

LIMK1 在结肠癌中表达与沉默对人结肠癌细胞迁移与侵袭的影响

苏 坚^{1,2}, 潘志兵^{2,3}, 史 玲², 向姝霖², 夏 红², 董 琳², 廖爱军^{2,3}, 苏 琦^{2,3}

(1. 南华大学附属第二医院病理科 湖南省胃癌研究中心, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学肿瘤研究所 湖南省高校肿瘤细胞与分子病理学重点实验室; 3. 南华大学附属第一医院病理科)

摘 要: **目的** 探讨 LIMK1 在结肠癌中的表达与临床病理参数的关系和沉默 LIMK1 对人结肠癌 SW480 细胞迁移与侵袭的影响。 **方法** 免疫组化检测 LIMK1 在结肠癌表达; RNA 干扰建立 LIMK1-miR/SW480 细胞株; RT-PCR 与 Western blot 分别检测 LIMK1 mRNA 与蛋白及磷酸化 LIMK1 表达; 划痕实验和侵袭实验检测沉默 LIMK1 对 SW480 细胞迁移与侵袭的影响。 **结果** 免疫组化显示, LIMK1 在结肠癌中表达明显高于结肠正常组织, 高分化腺癌表达明显低于中分化与低分化腺癌, 而低分化高于中分化腺癌; <5.0 cm 的结肠癌表达明显低于 ≥5.0 cm; 淋巴结转移显著高于无转移; Dukes 分期 A + B 组表达明显低于 C + D 组 ($P < 0.05$)。RT-PCR 与 Western blot 显示, LIMK1-miR/SW480 细胞 LIMK1 mRNA 与蛋白表达明显下调, 表明成功构建稳定沉默 LIMK1 基因的 SW480 细胞。免疫细胞化学证实, 沉默组 LIMK1 表达较未转染组与空载体组明显降低。Western blot 显示, 沉默组 LIMK1 和磷酸化 LIMK1 较未转染组与空载体组明显下调 ($P < 0.05$)。划痕实验显示, 沉默组癌细胞迁移率 (22.53%) 较对照组 (76.50%) 与空载体组 (72.14%) 明显降低 ($P < 0.05$)。侵袭实验发现, 沉默组穿膜细胞 (43.67 ± 1.51 个) 较未处理组 (143.33 ± 1.52 个) 与空载体组 (136.34 ± 1.53 个) 明显减少 ($P < 0.05$)。 **结论** LIMK1 表达与结肠癌发生、大小、淋巴结转移及 Dukes 分期有关。沉默 LIMK1 基因可抑制人结肠癌 SW480 细胞迁移与侵袭。

关键词: 结肠癌; SW480 细胞; LIMK1; RNA 干扰; 迁移与侵袭

中图分类号: R735.35 **文献标识码:** A

Expression of LIMK1 and the Effect of Silence LIMK1 for Migration and Invasion in Human Colon Cancer

SU Jian, PAN Zhibin, SHI Ling, et al

(Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of LIMK1 and the effects of silence LIMK1 for migration and invasion in human colon cancer. **Methods** The stable low expression of LIMK1-miR/SW480 cells was established by RNA interference and validated by RT-PCR and Western blot in SW480 cells. The effects of expression of LIMK1 and p-LIMK1 in LIMK1-miR/SW480 cells was detected by Western blot and Immunocytochemistry. Migration and invasion potentials were examined by scratch test and transwell membrane assays. **Results** LIMK1 expression in colon cancer was significantly higher than in the normal tissue, lower in the well-differentiated than in the moderately differentiated and poorly differentiated adenocarcinoma, and lower in moderately differentiated than in poorly differentiated adenocarcinoma; The expression of LIMK1 in volume <5.0 cm was lower than in ≥5.0 cm; that lymph node metastasis was significantly higher than that of non-lymph node

收稿日期: 2013-10-12

基金项目: 国家自然科学基金 (31000629, 81102854)。

作者简介: 苏坚, 硕士, 主治医师, 研究方向: 结肠癌防治的分子机制, E-mail: sj5929@163.com。并列第一作者潘志兵, 硕士生, 研究方向: 结肠癌防治的分子机制, E-mail: 675643731@qq.com。通讯作者廖爱军, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 胃肠肿瘤发生与防治的分子机制, E-mail: aijun.liao@163.com。通讯作者苏琦, 教授, 博士生导师, 研究方向: 肿瘤发生与防治的分子机制, E-mail: suqi1945@163.com。

metastasis; Dukes stage A + B was significantly lower than in C + D ($P < 0.05$). RT-PCR and Western blot showed that the expression of LIMK1 mRNA and protein was significantly downregulated in LIMK1-miR/SW480, indicating the stable low expression of LIMK1 cells were successfully established by microRNA interference. The expression of LIMK1 and p-LIMK1 in the silence LIMK1 group compared to the no-transfection and vector groups was significantly downregulated by Western blot, and the expression of LIMK1 in the silence group compared to the no-transfection and vector groups was significantly decreased by Immunocytochemistry. Scratch test revealed that the cell transport ratio of silence group was 22.53%, which was lower than 76.50% of no-transfection and 72.14% of vector groups ($P < 0.05$). Transwell assay exhibited that the number of cancer cells which passed through the matrigel membrane was 43.67 ± 1.51 in silence group which was decreased compared with 143.33 ± 1.52 in no-transfection and 136.34 ± 1.53 in vector groups ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of LIMK1 is closely related to carcinogenesis, tumor size, differentiation, lymph node metastasis and Dukes stage in colon cancer. Silence LIMK1 gene could inhibit the migration and invasion in SW480 cells.

Key words: human colon cancer; SW480 cell; LIMK1; RNA interference; migration and invasion

结肠癌是世界上第三位最常见恶性肿瘤,据最新统计,全球每年新发病例 120 余万和近 61 万人死亡,且其发生率和死亡率有逐渐上升的趋势^[1]。由于临床上患者就诊时大多已发生侵袭转移,治疗效果较差。因此,研究结肠癌迁移侵袭的机制和开发新一代有效低毒的抑制剂,对结肠癌的防治有重要意义。

研究证实, LIMK1 在肿瘤中高表达,并通过调控肌动蛋白解聚因子 ADF/Cofilin 磷酸化与去磷酸化之间的平衡,影响 actin 细胞骨架结构,促进肿瘤细胞侵袭,而 RNA 干扰 LIMK1 基因可明显减少肿瘤细胞迁移侵袭。LIMK1 经由上游信号分子介导调控的信号通路中处于中心地位,可能是有价值的靶点^[24]。然而,有关 LIMK1 在人结肠癌表达以及对细胞迁移和侵袭的影响鲜有报道,本文就此做一研究。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

人结肠癌 SW480 细胞株由本实验室保存。培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 完全培养基中 (Gibco 公司)。在 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度温箱中培养,每 2 天传一代。小牛血清 (杭州四季青生物工程公司), RPMI-1640 培养基 (Gibco 公司)。Transwell 小室 (Corning 公司), Matrigel (BD 公司), Total RNA Kit (Omega 公司), RT reagent kit (TaKaRa 公司), PCR 试剂盒 (Promega 公司)。BCA 蛋白定量检测试剂盒 (Pierce 公司), ECL 发光检测试剂盒和免疫组化试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司), LIMK1 (ab39641), Phospho LIMK1 (ab131341) 和 β -actin 兔多克隆抗体 (Abcam 公司)。

1.2 结肠癌标本与免疫组化染色

本院手术切除的结肠癌标本 87 例,其中, < 50

岁 38 例, ≥ 50 岁 49 例; 肿块直径 52 例 ≥ 5 cm, 35 例 < 5 cm; 高分化腺癌 10 例, 中分化腺癌 47 例, 低分化腺癌 30 例; 淋巴结转移 45 例, 无转移 42 例; Dukes A + B 期 41 例, C + D 期 46 例。SP 试剂盒、DAB 显色剂、0.1 mol/L PBS、0.01 mol/L 柠檬酸盐抗原修复液、EDTA 修复液均购自福州迈新生物技术公司,按试剂盒说明进行。结果判定: LIMK1 阳性表达为棕黄或棕褐色,定位于胞浆或胞核。根据阳性细胞染色程度及着色细胞百分率记分: 0 分不着色, 1 分浅棕色, 2 分深棕色; 着色细胞 < 5% 为 0 分, 5% ~ 25% 为 1 分, 26% ~ 50% 为 2 分, > 50% 为 3 分。两种分值相加, 1 分为 (-), 2 分为弱阳性 (+), 3 分为阳性 (++) ; > 4 分为强阳性 (+++)。

1.3 建立稳定低表达 LIMK1 基因的人结肠癌 SW480 细胞

1.3.1 重组质粒的构建与鉴定 LIMK1-microRNA 重组质粒 pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR 由 Invitrogen 公司构建和鉴定 (共构建了 4 个, 分别为 pcDNA6.2/LIMK1-miRNA 1、2、3、4)。根据分子克隆提供的操作步骤进行转化细菌, 挑选阳性转化细菌, 抽提质粒, 并经公司测序鉴定正确后用于实验。质粒的抽提按照质粒抽提试剂盒说明书进行。

1.3.2 建立稳定低表达 LIMK1 基因的人结肠癌 SW480 细胞 取对数生长期的 SW480 细胞, 调整细胞至 1×10^5 /mL, 取 0.5 mL 接种于 24 孔板, 37 °C 培养至细胞贴壁覆盖率达 70% ~ 90% 时进行转染。无血清培养基清洗细胞 2 ~ 3 次后再换 opti-MEM 培养基洗 2 ~ 3 次, 加 400 μ L 无血清 opti-MEM 培养基, 继续培养。加入 0.8 μ g 重组质粒 (pcDNA6.2/LIMK1-miRNA) 于无血清 opti-MEM 培养基中, 设立空载体对照组 (Vector), 各组终体积为 50 μ L。将

2 μL LipofectamineTM 2 000 加入到 48 μL 无血清 opti-MEM 中并充分混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 ~ 5 min。滴入上述混合物于细胞, 充分混匀, 培养 6 h 后, 更换为 10% 胎牛 opti-MEM 培养液。48 h 后, 以 1:10 比例传代。调整细胞浓度至 10/mL, 以 100 μL /孔接种于 96 孔板。24 h 后, 观察并在培养板上标注有单个细胞的培养孔。确定最佳杀稻瘟菌素的筛选浓度为 4 mg/L。加药后筛选阳性细胞单克隆, 每隔 3 天换液并加药, 筛选 4 周后可见有抗性的单克隆出现, 免疫荧光显微镜观察。将阳性单克隆细胞扩大培养, 依次转入 24、6 孔板及培养瓶并冻存细胞。RT-PCR 与 Western Blot 鉴定阳性克隆 LIMK1 干扰效果。

1.4 划痕愈合实验

调整细胞为 1×10^6 /mL, 吸 1 mL 细胞悬液接种于 6 孔板, 加无血清 DMEM 培养 6 h, 使细胞呈单层贴壁生长状态。用 10 μL Eppendorf Tip 在细胞板上划痕, 无血清培养液洗 3 次, 加新鲜的无血清培养基。实验分 SW480 细胞组、空载体组、LIMK1-miR 组。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。按 0、24 h 取样、拍照, 用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量划痕距离, 计算平均值与标准差。细胞迁移率计算: 迁移率 (%) = (原划痕宽度 - 现划痕宽度)/原划痕宽度 $\times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.5 Transwell 侵袭实验

采用孔径 8.0 μm 的 24 孔 Transwell 小室。实验分组同上。准备基质胶, 将冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱的 matrigel 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 变成液态; 无血清培养基以 1:9 稀释, 吸 50 μL 均匀铺到 Transwell 上室, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 当出现“白色层”时, 在上室中加入 100 μL 预温的无血清的 DMEM 培养基, 孵育 30 min, 使基质胶再水化, 吸去剩余培养液, 消化细胞, 无血清培养基洗 3 次, 调整细胞为 1×10^6 个/mL; 取细胞悬液 100 μL 加入上室, 下室加 500 μL 完全培养基; 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵育 24 h, 弃培养基, 擦拭上室细胞; 取出 transwell 用 PBS 洗 2 次, 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min, 倒置, 风干; 加 0.1% 结晶紫染色 20 min, PBS 洗 3 次, 擦净上室细胞; 倒置显微镜下随机计数 10 个视野的细胞, 取均数。每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次。侵袭抑制率 (%) = (对照组穿膜细胞 - 处理组穿膜细胞)/对照组穿膜细胞数 $\times 100\%$ 。

1.6 RT-PCR

用 Total RNA Kit 提取组织总 RNA, 按试剂盒说明书进行操作。在 AMV 酶的作用下逆转录合成 cD-

NA。LIMK1 及 β -actin 引物由上海生工合成。LIMK1: F5'-GGG GCA TCA TCA AGA GCA-3', R5'-GAG GAC TAG GGT GGT TCA G-3', 扩增长度为 138 bp; β -actin: F5'-ACA CTG TGC CCA TCT ACG AGG GG-3', R5'-ATG ATG GAG TTG AAG GTA GTT TCG TGG AT-3', 扩增长度为 367 bp。LIMK1 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 52.3 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 进行 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。 β -actin 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55.0 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 进行 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, BIO-RAD 凝胶成像系统拍照, AlphaImager 2200 软件进行扫描, 以相对光密度代表基因表达丰度, 以 LIMK1 表达丰度/ β -actin 表达丰度计算平均光密度值。实验重复 3 次。

1.7 Western blot 检测

收集细胞, 预冷 PBS 洗 3 次, 吸尽残留液后, 加入适量体积裂解液 (100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-Hcl pH7.6, 1 mmol/L EDTA pH 8.0, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Aprotinin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PMSF), 冰上裂解 1h, 刮下后转移至 EP 管中, 12 000 $\times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min, 吸取上清液, 即为细胞总蛋白。BCA 法进行蛋白浓度测定。调节样品浓度, 以每孔 30 μg 蛋白加样, 加入等体积 2 $\times$ SDS 加样缓冲液, 煮沸 5 min, SDS-PAGE 胶电泳; 电泳分离后的蛋白电转至 PVDF 膜上; 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 1 h; 加一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 每次 15 min; 羊抗兔 II 抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 每次 15 min; 用 ECL 发光法检测蛋白表达状况, 图像分析软件 AlphaImager 2 200 测定印迹区带的光密度。实验重复 3 次。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件 One-Way Anova 或 t 检验进行统计学处理, 不同组间的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 LIMK1 蛋白表达与结肠癌临床病理的关系

图 1 和表 1 显示, LIMK1 在结肠癌组织阳性表达 (75.86%) 明显高于结肠正常组织 ($P < 0.05$); 高分化腺癌表达 (40.00%) 明显低于中分化 (70.21%) 与低分化腺癌 (96.67%) ($P < 0.05$), 而低分化高于中分化腺癌 ($P < 0.05$); < 50 岁与 ≥ 50 岁患者表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 肿瘤直径 < 5.0 cm 的结肠

癌表达(57.14%)明显低于 ≥ 5.0 cm(88.46%)($P < 0.05$);淋巴结转移组表达(97.78%)显著高于无转移的(52.38%)($P < 0.05$);Dukes 分期 A + B 组表达

(60.98%)明显低于 C + D 组(89.13%)($P < 0.05$)。表明 LIMK1 表达与患者年龄无关,而与肿瘤发生、大小、淋巴结转移及 Dukes 分期有关。

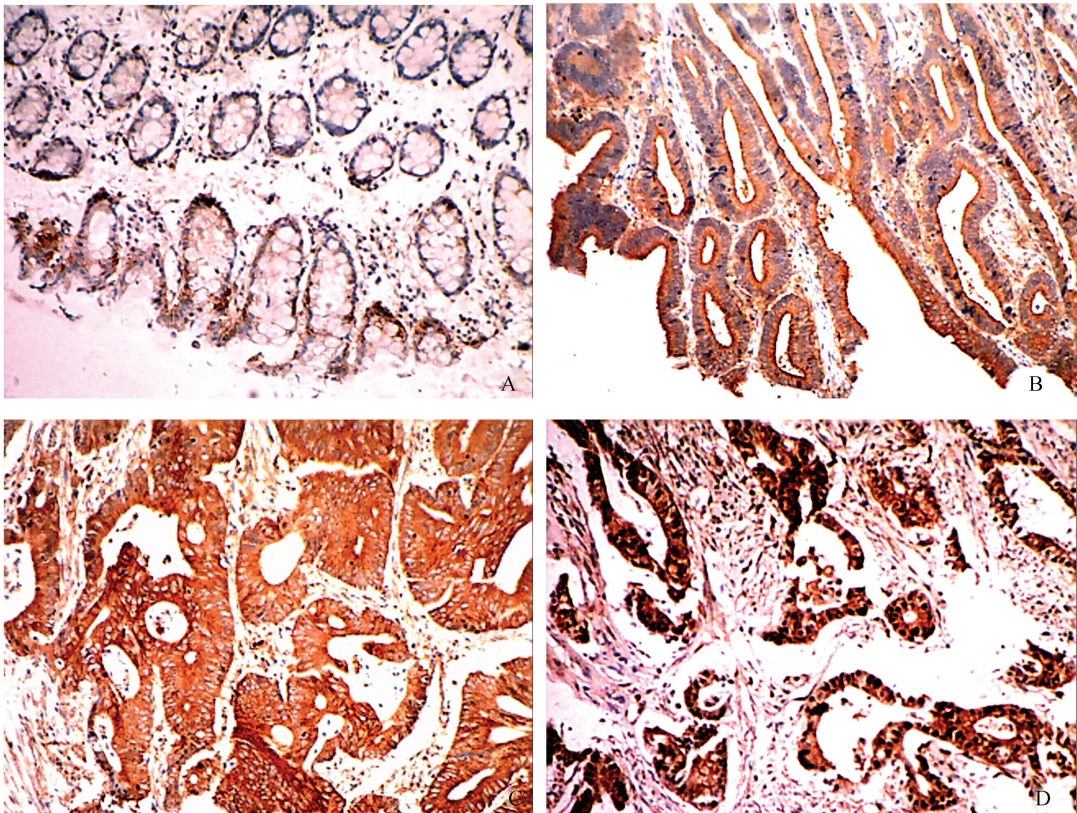


图1 LIMK1 蛋白在结肠癌组织中表达(SP×10) A:正常黏膜;B:高分化腺癌;C:中分化腺癌;D:低分化腺癌

表1 LIMK1 蛋白表达与临床病理的关系

临床指标	n	阳性(例,%)	χ^2	P
年龄				
<50 岁	38	28(73.68)	0.175	0.676
≥ 50 岁	49	38(77.55)		
肿瘤大小				
<5.0 cm	35	20(57.14)	11.206	0.001
≥ 5.0 cm	52	46(88.46)		
组别				
正常黏膜	34	7(20.58)	34.574	0
结肠癌	87	66(75.86)		
病理分级				
高分化	10	4(40.00)	16.684	0
中分化	47	33(70.21)		
低分化	30	29(96.67)		
淋巴结转移				
有	45	44(97.78)	25.483	0
无	42	22(52.38)		
Dukes 分期				
A + B	41	25(60.98)	9.384	0.002
C + D	46	41(89.13)		

2.2 沉默 LIMK1 基因 pcDNA6.2/LIMK1-miRNA/SW480 细胞的建立和鉴定

构建的 LIMK1 基因干扰质粒 (pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-LIMK1-miRNA1、miRNA2、miRNA3、miRNA4)在脂质体的介导下转染 SW480 细胞,可见大量绿色荧光表达,表明 LIMK1 基因干扰质粒已成功转入细胞中(图 2A)。

图 2B 所示,各组总 RNA 可见较明显的 28S、18S 带。RT-PCR 检测显示, LIMK1-miR1、-miR2、-miR3 和-miR4 各组较未转染组与空载体组 LIMK1 mRNA 表达明显下调,而 LIMK1-miR1 组干扰效率可达 90% 以上(图 2C)。Western blot 检测也显示, LIMK1-miR1、-miR2、-miR3 和-miR4 各组较未转染组与空载体组 LIMK1 蛋白表达显著降低,且以 LIMK1-miR1 干扰组效果最明显,与 RT-PCR 结果一致(图 2D)。因此,选取 LIMK1-miR1 作为后续研究。

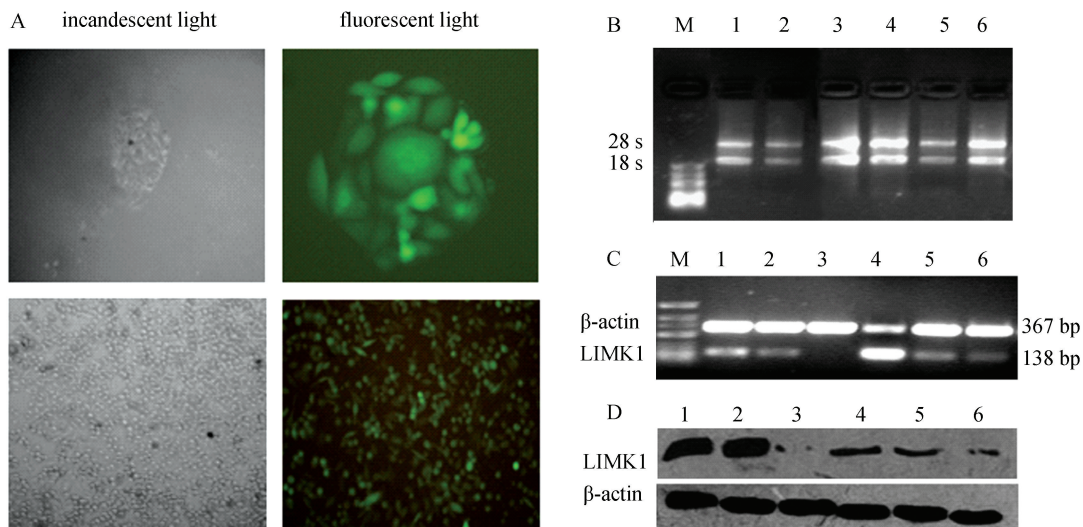


图 2 稳定低表达 LIMK1 基因 SW480 细胞系的建立和鉴定 A:阳性单克隆筛选与扩增;B:琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量;C,D:RT-PCR 与 Western blot 检测沉默 LIMK1 基因效果. M:Marker;1:SW480;2:Vector;3:LIMK1 miR1;4:LIMK1 miR3;5:LIMK1 miR3;6:LIMK1 miR4

2.3 沉默 LIMK1 对 SW480 细胞 LIMK1 和 p-LIMK1 蛋白表达的影响

图 3A 显示,沉默组 LIMK1 和 p-LIMK1 蛋白表达较未转染组与空载体组明显下调($P < 0.05$)。免

疫细胞化学检测证实,沉默组 LIMK1 蛋白表达较未转染组与空载体组明显降低(图 3B)。表明沉默 LIMK1 可明显下调 SW480 细胞 LIMK1 蛋白表达和抑制 LIMK1 蛋白磷酸化。

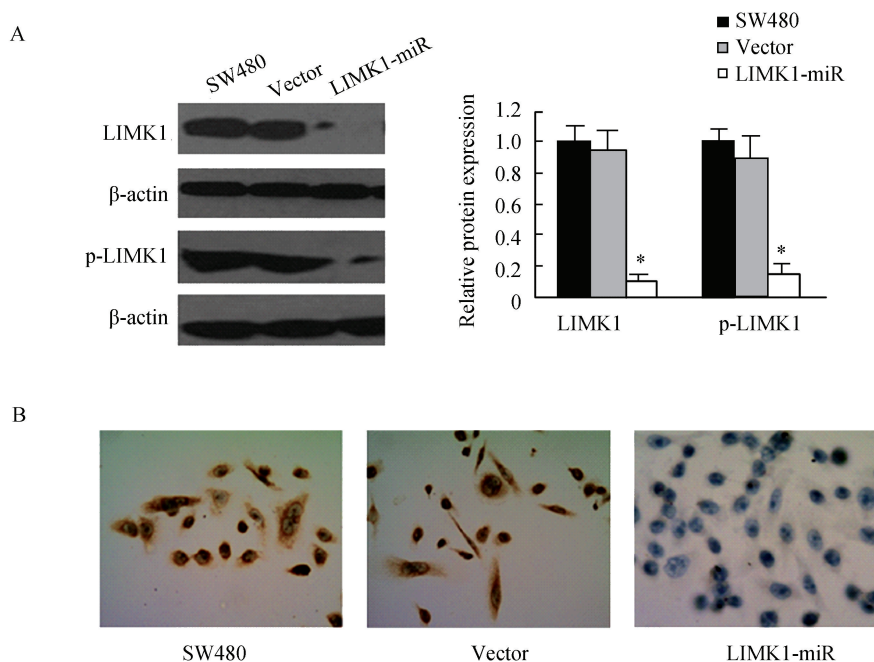


图 3 沉默 LIMK1 对 SW480 细胞 LIMK1 与 p-LIMK1 蛋白的表达影响 A:Western blot 检测;B:免疫细胞化学检测. 与对照组比较, *: $P < 0.05$

2.4 LIMK1 基因沉默对 SW480 细胞迁移的影响

图 4 显示,对照组、空载体组与 LIMK1 沉默组在 0 h 时,划痕距离分别为 $190.90 \pm 0.57 \mu\text{m}$ 、

$195.20 \pm 0.30 \mu\text{m}$ 与 $195.30 \pm 0.22 \mu\text{m}$,差异无显著性($P > 0.05$)。24 h 后,LIMK1 沉默组划痕距离 $151.1 \pm 12.1 \mu\text{m}$ 较对照组 $44.6 \pm 17.28 \mu\text{m}$ 与空载

体组 $54.30 \pm 8.38 \mu\text{m}$ 明显增宽, 细胞迁移率 (22.53%) 较对照组 (76.50%) 与空载体组

(72.14%) 明显降低 ($P < 0.05$)。表明沉默 LIMK1 基因可抑制 SW480 细胞迁移能力。

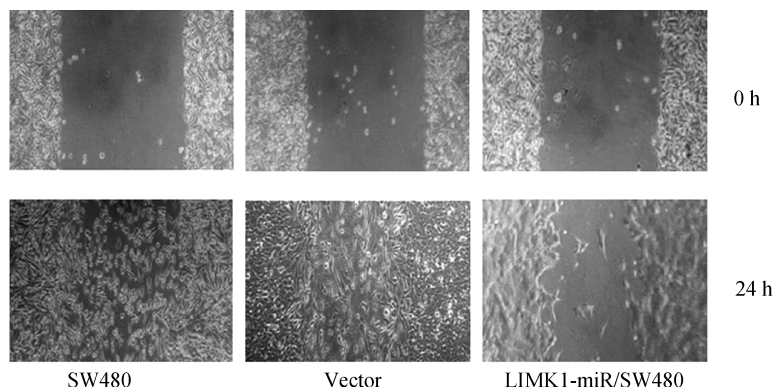


图4 沉默 LIMK1 基因对 SW480 细胞迁移的影响 ($\times 10$)

2.5 LIMK1 基因沉默对 SW480 细胞侵袭的影响

侵袭实验结果显示, 沉默 LIMK1 组穿膜细胞 (43.67 ± 1.51 个) 较未处理组 (143.33 ± 1.52 个) 与空

载体组 (136.34 ± 1.53 个) 明显减少 ($P < 0.05$); 未处理组与空载体组差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 5)。表明沉默 LIMK1 基因可抑制 SW480 细胞侵袭能力。

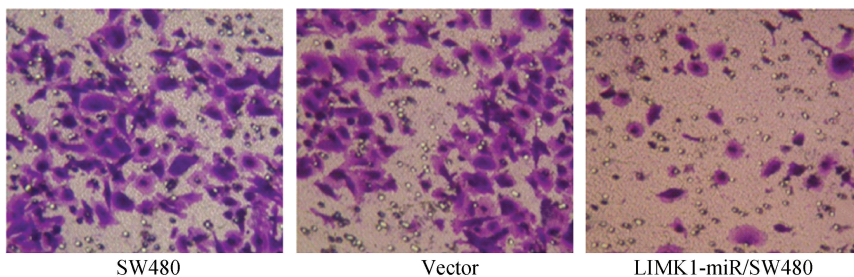


图5 沉默 LIMK1 基因对 SW480 细胞侵袭的影响 ($\times 20$)

3 讨 论

肿瘤转移的关键因素是肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力, 靶向抑制肿瘤细胞迁移侵袭过程的基因为治疗肿瘤提供了新思路。大量研究证实, 细胞迁移是由细胞伪足启动的高度整合的多阶段过程。迁移和侵袭的细胞形成的伪足结构取决于其形态、结构与功能特征, 这些结构的形成由时空调控的肌动蛋白聚合作用所驱动。actin 细胞骨架重组是肿瘤细胞迁移、粘附和侵袭的基本, 有众多分子参与了肌动蛋白聚合与解聚的调节, 其中, LIMK 基因就是一个重要的分子^[5-8]。

LIMK 在肿瘤迁移侵袭过程中发挥重要作用, 其通过对 ADF/cofilin 磷酸化与去磷酸化的平衡进行调节而影响肌动蛋白细胞骨架结构, 促使肿瘤细胞发生迁移和侵袭。这个过程主要受 Rac1-ROCK/PAK-LIMK-

ADF/Cofilin 通路调控, 而 LIMK 位于这一精细调控信号通路的中心, 因此, LIMK 可能是开发肿瘤侵袭和转移新的治疗药物的候选靶点^[2,5]。LIMK1 磷酸化可灭活 Cofilin/ADF, RNA 干扰 LIMK1 表达可明显减少鼠腹水肝细胞癌 MM1 细胞迁移, 提示 LIMK1 介导 cofilin/ADF 磷酸化和去磷酸化与肿瘤细胞迁移与侵袭有关^[5]。采用 CDK 抑制剂 p57 (kip2) 可通过 LIMK/cofilin 途径抑制鼻咽癌细胞迁移侵袭, 而沉默 p57 (kip2) 则可促进迁移侵袭^[9]。LIMK1 在乳腺癌 MDA-MB-435 细胞高表达可促进细胞增殖和侵袭, 上调 uPA 和 uPAR 表达, 增加裸鼠移植瘤生长, 促进肿瘤血管形成, 诱导肝、肺转移^[10]。沉默 LIMK1 基因或 LIMK1 抑制剂可降低 cofilin 磷酸化, 抑制乳腺癌等肿瘤细胞侵袭转移^[3,4,11]。LIMK1 高表达可促进耐药的骨肉瘤 MG63/VCR 细胞侵袭转移, 而沉默 LIMK1 基因能够废除

MG63/VCR 细胞侵袭能力^[12]。Chhavi 等^[13]发现宫颈癌 LIMK1 表达较正常组织与 CIN 高 4.6 与 3.0 倍。LIMK1 表达与子宫颈癌侵袭呈明显正相关,而与生存率呈负相关。免疫组化检测发现,LIMK1 在 76% 乳腺癌胞浆高表达,同时伴有 52% 核内表达,而正常乳腺组织仅有 48% 胞浆与 27% 胞核表达,并且,LIMK1 可促进 MDA-MB-231 细胞侵袭与裸鼠移植瘤肿瘤生长^[14]。

本研究显示,LIMK1 在结肠癌中表达明显高于结肠正常组织,高分化腺癌 LIMK1 表达明显低于中分化与低分化腺癌,而中分化显著低于低分化腺癌;直径 <5.0 cm、淋巴结转移和 Dukes 分期 C + D 组结肠癌 LIMK1 表达分别明显高于 ≥5.0 cm、无淋巴结转移和 A + B 组,表明 LIMK1 表达与结肠癌的发生、分化程度、肿瘤大小、淋巴结转移、临床分期密切相关。并且,沉默 LIMK1 基因后,发现 LIMK1 和 p-LIMK1 蛋白表达明显下调,迁移与侵袭能力显著下降。表明沉默 LIMK1 基因可明显抑制 SW480 细胞迁移和侵袭能力,LIMK1 可能是导致结肠癌侵袭转移的重要分子。

近年来,研究发现二烯丙基二硫(DADS)具有明显抑制人结肠癌细胞增殖的作用^[15-17],并可通过阻断 Rac1-ROCK/PAK-LIMK-ADF/Cofilin 信号通路,下调 LIMK1 抑制 SW480 细胞迁移与侵袭^[18-19]。上述研究给予一个重要提示,靶向抑制 LIMK1 的药物将可能成为治疗结肠癌的新策略。

参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Manetti F. Recent findings confirm LIM domain kinases as emerging target candidates for cancer therapy[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2012, 12(5): 543-560.
- [3] Scott RW, Hooper S, Crighton D, et al. LIM kinases are required for invasive path generation by tumor and tumor-associated stromal cells[J]. J Cell Biol, 2010, 191(1): 169-185.
- [4] Crighton D, Olson MF. Trailblazing LIM kinases take the lead in collective tumor cell invasion[J]. Bioarchitecture, 2011, 1(1): 5-8.
- [5] Horita Y, Ohashi K, Mukai M, et al. Suppression of the invasive capacity of rat ascites hepatoma cells by knock-down of Slingshot or LIM kinase[J]. J Biol Chem, 2008, 283(10): 6013-6021.
- [6] Bernard O. Lim kinases, regulators of actin dynamics[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39(6): 1071-1076.
- [7] Yamaguchi H, Condeelis J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion[J]. Bio-

- chim Biophys Acta, 2007, 1773(5): 642-652.
- [8] Delorme V, Machacek M, DerMardirossian C, et al. Cofilin activity downstream of Pak1 regulates cell protrusion efficiency by organizing lamellipodium and lamella actin networks[J]. Dev Cell, 2007, 13(5): 646-662.
- [9] Chow SE, Wang JS, Lin MR, et al. Downregulation of p57kip² promotes cell invasion via LIMK/cofilin pathway in human nasopharyngeal carcinoma cells[J]. J Cell Biochem, 2011, 112(11): 3459-3468.
- [10] Bagheri-Yarmand R, Mazumdar A, Sahin AA, et al. LIM kinase 1 increases tumor metastasis of human breast cancer cells via regulation of the urokinase-type plasminogen activator system[J]. Int J Cancer, 2006, 118(11): 2703-2710.
- [11] Li R, Doherty J, Antonipillai J, et al. LIM kinase inhibition reduces breast cancer growth and invasiveness but systemic inhibition does not reduce metastasis in mice[J]. Clin Exp Metastasis, 2013, 30(4): 483-495.
- [12] Zhang H, Wang Y, Xing F, et al. Overexpression of LIMK1 promotes migration ability of multidrug-resistant osteosarcoma cells[J]. Oncol Res, 2011, 19(10-11): 501-509.
- [13] Chhavi, Saxena M, Singh S, et al. Expression profiling of G2/M phase regulatory proteins in normal, premalignant and malignant uterine cervix and their correlation with survival of patients[J]. J Cancer Res Ther, 2010, 6(2): 167-171.
- [14] McConnell BV, Koto K, Gutierrez-Hartmann A. Nuclear and cytoplasmic LIMK1 enhances human breast cancer progression[J]. Mol Cancer, 2011, 10: 75.
- [15] Liao QJ, Su J, Zhou XT, et al. Inhibitory effect of diallyl disulfide on proliferation of human colon cancer cell line SW480 in nude mice[J]. Ai Zheng, 2007, 26(8): 828-832.
- [16] Liao QJ, Su J, He J, et al. Effect of diallyl disulfide on cell cycle arrest of human colon cancer sw480 cells[J]. Ai Zheng, 2009, 27(2): 168-172.
- [17] Huang YS, Xie N, Su Q, et al. Diallyl disulfide inhibits the proliferation of HT-29 human colon cancer cells by inducing differentially expressed genes[J]. Mol Med Report, 2011, 4(3): 553-559.
- [18] 史玲, 苏坚, 廖前进, 等. 二烯丙基二硫下调 LIMK1 抑制人结肠癌 SW480 细胞迁移与侵袭[J]. 中国药理学通报, 2011, 28(2): 200-205.
- [19] Zhou Y, Su J, Shi L, et al. DADS downregulates the Rac1-ROCK1/PAK1-LIMK1-ADF/cofilin signaling pathway, inhibiting cell migration and invasion[J]. Oncol Rep, 2013, 29(2): 605-612.

(此文编辑:朱雯霞)