Ascl2 的表达($P<0.01$)。RT-PCR 检测发现 Muc2 和 TFF3 mRNA 表达水平在 Ascl2 干扰后的 HT-29 细胞内均明显上调($P<0.05$);Muc2 mRNA 表达水平在 Ascl2 干扰后的 LS174T 细胞内明显上调,差异有统计学意义($P<0.05$),但是 TFF3 mRNA 表达水平在 Ascl2 干扰后的 LS174T 内升高不明显($P>0.05$)。Western blot 检测发现 Muc2 蛋白质表达水平在 Ascl2 干扰后明显上调($P<0.05$)。**结论** 干扰结肠癌 HT-29 和 LS174T 细胞内 Ascl2 的表达导致其向杯状细胞的表型分化。

[关键词] Ascl2;结肠肿瘤;肿瘤细胞, 培养的;细胞分化;杯状细胞
[中图法分类号] R394.2; R730.23; R735.35 [文献标志码] A

Interference of Asc12 expression in colon cancer epithelial cells leads to their differentiation into phenotype of goblet cells

Li Xiaohuan, Zhu Rong, Tian Yin, Wang Rongquan (Institute of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To determine the effect of transcription factor Ascl2 on differentiation of colon cancer cells. Methods Colon cancer HT-29 and LS174T cells were transfected with shRNA-Ascl2 interference plasmid and shRNA-control plasmid, respectively. A stably-transfected cell line model was established by screening G418. Effect of shRNA-Ascl2 interfe-rence plasmid on expression of goblet cell markers, Muc2 and TFF3 mRNA and protein expression, was detected by RT-PCR and Western blot analysis. Results The successfully constructed shRNA-Ascl2/EPGF plasmid and shRNA-control/EPGF plasmid were confirmed by sequencing. Stably-transfected shRNA-Ascl2/HT-29, shRNA-Ctr/HT-29, shRNA-Ascl2/LS174T and shRNA-Ctr/LS174T cells were obtained by screening G418. RT-PCR and Western blot analysis displayed that the Ascl2 interference plasmid could effectively inhibit the Ascl2 expression in HT-29 and LS174T cells ($P<0.01$) and the Muc2 and TFF3 mRNA expression levels were significantly higher in HT-29 and LS174T cells than in their controls after Ascl2 interference ($P<0.05$). However, no significant difference was observed in the TFF3 mRNA expression level in LS174T cells and controls after Ascl2 interference ($P>0.05$). Western blot analysis showed that the Muc2 protein expression level was significantly higher in shRNA-Ascl2/HT-29 and shRNA-Ascl2/LS174T cells than in their controls after Ascl2 interference ($P<0.05$). Conclusion Interference of Ascl2 expression in colon cancer HT-29 and LS174T cells leads to their differentiation into phenotype of goblet cells.

[**Key words**] Ascl2;colon tumor;tumor cells, cultured; cell differentiation; goblet cells

Corresponding author:Wang Rongquan,Tel: 86-23-68754124,E-mail: rongquanw@hotmail.com

Achaete scute-like 2 (Ascl2)是一个碱性/螺旋-环-螺旋转录因子,是 Wnt 信号的靶分子,其表达仅限于胎盘以及小肠和大肠隐窝基底的 Lgr5 阳性的肠隐窝基底柱细胞,即 CBC 细胞(crypt base columnar cells, CBC cells)[1]。小鼠基因过表达和基因敲除模型揭示 Ascl2 是控制 CBC 细胞"干性"的一个重要的转录因子,Ascl2 在小鼠肠上皮中的转基因过表达诱导了肠隐窝的过度增生和肠绒毛上的异位隐窝出现;Ascl2 基因

[通信作者] 汪荣泉,电话:(023)68754124,E-mail: rongquanw@hotmail.com

在成体小鼠肠道的诱导缺失则导致 Lgr5 阳性的 CBC 细胞在 Cre 诱导 5 d 后消失[1]。近来又有研究发现，在人的结肠癌标本中，Ascl2 的表达明显上调，并且在结肠癌发生、发展的各个时期均表达上调[2-3]，在人结肠癌细胞系中干扰了 Ascl2 的表达，导致了细胞周期的 G_2/M 期阻滞[4]。因此，我们设想 Ascl2 可能与结肠癌干细胞的“干性”相关，我们前期实验也已证实，Ascl2 在维持结肠癌干细胞自我更新方面发挥重要的作用[5]，但是，有关 Ascl2 在结肠癌细胞分化方面的作用尚不清楚。本研究对结肠癌 HT-29 和 LS174T 细胞进行 Ascl2 的 RNA 干扰并建立稳定转染的细胞系，观察 Ascl2 干扰后对 HT-29 和 LS174T 细胞分化方面的影响，以进一步探讨 Ascl2 在维持结肠癌细胞分化的影响作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

人结肠癌细胞株 HT-29 购自中国科学院上海细胞库，人结肠癌细胞株 LS174T 由第三军医大学西南医院全军消化病研究所保种（均引自 ATCC），Macoy’s 5A 培养基购自 Sigma 公司，胎牛血清（FBS）购自 Hyclone 公司，Lipofectamine™2000 和 Trizol 试剂均购自 Invitrogen 公司，逆转录和荧光定量 PCR 试剂购自大连宝生物工程有限公司，抗 Ascl2 单克隆抗体购自 Millipore 公司，抗 Muc2 多克隆抗体来源于加拿大多伦多大学儿童医院研究中心生物化学研究室，CO_2恒温培养箱购自美国 Thermo 公司，PCR 仪和凝胶成像系统均购自美国 BioRad 公司，激光共聚焦扫描显微镜购自德国 Carl Zeiss 公司。

1.2 质粒构建与测序

shRNA-Ascl2/EGFP 质粒以及对照质粒 shRNA-control/EGFP 由武汉市晶赛生物工程有限公司合成，Ascl2 干扰序列为 CCGCGTGAAGCTGGTGAAC[1]，经 *Eco* 31 Ⅰ酶克隆入 pGenesil-1.1 载体，然后将质粒进行测序，结果表明所获得的干扰质粒目的片段与预期完全相符[5]。

1.3 细胞培养、质粒转染以及稳定转染细胞系的建立

HT-29 和 LS174T 细胞以含 10% 胎牛血清的 Macoy’s 5A 完全培养液进行常规培养，当细胞处于对数生长期时消化、离心细胞，调整细胞浓度，接种至 24 孔板中，当细胞生长融合至 50% ~60%，进行转染（按 Lipofectamine™2000 转染试剂说明书进行操作）；转染 48 h 后激光共聚焦显微镜下观察绿色荧光表达情况，并进一步行 G418 筛选并维持稳定转染（HT-29 细胞：G418 筛选浓度为 800 μl/ml，维持浓度为 400 μl/ml；LS174T 细胞：G418 筛选浓度为 400 μl/ml，维持浓度为 200 μl/ml），分别建立 shRNA-Ascl2/HT-29、shRNA-Ctr/HT-29、shRNA-Ascl2/LS174T 和 shRNA-Ctr/LS174T 4 个稳定转染的细胞系。

1.4 Real-time PCR 检测肠分化标志物 mRNA 水平的表达

总 RNA 的提取按照 Trizol 试剂说明书进行操作，RT-PCR 引物由大连宝生物生物工程有限公司合成（表 1），退火温度为 60 ℃。按照试剂盒说明书进行逆转录，反应条件为：37 ℃ × 15 min；85 ℃ ×5 s。RT-PCR 反应体系为 20 μl，反应条件为：95 ℃ ×10 s，1 个循环；95 ℃ ×5 s，60 ℃ ×20 s，40 个循环；55 ℃ ×10 s，80 个循环。

表 1 RT-PCR 实验引物

基因	引物	片段长度(bp)
Ascl2	上游：5′-CGTGAAGCTGGTGAACTTGG-3′	113
	下游：5′-GGATGTACTCCACGGCTGAG-3′	
Muc2	上游：5′-GGGGAGTGCTGTAAGAAGTGTGA-3′	165
	下游：5′-GTTGGAGACGGACGAGATGAG-3′	
TFF3	上游：5′-AGCCAAGGACAGGGTGGACT-3′	110
	下游：5′-GCTTGAAACACCAAGGCACTC-3′	
Lysozyme	上游：5′-GGGCTTGTCCTCCTTTCTGTTAC-3′	122
	下游：5′-CACATCCAGTTTGCTAGGCTGA-3′	
PLA2G-2A	上游：5′-ACGTCTGGAGAAACGTGGATGT-3′	126
	下游：5′-GCAGCCTTATCACACTCACACAG-3′	
Isomaltase	上游：5′-GCACTGTTATCCGACCCCTTT-3′	164
	下游：5′-GTAGTCAAACCACCGAGCATTG-3′	
Lactase	上游：5′-GTAGGAGGCTGGGAGAATGAGAC-3′	131
	下游：5′-CCCTGGTAAGCAATGACAAAGG-3′	
Chromogranin A	上游：5′-TGTCCTGGCTCTTCTGCTCTG-3′	124
	下游：5′-CTTGGAAAGTGTGTCGGAGATG-3′	
Nero D1	上游：5′-GACGAGTGTCTCAGTTCTCAGGA-3′	146
	下游：5′-TCTTCTTCCTCCTCTTCCAGGTC-3′	
β-actin	上游：5′-TGGCACCCAGCACAATGAA-3′	186
	下游：5′-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3′	

1.5 Western blot 检测分化标志物 Muc2 的蛋白表达

用 SDS 裂解缓冲液裂解 HT-29、LS174T 细胞获得全细胞裂解液，BCA 法定量，取全细胞裂解液 20 μg 按照 4∶1 比例加入 0.5 mol/L DTT，煮沸 5 min 变性，上样，电泳，电转，用含 5% BSA 室温封闭 2 h，加入 Muc2 一抗（1∶1 000），4 ℃过夜，洗膜，加入辣根过氧化物酶标记的二抗（1∶10 000），室温孵育1 h，洗膜，免疫复合物经化学发光显色，凝胶成像仪成像。采用 Quantity-One 软件对条带的光密度值进行分析，蛋白的相对定量结果以实验条带光密度值/β-actin 条带光密度值表示。

1.6 统计学分析

用 SPSS 13.0 软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，各组间比较采用单因素方差分析。

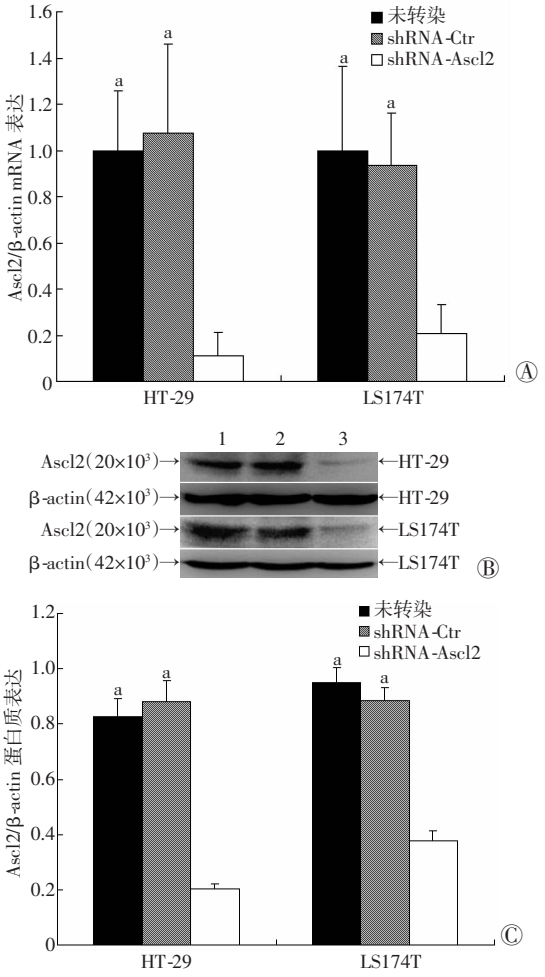
2 结果

2.1 质粒转染及稳定转染细胞系的建立

激光共聚焦显微镜观察结果显示 shRNA-Ascl2/EGFP 和 shRNA-control/EGFP 质粒瞬时转染 48 h，转染效率均低于 20%。进一步进行 G418 筛选稳定转染的细胞，3 ~4 周后形成稳定转染的克隆，再进一步进行消化、传代，扩增培养。LS174T 细胞质粒转染 48 h 后经 G418 筛选也得到稳定转染的细胞系，分别命名为 shRNA-Ascl2/HT-29、shRNA-Ctr/HT-29、shRNA-Ascl2/LS174T 和 shRNA-Ctr/LS174T 细胞。

2.2 Ascl2 干扰效果的检测

对 HT-29、shRNA-Ctr/HT-29、shRNA-Ascl2/HT-29、LS174T、shRNA-Ctr/LS174T 和 shRNA-Ascl2/LS174T 细胞进行 Ascl2 mRNA 和蛋白表达水平的检测，RT-PCR 和 Western blot 结果（图1）均显示，与未转染和转染对照质粒（shRNA-Ctr）细胞比较，转染干扰质粒（shRNA-Ascl2）mRNA 和蛋白质的表达均明显减少（$P<0.01$）。

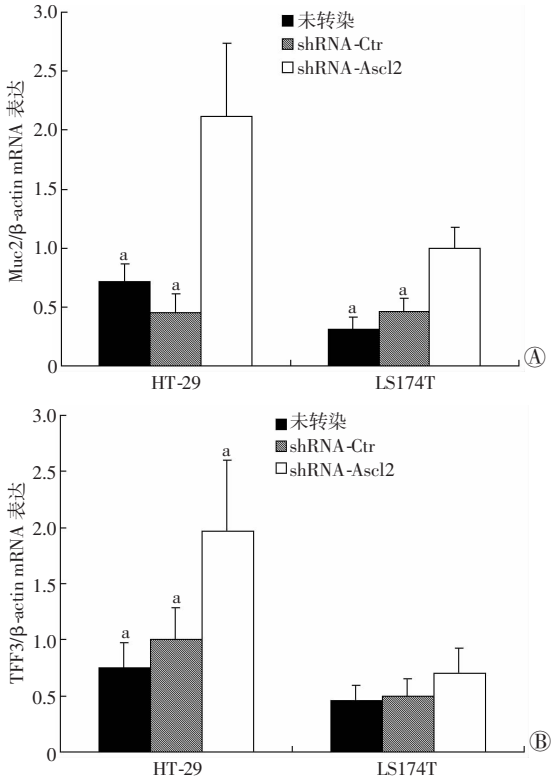


A：RT-PCR a：$P<0.01$，与 shRNA-Ascl2 比较；B：Western blot 1：未转染细胞；2：shRNA-Ctr；3：shRNA-Ascl2；C：半定量分析 a：$P<0.01$，与 shRNA-Ascl2 比较

图1 HT-29 和 LS174T 细胞 Ascl2 干扰后 Ascl2 mRNA 及蛋白表达

2.3 Real-time PCR 检测肠分化标志物 mRNA 水平的表达

Real-time PCR 实验结果显示：肠杯状细胞标志物 Muc2 mRNA 表达在 Ascl2 干扰后的 HT-29 和 LS174T 细胞中均明显高于未转染和转染对照质粒细胞，TFF3 在 Ascl2 干扰后的 HT-29 细胞中表达也明显上调，差异具有统计学意义（$P<0.05$，图2）。TFF3 在 Ascl2 干扰后的 LS174T 细胞中表达也有增高，但没有统计学意义（$P>0.05$）；而代表 Paneth 细胞表型的生物标志物 Lysozyme 和 PLA2G-2A 在 Ascl2 干扰前后其 mRNA 水平无明显变化；代表肠吸收细胞和肠内分泌细胞表型的生物标志物 Isomaltase、Lactase 以及 Chromogranin A、Nero D1 由于 mRNA 水平表达过低而在相同条件下检测不出。



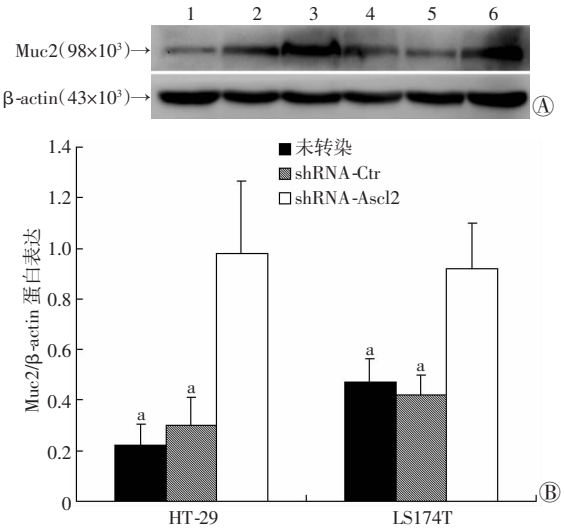
a：$P<0.05$，与 shRNA-Ascl2 比较

A：Ascl2 干扰后 Muc2 mRNA 的表达；B：Ascl2 干扰后 TFF3 mRNA 的表达

图2 Real-time PCR 检测干扰后 HT-29 和 LS174T 细胞 Muc2 和 TFF3 mRNA 的表达

2.4 Western blot 检测分化标志物 Muc2 的蛋白表达

肠杯状细胞标志物 Muc2 蛋白表达在 Ascl2 干扰后的 HT-29 和 LS174T 细胞中均明显高于未转染和转染对照质粒细胞，差异具有统计学意义（$P<0.05$，图3）。



A：Western blot 1：HT-29；2：shRNA-Ctr/HT-29；3：shRNA-Ascl2/HT-29；4：LS174T；5：shRNA-Ctr/LS174T；6：shRNA-Ascl2/LS174T；B：半定量分析 a：$P<0.05$，与 shRNA-Ascl2 比较

图3 Western blot 检测 Ascl2 干扰后 HT-29 和 LS174T 细胞 Muc2 蛋白的表达

3 讨论

结肠癌是常见的消化道恶性肿瘤之一,预后不良,死亡率较高。近年来,随着生活水平的提高和饮食结构的改变,结肠癌发病率在不断上升,已经严重危害到人类的健康。结肠癌的治疗一直是一大难题,结肠癌早期诊断率低,而中晚期结肠癌侵袭和转移又使结肠癌的治疗面临巨大的挑战。肿瘤干细胞理论的提出给结肠癌的治疗带来了新的希望。

Ascl2是正常成体肠干细胞的一个重要标志物,其控制着肠黏膜隐窝Lgr5阳性的干细胞命运[1]。目前研究认为,结肠癌干细胞可能起源于正常成体肠隐窝干细胞。我们前期实验也已证实,Ascl2与结肠癌干细胞相关[5]。本课题研究组对结肠癌HT-29和LS174T细胞进行Ascl2的shRNA干扰质粒转染并通过G418筛选分别建立了稳定转染的细胞系,对多个肠分化标志物进行了Real-time PCR检测,结果发现Muc2和TFF3 mRNA表达水平上调,并进一步对Muc2蛋白质水平进行了Western blot检测,结果发现Muc2蛋白质表达水平也上调。实验结果说明,转录因子Ascl2对结肠癌分化有影响,并且Ascl2干扰后导致结肠癌细胞向杯状细胞表型分化。

本研究探讨Ascl2对结肠癌分化方面的影响采用的是结肠癌细胞株,没有针对其原代干细胞进行研究,这是该研究的局限性所在。但是结肠癌干细胞的分离培养,尤其是原代结肠癌干细胞的分离培养具有相当的难度,并且,分离培养出来的干细胞需要经过质粒或慢病毒转染以及转染后细胞的活性和转染后细胞要很好地用于进一步实验均存在难度。目前,本课题组正在向这方面努力,希望能得到更有意义的结果,但是目前的结果是一个重要的提示,说明Ascl2对结肠癌分化具有影响。

肿瘤干细胞是肿瘤的种子和源泉,是肿瘤发生、发展、转移和复发等过程中的"起始细胞"或"动力细胞"。随着肿瘤干细胞研究的不断拓展,结肠癌干细胞已成功地获得分离和培养。其分离一般是利用其表面标志物(目前鉴别结肠癌干细胞的表面标志物有:CD133[6-9]、CD44[10-12]、CD166[12]、CD24[9]、CD29[9]和Lgr5[13]),采用流式细胞术或磁性激活细胞分选法进行分选;培养则主要是采用特殊的培养条件进行无血清成球培养。成功分离并培养出结肠癌干细胞,使结肠癌干细胞的研究具备了前提和基础。

结肠癌干细胞理论的提出使更有效的结肠癌治疗成为可能,而这种治疗的目标不仅仅是减少肿瘤的体积,更是以肿瘤"跳动的心脏"——肿瘤干细胞为靶标[14]。研究结肠癌干细胞的"干性",必将使结肠癌的治疗更加有的放矢!抑制结肠癌干细胞的自我更新,促使其分化,甚至杀灭结肠癌干细胞都将成为治疗结肠癌的重要方法和手段。Ascl2对结肠癌干细胞分化的影响有待进一步的研究,可为将来结肠癌的诊治提供新的依据。

参考文献:

[1] van-der-Flier L G, van-Gijn M E, Hatzis P, *et al*. Transcription factor achaete scute-like 2 controls intestinal stem cell fate[J]. Cell, 2009, 136(5): 903-912.

[2] Jubb A M, Hoeflich K P, Haverty P M, *et al*. Ascl2 and 11p15.5 amplification in colorectal cancer[J]. Gut, 2011, 60(11):1606-1607.

[3] Stange D E, Engel F, Longerich T, *et al*. Expression of an ASCL2 related stem cell signature and IGF2 in colorectal cancer liver metastases with 11p15.5 gain[J]. Gut, 2010, 59(9): 1236-1244.

[4] Jubb A M, Chalasani S, Frantz G D, *et al*. Achaete-scute like 2 (ascl2) is a target of Wnt signalling and is upregulated in intestinal neoplasia[J]. Oncogene, 2006, 25(24): 3445-3457.

[5] Zhu R, Yang Y, Tian Y, *et al*. Ascl2 knockdown results in tumor growth arrest by miRNA-302b-related inhibition of colon cancer progenitor cells[J]. PLoS One, 2012, 7(2):e32170.

[6] O'Brien C A, Pollett A, Gallinger S, *et al*. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice[J]. Nature, 2007, 445(7123): 106-110.

[7] Ricci-Vitiani L, Lombardi D G, Pilozzi E, *et al*. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells[J]. Nature, 2007, 445(7123): 111-115.

[8] Todaro M, Alea M P, Di-Stefano A B, *et al*. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4[J]. Cell Stem Cell, 2007, 1(4): 389-402.

[9] Vermeulen L, Todaro M, de-Sousa-Mello F, *et al*. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(36): 13427-13432.

[10] Chu P, Clanton D J, Snipas T S, *et al*. Characterization of a subpopulation of colon cancer cells with stem cell-like properties[J]. Int J Cancer, 2009, 124(6): 1312-1321.

[11] Du L, Wang H, He L, *et al*. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(21): 6751-6760.

[12] Dalerba P, Dylla S J, Park I K, *et al*. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(24): 10158-10163.

[13] Barker N, Ridgway R A, van-Es J H, *et al*. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer[J]. Nature, 2009, 457(7229): 608-611.

[14] Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges[J]. Nat Med, 2011, 17(3): 313-319.

(**收稿**:2012-03-26;**修回**:2012-05-14)

(编辑 王 红)