DOI:10.16016/j.2097-0927.202311079

SERPINE1 对结肠癌细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响

陈德合[1,2,3,4],李登玉[2],郭 刚[1,3],王 杰[3],周 倩[3],李洪涛[3] 750000 银川,宁夏医科大学临床医学院胃肠外科[1];476000 河南 商丘,商丘市第五人民医院普外科[2];730000 兰州,联勤保障部队第九四〇医院普外科[3];730000 兰州,甘肃省干细胞与基因药物重点实验室[4]

[**摘要**] **目的** 探究丝氨酸蛋白酶抑制剂 1(serine proteinase inhibitor family E member 1,SERPINE1)在结肠癌中的表达及对结肠癌细胞恶性生物学行为的影响。**方法** 通过 starBase 和 TISIDB 数据库分析 471 个结肠癌及 41 个正常结肠组织中 SERPINE1 的表达及其与临床分期、预后生存的关系;收集联勤保障部队第九四〇医院 5 例结肠癌患者癌组织与对应的癌旁组织标本,应用 RT-qPCR 和 Western blot 验证 SERPINE1 在结肠癌中的表达。构建 SERPINE1 过表达与干扰表达的慢病毒载体,进行结肠癌 RKO 和 LoVo 细胞株转染,通过 RT-qPCR 和 Western blot 评估 SERPINE1 过表达和干扰表达的效果,通过细胞计数试剂盒(cell counting kit-8,CCK-8)、克隆形成实验、Transwell 实验和 Hoechst 凋亡细胞核染色评估细胞的增殖、迁移与侵袭能力和细胞的凋亡情况;应用 Western blot 检测 SERPINE1 对磷脂酰激酶 3(phosphatidyl-inositol 3-kinase,PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B,AKT)信号通路的影响。**结果** 数据库分析发现 SERPINE1 在结肠癌中高表达,且与患者的肿瘤临床分期正相关,与预后总生存期负相关($P<0.05$)。转染过表达的慢病毒载体后细胞的增殖、迁移与侵袭能力增强,而细胞的凋亡减弱;反之,在转染干扰表达的慢病毒载体后细胞的增殖、迁移与侵袭能力减弱,而细胞的凋亡增强($P<0.05$)。通过 Western blot 实验发现转染 SERPINE1 过表达的慢病毒载体后细胞 PI3K 和 AKT 表达无明显变化,而磷酸化 PI3K(p-PI3K)和磷酸化 AKT(p-AKT)表达增加,反之转染 SERPINE1 干扰表达的慢病毒载体细胞 PI3K 和 AKT 表达无明显变化,而 p-PI3K 和 p-AKT 表达减少,灰度值定量分析 p-PI3K/PI3K 和 p-AKT/AKT 比值差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** SERPINE1 在结肠癌中高表达,与患者临床分期及预后相关;SERPINE1 过表达可能通过激活 PI3K/AKT 信号通路促进结肠癌细胞的增殖、迁移与侵袭,抑制其凋亡。

[**关键词**] 结肠癌;丝氨酸蛋白酶抑制剂 1;增殖;迁移;凋亡
[**中图法分类号**] R341;R730.23;R735.35 [**文献标志码**] A

Effects of SERPINE1 on proliferation, migration, invasion and apoptosis of colon cancer cells

CHEN Dehe[1,2,3,4], LI Dengyu[2], GUO Gang[1,3], WANG Jie[3], ZHOU Qian[3], LI Hongtao[3] [1]Department of Gastrointestinal Surgery, College of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia Hui Autonomous Region, 750000; [2]Department of General Surgery, Shangqiu Fifth People's Hospital, Shangqiu, Henan Province, 476000; [3]Department of General Surgery, No. 940 Hospital of Joint Logistic Support Force, Lanzhou, Gansu Province, 730000; [4]Gansu Provincial Key Laboratory of Stem Cells and Genetic Drugs, Lanzhou, Gansu Province, 730000, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the expression of serine proteinase inhibitor family E member 1 (SERPINE1) in colon cancer and its effect on the malignant biological behaviors of colon cancer cells.

[**基金项目**] 甘肃省自然科学基金(22JR5RA005)
[**通信作者**] 李洪涛,E-mail:lihongtao528@163.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Methods starBase and TISIDB databases were used to analyze the expression of SERPINE1 in 471 patients with colon cancer and 41 paracancerous tissues, and the relationships of its differential expression with clinical stage and prognostic survival were analyzed. The cancer specimens and paracancerous tissues from 5 patients with colon cancer were collected in No. 940 Hospital of Joint Logistic Support Force, and RT-qPCR and Western blotting were employed to detect the expression of SERPINE1 at mRNA and protein levels. After lentiviral vectors of SERPINE1 overexpression and interference were constructed and transfected into colon cancer RKO and LoVo cells. The experimental cells were assessed by RT-qPCR and Western blotting to verify the efficiency of overexpression and interference. Then cell proliferation, migration, invasion and apoptosis were evaluated by CCK-8 assay, clone formation test, Transwell test and Hoechst apoptotic nuclear staining, respectviely. Finally, Western blotting was applied to determine the effect of SERPINE1 on phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) signaling pathway. **Results** Database analysis showed that SERPINE1 was highly expressed, positively correlated with the clinical stage and negatively correlated with the overall survival in colon cancer patients ($P<0.05$). Transfection of overexpression lentiviral vector resulted in enhanced cell proliferation, invasion and migration abilities while weakened apoptosis in RKO and LoVo cells. On the contrary, SERPINE1 interference reduced the abilities of cell proliferation, invasion and migration but improved cell apoptosis ($P<0.05$). Western blotting showed that overexpression of SERPINE1 had no effect on the expression of PI3K and AKT, but increased the expression of p-PI3K and p-AKT, and SERPINE1 interference also had no change in PI3K and AKT expression and reduced the levels of their phosphorylation levels. Statistical differences were observed in relative quantitative analysis on the ratios of p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT ($P<0.05$). **Conclusion** SERPINE1 is highly expressed, and correlated with clinical stage and prognosis of patients with colon cancer. Its overexpression promotes the proliferation, migration, invasion and inhibits apoptosis of colon cancer RKO and LoVo cells through PI3K/AKT signaling pathway.

[**Key words**] colon cancer; SERPINE1; proliferation; migration; apoptosis

Supported by the Natural Science Foundation of Gansu Province (22JR5RA005). Corresponding author: LI Hongtao, E-mail: lihongtao528@163.com

肿瘤是全球主要致死原因之一,在部分国家已成为过早死亡的首要原因[1]。据统计,2020 年全球新发癌症中消化系统肿瘤的发病率和病死率位居榜首,其中结直肠癌(colorectal cancer,CRC)地位举足轻重,新发病例高达 193.2 万,死亡病例高达 93.5 万,分别占消化系统肿瘤的 33.8%和 24.1%[2]。然而,我国结直肠癌年发病达 40.64 万例,其发病率和病死率均呈现上升趋势,尤其在男性中更为明显[3]。近年来,尽管 CRC 的治疗取得了重大进展,但由于缺乏特异性早期诊断分子,超过 60%的患者发现时已经发展到肿瘤晚期,且大多已转移,存活率为 8%~9%[4-5]。结肠癌(colon cancer,CC)是结直肠癌的主要类型,我国 CC 的发病率城市高于农村,男性高于女性[6]。因此,迫切需要寻找有助于 CC 诊治的靶分子,以期及早发现、靶向治疗,进而改善患者预后。

SERPINE1 又称纤溶酶原激活物抑制剂 1(plasminogen activator inhibitor-1,PAI-1),属于丝氨酸蛋白酶抑制剂家族 E 亚家族中的一员,位于人类 7 号染色体 2 区 2 带 1 亚带($7q^{22.1}$),不但调节凝血与纤溶系统,而且参与许多病理(生理)过程,包括炎症、伤口愈合、细胞黏附和肿瘤进展[7]。近年来,研究表明 SERPINE1 与肿瘤的发生、发展密切相关,且有报道显示其在不同肿瘤或者在同一肿瘤的不同时期可能发挥着抑癌与促癌的双重功能[8-9]。研究报道,SERPINE1 过表达激活 AKT 和细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases,ERK)通路促进食管癌细胞的侵袭和迁移[10];SERPINE1 可促进血管肉瘤血管生成增加其恶性进展[11];沉默 SERPINE1 的表达可以抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭,增强胃癌细胞的凋亡[12]。生物信息学分析发现结肠癌中 SERPINE1 异常表达,且与患者预后相关[13-15]。然而,SERPINE1 在结肠癌中的表达与其生物学表型功能的关系尚待明确。本研究通过收集临床样本验证其在结肠癌中的表达,并通过构建过表达和干扰表达的慢病毒载体转染结肠癌细胞,探究其对细胞增殖、迁移与侵袭及凋亡等的影响,以明确 SERPINE1 在结肠癌细胞增殖、迁移与

侵袭及凋亡过程中发挥的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 数据库

通过 starBase 和 TISIDB 数据库平台分析 471 个结肠癌及 41 个正常结肠组织中 SERPINE1 的表达差异,及其与临床分期及预后生存的关系。

1.2 实验材料

组织:收集联勤保障部队第九四〇医院普外科 2023 年 6-11 月 5 例结肠癌患者手术标本的结肠癌组织与对应的癌旁组织(距离肿瘤边缘 5 cm)。本研究获得联勤保障部队第九四〇医院伦理委员会批准(2022KYLL210)。

细胞:通过前期预实验筛选 SERPINE1 表达适中的结肠癌 RKO 和 LoVo 细胞株进行实验研究,可同时满足 SERPINE1 过表达和干扰表达。LoVo 细胞株由甘肃省干细胞基因与药物重点实验室赠予,RKO 细胞株购自上海 FuHeng Biology 公司。

1.3 主要试剂及仪器

主要试剂:南美特级胎牛血清购自上海 SEOU Biology 公司;培养基 DMEM 和 1640 及胰酶购自北京 GIBCO-Invitrogen 公司;SERPINE1 过表达和干扰表达的慢病毒载体购自上海 Genepharma 公司;c-DNA 反转录和扩增试剂盒购自北京 TaKaRa 公司;CCK-8、4%多聚甲醛、结晶紫染色液、RIPA 组织/细胞裂解液、BCA 蛋白浓度检测试剂盒、蛋白上样缓冲液、嘌呤霉素、SDS-PAGE 制胶盒、电泳缓冲液及电转缓冲液、脱脂奶粉和 TBST 购自北京 Solarbio 公司;Matrigengel 基底膜基质购自上海诺娃公司;RNA 提取试剂盒、细胞核凋亡检测试剂盒、青链霉素、抗体稀释液和 ECL 发光液购自上海 Beyotime 公司;SERPINE1 引物购自西安 Tsingke Biotech 公司,内参引物购自湖南 Accurate Biology 公司;SERPINE1 一抗购自武汉 Proteintech 公司;PI3K、AKT、p-PI3K 和 p-AKT 一抗购自上海 Abmarts 公司;GAPDH 一抗、二抗购自杭州 HUABIO 公司。

主要仪器:恒温培养箱、酶标仪(厂家:Thermo,产地:USA);荧光显微镜(厂家:Olympus,产地:Japan);qPCR 扩增仪(厂家:ABI,产地:USA);电泳/电转仪(厂家:Bio-Rad,产地:USA)。

1.4 细胞培养、转染及稳转株筛选

RKO 细胞株用 DMEM 高糖完全培养基培养;LoVo 细胞株用 1640 完全培养基培养。培养基中加入 1%的青链霉素和 10%胎牛血清(FBS)配制成完全培养基,培养条件为 37 ℃,5%CO_2。

细胞分组:过表达组(oe-RKO、oe-LoVo)转染 oe-LV8N-SERPINE1 慢病毒载体,以转染 oe-LV8N 空载体的细胞作为对照组(oe-RKO-NC、oe-LoVo-NC);干扰表达组(sh-RKO-352、sh-RKO-603、sh-RKO-822,sh-LoVo-352、sh-LoVo-603、sh-LoVo-822)分别转染 sh-LV3-SERPINE1(352、603、822)慢病毒载体,以转染 sh-LV3 空载体的细胞作为对照组(sh-RKO-NC、sh-LoVo-NC)。

选取生长良好的对数期待感染靶细胞和根据预实验选取合适的感染复数(MOI)加入适量的慢病毒载体,感染 24 h 后换液,待感染 72 h 后荧光显微镜初步观察感染效果,然后加入适量浓度的嘌呤霉素完全培养基,定期换液,进行稳转株筛选,培养 7 d 后收集细胞进行 RT-qPCR 和 Western blot 鉴定(鉴定目的基因表达水平),并将鉴定结果合格的靶细胞冻存保种,便于进行后续实验。

1.5 RT-qPCR 检测

选取融合度在 80%对数生长期待测细胞(组织提取:取适量组织加入液氮进行研磨),应用 RNA 提取试剂盒进行总 RNA 提取,紫外分光光度计检测其纯度,并计算其浓度,选取合格的提取样本进行 c-DNA 反转录,然后进行 RT-qPCR 扩增,最后采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行相对定量分析并绘制柱状图。引物序列:SERPINE1 正向引物 5′-CCGCCGCCTCTTCCACAAATC-3′,反向引物 5′-TAGGGCAGTTCCAGGATGTCGTAG-3′;GAPDH 正向引物 5′-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3′,反向引物 5′-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3′。

1.6 Western blot 检测

蛋白提取:选取融合度在 80%对数生长期待测细胞,加入适量 RIPA 组织/细胞裂解液(组织提取:取适量组织切碎加入裂解液后应用低温组织研磨仪进行研磨),提取总蛋白,BCA 检测蛋白浓度。电泳电转封闭:制作 10% SDS-PAGE 凝胶,加入 10 μg 总蛋白电泳分离,电转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,应用 5% 脱脂奶粉常温封闭 2 h。抗体孵育:按照一抗说明书稀释抗体,将 PVDF 置于配置好的一抗工作液中,4 ℃冰箱内摇床孵育过夜,待一抗孵育完成后进行 TBST 洗膜;将 PVDF 膜置于辣根过氧化物标记的山羊二抗中,常温摇床孵育 2 h,孵育完成后洗膜。曝光分析:使用 ECL 发光液进行 PVDF 膜显影,通过 Image J 软件计算灰度值,并进行定量分析。

1.7 细胞功能实验

1.7.1 CCK-8 实验 将待测细胞按 2 000 个/孔均匀接种于 96 孔板,并在常规条件下培养 6、12、24、48、

72 h 后每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,在 37 ℃、含 5% CO_2 的恒温箱孵育 3 h。利用酶标仪检测 450 nm 和 620 nm 处的光密度(optical density,OD),采用 450 nm 处 OD 值减去 620 nm 处参比波长的 OD 值作为评估细胞的增殖能力。

1.7.2　克隆形成实验　　将待测细胞按 500 个/孔均匀接种于 6 孔板,放入 37 ℃、5% CO_2 恒温培养箱中,2~3 d 换液 1 次。根据不同情况在培养 10~14 d 后终止克隆,吸弃培养液,用 PBS 清洗 2 次后加入 4%多聚甲醛固定(1 mL/孔),30 min 后 PBS 清洗 2 次,加入结晶紫染色液(1 mL/孔),染色 30 min 后,PBS 清洗至 6 孔板上无明显背景,晾干后相机拍照,通过 Image J 软件计算克隆面积,并进行量化分析。

1.7.3　Transwell 迁移实验　　提前 12 h 把待测细胞换用无 FBS 培养基培养,在 Transwell 下层小室加入含 20% FBS 的完全培养基 600 μL。将饥饿细胞进行消化,用无 FBS 培养基重悬,均匀接种于 Transwell 上层小室,每孔 100 μL(约 5×10^4 个),接种完毕后将培养板放入 37 ℃、5% CO_2 恒温培养箱中孵育 36 h;孵育完成后上层小室用 4% 多聚甲醛固定,结晶紫染色,PBS 漂洗晾干后高倍显微镜下拍照,随机选取 3 个视野,做定量分析并绘制柱状图。

1.7.4　Transwell 侵袭实验　　提前 12 h 把待测细胞换用无 FBS 培养基培养,提前 3 h 将 Matrigengel 基底膜基质铺于 Transwell 上室底部,制作侵袭模型。在 Transwell 下层小室加入含 20% FBS 的完全培养基 600 μL,将饥饿细胞进行消化,用无 FBS 培养基重悬,均匀接种于 Transwell 的上层小室,每孔 150 μL(约 7.5×10^4 个),后续同 Transwell 迁移实验。

1.7.5　Hoechst 细胞核染色　　采用 Hoechst 染色细胞核检测细胞凋亡。将洁净的盖玻片置入 6 孔板内,均匀接种适量的不同待测细胞后放入恒温培养箱过夜,第 2 天进行细胞固定,固定完成后 PBS 液清洗,加入 Hoechst 33258 染色液,500 μL/孔,室温避光孵育 5 min,间断晃动培养板,染色完成 PBS 清洗后滴一滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上,盖上贴有细胞的盖玻片,最后在荧光显微镜下激发波长 350 nm 左右,发射波长 460 nm 左右调整焦距观察和拍照,随机选取 15 张照片,通过量化高倍显微镜下凋亡细胞核个数,评估细胞的凋亡情况。

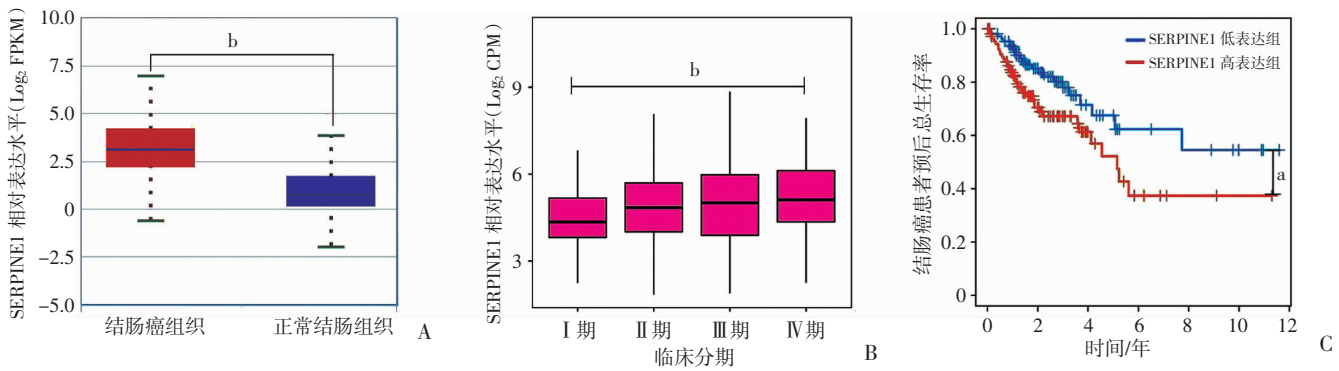
1.8　统计学分析

数据库样本分析采用平台默认的统计学方法;统计学分析使用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件,实验数据为计量资料,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组比较采用独立样本 t 检验,配对样本选用配对样本 t 检验,多组间差异比较采用单因素方差分析,$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　结肠癌中 SERPINE1 表达与临床分期及预后的关系

通过 starBase 和 TISIDB 数据库可视化分析模块,查找并分析结肠癌中 SERPINE1 表达与临床分期和预后的关系,starBase 数据库分析发现 SERPINE1 在结肠癌中表达显著高于正常结肠组织($P<0.01$);TISIDB 数据库分析发现 SERPINE1 的表达随临床分期的增加而增加,差异有统计学意义($P<0.01$),SERPINE1 高表达组患者预后总生存时间(overall suivival,OS)短于低表达组($P<0.05$)。见图 1。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:starBase 数据库中 SERPINE1 在结肠癌组织和正常结肠组织中的表达分析;B:TISIDB 数据库中 SERPINE1 在不同临床分期结肠癌组织中的表达分析;C:TISIDB 数据库中结肠癌患者 SERPINE1 高、低表达组预后生存曲线

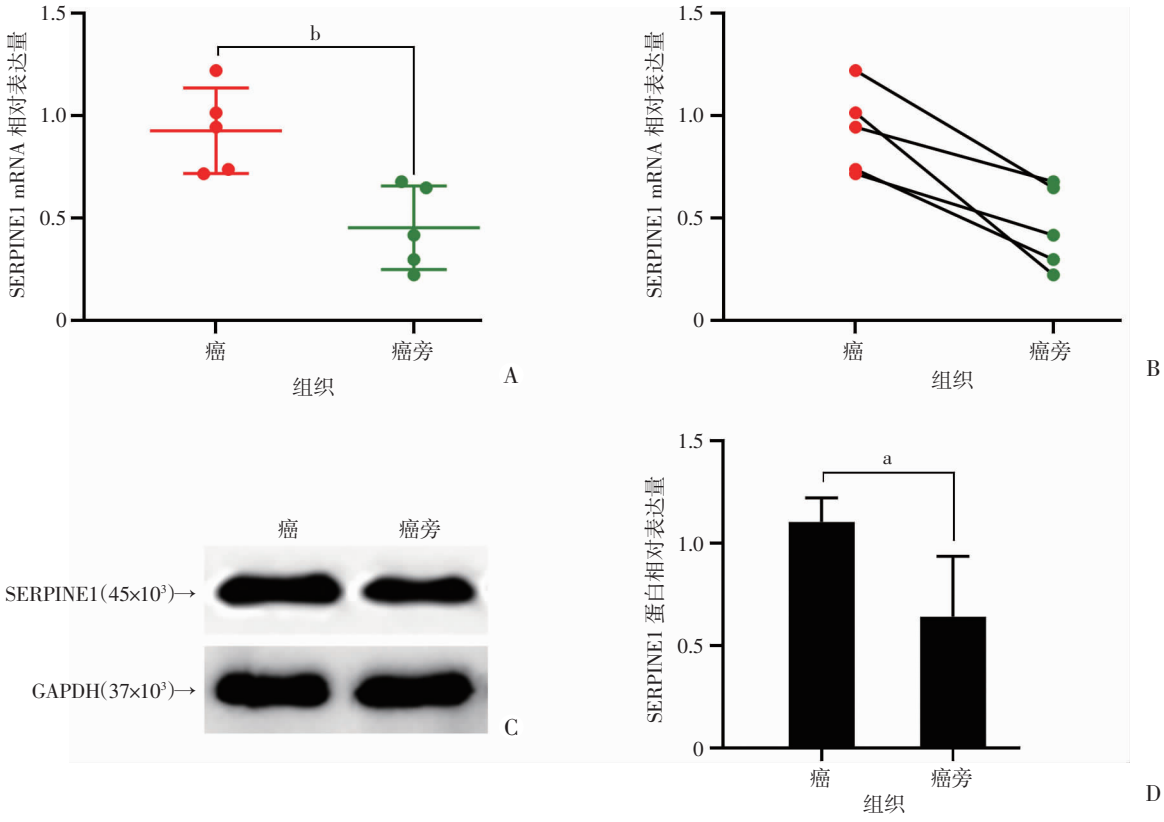
图 1　数据库分析 SERPINE1 的表达与临床分期及预后的关系

2.2 SERPINE1 在结肠癌组织与癌旁组织中的表达

实验以 GAPDH 为内参,通过 RT-qPCR 实验发现 SERPINE1 的表达与数据库平台分析结果一致,SERPINE1 在结肠癌组织中的表达高于癌旁组织,应用配对样本 t 检验分析 5 组数据中结肠癌组织与癌旁组织的表达差异具有统计学意义($P<0.01$,图 2A、B);Western blot 实验同样发现结肠癌组织中 SERPINE1 蛋白的表达高于癌旁组织,灰度值定量分析差异具有统计学意义($P<0.05$,图 2C、D)。

2.3 SERPINE1 过表达和干扰表达效率的验证

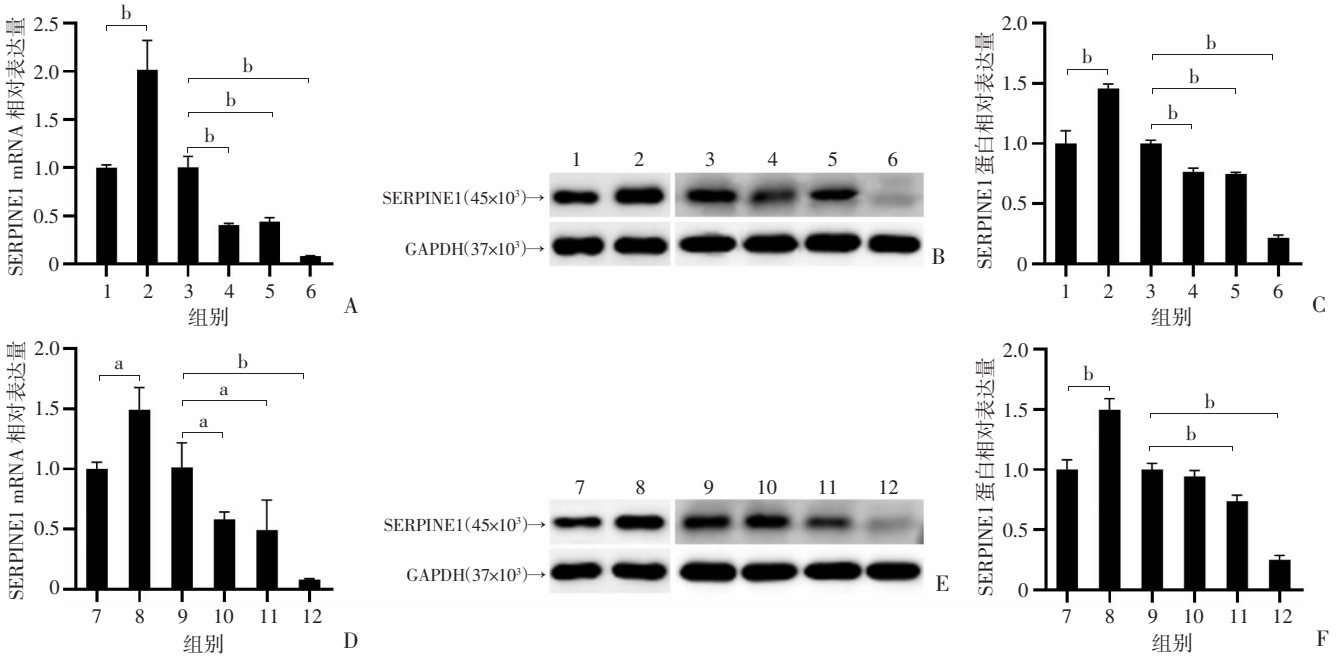
为评估 SERPINE1 基因过表达和干扰表达的慢病毒载体转染结肠癌细胞(RKO 和 LoVo 细胞株)的效果,采用 RT-qPCR 和 Western blot 双重验证目的基因 SERPINE1 的表达情况,以 GAPDH 为内参,对数据进行均一化处理。RT-qPCR 结果表明,与对照组(oe-RKO-NC、oe-LoVo-NC)相比,过表达组(oe-RKO、oe-LoVo)SERPINE1 的表达升高;与对照组(sh-RKO-NC、sh-LoVo-NC)相比,干扰表达组(sh-RKO-352、sh-RKO-603、sh-RKO-822,sh-LoVo-352、sh-LoVo-603、sh-LoVo-822)SERPINE1 的表达降低,差异均有统计学意义($P<0.05$,图 3A、D)。Western blot 结果显示,与对照组相比,过表达组 SERPINE1 蛋白的表达增多;与对照组相比,干扰表达组的 SERPINE1 表达减少(图 3B、E);统计学分析显示,除 sh-LoVo-352 组外,其余各组差异均有统计学意义($P<0.05$,图 3C、F)。结果表明转染 sh-LV3-SERPINE1(822)慢病毒载体 SERPINE1 的表达最低,选择其作为干扰表达组进行后续功能实验。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:RT-qPCR 检测 SERPINE1 在结肠癌和癌旁组织中的表达差异;B:RT-qPCR 检测 5 对组织样本中 SERPINE1 的表达;C:Western blot 检测 SERPINE1 蛋白在结肠癌和癌旁组织中表达;D:定量分析结肠癌与癌旁组织中 SERPINE1 蛋白表达差异

图 2 SERPINE1 在结肠癌及癌旁组织中的表达



1:oe-RKO-NC;2:oe-RKO;3:sh-RKO-NC;4:sh-RKO-352;5:sh-RKO-603;6:sh-RKO-822;7:oe-LoVo-NC;8:oe-LoVo;9:sh-LoVo-NC;10:sh-LoVo-352;11:sh-LoVo-603;12:sh-LoVo-822;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:RT-qPCR 检测转染不同慢病毒载体后 SERPINE1 在 RKO 细胞中的表达;B:Western blot 检测转染不同慢病毒载体后 SERPINE1 蛋白在 RKO 细胞中的表达;C:各组 RKO 细胞 SERPINE1 蛋白相对表达的定量分析;D:RT-qPCR 检测转染不同慢病毒载体后 SERPINE1 在 LoVo 细胞中的表达;E:Western blot 检测转染不同慢病毒载体后 SERPINE1 蛋白在 LoVo 细胞中的表达;F:各组 LoVo 细胞 SERPINE1 蛋白相对表达的定量分析

图 3 转染不同 SERPINE1 慢病毒载体后 SERPINE1 的表达

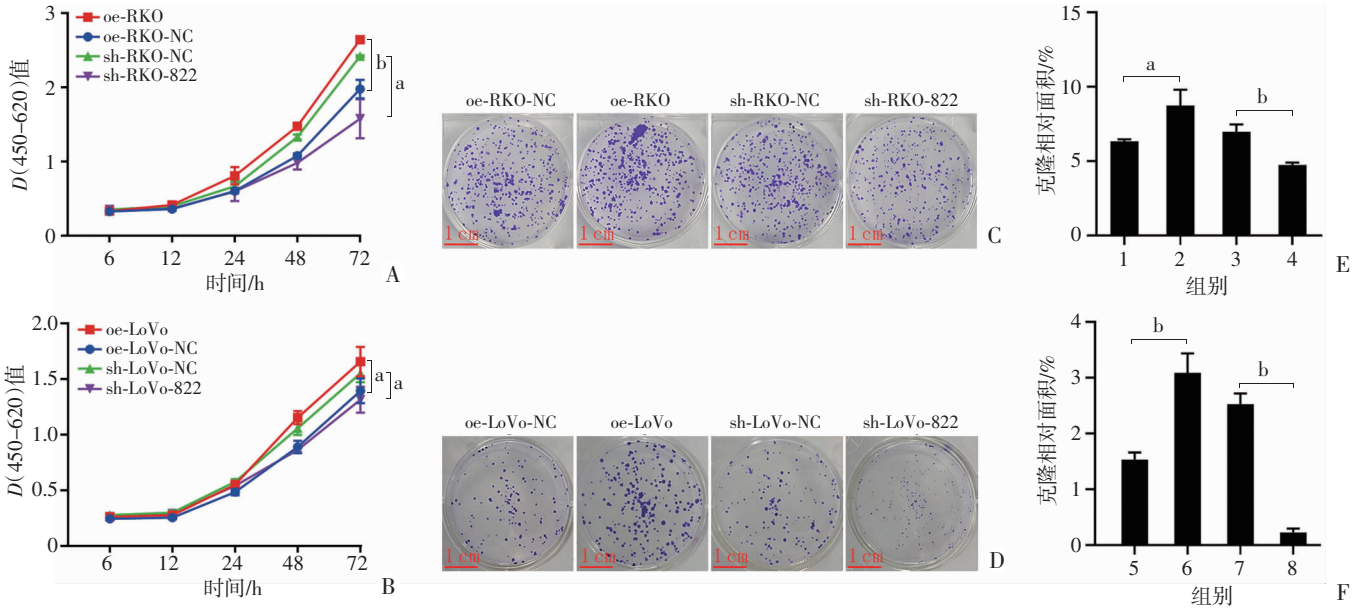
2.4 SERPINE1 对结肠癌细胞增殖的影响

2.4.1 CCK-8 实验评估 SERPINE1 对结肠癌细胞增殖的影响 采用 450 nm 处 OD 值减去 620 nm 处参比波长的 OD 值,评估 SERPINE1 过表达和干扰表达后对细胞增殖的影响。结果表明在 RKO 和 LoVo 细胞株中转染过表达 oe-LV8N-SERPINE1 慢病毒载体,转染 12 h 后,oe-RKO 组和 oe-LoVo 组细胞的 OD 值高于 oe-RKO-NC 组和 oe-LoVo-NC 组,转染 48 h 后,二者差异具有统计学意义(RKO 细胞:$P<0.01$;LoVo 细胞:$P<0.05$,图 4A、B)。同时在 RKO 和 LoVo 细胞株中转染干扰表达 sh-LV3-SERPINE1(822)慢病毒载体,转染 24 h 后,sh-RKO-822 组和 sh-LoVo-822 组细胞的 OD 值低于 sh-RKO-NC 组和 sh-LoVo-NC 组,转染 48 h 后,二者差异具有统计学意义($P<0.05$,图 4A、B)。

2.4.2 克隆形成实验评估 SERPINE1 对结肠癌细胞增殖的影响 通过克隆形成实验并对集落形成面积进行量化,评估 SERPINE1 过表达和干扰表达后对细胞增殖的影响。结果表明在 RKO 和 LoVo 细胞株中转染过表达 oe-LV8N-SERPINE1 慢病毒载体后,oe-RKO 组和 oe-LoVo 组细胞的集落形成面积大于 oe-RKO-NC 组和 oe-LoVo-NC 组(图 4C、D);同时在 RKO 和 LoVo 细胞株中转染干扰表达 sh-LV3-SERPINE1(822)慢病毒载体后,sh-RKO-822 组和 sh-LoVo-822 组细胞的集落形成面积小于 sh-RKO-NC 组和 sh-LoVo-NC 组(图 4C、D);在 RKO 细胞株和 LoVo 细胞株中 SERPINE1 过表达组和干扰表达组细胞克隆形成面积与其对应的对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$,图 4E、F)。

2.5 Transwell 实验评估 SERPINE1 对结肠癌细胞迁移能力的影响

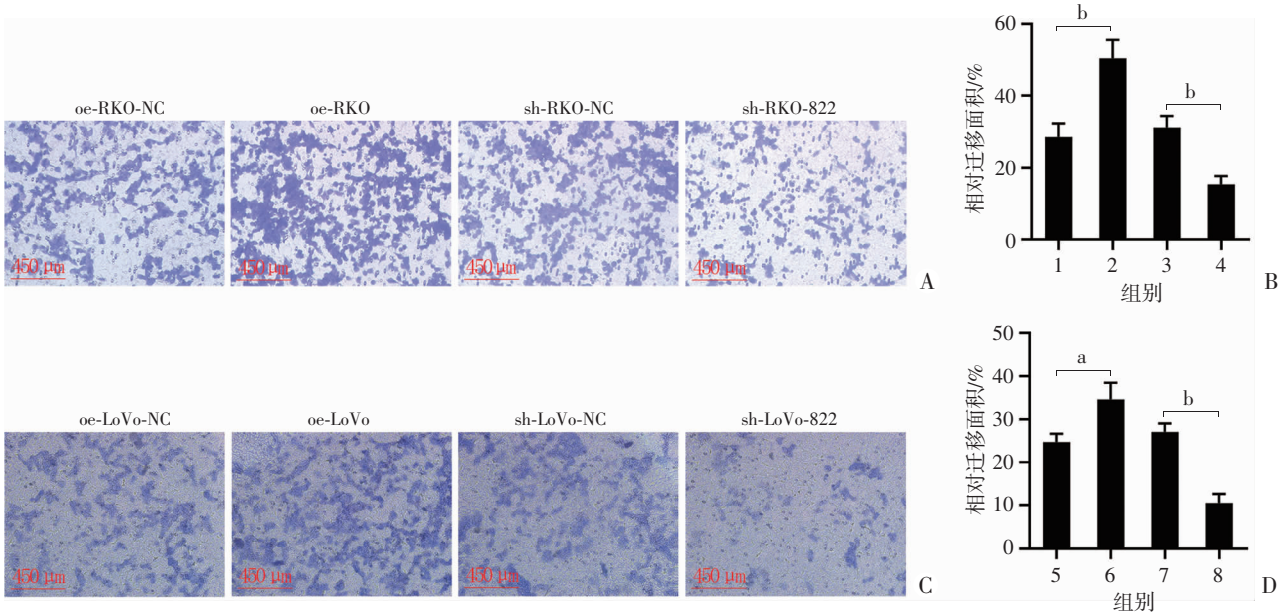
通过 Transwell 实验检测细胞的迁移能力并量化各组细胞的相对迁移面积,评估 SERPINE1 过表达和干扰表达后对细胞迁移能力的影响。结果表明在 RKO 和 LoVo 细胞株中转染过表达 oe-LV8N-SERPINE1 慢病毒载体后,oe-RKO 组和 oe-LoVo 组细胞的迁移能力高于 oe-RKO-NC 组和 oe-LoVo-NC 组;同时在 RKO 和 LoVo 细胞株中转染干扰 sh-LV3-SERPINE1(822)慢病毒载体后,sh-RKO-822 组和 sh-LoVo-822 组细胞的迁移能力低于 sh-RKO-NC 组和 sh-LoVo-NC 组(图 5A、C);在 RKO 细胞株和 LoVo 细胞株中 SERPINE1 过表达组和干扰表达组迁移面积与其对应的对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$,图 5B、D)。



1:oe-RKO-NC;2:oe-RKO;3:sh-RKO-NC;4:sh-RKO-822;5:oe-LoVo-NC;6:oe-LoVo;7:sh-LoVo-NC;8:sh-LoVo-822;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:SERPINE1 过表达及干扰表达后各组 RKO 细胞在不同时间点 OD 值的差异分析;B:SERPINE1 过表达及干扰表达后各组 LoVo 细胞在不同时间点 OD 值的差异分析;C:SERPINE1 过表达及干扰表达后各组 RKO 细胞克隆形成情况;D:SERPINE1 过表达及干扰表达后各组 LoVo 细胞克隆形成情况;E:各组 RKO 细胞克隆形成面积定量分析;F:各组 LoVo 细胞克隆形成面积定量分析

图 4 SERPINE1 过表达和干扰表达对细胞增殖能力的影响



1:oe-RKO-NC;2:oe-RKO;3:sh-RKO-NC;4:sh-RKO-822;5:oe-LoVo-NC;6:oe-LoVo;7:sh-LoVo-NC;8:sh-LoVo-822;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:SERPINE1 过表达及干扰表达后各组 RKO 细胞迁移情况;B:各组 RKO 细胞迁移面积定量分析;C:SERPINE1 过表达及干扰表达后各组 LoVo 细胞迁移情况;D:各组 LoVo 细胞迁移面积定量分析

图 5 SERPINE1 过表达和干扰表达对细胞迁移能力的影响

2.6 Transwell 侵袭实验评估 SERPINE1 对结肠癌细胞侵袭能力的影响

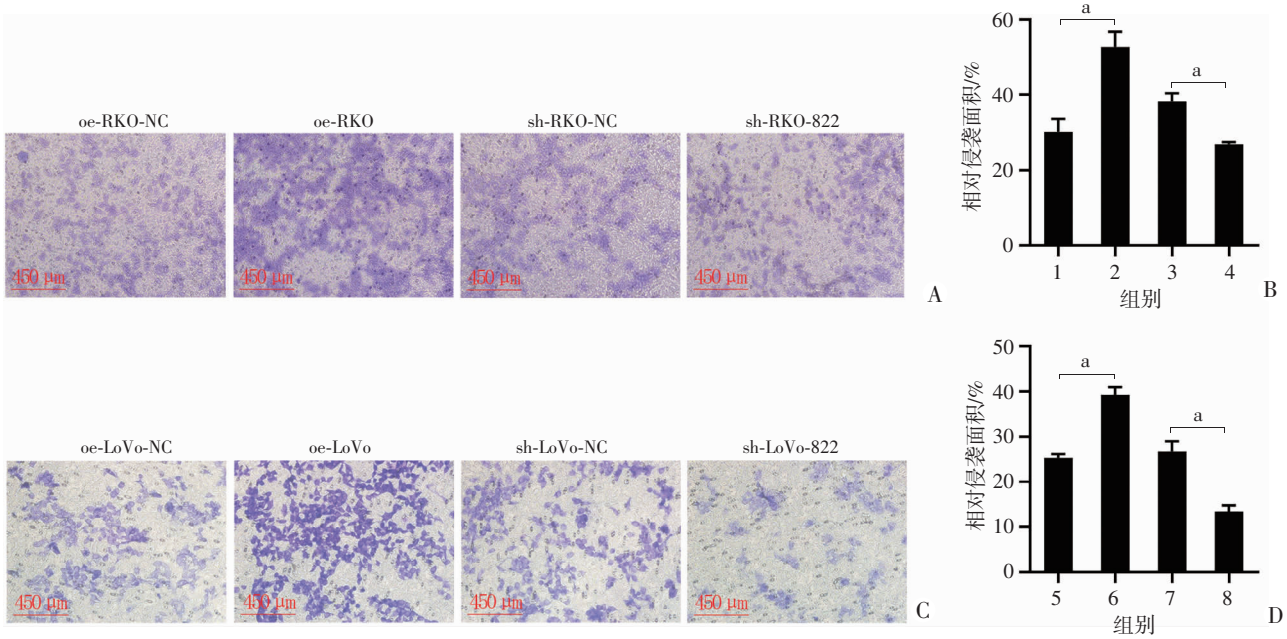
在 Transwell 上室底部包被 Matrigengel 基底膜基质,建立细胞侵袭模型。采用 Transwell 实验检测细胞的侵袭能力并量化各组细胞的相对侵袭面积,评估 SERPINE1 过表达和干扰表达后对细胞侵袭能力的影响。结果表明在 RKO 和 LoVo 细胞株中转染过表达 oe-LV8N-SERPINE1 慢病毒载体后,oe-RKO 和 oe-LoVo 组细胞的侵袭能力高于 oe-RKO-NC 组和 oe-LoVo-NC 组,同时在 RKO 和 LoVo 细胞株中转染干扰 sh-LV3-SERPINE1(822)慢病毒载体后,sh-RKO-822 组和 sh-LoVo-822 组细胞的侵袭能力低于 sh-RKO-NC 组和 sh-LoVo-NC 组(图 6A、C);在 RKO 细胞株和 LoVo 细胞株中 SERPINE1 过表达组和干扰表达组与其对应的对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.01$,图 6B、D)。

2.7 Hoechst 细胞核凋亡染色实验评估 SERPINE1 对结肠癌细胞凋亡的影响

通过 Hoechst 细胞核凋亡染色检测细胞凋亡并在高倍镜视野下量化各组细胞的凋亡数量,评估 SERPINE1 过表达和干扰后对细胞凋亡的影响。结果表明在 RKO 和 LoVo 细胞株中转染过表达 oe-LV8N-SERPINE1 慢病毒载体后,oe-RKO 组和 oe-LoVo 组细胞的凋亡数量少于 sh-RKO-NC 组和 sh-LoVo-NC 组,同时在 RKO 和 LoVo 细胞株中转染干扰表达 sh-LV3-SERPINE1(822)慢病毒载体后,sh-RKO-822 组和 sh-LoVo-822 组细胞的凋亡数量多于 sh-RKO-NC 组和 sh-LoVo-NC 组(图 7A、C);通过计数高倍镜视野下每组细胞的凋亡数量,进行统计学分析,与各自的对照组相比差异均有统计学意义($P<0.01$,图 7B、D)。

2.8 探索 SERPINE1 对 PI3K/AKT 信号通路的影响

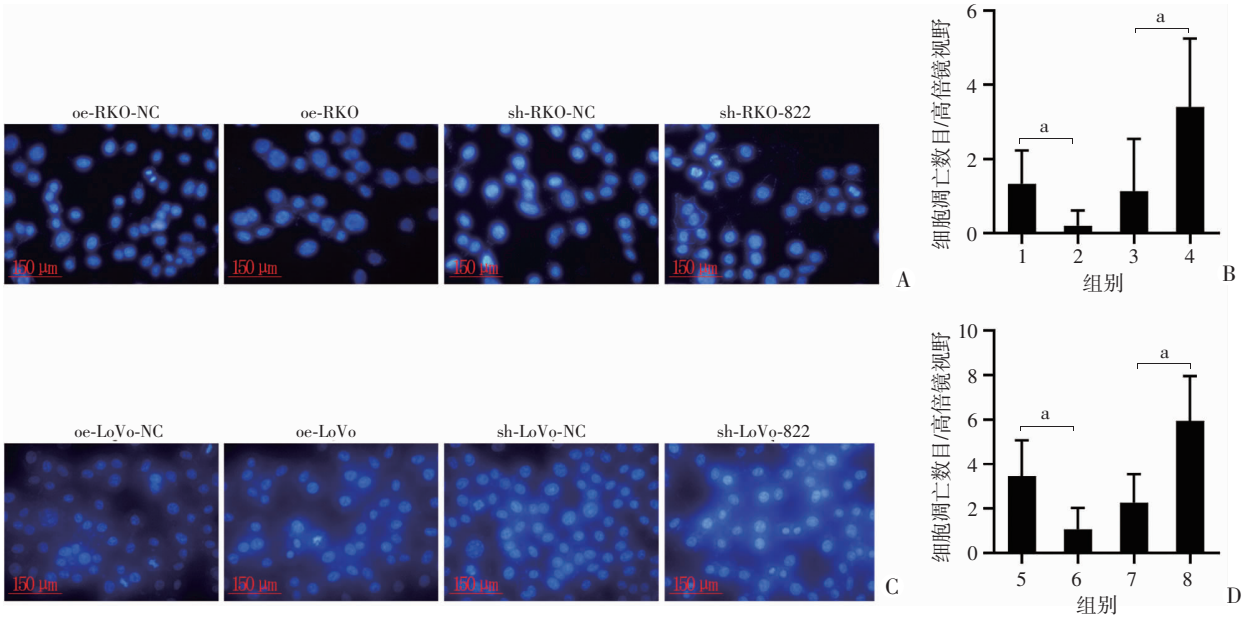
通过 Western blot 实验评估 SERPINE1 对 PI3K/AKT 信号通路的影响。结果显示,在结肠癌 RKO 和 LoVo 细胞株中进行 SERPINE1 过表达后,细胞 PI3K 和 AKT 的表达无明显变化,而 p-PI3K 和 p-AKT 的表达增强;在进行 SERPINE1 干扰表达后,细胞 PI3K 和 AKT 表达也无明显变化,而 p-PI3K 和 p-AKT 的表达减弱(图 8A);统计学分析显示,p-PI3K/PI3K 和 p-AKT/AKT 比值差异均有统计学意义($P<0.05$,图 8B、C)。由此推测,在结肠癌细胞中 SERPINE1 过表达和干扰表达可能通过 PI3K/AKT 信号通路影响细胞的增殖、迁移与侵袭和凋亡。



1:oe-RKO-NC;2:oe-RKO;3:sh-RKO-NC;4:sh-RKO-822;5:oe-LoVo-NC;6:oe-LoVo;7:sh-LoVo-NC;8:sh-LoVo-822;a:$P<0.01$

A:SERPINE1 过表达及干扰表达后各组 RKO 细胞侵袭情况;B:各组 RKO 细胞侵袭面积定量分析;C:SERPINE1 过表达及干扰表达后各组 LoVo 细胞侵袭情况;D:各组 LoVo 细胞侵袭面积定量分析

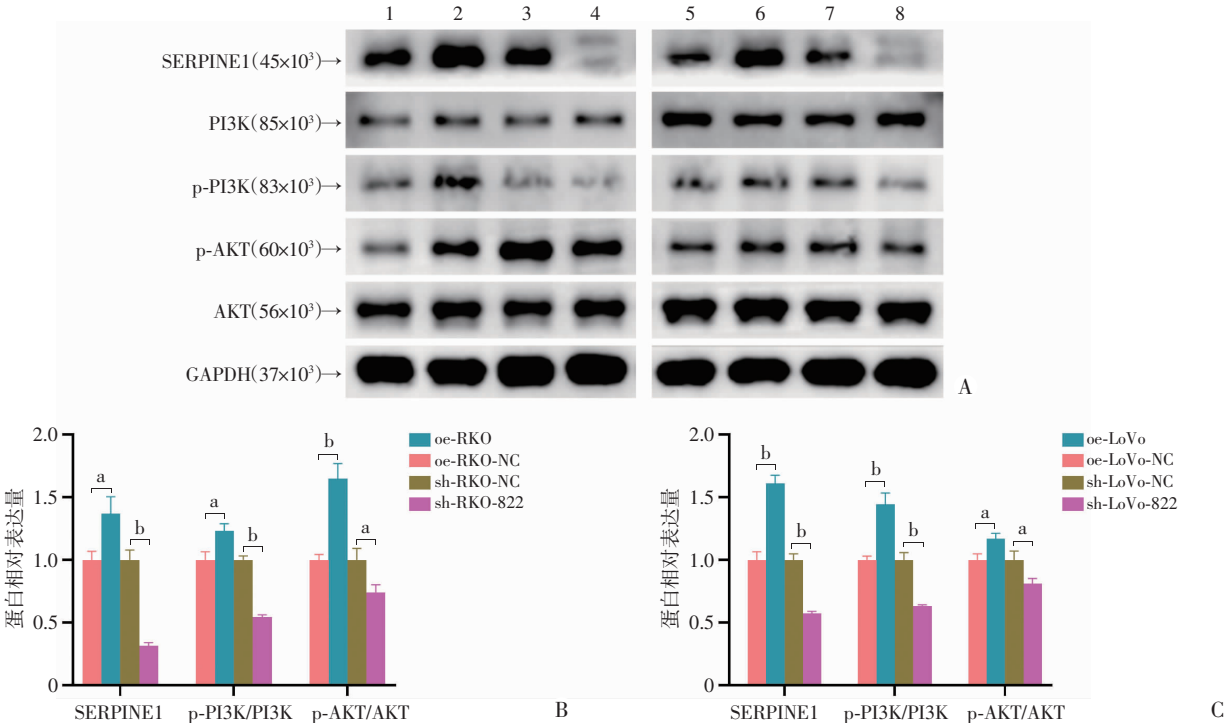
图 6 SERPINE1 过表达和干扰表达对细胞侵袭能力的影响



1:oe-RKO-NC;2:oe-RKO;3:sh-RKO-NC;4:sh-RKO-822;5:oe-LoVo-NC;6:oe-LoVo;7:sh-LoVo-NC;8:sh-LoVo-822;a:$P<0.01$

A:SERPINE1 过表达及干扰表达后各组 RKO 细胞凋亡情况;B:各组 RKO 细胞凋亡定量分析;C:SERPINE1 过表达及干扰表达后各组 LoVo 细胞凋亡情况;D:各组 LoVo 细胞凋亡定量分析

图 7 SERPINE1 过表达和干扰对结肠癌细胞凋亡的影响



1:oe-RKO-NC;2:oe-RKO;3:sh-RKO-NC;4:sh-RKO-822;5:oe-LoVo-NC;6:oe-LoVo;7:sh-LoVo-NC;8:sh-LoVo-822;a:$P<0.05$;b:$P<0.01$

A:Western blot 检测 SERPINE1 过表达和干扰表达后各组 RKO 和 LoVo 细胞的 SERPINE1、PI3K、p-PI3K、p-AKT、AKT 及 GAPDH 表达;B:SERPINE1 过表达和干扰表达后定量分析各组 RKO 细胞中 SERPINE1、p-PI3K/PI3K 及 p-AKT/AKT 的差异;C:SERPINE1 过表达和干扰表达后定量分析各组 LoVo 细胞中 SERPINE1、p-PI3K/PI3K 及 p-AKT/AKT 的差异

图 8 SERPINE1 对 PI3K/AKT 信号通路的影响

3 讨论

虽然早期结肠癌5年生存率达90%以上,但由于缺乏特异性诊断的分子标志物,同时临床上又多无异常表现,结肠癌很难被早期发现[16]。有研究报道诊断为转移性结肠癌患者的5年生存率不足20%[17-18],更为严峻的是近年来早发型结肠癌(发病年龄小于50岁患者)发病率逐年上升,在高收入国家的人群中表现更为明显[19-20]。随着分子生物学的日趋成熟,为结肠癌的诊治带来新生力量。因此,迫切需要探寻与结肠癌诊断、治疗及预后判断相关的靶分子。

SERPINE1在过去被认为与出血和凝血机制相关。然而,近几年研究发现其在多种癌症中异常表达,通过影响肿瘤细胞的侵袭和迁移[10]、肿瘤组织的血管生成[11]、上皮间质细胞转化(epithelial mesenchymal transition,EMT)[21]、肿瘤微环境[22]、炎症反应[23]及放射抗性[24]等来发挥其生物学功能。LI等[25]发现上调SERPINE1可以驱动口腔鳞状细胞EMT或部分EMT,促进淋巴管生成,加速癌细胞淋巴转移;MAO等[26]研究却得出相反的结论,上调SERPINE1的表达后可减少前列腺癌细胞的转移;TENG等[27]发现诱导SERPINE1翻译后可激活血管内皮生长因子-2(vascular endothelial growth factor-2,VEGF-2)信号通路,促进胃癌的进展和血管生成;ZHANG等[28]发现沉默SERPINE1的表达后导致血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factorA,VEGFA)表达下调,显著减弱了三阴性乳腺癌的体内生长。有趣的是CHAVES-MOREIRA等[29]在一项卵巢癌研究中发现SERPINE1表达受抑制后可以促进一种具有抗血管生成的蛋白酶抑制剂表达,调节肿瘤组织的新生血管;此外,有研究发现下调MiR-181c-5p通过靶向SERPINE1促进喉鳞状细胞癌的上皮间质转化,从而影响喉鳞状细胞癌的迁移与侵袭[30]。综上所述,SERPINE1的生物学功能具有多样性,推测其可能在不同的组织类型中发挥着抑癌/促癌的双重功能。

近年来有多项生物信息学研究发现SERPINE1在结肠癌中异常表达,且与预后相关[13-15, 31],与本研究结果一致,且本研究进一步通过生信分析发现其表达与临床分期正相关。HU等[32]研究证实SERPINE1在结肠癌组织中的表达量高于相应的非癌组织,当SERPINE1表达降低时,细胞的EMT过程受到抑制,其侵袭和增殖能力明显降低,凋亡水平升高;KIM等[33]发现抗血小板治疗增加分泌型SERPINE1表达,诱导MMP1表达,增加结肠癌转移。本研究进一步应用Western blot技术分析发现SERPINE1高表达可能通过激活PI3K/AKT信号通路发挥促癌功能,与ZHANG等[34]发现SERPINE1促进三阴性乳腺癌细胞转移的作用机制一致。

总之,本研究通过收集临床标本应用RT-qPCR和Western blot验证生物信息学分析结果——SERPINE1在结肠癌中高表达。接着,通过构建SERPINE1过表达和干扰表达的慢病毒载体,转染细胞后筛选稳转株进行增殖、迁移与侵袭和凋亡的表型功能研究,评估其在结肠癌进展中发挥的生物学功能。最后通过Western blot实验发现SERPINE1过表达可能通过激活PI3K/AKT信号通路促进结肠癌的进展。

致谢 感谢甘肃省干细胞与基因药物重点实验室赠送结肠癌细胞株,并提供科研场所及器材

参考文献:

[1] BRAY F, LAVERSANNE M, WEIDERPASS E, *et al*. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide[J]. Cancer, 2021, 127(16): 3029-3030. DOI: 10.1002/cncr.33587.

[2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al*. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.

[3] ZHENG R S, ZHANG S W, ZENG H M, *et al*. Cancer incidence and mortality in China, 2016[J]. J Natl Cancer Cent, 2022, 2(1): 1-9. DOI: 10.1016/j.jncc.2022.02.002.

[4] KUIPERS E J, GRADY W M, LIEBERMAN D, *et al*. Colorectal cancer[J]. Nat Rev Dis Primers, 2015, 1: 15065. DOI: 10.1038/nrdp.2015.65.

[5] ZHANG F, ZHANG Y Y, ZHAO W W, *et al*. Metabolomics for biomarker discovery in the diagnosis, prognosis, survival and recurrence of colorectal cancer: a systematic review[J]. Oncotarget, 2017, 8(21): 35460-35472. DOI: 10.18632/oncotarget.16727.

[6] 郭天安, 谢丽, 赵江, 等. 中国结直肠癌1988-2009年发病率和死亡率趋势分析[J]. 中华胃肠外科杂志, 2018,21(1): 33-40. DOI:10.3706/cma.j.issn.1671-0274.2018.01.007.

GUO T A, XIE L, ZHAO J, *et al*. Trend analysis of

morbidity and mortality of colorectal cancer in China from 1988 to 2009[J]. Chin J Gastrointest Surg, 2018,21(1): 33-40. DOI: 10.3706/cma.j.issn.1671-0274.2018.01.007.

[7] MORROW G B, MUTCH N J. Past, present, and future perspectives of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1)[J]. Semin Thromb Hemost, 2023, 49(3): 305-313. DOI: 10.1055/s-0042-1758791.

[8] 陈德合, 郭刚, 王杰, 等. SERPINE1在肿瘤中功能及应用的研究进展[J]. 联勤军事医学, 2023,37(9): 813-816, 封3. DOI: 10.13730/j.issn.2097-2148.2023.09.019.
CHEN D H, GUO G, WANG J, *et al*. Research progress on the function and application of SERPINE1 in tumors[J]. Mil Med Jnt Log, 2023,37(9): 813-816, Cover 3. DOI: 10.13730/j.issn.2097-2148.2023.09.019.

[9] WANG B F, GU B H, ZHANG T, *et al*. Good or bad: paradox of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in digestive system tumors[J]. Cancer Lett, 2023, 559: 216117. DOI: 10.1016/j.canlet.2023.216117.

[10] WANG D, YANG L Y, LIU Z, *et al*. PAI-1 overexpression promotes invasion and migration of esophageal squamous carcinoma cells[J]. Hereditas, 2020, 42(3): 287-295. DOI: 10.16288/j.yczz.19-334.

[11] OHUCHI K, AMAGAI R, IKAWA T, *et al*. Plasminogen activating inhibitor-1 promotes angiogenesis in cutaneous angiosarcomas[J]. Exp Dermatol, 2023, 32(1): 50-59. DOI: 10.1111/exd.14681.

[12] LI Y Q, SHEN L, TAO K L, *et al*. Key roles of p53 signaling pathway-related factors GADD45B and SERPINE1 in the occurrence and development of gastric cancer[J]. Mediators Inflamm, 2023, 2023: 6368893. DOI: 10.1155/2023/6368893.

[13] WANG W J, LI H T, YU J P, *et al*. A competing endogenous RNA network reveals novel potential lncRNA, miRNA, and mRNA biomarkers in the prognosis of human colon adenocarcinoma[J]. J Surg Res, 2019, 235: 22-33. DOI: 10.1016/j.jss.2018.09.053.

[14] LIU Y, LI C, DONG L J, *et al*. Identification and verification of three key genes associated with survival and prognosis of COAD patients *via* integrated bioinformatics analysis[J]. Biosci Rep, 2020, 40(9): BSR20200141. DOI: 10.1042/BSR20200141.

[15] WANG Y G, WANG J Y, GAO J C, *et al*. The expression of SERPINE1 in colon cancer and its regulatory network and prognostic value[J]. BMC Gastroenterol, 2023, 23(1): 33. DOI: 10.1186/s12876-022-02625-y.

[16] MIAO Z H, LIU S Y, XIAO X W, *et al*. LINC00342 regulates cell proliferation, apoptosis, migration and invasion in colon adenocarcinoma *via* miR-545-5p/MDM2 axis[J]. Gene, 2020, 743: 144604. DOI: 10.1016/j.gene.2020.144604.

[17] BILLER L H, SCHRAG D. Diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer: a review[J]. JAMA, 2021, 325(7): 669-685. DOI: 10.1001/jama.2021.0106.

[18] LI N, LU B, LUO C Y, *et al*. Incidence, mortality, survival, risk factor and screening of colorectal cancer: a comparison among China, Europe, and northern America[J]. Cancer Lett, 2021, 522: 255-268. DOI: 10.1016/j.canlet.2021.09.034.

[19] PATEL S G, KARLITZ J J, YEN T, *et al*. The rising tide of early-onset colorectal cancer: a comprehensive review of epidemiology, clinical features, biology, risk factors, prevention, and early detection[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2022, 7(3): 262-274. DOI: 10.1016/S2468-1253(21)00426-X.

[20] SINICROPE F A. Increasing incidence of early-onset colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2022, 386(16): 1547-1558. DOI: 10.1056/nejmra2200869.

[21] XUE W, SUN C Y, YUAN H, *et al*. Establishment and analysis of an individualized EMT-related gene signature for the prognosis of breast cancer in female patients[J]. Dis Markers, 2022, 2022: 1289445. DOI: 10.1155/2022/1289445.

[22] WU P, ZHANG Z H, YUAN Y L, *et al*. A tumor immune microenvironment-related integrated signature can predict the pathological response and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma following neoadjuvant chemoradiotherapy: a multicenter study in China[J]. Int J Surg, 2022, 107: 106960. DOI: 10.1016/j.ijsu.2022.106960.

[23] WANG Y C, ZHANG L P, SHI G H, *et al*. Effects of inflammatory response genes on the immune microenvironment in colorectal cancer[J]. Front Genet, 2022, 13: 886949. DOI: 10.3389/fgene.2022.886949.

[24] SU Y H, WU Y Z, ANN D K, *et al*. Obesity promotes radioresistance through SERPINE1-mediated aggressiveness and DNA repair of triple-negative breast cancer[J]. Cell Death Dis, 2023, 14(1): 53. DOI: 10.1038/s41419-023-05576-8.

[25] LI X, WANG C X, ZHANG H, *et al*. circFNDC3B accelerates vasculature formation and metastasis in oral squamous cell carcinoma[J]. Cancer Res, 2023, 83(9):

1459-1475. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-22-2585.

[26] MAO Y S, LI W F, HUA B, *et al*. Silencing of ELK3 induces S-M phase arrest and apoptosis and upregulates SERPINE1 expression reducing migration in prostate cancer cells[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 2406159. DOI: 10.1155/2020/2406159.

[27] TENG F, ZHANG J X, CHEN Y, *et al*. LncRNA NKX2-1-AS1 promotes tumor progression and angiogenesis *via* upregulation of SERPINE1 expression and activation of the VEGFR-2 signaling pathway in gastric cancer[J]. Mol Oncol, 2021, 15(4): 1234-1255. DOI: 10.1002/1878-0261.12911.

[28] ZHANG Q, LEI L, JING D. Knockdown of SERPINE1 reverses resistance of triple-negative breast cancer to paclitaxel *via* suppression of VEGFA[J]. Oncol Rep, 2020, 44(5): 1875-1884. DOI: 10.3892/or.2020.7770.

[29] CHAVES-MOREIRA D, MITCHELL M A, ARRUZA C, *et al*. The transcription factor PAX8 promotes angiogenesis in ovarian cancer through interaction with SOX17[J]. Sci Signal, 2022, 15(728): eabm2496. DOI: 10.1126/scisignal.abm2496.

[30] LI X, WU P, TANG Y Y, *et al*. Down-regulation of *MiR-181c-5p* promotes epithelial-to-mesenchymal transition in laryngeal squamous cell carcinoma *via* targeting *SERPINE1*[J]. Front Oncol, 2020, 10: 544476. DOI: 10.3389/fonc.2020.544476.

[31] ZENG C Y, CHEN Y X. HTR1D, TIMP1, SERPINE1, MMP3 and CNR2 affect the survival of patients with colon adenocarcinoma[J]. Oncol Lett, 2019, 18(3): 2448-2454. DOI: 10.3892/ol.2019.10545.

[32] HU B W, CHEN Z W, WANG X G, *et al*. MicroRNA-148a-3p directly targets SERPINE1 to suppress EMT-mediated colon adenocarcinoma progression[J]. Cancer Manag Res, 2021, 13: 6349-6362. DOI: 10.2147/CMAR.S302777.

[33] KIM W T, MUN J Y, BAEK S W, *et al*. Secretory SERPINE1 expression is increased by antiplatelet therapy, inducing MMP1 expression and increasing colon cancer metastasis[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17): 9596. DOI: 10.3390/ijms23179596.

[34] ZHANG W W, YANG S F, CHEN D T, *et al*. SOX2-OT induced by PAI-1 promotes triple-negative breast cancer cells metastasis by sponging miR-942-5p and activating PI3K/Akt signaling[J]. Cell Mol Life Sci, 2022, 79(1): 59. DOI: 10.1007/s00018-021-04120-1.

(收稿:2023-11-16;修回:2023-12-23)

(编辑 汪勤俭)