

· 基础研究 ·

转化生长因子 $\beta 1$ 联合表皮生长因子 诱导上皮向间质转化对人喉癌细胞株 Hep-2 侵袭能力影响的研究

杜瑞霞¹, 侯学东¹, 富公弼¹, 刘哲², 许元鸿², 杨帆¹, 高红¹, 周彬¹

(1. 沈阳医学院附属奉天医院耳鼻咽喉科, 辽宁沈阳 110024; 2. 中国医科大学附属第一医院胰腺外科, 辽宁沈阳 110001)

摘要: 目的 探讨转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 联合表皮生长因子 (epithelial growth factor, EGF) 诱导上皮向间质转化对人喉癌细胞株 Hep-2 侵袭能力的影响。方法 应用 TGF- $\beta 1$ 单独刺激和 TGF- $\beta 1$ 联合 EGF 刺激人喉癌细胞株 Hep-2 后 24、48 h 观察细胞形态学的动态变化。应用 Transwell 检测细胞侵袭能力及 RT-PCR 和 Western blot 技术检测细胞上皮钙依赖黏附蛋白 (E-cadherin) 和波形蛋白 (vimentin) 的表达。结果 ① TGF- $\beta 1$ 单独处理 48 h 组和 TGF- $\beta 1$ 联合 EGF 处理 24、48 h 组均能刺激喉癌细胞株 Hep-2 发生细胞形态改变。② TGF- $\beta 1$ 联合 EGF 处理组无论是 24 h 还是 48 h, 其 Hep-2 细胞的侵袭能力都明显强于相同时段 TGF- $\beta 1$ 单独处理组 ($P < 0.05$); TGF- $\beta 1$ 单独处理 48 h 组细胞侵袭能力又明显强于对照组 ($P < 0.05$)。③ TGF- $\beta 1$ 联合 EGF 处理组 E-cadherin 的表达降低, 而 Vimentin 表达却明显上升。结论 EGF 能够协同 TGF- $\beta 1$ 诱导上皮向间质转化, 从而使喉癌具有更强的侵袭能力。

关键词: 喉癌; 细胞株; 转化生长因子 $\beta 1$; 表皮生长因子; 上皮向间质转化

中图分类号: R739.65 文献标识码: A 文章编号: 1007-1520(2012)01-0010-05

Effect of epithelial-mesenchymal transition induced by TGF- $\beta 1$ co-treated with EGF on invasive ability of human laryngeal carcinoma cell Hep-2

DU Rui-xia, HOU Xue-dong, FU Gong-bi, et al.

(Department of Otorhinolaryngology, Affiliated Fengtian Hospital, Shenyang Medical University, Shenyang 110024, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) co-treated with epithelial growth factor (EGF) on invasive ability of human laryngeal carcinoma cell Hep-2. **Methods** Human laryngeal carcinoma cell line Hep-2 was treated with TGF- $\beta 1$ or TGF- $\beta 1$ + EGF. Cellular morphological changes were observed seperatively under inverted microscope 24 h and 48 h after treatment. RT-PCR and Western blot assay were used for estimating several invasive genes: E-cadherin and vimentin. The invasive ability was detected by transwell chamber. **Results** ① EMT in Hep-2 was promoted both in the TGF- $\beta 1$ group (48 h) and the TGF- $\beta 1$ + EGF group (24 and 48 h). ② The enhancement of Hep-2 invasive ability in TGF- $\beta 1$ + EGF group (24 h and 48 h) were more obvious than that in TGF- $\beta 1$ group ($P < 0.05$). The invasive ability of TGF- $\beta 1$ group (48 h) was more obvious than that of the control group ($P < 0.05$). ③ E-cadherin expression decreased and Vimentin expression increased obviously in TGF- $\beta 1$ + EGF group. **Conclusion** EGF

作者简介: 杜瑞霞, 女, 博士研究生。

通讯作者: 侯学东, Email: houxuedong4321@126.com; 富公弼, Email: fugongbi4321@126.com; 侯学东, 富公弼为并列通讯作者。

can promote EMT while co-treated with TGF- $\beta 1$, and therefore enhance the invasive ability of human laryngeal carcinoma cell line Hep-2.

Key words: Laryngeal neoplasm; Cell strain; Transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$); Epithelial growth factor (EGF); Epithelial-mesenchymal transition (EMT)

喉癌是头颈部常见恶性肿瘤之一,其局部浸润转移能力及有无淋巴结转移对患者的预后产生重要影响。肿瘤的转移是个多因素参与的多阶段复杂过程。其中,上皮向间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)起到极为重要的作用。目前研究证明,上皮来源的肿瘤在其侵袭和转移的过程中往往伴有上皮细胞特征的消失,而同时出现间质细胞的特征,这种情况又往往多见于肿瘤发生侵袭、转移的早期^[1]。因此,研究肿瘤的 EMT 对于探讨肿瘤早期的侵袭、转移能力及为研究更为合理有效的治疗靶点提供了新的方向。

本实验研究了 TGF- $\beta 1$ 单独和 TGF- $\beta 1$ 联合 EGF 刺激对人喉癌细胞株 Hep-2 中 E-cadherin 和 Vimentin 的变化以及对 Hep-2 细胞侵袭能力的影响,从而进一步探讨喉癌细胞株 Hep-2 的侵袭、转移的生物学行为。

1 材料与方法

1.1 材料

人喉癌细胞株 Hep-2 及人胰腺癌细胞株 Panc-1 购自上海中科院细胞库;DMEM 培养基和胎牛血清均购自 Gibco 公司;Transwell 小室购自美国 Corning Coster 公司;Matrigel 胶购自美国 BD Biosciences 公司, RNAiso plus 及逆转录试剂 Prime-Script[®] RT reagent Kit 均购自 TAKARA 公司;TGF- $\beta 1$ 和 EGF 均购自 Reprotech 公司;E-cadherin、vimentin、GAPDH 引物由南京金斯瑞公司合成;兔抗羊 E-cadherin、vimentin 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;ECL 化学发光液购自碧云天公司。

1.2 细胞培养

人喉癌细胞株 Hep-2 培养于含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中,每 2 d 换液 1 次,每 3 ~ 4 d 传代 1 次。当细胞达到 70% ~ 80% 融合状态时,以 PBS 洗涤细胞 3 次,分别用含有 TGF- $\beta 1$ (10 ng/ml) 和 TGF- $\beta 1$ (10 ng/ml) 联合 EGF (100 ng/ml) 的 DMEM 培养基培养 24 h 和

48 h。实验对照组仅将等量 1% BSA 加入 DMEM 中进行培养。Olympus 倒置相差显微镜观察细胞形态。

1.3 Transwell 小室检测细胞侵袭能力

Transwell 小室上室铺 50 μ l (250 μ g/ml) Matrigel 生物胶,下室中加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 600 μ l。所有实验细胞均调整密度为 1×10^5 个/孔,以含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养基种于小室上室。实验对照组不加任何处理因素直接按上述密度接种;单纯 TGF- $\beta 1$ 和 TGF- $\beta 1$ 联合 EGF 刺激组分别刺激 24、48 h 后接种于小室上室。

放于培养箱中培养 24 h,取出小室,PBS 洗 2 遍,4% 多聚甲醛固定 30 min,0.1% 结晶紫染色 20 min 后拿棉签轻轻擦去上室 Matrigel 胶及未穿过的细胞,200 倍显微镜下计数,任意选取 5 个视野,以其平均细胞数为侵袭至膜上的细胞数,每组重复 3 次实验,求取平均数。

1.4 RT-PCR 检测 E-cadherin 及 Vimentin mRNA 表达

细胞总 RNA 的提取:各组细胞在刺激 48 h 后分别提取 RNA。按照 TAKARA 公司 RNAiso plus 试剂盒提取 RNA,A260 测浓度。引物序列:E-cad 的 sense primer 为 (5'-TCC CAT CAG CTG CCC AGA AA-3'), antisense primer 为 (5'-TGA CTC CTG TGT TCC TGT TA-3') 500 bp。Vimentin 的 sense primer 为 (5'-CCA GTG CGT GAA ATG GAA G-3'), antisense primer 为 (5'-TCA AGG TCA TCG TGA TGC TG-3') 366 bp。GAPDH 的 sense primer 为 (5'-TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG G-3'), antisense primer 为 (5'-CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3') 982 bp。PCR 扩增条件:94℃ 变性 30 s, 57℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环。2% 琼脂糖凝胶电泳,结果采用 Quantity one 成像分析软件分析。实验重复 3 次。

1.5 Western blot 检测 E-cadherin、Vimentin 蛋白表达

严格按照 RIPA 蛋白裂解液试剂盒说明书

进行各组蛋白的提取,将蛋白与 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液以 4: 1 混合后煮沸变性 5 min,置于 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,分离的蛋白转移至 PVDF 膜上之后,用 5% 脱脂奶粉配置的 TBST 室温封闭 2 h,加入 E-cadherin (1: 800)、vimentin (1: 1000)、GAPDH (1: 1500) 一抗后 4℃ 封闭过夜,辣根过氧化物酶标记的二抗室温 2 h, TBST 洗膜, 5 min × 4 次,化学发光法 (electrochemiluminescence, ECL) 显色。实验重复 3 次。

1.6 统计学方法

所有计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 13.0 统计软件对结果进行分析,应用 *t* 检验统计分析; $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TGF-β1 单独与 TGF-β1 联合 EGF 刺激对 Hep-2 细胞形态学的影响 (图 1)

与对照组相比, TGF-β1 单独刺激 24 h 后细胞形态学已经开始出现变化,但是不明显,仅仅少量细胞略出现变成梭形的趋势; TGF-β1 单独刺激 48 h 后上述趋势有了较为明显的变化,部分细胞变成梭形,细胞间也更加分散。与 TGF-β1 单独 24 h 相比, TGF-β1 联合 EGF 刺激 24 h 后细胞形态学的变化非常明显,大部分细胞已经变成长梭形; 联合刺激 48 h 后,细胞形态学变化异常的明显,几乎所有细胞都变成了长梭形,细胞排列极不规则。

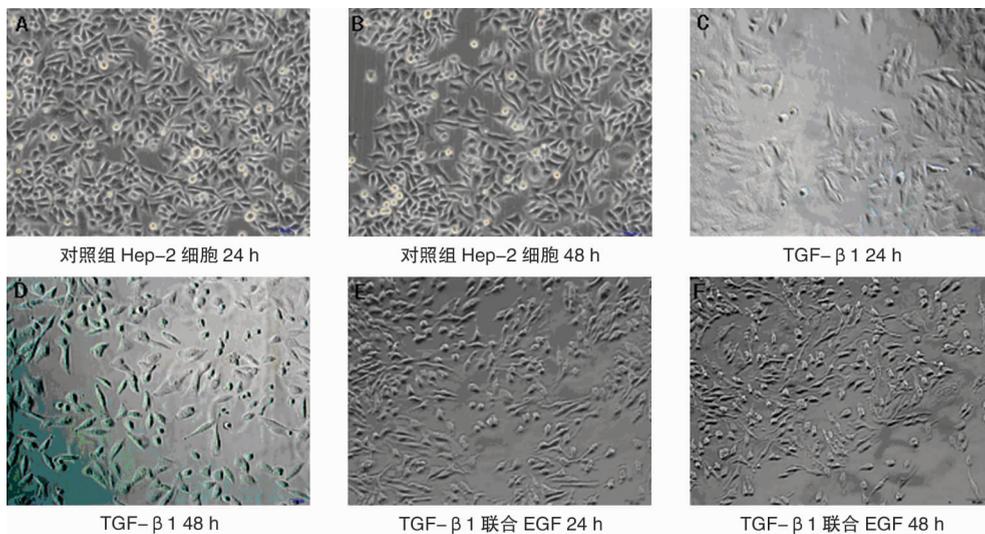


图 1 与对照组相比, TGF-β1 单独处理组及 TGF-β1 联合 EGF 处理组 24、48 h 细胞形态学的变化 (倒置显微镜, × 200)

2.2 Transwell 体外检测细胞侵袭能力的结果

与对照组相比,单纯 TGF-β1 刺激 48 h 后细胞侵袭能力增加较明显 (99 ± 11 vs 59 ± 9 , $P < 0.05$); 而 TGF-β1 联合 EGF 刺激 24 h 后细胞侵袭能力与对照组相比,差异有统计学意义 (120 ± 9 vs 59 ± 9 , $P < 0.01$), TGF-β1 联合 EGF 刺激 48 h 后侵袭能力增加,与对照组相比差异具有统计学意义 (170 ± 15 vs 59 ± 9 , $P < 0.001$)。体外侵袭实验结果表明:无论是 TGF-β1 单独处理组 48 h 还是 TGF-β1 联合 EGF 处理组, Hep-2 细胞的侵袭能力都明显增

加。但联合刺激能使 Hep-2 细胞获得更强的侵袭能力 (图 2)。

2.3 Western blot 及 RT-PCR 的检测结果

与对照组相比, Vimentin 的 mRNA 及蛋白的表达在 TGF-β1 单独刺激 48 h 组及 TGF-β1 联合 EGF 刺激 48 h 组均有改变,其差异具有统计学意义 (mRNA: 0.88 ± 0.07 vs 0.4 ± 0.04 ; 蛋白: 0.79 ± 0.08 vs 0.23 ± 0.01 , $P < 0.01$); TGF-β1 单独与 TGF-β1 联合 EGF 刺激 48 h 两组之间比较,差异具有统计学意义 (mRNA: 0.62 ± 0.06 vs 0.88 ± 0.07 ; 蛋白: 0.41 ± 0.05 vs

0.79 ± 0.08 , $P < 0.05$, 见图 3A, B)。同时与对照组相比, E-cadherin 的表达在 TGF-β1 单独刺激 48 h 组及 TGF-β1 联合 EGF 刺激 48 h 组均有改变, 其差异具有统计学意义 (mRNA: 0.07 ± 0.03 vs 0.28 ± 0.07 , 蛋白: 0.09 ± 0.02 vs

0.36 ± 0.06 , $P < 0.01$); TGF-β1 单独与 TGF-β1 联合 EGF 刺激 48 h 两组之间比较, 其差异具有统计学意义 (mRNA: 0.21 ± 0.04 vs 0.07 ± 0.03 , 蛋白: 0.31 ± 0.04 vs 0.09 ± 0.02 , $P < 0.05$, 见图 3C, D)。

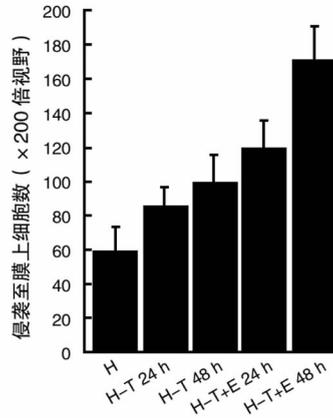


图2 TGF-β1单独处理组与TGF-β1联合EGF处理组24、48 h Transwell侵袭实验。H:对照组;H-T 24 h:TGF-β1单独处理24 h;H-T 48 h:TGF-β1单独处理48 h;H-T + E 24 h:TGF-β1联合EGF处理24 h;H-T + E 48 h:TGF-β1联合EGF处理48 h

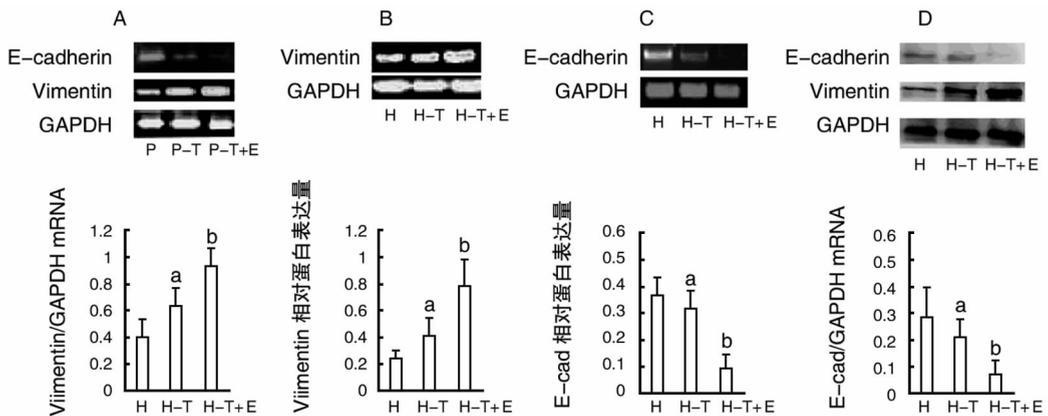


图3 TGF-β1单独与TGF-β1联合EGF处理Hep-2细胞48 h后对E-cadherin和Vimentin mRNA表达的影响。A为阳性对照胰腺癌细胞系PANC-1;P:对照组;P-T:TGF-β1单独处理48 h组;P-T + E:TGF-β1联合EGF 48 h组。B为Hep细胞系vimentin的mRNA表达。C为Hep细胞系E-cadherin的mRNA表达。D为Hep细胞系E-cadherin及vimentin的蛋白表达;H:对照组;H-T:TGF-β1单独处理48 h组;H-T + E:TGF-β1联合EGF 48 h组

3 讨论

EMT自20余年前被提出以来,一直受到广泛的关注。经典的诱导EMT的因子为TGF-β,另外还有EGF、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、成纤维细胞生长因

子(fibroblast growth factor, FGF)等。EMT使细胞失去极性,丢失细胞间紧密连接和黏附连接,获得了浸润性和游走迁移能力。目前已经在乳腺癌、结肠癌、肝癌、肺癌、胰腺癌等多种癌症中得到证明。越来越多的证据显示,EMT与肿瘤的侵袭、转移,特别是早期转移有极为密切的关系,并且可以通过多条途径诱导产

生。TGF- β 与其受体结合后,激活细胞内 Smad 信号通路,通过抑制 E-钙黏蛋白的表达来诱导 EMT 发生^[2-3]。在人的角质细胞中,由 TGF- β 诱导产生的 EMT 需要 Ras 基因的激活^[4]。而在人胰腺癌中, Collagen I 通过激活 JNK1 而使得胰腺癌的 N-cadherin 表达上调从而增加其侵袭能力^[5]。有学者证明在 TGF- β 诱导肝肿瘤细胞产生 EMT 以后, SDF-1/CXCR4 轴可能对转移起到重要的作用^[6]。在口腔鳞癌和胰腺癌中,单独转染带有 SNAIL 的质粒便可产生 EMT^[7-8]。

本研究对人喉癌细胞 Hep-2 EMT 的诱导进行了初步研究。笔者发现, TGF- β 1 单独刺激 24h 后细胞形态学已经开始出现变化,但是不明显,仅少量细胞略出现变成梭形的趋势。TGF- β 1 单独刺激 48 h 后上述趋势有了较为明显的变化,部分细胞变成梭形,细胞间也更加分散。笔者同时还应用了 TGF- β 1 联合 EGF 刺激,当刺激 24 h 后,细胞形态学发生了非常明显的变化,侵袭能力增加显著;当刺激时间延长至 48 h 后,所有细胞均变成长梭形,侵袭能力与对照组比较,差异具有统计学意义。同时上皮标志物 E-cadherin 的 mRNA 及蛋白的表达明确降低,而间质细胞标志物 Vimentin 的表达却明显上升。笔者还应用了阳性对照 Panc-1 胰腺癌细胞系,根据文献所述方法成功诱导其 EMT 的产生^[9-10],并检测到 E-cadherin 及 vimentin 的 mRNA 变化作为阳性对照组。综上所述笔者得到启示:在 Hep-2 细胞中,EGF 通过与 TGF- β 1 的协同作用产生 EMT,并且产生 EMT 的细胞更具备间质细胞的形态,其侵袭能力更强。特异性的阻断表皮生长因子受体可以有效地抑制鼻咽癌细胞的生长^[11],可见 EGF 极有可能在头颈鳞癌的增殖、转移过程中发挥重要作用。因此笔者猜测,EGF 很有可能是通过与 TGF- β 1 共同激活如 PI3K-AKT/PKB 等途径使得细胞获得更强的侵袭能力^[12]。至于各种刺激因子是如何通过协同作用来调控喉癌的侵袭和转移仍需要进一步研究探明。

参考文献:

- [1] Thierry JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(6): 442-454.
- [2] Thuault S, Valcourt U, Petersen M, et al. Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Cell Biol*, 2006, 174(2): 175-183.
- [3] Thuault S, Tan EJ, Peinado H, et al. HMGA2 and Smads co-regulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(48): 33437-33446.
- [4] Davies M, Robinson M, Smith E, et al. Induction of an epithelial to mesenchymal transition in human immortal and malignant keratinocytes by TGF-beta1 involves MAPK, Smad and AP-1 signalling pathways [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2005, 95(5): 918-931.
- [5] Shintani Y, Hollingsworth MA, Wheelock MJ. Collagen I promotes metastasis in pancreatic cancer by activating c-Jun NH2-Terminal Kinase 1 and up-regulating N-cadherin expression [J]. *Cancer Research*, 2006, 66(24): 11745-11753.
- [6] Bertran E, Caja L, Navarro E, et al. Role of CXCR4/SDF-1 alpha in the migratory phenotype of hepatoma cells that have undergone epithelial-mesenchymal transition in response to the transforming growth factor-beta [J]. *Cell Signal*, 2009, 21(11): 1595-1606.
- [7] Takkunen M, Grenman R, Hukkanen M, et al. Snail-dependent and -independent epithelial-mesenchymal transition in oral squamous carcinoma cells [J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2006, 54(11): 1263-1275.
- [8] Nishioka R, Itoh S, Gui T, et al. SNAIL induces epithelial-to-mesenchymal transition in a human pancreatic cancer cell line (BxPC3) and promotes distant metastasis and invasiveness in vivo [J]. *Experimental and molecular pathology*, 2010, 89(2): 149-157.
- [9] Ellenrieder V, Hendl SF, Boeck W, et al. Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation [J]. *Cancer Research*, 2001, 61(10): 4222-4228.
- [10] 殷涛,王春友,赵刚,等. 转化生长因子- β 1 诱导的上皮向间叶转化对胰腺癌侵袭和转移的意义 [J]. *华中科技大学学报*, 2007, 36(1): 67-70.
- [11] 张宁,刘勇,张欣,等. 联合靶向阻断 EGFR 和 mTOR 信号通路对鼻咽癌细胞生长影响的研究 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2010, 16(2): 86-90.
- [12] Onoue T, Uchida D, Begum NM, et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 system in oral squamous cell carcinoma cells [J]. *International Journal of Oncology*, 2006, 29(5): 1133-1138.

(修回日期:2011-11-07)

[1] Thierry JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour pro-