

**Inhibition of Autotaxin Sensitizes Colon Cancer to Radiation by Suppressing
LPAR2-AKT Survival Signaling**

Yingnan Zhang¹, Yuanyuan Chen¹, Wenwen Guo¹, Yaru Guo¹, Shengcheng Yao^{2*},
Xiaojin Wu^{3, 1*}.

¹ Xuzhou first People's Hospital, The Affiliated Xuzhou Municipal Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, 221112, China.

² The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, 221002, China.

³ XuZhou Central Hospital. Xuzhou, 221009, China.

*** Corresponding authors:**

Shengcheng Yao, The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, 99 Huaihai West Road, Xuzhou, 221004, China. E-mail: surgery@126.com. ORCID: 0009-0007-6885-145X

Xiaojin Wu, Xuzhou Central Hospital, 199 Jiefang South Road, Xuzhou, 221009, China. E-mail: xiaojinwuxz2014@163.com. ORCID: 0009-0003-9081-8438

This PDF file includes:

Supplementary figures

Raw uncropped labelled western blots

Mycoplasma testing and STR authentication for cell lines.

Primer sequences

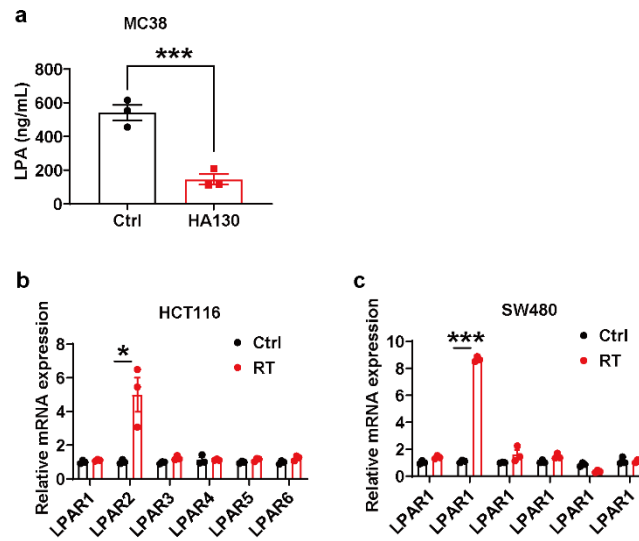


Figure S1 ATX promotes colon cell growth through LPAR2-AKT activation. (a) MC38 cells were cultured with or without HA130 (50 nM). Then LPA level was measured by ELISA. (b-c) LPAR1-6 mRNA levels in HCT116, and SW480 cells were determined by RT-qPCR. Differences between two groups were assessed by an unpaired Student's t-test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

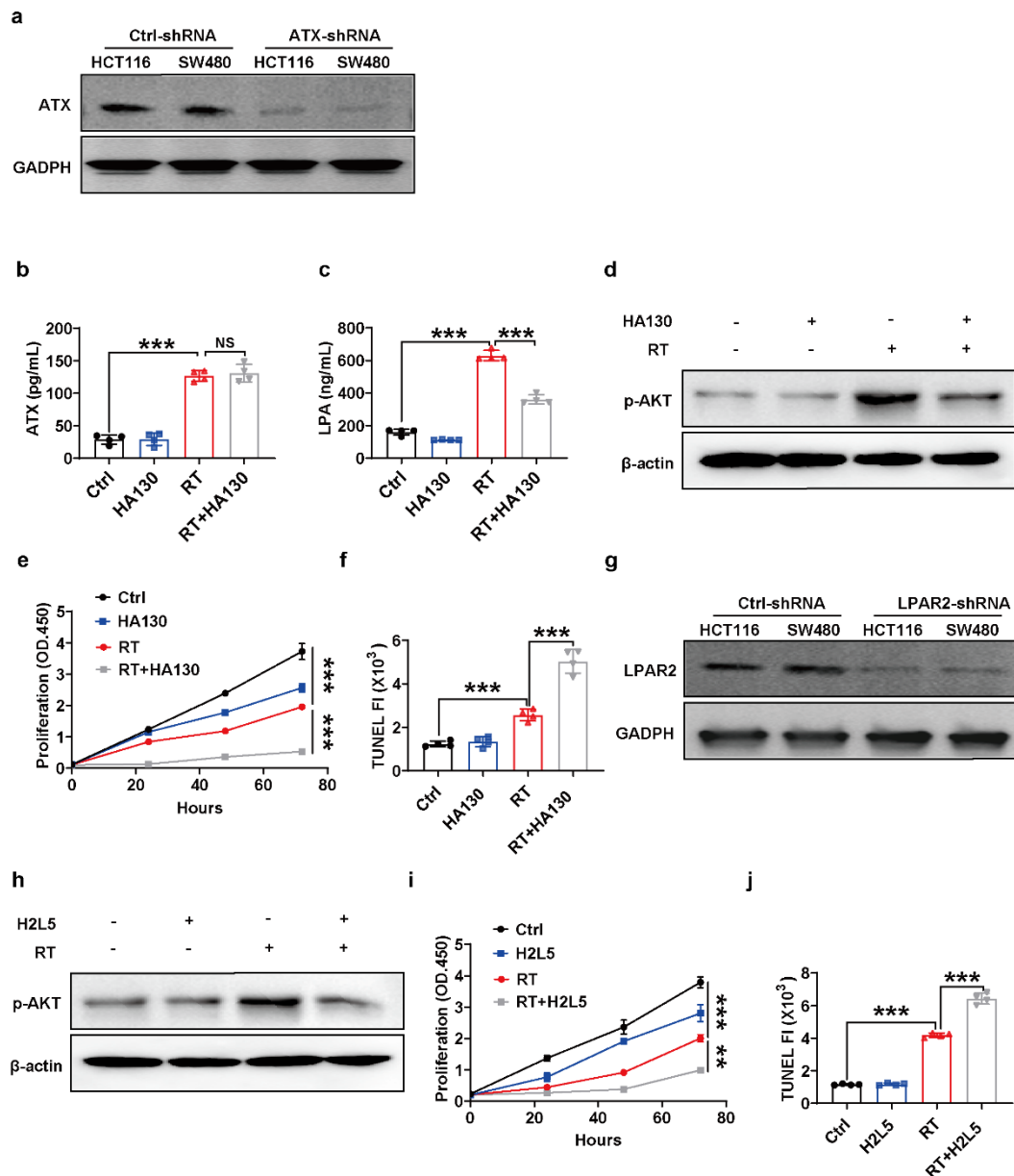


Figure S2. ATX-LPAR2 blocking enhances radiosensitivity in colon cancer cells *in vitro*. (a) ATX expression was measured by Western blot in HCT116 and SW480 cells with or without ATX knockdown. (b) MC38 cells were irradiated with a dose of 6 Gy, with or without HA130 (50 nM) administration. ATX level was measured by ELISA in supernatants. (c) LPA level was measured by ELISA in supernatants. (d) p-AKT expression was measured by Western blot. (e) The proliferation was measured by CCK-8 assay. (f) MC38 cells were irradiated with a dose of 6 Gy, with or without HA130 (50 nM). After 48 hours, apoptosis was measured using the TUNEL apoptosis assay kit. (g) LPAR2 expression was measured by Western blot in HCT116 and SW480 cells with or without LPAR2 knockdown. (h) MC38 cells were irradiated with a dose of 6 Gy, with

or without H2L5186303 (H2L5, 18 nM) administration. p-AKT expression was measured by Western blot (i) Then the proliferation was measured by CCK-8 assay. (j) MC38 cells were irradiated with a dose of 6 Gy, with or without H2L5 (18 nM,). After 48 hours, apoptosis was measured using the TUNEL apoptosis assay kit. All data are expressed as the mean $\pm$ SEM (n = 3-4). Multiple groups were analyzed by one-way ANOVA with Tukey's post hoc test. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$.

Raw uncropped labelled western blots

Figure 1h

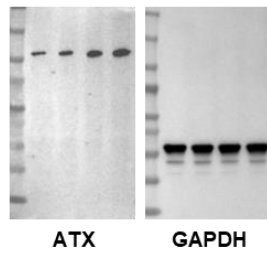


Figure 1i

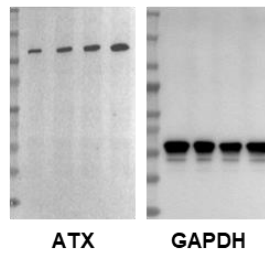


Figure 1j

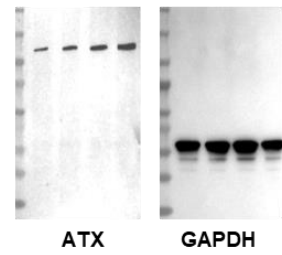


Figure 2j

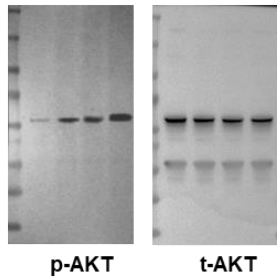


Figure 2k

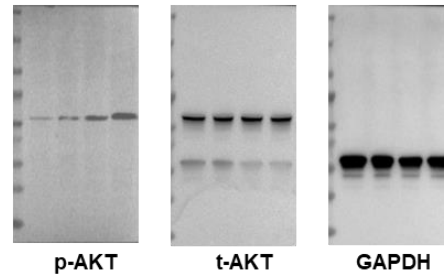


Figure 2i

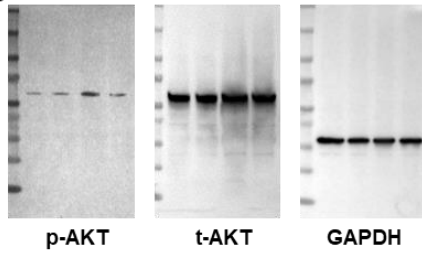


Figure 2m

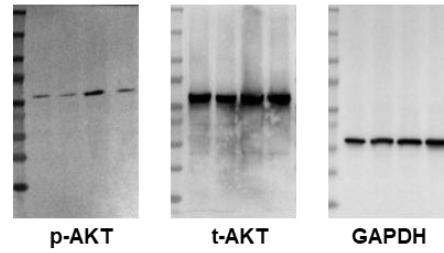


Figure 3c

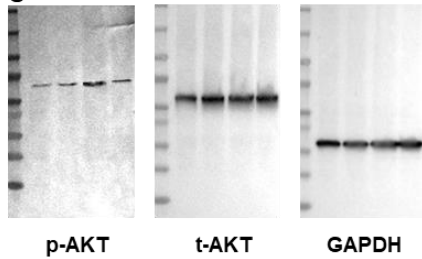


Figure 3d

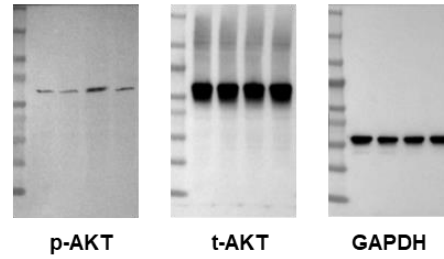


Figure 3g

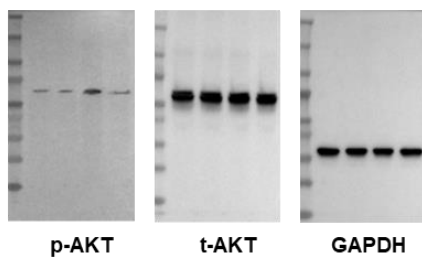
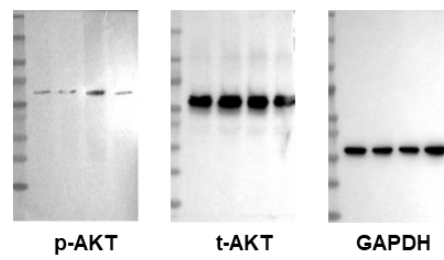
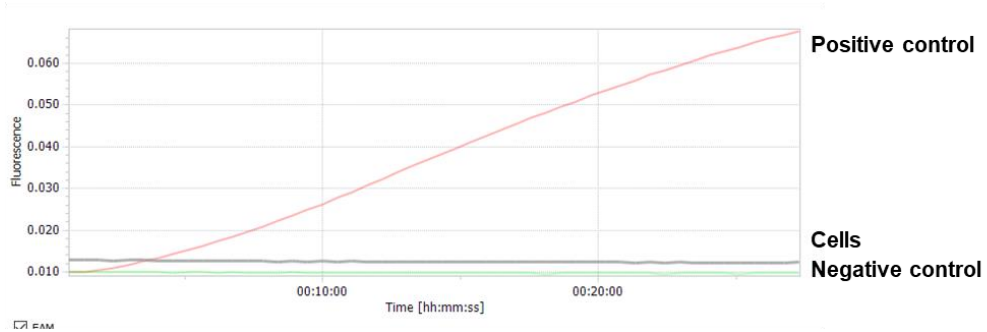


Figure 3h

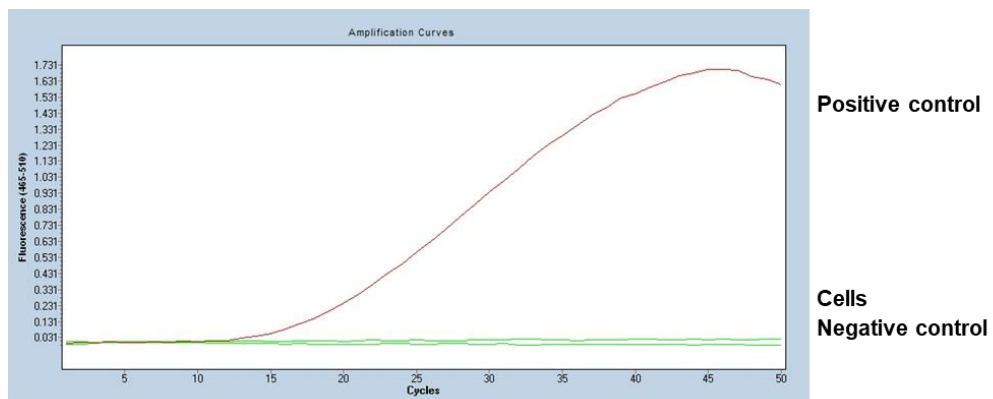


Mycoplasma testing

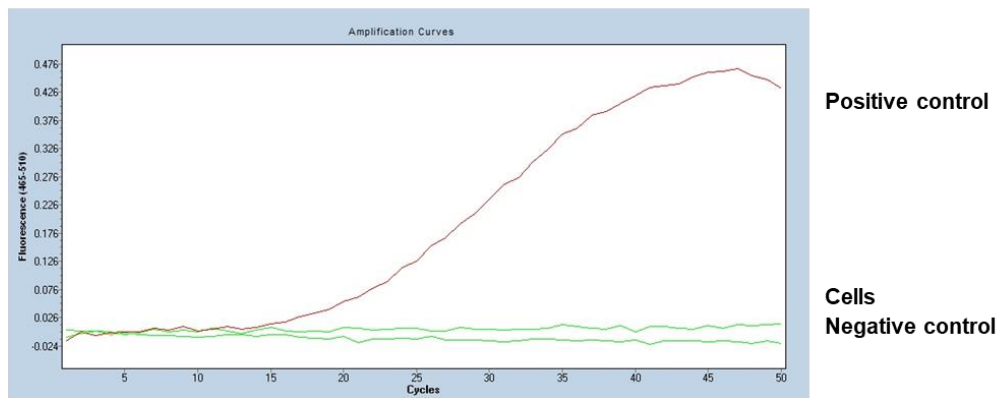
MC38



HCT116



SW480



STR authentication for cell lines

SW480

梓杉生物

梓杉生物

SW480 细胞 STR 鉴定报告

附表：SW480 细胞的 STR 位点和 Amelogenin 位点的基因分型结果

一、材料处理和检测方法

取适量细胞 ($> 1\times 10^6$)，使用 Tingle 的动物基因组抽提试剂盒 (货号 TSP201-200) 提取细胞的基因组 DNA，使用新海生物的 Nati SU9 dNTP Mix (货号 NH9347) 对 19 个 STR 位点以及性别位点 Amelogenin 进行扩增，使用 Cellosaurus STR 相似度搜索工具 CLASTR 对检测数据进行分析，同时与 ATCC、DSMZ、JCRB 等多个细胞库以及文献资料进行比对。

二、检验结果

样品编号	多等位基因	匹配细胞系	细胞库	匹配度	匹配说明
SW480	无	SW480	ATCC	1.00	完全匹配

● 多等位基因指三等位及以上基因现象。

三、鉴定结论：

1、本次检测各细胞分型结果良好。

2、该细胞株 DNA 分型在细胞库中匹配到与其细胞分型 **100%** 匹配的细胞株，细胞株名为：**SW480**。

备注：

1、根据国际细胞鉴定委员会 (ICLAC) 制定的细胞 STR 鉴定标准，当细胞系匹配度为 1.00 时是完全匹配；匹配度在 0.80 到 0.99 之间时认定检测细胞与细胞库里匹配到的细胞具有相关性；但当匹配度小于 0.80 时表明检测细胞与细胞库里匹配到的细胞 STR 位点差异较大，两者之间没有关联，不能对检测细胞进行鉴定。

2、STR 比对结果默认 ExPASy，服务器公开访问地址
(<https://web.expasy.org/cellosaurus-str-search/>)。

细胞 SW480 的 STR 位点和 Amelogenin 位点的基因分型结果						
Loci	送检细胞 STR 信息			细胞库细胞 STR 信息		
	送检细胞名：SW480			细胞库细胞名：SW480		
	Allele1	Allele2	Allele3	Allele1	Allele2	Allele3
D5S818	13			13		
D13S317	12			12		
D7S820	8			8		
D16S539	13			13		
VWA	16			16		
TH01	8			8		
AMEL	X			X		
TPOX	11			11		
CSF1PO	13	14		13	14	
D12S391	17			17		
FGA	24			24		
D2S1338	17	24		17	24	
D21S11	30	30.2		30	30.2	
D18S51	13			13		
D8S1179	13			13		
D3S1358	15			15		
D6S1043	11	12				
PENTAE	10			10		
D19S433	13			13		
PENTAD	9	15		9	15	

鉴定日期：2022-10-19

第 1 页 共 6 页

第 2 页 共 6 页

武汉梓杉生物技术有限公司

地址：湖北省武汉市东西湖区吴家湾二街111号生物医药加速器22栋5楼
电话：027-85714038 网址：www.servobio.cn 全国服务热线：4006027178

武汉梓杉生物技术有限公司

地址：湖北省武汉市东西湖区吴家湾二街111号生物医药加速器22栋5楼
电话：027-85714038 网址：www.servobio.cn 全国服务热线：4006027178

HCT116

梓杉生物

梓杉生物

HCT116 细胞 STR 鉴定报告

一、材料处理和检测方法

取适量细胞 ($> 1 \times 10^6$)，使用 Tingle 的动物基因组抽提试剂盒 (货号 TSP201-200) 提取细胞的基因组 DNA，使用新海生物的 NaH SU9 dNTP Mix (货号 NH9347) 对 19 个 STR 位点以及性别位点 Amelogenin 进行扩增，使用 Cellosaurus STR 相似度搜索工具 CLASTR 对检测数据进行分析，同时与 ATCC、DSMZ、JCRB 和 RIKEN 等多个细胞库以及文献资料进行比对。

二、检验结果

样品编号	多等位基因	匹配细胞系	细胞库	匹配度	匹配说明
HCT116	有	HCT 116	PubMed (19372543)	0.9538	基本匹配

● 多等位基因指三等位及以上基因现象。

三、鉴定结论：

1、本次检测各细胞分型结果良好。

2、该细胞株 DNA 分型在细胞库中匹配到与其细胞分型 **95.38%** 匹配的细胞株，细胞株名为：**HCT116**。

备注：

1、根据国际细胞鉴定委员会 (ICLAC) 制定的细胞 STR 鉴定标准，当细胞系匹配度为 1.00 时是完全匹配；匹配度在 0.80 到 0.99 之间时认定检测细胞与细胞库里匹配到的细胞具有相关性；但当匹配度小于 0.80 时表明检测细胞与细胞库里匹配到的细胞 STR 位点差异较大，两者之间没有关联，不能对检测细胞进行鉴定。

2、STR 比对结果默认 ExPASy，服务器公开访问地址
(<https://web.expasy.org/cellosaurus-str-search/>)。

附表：HCT116 细胞的 STR 位点和 Amelogenin 位点的基因分型结果

细胞 HCT116 的 STR 位点和 Amelogenin 位点的基因分型结果						
Loci	送检细胞 STR 信息			细胞库细胞 STR 信息		
	送检细胞名：HCT116			细胞库细胞名：HCT 116		
	Allele1	Allele2	Allele3	Allele1	Allele2	Allele3
D5S818	10	11		10	11	
D13S317	10	12		10	12	
D7S820	11	12		11	12	
D16S539	11	13		11	13	
VWA	17	22		17		
TH01	7	8	9	8	9	
AMEL	X			X		
TPOX	8			8		
CSF1PO	7	10		7	10	
D12S391	17	21				
FGA	18	23		18	23	
D2S1338	16			16		
D21S11	29	30		29	30	
D18S51	16	17		16	17	
D8S1179	12	14		12	14	
D3S1358	12	19		12	19	
D6S1043	13	14				
PENTAE	13	14		12	13	14
D19S433	12	13		12	13	
PENTAD	9	13		9	13	

鉴定日期：2022-10-19

第 1 页 共 2 页

第 2 页 共 2 页

武汉梓杉生物技术有限公司

地址：湖北省武汉市东西湖区吴家湾二街111号生物医药加速器22栋5楼
电话：027-85714038 网址：www.servobio.cn 全国服务热线：4006027178

武汉梓杉生物技术有限公司

地址：湖北省武汉市东西湖区吴家湾二街111号生物医药加速器22栋5楼
电话：027-85714038 网址：www.servobio.cn 全国服务热线：4006027178

Supplementary Table 1. Sequences of primer sets used in qRT-PCR

Gene	Sequence (5'-3')
hATX Fwd	5'-AGGCAGTTCCATTCCCTGTTC-3'
hATX Rev	5'-AGGCTGGTGAGATGTTCAAT-3'
mATX Fwd	5'-TCCTCCCTATCTGAGCTCTTC-3'
mATX Rev	5'-GGTGATGATGCTGTAGTAGTGG-3'
hLPA1 Fwd	5'-GGCTATGTTCCGCCAGAGGACTAT-3'
hLPA1 Rev	5'-TCCAGGAGTCCAGCAGATGATAA-3'
hLPA2 Fwd	5'-CAGCCTGGTCAAGACTGTTGT-3'
hLPA2 Rev	5'-TGCAGGACTCACAGCCTAAA-3'
hLPA3 Fwd	5'-ACGGTGATGACTGTCTTAGGG-3'
hLPA3 Rev	5'-CACCTTTTCACATGCTGCAC-3'
hLPA4 Fwd	5'-AAAGATCATGTACCCAATCACCTT -3'
hLPA4 Rev	5'-CTTAAACAGGGACTCCATTCTGAT -3'
hLPA5 Fwd	5'-ATGTTAGCCAACAGCTCCTCAACC-3'
hLPA5 Rev	5'-GCCAGTGGTGCAGTGCGTAGTA-3'
hLPA6 Fwd	5'-GGTAAGCGTTAACAGCTCCCACT-3'
hLPA6 Rev	5'-TTTGAGGACGCAGATGAAAATGT-3'
h β -Actin Fwd	5'-TGAAGTGTGACGTGGACATA-3'
h β -Actin Rev	5'-GGAGGAGCAATGATCTTGAT-3'
m β -Actin Fwd	5'-GTGACGTTGACATCCGTAAAG-3'
m β -Actin Rev	5'-GCCGGACTCATCGTACTCC-3'