

## 研究论文

# 敲低*Sec23a*基因对人乳腺癌寡灶型转移细胞株体外细胞生物学特性的影响

孙志卫 周仕霞 王健宇\* 邢若曦\*

(重庆医科大学生命科学研究院, 重庆 400016)

**摘要** 针对来源于乳腺癌细胞MDA-MB-435的小鼠肺癌寡灶型转移肿瘤细胞株MDA-435-OL, 利用慢病毒感染的方法建立稳定敲低*Sec23a*基因表达的细胞株MDA-435-OL-*Sec23a*-GFP和其阴性对照细胞株MDA-435-OL-LV3NC-GFP, 通过CCK-8(Cell Counting Kit-8)增殖实验、Transwell小室细胞迁移实验、侵袭实验和琼脂克隆斑形成实验探索敲低*Sec23a*基因后, 寡灶型转移肿瘤细胞株体外细胞生物学特性的改变。在寡灶转移细胞株中敲低*Sec23a*基因后, 细胞生长曲线与倍增时间并没有显著差异(28.23 h和28.32 h,  $P>0.05$ ), 但Transwell小室迁移细胞数量( $58.50\pm 2.81$ 和 $39.60\pm 3.21$ )、侵袭细胞数量( $54.40\pm 3.33$ 和 $34.60\pm 1.44$ )和细胞体外克隆形成率( $0.67\pm 0.05$ 和 $0.37\pm 0.03$ ), 均较阴性对照组显著增加( $P<0.001$ )。该研究结果表明, 乳腺癌寡灶型细胞株稳定敲低*Sec23a*基因后, 细胞的增殖特性并没有明显变化, 但细胞的迁移、侵袭能力和克隆形成能力均增强。

**关键词** *Sec23a*; 寡灶型转移; 乳腺癌

## The Biological Effects of *Sec23a* Knockdown in Human Oligometastatic Breast Cancer Cells *In Vitro*

Sun Zhiwei, Zhou Shixia, Wang Jianyu\*, Xing Ruoxi\*

(Life Sciences Institute, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** The MDA-435-OL-*Sec23a*-GFP cell line in which the *Sec23a* was knocked down and the MDA-435-OL-LV3NC-GFP cell line as the negative control were derived from the oligometastatic cell lines MDA-435-OL obtained by the breast cancer cell line MDA-MB-435 metastasizes to the mouse lungs through the lentivirus containing recombinant plasmids. Thereafter, the effects of *Sec23a* stable knockdown on cell proliferation, migration, invasion and clonogenicity were measured *in vitro* by the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay, Transwell migration assay, matrigel invasion assay and agar clone formation assay, respectively. The results showed that the numbers of migrated cells ( $58.50\pm 2.81$  vs  $39.60\pm 3.21$ ), invaded cells ( $54.40\pm 3.33$  vs  $34.60\pm 1.44$ ) and formed cell clones ( $0.67\pm 0.05$  vs  $0.37\pm 0.03$ ) increased significantly ( $P<0.001$ ) after stable *Sec23a* knockdown. In contrast, cell proliferation rate was not significantly affected (28.23 h vs 28.32 h,  $P>0.05$ ). The abilities of cell migration, cell invasion and cell clone formation were enhanced while the cell growth was

收稿日期: 2016-08-15 接受日期: 2016-11-03

国家自然科学基金(批准号: 81272405)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-68812290, E-mail: wjy2003123@163.com; Tel: 023-68486602, E-mail: rosiexing@163.com

Received: August 15, 2016 Accepted: November 3, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81272405).

\*Corresponding authors. Tel: +86-23-68812290, E-mail: wjy2003123@163.com; Tel: +86-23-68486602, E-mail: rosiexing@163.com

网络出版时间: 2016-12-20 16:07:08

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161220.1607.004.html>

not altered after *Sec23a* stable knockdown in the oligometastatic breast cancer cells. Taken together, these results indicate that the stable knockdown of *Sec23a* enhances cancer biological features of human oligometastatic breast cancer cells.

**Keywords** *Sec23a*; oligometastasis; breast cancer

肿瘤的转移是肿瘤致死率居高不下的主要原因, 肿瘤的转移有寡灶型转移和多灶型转移之分<sup>[1]</sup>。Hellman等<sup>[2]</sup>于1995年首次提出临床寡灶型转移肿瘤的存在, 认为在某些肿瘤的临床演进过程中, 以有限数量的转移灶和(或)受累器官为标志的“寡灶转移”(全身累积转移灶数目不超过5个)的存在, 为治疗转移期肿瘤提供了一个以前没有发现的契机。与多灶型转移相比, 肿瘤的寡灶型转移一般可以通过外科手术和立体定向全身放疗进行有效的针对性治疗, 显著提高患者的十年生存率<sup>[3-7]</sup>。寡灶型转移针对性治疗很可能是突破临床转移性肿瘤治疗难题的一个新起点和一条新途径, 而从寡灶型转移向多灶型转移演变是寡灶型转移针对性治疗失败的根本原因<sup>[8-11]</sup>。Korpal等<sup>[3]</sup>研究表明, 在4TO7小鼠乳腺癌细胞株中, 抑制*Sec23a*基因表达可以显著降低乳腺癌细胞株4TO7的Igfbp4和Tinagl1蛋白质分泌水平, 增强4TO7细胞在小鼠体内的肿瘤转移程度。*Sec23a*基因表达与细胞蛋白质分泌水平有明确的相关性, 蛋白质分泌水平的改变可以引起肿瘤细胞微环境的改变, 进而对肿瘤细胞的迁移能力造成影响<sup>[11-14]</sup>。*Sec23a*基因在体内编码SEC23A蛋白质, 是外壳蛋白质复合物II(coat protein II, COPII)的重要成分<sup>[15]</sup>。COPII形成内质网分泌小泡的外壳蛋白, 对内质网分泌小泡的形成、运输有重要影响<sup>[15-20]</sup>。当SEC23A蛋白质水平降低时, COPII的合成会受到影响, 内质网分泌小泡的形成也会受到抑制, 从而影响细胞的分泌蛋白质功能。SEC23A是一种GTP酶活化蛋白质, 参与蛋白质在内质网与高尔基体间的转运过程<sup>[12,16,18]</sup>。已有研究显示, 在乳腺癌细胞中, 敲低*Sec23a*基因的表达可以促进乳腺癌细胞向小鼠肺部的转移<sup>[3]</sup>, 在结直肠癌细胞中, 敲低*Sec23a*基因的表达水平, 细胞增殖、迁移及侵袭能力均明显提高<sup>[21]</sup>。另有研究显示, 临床样本中SEC23A蛋白质水平与前列腺癌患者预后情况呈明显负相关<sup>[22]</sup>。这些研究都是从整个肿瘤的发生、转移过程出发, 研究*Sec23a*基因的作用, 而*Sec23a*基因到底是通过怎样具体的机制来影响癌症转移进程的, 尚未有明确的结论。

本研究则具体化到了*Sec23a*基因对肿瘤转移后形成寡灶型转移还是多灶型转移这一点上, 阐释其具体的作用机制。本研究通过建立稳定敲低*Sec23a*基因表达的寡灶型转移乳腺癌细胞株, 评价寡灶型转移的乳腺癌细胞株细胞迁移能力、侵袭能力以及克隆形成能力的改变, 初步探索敲低*Sec23a*基因是否可以通过改变肿瘤细胞的微环境从而影响肿瘤细胞的生物学特性, 促进寡灶型转移的乳腺癌细胞株形成多灶型的肿瘤转移, 为临床上研究肿瘤寡灶型转移向多灶型转移的演进机制提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

胎牛血清购自ExCell Bio公司; DMEM培养液购自Gibco公司; PBS和双抗和两性霉素B均购自HyClone公司; *Sec23a*慢病毒载体和LV3NC阴性对照载体由上海生工生物工程股份有限公司提供(该质粒由上海生工生物工程股份有限公司购自System Biosciences公司的干扰穿梭质粒并进行改造); SYBR染料法荧光定量PCR试剂盒、cDNA第一链合成试剂盒购自TaKaRa公司; RT-PCR扩增引物由上海生工生物工程股份有限公司合成; Trizol试剂购自Invitrogen公司; Western blot一抗购自Cell Signaling公司; 二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司; CCK-8(Cell Counting Kit-8)试剂盒购自日本同仁化学研究所; Transwell小室购自Milipore公司; 琼脂粉购自Sigma公司; FSX-100智能图像导航仪、37 °C细胞培养箱均购自Olympus公司; 基质胶、流式细胞仪、荧光定量PCR仪均购自BD公司; 4 °C离心机购自Thermo公司。

### 1.2 细胞来源和细胞培养

本研究所用人乳腺癌细胞MDA-MB-435来自美国标准培养物保藏所(American Type Culture Collection, ATCC)馈赠。利用尾静脉注射的方法将MDA-MB-435细胞种植于裸鼠体内(裸鼠购于北京华阜康生物科技股份有限公司, 经中国医学科学院医学实验动物研究所质检合格), 发现在裸鼠肺上形

成两种不同类型的肿瘤转移灶,一种是生长于肺部表面的独立的单个肿瘤灶,另一种是生长于肺实质内部的多处转移的微小转移灶。取裸鼠肺表面的独立单个肿瘤灶进行原代细胞提取、分离和培养,得到MDA-435-R1-OL细胞。利用MDA-435-R1-OL细胞再次进行裸鼠尾静脉注射时,发现绝大多数裸鼠体内形成单个肿瘤灶或累计不超过5个肿瘤转移灶。经过3次连续、重复尾静脉注射和原代细胞培养,建立来源于人乳腺癌细胞MDA-MB-43的小鼠肺癌寡灶型转移肿瘤细胞株MDA-435-OL。细胞用含10%胎牛血清、1%双抗和1%两性霉素B的DMEM培养液,在37 °C、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱内培养。寡灶型转移细胞株呈贴壁梭形分化,聚集克隆性生长。

### 1.3 细胞慢病毒感染和纯化

取对数生长期的MDA-435-OL细胞进行慢病毒感染,参考上海生工生物工程股份有限公司提供的慢病毒使用说明,用含*Sec23a*基因表达抑制质粒的慢病毒载体和含LV3NC阴性对照质粒的慢病毒载体分别感染MDA-435-OL细胞,感染时MOI值为50, Polybrene工作浓度为10 μg/mL。感染72 h后在FSX-100智能导航仪下拍摄荧光和白光图片,确定感染效率>80%后使用流式细胞分选仪根据绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)荧光表达分选、纯化感染阳性细胞。

### 1.4 RT-PCR检测细胞*Sec23a*基因的mRNA水平

传代时收集寡灶型转移细胞MDA-435-OL以及经流式细胞仪分选、纯化的慢病毒感染后的寡灶型转移细胞MDA-435-OL-*Sec23a*-GFP和其阴性对照细胞MDA-435-OL-LV3NC-GFP,使用Trizol提取细胞总RNA,保存在-80 °C冰箱。使用细胞总RNA按照cDNA第一链合成试剂盒(TaKaRa, PrimeScript RT Master Mix, RR036A)说明书进行逆转录合成,反应条件为:37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C保存。使用合成的cDNA按照SYBR染料法荧光定量PCR试剂盒(TaKaRa, SYBR Premix Ex Taq II, RR820A)说明书进行目的基因*Sec23a*和内参基因*GAPDH*的PCR扩增。*Sec23a*基因引物序列如下。Forward: 5'-AGT GGC GGA AGT CAG GAT AC-3', Reverse: 5'-GGC ATT GGA AAT CTG GAGTG-3'; *GAPDH*基因引物序列如下。Forward: 5'-AGA AGG CTG GGG CTC ATT TG 3', Reverse: 5'-AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC-3'。PCR反应条件为:第一步95 °C 30 s;第

二步95 °C 5 s, 60 °C 30 s,共40个循环。PCR数据用2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法进行分析。

### 1.5 Western blot检测细胞内SEC23A蛋白质水平

分别按照10%和5%的浓度配制浓缩胶和分离胶,细胞蛋白质样品上样量为50 μg。蛋白质样品制备方法:冻存在-80 °C的细胞样中加入100 μL蛋白质裂解液,冰上震荡10 min(震荡30 s,冰上15 s,循环),4 °C,12 000 r/min离心5 min,如果上清还有絮状物继续离心5 min,收集上清与5×样品缓冲液混合后沸水浴5 min,置于-80 °C保存。按照150 V、70 min和350 mA、70 min分别进行电泳和电转。一抗参考说明书按照1:1 000的稀释比例使用,4 °C摇床过夜孵育。二抗参考说明书按照1:5 000的稀释比例使用,避光孵育1 h。内参蛋白质使用Tubulin。然后使用Image J软件对Western blot的蛋白质水平检测结果进行相对灰度分析。

### 1.6 CCK-8检测细胞增殖曲线

以MDA-435-OL-*Sec23a*-GFP细胞为实验组,MDA-435-OL-LV3NC-GFP为阴性对照组,均有空白对照。实验在96孔板中进行,每种细胞每天设置5个复孔,每孔细胞数量初始设置为2 000个,每个孔内加入的细胞悬液为100 μL。进行吸光度测定时,每孔先加入CCK-8试剂10 μL,在37 °C培养箱内孵育2 h后,使用酶标仪测定450 nm处吸光度(*D*)值,连续测定5 d。按照 $D_{\text{真实}}=D_{\text{测}}-D_{\text{空白}}$ 计算出每天相应的真实*D*值(取5个复孔的平均值),然后利用连续5 d测得的真实*D*值绘制细胞增殖曲线。在增殖曲线对数生长期任意取两点,根据公式计算出细胞倍增时间(doubling time, DT),公式为 $DT=t \times [\lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)]$ ,其中,t为增殖曲线两点间的时间间隔, *N*<sub>0</sub>为对数生长期第一个时间点的*D*值, *N*<sub>t</sub>为对数生长期第二个时间点的*D*值。

### 1.7 Transwell小室细胞迁移实验

MDA-435-OL-*Sec23a*-GFP细胞为实验组,MDA-435-OL-LV3NC-GFP为阴性对照组,两组均取对数生长期细胞用不含血清的DMEM培养液制成单细胞悬液,使用血细胞计数板计数后备用。将Transwell小室轻轻放入24孔板孔内,每个Transwell小室上室均加入300 μL细胞悬液,内含5×10<sup>4</sup>细胞;下室加入800 μL含10% FBS的DMEM培养液。实验组和对照组分别设置3个Transwell小室,设置完成后将24孔板放入37 °C细胞培养箱。24 h后取出24孔板,

轻轻移出Transwell小室并吸出上室液。使用润湿的棉签轻轻擦蘸小室底膜上表面,然后使用PBS轻轻润洗小室上室。Transwell小室经冰甲醇固定30 min, PBS轻轻润洗2遍后使用结晶紫染色5 min, 再使用PBS轻轻润洗2遍。然后待小室底膜干燥后使用刀片轻轻裁下小室底膜,将底膜底面向上置于载玻片上,使用中性的树脂封片,干燥后于FSX-100智能导航仪20倍物镜下拍摄细胞图像,拍摄时随机选取20个视野。统计每张图片中细胞数量进行数据分析。

### 1.8 Transwell小室细胞侵袭实验

实验前,取-20 °C保存的Matrigel胶在4 °C条件下融化,与预冷的DMEM培养液按照1:11的比例均匀混合,操作在冰上进行,使用的移液管头、EP管等均需提前预冷。取60  $\mu$ L稀释后的Matrigel胶均匀铺在Transwell小室底膜上,置于超净台内自然干燥后备用。Transwell小室细胞侵袭实验的其余实验设置均同方法1.7中所述。

### 1.9 细胞琼脂克隆斑形成实验

取MDA-435-OL-Sec23a-GFP和MDA-435-OL-LV3NC-GFP对数生长期的细胞制成单细胞悬液,使用血细胞计数板计数后备用。使用梯度稀释法适当稀释细胞悬液后,向6孔板的每个孔内分别加入含50个细胞的2 mL细胞悬液,细胞悬液使用含10% FBS的DMEM培养液配制。每种细胞均设置3个6孔板复孔。12 h后镜下可观察到6孔板内细胞已经全部贴壁,此时将皿中培养液换成琼脂浓度为0.2%的含10% FBS的DMEM培养液,置于37 °C培养箱内培养。10 d后镜下可观察到6孔板内出现集落生长的细胞克隆斑。此时弃去含琼脂的培养液,用PBS轻轻润洗2次,然后6孔板内每孔加入2 mL冰甲醇固定30 min,固定结束后使用PBS轻轻润洗2次,然后使用结晶紫染色5 min,再用PBS轻轻润洗后室温干燥。干燥完成后将6孔板移至显微镜下观察计数每个孔内细胞克隆斑数量,超过50个细胞的克隆斑即可计数。根据细胞克隆斑形成率=(克隆数/接种细胞数) $\times$ 100%来计算细胞体外克隆率。

### 1.10 统计方法

用SPSS 22.0统计软件进行分析,所有数据以mean $\pm$ S.D.来表示,采用*t*检验的分析方法, $P < 0.05$ 为差异有显著统计学意义, $P < 0.001$ 为差异有极显著统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 敲低Sec23a基因稳定细胞系的建立

用抑制Sec23a基因表达的慢病毒载体和阴性对照慢病毒载体分别感染MDA-435-OL细胞,以共表达的GFP荧光作为筛选标记,经流式细胞仪分选和培养纯化后GFP阳性率 $> 90\%$ ,且细胞荧光明显(图1)。

### 2.2 在mRNA和蛋白质水平验证敲低Sec23a基因的稳定细胞系

RT-PCR结果显示,MDA-435-OL-Sec23a-GFP细胞中Sec23a基因的mRNA水平是MDA-435-OL-LV3NC-GFP细胞的(13.99 $\pm$ 1.01)%,显著敲低约84%(图2,  $P < 0.001$ )。Western blot结果显示,Sec23a基因的的稳定干扰有效地抑制了其在MDA-435-OL-Sec23a-GFP细胞中的蛋白质水平(图3,  $P < 0.001$ )。

### 2.3 敲低Sec23a基因对寡灶型转移细胞体外增殖特性的影响

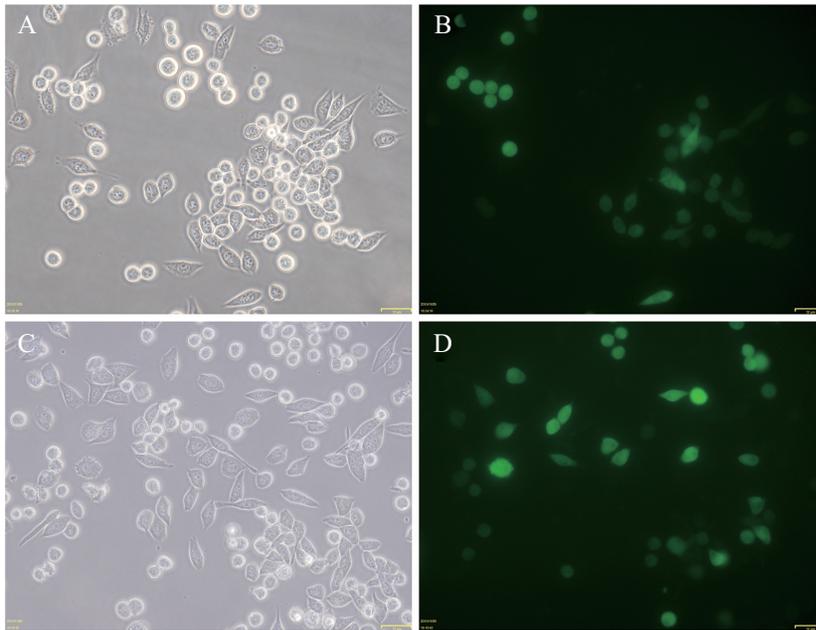
使用CCK-8检测的方法对敲低Sec23a基因的MDA-435-OL-Sec23a-GFP细胞和其阴性对照细胞MDA-435-OL-LV3NC-GFP的生长进行了连续5 d的检测。以所测真实*D*值为纵坐标、实验天数为横坐标绘制细胞增殖曲线,同时计算2种细胞的倍增时间。实验结果显示,MDA-435-OL-Sec23a-GFP细胞和其阴性对照细胞MDA-435-OL-LV3NC-GFP的增殖曲线趋势一致。MDA-435-OL-Sec23a-GFP细胞的倍增时间为28.23 h,MDA-435-OL-LV3NC-GFP细胞的倍增时间为23.32 h,二者无显著差异(图4,  $P > 0.05$ )。实验结果表明,敲低Sec23a基因并没有影响寡灶型转移细胞的体外增殖特性。

### 2.4 敲低Sec23a基因对寡灶型转移细胞的体外迁移能力的影响

使用Transwell小室细胞迁移实验检测敲低Sec23a基因后对寡灶型转移细胞体外迁移能力的影响。实验结果统计显示,MDA-435-OL-Sec23a-GFP细胞迁移数量为58.50 $\pm$ 2.81,MDA-435-OL-LV3NC-GFP为39.60 $\pm$ 3.21,*t*检验分析显示,2组间存在显著差异(图5,  $P < 0.001$ )。这表明,敲低Sec23a基因可以增强了寡灶型转移细胞的体外迁移能力。

### 2.5 敲低Sec23a基因对寡灶型转移细胞的体外侵袭能力的影响

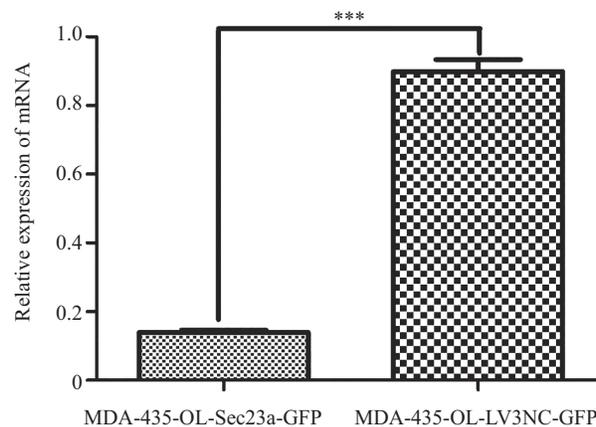
Transwell小室细胞侵袭实验结果统计显示,MDA-435-OL-Sec23a-GFP细胞侵袭数量为



A、B: MDA-435-OL-Sec23a-GFP细胞同一视野的白光和荧光图片; C、D: MDA-435-OL-LV3NC-GFP细胞同一视野的白光和荧光图片。标尺=30  $\mu\text{m}$ 。

A,B: images of same vision in bright and green fluorescent light of MDA-435-OL-Sec23a-GFP cell line; C,D: images of same vision in bright and green fluorescent light of MDA-435-OL-LV3NC-GFP cell line. Scale bars=30  $\mu\text{m}$ .

图1 FSX100智能图像导航仪观察MDA-435-OL-Sec23a-GFP和MDA-435-OL-LV3NC-GFP两种细胞GFP表达  
Fig.1 GFP expression in MDA-435-OL-Sec23a-GFP and MDA-435-OL-LV3NC-GFP observed under FSX100 Box-Type Fluorescence Imaging Device



\*\*\* $P < 0.001$ .

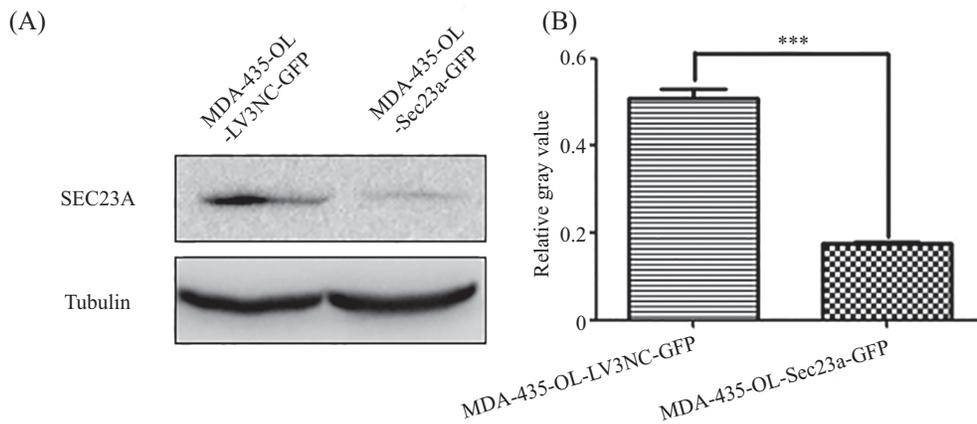
图2 RT-PCR检测慢病毒感染后*Sec23a*基因的表达  
Fig.2 The relative expression of *Sec23a* after the lentivirus infections measured by RT-PCR

54.40 $\pm$ 3.33, 其阴性对照细胞MDA-435-OL-LV3NC-GFP为34.60 $\pm$ 1.44,  $t$ 检验分析显示, 2组间存在显著差异(图6,  $P < 0.001$ )。这表明, 敲低*Sec23a*基因可以增强寡灶型转移细胞的体外细胞侵袭能力。

## 2.6 敲低*Sec23a*基因对寡灶型转移细胞的体外克隆形成能力的影响

使用琼脂克隆斑形成实验评价敲低*Sec23a*基

因对细胞克隆形成能力的影响。6孔板内细胞克隆斑染色后对其进行计数, 并计算出细胞克隆形成率。实验结果显示, MDA-435-OL-Sec23a-GFP细胞的克隆形成率是0.67 $\pm$ 0.05, MDA-435-OL-LV3NC-GFP为0.37 $\pm$ 0.03,  $t$ 检验分析显示, 2组结果存在显著差异(图7,  $P < 0.001$ )。这表明, 敲低*Sec23a*基因可以增强寡灶型转移细胞的体外克隆形成能力。



A: Western blot检测慢病毒感染后SEC23A蛋白质水平; B: Western blot检测SEC23A蛋白质水平结果的相对灰度分析, \*\*\* $P<0.001$ 。  
A: the relative expression of SEC23A protein after the lentivirus infections measured by Western blot; B: the relative grayscale analysis of the results of Western blot, \*\*\* $P<0.001$ .

图3 Western blot检测慢病毒感染前后SEC23A蛋白质表达情况

Fig.3 The relative expression of SEC23A protein after the lentivirus infections measured by Western blot

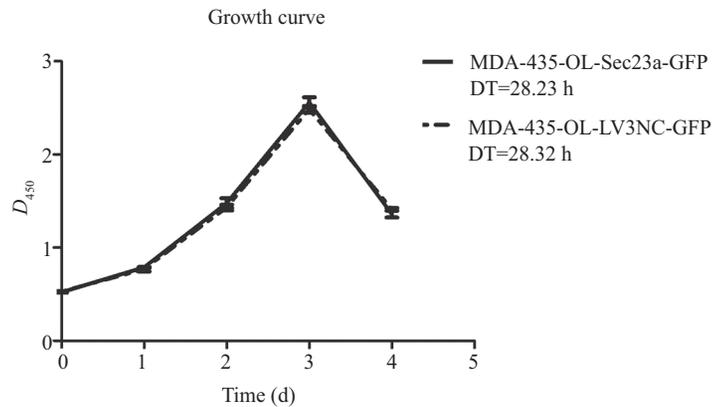
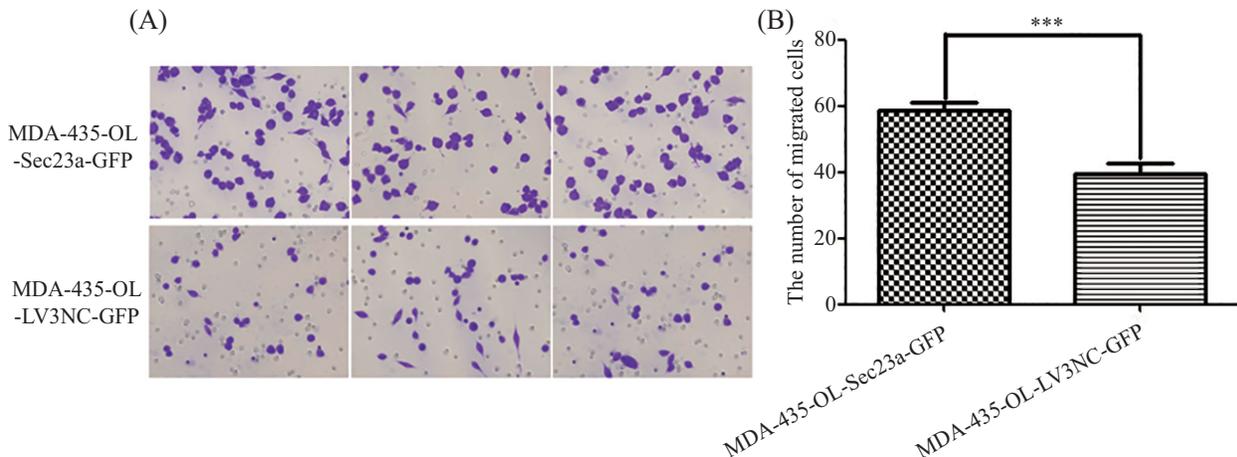


图4 CCK-8检测细胞体外增殖特性

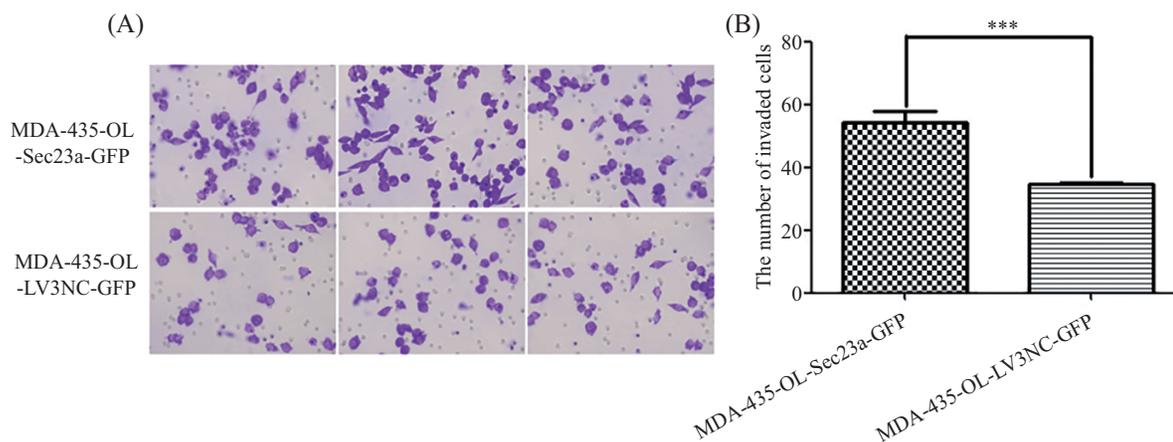
Fig.4 The cell proliferation measured by CCK-8 assay *in vitro*



A: Transwell小室迁移实验检测细胞体外迁移能力(20×); B: Transwell小室迁移实验结果的统计分析, \*\*\* $P<0.001$ 。  
A: the abilities of cell migration *in vitro* measured by Transwell migration assay (20×); B: the statistical analysis of the results of Transwell migration assay, \*\*\* $P<0.001$ .

图5 Transwell小室迁移实验检测慢病毒感染前后细胞体外迁移能力

Fig.5 The abilities of cell migration *in vitro* measured by Transwell migration assay



A: Transwell小室侵袭实验检测细胞体外侵袭能力(20×); B: Transwell小室侵袭实验结果的统计分析, \*\*\* $P<0.001$ 。

A: the abilities of cell invasion *in vitro* measured by Transwell invasion assay (20×); B: the statistical analysis of the results of Transwell invasion assay, \*\*\* $P<0.001$ .

图6 Transwell小室迁移实验检测慢病毒感染前后细胞体外侵袭能力

Fig.6 The abilities of cell invasion *in vitro* measured by Transwell invasion assay



A: 克隆斑形成实验检测细胞克隆形成能力; B: 克隆斑形成实验结果的统计分析, \*\*\* $P<0.001$ 。

A: the abilities of cell clonogenicity measured by agar colony formation assay; B: the statistical analysis of the results of agar colony formation assay, \*\*\* $P<0.001$ .

图7 克隆斑形成实验检测细胞克隆形成能力

Fig.7 The abilities of cell clonogenicity measured by agar colony formation assay

### 3 讨论

寡灶型转移肿瘤理论的提出, 为研究、治疗转移期肿瘤提供了一个契机<sup>[1-2]</sup>。多年临床观察结果也表明, 寡灶型转移性肿瘤的病例比预想的更为普遍, 例如, 它在非小细胞肺癌中的比例可高达50%<sup>[9]</sup>。随着用于癌症诊断的成像技术的灵敏性和准确性不断改进, 肿瘤在寡灶型转移阶段被确诊的比例将继续提高。外科手术和立体定向全身放疗在针对性治疗转移性肿瘤方面取得了显著成效, 通过手术切除原发灶器官来源各异的肺和肝的寡灶型转移灶, 能够显著提高患者的十年生存率<sup>[10-11]</sup>。在接受立体定向

全身放疗的寡灶型转移患者中, 也有21%达到完全治愈, 另有57%患者转移灶的增生在放疗后得到稳定的控制<sup>[12]</sup>。这些临床实验数据和结果共同提示了寡灶型转移可作为一个临床诊断和治疗的新实体及其可治愈性。因此, 寡灶型转移针对性治疗很可能是突破临床转移性肿瘤治疗难题的一个新起点和一条新途径。但临床结果数据同样显示, 从寡灶型向多灶型转移演变是寡灶型针对性治疗失败的根本原因<sup>[13]</sup>。有75%的患者在接收寡灶型转移针对性治疗后仍不可避免地形成涉及单器官或多器官的多灶型转移<sup>[14]</sup>(累积转移灶超过5个)。因此, 寡灶型向多灶

型转移的演变过程, 代表了一个极具吸引力的治疗新靶点。

分泌性蛋白质SEC23A是组成SEC23家族的重要成员, 与SEC24C、SEC16A和SEC16B具有相似作用<sup>[15]</sup>。Sec23a基因在体内编码SEC23A, 是COPII的外被结构蛋白质主要成分之一<sup>[16-17]</sup>。COPII包裹内质网分泌小泡形成COPII被膜小泡, 是内质网分泌蛋白质的重要运输工具, 这种类型的小泡介导非选择性运输, 它参与从内质网到顺面高尔基体、从顺面高尔基体到高尔基体中间膜囊、从中间膜囊到反面高尔基体的运输<sup>[18-20]</sup>。当Sec23a表达被抑制后, 其蛋白质翻译水平降低, 直接影响COPII、COPII被膜小泡的形成<sup>[15,17]</sup>, 对内质网分泌小泡的形成、运输有重要影响, 从而影响细胞的蛋白质分泌功能<sup>[20]</sup>。肿瘤转移抑制因子胰岛素样生长因子结合蛋白4(insulin like growth factor binding protein 4, Igfbp4)和肾小管间质性肾炎抗原类似物1(tubulointerstitial nephritis antigen-like 1, Tinagl1)是细胞外作用因子<sup>[23-24]</sup>, 通过改变细胞摄取间质内葡萄糖分子和改变细胞膜通透性的作用, 抑制肿瘤细胞克隆的形成, 从而抑制远位转移的肿瘤细胞形成远位转移灶。在Sec23a被抑制前后, 可以发现, Igfbp4和Tinagl1的细胞外基质含量显著降低<sup>[25-26]</sup>, 也就是说Igfbp4和Tinagl1的分泌作用依赖于SEC23A作为主要结构蛋白质成分的COPII的形成<sup>[26-28]</sup>。Igfbp4和Tinagl1对肿瘤细胞克隆和肿瘤转移灶的形成的抑制依赖于Sec23a基因对细胞蛋白质分泌功能的影响。当Sec23a被抑制后, 细胞的蛋白质分泌功能减弱, Igfbp4和Tinagl1的细胞外基质含量降低, 肿瘤细胞克隆和肿瘤转移灶的形成增加。

本研究针对乳腺癌寡灶型转移肿瘤细胞MDA-435-OL, 以Sec23a基因作为研究的出发点, 通过慢病毒感染建立稳定敲低Sec23a基因的寡灶型转移细胞MDA-435-OL-Sec23a-GFP和其阴性对照细胞MDA-435-OL-LV3NC-GFP, 并通过荧光定量PCR和Western blot验证Sec23a在mRNA和蛋白质水平的下调。进一步研究发现, 敲低Sec23a基因并没有改变寡灶型转移肿瘤细胞的增殖特性, 而Sec23a基因的敲低, 可以显著增强寡灶型转移肿瘤细胞的体外细胞迁移、侵袭和克隆形成能力。这些研究结果为寡灶型转移的调控机制提供体外实验依据, 并揭示Sec23a基因很可能成为调控寡灶型转移演进的新靶点。

寡灶型转移针对性治疗已展示临床治愈转移性肿瘤的希望。然而, 目前阻碍寡灶型转移针对性治疗发展的最主要障碍是如何准确识别这些可治愈的或能于治疗后保持缓慢寡灶型转移演进的肿瘤患者进而进行针对性治疗, 以及如何控制寡灶型向多灶型转移演变。因此, 筛选稳定寡灶型转移型肿瘤的特异性临床标志和筛选阻断寡灶型向多灶型转移演变的靶标显得尤为重要。这将对提高对寡灶型转移肿瘤的早期诊断能力和正确预测寡灶型转移的后期演化途径的能力具有重要意义。若能有效地阻断或延缓寡灶型向多灶型演变的过程, 更多的患者将能够接受寡灶型转移针对性治疗并达到长期存活和治愈的目标。

### 参考文献 (References)

- Weichselbaum RR, Hellman S. Oligometastases revisited. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8(6): 378-82.
- Hellman S, Weichselbaum RR. Oligometastases. *J Clin Oncol* 1995; 13(1): 8-10.
- Korpala M, Ell BJ, Buffa FM, Ibrahim T, Blanco MA, Celia-Terrassa T, *et al.* Direct targeting of *Sec23a* by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nat Med* 2011; 17(9): 1101-8.
- Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, *et al.* Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 2008; 451(7175): 147-52.
- Bendorait A, Knouf EC, Garg KS, Parkin RK, Kroh EM, O'Brian KC, *et al.* Regulation of miR-200 family microRNAs and ZEB transcription factors in ovarian cancer: Evidence supporting a mesothelial-to-epithelial transition. *Gynecol Oncol* 2010; 116(1): 117-25.
- Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, *et al.* The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 2008; 10(5): 593-601.
- Bonnomet A, Brysse A, Tachsidis A, Waltham M, Thompson EW, Polette M, *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; 15(2): 261-73.
- Weissman JT, Aridor M, Balch WE. Purification and properties of rat liver Sec23-Sec24 complex. *Methods Enzymol* 2001; 329: 431-8.
- Gooi BH, Premnath N, Manjit S. Pulmonary resection for metastatic breast cancer. *Med J Malaysia* 2004; 59(1): 112-4.
- Tomlinson JS, Jarnagin WR, DeMatteo RP, Fong Y, Kornprat P, Gonen M, *et al.* Actual 10-year survival after resection of colorectal liver metastases defines cure. *J Clin Oncol* 2007; 25(29): 4575-80.
- Brouquet A, Abdalla EK, Kopetz S, Garrett CR, Overman MJ, Eng C, *et al.* High survival rate after two-stage resection of advanced colorectal liver metastases: Response-based selection and complete resection define outcome. *J Clin Oncol* 2011;

- 29(8): 1083-90.
- 12 Salama JK, Chmura SJ, Mehta N, Yenice KM, Stadler WM, Vokes EE, *et al.* An initial report of a radiation dose-escalation trial in patients with one to five sites of metastatic disease. *Clin Cancer Res* 2008; 14(16): 5255-9.
- 13 Nguyen DX, Bos PD, Massague J. Metastasis: From dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(4): 274-84.
- 14 Sung V, Cattell DA, Bueno JM, Murray A, Zwiebel JA, Aaron AD, *et al.* Human breast cancer cell metastasis to long bone and soft organs of nude mice: A quantitative assay. *Clin Exp Metastasis* 1997; 15(2): 173-83.
- 15 Miller E, Antonny B, Hamamoto S, Schekman R. Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *EMBO J* 2002; 21(22): 6105-13.
- 16 Fath S, Mancias JD, Bi X, Goldberg J. Structure and organization of coat proteins in the COPII cage. *Cell* 2007; 129(7): 1325-36.
- 17 Stagg SM, LaPointe P, Razvi A, Gurkan C, Potter CS, Carragher B, *et al.* Structural basis for cargo regulation of COPII coat assembly. *Cell* 2008; 134(3): 474-84.
- 18 Supek F, Madden DT, Hamamoto S, Orci L, Schekman R. Sec16p potentiates the action of COPII proteins to bud transport vesicles. *J Cell Biol* 2002; 158(6): 1029-38.
- 19 Forster R, Weiss M, Zimmermann T, Reynaud EG, Verissimo F, Stephens DJ, *et al.* Secretory cargo regulates the turnover of COPII subunits at single ER exit sites. *Curr Biol* 2006; 16(2): 173-9.
- 20 Hughes H, Budnik A, Schmidt K, Palmer KJ, Mantell J, Noakes C, *et al.* Organisation of human ER-exit sites: Requirements for the localisation of Sec16 to transitional ER. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 16): 2924-34.
- 21 Li C, Zhao L, Chen Y, He T, Chen X, Mao J, *et al.* MicroRNA-21 promotes proliferation, migration, and invasion of colorectal cancer, and tumor growth associated with down-regulation of sec23a expression. *BMC Cancer* 2016; 16: 605.
- 22 Szczyrba J, Nolte E, Wach S, Kremmer E, Stohr R, Hartmann A, *et al.* Downregulation of Sec23A protein by miRNA-375 in prostate carcinoma. *Mol Cancer Res* 2011; 9(6): 791-800.
- 23 Townley AK, Feng Y, Schmidt K, Carter DA, Porter R, Verkade P, *et al.* Efficient coupling of Sec23-Sec24 to Sec13-Sec31 drives COPII-dependent collagen secretion and is essential for normal craniofacial development. *J Cell Sci* 2008; 121(Pt 18): 3025-34.
- 24 Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F, *et al.* Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005; 365(9460): 671-9.
- 25 Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, *et al.* Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 2005; 436(7050): 518-24.
- 26 O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005; 435(7043): 839-43.
- 27 Yu Z, Wang C, Wang M, Li Z, Casimiro MC, Liu M, *et al.* A cyclin D1/microRNA 17/20 regulatory feedback loop in control of breast cancer cell proliferation. *J Cell Biol* 2008; 182(3): 509-17.
- 28 Yu Z, Willmarth NE, Zhou J, Katiyar S, Wang M, Liu Y, *et al.* MicroRNA 17/20 inhibits cellular invasion and tumor metastasis in breast cancer by heterotypic signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(18): 8231-6.