

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.17.001

• 基础研究 •

GJA1 在结直肠癌组织中表达及促进侵袭转移的研究 *

梅海涛¹ 郝家领¹ 刘 洋¹ 罗青杉¹ 翁俊勇² 温玉刚^{1Δ}

(1 上海交通大学附属第一人民医院 上海 200080; 2 上海中医药大学附属曙光医院 上海 200021)

摘要 目的: 间隙连接 Alpha-1 蛋白(Gap Junction Alpha-1, GJA1)是间隙连接中分布最广泛的蛋白,并在多种肿瘤中起促癌作用,但其在结直肠癌发生、发展的作用研究甚少。本实验旨在探究 GJA1 在结直肠癌组织中的表达情况及其对结直肠癌细胞系侵袭、转移能力的影响,以期对结直肠癌的诊断和预后寻找新的生物标志物。**方法:** 收集 92 对结直肠癌及其癌旁组织样本,提取组织 RNA,利用 qRT-PCR 检测 GJA1 相对表达量,并分析 GJA1 表达与临床病理特征及预后的相关性。在 HCT116 和 HCT8 两种结直肠癌细胞系中分别构建 GJA1 过表达载体和敲减载体,利用 qRT-PCR 和 Western Blot 检测上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关蛋白 E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin 和 Snail 的表达变化,利用 Wound healing 和 Transwell 实验观察其迁移、侵袭能力的变化。**结果:** 相对于癌旁组织, GJA1 在结直肠癌组织中显著低表达。并且结直肠癌中低表达的 GJA1 与肿瘤分化程度、浸润深度、淋巴血管转移相关,低表达 GJA1 结直肠癌患者显示更差的总体生存率和更低的无病生存率。此外,过表达 GJA1 后,结直肠癌细胞 E-cadherin 的表达升高, N-cadherin、Vimentin 和 Snail 的表达降低,划痕愈合减慢, Transwell 转移细胞减少;而敲减 GJA1 后,结直肠癌细胞 E-Cadherin 的表达降低, N-Cadherin、Vimentin 和 Snail 的表达升高,划痕愈合加快, Transwell 转移细胞增多。**结论:** GJA1 在结直肠癌中低表达,其表达降低可通过 EMT 促进结直肠癌的侵袭、转移并影响病人预后。

关键词: 结直肠癌; GJA1; 转移; 预后

中图分类号: R-33; R735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2021)17-3201-06

Study on the Expression of GJA1 in Colorectal Cancer Tissue
and Its Promotion of Invasion and Metastasis*MEI Hai-tao¹, HAO Jiao-ling¹, LIU Yang¹, LUO Qing-shan¹, WENG Jun-yong², WEN Yu-gang^{1Δ}

(1 Department of general surgery, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China;

2 Department of general surgery, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200021, China)

ABSTRACT Objective: The Gap Junction alpha-1 (GJA1) protein is the most extensive protein in the Gap Junction, and it has been found to promote cancer in a variety of tumors, but its effect on colorectal cancer has not been explored. Therefore, This study aims to explore the expression of GJA1 in colorectal cancer tissues and its influence on the invasion and metastasis ability of colorectal cancer cell lines, so as to find new biomarkers for the diagnosis and prognosis of colorectal cancer. **Methods:** 92 pairs of colorectal cancer and its adjacent tissues were collected from 2013 to 2014, and tissue RNA was extracted. The relative expression level of GJA1 was detected by qRT-PCR, and the correlation between GJA1 expression and clinicopathology and prognosis was analyzed. GJA1 overexpression vector and GJA1-SI were constructed in HCT116 and HCT8 colorectal cancer cell lines, respectively. qRT-PCR and WB were used to detect the expression changes of invasion and metastasis related proteins E-cadherin, N-cadherin, Vimentin and Snail. Transwell and Wound Healing experiments were used to observe the changes of migration and metastasis ability. **Results:** GJA1 expression was low in colorectal cancer tissues. Low expression of GJA1 in colorectal cancer is associated with tumor staging, differentiation, invasion and metastasis. Low expression of GJA1 in colorectal cancer is associated with worse overall survival and disease-free survival. After the overexpression of GJA1, the expression of E-cadherin in colorectal cancer cells increased, the expression of N-cadherin, Vimentin and Snail decreased, the Transwell metastasis cells decreased, and the Wound Healing slowed down. After GJA1 knockdown, the expression of E-cadherin in colorectal cancer cells decreased, the expression of N-cadherin, Vimentin and Snail increased, the number of Transwell metastases increased, and the Wound Healing was accelerated. **Conclusions:** GJA1 expression is low in colorectal cancer, and its decreased expression can promote the invasion and metastasis of colorectal cancer by EMT and affect the prognosis of patients.

Key words: Colorectal cancer; GJA1; Metastasis; Prognosis

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R735.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)17-3201-06

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81972215; 82003060)

作者简介: 梅海涛(1991-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 胃肠道肿瘤, E-mail: 304176783@qq.com

Δ 通讯作者: 温玉刚(1973-), 男, 博士生导师, 教授, 主要研究方向: 胃肠道肿瘤, E-mail: wangqing@126.com, 电话: 021-37798571

(收稿日期: 2021-02-02 接受日期: 2021-02-25)

前言

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球范围内致死率居第三位的恶性肿瘤^[1],近年来随着诊断及治疗水平的提高,结直肠癌患者的预后得到了明显改善,但是发生远处转移的病人五年生存率只有 11.7%^[2]。上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是细胞从上皮型到间充质型转化的过程,是导致细胞发生侵袭、转移的重要原因^[3]。EMT 过程中,细胞表面分子表达改变,上皮表型蛋白分子表达减少,间质表型蛋白分子表达增加,使肿瘤细胞获得侵袭、转移能力^[4]。

间隙连接广泛存在于人体细胞中,间隙连接由间隙连接蛋白形成膜通道,相邻细胞或细胞与细胞外基质间可通过间隙连接通道交换物质,对细胞生理功能及信号传导有重要作用^[5]。近些年的研究报道指出,间隙连接蛋白的表达异常与肿瘤相关,GJA1(Gap Junction Alpha-1)是研究最为广泛的间隙连接基因,其编辑的连接蛋白称 Connexin-43(Cx43),但其参与癌症发生、发展中的具体机制仍有争议。有研究表明,GJA1 在癌组织中高表达,并在肿瘤发生、发展中起促进作用^[6-9];也有研究发现 GJA1 在癌组织中低表达,其表达功能的减少促进癌的发生发展^[10-12]。GJA1 的相关研究已经见于胃癌、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌和肺癌中^[6-9,13-17],但其在结直肠癌中的作用尚未见相关报道。本研究通过组织 PCR 探究 GJA1 在结直肠癌中的表达变化,通过细胞功能实验研究 GJA1 对结直肠癌细胞侵袭、转移能力的影响,并初步探讨其分子机制,旨在为结直肠癌的诊断及预后判断提供新的生物标志物。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 人结直肠癌细胞 HCT116 和 HCT8 均购于上海中国科学院细胞库。

1.1.2 组织样本 结直肠癌组织样本(配对的癌和正常组织)92 例均随机选自于 2013-2014 年在上海市第一人民医院行根治性手术的病人标本库,其中男性 48 例,女性 43 例,年龄 35 岁-84 岁,中位年龄 65 岁。入选标准:1、所有病人术前均没有接受放疗或者新辅助治疗;2、术后患者组织病理经两位病理专家诊断为结直肠癌。排除标准:1、患者年龄小于 25 岁;2 术前接受放疗或新辅助治疗;3 伴有其它组织类型肿瘤或既往有肿瘤病史;4、有家族遗传性结直肠癌或其它相关遗传病。本研究通过上海第一人民医院伦理委员会的许可,对病人知情并得到许可。

1.1.3 主要试剂及仪器 试剂:DMEM 高糖培养基、胎牛血清(Gibco)、青霉素-链霉素-两性霉素 B、胰酶 蛋白酶抑制剂混合液(新赛美)、RIPA 裂解液(强)、loading buffer、10%快速配胶试剂盒、蛋白 marker、PVDF 膜(Millipore)、ECL 显影液、TRIzol、RNA 逆转录试剂盒、PCR SYBR Green(新贝公司)。

抗体:一抗:E-cadherin(3195)、N-cadherin(13116)、Vimentin(5741)、Snail(3879)均购于 CST 公司;GJA1(A2163)购于 Ab-colonal 公司;GAPDH(Proteintech,10494-1-AP)

二抗:过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (H+L)多克隆抗体、过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (H+L)多克隆抗体

质粒:空载体(Vector):pSLenti-EF1a-mCherry-P2A-Puro-CMV-MCS-3Flag

过表达载体(OE):pSLenti-EF1a-mCherry-P2A-Puro-CMV-GJA1-3Flag

敲减对照序列(NC):UUCUCCGAACGUGUCACGU

敲减序列(Si):CAGUCUGCCUUUCGUUGUA

仪器:罗氏 PCR 仪,Bio-Rad 公司电泳仪和转膜槽,Thermo Fisher 公司细胞培养箱,Leica 公司倒置显微镜。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及敲减、过表达细胞株的构建 将 HCT8 及 HCT116 细胞培养于 10%的血清+1%三抗的培养基、5%的 CO₂、37℃ 无菌的环境中。待细胞状态良好,铺至 6 cm 皿的 60-80%时,转染 GJA1 过表达质粒及 siRNA。按照 Lipofectamine2000 转染试剂的操作手册进行配置对应的质粒、siRNA、Lipofectamine2000 和 DMEM 各组分比例,加入待染细胞中培养,8 小时后弃培养基,改用为完全培养基继续培养,24 小时提取 RNA,48 小时提取蛋白,并同时完成相关功能实验。

1.2.2 实时定量链式聚合酶反应(Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction,PCR) 组织样本和细胞系 RNA 的提取使用 TRIzol(Invitrogen,CA,USA),根据试剂所给的操作手册步骤提取。cDNA 的合成使用逆转录试剂盒(新贝公司) GAPDH 为内参基因,所有实验均设三个重复。

引物序列:Human-GAPDH-F: GTCTCCTCT-GACTTCAACAGCG

Human-GAPDH-R: ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

Human-GJA1-F: GGAGATGAGCAGTCTGCCTTTC

Human-GJA1-R: TGAGCCAGGTACAAGAGTGTGG

1.2.3 蛋白免疫印迹(Western Blot,WB) 用 BCA 蛋白浓度测试盒检测蛋白浓度,以 20 μg 作为上样蛋白总量计算各组蛋白上样体积,加入 5× loading buffer 后 100℃ 8 分钟,电泳(90V 20 分钟+120V 40 分钟),转膜(300 mA 90 分钟)封闭(雅酶快速封闭液 30 分钟),一抗孵育(E-Cadherin 1:1000, E-Cadherin 1:1000, Vimentin 1:1000,Snail 1:1000,GJA1 1:500,GAPDH 1:1000,)4℃ 过夜;二抗孵育(兔二抗 1:10000,鼠二抗 1:10000)室温 2 小时;ECL 显影液显影,ImageJ 软件进行灰度分析。

1.2.4 划痕实验(Wound Healing assay) 六孔板铺满目的细胞(每组细胞 3 个副孔),贴壁后用无菌 200 μL 的枪头沿直尺垂直划痕,PBS 清洗脱落细胞,改用空 DMEM 培养基继续培养,分别在 0 h 和 48 h 同一位置拍照,以 0 h 为基础观察各组细胞的迁移能力。

1.2.5 迁移实验(Transwell assay) 胰酶消化目的细胞为单个细胞,离心去上清,加入空白 DMEM 培养基,制作均匀的细胞悬液,计数,取约 5000 个细胞加入小室上方,另加空白 DMEM 培养基补至 200 μL,小室下方加适量(没过小室底部)完全培养基,放入培养箱继续培养 24-48 h 后取出小室,去除小室上方培养基,PBS 清洗,甲醇固定 15 分钟,0.1%的结晶紫染 30 分钟,棉签轻拭小室上表面去除小室上表面的细胞,倒置显微镜调整焦距观察小室下表面细胞,随机取小室下表面 5 个视野拍照并对视野内的细胞计数。

1.3 统计学方法

使用 Graphpad 8.0 软件作图和 SPSS 22.0 软件进行定量数据的统计分析,两组差异比较用 t 检验,相关分性析用卡方检验,多组之间差异比较采用 One-way ANOVA 分析, Kiplan-Mere 分析肿瘤患者 GJA1 高表达组和低表达组总体生存率和无病生存率, $P < 0.05$ 视为有统计学意义的差异。

2 结果

2.1 GJA1 在结直肠癌组织中低表达

qPCR 定量分析 92 对结直肠癌组织和癌旁组织中 GJA1 的表达量,其中,62 对癌组织中 GJA1 的表达量显著低于其对应癌旁组织, One-way ANOVA 分析, $P < 0.0001$ (如图 1 A)。卡方检验分析结果表明 GJA1 的相对表达量与肿瘤分期、分化程度、浸润深度、淋巴血管转移明显相关 ($P < 0.05$),而与患者年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤大小无相关性(表 1)。Kiplan-Mere 分析发现结直肠癌患者中低表达 GJA1 者显示出更差的总体生存率和更低的无病生存率(如图 1 B、C)。

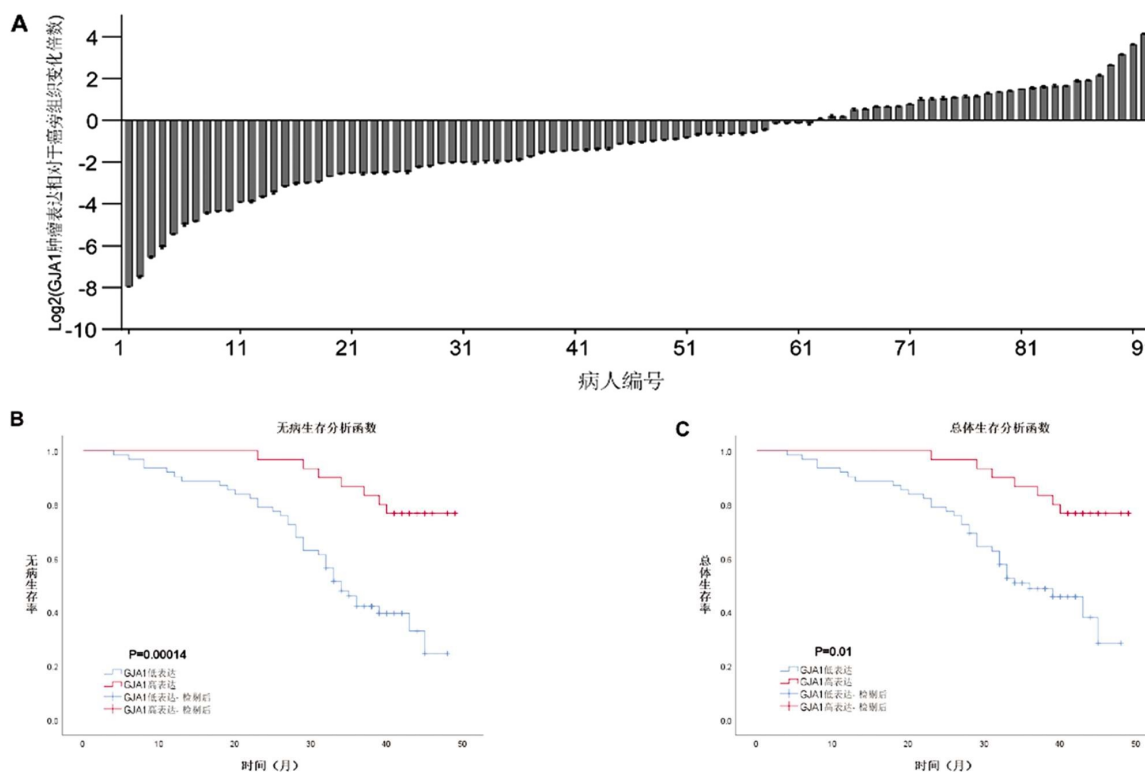


图 1 GJA1 在结直肠癌组织中的表达及其与患者预后相关性

Fig.1 The expression level of GJA1 in 92 pairs of colorectal cancer tissues and prognosis of corresponding patients

(A. PCR 定量分析表明结直肠癌组织中 GJA1 的表达量显著低于其对应癌旁组织;B,C. Kiplan-Mere 分析提示结直肠癌患者 GJA1 低表达总体生存率和无病生存率明显低于高表达者。)

(A. PCR quantitative analysis show that the expression level of GJA1 in colorectal cancer tissues is significantly lower than that in corresponding paracancerous tissues; B,C. Kiplan-Mere analysis indicate that the overall survival and disease-free survival of patients with low GJA1 expression are significantly lower than those with high GJA1 expression.)

2.2 构建 HCT116 过表达 GJA1 细胞株和构建 HCT8 敲减 GJA1 细胞系

在低表达 GJA1 的结直肠癌细胞系 HCT116 中转入载有 GJA1 基因序列的质粒后,分别提取细胞系蛋白和细胞系 RNA,检测其表达情况,发现 GJA1 蛋白表达和 mRNA 表达均明显升高 ($P < 0.001$)(如图 2 A、C)。同样,在高表达 GJA1 的 HCT8 中在转入 Si 序列后,GJA1 蛋白表达和 mRNA 表达均明显降低 ($P < 0.01$)(如图 2 B、C)。

2.3 过表达和敲减 GJA1 对 EMT 相关表型分子的影响

Western blot 检测 4 种细胞侵袭转移相关的基因 E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin、Snail 蛋白表达情况。HCT116 过表达(OE)GJA1 与空载(Vector)比较:E-cadherin 蛋白表达明显升高,N-cadherin、Vimentin、Snail 蛋白表达明显降低(如图 3 A、

B)。HCT8 敲减(Si)GJA1 与对照(NC)比较:E-Cadherin 蛋白表达量显著降低,N-Cadherin、Vimentin、Snail 蛋白表达量显著升高(如图 3 A、C)。正反两个方面结果表明 GJA1 能抑制结直肠癌细胞中间充质表型蛋白的表达,初步证明 GJA1 可能通过负调控结直肠癌细胞 EMT 进程来抑制结直肠癌侵袭、转移。

2.4 过表达和敲减 GJA1 对细胞侵袭、转移能力的影响

Transwell 和划痕实验结果显示:在 HCT116 细胞中,过表达 GJA1 可使 Transwell 小室迁移能力降低(如图 4 A),划痕爬行能力减弱(如图 4 C);在 HCT8 细胞中,敲减 GJA1 可增强 Transwell 小室迁移(如图 4 B)及划痕爬行能力(如图 4 D)。两种细胞株功能实验均表明 GJA1 能抑制结直肠癌细胞侵袭、转移。

表 1 GJA1 的表达与患者临床病理特征的相关性(n=92)

Table 1 Patient and tumor information statistics(n=92)

	Groups	Low expression of GJA1 (62)	High expression of GJA1 (30)	χ^2	P-value
Age(years)	<65(45)	29	16	0.348	0.555
	≥ 65(47)	33	14		
Gender	Male(48)	32	16	0.1	0.751
	Female(43)	30	13		
Tumor location	Right hemicolon(35)	23	12	0.072	0.788
	Left hemicolon and return(57)	39	18		
Tumor sizes	<5 cm(51)	37	14	1.385	0.239
	≥ 5 cm(41)	25	16		
Stage of TNM	I + II(44)	23	19	5.609	0.018*
	III+IV(48)	39	11		
Differentiation	Low and moderate(74)	56	18	11.812	0.01*
	High(18)	6	12		
Invasion	To mucosa and submucosa layer(26)	10	16	13.803	0.0001***
	To Muscle and serous layer(66)	52	14		
Lymphatic vascular metastasis	No(64)	36	28	11.878	0.001**
	Yes(28)	26	2		

Bold represent significance: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$.

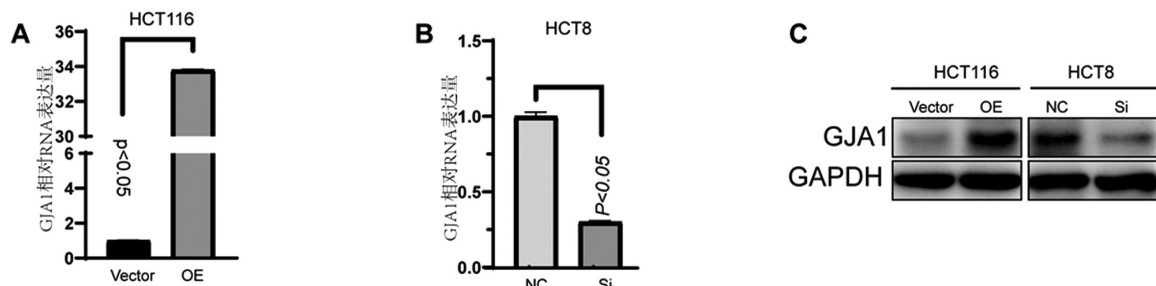


图 2 GJA1 在过表达和敲减细胞系中的 RNA 和蛋白的表达情况

Fig.2 The expression of protein and RNA of GJA1 after overexpression and knockdown of GJA1 in cell lines

Note: Data A were expressed as $\bar{x} \pm SD$, n=3. $P<0.05$, compared with Vector group; So as data B, $P<0.05$, compared with NC group.

(A,C. PCR 和 WB 检测转入 GJA1 过表达载体的 HCT116, GJA1 的 RNA 和蛋白水平均升高; B,C. PCR 和 WB 检测转入 GJA1 敲减载体的 HCT8, GJA1 的 RNA 和蛋白水平均下降。)

(A,C. The results of PCR and WB show that both RNA and protein levels of GJA1 increase when HCT116 is transferred into the overexpression of GJA1;

B,C. The results of PCR and WB show that both RNA and protein levels of GJA1 decrease when HCT8 is transferred into the knockdown of GJA1.)

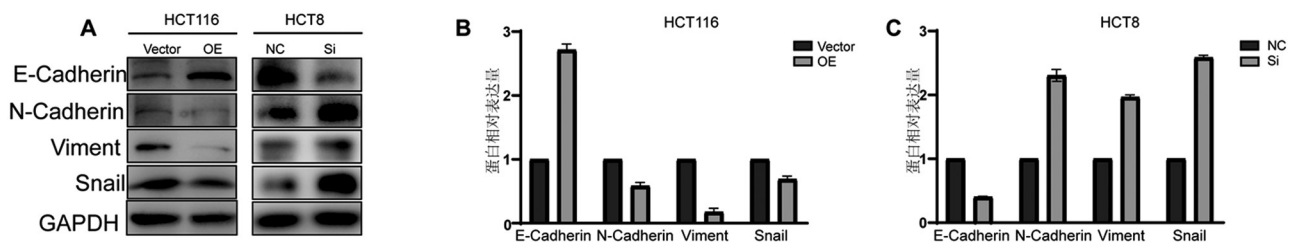


图 3 GJA1 过表达和敲减后 EMT 相关蛋白的表达

Fig.3 Expression of EMT relative proteins after GJA1 OE or Si

(A,B. WB 检测 HCT116 过表达 GJA1 后, E-cadherin 升高, N-cadherin、Vimentin、Snail 降低; A,C. WB 检测 HCT8 敲减 GJA1 后, E-cadherin 降低, N-cadherin、Vimentin、Snail 升高。)

(A,B. WB results show that E-cadherin is increased and N-cadherin, Vimentin and Snail are decreased in HCT116 overexpressed with GJA1; A,C. WB results show that E-cadherin is decreased and N-cadherin, Vimentin and Snail are increased in HCT8 with GJA1 knockdown.)

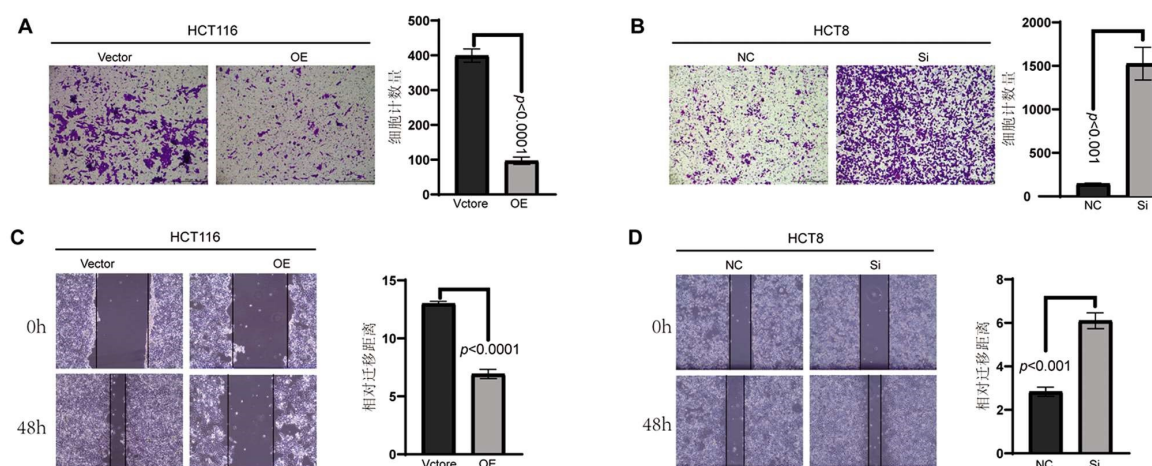


图4 GJA1 敲减和过表达后 Transwell 和 Wound Healing 实验结果

Fig.4 Changes of Transwell and Wound Healing after GJA1 OE or Si

(A,B. Transwell 实验示:HCT116 过表达 GJA1 后, Transwell 小室迁移细胞数减少,HCT8 敲减 GJA1 后, Transwell 小室迁移细胞数增加;C,D. Wound Healing 实验示:HCT116 过表达 GJA1 后, 迁移距离减少,HCT8 敲减 GJA1 后, 迁移距离增加。)

(A,B. Transwell assay show that HCT116 overexpressed with GJA1 reduce the number of migrating cells comparing with Vector, while HCT8 with the knockdown of GJA1 increase the number of migrating cells comparing with Si; C,D. Wound Healing assay show that the migration distance decrease after HCT116 overexpressed with GJA1, while the migration distance increase after HCT8 knockdown with GJA1.)

3 讨论

虽然 GJA1 已经在胃癌、前列腺癌、乳腺癌等恶性肿瘤中做过部分研究^[6-9],但在不同肿瘤发生、发展中作用尚存争议,并且尚未见 GJA1 在结直肠癌中的研究。本研究旨在探讨 GJA1 在结直肠癌组织中的表达情况及其对结直肠癌发生、发展的影响。通过 PCR 检测结直肠癌病例组织标本,首次发现 GJA1 在结直肠癌组织中相对于癌旁组织的表达降低。Bo Tang 等利用免疫组化分析胃癌组织芯片中 CX43 的表达量,发现高表达的 CX43 与胃癌的淋巴转移相关^[8];但 Lidia Puzzo 等在喉鳞状细胞癌的研究结果示低表达 CX43 的患者与更差的预后相关^[12]。本研究分析相关临床病理信息发现 GJA1 的表达与结直肠肿瘤分期、分化程度、浸润深度、淋巴血管转移相关;且低表达 GJA1 结直肠癌患者显示更差的无病生存率和总体生存率。缝隙连接和上皮到间充质转化(EMT)均为重要的细胞功能。生理条件下,缝隙连接主要由 GJA1 所表达的 CX43 所构成,主要负责相邻细胞间或细胞与细胞外环境之间的生物活性分子、代谢物和盐的转移,对细胞间信号交流和维持组织正常结构和功能有重要作用^[18]。同样,生理条件下 EMT 不仅是组织器官发育形成中一种重要方式,而且也可帮助组织器官抵抗不利环境的危害,是个体发育和自我保护的一种方式。然而在肿瘤中,EMT 使肿瘤细胞失去其上皮特性,例如细胞极性丧失和细胞间接触减少,在此过程中具上皮表型的肿瘤细胞获得了间充质表型,其游走运动能力增强,易向周围组织侵袭和远处转移^[19,20]。

近些年,许多研究认为肿瘤的侵袭和转移和肿瘤细胞的 EMT 密切相关^[21]。EMT 的效应蛋白为上皮特征蛋白 E-Cadherin 和间质特征蛋白 N-Cadherin、Viment、Snail、Twist 等,上皮特征蛋白表达减少和间质特征蛋白增加是 EMT 进程中的标志性改变^[22-24]。Jalal M Kazan 等人在乳腺癌的研究中发现 GJA1 的过表达增加了上皮特征蛋白 E-cadherin 和 zonula occludens

1 的表达水平,并导致 β -catenin 在细胞膜上聚集^[25]。Meiling Yu 等人在非小细胞肺癌化疗药顺氯氨铂(Cis-dichlorodiammine-platinum, CDDP)的耐药研究中发现 Cx43 的过表达逆转了耐 CDDP 肺癌细胞株中的 EMT 和 CDDP 耐药性^[26]。同样,本研究中通过构建 GJA1 过表达和敲减细胞株,检测 E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin 和 Snail 的表达,正反两个方面验证 GJA1 抑制结直肠癌细胞 EMT 进程,细胞功能实验和组织病理统计结果均表明 GJA1 与结直肠癌的侵袭转移相关。虽然我们对于 GJA1 调控结直肠癌 EMT 的具体机制尚未进一步探究,但已有的研究表明,敲减 Cx43 会导致 Wnt/ β -catenin 信号通路的活性增强,同时 Wnt/ β -catenin 信号通路的下游基因表达也增强,而 E-cadherin 基因的表达降低^[27]。Wnt/ β -catenin 通路和 TGF- β 信号通路是影响 EMT 进程的两个重要通路^[21,28],TGF- β 信号通路在肿瘤发展的不同时期对肿瘤的作用不同。但 Shuhei Fukuda 在 U2OS 细胞研究发现,GJA1 表达量的改变不影响 TGF- β 信号通路^[29]。

GJA1 作为编辑连接蛋白最主要的基因,是促癌因子还是抑癌因子,目前研究观点尚未统一,但越来越多的 GJA1 研究指向后者。Renzen Chen 等发现在肺癌 A549 细胞中过表达 GJA1 后能够加速 cyclin D1 和 E1 的降解并且抑制它们的表达,因为 Cx43 可以和 AKAP95 竞争性结合 cyclin E1/E2,从而影响 Cdk2 活性、Rb 磷酸化、DNA 转录活性和 G1/S 转换^[30]。但最近关于截断型的 Cx43(GJA1-20K)的报道似乎解释了 GJA1 在不同组织中促癌抑癌不统一的矛盾,GJA1 不仅表达连接蛋白作用的 Cx43,还表达存在于核内的 GJA1-20K。核内 GJA1-20K 显示出 mTOR 和 MAPK-Mnk1/2 通路激活效应,并且 GJA1-20K 可直接激活 N-Cadherin 的转录从而促进 EMT^[31]。

本研究首次发现,GJA1 在结直肠癌组织中表达降低,可抑制结直肠癌细胞 EMT,进而抑制其侵袭和转移。临床病理特征分析表明结直肠癌中 GJA1 低表达与肿瘤的侵袭、转移等恶性生物学行为相关,且低表达 GJA1 的结直肠癌患者显示更差的总

体生存率和无病生存率。在此基础上,可进一步深入研究 GJA1 的表达对 TGF- β 信号通路和 Wnt/ β -catenin 通路的影响,进一步探究 GJA1 影响结直肠癌发生、发展的具体分子机制,为结直肠癌的预防、诊断和治疗寻找新的靶点和思路。

参考文献(References)

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2019, 69(1): 7-34
- [2] Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer [J]. Lancet (London, England), 2014, 383(9927): 1490-502
- [3] Yang J, Antin P, Bex G, et al. Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition [J]. Nature reviews Molecular cell biology, 2020, 21(6): 341-52
- [4] Nieto MA, Huang RY-J, Jackson RA, et al. EMT: 2016 [J]. Cell, 2016, 166(1): 21-45
- [5] Bonacquisti EE, Nguyen J. Connexin 43 (Cx43) in cancer: Implications for therapeutic approaches via gap junctions [J]. Cancer Lett, 2019, 442(1): 439-444
- [6] Poyet C, Buser L, Roudnicky F, et al. Connexin 43 expression predicts poor progression-free survival in patients with non-muscle invasive urothelial bladder cancer[J]. J Clin Pathol, 2015, 68(10): 819-824
- [7] Stoletov K, Strnadl J, Zardouzan E, et al. Role of connexins in metastatic breast cancer and melanoma brain colonization [J]. J Cell Sci, 2013, 126(Pt 4): 904-913
- [8] Tang B, Peng Z-H, Yu P-W, et al. Expression and significance of Cx43 and E-cadherin in gastric cancer and metastatic lymph nodes [J]. Med Oncol, 2011, 28(2): 502-508
- [9] Conklin C, Huntsman D, Yorlida E, et al. Tissue microarray analysis of connexin expression and its prognostic significance in human breast cancer [J]. Cancer Lett, 2007, 255(2): 284-294
- [10] Pu P, Xia Z, Yu S, et al. Altered expression of Cx43 in astrocytic tumors[J]. Clinical neurology and neurosurgery, 2004, 107(1): 49-54
- [11] Caltabiano R, Torrisi A, Condorelli D, et al. High levels of connexin 43 mRNA in high grade astrocytomas. Study of 32 cases with in situ hybridization[J]. Acta histochemica, 2010, 112(6): 529-535
- [12] Puzzo L, Caltabiano R, Parenti R, et al. Connexin 43 (Cx43) Expression in Laryngeal Squamous Cell Carcinomas: Preliminary Data on Its Possible Prognostic Role [J]. Head and neck pathology, 2016, 10(3): 292-297
- [13] Alaga KC, Crawford M, Dagnino L, et al. Aberrant Cx43 Expression and Mislocalization in Metastatic Human Melanomas [J]. J Cancer, 2017, 8(7): 1123-1128
- [14] Liang Q-L, Wang B-R, Chen G-Q, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor and connexin43 for predicting pancreatic cancer clinicopathologic parameters[J]. Med Oncol, 2010, 27(4): 1164-1170
- [15] Tanaka T, Kimura M, Ishiguro H, et al. Connexin 43 expression is associated with poor survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. Mol Clin Oncol, 2016, 4(6): 989-993
- [16] Tang B, Peng Z-H, Yu P-W, et al. Aberrant expression of Cx43 is associated with the peritoneal metastasis of gastric cancer and Cx43-mediated gap junction enhances gastric cancer cell diapedesis from peritoneal mesothelium[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e74527
- [17] Zhang Y, Xu H, Wang E. Expressions of connexin 43 and E-cadherin and their correlation in non-small cell lung cancer [J]. Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 2005, 8(2): 103-106
- [18] Epifantseva I, Shaw RM. Intracellular trafficking pathways of Cx43 gap junction channels [J]. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2018, 1860(1): 40-47
- [19] Pastushenko I, Blanpain C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis[J]. Trends Cell Biol, 2019, 29(3): 212-226
- [20] Aiello NM, Kang Y. Context-dependent EMT programs in cancer metastasis[J]. J Exp Med, 2019, 216(5): 1016-1026
- [21] Vu T, Datta PK. Regulation of EMT in Colorectal Cancer: A Culprit in Metastasis[J]. Cancers (Basel), 2017, 9(12): 171
- [22] Loh C-Y, Chai JY, Tang TF, et al. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges[J]. Cells, 2019, 8(10): 1118
- [23] Bai Y, Sha J, Kanno T. The Role of Carcinogenesis-Related Biomarkers in the Wnt Pathway and Their Effects on Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Oral Squamous Cell Carcinoma[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(3): 555
- [24] Georgakopoulos-Soares I, Chartoumpakis DV, Kyriazopoulou V, et al. EMT Factors and Metabolic Pathways in Cancer [J]. Front Oncol, 2020, 10(7): 499
- [25] Kazan JM, El-Saghir J, Saliba J, et al. Cx43 Expression Correlates with Breast Cancer Metastasis in MDA-MB-231 Cells In Vitro, In a Mouse Xenograft Model and in Human Breast Cancer Tissues [J]. Cancers (Basel), 2019, 11(4): 460
- [26] Yu M, Zhang C, Li L, et al. Cx43 reverses the resistance of A549 lung adenocarcinoma cells to cisplatin by inhibiting EMT[J]. Oncology reports, 2014, 31(6): 2751-2758
- [27] Xie D, Zheng G-Z, Xie P, et al. Antitumor activity of resveratrol against human osteosarcoma cells: a key role of Cx43 and Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Oncotarget, 2017, 8(67): 111419-111432
- [28] Qi J, Yu Y, Akilli Öztürk Ö, et al. New Wnt/ β -catenin target genes promote experimental metastasis and migration of colorectal cancer cells through different signals[J]. Gut, 2016, 65(10): 1690-1701
- [29] Fukuda S, Akiyama M, Harada H, et al. Effect of gap junction-mediated intercellular communication on TGF- β induced epithelial-to-mesenchymal transition [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2019, 508(3): 928-933
- [30] Chen R, Chen Y, Yuan Y, et al. Cx43 and AKAP95 regulate G1/S conversion by competitively binding to cyclin E1/E2 in lung cancer cells[J]. Thoracic cancer, 2020, 11(6): 1594-1602
- [31] Kotini M, Barriga EH, Leslie J, et al. Gap junction protein Connexin-43 is a direct transcriptional regulator of N-cadherin in vivo[J]. Nature communications, 2018, 9(1): 3846