

本文引用:王婧媛,谢雨琪,岳凤恺,等.含GATA锌指结构域1对结肠癌细胞迁移的影响[J].新乡医学院学报,2024,41(4):309-315. DOI:10.7683/xyxyxb.2024.04.002.

【基础研究】

含GATA锌指结构域1对结肠癌细胞迁移的影响

王婧媛, 谢雨琪, 岳凤恺, 阔艺, 李卓越, 关津京, 杨子善, 陈志国

(新乡医学院基础医学院,河南 新乡 453003)

摘要: **目的** 探讨含GATA锌指结构域1(GATAD1)对结肠癌细胞迁移的影响及其机制。**方法** 采用限制性内切酶连接法构建GATAD1干扰质粒SiRNA-GATAD1(Si-GATAD1)。取培养的人正常结肠上皮细胞NCM460及结肠癌细胞Caco-2、HCT-116、HCT-8、HT-29、RKO,应用Western blot法检测细胞中GATAD1蛋白相对表达量,选择其中GATAD1表达水平相对较高的结肠癌细胞HCT-116、RKO用于转染GATAD1干扰质粒Si-GATAD1,另选择其中GATAD1表达水平最低的结肠癌细胞Caco-2用于转染过表达pMZ-GATAD1质粒。取HCT-116、RKO细胞随机分为阴性对照(NC)组和转染Si-GATAD1质粒组(Si-GATAD1组),取Caco-2细胞随机分为NC组、转染过表达pMZ-GATAD1质粒组(pMZ-GATAD1组),Si-GATAD1组HCT-116和RKO细胞分别转染Si-GATAD1质粒,pMZ-GATAD1组Caco-2细胞转染过表达pMZ-GATAD1质粒,同时将空载体pMZ-MO3质粒转染至NC组HCT-116、RKO和Caco-2细胞。采用细胞划痕实验检测各组细胞划痕愈合率;采用Western blot法检测各组细胞磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路相关蛋白PI3K、Akt、磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)、细胞周期蛋白-D1(cyclin D1)的相对表达量。**结果** 结肠癌细胞HCT-8、HCT-116、RKO、HT-29、Caco-2中GATAD1蛋白相对表达量均显著高于人正常结肠上皮细胞NCM460($P < 0.05$);结肠癌HCT-116、RKO细胞中GATAD1蛋白相对表达量显著高于HCT-8、HCT-29和Caco-2细胞($P < 0.05$),结肠癌Caco-2细胞中GATAD1蛋白相对表达量显著低于结肠癌HCT-8、HCT-29细胞($P < 0.05$)。Si-GATAD1组HCT-116、RKO细胞中GATAD1蛋白相对表达量均显著低于NC组($P < 0.05$),pMZ-GATAD1组Caco-2细胞中GATAD1蛋白相对表达量显著高于NC组($P < 0.05$)。培养12、24 h, Si-GATAD1组HCT-116、RKO细胞的划痕愈合率均显著低于NC组($P < 0.01$);pMZ-GATAD1组Caco-2细胞的划痕愈合率均显著高于NC组($P < 0.01$)。Si-GATAD1组RKO、HCT-116细胞中PI3K、p-Akt、cyclin D1蛋白相对表达量均显著低于其NC组($P < 0.05$);pMZ-GATAD1组Caco-2细胞中PI3K、p-Akt、cyclin D1蛋白相对表达量均显著高于NC组($P < 0.05$);Si-GATAD1组RKO、HCT-116细胞及pMZ-GATAD1组Caco-2细胞中Akt蛋白相对表达量与NC组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** GATAD1高表达于结肠癌细胞中,且通过调控PI3K/Akt信号通路促进结肠癌细胞的迁移。

关键词: 结肠癌;含GATA锌指结构域1;磷脂酰肌醇3激酶;细胞周期蛋白-D1;蛋白激酶B

中图分类号: R735.3+5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2024)04-0309-07

Effect of GATA zinc finger domain containing 1 on migration of colon cancer cells

WANG Jingyuan, XIE Yuqi, YUE Fengkai, KUO Yi, LI Zhuoyue, GUAN Jinjing, YANG Zishan, CHEN Zhiguo

(Department of Basic Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect and mechanism of GATA zinc finger domain containing 1 (GATAD1) on the migration of colon cancer cells. **Methods** The GATAD1 interference plasmid SiRNA-GATAD1 (Si-GATAD1) was constructed using the restriction endonuclease ligation method. Normal human colon epithelial cells NCM460 and colon cancer cells Caco-2, HCT-116, HCT-8, HT-29, and RKO were cultured separately. The relative expression levels of GATAD1 protein in each group were detected by Western blot. Colon cancer cells HCT-116 and RKO with relatively high GATAD1 expression levels were selected for transfection of GATAD1 interference plasmid Si-GATAD1, and colon cancer cells Caco-2 with the lowest GATAD1 expression levels were selected for transfection of overexpressing pMZ-GATAD1 plasmid. HCT-116 and RKO

DOI:10.7683/xyxyxb.2024.04.002

收稿日期:2022-05-04

基金项目:河南省大学生创新创业训练计划项目(编号:S201910472023)。

作者简介:王婧媛(1999-),女,河南许昌人,本科在读。

通信作者:陈志国(1980-),男,河南南阳人,博士,讲师,研究方向:消化道肿瘤发病机制;E-mail:czgxxmu@126.com。

cells were randomly divided into the negative control group (NC group) and the Si-GATAD1 plasmid transfection group (Si-GATAD1 group). Caco-2 cells were randomly divided into the NC group and the overexpressing pMZ-GATAD1 plasmid transfection group (pMZ-GATAD1 group). Si-GATAD1 plasmids were transfected into HCT-116 and RKO cells, respectively, in the Si-GATAD1 group. The overexpressing pMZ-GATAD1 plasmids were transfected into Caco-2 cells in the pMZ-GATAD1 group. The empty pML-MO3 plasmids were transfected into HCT-116, RKO and Caco-2 cells in the NC group. The cell scratch assay was used to detect the scratch healing rate of cells in each group. Western blot was used to detect the relative expression levels of phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway related proteins PI3K, Akt, phosphorylated protein kinase B (p-Akt), and Cyclin D1 (CCND1) in each group. **Results** The relative expression levels of GATAD1 protein in colon cancer cells HCT-8, HCT-116, RKO, HT-29, and Caco-2 were significantly higher than those in normal human colon epithelial cells NCM460 ($P < 0.05$). The relative expression levels of GATAD1 protein in colon cancer cells HCT-116 and RKO were significantly higher than those in HCT-8, HCT-29, and Caco-2 cells ($P < 0.05$), while the relative expression level of GATAD1 protein in Caco-2 cells was significantly lower than that in HCT-8 and HCT-29 cells ($P < 0.05$). The relative expression levels of GATAD1 protein in HCT-116 and RKO cells in the Si-GATAD1 group were significantly lower than those in the NC group ($P < 0.05$), while the relative expression level of GATAD1 protein in Caco-2 cells in the pMZ-GATAD1 group was significantly higher than that in the NC group ($P < 0.05$). After 12 and 24 hours of cultivation, the scratch healing rates of HCT-116 and RKO cells in the Si-GATAD1 group were significantly lower than those in the NC group ($P < 0.01$), while the scratch healing rates of Caco-2 cells in the pMZ-GATAD1 group were significantly higher than those in the NC group ($P < 0.01$). The relative expression levels of PI3K, p-Akt, and CCND1 proteins in RKO and HCT-116 cells in the Si-GATAD1 group were significantly lower than those in the NC group ($P < 0.05$), while the relative expression levels of PI3K, p-Akt, and CCND1 proteins in Caco-2 cells in the pMZ-GATAD1 group were significantly higher than those in the NC group ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference in the relative expression of Akt protein between the Si-GATAD1 group (RKO and HCT-116 cells), pMZ-GATAD1 group (Caco-2 cells) and the NC group ($P > 0.05$). **Conclusion** GATAD1 is highly expressed in colon cancer cells and promotes their migration by regulating the PI3K/Akt signaling pathway.

Key words: colon cancer; GATA zinc finger domain containing 1; phosphoinositide 3-kinase; cyclin D1; protein kinase B

结肠癌是全球最常见的肿瘤之一,也是人类癌症死亡的主要原因之一,尽管目前在结肠癌的手术、化学治疗和生物治疗方面取得了一定进展,但不良预后仍是结肠癌患者死亡的主要原因^[1-2]。含 GATA 锌指结构域 1 (GATA zinc finger domain containing 1, GATAD1) 为 GATA 转录因子家族中的一员,其被认为是红细胞生成中重要的转录因子^[3-4]。研究发现, GATAD1 在肝癌细胞中高表达,通过与肝再生磷酸酶 3 (phosphatase of regenerating liver 3, PRL3) 的启动子结合,诱导 PRL3 的转录,激活蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路,从而在肝细胞中发挥重要的促癌作用^[5]。通过对 Biogps 数据库的检索发现, GATAD1 在结肠癌组织中的表达水平也较高,但其在结肠癌中的作用鲜有报道。基于此,本研究通过建立过表达 GATAD1 的人结肠癌 Caco-2 细胞和稳定敲低 GATAD1 的人结肠癌 HCT-116、RKO 细胞,观察 GATAD1 对结肠癌细胞迁移及磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/Akt 信号通路相关蛋白表达的影响,探讨 GATAD1 影响结肠癌细胞迁移的机制,为 GATAD1 在结肠癌进展

中的作用研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞

人正常结肠上皮细胞 NCM460 及人结肠癌细胞 Caco-2、HCT-116、HCT-8、HT-29 和 RKO 购自上海索尔生物科技有限公司,置于液氮中冻存。

1.2 主要试剂与仪器

空载体 pMZ-MO3 和过表达 pMZ-GATAD1 质粒、pScilencer 3.1-U6 质粒购自广州复能基因有限公司, TransStbl3 Chemically Competent Cell 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司, RPMI-1640、Mcoy'5A 培养液购自美国 GIBCO 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物技术有限公司,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS)、青霉素链霉素双抗、胰酶消化液、氨苄青霉素、LB 培养基、DNA ladder、丙烯酰胺、Tris-HCl (pH 8.8)、Tris-HCl (pH 6.8)、十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)、过硫酸铵、Tris 缓冲生理盐水购自北京索莱宝科技有限公司,甘油醛 3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphonate

dehydrogenase, GAPDH) 购自美国 Thermo Fisher 公司,质粒提取试剂盒、DH-5 α 感受态细胞、去基因组反转录试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, *SamH* I 和 *Hind* III 限制性内切酶购自大连宝生物工程 有限公司, lipofectamine 2000 转染试剂、增强电 化学发光液购自美国 Invitrogen 公司, GATAD1、Akt、 磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylated protein kinase B, p-Akt) 抗体及山羊抗小鼠 IgG、山羊抗兔 IgG 抗体购 自美国 Abcam 公司, 细胞周期蛋 D1(cyclin D1)、 PI3K 抗体购自美国 Proteintech 公司, 聚偏二氟乙烯 膜(polyvinylidene fluorid, PVDF) 购自美国 Millipore 公司; CO₂ 培养箱、高速低温冷冻离心机购自美国 Thermo 公司, Western blot 化学成像仪购自上海天能 科技有限公司, 倒置显微镜购自日本 Nikon 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 GATAD1 干扰质粒的构建

取 100 μ L DH-5 α 感受态细胞置于冰上, 加入 3 μ L pScilencer 3.1-U6 质粒, 30 min 后于 42 $^{\circ}$ C 水浴 锅中热击 30 s, 将其涂布于含氨苄抗性的固体细菌 培养基上, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中过夜。挑取培养基上 的单个菌落置于 20 mL 含氨苄抗生素的 LB 液体培 养基中, 置于 37 $^{\circ}$ C、220 r \cdot min⁻¹ 摇床上 14 h, 采用 质粒提取试剂盒提取 16 μ L pScilencer 3.1-U6 质粒 置于 EP 管中, 加入 2 μ L 内切酶缓冲液, 然后分别 加入 1 μ L *BamH* I 和 *Hind* III, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 用 DNA 胶回收试剂盒回收上述酶切片段; 将合成的干 扰序列用 TE 缓冲液溶解为 10 mol \cdot L⁻¹, 取 10 μ L, 98 $^{\circ}$ C 反应 10 min, 60 $^{\circ}$ C 反应 2 min; 取回收的酶切片 段 3 μ L 和合成的干扰序列 5 μ L 置于印管中, 加入 1 μ L T4 DNA 连接酶和 1 μ L 连接酶缓冲液, 16 $^{\circ}$ C 连接反应 3 h, 取连接产物 2 μ L, 加入到 50 μ L 解冻的 TransStbl3 Chemically Competent Cell 感受态细胞, 冰 浴 30 min, 42 $^{\circ}$ C 热击 90 s, 然后快速冰浴 2 min; 随 后加入 1 mL LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 摇床中放置 1 h; 最后 将所有 TransStbl3 Chemically Competent Cell 感受态 细胞涂布在含有抗生素的固体培养基上, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中倒置培养过夜; 挑取单克隆菌落, 送至苏州金 唯智生物技术有限公司测序。构建完成的 GATAD1 干 扰质粒为 SiRNA-GATAD1 (Si-GATAD1)。GATAD1 干 扰引物序列: 正向引物为 5'-GATCCGCAGGTCTTT- GCCGGTTAAGTTTCAAGAGAACTTAACCGGCAAA- GACCTGCTTTTTTGGAAA-3', 反向引物为 5'-

AGCTTTTCCAAAAAAGCAGGTCTTTGCCGGTTAAG- TTCTCTTGAAACTTAACCGGCAAAAGACCTGCG-3'。

1.3.2 细胞培养

将人正常结肠上皮细胞 NCM460 及人结肠癌细 胞 Caco-2、HCT-116、HCT-8、HT-29、RKO 从液氮中 取出, 置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中复苏。将 NCM460 细胞置 于 6 孔板中, 加入含体积分数 10% 胎牛血清、体积 分数 1% 青链霉素的 RPMI-1640 培养液; 将 Caco-2、 HCT-116、HCT-8、HT-29 和 RKO 细胞置于 6 孔板 中, 加入含体积分数 10% 胎牛血清、体积分数 1% 青 链霉素的 McCoy's 5A 培养液, 放入 37 $^{\circ}$ C、含体积分数 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 每 24 ~ 48 h 更换 1 次培养基。

1.3.3 Western blot 法检测 NCM460、Caco-2、 HCT-116、HCT-8、HT-29、RKO 细胞中 GATAD1 蛋白表达

从培养箱中分别取出 NCM460、Caco-2、HCT-116、 HCT-8、HT-29、RKO 细胞, 弃上清, 加 1 mL PBS 洗涤, 用细胞刷轻轻刮取细胞置于离心管中, 3 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清, 收集细胞沉淀, 加入 300 μ L 细胞裂解液吹打混匀, 冰上裂解 25 min, 12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 取 200 μ L 上清 液置于新的离心管中, 向上清液中加入 1/4 体积的 4 \times loading buffer 吹打混匀, 置于 100 $^{\circ}$ C 金属浴中 5 min 使蛋白充分变性, 取 30 μ g 蛋白进行 SDS-聚 丙烯酰胺蛋白电泳, 并将蛋白恒流 300 mA 转至 PVDF 膜上, 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 分别加入 GATAD1 一抗(滴度为 1 : 1 000)、GAPDH 一抗(滴度为 1 : 500), 4 $^{\circ}$ C 摇床上孵育过夜, Tris 缓冲生理盐水 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入辣根过氧化物酶标记的 二抗(滴度为 1 : 2 000), 室温摇床孵育 1 h, 用 Tris 缓冲生理盐水洗涤 3 次, 每次 10 min, 最后每个条带 加入 100 μ L 增强电超敏发光液, 用化学成像仪采集 图像, 应用 Image J 软件分析各个条带的灰度值, 以 目的蛋白 GATAD1 条带灰度值与内参蛋白 GAPDH 条带灰度值的比值表示 GATAD1 蛋白相对表达量。 实验重复 3 次, 取均值。

1.3.4 GATAD1 干扰质粒和过表达 pMZ-GATAD1 质粒的转染和检测

选择 GATAD1 表达水平相对较高的结肠癌细 胞 HCT-116、RKO 转染 GATAD1 干扰质粒, 另选择 GATAD1 表达水平最低的结肠癌细胞 Caco-2 转染

过表达 pMZ-GATAD1 质粒。从培养箱中取出对数期生长的结肠癌细胞 HCT-116、RKO、Caco-2,以 $1 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$ 的密度接种到 6 孔板中,每组设 3 个复孔。将 HCT-116、RKO 细胞随机分为阴性对照(negative control,NC)组和转染 Si-GATAD1 质粒组(Si-GATAD1 组);将 Caco-2 细胞随机分为 NC 组和转染过表达 pMZ-GATAD1 质粒组(pMZ-GATAD1 组)。Si-GATAD1 组 HCT-116、RKO 细胞转染 Si-GATAD1 质粒,pMZ-GATAD1 组 Caco-2 细胞转染过表达 pMZ-GATAD1 质粒,同时将空载体 pMZ-MO3 质粒转染 NC 组 HCT-116、RKO 和 Caco-2 细胞。按照 lipofectamine 2000 说明书进行转染,转染 6 h 后弃去培养基,换为正常培养基继续培养,用于后续 GATAD1 蛋白表达量和细胞划痕实验检测。

1.3.5 细胞划痕实验检测干扰 GATAD1 和过表达 GATAD1 对结肠癌细胞迁移的影响

从培养箱中取出转染后的结肠癌细胞 HCT-116、RKO、Caco-2,用 2 mL PBS 清洗 1 次,加入 1 mL 胰酶消化,计数;以 $1 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$ 的密度接种到 6 孔板中,每组设 3 个复孔;待细胞长满孔底,用 200 μL 无菌枪头在每个孔中划 2 条平行线,加 1 mL PBS 清洗细胞 3 次,使用无血清培养基置于细胞培养箱中培养,并于 0、12、24 h 时用倒置显微镜拍照记录,应用 Image J 软件测量空白面积,计算划痕愈合率,划痕愈合率越高代表细胞迁移能力越强。实验重复 3 次,取均值。

1.3.6 Western blot 法检测 HCT-116、RKO、Caco-2 细胞中 PI3K、Akt、p-Akt、cyclin D1 蛋白的表达

分别取转染后的 NC 组、Si-GATAD1 组 HCT-116、RKO 细胞和 NC 组、pMZ-GATAD1 组 Caco-2 细胞,加入 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,使用二喹啉甲酸法进行蛋白定量后,使用 $4 \times \text{loading buffer}$ 将蛋白样品浓度调整为 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,置于 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 金属浴中煮沸 10 min 使蛋白充分变性,取 40 μg 蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺蛋白电泳,将蛋白恒压转至 PVDF 上,用脱脂牛奶封闭 1 h,加入 GAPDH(滴度为 1 : 1 000)、PI3K(滴度为 1 : 1 000)、Akt(滴度为 1 : 500)、p-Akt(滴度为 1 : 1 000)、cyclin D1(滴度为 1 : 2 000)一抗,室温孵育 3 h,Tris 缓冲生理盐水洗涤 3 次,每次 10 min,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(滴度为 1 : 2 000),室温摇床孵育 1 h,用 Tris 缓冲生理盐水洗涤 3 次,使用增强电化学发光液显色,

用化学成像仪采集图像,应用 Image J 软件分析各个条带的灰度值。PI3K、Akt、p-Akt、cyclin D1 相对表达量以目的蛋白条带灰度值与内参蛋白 GAPDH 灰度值的比值表示。实验重复 3 次,取均值。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验;*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NCM460、HCT-8、HCT-116、RKO、HT-29、Caco-2 细胞中 GATAD1 蛋白相对表达量比较及转染质粒细胞的选择

NCM460、HCT-8、HCT-116、RKO、HT-29、Caco-2 细胞中 GATAD1 蛋白相对表达量分别为 0.163 ± 0.052 、 0.463 ± 0.051 、 0.916 ± 0.067 、 0.859 ± 0.100 、 0.494 ± 0.035 、 0.255 ± 0.059 。HCT-8、HCT-116、RKO、HT-29、Caco-2 细胞中 GATAD1 蛋白相对表达量均显著高于 NCM460 细胞,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。HCT-116、RKO 细胞中 GATAD1 蛋白相对表达量显著高于 HCT-8、HCT-29 和 Caco-2 细胞,差异有统计学意义(*P* < 0.05);Caco-2 细胞中 GATAD1 蛋白相对表达量显著低于 HCT-8、HCT-29 细胞,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。结果见图 1。选择 HCT-116、RKO 细胞用于转染 GATAD1 干扰质粒,选择 Caco-2 细胞用于转染 GATAD1 过表达质粒。

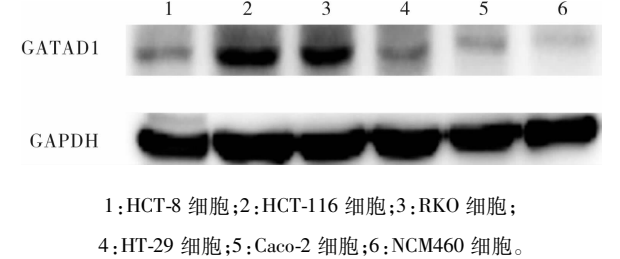
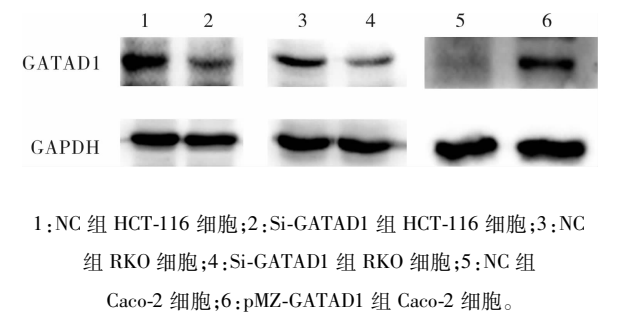


图 1 GATAD1 蛋白在 HCT-8、HCT-116、RKO、HT-29、Caco-2 及 NCM460 细胞中的表达(Western blot)
Fig.1 Expression of GATAD1 protein in HCT-8, HCT-116, RKO, HT-29, Caco-2 and NCM460 cells(Western blot)

2.2 NC 组、Si-GATAD1 组 HCT-116、RKO 细胞及 NC 组、pMZ-GATAD1 组 Caco-2 细胞的 GATAD1 蛋白相对表达量比较

NC 组、Si-GATAD1 组 HCT-116 细胞中 GATAD1 蛋白相对表达量分别为 0.697 ± 0.013 、 $0.463 \pm$

0.008;NC 组、Si-GATAD1 组 RKO 细胞中 GATAD1 蛋白相对表达量分别为 0.641 ± 0.003 、 0.395 ± 0.006 。Si-GATAD1 组 HCT-116、RKO 细胞中 GATAD1 蛋白相对表达量均显著低于 NC 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。NC 组、pMZ-GATAD1 组 Caco-2 细胞中 GATAD1 蛋白相对表达量分别为 0.098 ± 0.007 、 0.371 ± 0.004 , pMZ-GATAD1 组 Caco-2 细胞中 GATAD1 蛋白相对表达量显著高于 NC 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果见图 2。



1:NC 组 HCT-116 细胞;2:Si-GATAD1 组 HCT-116 细胞;3:NC 组 RKO 细胞;4:Si-GATAD1 组 RKO 细胞;5:NC 组 Caco-2 细胞;6:pMZ-GATAD1 组 Caco-2 细胞。

图 2 NC 组、Si-GATAD1 组 HCT-116、RKO 细胞和 NC 组、pMZ-GATAD1 组 Caco-2 细胞中 GATAD1 蛋白表达

Fig.2 Expression of GATAD1 protein in NC group,Si-GATAD1 group HCT-116,RKO cells,and NC group,pMZ-GATAD1 group Caco-2 cells

2.3 NC 组、Si-GATAD1 组 HCT-116、RKO 细胞和 NC 组、pMZ-GATAD1 组 Caco-2 细胞迁移能力比较

培养 12、24 h, Si-GATAD1 组 HCT-116、RKO 细胞的划痕愈合率均显著低于 NC 组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。培养 12、24 h, pMZ-GATAD1 组 Caco-2 细胞的划痕愈合率均显著高于 NC 组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果见表 1 和图 3、图 4。

表 1 NC 组、Si-GATAD1 组 HCT-116、RKO 细胞及 NC 组、pMZ-GATAD1 组 Caco-2 细胞迁移能力比较

Tab.1 Comparison of migration of HCT-116 and RKO cells in NC group,Si-GATAD1 group, and Caco-2 cells in NC group and pMZ-GATAD1 group				(% , $\bar{x} \pm s$)
组别	n	划痕愈合率		
		培养 12 h	培养 24 h	
HCT-116 细胞				
NC 组	3	36.73 \pm 5.87	54.29 \pm 7.11	
Si-GATAD1 组	3	21.89 \pm 3.25 ^a	37.34 \pm 5.52 ^a	
RKO 细胞				
NC 组	3	58.15 \pm 6.92	84.24 \pm 9.74	
Si-GATAD1 组	3	45.89 \pm 7.85 ^a	73.49 \pm 10.04 ^a	
Caco-2 细胞				
NC 组	3	26.79 \pm 4.41	43.33 \pm 2.57	
pMZ-GATAD1 组	3	61.31 \pm 5.88 ^a	73.43 \pm 4.94 ^a	

注:与 NC 组比较^a $P < 0.01$ 。

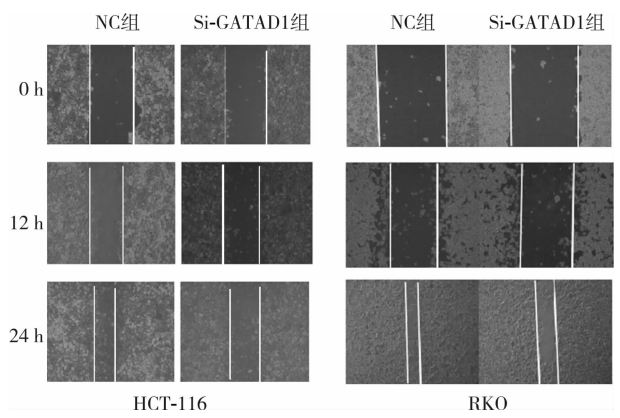


图 3 NC 组、Si-GATAD1 组 HCT-116、RKO 细胞的迁移

Fig.3 Migration of HCT-116 and RKO cells in NC group and Si-GATAD1 group

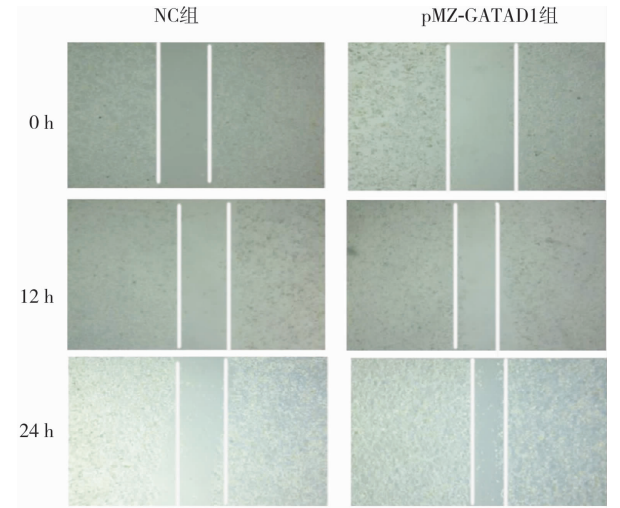


图 4 NC 组、pMZ-GATAD1 组 Caco-2 细胞的迁移

Fig.4 Migration of Caco-2 cells in NC group and pMZ-GATAD1 group

2.4 NC 组、Si-GATAD1 组 RKO、HCT-116 细胞及 NC 组、pMZ-GATAD1 组 Caco-2 细胞中 PI3K、Akt、p-Akt、cyclin D1 蛋白相对表达量比较

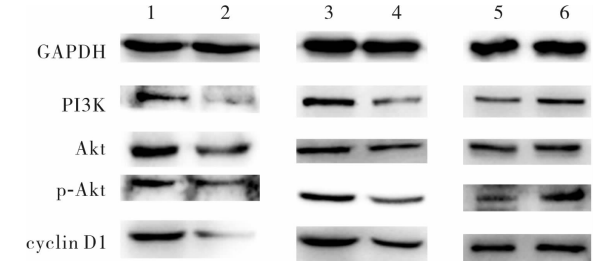
Si-GATAD1 组 RKO、HCT-116 细胞中 PI3K、p-Akt、cyclin D1 蛋白相对表达量均显著低于 NC 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。pMZ-GATAD1 组 Caco-2 细胞中 PI3K、p-Akt、cyclin D1 蛋白相对表达量均显著高于 NC 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Si-GATAD1 组 RKO、HCT-116 细胞及 pMZ-GATAD1 组 Caco-2 细胞中 Akt 蛋白相对表达量与 NC 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果见表 2 和图 5。

表 2 NC 组、Si-GATD1 组 RKO、HCT-116 细胞及 NC 组、pMZ-GATAD1 组 Caco-2 细胞中 PI3K、Akt、p-Akt、cyclin D1 蛋白相对表达量比较

Tab. 2 Comparison of relative expression levels of PI3K, Akt, p-Akt, and cyclin D1 proteins in NC group, Si-GATD1 group RKO, HCT-116 cells, and NC group, pMZ-GATAD1 group Caco-2 cells

组别	<i>n</i>	PI3K	Akt	p-Akt	cyclin D1
RKO 细胞					
NC 组	3	0.494 ± 0.009	0.653 ± 0.013	0.605 ± 0.012	0.493 ± 0.006
Si-GATAD1 组	3	0.222 ± 0.014 ^a	0.611 ± 0.018	0.291 ± 0.009 ^a	0.176 ± 0.007 ^a
HCT-116 细胞					
NC 组	3	0.435 ± 0.004	0.715 ± 0.009	0.444 ± 0.006	0.615 ± 0.015
Si-GATAD1 组	3	0.208 ± 0.006 ^a	0.641 ± 0.016	0.223 ± 0.100 ^a	0.219 ± 0.017 ^a
Caco-2 细胞					
NC 组	3	0.361 ± 0.042	0.481 ± 0.005	0.526 ± 0.006	0.716 ± 0.007
pMZ-GATAD1 组	3	0.437 ± 0.007 ^a	0.424 ± 0.004	0.873 ± 0.013 ^a	0.864 ± 0.011 ^a

注：与 NC 组比较^a*P* < 0.05。



1: NC 组 RKO 细胞; 2: Si-GATAD1 组 RKO 细胞; 3: NC 组 HCT-116 细胞; 4: Si-GATAD1 组 HCT-116 细胞; 5: NC 组 Caco-2 细胞; 6: pMZ-GATAD1 组 Caco-2 细胞。

图 5 NC 组、Si-GATD1 组 HCT-116、RKO 细胞及 NC 组、pMZ-GATAD1 组 Caco-2 细胞中 PI3K、Akt、p-Akt、cyclin D1 蛋白的表达

Fig. 5 Expression of PI3K, Akt, p-Akt, and cyclin D1 proteins in NC group, Si-GATD1 group HCT-116, RKO cell, and NC group, pMZ-GATAD1 group Caco-2 cell

3 讨论

结肠癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一，也是导致世界范围内患者死亡的最常见原因之一，随着外科手术的发展，结肠癌的治疗经历了快速的发展，但患者的生存率没有得到明显提高^[6-8]，因此，寻找结肠癌治疗的新靶点具有重要意义。基因靶点治疗作为一种新的肿瘤治疗方法，选择合适且有效的基因靶点至关重要。

GATAD1 为 GATA 蛋白质家族成员之一，作为一种重要的转录因子，其在多种生物过程中起着重要的作用^[9-10]。GATAD1 被发现高表达于肝癌细胞中，其高表达显著增加了细胞周期 G₁ ~ S 期的停滞，促进肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭；此外，GATAD1 可增加 Akt 的磷酸化水平，促进 Akt 信号通路的活化^[5]。由此可知，GATAD1 作为一种关键的原癌基因，参与肝癌细胞的发生发展。本研究通过

对 Biogps 数据库的检索发现，GATAD1 在结肠癌组织中呈高表达，进一步实验观察了人正常结肠上皮细胞 NCM460 及结肠癌细胞 Caco-2、HCT-116、HCT-8、HT-29、RKO 中 GATAD1 蛋白的表达，结果显示，GATAD1 在结肠癌细胞 HT-29、HT-116、RKO、Caco-2、HCT-8 中的表达均高于正常结肠上皮细胞 NCM460，提示 GATAD1 可能参与结肠癌细胞的发生发展。而在本研究所采用的 5 种结肠癌细胞中，结肠癌细胞 HCT-116、RKO 中的 GATAD1 蛋白相对表达量显著高于 HCT-8、HCT-29 和 Caco-2 细胞，结肠癌细胞 Caco-2 中的 GATAD1 蛋白相对表达量显著低于结肠癌细胞 HCT-8、HCT-29，因此，选择结肠癌细胞 HCT-116、RKO 用于转染 GATAD1 干扰质粒，选择结肠癌细胞 Caco-2 用于转染 GATAD1 过表达质粒，以进行后续研究。

PI3K/Akt 信号通路和周期蛋白 cyclin D1 在结肠癌中常处于激活状态，相关研究表明，PI3K/Akt 信号通路的活化介导着结肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭，从而促进结肠癌的进展^[11-14]。在肿瘤信号的刺激作用下，PI3K 表达增加促使下游蛋白 Akt 磷酸化，p-Akt 蛋白表达上调增加下游靶基因蛋白的表达进而促进肿瘤的迁移和增殖^[15-17]；如 G 蛋白偶联受体 56 (G-protein coupled receptor 56, GPR56) 高表达于结肠癌细胞和组织中，且与患者的预后呈负相关，siRNA 抑制 GPR56 的表达后，显著抑制了 cyclin D1 蛋白的表达，从而抑制结肠癌细胞的增殖和迁移^[18]；B 细胞白血病/淋巴瘤 6B (B-cell leukemia/lymphoma 6 member B, BCL6B) 作为肿瘤抑制因子，其表达水平上调可降低 Akt 磷酸化，同时降低 cyclin D1 的表达，而这些现象可被 PI3K 抑制剂 LY294002 逆转，因此，BCL6B 通过 PI3K/Akt 信号通路抑制结肠癌细胞的迁移^[19]。基于此，本研究旨在探讨

GATAD1 是否与 GPR56 或 BCL6B 一样均是通过调节 PI3K/Akt 信号通路来影响结肠癌细胞的迁移。

本研究将结肠癌细胞 HCT-116、RKO 转染 SiRNA-GATAD1 质粒,Caco-2 细胞转染过表达 pMZ-GATAD1质粒,并进行划痕实验观察 GATAD1 对结肠癌细胞迁移的影响,结果显示,NC 组 HCT-116、RKO 细胞的划痕愈合率显著高于 Si-GATAD1 组,而 NC 组 Caco-2 细胞的划痕愈合率显著低于 pMZ-GATAD1组;以上结果说明 GATAD1 能够促进结肠癌细胞的迁移。Western blot 实验结果显示,NC 组 HCT-116、RKO 细胞中 PI3K、p-Akt、cyclin D1 蛋白表达均高于 Si-GATAD1 组,而 NC 组 Caco-2 细胞中 PI3K、p-Akt、cyclin D1 蛋白表达均低于 pMZ-GATAD1组,表明 GATAD1 能够上调 PI3K 的表达,进而促进 Akt 的磷酸化、增加 cyclin D1 的表达,从而促进结肠癌细胞的迁移。

4 结论

GATAD1 高表达于结肠癌细胞中,且通过调控 PI3K/Akt 信号通路而促进结肠癌细胞的迁移。本研究为结肠癌患者的基因靶点治疗提供了新的思路,但 GATAD1 调控结肠癌细胞迁移能力的其他分子机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] SIEGEL R L,GIAQUINTO A N,JEMAL A. Cancer statistics,2024 [J]. *CA Cancer J Clin*,2024,74(1):12-49.

[2] VASQUEZ E G,NASCREDIN N,VALBUENA G N,et al. Dynamic and adaptive cancer stem cell population admixture in colorectal neoplasia[J]. *Cell Stem Cell*,2022,29(8):1213-1228.

[3] RAVID LUSTIG L,SAMPATH KUMAR A,SCHWÁMMLE T,et al. GATA transcription factors drive initial Xist upregulation after fertilization through direct activation of long-range enhancers[J]. *Nat Cell Biol*,2023,25(11):1704-1715.

[4] ZOU X,MA L,ZHANG Y,et al. GATA zinc finger protein p66beta promotes breast cancer cell migration by acting as a co-activator of Snail[J]. *Cell Death Dis*,2023,14(6):382.

[5] SUN W,ZHANG Y,WONG K C,et al. Increased expression of GATA zinc finger domain containing 1 through gene amplification promotes liver cancer by directly inducing phosphatase of regenerating liver 3[J]. *Hepatology*,2018,67(6):2302-2319.

[6] 蒋永杰,寇邦国,杜文龙,等. 基于术前 NLR、LMR、CEA 和 CA19-9 对结肠癌根治术后预后列线图预测模型的构建及评价[J]. *解放军医学杂志*,2022,47(9):893-901.

JIANG Y J,KOU B G,DU W L,et al. Construction and evaluation of nomogram prognostic model based on preoperative NLR,LMR,

CEA and CA19-9 for patients with colon cancer after radical resection[J]. *Med J Chin PLA*,2022,47(9):893-901.

[7] GURBA A,TACIAK P,SACHARCZUK M,et al. Gold (III) derivatives in colon cancer treatment[J]. *Int J Mol Sci*,2022,23(2):724.

[8] BOURDAKOU M M,SPYROU G M,KOLIOS G. Colon cancer progression is reflected to monotonic differentiation in gene expression and pathway deregulation facilitating stage-specific drug repurposing [J]. *Cancer Genomics Proteomics*,2021,18(6):757-769.

[9] WANG X,SU D,WEI Y,et al. Effect of GATAD1 regulating the SRRM2 gene on recurrence of thyroid tumor and its molecular mechanism[J]. *Gland Surg*,2022,11(12):1897-1907.

[10] LIU W,ZHANG R,YU X,et al. CRISPR screen identifies GATAD1 as a synthetic lethal target with CDK4/6 inhibitors in estrogen receptor-positive breast cancer [J]. *Med Oncol*,2023,40(9):267.

[11] ALVARADO-ORTIZ E, ORTIZ-SÁNCHEZ E, SARABIA-SÁNCHEZ M A,et al. Mutant p53 gain-of-function stimulates canonical Wnt signaling via PI3K/Akt pathway in colon cancer[J]. *J Cell Commun Signal*,2023,17(4):1389-1403.

[12] LI P,ZHOU D,CHEN D,et al. Tumor-secreted IGF1 promotes proliferation and cytotoxic activity of CD8⁺ T cells through PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in colorectal cancer[J]. *J Biomed Sci*,2023,30(1):47.

[13] WANG R,LI S,HOU Q,et al. Propofol inhibits colon cancer cell stemness and epithelial-mesenchymal transition by regulating SIRT1, Wnt/ β -catenin and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways [J]. *Discov Oncol*,2023,14(1):137.

[14] BISHNUPURI K S,ALVARADO D M,KHOURI A N,et al. IDO1 and kynurenine pathway metabolites activate PI3K/Akt signaling in the neoplastic colon epithelium to promote cancer cell proliferation and inhibit apoptosis [J]. *Cancer Res*,2019,79(6):1138-1150.

[15] MAHARATI A,MOGHBELI M. PI3K/AKT signaling pathway as a critical regulator of epithelial-mesenchymal transition in colorectal tumor cells[J]. *Cell Commun Signal*,2023,1(21):201.

[16] 陈小霞,陈国忠,梁毅锋,等. 靶向 PI3K/Akt 信号通路中医药治疗胃癌的研究进展[J]. *中华中医药学刊*,2022,40(3):125-130.

CHEN X X,CHEN G Z,LIANG Y F,et al. Targeted intervention of PI3K/Akt signaling pathway in treatment of gastric cancer with traditional Chinese medicine [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*,2022,40(3):125-130.

[17] YIN Y,DAI H,SUN X,et al. HRG inhibits liver cancer lung metastasis by suppressing neutrophil extracellular trap formation[J]. *Clin Transl Med*,2023,6(13):1283.

[18] LIM D R,KANG D H,KUK J C,et al. Prognostic impact of GPR56 in patients with colorectal cancer [J]. *Neoplasma*,2021,68(3):580-589.

[19] GU Y,LI A,SUN H,et al. BCL6B suppresses proliferation and migration of colorectal carcinoma cells through inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*,2018,41(5):2660-2668.