

- [16] 来建飞, 丁蕾, 窦晓兵. miRNA在结直肠癌中的作用研究进展[J]. 浙江临床医学, 2017, 19(2):374-376.
- [17] WANG G, LI Z, TIAN N, et al. miR-148b-3p inhibits malignant biological behaviors of human glioma cells induced by high HOTAIR expression[J]. Oncol Lett, 2016, 12(2):879-886.
- [18] LI X, JIANG M, CHEN D, et al. miR-148b-3p inhibits gastric cancer metastasis by inhibiting the Dock6/Rac1/Cdc42 axis[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1):71.
- [19] ZHANG H, YE Q, DU Z, et al. MiR-148b-3p inhibits renal carcinoma cell growth and pro-angiogenic phenotype of endothelial cell potentially by modulating FGF2[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 107:359-367.
- [20] WANG Y, LI J, KUANG D, et al. miR-148b-3p functions as a tumor suppressor in GISTs by directly targeting KIT[J]. Cell Commun Signal, 2018, 16(1):16.

(收稿日期:2019-08-08, 修回日期:2019-08-22)

引用本文:谭定春,秦惠何. 2型人类表皮生长因子受体基因对结直肠癌自然杀伤细胞92局部浸润的影响及机制[J]. 安徽医药, 2021, 25(10):2098-2101. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2021.10.044.

◇ 临床医学 ◇



2型人类表皮生长因子受体基因对结直肠癌自然杀伤细胞92局部浸润的影响及机制

谭定春, 秦惠何

作者单位:深圳市龙华区人民医院全科医学, 广东 深圳 518110

摘要: 目的 探讨抑制2型人类表皮生长因子受体(HER2)基因表达对结直肠癌自然杀伤细胞92(NK92)细胞局部浸润的影响及机制。方法 本研究起止时间为2018年5—11月。结直肠癌细胞(SW480、SW620和HT29)细胞及人正常肠上皮细胞(NCM460)购自美国模式培养物保藏所。Western blotting检测上述细胞中HER2的蛋白表达。Western blotting及ELISA检测HER2的特异性小干扰RNA(si-HER2)转染HT29细胞效率。Transwell小室检测重组HER2及肿瘤培养上清对NK92细胞迁移指数的影响。Transwell小室检测及Western blotting检测si-HER2对NK92细胞迁移指数及 β -catenin表达影响。结果 3株结直肠癌细胞HER2表达均明显高于在NCM460细胞表达[(0.104±0.011)、(0.141±0.015)、(0.243±0.018)比(0.018±0.003)]。对照组HER2蛋白及HER2含量均明显高于si-HER2组[(0.467±0.046)比(0.101±0.012), (125.3±10.1)pg/mL比(74.7±4.6)pg/mL]。重组HER2均能抑制NK92的迁移,促进 β -catenin蛋白表达,而转染si-HER2可提高NK92迁移,且抑制 β -catenin蛋白表达。结论 抑制HER2基因表达可增强结直肠癌NK92细胞局部浸润,机制与下调Wnt/ β -catenin信号有关。

关键词: 结直肠肿瘤; 基因, erbB-2; 受体, 自然杀伤细胞; Wnt信号通路; 趋化运动; NK细胞; β 连环素

Effect and mechanism of HER2 gene on local infiltration and Wnt/ β -catenin signal of NK cells in colorectal cancer

TAN Dingchun, QIN Huihe

Author Affiliation: General Medicine, Shenzhen Longhua District People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518110, China

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of inhibiting the expression of human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2) gene on the infiltration of Natural killer cell 92 (NK92) cells in colorectal cancer. **Methods** The start and end time of this study was from May 2018 to November 2018. Colorectal cancer cells (SW480, SW620 and HT29) and human normal intestinal epithelial cells (NCM460) were purchased from American Type Culture Collection. The expression of HER2 protein was detected by Western blotting. Western blotting and ELISA were used to detect the transfection efficiency of HER2-specific small interfering RNA (si-HER2) into HT29 cells. The effect of recombinant HER2 and tumor culture supernatant on NK92 cell migration index was detected by Transwell cell assay. Transwell chamber test and Western blotting test were used to detect the effect of si-HER2 on migration index and β -catenin expression of NK92 cells. **Results** The expression of HER2 in 3 colorectal cancer cells was significantly higher than that in NCM460 cells [(0.018±0.003) vs. (0.104±0.011), (0.141±0.015), (0.243±0.018)]. The expression of HER2 [(0.467±0.046) vs. (0.101±0.012)] and HER2 content [(125.3±10.1) pg/mL vs. (74.7±4.6) pg/mL] in si-HER2 group were significantly lower than those in control group. Recombinant HER2 could inhibit the migration of NK92 [(1.00±0.10) vs. (0.63±0.09)], and promote β -catenin protein expression. However, transfection of si-HER2 could significantly enhance the migration of NK92 and inhibit the expression of β -catenin protein. **Conclusion** Inhibition of HER2 gene expression can enhance the local invasion of colorectal cancer NK92 cells, and the mecha-

nism is related to down-regulation of Wnt/ β -catenin signal.

Key words: Colorectal neoplasms; Genes, erbB-2; Receptors, natural killer cell; Wnt signaling pathway; Chemotactic movement; NK cell; Beta catenin

结直肠癌是常见的恶性肿瘤之一,近些年的发病率和死亡率均呈现上升趋势,严重威胁人类的生命健康^[1]。肿瘤的发生发展受肿瘤微环境中多种因素的调控,这些因素包括细胞内源性因子和外源性因素,如局部浸润的免疫细胞、肿瘤细胞分泌的促炎因子等。淋巴细胞是肿瘤微环境的重要组成部分,影响肿瘤的进展和预后,自然杀伤细胞(NK)是固有免疫细胞之一。结肠癌肿瘤组织中NK细胞数明显低于临近的正常组织^[2],这说明肿瘤微环境中的调控因子不足以将NK细胞募集到肿瘤组织。2型人类表皮生长因子受体(HER2)是人类癌基因之一,在成人组织中几乎不表达,而在多种肿瘤中呈现高表达。有研究显示,结直肠癌中HER2表达升高,RNA干扰HER2表达可抑制癌细胞增殖^[3];NK-92细胞联合靶向HER2基因的siRNA可抑制卵巢癌细胞在体内及体外增殖^[4],提示HER2可能在NK细胞的局部浸润中发挥调控作用。NK92细胞与NK细胞具有相似的表面分子特征和功能特点,是一种理想的肿瘤生物治疗的细胞系^[5]。王洋^[6]研究显示,半乳糖凝集素-9(galectin-9)基因可通过影响NK92细胞F-肌动蛋白(F-actin)的极化,调节NK92细胞的趋化引动。目前,HER2对NK细胞局部浸润的影响还未知。鉴于此,本研究于2018年5—11月进行实验,旨在探讨HER2对结直肠癌NK细胞局部浸润的影响及作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器 杜尔伯格伊戈尔培养基(DMEM)、胎牛血清(FBS)均购自美国Gibco;HER2和 β -连环蛋白(β -catenin)抗体均购自美国CST;重组HER2购自美国R&D;二喹啉甲酸(BCA)试剂盒购自中国碧云天;凝胶成像系统购自美国伯乐。

1.2 细胞及培养 人正常结肠上皮细胞(NCM460),人结直肠癌细胞(SW480、SW620、HT29)及人类NK92细胞均购自美国ATCC。NCM460、SW480、SW620和HT29细胞使用含10% FBS的DMEM培养基,NK92细胞用 α 最小必需培养基(α -MEM)完全培养基(含2 mmol L-谷氨酰胺、1.5 g/L碳酸氢钠、12.5%FBS和马血清、0.02 mmol 叶酸、0.2 mmol 肌醇、100~200 U/mL重组IL-2和0.1 mmol 2-巯基乙醇),所有细胞均在5%体积分数二氧化碳、37℃恒温培养箱中培养。

1.3 Western blotting 预冷RIPA裂解液(加蛋白

酶抑制剂PMSF)提取生长至对数期的SW480、SW620和HT29细胞总蛋白,BCA试剂盒定量蛋白,蛋白变性后,每孔加40 μ g上样,依次经10%SDS-PAGE、转PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭,洗膜,将膜完全浸入按照1:500稀释的HER2及1:1 000稀释的内参GAPDH溶液中,4℃摇床孵育过夜,洗膜,加1:2 000稀释的HRP标记的二抗,室温孵育30~50 min,洗膜,ECL显色,显影、定影,待胶片晾干后扫描分析。使用Image J分析软件对图像进行灰度值分析。得出目的蛋白与内参蛋白光密度值比值,即为蛋白的相对表达量。实验重复3次。

1.4 转染 以 1×10^5 /孔接种生长至对数期的HT29细胞于6孔细胞培养板,每孔2 mL,使其在24 h内细胞达70%~80%生长汇合度,参照Lipofectamine™ 2000说明制备Lipo-2000-siRNA复合物,其中siRNA包括阴性对照siRNA及HER2的特异性siRNA,将复合物加入培养孔中,设置加等体积脂质体的空白组,轻轻混匀,37℃、5%二氧化碳、饱和湿度培养箱,常规孵育4~6 h,更换含血清及双抗的培养基,继续培养48 h,然后进行后续实验。siRNA序列如下:HER2 siRNA正向引物5'-CUGGUGUAUGCAGAUUGCCUU-3',反向引物5'-GGCAAUCUGCAUACAC-CAGUU-3';阴性对照siRNA正向引物5'-CUUGUAUGGGCAGAUUGCCUU-3',反向引物5'-GGCAAUCUGCCCAUACAAGUU-3'。

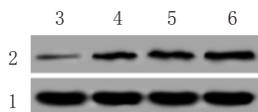
1.5 HT29细胞培养上清HER2的含量 HER2的特异性siRNA转染HT29细胞48 h,收集肿瘤细胞培养上清,采用ELISA试剂盒检测上清中HER2的含量。

1.6 趋化实验 将100 μ L的NK92细胞(浓度 2×10^6 /mL)置于Transwell小室上层,Transwell小室下层加25 ng/mL、50 ng/mL和100 ng/mL的rhHER2或600 μ L的HT29细胞培养上清,将培养板放于37℃孵箱中4 h,用于趋化实验。收集下室细胞使用细胞计数板计数。应用趋化指数(MI)评估:MI=趋化细胞数/自发趋化细胞数(无趋化因子)^[7]。此外,使用7.5 ng/mL的IL-12作为NK细胞趋化作用的阳性对照^[8]。

1.7 统计学方法 所有实验数据采用SPSS 21.0软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组差异比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用SNK-q检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三株结直肠癌细胞 HER2 基因表达 以正常结肠 NCM460 细胞为对照细胞, Western blotting 检测结直肠癌 SW480、SW620 和 HT29 细胞 HER2 蛋白表达, 结果如图 1 所示。

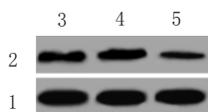


注: 1—磷酸甘油醛脱氢酶; 2—2型人类表皮生长因子受体; 3—人正常肠上皮细胞 NCM460; 4—结直肠癌细胞 SW480; 5—结直肠癌细胞 SW620; 6—结直肠癌细胞 HT29。

图1 SW480、SW620和HT29细胞HER2的蛋白表达

三株结直肠癌细胞 HER2 蛋白表达均明显高于 NCM460 细胞 [(0.104±0.011)、(0.141±0.015)、(0.243±0.018) 比 (0.018±0.003), $F=153.526$, $P<0.05$], 由于在 HT29 细胞表达最高, 因此选择 HT29 细胞为后续研究对象。

2.2 HER2 小干扰 RNA 转染 HT29 细胞效果 转染 si-HER2 的 HT29 细胞 HER2 蛋白表达 [(0.467±0.046)、(0.506±0.053) 比 (0.101±0.012), $F=88.628$, $P<0.05$] 及培养上清 HER2 含量 [(74.7±4.6) pg/mL 比 (125.3±10.1) pg/mL、(121.6±9.3) pg/mL, $F=34.153$, $P<0.05$] 均明显低于对照组和 NC 组。见图 2。



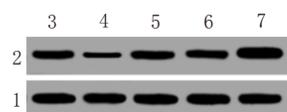
注: 1—磷酸甘油醛脱氢酶; 2—2型人类表皮生长因子受体; 3—对照组; 4—NC 组; 5—HER2 的小干扰 RNA 组。

图2 Western blotting 检测转染 si-HER2 的 HT29 细胞 HER2 蛋白表达

2.3 重组 HER2 对 NK92 细胞趋化运动的影响 25 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL 的重组 HER2 处理 NK92 细胞 4 h, IL-12 作为阳性对照, 细胞趋化检测结果显示, 与对照组比较, IL-12 组迁移指数明显升高 [(1.00±0.10) 比 (2.26±0.24), $P<0.05$], 而 100 ng/mL 重组 HER2 组迁移指数明显降低 [(1.00±0.10) 比 (0.63±0.09), $P<0.05$]。25 ng/mL 和 50 ng/mL 的重组 HER2 组迁移指数与对照组差异无统计学意义 [(1.00±0.10) 比 (1.11±0.12)、(1.04±0.15), $P>0.05$]。

2.4 抑制 HER2 表达对 NK92 细胞趋化运动的影响 si-HER2 转染 HT29 细胞后, 收集肿瘤上清对 NK92 细胞进行趋化实验, 结果显示, 与对照组、NC 组比较, si-HER2 组迁移指数明显升高 [(1.00±0.11), (1.37±0.10) 比 (1.95±0.16), $F=43.264$, $P<0.05$]。

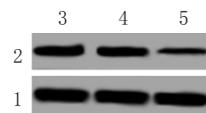
2.5 重组 HER2 对 NK92 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响 25 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL 的重组 HER2 处理 NK92 细胞 4 h, IL-12 作为阳性对照, Western blotting 检测 NK92 细胞中 β -catenin 蛋白表达, 结果如图 3 所示。与对照组比较, IL-12 组 β -catenin 蛋白水平明显降低 [(0.687±0.059) 比 (0.312±0.025), $P<0.05$], 而 100 ng/mL 重组 HER2 组 β -catenin 蛋白水平明显升高 [(0.687±0.059) 比 (1.118±0.097), $P<0.05$]。25 ng/mL 和 50 ng/mL 的重组 HER2 组 β -catenin 蛋白水平与对照组差异无统计学意义 [(0.687±0.059) 比 (0.692±0.061), (1.118±0.097), $P>0.05$]。



注: 1—磷酸甘油醛脱氢酶; 2— β -连环蛋白; 3—对照组; 4—白细胞介素-12; 5—25 ng/mL 重组 2 型人类表皮生长因子受体 (rh-HER2); 6—50 ng/mL rhHER2; 7—100 ng/mL rhHER2。

图3 各组 NK92 细胞 β -catenin 蛋白表达条带

2.6 抑制 HER2 对 NK92 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响 si-HER2 转染 HT29 细胞后, 收集肿瘤上清, Western blotting 检测 β -catenin 蛋白表达, 结果如图 4 所示, si-HER2 组 β -catenin 蛋白表达明显低于对照组和 NC 组 (0.687±0.059), (0.651±0.052) 比 (0.092±0.011), $F=158.849$, $P<0.05$]。



注: 1—磷酸甘油醛脱氢酶; 2— β -连环蛋白; 3—对照组; 4—NC 组; 5—HER2 的小干扰 RNA。

图4 HER2 对 NK92 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响

3 讨论

NK 细胞是固有免疫系统的主要细胞之一, 可识别和杀伤肿瘤细胞, 在肿瘤的免疫监视中起重要作用。研究显示, 结直肠癌肿瘤组织中淋巴细胞大量浸润的病人预后较好^[9], 原因与 NK 细胞对肿瘤细胞的识别和杀伤作用密不可分。NK92 细胞是一种 NK 细胞, 与人 NK 细胞具有相似的表面分子特征和功能特点, 对血液系统肿瘤、黑色素瘤等具有很强的杀伤活性, 且不引起自身正常细胞损伤, 是目前认为的一种理想的可用于肿瘤生物治疗的细胞系^[10-11]。

HER2 是一种由原癌基因表达的跨膜糖蛋白, 可促进肿瘤细胞增殖、侵袭和血管生成, 抑制肿瘤

细胞的凋亡^[12-14]。研究显示,HER2在结直肠癌组织中的表达水平明显高于正常组织,其表达水平与肿瘤浸润深度密切相关,可作为判断结直肠癌发生、发展、浸润及转移的有效生物学指标^[15]。本研究结果显示,结直肠癌细胞系中HER2蛋白表达明显高于正常结肠细胞,与相关研究结果一致^[16],提示HER2参与结直肠癌的发生和发展;研究显示,激活HER2-ERK1/2信号转导途径可促进乳腺癌MCF-7细胞的迁移和侵袭^[17];HER2靶向NK细胞可用于治疗HER2阳性转移性乳腺癌^[18]。本研究结果显示,重组HER2可降低NK92细胞的趋化运动,而抑制HER2表达后NK92细胞趋化运动明显升高,说明抑制HER2表达可增强结直肠癌NK92细胞趋化运动。

Wnt/ β -catenin是细胞内一条重要的信号途径,与多种肿瘤发生发展密切相关。研究表明,抑制Wnt/ β -catenin通路可降低肿瘤细胞生长、侵袭、迁移^[19]。 β -catenin是Wnt/ β -catenin信号的关键分子,研究显示,NK细胞对非小细胞肺癌细胞NCI-H292具有杀伤作用,并可抑制 β -catenin蛋白表达^[20]。本研究结果显示,HER2表达受到抑制后,NK92细胞中 β -catenin蛋白表达明显降低,而重组HER2则会促进NK92细胞中 β -catenin蛋白表达,提示抑制HER2表达可能通过下调Wnt/ β -catenin信号通路增强结直肠癌NK细胞的趋化运动,进而增加结直肠癌NK细胞局部浸润。

综上所述,抑制HER2基因表达可增强结直肠癌NK92细胞局部浸润,机制与下调Wnt/ β -catenin信号有关。提示HER2可能是结直肠癌治疗的有效靶点之一。

参考文献

- [1] ZHANG YH, FU J, ZHANG ZJ, et al. LncRNA-LINC00152 down-regulated by miR-376c-3p restricts viability and promotes apoptosis of colorectal cancer cells[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(12):5286-5297.
- [2] HALAMA N, BRAUN M, KAHLERT C, et al. Natural killer cells are scarce in colorectal carcinoma tissue despite high levels of chemokines and cytokines [J]. *Clinical Cancer Research*, 2011, 17(4):678-689.
- [3] 吴爱国, 纪术峰, 韩明阳, 等. RNA干扰HER2基因对人大肠癌HT29细胞株增殖影响的研究[J]. *肿瘤防治研究*, 2009, 36(5):380-383.
- [4] 程志祥, 朱园园, 周颖, 等. NK-92细胞联合靶向HER2基因的siRNA治疗卵巢癌的体外及动物实验[J]. *蚌埠医学院学报*, 2014, 39(8):1008-1011.
- [5] ARAI S, MEAGHER R, SWEARINGEN M, et al. Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial[J]. *Cytotherapy*, 2008, 10(6):625-632.
- [6] 王洋. Galectin-9在结直肠癌中的表达及对NK细胞局部浸润的影响及机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2016.
- [7] STARNES T, RASILA KK, ROBERTSON MJ, et al. The chemokine CXCL14 (BRAK) stimulates activated NK cell migration: implications for the downregulation of CXCL14 in malignancy. [J]. *Exp Hematol*, 2006, 34(8):1101-1105.
- [8] ALLAVENA P, PAGANIN C, ZHOU D, et al. Interleukin-12 is chemotactic for natural killer cells and stimulates their interaction with vascular endothelium[J]. *Blood*, 1994, 84(7):2261-2268.
- [9] 颜兵, 刘辉, 游俊浩, 等. T调节淋巴细胞在结直肠癌中的作用及对患者预后的研究进展[J]. *肿瘤预防与治疗*, 2018, 31(2):155-159.
- [10] OELSNER S, FRIEDE ME, ZHANG C, et al. Continuously expanding CAR NK-92 cells display selective cytotoxicity against B-cell leukemia and lymphoma [J]. *Cytotherapy*, 2016, 19(2):235-249.
- [11] ELEMAM NM, AL-JADERI Z, HACHIM MY, et al. HCT-116 colorectal cancer cells secrete chemokines which induce chemoattraction and intracellular calcium mobilization in NK92 cells[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, 68(6):883-895.
- [12] YEH ES, WILLIAMS CJ, WILLIAMS CB, et al. Dysregulated connexin 43 in HER2-positive drug resistant breast cancer cells enhances proliferation and migration [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(65):109358-109369.DOI: 10.18632/oncotarget.22678.
- [13] YAMASHITA N, SAITO N, ZHAO S, et al. Heregulin-induced cell migration is promoted by aryl hydrocarbon receptor in HER2-overexpressing breast cancer cells[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 366(1):34-40.
- [14] LI G, ZHENG J, XU B, et al. Simvastatin inhibits tumor angiogenesis in HER2-overexpressing human colorectal cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85(6):418-424.
- [15] 温达雄, 王军, 殷燕, 等. 结直肠癌组织中HER2表达水平与肿瘤的发生、发展及浸润转移的相关性研究[J]. *临床和实验医学杂志*, 2016, 15(3):227-229.
- [16] CHI F, WU R, JIN X, et al. HER2 induces cell proliferation and invasion of non-small-cell lung cancer by upregulating COX-2 expression via MEK/ERK signaling pathway [J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9:2709-2716.
- [17] KHAN S, SHUKLA S, SINHA S, et al. Centchroman suppresses breast cancer metastasis by reversing epithelial-mesenchymal transition via downregulation of HER2/ERK1/2/MMP-9 signaling [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 58:1-16.
- [18] 阮姝琴, 代晓燕. 新型雌激素受体GPR30激活HER2-ERK1/2促进乳腺癌MCF-7细胞迁移和侵袭[J]. *重庆医学*, 2017, 46(9):1168-1171.
- [19] ZHAO T, YANG H, TIAN Y, et al. SOX7 is associated with the suppression of human glioma by HMG-box dependent regulation of Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Cancer Lett*, 2016, 375(1):100-107.
- [20] 杨永辉, 李辉, 郭素敏, 等. NK细胞对非小细胞肺癌细胞NCI-H292的杀伤作用及其对 β -catenin蛋白表达的影响[J]. *山东医药*, 2017, 57(45):33-35.

(收稿日期:2019-08-08,修回日期:2019-09-27)