

CCDC3对结肠癌细胞增殖、迁移和侵袭功能的影响及其作用机制

贾艳梅^{1#*} 陈利荣^{1#} 倪菊华²

(¹山西医科大学汾阳学院医学检验系, 汾阳 032200; ²北京大学医学部生物化学与分子生物学系, 北京 100191)

摘要 该文研究了CCDC3基因对人结肠癌HCT116细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其作用机制。采用CCK-8法检测CCDC3对人结肠癌HCT116细胞增殖的影响。采用平板克隆和软琼脂克隆方法检测CCDC3对癌细胞克隆形成能力的影响。采用Transwell方法检测CCDC3对HCT116细胞迁移和侵袭的影响。采用Western blot法检测CCDC3对HCT116细胞上皮间质转化相关蛋白质水平的影响。采用体内成瘤实验检测CCDC3对HCT116细胞致瘤能力的影响。结果表明, CCDC3在癌细胞的生长调节中发挥重要的作用。过表达CCDC3显著促进癌细胞生长, 增强癌细胞的克隆形成能力, 增强癌细胞的迁移、侵袭和致瘤能力; 敲低CCDC3后, 癌细胞的恶性减弱。同时, 该研究还发现, CCDC3的表达与癌细胞发生上皮间质转化相关。这些研究结果表明, CCDC3可能是一个新的癌基因, 为结肠癌治疗寻找新的治疗靶点提供了线索。

关键词 结肠癌; 增殖; 细胞迁移和侵袭; EMT

The Effects and Mechanism of CCDC3 on Proliferation, Migration and Invasion of Human Colon Cancer Cells

Jia Yanmei^{1#*}, Chen Lirong^{1#}, Ni Juhua²

(¹Laboratory Medicine Department in Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China;

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China)

Abstract We studied the ability of CCDC3 gene on proliferation, migration and invasion of human colon cancer HCT116 cells and its regulatory mechanism in this study. The effect of CCDC3 on the proliferation of human colon cancer HCT116 cells was detected by CCK-8 assay. The effect of CCDC3 on the colony-forming ability of cancer cells was detected by plate clone and soft agarose. The effect of CCDC3 on the migration and invasion of HCT116 cells was detected by Transwell assay. The effect of CCDC3 on the protein level of epithelial-mesenchymal transition in HCT116 cells was detected by Western blot. The effect of CCDC3 on the tumorigenic ability of HCT116 cells was detected by tumor formation assay *in vivo*. The results showed that CCDC3 played an important role in the regulation of cancer cells growth. Overexpression of CCDC3 significantly promoted the growth of cancer cells, enhanced the colony-forming ability of cancer cells and enhanced the migration, invasion and tumorigenic abilities of cancer cells. After interfering with the expression of this gene, the malignancy of cancer cells weakened. At the same time, we also found

收稿日期: 2018-02-06 接受日期: 2018-08-27

山西医科大学汾阳学院校级科研基金(批准号: 2017C02)资助的课题

*共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0358-2100772, E-mail: jym928928@126.com

Received: February 6, 2018 Accepted: August 27, 2018

This work was supported by the Research Fund of Fenyang College of Shanxi Medical University (Grant No.2017C02)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-358-2100772, E-mail: jym928928@126.com

网络出版时间: 2018-09-27 11:25:38

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180927.1125.006.html>

that the expression of *CCDC3* was associated with epithelial-mesenchymal transition of cancer cell. These findings suggested that *CCDC3* might be a new oncogene that provided clues for finding new therapeutic targets for colon cancer.

Keywords colon cancer; proliferation; cell migration and invasion; EMT

结肠癌是消化系统最为常见的恶性肿瘤之一^[1]。随着人民生活水平的提升和膳食结构的改变,近年来国内统计发现,结肠癌的发病率及死亡率呈现出较为明显的上升趋势,且发病年龄也呈年轻化趋势^[2-3]。目前,结肠癌的治疗策略主要包括外科手术根治或姑息切除、化学药物治疗、放射治疗及生物治疗等,但是结肠癌治疗效果仍无明显突破,治疗的副反应使患者生存质量不佳,复发亦不少见。因此,探索结肠癌早期诊断和治疗的新的分子靶标显得尤为重要。

卷曲螺旋结构域(coiled coil domain containing, *CCDC*)结构基因或其表观遗传的改变与许多恶性肿瘤有关。近年来,多项研究表明,*CCDC*与肿瘤细胞侵袭、迁移及转移表型的获得有着直接的联系,如 *CCDC6*^[4-5]、*CCDC8*^[6]、*CCDC116*^[7]、*CCDC19*^[8]、*CCDC62*^[9]、*CCDC67*^[10]、*CCDC68*^[11]、*CCDC98*^[12-13]、*CCDC134*^[14]和*CCDC152*^[15]等蛋白成员在细胞的许多重要活动中起作用,如参与基因转录、细胞周期过程的调控,并与细胞凋亡、肿瘤侵袭密切相关。*CCDC3*是新发现的基因,编码Favine/*CCDC3*(NCBI蛋白进入NP_083080),它可能是一种细胞分泌因子,*CCDC3*在脂肪组织和主动脉中高表达。Liao等^[16]研究表明,*CCDC3*作为p63网络的下游参与者,通过抑制肝脏脂肪生成来调节肝脏脂质代谢。Kobayashi等^[17]的研究结果表明,Favine对脂肪细胞具有促脂肪生成作用。Azad等^[18]的研究结果表明,*CCDC3*抑制ECs中的TNF- α (tumor necrosis factor- α)/NF- κ B(nuclear factor-kappa B)诱导的促炎反应。Ugi等^[19]研究证明,腹部肥胖者的内脏脂肪组织中*CCDC3*的表达明显增加。Kobayashi等^[20]的研究表明,*CCDC3*是由脂肪细胞和内皮细胞分泌的蛋白质,其水平受激素和营养调节。但是,截至目前,还没有*CCDC3*基因与干细胞和肿瘤相关的研究报道。我们通过分析GEO数据库中的数据集,筛选得到*CCDC3*基因,推测它与干细胞和肿瘤相关;通过分析Oncomine数据库中肠癌相关的数据发现,*CCDC3*在癌组织中的表达量显著高于正常组织或癌旁组织,并发现其与已知的肠癌相关基因的共表达模式。根据以上结果,

我们推测*CCDC3*可能与这一类基因有着类似的功能,也许与肿瘤的干性相关,即有望成为肿瘤干细胞候选基因,于是我们选定*CCDC3*作为研究对象。本研究以我国常见的恶性肿瘤结肠癌为研究对象,通过体内外实验对其生物学特性、功能进行了研究,揭示了*CCDC3*在结肠癌中的作用及分子机制,为治疗结肠癌寻找新的诊断、治疗靶点提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料

人结肠癌细胞株Sw620、Lovo、HT29、Caco2、Sw480、HCT116和HCT8为肠癌细胞系,NCM460为永生化结肠上皮细胞,均购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。DMEM培养基、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素、0.02% EDTA+0.25%胰蛋白酶购自Gibco公司。Transwell培养板购自Corning公司。E-cadherin、N-cadherin、Vimentin和 β -actin抗体购自Cell Signaling Technology公司。HRP标记山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。SPF级6周龄的C57BL/B6小鼠和裸鼠均购自山西医科大学实验动物中心。相关动物实验均符合本单位动物伦理相关条例。

1.2 质粒

过表达质粒pLenti-CMV-Flag及敲低质粒骨架pLKO由北京大学医学部基础医学院生化系贾弘提教授实验室馈赠。内切酶*Xho* I、*Nhe* I、*Eco*R I、*Age* I和2 \times Q5 PCR mix购于NEB公司。通过PCR的方法以人的cDNA为模板将cDNA的编码区克隆到过表达质粒上,克隆*CCDC3*的引物为*CCDC3-Xho* I-F、*CCDC3-Nhe* I-R。通过双引物退火后连接到pLKO载体的*Eco*R I和*Age* I位点之间,构建敲低*CCDC3*的质粒pLKO-shC-1、pLKO-shC-2,敲低引物序列为shC-1-F/shC-1-R、shC-2-F/shC-2-R。

1.3 数据库分析

通过下载TCGA与Oncomine数据库中的结肠癌相关的数据,分别比较癌与癌旁组织中*CCDC3*与肠干细胞和肠癌中相关标记基因的表达量差异,通过R语言与Graphpad Prism 7软件做图。

1.4 包装慢病毒和感染HCT116细胞系

将293T细胞铺种至10 cm细胞培养皿中,当293T细胞系生长至密度为60%左右时,准备包装慢病毒。分别按照10 μg 质粒(已构建的CCDC3过表达质粒pLenti-CMV-Flag-CCDC3和敲低质粒pLKO-shC-1及pLKO-shC-2)、6 μg VSVG和4 μg p Δ 8.9通过PEI转染的方法转染至293T细胞当中,转染后12 h更换新鲜的DMEM完全培养基继续培养36 h后收集培养物,于1 200 r/min离心5 min,收集上清,再将上清用0.22 μm 滤器过滤,滤液即为病毒悬浮液。将HCT116细胞系接种至6孔板中,待HCT116细胞系生长至细胞密度为60%左右时,将2 mL病毒液与1 mL新鲜的DMEM完全培养基混匀,并加入polyBrane至6 $\mu\text{g}/\text{mL}$,之后加入到细胞中继续培养12 h,然后更换新鲜DMEM完全培养基继续培养48 h,更换DMEM完全培养基并添加终浓度为3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的嘌呤霉素。连续筛选2周之后即构建成相应的CCDC3过表达及敲低细胞系。在后续的功能检测实验中,转染空载体Vector的细胞系为过表达CCDC3细胞系CCDC-OE的对照组(在图注中称为对照组);转染Sh-Scramble的细胞系为转染Sh-CCDC3-1和Sh-CCDC3-2细胞系的对照组(在图注中称为对照组)。

1.5 分离小肠绒毛与隐窝区

肠道干细胞位于肠黏膜隐窝基底部,即基底隐窝是肠道干细胞的细胞库。小肠黏膜干细胞位于小肠黏膜隐窝位置的4~5层。正常情况下,位于隐窝基底部的肠道干细胞不断向隐窝顶部(肠腔方向)迁移,整个迁移过程要3~5天,在迁移过程中肠道干细胞分化形成不同的肠黏膜细胞。我们将野生型小鼠小肠剪成2~4 mm长的片段,放入25 mL预冷的2 mmol/L EDTA/PBS中,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床以80~100 r/min离心30~40 min之后,剧烈震荡10 s。当观察到液体浑浊之后,静置1 min,吸取上清,600 r/min离心5 min后收集沉淀,此时沉淀即为富集的小肠绒毛。向剩余的小肠片段中加入25 mL预冷的PBS后继续剧烈震荡10 min,之后将混合液用100 μm 细胞筛过滤2次之后,收集滤液并以800 r/min离心5 min,收集沉淀。此沉淀即为富集的小肠隐窝。

1.6 CCK-8法检测细胞增殖能力

将处于对数生长期的不同处理的HCT116癌细胞(Vector、CCDC3-OE、Sh-Scramble、Sh-CCDC3-1和Sh-CCDC3-2)用0.25%的胰酶消化,以每

孔5 000个细胞分别接种至96孔板中,并设置6个复孔。细胞贴壁后,每孔更换成100 μL 新鲜的完全培养基,并加入10 μL CCK-8溶液,在培养箱中继续培养1 h后,用酶标仪在450 nm测定吸光度(D)值。

1.7 平板克隆形成试验

将不同处理的HCT116癌细胞(Vector、CCDC3-OE、Sh-Scramble和Sh-CCDC3-1)以1 000/孔的细胞浓度接种到6孔板内,培养24 h后吸弃上清。PBS洗2次,4%多聚甲醛固定和结晶紫染色,扫描成像并计数细胞集落。

1.8 软琼脂克隆形成试验

首先,用蒸馏水分别制备出1.2%和0.7%两个浓度的低熔点琼脂糖液,高压灭菌后,维持在40 $^{\circ}\text{C}$ 中以免凝固。其次,按1:1比例使1.2%的琼脂糖和2 \times DMEM培养基(含有2 \times 抗生素和20%的小牛血清)混合后,取3 mL混合液注入直径6 cm平皿中(10 cm平皿加7~10 mL),冷却凝固,可作底层琼脂置CO₂温箱中备用。最后按1:1比例让0.7%的琼脂糖和2 \times DMEM培养基在无菌试管中相混,再向管中加入不同处理的HCT116癌细胞(Vector、CCDC3-OE、Sh-Scramble和Sh-CCDC3-1) 0.2 mL的细胞悬液,充分混匀,使得每孔细胞为500个,注入铺有1.2%琼脂糖底层的6孔板中,逐渐形成双琼脂层。待上层琼脂凝固后,置入37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂温箱中培养10~14天。用结晶紫染色,把平皿放置在倒置显微镜下,观察细胞克隆数,计算克隆形成率。

1.9 划痕实验检测细胞的迁移能力

将不同处理的HCT116癌细胞(Vector、CCDC3-OE、Sh-Scramble和Sh-CCDC3-1)以5 000/孔接种到6孔板内。当细胞长满培养板底部时用枪头比着直尺划线,枪头要垂直不能倾斜,然后用PBS洗细胞3次,去除枪头划下的脱落细胞,加入无血清培养基,血清饥饿处理12 h后取样拍照。

1.10 Transwell侵袭实验

取300 μL 无血清培养基,加入30 μL Matrigel,混匀(4 $^{\circ}\text{C}$ 操作,最好在冰浴上操作),加入上室各100 μL (3个室)。放入37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中,孵育4~5 h。消化不同处理的HCT116癌细胞(Vector、CCDC3-OE、Sh-Scramble和Sh-CCDC3-1),无血清培养基洗3次,计数,配成细胞悬液。用无血清培养基洗Matrigel洗1次。每孔加入100 μL 细胞悬液。下腔室中加入含血清20%的培养基。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中,孵育

20~24 h。取出Transwell用PBS洗2次, 4 °C 5%戊二醛固定。PBS洗2次, 加入结晶紫(0.1%)染色, 室温0.5 h, PBS洗2次, 用棉球擦去Transwell膜的上表面细胞, 显微镜下观察。计数每个200倍镜视野下细胞的数量, 每下室计3个视野后取平均值。

1.11 Western blot检测相关蛋白质水平

提取不同处理的HCT116癌细(Vector、CCDC3-OE、Sh-Scramble、Sh-CCDC3-1和Sh-CCDC3-2)总蛋白, 通过BCA法测定蛋白质浓度。将蛋白质样品进行SDS电泳后转移至硝酸纤维素膜, 用5%脱脂牛奶于37 °C封闭1 h后, 分别放入不同一抗孵育液中, 4 °C孵育过夜。第2天用PBST洗涤后, 再用辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育2 h, ECL显色发光, 对实验结果用Quantity One软件分析灰度值, 以 β -actin为内参, 计算目的蛋白与内参的比值。

1.12 建立Nude小鼠移植瘤模型

分别将处于对数生长期的 5×10^6 个不同处理的HCT116癌细胞(Vector、CCDC3-OE、Sh-Scramble和Sh-CCDC3-1)从皮下接种于裸鼠腋下, 每组细胞接种5只裸鼠, 在第7天后不同处理组陆续出现可触及肿瘤。定期测量肿瘤的大小, 当最大肿瘤的直径达2 cm时用CO₂处死荷瘤鼠, 收集肿瘤。计算肿瘤生长曲线公式为: 体积(mm³)=长径 \times 短径² \times 0.5。然后绘制肿瘤生长曲线。

1.13 统计学分析

各实验独立重复3次, 采用SPSS 17.0软件进行统计学分析, 数据以均数 \pm 标准差表示。各组之间的统计学差异分析选用方差分析(One-Way ANOVA)。P<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 数据库分析结果

通过重新分析GEO数据库中的数据, 将LGR5阳性的细胞与LGR5阴性的细胞分群, 并设定在两组中的变化量比值绝对值大于4倍为阈值。以此筛选得到总共530个基因, 其中包括已经鉴定出功能的基因, 比如LGR5、ASCL2、SOX9、OLFM4、SMOC2、TERT等。通过基因功能筛选我们发现, 截至目前为止, 还没有CCDC3基因与干细胞和肿瘤相关的研究, 于是我们选定CCDC3作为研究对象(图1A)。

与已知的肠癌相关基因的共表达分析发现, CCDC3与APC、PROC、ATOH1、C21ORF3等抑癌基

因呈负相关的表达模式。CCDC3的表达量与SOX9、OLFM4、ASCL2、LGR5等在小肠干细胞以及肠癌中高表达的基因呈现出相似的表达模式。我们猜测, CCDC3可能与这一类基因有着类似的功能(图1B)。

通过分析Oncomine数据库中肠癌相关的数据发现, 与正常组织(或癌旁组织)相比, CCDC3在癌组织中的表达量显著高于正常组织(或癌旁组织)(图1C)。

2.2 CCDC3在小肠干细胞和肠癌细胞系中的表达

我们分离了野生型小鼠的小肠绒毛(villi)与隐窝区(crypt), 检测小肠绒毛与隐窝区中CCDC3的mRNA的表达量发现, 与分化程度较高的肠绒毛区比较, CCDC3在包含干细胞以及分化程度较低的隐窝区有更高的表达量。同时, 用SOX9、OLFM4和ASCL2在小肠干细胞中高表达的基因作为阳性对照, 进一步验证了数据库中的数据, 即CCDC3在小肠干细胞中也呈高表达(图2A)。

通过检测常用的肠癌细胞系中CCDC3的mRNA表达量发现, 与永生化正常结肠上皮细胞NCM460相比, 在其他几种肠癌细胞系中, CCDC3的表达量显著高于正常对照细胞系(图2B)。

2.3 构建过表达和敲低CCDC3的HCT116细胞系

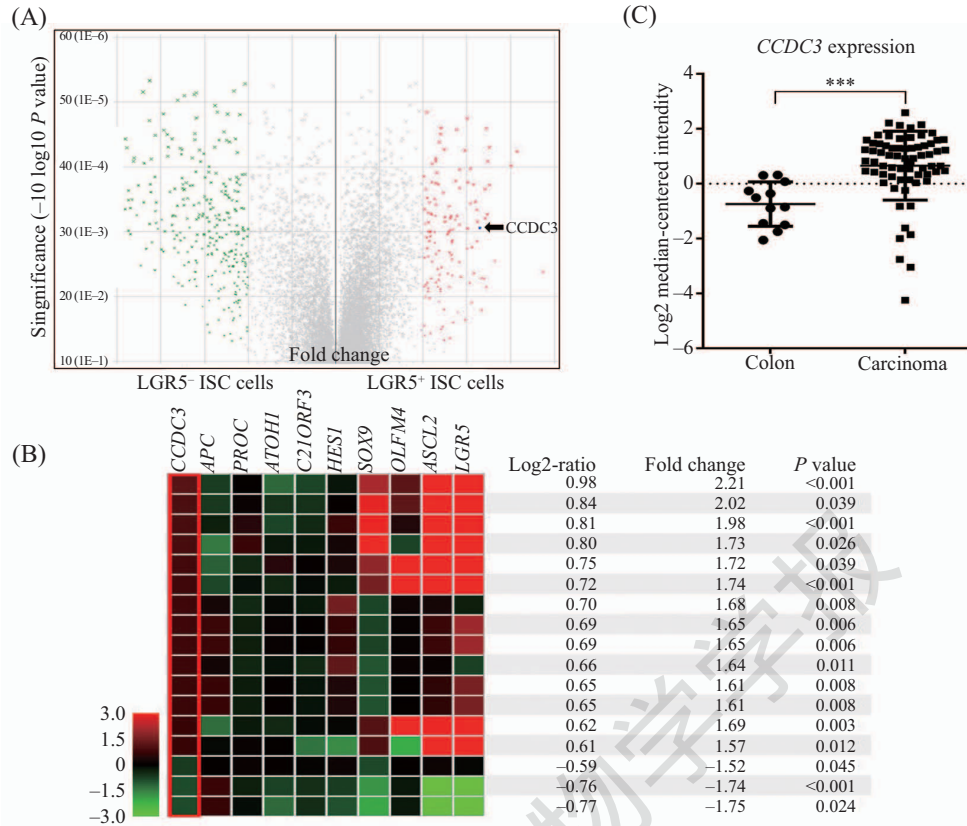
通过慢病毒感染得到过表达与敲低CCDC3的HCT116细胞系, Real-time PCR鉴定过表达及敲低效率。结果表明, 我们成功构建了过表达和敲低CCDC3的细胞系(图3)。从结果中可以看出, Sh-CCDC3-1的敲低效率高于Sh-CCDC3-2, 因此, 在后面的功能试验中, 我们选取Sh-CCDC3-1这株细胞作为研究对象。

2.4 过表达和敲低CCDC3对HCT116细胞增殖的影响

为了进一步研究CCDC3在肿瘤细胞增殖过程中的作用, 我们用CCK-8检测处于对数生长期的过表达和敲低CCDC3细胞的增殖情况。结果表明, 与对照组相比, 过表达CCDC3对HCT116细胞的增殖有明显的促进作用(图4A), 但是我们敲低CCDC3后, HCT116细胞的增殖能力明显被抑制(图4B)。

2.5 过表达和敲低CCDC3对HCT116细胞平板克隆能力的影响

为了进一步探讨CCDC3对肿瘤细胞克隆形成能力的影响, 我们检测了处于对数生长期的过表达和敲低CCDC3的细胞培养24 h后的细胞平板克

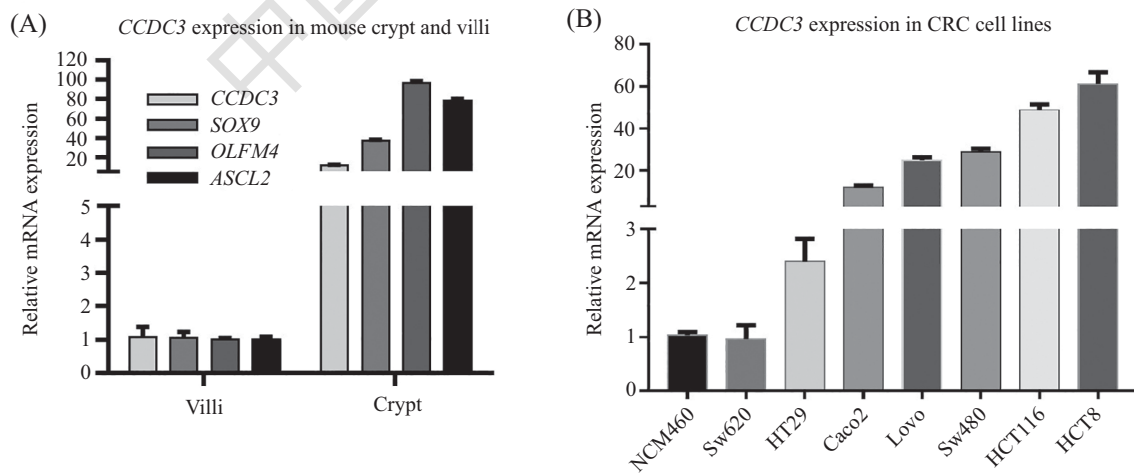


A: 在数据库中通过分析小肠上皮中LGR5⁺和LGR5⁻的细胞发现, *CCDC3*在LGR5⁺的细胞中表达量较高; B: 通过分析GEO数据库中*CCDC3*与小肠干细胞及肠癌相关的基因的共表达模式发现, *CCDC3*这一类基因有相同或者相反的表达模式; C: 通过分析Oncomine中肠癌相关数据库发现, *CCDC3*在结肠癌中表达量比正常结肠中高。****P*<0.001。

A: *CCDC3* was highly expressed in LGR5⁺ cells, by analyzing the LGR5⁺ and LGR5⁻ cells in the intestinal epithelium of the database; B: *CCDC3* has the same or opposite expression pattern, by analyzing the co-expression pattern of *CCDC3* with intestine cancer-associated genes and small intestine stem cells in the GEO database; C: the expression level of *CCDC3* in colon cancer was significantly higher than that in normal colon tissue, by analyzing the Oncomine colorectal cancer-related databases. ****P*<0.001.

图1 通过分析已发表的数据库发现基因*CCDC3*

Fig.1 Screening of gene *CCDC3* by analyzing published databases

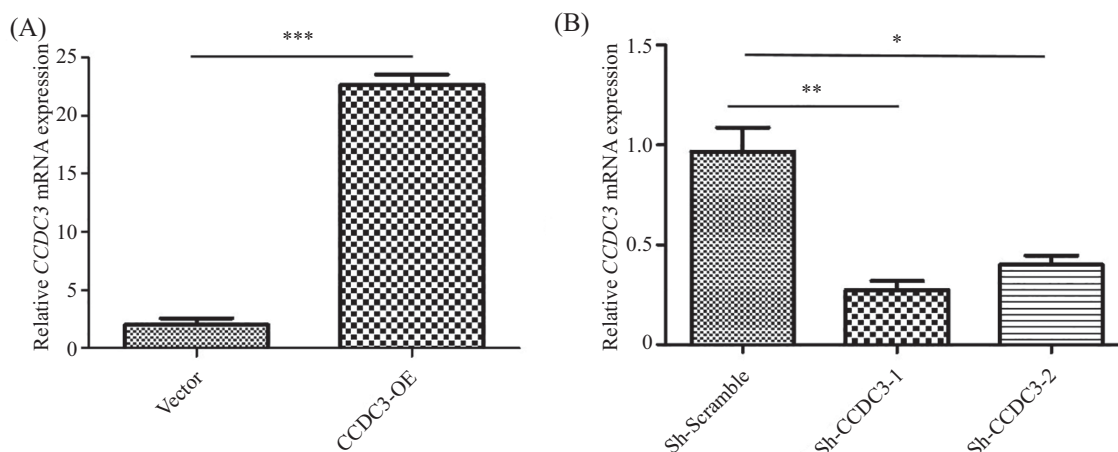


A: *CCDC3*在小肠干细胞中的表达; B: *CCDC3*在多种肠癌细胞系中的表达。检测8种肠相关细胞系中的*CCDC3*表达量, 其中Sw620、Lovo、HT29、Caco2、Sw480、HCT116和HCT8为肠癌细胞系, NCM460为永生化结肠上皮细胞, 作为正常对照组。

A: expression of *CCDC3* in small intestinal stem cells; B: expression of *CCDC3* in various intestinal cancer cell lines. Sw620, Lovo, HT29, Caco2, Sw480, HCT116 and HCT8 cell lines were intestinal cancer cell lines, and NCM460 was an immortalized colonic epithelial cell as a normal control.

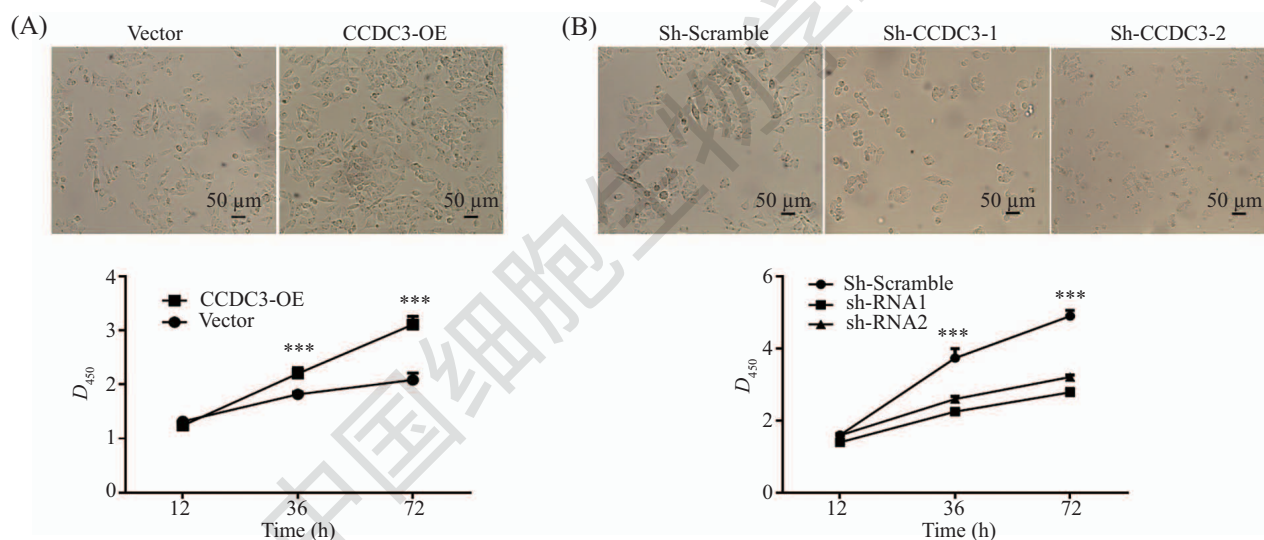
图2 *CCDC3*在小肠干细胞和肠癌细胞系中的表达

Fig.2 Expression of *CCDC3* in small intestine stem cells and intestine cancer cell lines



A: 过表达*CCDC3*细胞系的验证; B: 敲低*CCDC3*细胞系的验证。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。
A: verification of the *CCDC3* overexpression cell line; B: verification of the *CCDC3* knockdown cell line. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图3 *CCDC3*过表达和敲低*CCDC3*细胞系的构建
Fig.3 Construction of overexpression and knockdown *CCDC3* cell lines



A: 过表达*CCDC3*对HCT116细胞增殖的影响; B: 敲低*CCDC3*对HCT116细胞增殖的影响。*** $P < 0.001$, 与对照组相比较。
A: effect of *CCDC3* overexpression on proliferation of HCT116 cells; B: effect of *CCDC3* knockdown on proliferation of HCT116 cells. *** $P < 0.001$ vs control group.

图4 过表达或敲低*CCDC3*后对癌细胞增殖能力的影响
Fig.4 Effect of *CCDC3* overexpression or knockdown on the proliferation of cancer cells

隆能力。结果表明,与对照组相比,过表达*CCDC3*对HCT116细胞的平板克隆能力有明显的促进作用,增加了HCT116克隆形成的数量,差异显著($P < 0.01$)。但是我们敲低了*CCDC3*后,HCT116细胞的平板克隆能力明显被抑制,差异极显著($P < 0.001$) (图5)。

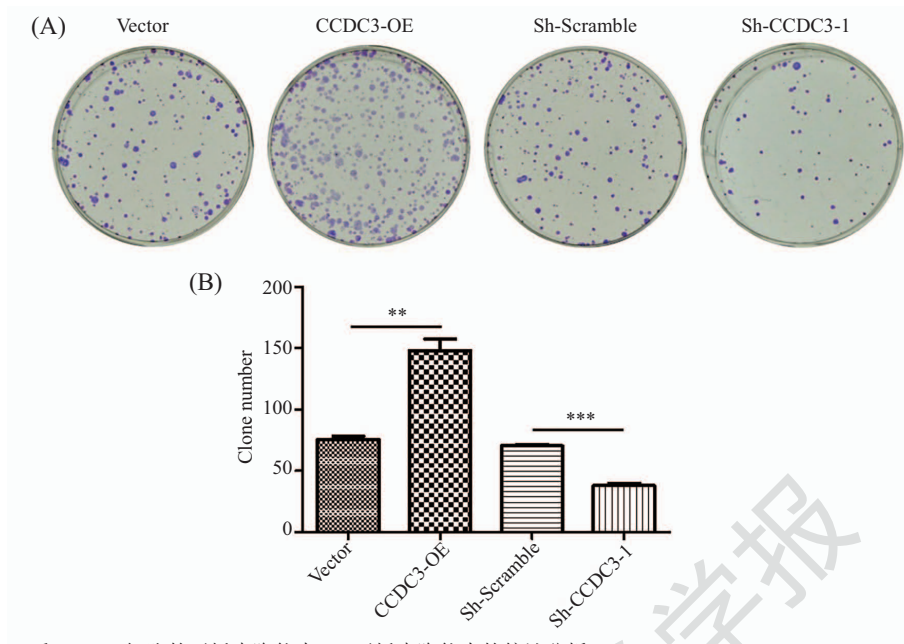
2.6 过表达和敲低*CCDC3*对HCT116细胞成球能力的影响

肿瘤细胞的成球能力与癌细胞的恶性成正相

关。我们将处于对数生长期的过表达和敲低*CCDC3*的细胞接种在软琼脂内,培养10天后检测形成的克隆数。结果表明,与对照组相比,过表达*CCDC3*对HCT116细胞的成球能力有明显的促进作用,差异显著($P < 0.01$)。但是我们敲低*CCDC3*后,HCT116细胞的成球能力明显被抑制(图6)。

2.7 过表达和敲低*CCDC3*对HCT116细胞迁移和侵袭能力的影响

我们采用划痕实验检测了*CCDC3*对HCT116细

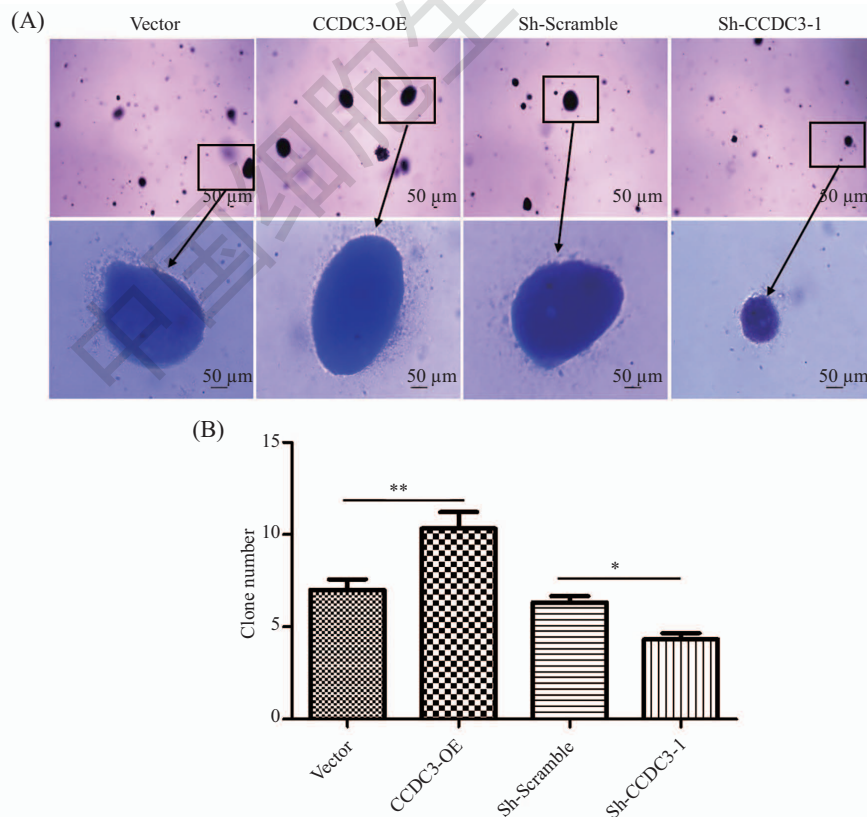


A: 过表达或敲低 $CCDC3$ 后HCT116细胞的平板克隆能力; B: 平板克隆能力的统计分析。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: effect of $CCDC3$ overexpression or knockdown on plate cloning ability of HCT116 cells; B: statistical analysis of plate cloning ability. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图5 过表达或敲低 $CCDC3$ 后对癌细胞平板克隆能力的影响

Fig.5 Effect of $CCDC3$ overexpression or knockdown on plate cloning ability of cancer cells

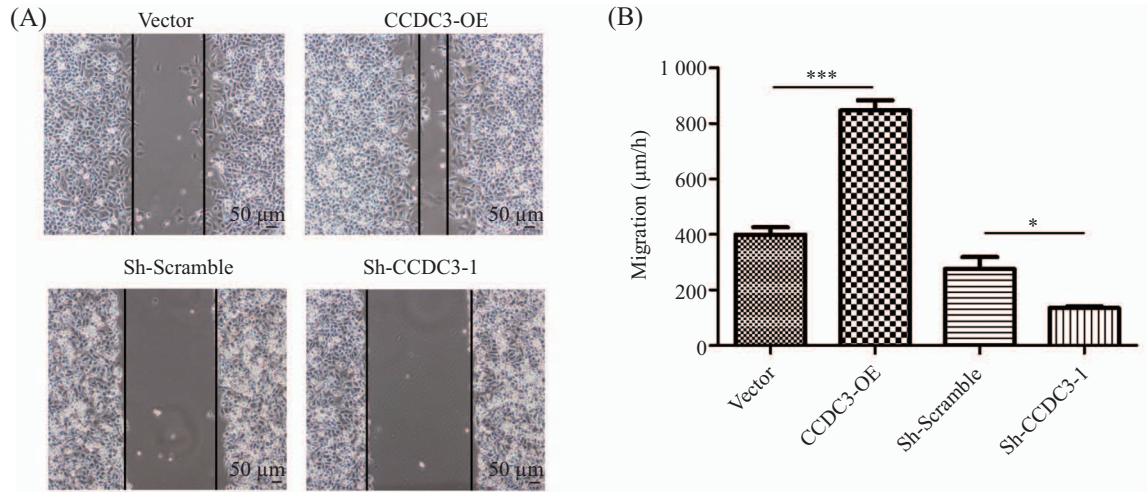


A: 过表达或敲低 $CCDC3$ 后HCT116细胞的软琼脂克隆能力; B: 统计分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: effect of $CCDC3$ overexpression or knockdown on soft agar cloning ability of HCT116 cells; B: statistical analysis. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图6 过表达或敲低 $CCDC3$ 后对癌细胞软琼脂克隆能力的影响

Fig.6 Effect of $CCDC3$ overexpression or knockdown on the ability of soft agar clones of cancer cells

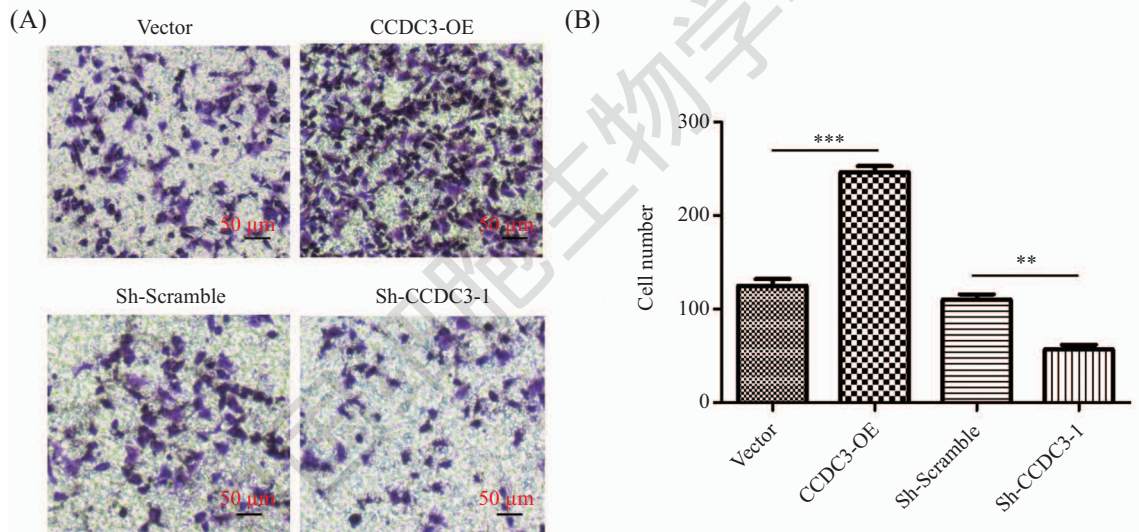


A: 过表达或敲低*CCDC3*后HCT116细胞的迁移能力; B: 迁移能力统计分析。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

A: effect of *CCDC3* overexpression or knockdown on migration ability of HCT116 cells; B: statistical analysis of migration ability. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

图7 过表达或敲低*CCDC3*对癌细胞迁移能力的影响

Fig.7 Effect of *CCDC3* overexpression or knockdown on the migration ability of cancer cells



A: 过表达或敲低*CCDC3*后HCT116细胞的侵袭能力; B: 侵袭能力的统计分析。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: effect of *CCDC3* overexpression or knockdown on invasive ability of HCT116 cells; B: statistical analysis of invasive ability. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图8 过表达或敲低*CCDC3*对癌细胞侵袭能力的影响

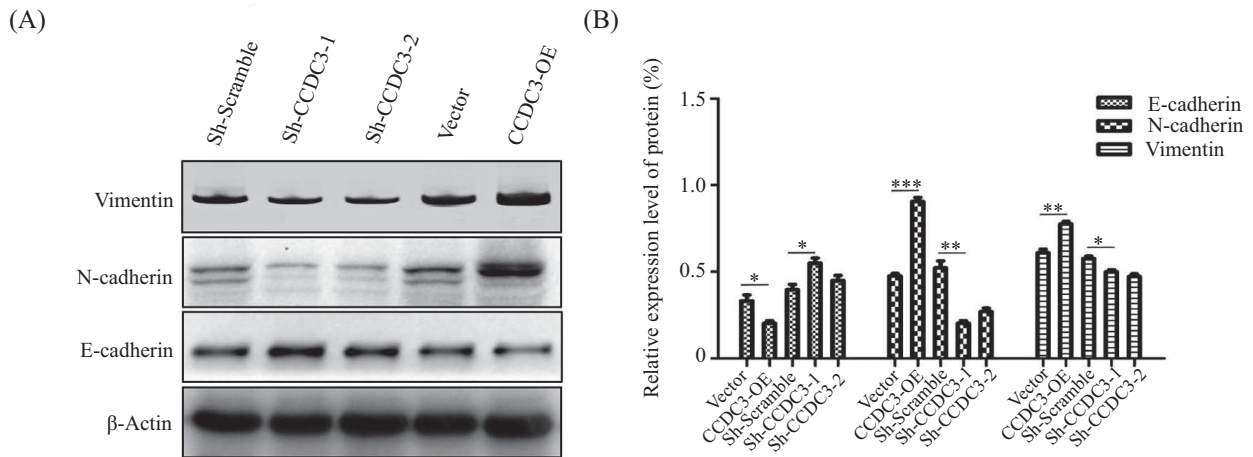
Fig.8 Effect of *CCDC3* overexpression or knockdown on the invasive ability of cancer cells

胞迁移能力的影响。实验结果显示,与对照组相比,*CCDC3*过表达后细胞迁移能力明显增强,差异极显著($P < 0.001$)。但是我们敲低*CCDC3*后,HCT116细胞的迁移能力明显被抑制(图7)。

我们用Transwell小室检测*CCDC3*对HCT116细胞侵袭能力的影响。实验结果显示,与对照组相比,*CCDC3*过表达后细胞侵袭能力明显增强,差异极显著($P < 0.01$, $P < 0.001$)。但是我们敲低*CCDC3*后,HCT116细胞的侵袭能力被显著抑制(图8)。

2.8 过表达和敲低*CCDC3*后上皮间质转化相关蛋白的表达

我们在肠癌细胞系HCT116中过表达或敲低*CCDC3*后,用Western blot方法检测癌细胞中上皮间质转化(EMT)相关标记物的表达。实验结果显示,与对照组相比,*CCDC3*过表达后细胞向间充质分化,即间充质标记蛋白Vimentin和N-cadherin表达量明显增高,而上皮细胞标记物E-cadherin表达量减少,差异显著($P < 0.05$);但是我们敲低*CCDC3*后,结



A: 过表达或敲低 $CCDC3$ 后癌细胞中上皮间质转化(EMT)相关标记物的表达; B: 统计分析。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: expression of EMT-related markers in cancer cells after overexpression or knockdown of $CCDC3$; B: statistical analysis. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图9 过表达或敲低 $CCDC3$ 后肠癌细胞中上皮间质转化(EMT)相关标记物的表达情况
Fig.9 Expression of markers associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT) in colorectal cancer cells after overexpression or knockdown of $CCDC3$

果正好相反, 以上结果充分表明, $CCDC3$ 可以促进HCT116细胞发生EMT转化(图9)。

2.9 体内成瘤实验

不同处理的HCT116癌细胞(Vector、 $CCDC3$ -OE、Sh-Scramble、Sh- $CCDC3$ -1)体内致瘤实验结果表明, Vector、 $CCDC3$ -OE和Sh-Scramble三组细胞致瘤率100%(5/5), 但是, Sh- $CCDC3$ -1细胞组五只裸鼠中只有四只成瘤, 致瘤率为80%(4/5)(图10A)。 $CCDC3$ -OE细胞与Vector细胞相比, $CCDC3$ -OE细胞致瘤能力明显增强, 肿瘤生长较快, 两组间存在统计学差异, 差异显著($P<0.01$, 图10B)。Sh-Scramble和Sh- $CCDC3$ -1细胞相比, Sh- $CCDC3$ -1细胞致瘤能力明显减弱, 两组间存在统计学差异($P<0.05$, 图10B)。在本实验中, 每只裸鼠皮下接种 5×10^6 个细胞, 在第7天后不同处理组陆续出现米粒大小的结节, 到23天时最大肿瘤的直径已达2 cm。由于初始细胞接种量较大, 肿瘤生长较快, 观察不同处理组荷瘤鼠的各个脏器时, 只在 $CCDC3$ -OE组发现有一只裸鼠肝脏有白色小结节, 其余均未发现转移灶点。如果我们在后续实验中采用尾静脉接种肿瘤细胞, 延长肿瘤发生时间及生长周期, 也许会观察到更多的裸鼠发生肿瘤转移的情况。

以上结果充分表明, 不论是过表达还是敲低 $CCDC3$ 在HCT116癌细胞中的表达, 均可影响HCT116癌细胞的体内致瘤能力, 与前面的体外结果

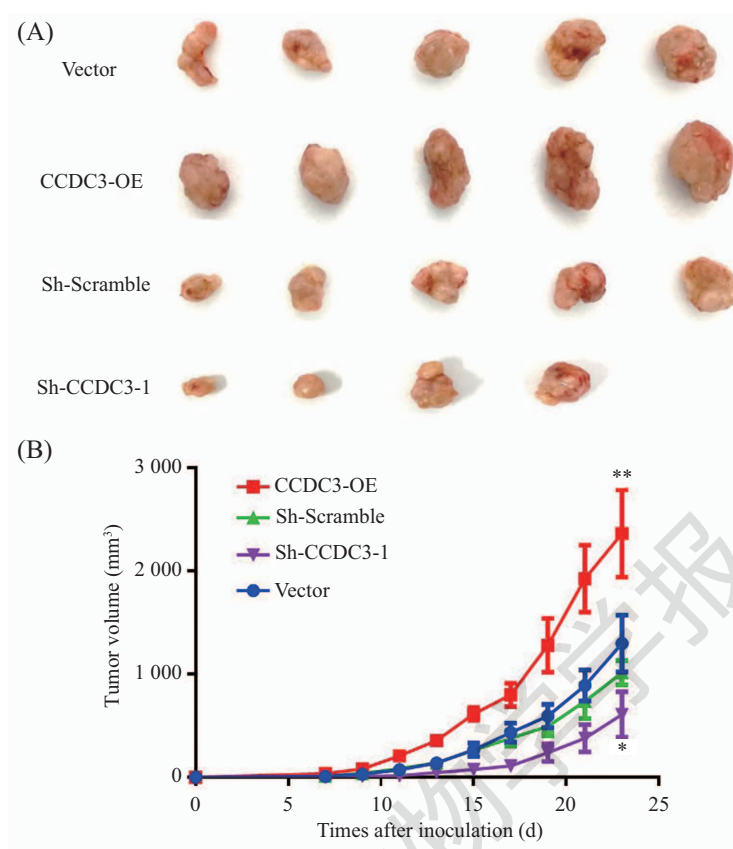
相一致, 进一步证明, $CCDC3$ 在癌细胞的致瘤过程中发挥着重要作用。

3 讨论

通过分析GEO数据库中的数据, 我们筛选得到了 $CCDC3$ 基因, 推测它与干细胞和肿瘤相关, 于是我们选定 $CCDC3$ 作为研究对象。我们通过将 $CCDC3$ 与已知的肠癌相关基因的共表达分析后发现, $CCDC3$ 与 APC 、 $PROC$ 、 $ATO1$ 、 $C21ORF3$ 等抑癌基因呈负相关的表达模式, 而与 $SOX9$ 、 $OLFM4$ 、 $ASCL2$ 、 $LGR5$ 等在小肠干细胞以及肠癌中高表达的基因呈现出相似的表达模式。我们推测, $CCDC3$ 可能与这一类基因有着类似的功能, 也许与肿瘤的干性相关, 即有望成为肿瘤干细胞候选基因。

本研究采用不同方法检测了过表达和敲低 $CCDC3$ 对结肠癌HCT119细胞功能的影响。结果发现, 过表达 $CCDC3$ 后促进癌细胞的增殖, 增强癌细胞的克隆形成能力, 增强癌细胞的迁移和侵袭能力, 并促进癌细胞发生EMT。 $CCDC3$ 可以促进癌细胞EMT相关的M型蛋白的表达, 即促进细胞从E型向M型转化, 敲低 $CCDC3$ 后作用相反, 有力地说明了 $CCDC3$ 在肿瘤的发生、发展及转移中发挥了不可低估的作用。

肿瘤细胞发展到一定阶段, 便向周围传播, 侵



A: 不同处理组的肿瘤; B: 肿瘤生长曲线。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组比较。

A: tumors of different treatment groups; B: tumor growth curve. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

图10 *CCDC3*对HCT116结肠癌细胞体内致瘤能力的影响

Fig.10 Effect of *CCDC3* on tumorigenicity of HCT116 colon cancer cells *in vivo*

蚀正常组织,这种细胞浸润能力的获得是肿瘤细胞变成恶性过程中的一个重要环节。发生EMT的细胞具有更为强烈的迁移能力,本实验的细胞划痕实验结果表明,发生EMT的细胞能更快的迁移,在更短的时间内使划痕愈合。

EMT在肿瘤细胞浸润过程中扮演了重要的角色。Matrigel被认为类似于体内的基底膜,包含基底膜的成分,如胶原、laminin、蛋白多糖以及细胞因子和酶。发生EMT的细胞能够在matrigel上生长并穿透matrigel,表明EMT在体内有可能是肿瘤细胞突破基底膜浸润性生长的一个重要机制。细胞的侵袭能力是反映细胞恶性程度的重要指标之一。恶性程度越高的细胞往往具有越强的侵袭能力,可向邻近组织扩展性地生长并进一步破坏^[21]。具有高度侵袭能力的细胞往往同时还具有活跃的细胞运动能力。活跃的细胞运动能力是肿瘤侵袭的基本条件,也是关键条件。细胞的这两个恶性表型,赋予细胞持续侵袭直至远处转移的能力。从我们的实验结果

来看,*CCDC3*过表达可明显促进HCT116细胞的侵袭能力。加之我们检测的过表达和敲低*CCDC3*对EMT相关蛋白表达的影响结果更证实了这一点,说明*CCDC3*和EMT之间存在一定的联系。

综上所述,*CCDC3*的功能具有一定的特异性。*CCDC3*对人结肠癌HCT116细胞的增殖、迁移和侵袭有较强的促进作用,但其作用靶点和更为详尽的机制还需进一步研究。我们未来将研究的重心放在*CCDC3*通过何种分子机制影响细胞迁移和侵袭能力上。本研究结果为*CCDC3*成为一种肿瘤治疗的新靶标提供了理论基础。

参考文献 (References)

- 1 Robbins AS, Siegel RL, Jemal A. Racial disparities in stage-specific colorectal cancer mortality rates from 1985 to 2008. *J Clin Oncol* 2012; 30(4): 401-5.
- 2 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
- 3 Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2014; 64(2): 104-17.

- 4 Nikiforov YE. RET/FFC rearrangement in thyroid tumors. *Endocr Pathol* 2002; 13(1): 3-16.
- 5 Thanasopoulou A, Stravopodis DJ, Dimas KS, Schwaller J, Anastasiadou E. Loss of CCDC6 affects cell cycle through impaired intra-S-phase checkpoint control. *PLoS One* 2012; 7(2): e31007.
- 6 Hanson D, Murray PG, O Sullivan J, Urquhart J, Daly S, Bhaskar SS, *et al.* Exome sequencing identifies CCDC8 mutations in 3-M syndrome, suggesting that CCDC8 contributes in a pathway with CUL7 and OBSL1 to control human growth. *Am J Hum Genet* 2011; 89(1): 148-53.
- 7 Tsolakis AV, Grimelius L, Islam MS. Expression of the coiled coil domain containing protein 116 in the pancreatic islets and endocrine pancreatic tumors. *Islets* 2012; 4(5): 349-53.
- 8 Liu Z, Li X, He X, Jiang Q, Xie S, Yu X, *et al.* Decreased expression of updated NESGI in nasopharyngeal carcinoma: its potential role and preliminarily functional mechanism. *Int J Cancer* 2011; 128(11): 2562-71.
- 9 Najafov A, Alessi DR. Uncoupling the Warburg effect from cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(45): 19135-6.
- 10 Park SJ, Jang HR, Kim M, Kim JH, Kwon OH, Park JL, *et al.* Epigenetic alteration of CCDC67 and its tumor suppressor function in gastric cancer. *Carcinogenesis* 2012; 33(8): 1494-501.
- 11 Shefer M, Bacolod MD, Zuk O, Giardina SF, Pincas H, Barany F, *et al.* Association of survival and disease progression with chromosomal instability: a genomic exploration of colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(17): 7131-6.
- 12 Kim H, Huang J, Chen J. CCDC98 is a BRCA1-BRCT domain-binding protein involved in the DNA damage response. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14(8): 710-5.
- 13 Iiu Z, Wu J, Yu X. CCDC98 targets BRCA1 to DNA damage sites. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14(8): 716-20.
- 14 骆小江, 张培建. 肿瘤细胞浸润和血管生成在胃癌肝转移中的机制研究. *国际外科学杂志*(Luo Xiaojiang, Zhang Peijian. Tumor cell invasion and angiogenesis in the mechanism of liver metastasis in gastric cancer. *International Journal of Surgery* 2012; 39(9): 622-5.
- 15 Chen M, Ni J, Chang HC, Lin CY, Muyan M, Yeh S, *et al.* CCDC62/ERAP75 functions as a coactivator to enhance estrogen receptor beta-mediated transactivation and target gene expression in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 2009; 30(5): 841-50.
- 16 Liao W, Liu H, Zhang Y, Jung JH, Chen J, Su X, *et al.* Ccdc3: a new P63 target involved in regulation of liver lipid metabolism. *Sci Rep* 2017; 7(1): 9020.
- 17 Kobayashi S, Fukuhara A, Otsuki M, Suganami T, Ogawa Y, Morii E, *et al.* Fat/vessel-derived secretory protein (Favine)/CCDC3 is involved in lipid accumulation. *Biol Chem* 2015; 290(12): 7443-51.
- 18 Azad AK, Chakrabarti S, Xu Z, Davidge ST, Fu Y. Coiled-coil domain containing 3 (CCDC3) represses tumor necrosis factor- α /nuclear factor κ B-induced endothelial inflammation. *Cell Signal* 2014; 26(12): 2793-800.
- 19 Ugi S, Maeda S, Kawamura Y, Kobayashi MA, Imamura M, Yoshizaki T, *et al.* CCDC3 is specifically upregulated in omental adipose tissue in subjects with abdominal obesity. *Obesity (Silver Spring)* 2014; 22(4): 1070-7.
- 20 Kobayashi S, Fukuhara A, Taguchi T, Matsuda M, Tochino Y, Otsuki M, *et al.* Identification of a new secretory factor, CCDC3/Favine, in adipocytes and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 392(1): 29-35.
- 21 Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 2011; 147(2): 275-92.