

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.03.002

· 基础研究 ·

## *Sphk1* 基因对间充质干细胞诱导结肠癌 RKO 细胞增殖和迁移的影响

伍文红, 刘诗权, 符振华, 覃蒙斌, 徐春燕, 朱丽叶, 黄杰安(广西医科大学第二附属医院 消化内科, 广西南宁 530007)

**[摘要]** **目的:** 探讨鞘氨醇激酶 1 (sphingosine kinase 1, *SphK1*) 基因下调对间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 诱导的结肠癌 RKO 细胞增殖和迁移的影响。**方法:** 采用 MSC 条件培养液 (MSC-CM) 和对照培养液 (Control-CM) 分别干预 RKO 细胞, CCK-8 法检测细胞的增殖能力, Transwell 实验检测细胞的迁移能力, Western blotting 法检测 Ki-67 抗原 (Ki-67)、MMP-2/9、肿瘤干细胞标志物 CD44 和 CD133 蛋白的表达。用慢病毒 shRNA 载体转染 RKO 细胞抑制 *SphK1* 的表达, 观察抑制 *SphK1* 的表达对 MSC-CM 诱导的 RKO 细胞增殖、迁移以及 MMP-2/9、CD44 和 CD133 蛋白表达的影响。**结果:** MSC-CM 可时间依赖性促进 RKO 细胞的增殖 ( $P < 0.05$ ), 并明显增强细胞的迁移能力 ( $P < 0.01$ ) 和细胞中 Ki-67、MMP-2/9、CD44 和 CD133 蛋白的表达 (均  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。慢病毒 shRNA 转染明显抑制 RKO 细胞 *SphK1* 的表达, 抑制 *SphK1* 的表达可显著抑制 MSC-CM 对 RKO 细胞增殖和迁移的促进作用 (均  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 且明显抑制 MSC-CM 诱导的 Ki-67、MMP-2/9、CD44 和 CD133 蛋白的表达。**结论:** MSC-CM 可促进 RKO 细胞的增殖和迁移, 下调 *SphK1* 可通过抑制 MMP-2/9、CD44 和 CD133 的表达逆转 MSC-CM 诱导的细胞增殖和迁移。

**[关键词]** 鞘氨醇激酶 1 基因; 间充质干细胞; 结肠癌; RKO 细胞; 增殖; 迁移

**[中图分类号]** R735.3; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)03-0221-08

## Effects of *SphK1* gene on the proliferation and migration of colon cancer RKO cells induced by mesenchymal stem cells

WU Wenhong, LIU Shiquan, FU Zhenhua, QIN Mengbin, XU Chunyan, ZHU Liye, HUANG Jian (Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530007, Guangxi, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of sphingosine kinase 1 (*SphK1*) knockdown on the proliferation and migration of colon cancer RKO cells induced by mesenchymal stem cells (MSCs). **Methods:** RKO cells were treated with MSCs conditioned medium (MSC-CM) or control medium (Control-CM), respectively. Cell proliferation was detected by CCK-8 assay. Cell migration ability was tested by Transwell chamber assay. The proteins expression of Ki-67, MMP-2/9, CD44 and CD133 was detected by Western blotting. Then, the expression of *SphK1* in RKO cells was suppressed by targeted gene lentivirus shRNA vector transfection. The effects of *SphK1* knockdown on the proliferation, migration and protein expressions of Ki-67, MMP-2/9, CD44 and CD133 of RKO cells induced by MSC-CM were observed. **Results:** The RKO cells proliferation was promoted by MSC-CM in a time-dependent manner; moreover ( $P < 0.05$ ), the migration ability of cells was significantly enhanced after being treated with MSC-CM ( $P < 0.01$ ). In addition, MSC-CM significantly increased the protein expressions of Ki-67, MMP-2/9, CD44 and CD133 (all  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Lentiviral ShRNA vector transfection could significantly inhibit the expression of *SphK1*. Down-regulation of *SphK1* significantly inhibited the proliferation, migration and protein expressions of Ki-67, MMP-2/9, CD44 and CD133 of RKO cells induced by MSC-CM (all  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** MSC-CM promotes the proliferation and migration of colon cancer RKO cells. Down-regulation of *SphK1* reverses the cell proliferation and migration induced by MSC-CM via inhibiting the expression of MMP-2/9, CD44 and CD133.

**[Key words]** sphingosine kinase 1 gene (*SphK1*); mesenchymal stem cell (MSC); colon cancer; RKO cell; proliferation; migration

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(3): 221-228. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.03.002]

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (No.81460380); 广西自然科学基金项目 (No.2017GXNSFAA198019)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81460380), and the Natural Science Foundation of Guangxi (No.2017GXNSFAA198019)

**[作者简介]** 伍文红 (1990-), 女, 硕士生, 主要从事消化道肿瘤研究, E-mail: 1193201638@qq.com

**[通信作者]** 刘诗权 (LIU Shiquan, corresponding author), 博士, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 主要从事消化道肿瘤的发生、转移以及化疗耐药的研究, E-mail: poempower@163.com

结肠癌是全球病死率最高的恶性肿瘤之一。随着诊疗技术的改进,早期治疗可以提高总体生存率,但是40%~50%的患者在诊治初期或根治术后复发且出现远处侵袭转移,导致结肠癌总体预后不佳<sup>[1]</sup>。因此,研究侵袭转移机制是探索结肠癌防治策略的基础。间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)可迁移到肿瘤部位,进入肿瘤基质,成为肿瘤微环境构成成分,在促进肿瘤发展和侵袭转移中发挥重要作用<sup>[2-3]</sup>。有研究<sup>[4]</sup>显示,在结肠癌中, MSC通过增进血管生成和增强肿瘤细胞的侵袭和迁移能力促进肿瘤生长和转移,但其具体作用机制还不十分明确。鞘氨醇激酶1(sphingosine kinase 1, SphK1)是参与细胞内鞘脂类代谢的重要调节酶,其在包括结肠癌在内的多种肿瘤中高表达,且其表达水平与肿瘤的恶性程度及患者的预后密切相关,其基因也被普遍认为是一种癌基因<sup>[5]</sup>。MSC可促进结肠癌的生长和转移<sup>[4]</sup>。然而, *SphK1* 基因对MSC诱导的结肠癌细胞增殖和迁移的影响及其机制却鲜有报道。本研究拟探讨MSC对结肠癌RKO细胞的增殖和迁移的影响,并采用小干扰RNA技术下调RKO细胞的*SphK1*基因,探讨*SphK1*在MSC促进结肠癌细胞增殖和迁移中的作用及其可能的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株与主要试剂

人结肠癌RKO细胞株购自中国科学院上海细胞库。成人骨髓MSC和MSC完全培养基购自广州赛业生物科技有限公司,胎牛血清购自上海依科赛生物制品有限公司,DMEM高糖培养基和Transwell小室购自美国Corning公司,POLOdeliverer™ 3000转染试剂盒购自上海锐赛公司,CCK-8细胞增殖试剂盒购自日本同仁化学研究所,兔抗人Ki67、CD44多克隆抗体购自Abclonal公司,兔抗人SphK1、MMP-2、MMP-9、CD133和GAPDH多克隆抗体均购自Proteintech Group公司,IRDye680RD标记的山羊抗兔二抗购自LI-COR公司。

### 1.2 细胞培养

人结肠癌RKO株细胞采用含10%胎牛血清的高糖培养基、人骨髓MSC采用MSC完全培养基,在5% CO<sub>2</sub>、37℃、饱和湿度的孵育箱中培养。

### 1.3 MSC条件培养液的制备

1×10<sup>6</sup>对数生长期MSC接种于培养瓶,贴壁后用10 ml无血清DMEM清洗细胞3次,然后加入10 ml无血清培养基,在5% CO<sub>2</sub>、37℃、饱和湿度的孵育箱培养24 h,收集培养液。4℃下1 250×g离心5 min,0.22 μm过滤器过滤后获取MSC条件培养液(MSC-

CM),-20℃冻存储用。无血清DMEM培养基作为对照培养液(Control-CM)。

### 1.4 实验分组

检测MSC-CM对RKO细胞生物学特性的影响,分为RKO+MSC-CM组、RKO+Control-CM组;检测抑制*SphK1*表达对RKO细胞生物学特性的影响,分为SphK1(-)-RKO组、NC-RKO组和wild-RKO组;检测MSC-CM联合抑制*SphK1*表达对RKO细胞生物学特性的影响,分为SphK1(-)-RKO+MSC-CM组、SphK1(-)-RKO+Control-CM组、NC-RKO+MSC-CM组和NC-RKO+Control-CM组。

### 1.5 慢病毒载体转染RKO细胞

细胞转染方法同本课题前期研究<sup>[6]</sup>。将靶向*SphK1*基因的shRNA序列连接到pLenti6.3载体并转染HEK293T细胞构建慢病毒载体(pLenti6.3-shRNA-SphK1),无义序列pLenti6.3-EGFP慢病毒载体作为阴性对照,按照POLOdeliverer™ 3000转染试剂盒说明书操作分别转染RKO细胞,添加转染增强剂聚凝胺(终质量浓度8 μg/ml)以提高转染效率。转染48~72 h后观察细胞转染效率,当转染率>70%时加杀稻瘟菌素(blasticidin, BSD)(终质量浓度2 μg/ml)筛选转染细胞,持续筛选7 d后,将BSD浓度降为1 μg/ml进行维持培养,约14 d可以构建稳定低表达*SphK1*的RKO转染细胞株。可分为*SphK1*低表达转染细胞(SphK1(-)-RKO)、阴性对照转染细胞(NC-RKO),未转染处理的野生型RKO(wild-RKO)细胞为空白对照细胞。在光学显微镜和荧光显微镜下分别观察3组细胞的形态和荧光颗粒。

### 1.6 CCK-8法检测各组细胞的增殖

检测MSC-CM对RKO细胞增殖的影响,取对数生长期RKO细胞制备细胞悬液接种于96孔板(2×10<sup>3</sup>个/孔),设置5个复孔,待细胞完全贴壁后更换培养液为MSC-CM或Control-CM,分别作用0、24、48、72和96 h后,每孔加入10 μl CCK-8试剂,避光孵育4 h后,酶标仪检测波长在450 nm处光密度(D<sub>450</sub>)值。以时间和D<sub>450</sub>值绘制细胞增殖曲线。

检测抑制*SphK1*表达对RKO细胞增殖的影响,将SphK1(-)-RKO组、NC-RKO组和wild-RKO组细胞制成细胞悬液,接种于96孔板(2×10<sup>3</sup>个/孔),设置5个复孔,分别于0、24、48、72和96 h培养时间点,每孔加入10 μl CCK-8试剂,避光孵育4 h后,酶标仪检测450 nm处D值。以时间和D值绘制增殖曲线。

检测MSC-CM联合抑制*SphK1*表达对RKO细胞增殖的影响,分别取SphK1(-)-RKO、NC-RKO细胞制备细胞悬液接种于96孔板(2×10<sup>3</sup>个/孔),设置5个复孔,待细胞完全贴壁后更换培养液为MSC-CM或

Control-CM, 分别作用0、24、48、72和96 h后, 每孔加入10  $\mu$ l CCK-8试剂, 避光孵育4 h后, 酶标仪检测450 nm处 $D$ 值。以时间和 $D_{450}$ 值绘制增殖曲线。

### 1.7 Transwell 迁移实验检测各组迁移细胞数

检测MSC-CM对RKO细胞迁移的影响, 用含DMEM无血清培养基重悬RKO细胞至 $5 \times 10^5$ /ml, Transwell上室加200  $\mu$ l细胞悬液, 下室加入600  $\mu$ l MSC-CM, 对照组下室加600  $\mu$ l含0.5%胎牛血清的Control-CM, 37  $^{\circ}$ C孵育24 h, 棉签擦去Transwell上室未迁移细胞, 倒置风干, 结晶紫染色穿膜细胞, PBS清洗, 相差显微镜观察并拍照。每个小室随机取5个视野拍照并计数迁移细胞数, 计算平均值。

检测抑制*SphK1*表达对RKO细胞迁移的影响, 用含DMEM无血清培养基分别重悬SphK1(-)-RKO组、NC-RKO组和wild-RKO组细胞至 $5 \times 10^5$ /ml, 上室加200  $\mu$ l细胞悬液, 下室加入600  $\mu$ l含0.5%胎牛血清的DMEM, 37  $^{\circ}$ C孵育24 h, 迁移细胞数检测方法同上。

检测MSC-CM联合抑制*SphK1*表达对RKO细胞迁移的影响, 用含DMEM无血清培养基分别重悬SphK1(-)-RKO组和NC-RKO组细胞至 $5 \times 10^5$ /ml, 上室加200  $\mu$ l细胞悬液, 下室加入600  $\mu$ l MSC-CM, 对照组下室加600  $\mu$ l含0.5%胎牛血清的Control-CM, 37  $^{\circ}$ C孵育24 h, 迁移细胞数检测方法同上。

### 1.8 Western blotting 法检测各组细胞肿瘤相关蛋白表达水平

收集各组细胞提取总蛋白, BCA法测蛋白浓度, 每孔上样300  $\mu$ g, 经10%SDS-PAGE分离后转移至PVDF膜, 5%BSA室温封闭60 min后, RKO+MSC-CM组、RKO+Control-CM组、NC-RKO+MSC-CM组、NC-RKO+Control-CM组、SphK1(-)-RKO+MSC-CM组和SphK1(-)-RKO+Control-CM组分别加兔抗人Ki67(1:1 000)、MMP-2(1:500)、MMP-9(1:500)、CD44(1:1 000)、CD133(1:1 000)和GAPDH(1:5 000)一抗; wild-RKO组、NC-RKO组和SphK1(-)-RKO组分别加兔抗人SphK1(1:500)和GAPDH(1:5 000)一抗, 4  $^{\circ}$ C条件下摇床孵育过夜, 次日经TBST洗涤后, 加入IRDye680RD标记的山羊抗兔二抗(1:10 000)室温孵育1 h, Odyssey红外成像分析仪(LI-COR公司)进行扫膜显影, 以GAPDH蛋白为内参照对以上目的蛋白进行灰度值分析, 蛋白相对表达水平=目的蛋白 $D$ 值/内参照 $D$ 值。

### 1.9 统计学处理

应用GraphPad Prism 5.0软件和SPSS 17.0软件进行统计学分析, 实验均重复3次, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 $t$ 检验, 多组间比较用单因素方差分

析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MSC-CM 促进RKO细胞的增殖、迁移和相关蛋白的表达

CCK-8结果(图1A)显示, 培养24 h后, RKO+MSC-CM组细胞的 $D_{450}$ 值呈时间依赖性显著高于RKO+Control-CM组[24 h: (0.376 $\pm$ 0.035) vs (0.275 $\pm$ 0.031); 48 h: (0.578 $\pm$ 0.032) vs (0.383 $\pm$ 0.041); 72 h: (0.882 $\pm$ 0.037) vs (0.585 $\pm$ 0.047), 96 h: (1.291 $\pm$ 0.048) vs (0.864 $\pm$ 0.039); 均 $P < 0.05$ ]。Transwell迁移实验结果(图1B)表明, RKO+MSC-CM组迁移细胞密度显著高于RKO+Control-CM组, 两组迁移细胞数的比较为(477.00 $\pm$ 18.36) vs (280.80 $\pm$ 15.53)个( $P < 0.01$ )。说明MSC-CM可显著地促进RKO细胞的增殖和迁移。Western blotting法检测结果(图1C)表明, RKO+MSC-CM组Ki-67、MMP-2/9、CD44和CD133蛋白表达量均高于RKO+Control-CM组[Ki67: (1.23 $\pm$ 0.06) vs (0.95 $\pm$ 0.07); MMP-2: (0.87 $\pm$ 0.06) vs (0.67 $\pm$ 0.04), MMP-9: (0.97 $\pm$ 0.06) vs (0.82 $\pm$ 0.06); CD44: (1.74 $\pm$ 0.05) vs (1.36 $\pm$ 0.06), CD133: (0.90 $\pm$ 0.03) vs (0.75 $\pm$ 0.06); 均 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ], 说明MSC-CM可增加RKO细胞肿瘤相关蛋白的表达。

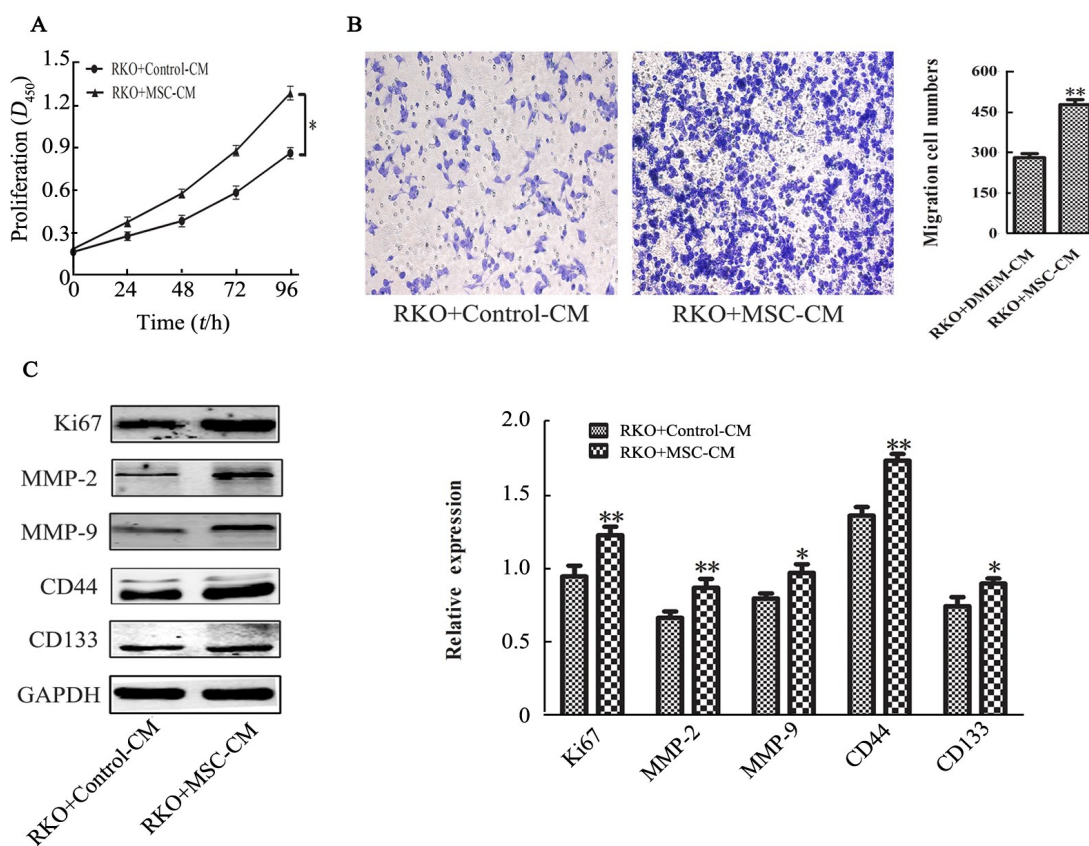
### 2.2 成功构建稳定转染的*SphK1*低表达细胞

各组细胞在光学显微镜下观察未见明显差异, 但在荧光显微镜下观察可见转染*SphK1*基因shRNA慢病毒载体的SphK1(-)-RKO组和转染无义序列慢病毒载体的NC-RKO组细胞携带绿色荧光颗粒, 而未转染慢病毒载体的wild-RKO组细胞无绿色荧光颗粒(图2A)。Western blotting法检测结果(图2B)显示, SphK1(-)-RKO组细胞SphK1蛋白表达水平较wild-RKO组和NC-RKO组明显下降[(0.56 $\pm$ 0.05) vs (1.25 $\pm$ 0.06)和(1.20 $\pm$ 0.09), 均 $P < 0.01$ ], 表明成功构建了稳定转染*SphK1*低表达的RKO细胞。

### 2.3 下调*SphK1*表达可抑制RKO细胞的增殖和迁移

CCK-8法检测结果(图3A)表明, 下调*SphK1*表达后, SphK1(-)-RKO组细胞的增殖能力较wild-RKO组和NC-RKO组明显下降[24 h: (0.192 $\pm$ 0.033) vs (0.326 $\pm$ 0.041)和(0.281 $\pm$ 0.031); 48 h: (0.296 $\pm$ 0.042) vs (0.480 $\pm$ 0.043)和(0.422 $\pm$ 0.032); 72 h: (0.406 $\pm$ 0.036) vs (0.672 $\pm$ 0.033)和(0.625 $\pm$ 0.049); 96 h: 0.598 $\pm$ 0.053 vs (0.935 $\pm$ 0.052)和(0.894 $\pm$ 0.036); 均 $P < 0.05$ ]。Transwell实验结果(图3B)显示, SphK1(-)-RKO组细胞迁移数明显低于wild-RKO组和NC-RKO组[(92.20 $\pm$ 18.96) vs (279.40 $\pm$ 20.34)和(276.20 $\pm$ 24.44), 均 $P < 0.01$ ]。





\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs ROK+Control-CM group

A: Cell proliferation of the RKO cell detected by CCK-8 assay; B: Cell migration of the RKO cell detected by Transwell assay (×200); C: Expressions of relevant-proteins detected by Western blotting assay

图1 不同组RKO细胞增殖、迁移和相关蛋白的表达

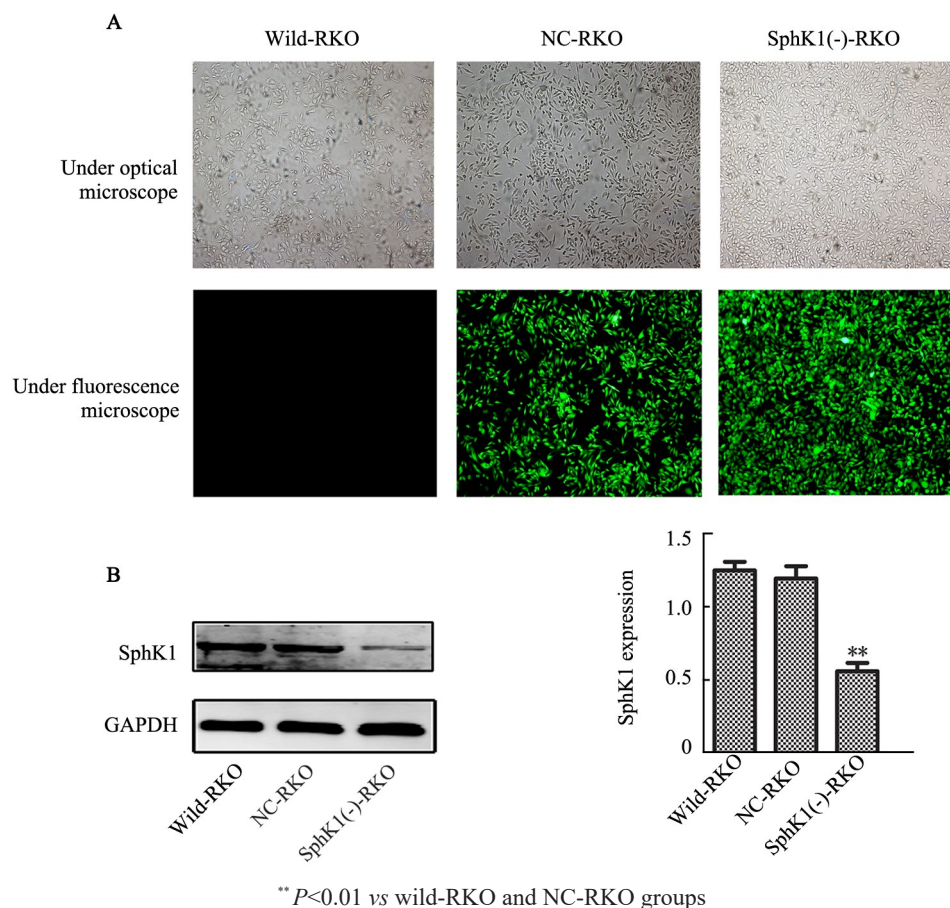
Fig. 1 Proliferation, migration and relevant protein expressions of the RKO cell in various groups

#### 2.4 下调 *SphK1* 表达可逆转 MSC-CM 对 RKO 细胞增殖和迁移的促进作用

CCK-8 法检测结果(图 4A)显示, NC-RKO 细胞 MSC-CM 组细胞增殖能力明显较 Control-CM 组细胞强[24 h: (0.374±0.033) vs (0.273±0.029); 48 h: (0.575±0.043) vs (0.382±0.032); 72 h: 0.881±0.045 vs (0.582±0.032); 96 h: (1.289±0.038) vs (0.862±0.040); 均  $P < 0.05$ ], 然而 *SphK1*(-)-RKO 细胞 MSC-CM 组和 Control-CM 组细胞增殖无明显差异[24 h: (0.211±0.016) vs (0.185±0.019); 48 h: (0.305±0.021) vs (0.264±0.027); 72 h: (0.419±0.017) vs (0.376±0.025); 96 h: (0.605±0.027) vs (0.564±0.024), 均  $P > 0.05$ ]. Transwell 实验结果(图 4B)表明, NC-RKO+MSC-CM 组迁移细胞数明显多于 NC-RKO+Control-CM 组 [(473.20±19.06) vs (274.20±21.05) 个,  $P < 0.01$ ]. 而 *SphK1*(-)-RKO+MSC-CM 组迁移细胞数和 *SphK1*(-)-RKO+Control-CM 组没有显著差异[(94.20±14.15) vs (86.00±15.38) 个,  $P > 0.05$ ]. 说明下调 *SphK1* 表达可逆转 MSC-CM 促进 RKO 细胞的增殖和迁移。

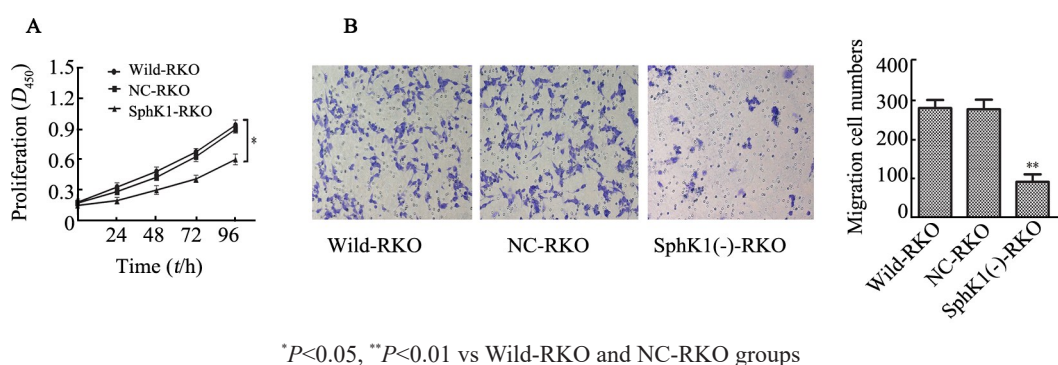
#### 2.5 下调 *SphK1* 表达可抑制 MSC-CM 增强 RKO 细胞相关蛋白的表达

Western blotting 检测结果(图 5)显示, 肿瘤相关蛋白 Ki67、MMP-2/9、CD44 和 CD133 的表达, 在未下调 *SphK1* 表达 NC-RKO 细胞的 NC-RKO+MSC-CM 组比 NC-RKO+Control-CM 组显著增强[Ki67: (1.22±0.06) vs (0.94±0.07); MMP-2: (0.88±0.04) vs (0.68±0.05), MMP-9: (0.97±0.05) vs (0.79±0.04); CD44: (1.74±0.06) vs (1.36±0.06); CD133: (0.95±0.04) vs (0.73±0.07), 均  $P < 0.01$ ]. 而在下调 *SphK1* 表达 *SphK1*(-)-RKO 细胞的 *SphK1*(-)-RKO+MSC-CM 组与 *SphK1*(-)-RKO+Control-CM 组之间无明显差异[Ki67: (0.68±0.04) vs (0.64±0.05); MMP-2: (0.57±0.04) vs (0.49±0.04); MMP-9: (0.61±0.05) vs (0.59±0.04); CD44: (0.88±0.04) vs (0.85±0.05); CD133: (0.60±0.05) vs (0.59±0.06); 均  $P > 0.05$ ]. 说明下调 *SphK1* 表达明显抑制 MSC-CM 增强 RKO 细胞肿瘤相关蛋白 Ki67、MMP-2/9、CD44 和 CD133 的表达。



A: Green fluorescence particles under microscope ( $\times 100$ ); B: Expression of SphK1 protein detected by Western blotting assay  
图2 转染慢病毒载体各组 RKO 细胞的绿色荧光颗粒和 SphK1 蛋白的表达

Fig. 2 Green fluorescence particles and SphK1 protein expression in RKO cells transfected with lentiviral vectors in various groups



A: Proliferation of the cells detected by CCK-8 assay; B: Migration situation of the cells detected by Transwell assay ( $\times 200$ )

图3 转染慢病毒载体各组 RKO 细胞的增殖和迁移数比较

Fig. 3 Comparison of proliferation and migrated cell numbers of RKO cells transfected with lentiviral vectors in various groups

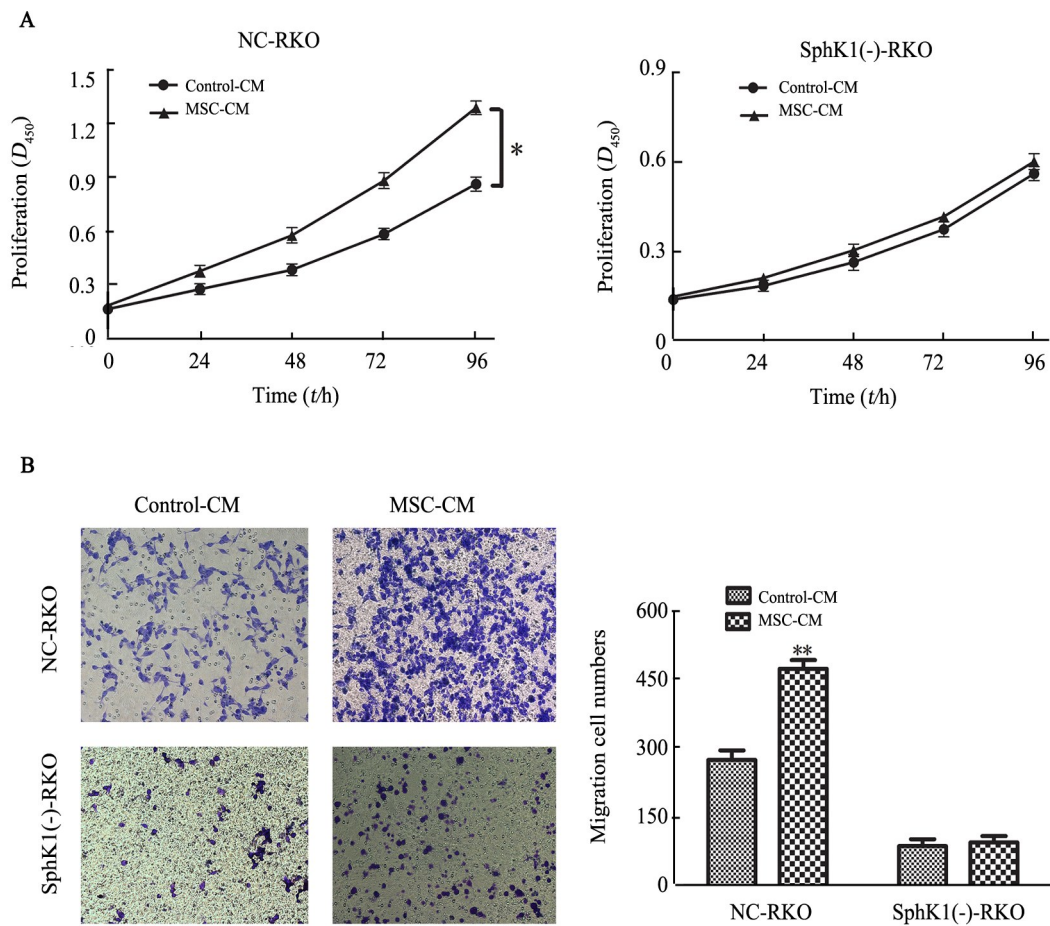
### 3 讨论

骨髓来源的 MSC 是一类具有自我更新和多向分化潜能的干细胞,在体外经诱导可分化为骨、软骨、肌肉、脂肪和神经等组织细胞<sup>[7]</sup>。有研究<sup>[2]</sup>显示, MSC 与肿瘤的发生发展密切相关,在肿瘤发生的过程中, MSC 被间质微环境招募或动员进入肿瘤间质,并在

肿瘤的侵袭转移中发挥重要作用。本实验发现 MSC-CM 可促进结肠癌细胞的增殖和迁移,表明 MSC 可能是通过旁分泌作用在促进结肠癌细胞的增殖和迁移中发挥作用,与 MSC 具有旁分泌作用的相关研究<sup>[8]</sup>一致。也有研究<sup>[9]</sup>显示,在肿瘤的进展阶段,

MSC可迁移至肿瘤间质并转化为癌相关成纤维细胞 (carcinoma associated fibroblasts, CAF), 增强肿瘤细

胞的增殖、侵袭和迁移能力。然而, MSC在结肠癌细胞增殖和迁移中的作用机制还远未阐明。



\*P<0.05, \*\*P<0.01 vs Control-CM group

A: Proliferation of the cells detected by CCK-8 assay; B: Migration situation of the cells detected by Transwell assay (× 200)

图4 不同组SphK1(-)-RKO和NC-RKO细胞增殖和迁移数比较

Fig. 4 Comparison of proliferation and migrated cell numbers of SphK1(-)-RKO and NC-RKO cells in various groups

MMP-2/9是金属蛋白酶家族的重要成员,可通过降解细胞外基质促进肿瘤的转移<sup>[10-11]</sup>。有研究<sup>[12]</sup>表明, MSC还可通过增加肿瘤细胞中MMP-2/9的表达促进骨肉瘤的生长转移。本研究结果发现, MSC-CM促进结肠癌细胞MMP-2/9蛋白的表达,说明MSC可能通过上调MMP-2/9促进结肠癌细胞的增殖和迁移。此外,有研究<sup>[13]</sup>发现MSC自身可以分泌MMP-2/9抑制T细胞介导的免疫反应,抑制T细胞对肿瘤的免疫监视,从而发挥促进结肠癌细胞增殖、迁移作用。

CD44和CD133均是细胞表面的糖蛋白,二者参与细胞黏附和迁移,也被认为是肿瘤干细胞标志物<sup>[14]</sup>。MSC-CM干预人结肠癌RKO细胞后,CD44和CD133的蛋白表达量明显增加, MSC可能通过诱导结肠癌细胞的干细胞特性从而参与肿瘤细胞的增殖

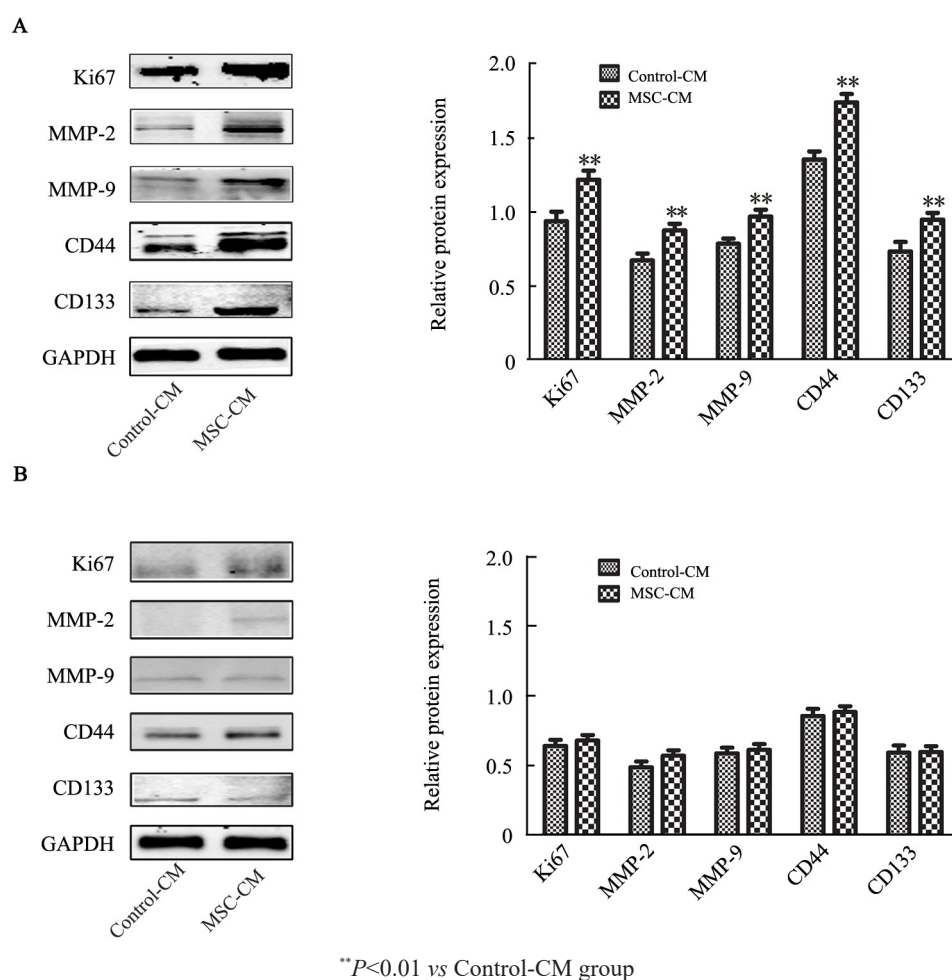
和迁移。前列腺癌细胞中的研究<sup>[15-16]</sup>发现,与MSC共培养后可增加前列腺癌细胞CD44<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>干细胞亚群的数量,且已证实CD44<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>干细胞亚群的增殖和迁移能力较原始肿瘤细胞强,同时MMP-2/9、CD44和CD133蛋白的表达量也增加。这些研究进一步证实MSC可能是通过调控MMP-2/9、CD44和CD133的表达促进结肠癌细胞的增殖和迁移。

SphK1是生物进化过程中形成的一种保守脂类激酶,其催化鞘脂代谢生成1-磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate, S1P),促使细胞活化、增殖和血管生成,抑制细胞凋亡。近年来发现SphK1在多种实体瘤中高表达,结肠癌的细胞和组织也存在此现象<sup>[5]</sup>。有研究<sup>[17-18]</sup>发现, SphK1基因过表达可以促进结肠癌细胞的增殖、侵袭和迁移。应用下调SphK1表达的SiRNA或SphK1抑制剂可以有效抑制结肠癌细胞的



上述生物学行为<sup>[18-19]</sup>。本研究也证实下调 *SphK1* 表达不但可抑制结肠癌细胞的增殖和迁移,而且可逆转 MSC 诱导的细胞增殖和迁移。肿瘤微环境中, MSC 可以产生和分泌多种细胞因子影响肿瘤的生长,其中包括 TGF- $\beta$ ,且 TGF- $\beta$  可激活 *SphK1* 促进肿瘤细胞的侵袭和转移<sup>[20-21]</sup>。因此, *SphK1* 可能在 MSC 促进结

肠癌侵袭转移的过程中发挥重要作用。此外,有研究<sup>[17,22-23]</sup>发现, *SphK1* 可通过增加 MMP-2/9 的分泌,直接或间接上调 CD44 和 CD133 表达促进结肠癌细胞的增殖和侵袭迁移。综上所述, *SphK1* 可能通过调控 MMP-2/9、CD44 和 CD133 在 MSC 促进结肠癌细胞的增殖和迁移中发挥关键作用。



\*\* $P < 0.01$  vs Control-CM group  
A: NC-RKO cell; B: SphK1(-)-RKO cell

图5 各组 *SphK1*(-)-RKO 和 NC-RKO 细胞相关蛋白的表达

Fig. 5 Relevant proteins expressions in *SphK1*(-)-RKO and NC-RKO cells in various groups

### [参考文献]

- [1] CALON A, ESPINET E, PALOMO-PONCE S, et al. Dependency of colorectal cancer on a TGF- $\beta$ -driven program in stromal cells for metastasis initiation[J]. *Cancer Cell*, 2012, 22(5): 571-584. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.08.013.
- [2] ALBA-CASTELLON L, OLIVERA-SALGUERO R, MESTRE-FARRERA A, et al. Snail1-dependent activation of cancer-associated fibroblast controls epithelial tumor cell invasion and metastasis [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(21): 6205-6217. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-16-0176.
- [3] TSAI K S, YANG S H, LEI Y P, et al. Mesenchymal stem cells promote formation of colorectal tumors in mice[J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(3): 1046-1056. DOI:10.1053/j.gastro.2011.05.045.
- [4] SHINAGAWA K, KITADAI Y, TANAKA M, et al. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(10): 2323-2333. DOI:10.1002/ijc.25440.
- [5] VADAS M, XIA P, MCCAUGHAN G, et al. The role of sphingosine kinase 1 in cancer: oncogene or non-oncogene addiction? [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1781(9):442-447. DOI:10.1016/j.bbap.2008.06.007.
- [6] 覃琳, 刘诗权, 覃蒙斌, 等. 敲低鞘氨醇激酶1增强人结肠癌RKO细胞对顺铂的敏感性[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2017, 33(5): 623-629. DOI:10.13423/j.cnki.cjcmi.008134.
- [7] XU W R, ZHANG X R, QIAN H, et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro[J]. *Exp Biol Med*, 2004, 229(7): 623-631.

- [8] 冯吉, 陈东风. 骨髓间充质干细胞的旁分泌作用[J]. 重庆医学, 2011, 40(13): 1332-1333. DOI:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.13.038.
- [9] SPAETH E L, DEMBINSKI J L, SASSER A K, et al. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression[J/OL]. PLoS One, 2013, 8(3): e4992 [2017-08-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3609724/>. DOI:10.1371/journal.pone.0004992.
- [10] HUANG D, DU X, YUAN R, et al. Rock2 promotes the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by modifying MMP2 ubiquitination and degradation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 453(1): 49-56. DOI:10.1016/j.bbrc.2014.09.061.
- [11] TSURU A, SETOGUCHI T, MATSUNOSHITA Y, et al. Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1 promotes osteosarcoma metastasis via matrix metalloproteinase 9 expression[J]. Br J Cancer, 2015, 112(7):1232-1240. DOI:10.1038/bjc.2015.84.
- [12] WANG Y, CHU Y, YUE B, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells promote osteosarcoma proliferation and metastasis by activating the STAT3 pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(14): 23803-23816. DOI:10.18632/oncotarget.15866.
- [13] DING Y, XU D, FENG G, et al. Mesenchymal stem cells prevent the rejection of fully allogeneic islet grafts by the immunosuppressive activity of matrix metalloproteinase-2 and -9[J]. Diabetes, 2009, 58(8):1797-1806. DOI:10.2337/db09-0317.
- [14] MALLARD B W, TIRALONGO J. Cancer stem cell marker glycosylation: nature, function and significance[J]. Glycoconj J, 2017, 34(4):441-452. DOI:10.1007/s10719-017-9780-9.
- [15] LUO J, OK LEE S, LIANG L, et al. Infiltrating bone marrow mesenchymal stem cells increase prostate cancer stem cell population and metastatic ability via secreting cytokines to suppress androgen receptor signaling[J]. Oncogene, 2014, 33(21): 2768-2778. DOI: 10.1038/onc.2013.233.
- [16] WANG S S, GAO X L, LIU X, et al. CD133+ cancer stem-like cells promote migration and invasion of salivary adenoid cystic carcinoma by inducing vasculogenic mimicry formation[J]. Oncotarget, 2016, 7(20):29051-29062. DOI:10.18632/oncotarget.8665.
- [17] LIU S Q, HUANG J A, QIN M B, et al. Sphingosine kinase 1 enhances colon cancer cell proliferation and invasion by upregulating the production of MMP-2/9 and uPA via MAPK pathways[J]. Int J Colorectal Dis, 2012, 27(12):1569-1578. DOI:10.1007/s00384-012-1510-y.
- [18] LONG J, XIE Y, YIN J, et al. SphK1 promotes tumor cell migration and invasion in colorectal cancer[J]. Tumour Biol, 2016, 37(5): 6831-6836. DOI:10.1007/s13277-015-4542-4.
- [19] JU T, GAO D, FANG Z Y. Targeting colorectal cancer cells by a novel sphingosine kinase 1 inhibitor PF-543[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 470(3): 728-734. DOI:10.1016/j.bbrc.2016.01.053.
- [20] STAYROOK K R, MACK J K, CERABONA D, et al. TGFbeta-mediated induction of SphK1 as a potential determinant in human MDA-MB-231 breast cancer cell bone metastasis[J/OL]. Bonekey Rep, 2015, 4: 719[2017-08-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4495778/>. DOI: 10.1038/bonekey.2015.88.
- [21] BEACH J A, ASPURIA P J, CHEON D J, et al. Sphingosine kinase 1 is required for TGF-beta mediated fibroblast-to-myofibroblast differentiation in ovarian cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(4): 4167-4182. DOI:10.18632/oncotarget.6703.
- [22] KAWAHARA S, OTSUJI Y, NAKAMURA M, et al. Sphingosine kinase 1 plays a role in the upregulation of CD44 expression through extracellular signal-regulated kinase signaling in human colon cancer cells[J]. Anticancer Drugs, 2013, 24(5): 473-483. DOI: 10.1097/CAD.0b013e32835f705f.
- [23] CHATTERJEE I, HUMTSOE J O, KOHLER E E, et al. Lipid phosphate phosphatase-3 regulates tumor growth via  $\beta$ -catenin and Cyclin-D1 signaling[J]. Mol Cancer, 2011, 10(1): 51. DOI: 10.1186/1476-4598-10-51.

[收稿日期] 2017-11-12

[修回日期] 2017-12-25

[本文编辑] 韩丹