

AEG-1 介导上皮 – 间质转化调控头颈部鳞状细胞癌的侵袭转移

余长云,刘 勇,谭浩蕾,朱刚才,李 果,粟忠武,田勇泉,邱元正,张 欣

(中南大学湘雅医院 耳鼻咽喉头颈外科,耳鼻咽喉科重大疾病研究湖南省重点实验室,湖南 长沙 410008)

摘 要: **目的** 分析星形胶质细胞上调基因-1 (astrocyte elevated gene-1, AEG-1) 可介导上皮 – 间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 调控头颈鳞癌侵袭转移的分子机制。**方法** 采用慢病毒介导 AEG-1 的上调载体上调 AEG-1 在头颈鳞癌 Tu686 细胞中的表达,划痕愈合实验、Transwell 侵袭小室实验检测其体外迁移侵袭能力的改变,同时 Western blot 检测 EMT 分子标志物 E-cadherin 及 Vimentin 的表达情况。**结果** Tu686 细胞中 AEG-1 表达上调后,细胞划痕愈合率增加,穿过 Transwell 聚碳酸酯膜的细胞明显增多,且 Tu686 细胞上皮细胞标志物 E-cadherin 的表达量显著下调,间质细胞标志物 Vimentin 表达显著上调。**结论** AEG-1 表达上调可显著提高头颈部鳞癌细胞的体外侵袭能力,且该侵袭能力的增强可能与 AEG-1 介导的 EMT 改变密切相关。

关 键 词: 头颈部肿瘤;癌,鳞状细胞;星形胶质细胞上调基因-1;上皮 – 间质转化;转移

中图分类号: Q785; R739. 91 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007 – 1520(2013)03 – 0183 – 05

AEG-1 regulation of invasion and metastasis via epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma of head and neck

YU Chang-yun, LIU Yong, TAN Hao-lei, et al

(Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Otolaryngology Major Disease Research Key Laboratory of Hunan Province, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To investigate the molecular mechanism of regulation of invasion and metastasis of squamous cell carcinoma in head and neck (SCCHN) via epithelial-mesenchymal transition (EMT) mediated by AEG-1 in vitro. **Methods** Lentivirus-mediated AEG-1 overexpression vector was used for upregulating the expression of AEG-1 protein in SCCHN Tu686 cells. Wound healing assay, transwell chamber assay and Western blot were applied to examining the alteration of migration, invasion ability of Tu686 cells, and EMT molecular biomarkers (E-cadherin and Vimentin). **Results** Overexpression of AEG-1 led to increase of both wound healing rate and number of cells penetrating transwell membrane, accompanied with down-regulated expression of epithelial molecule E-cadherin and up-regulated expression of mesenchymal molecule Vimentin. **Conclusions** AEG-1 overexpression can greatly enhance the migration and invasion ability of SCCHN cells in vitro, which may be associated with EMT changes mediated by AEG-1.

Key words: Head and neck neoplasm; Carcinoma, squamous cell; Astrocyte elevated gene-1; Epithelial-mesenchymal transition; Metastasis

头颈部鳞状细胞癌的侵袭转移严重影响

着其治疗方案的决定及预后。星形胶质细胞上调基因-1 (astrocyte elevated gene-1, AEG-1; 又名 Metadherin) 为新近发现的肿瘤癌基因, 现有研究显示 AEG-1 在恶性肿瘤的侵袭转移中发挥了重要作用^[1-2]。笔者前期在头颈鳞癌组织中发现 AEG-1 的表达显著升高, 且与头颈鳞癌的颈部淋巴结转移密切相关, 与头颈鳞癌的预后呈负相关, 为影响预后的独立影响因子^[3]。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81071757, 81272974, 81202128), 教育部博士点基金项目 (201001621), 湖南省博士研究生科研创新项目 (CX2011B059), 湖南省科技厅重点项目 (2010TP4012 – 1), 高等学校博士点专项科研基金新教师类 (20120162120049), 中南大学青年助推基金 (2012QNZT099)。
作者简介: 余长云, 女, 博士研究生。
通讯作者: 张 欣, E-mail: xinz99@163. com.

然而, AEG-1 调控肿瘤侵袭转移的具体分子机制尚不明确。上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)目前为肿瘤转移分子机制研究中的热点,大量研究表明肿瘤细胞发生 EMT 改变后,侵袭转移能力显著增强^[4]。因此,本研究则在体外实验中探讨 AEG-1 对头颈鳞癌细胞侵袭转移能力及 EMT 改变的调控作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

DMEM/F12(1:1)培养基(Hyclone, 美国), 特级胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司), 0.25% 胰蛋白酶消化液(含乙二胺四乙酸), 双抗(青霉素-链霉素, Gibco, 美国), AEG-1 过表达慢病毒颗粒及对照慢病毒颗粒(广州复能基因有限公司), 兔抗人 AEG-1 多克隆抗体(美国 Proteintech group 公司), 小鼠抗人 E-cadherin 单克隆抗体、小鼠抗人 Vimentin 单克隆抗体(Santa Cruz, 美国), 小鼠抗人 β -actin 单克隆抗体(上海碧云天), 铺有 Matrigel 基质胶的 Transwell 小室(8 μ m 规格, Chemicon 公司, 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 头颈鳞癌 Tu686 细胞培养 本研究所采用的 Tu686 细胞为口咽部头颈鳞癌细胞, 由美国 Emory 大学 Gorgia Chen 赠送。该细胞株在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下, 用含有 10% 特级胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 DMEM/F12(1:1)培养基进行培养, 常规 0.25% 胰蛋白酶消化传代。所有试验均选用处于对数生长期的细胞。

1.2.2 Tu686 细胞慢病毒感染 Tu686 细胞胰酶消化后, 经胎盼蓝染色计数, 确保活细胞比率在 98% 以上。再将 Tu686 细胞接种于 24 孔板, 每孔约 2×10^4 细胞, 培养过夜(感染时细胞融合率在 40%~50% 为宜)。分别加入 AEG-1 过表达慢病毒颗粒及对照慢病毒颗粒(携带 GFP 绿色荧光蛋白), 另加培养基及感染增强剂 Polybrene[®](终浓度为 5 μ g/ml)。感染后 16 h, 更换新鲜完全培养基继续培养 72 h。一方面, 荧光显微镜下观察该慢病毒载体对 Tu686 细胞的体外感染效率(GFP 绿色荧光蛋白表达的细胞数占总细胞数的比率); 另一方面, Western blot 验证感染后 Tu686 细胞 AEG-1 蛋白过表达效果。

实验细胞共分为 3 组: ①亲本细胞组(未进行病毒感染的 Tu686 细胞); ②对照组(感染携带空白载体慢病毒颗粒的 Tu686 细胞); ③实验组(感染携带 AEG-1 过表达慢病毒颗粒的 Tu686 细胞)。

1.2.3 蛋白印迹法(Western blot) 提取细胞总蛋白, 二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定细胞总蛋白浓度。50 μ g 总蛋白变性处理后, 进行 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳。蛋白电泳分离后转膜至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h。兔抗人 AEG-1 多克隆抗体(1:800), 小鼠抗人 E-cadherin 单克隆抗体(1:400)、小鼠抗人 Vimentin 单克隆抗体(1:200)于 4℃ 冰箱下孵育过夜或室温下孵育 1 h。洗膜后, 辣根过氧化物酶标记的二抗(1:3000)室温下孵育 1 h。经化学发光剂显影曝光摄片。以小鼠抗人 β -actin 抗体(1:2000)检测 β -actin 含量作为内参照。实验均重复 3 次。

1.2.4 划痕愈合实验 对数生长期细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化后, 吹打成单细胞悬液, 调整细胞浓度, 按 3×10^5 个细胞/孔接种于 6 孔细胞培养板, 使细胞第 2 天能达到单层贴壁生长状态并将近 100% 融合度。细胞贴壁完好后换无血清细胞培养基, 过夜。用 200 μ l 无菌 Tip 在 6 孔板中央划痕, 用 PBS 将漂浮的细胞洗净, 继续在无血清培养基, 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养。分别于划痕后 0、48 h 在倒置相差显微镜下拍照, 观察细胞划痕愈合情况, 比较各组细胞划痕愈合率。每组细胞做 3 个平行孔, 实验重复 3 次, 实验结果用 ip 6.0 软件进行分析, 分别随机取 5 处测量划痕距离, 计算划痕愈合率。

1.2.5 Transwell 小室侵袭实验 将铺有 Matrigel 胶的 Transwell 小室用紫外线照射 2 min, 使用前加入少量的灭菌无血清 DMEM/F12 培养基让其充分水化。将各组细胞胰蛋白酶消化后, 用无血清的 DMEM/F12 培养基制成细胞悬液, 按 2×10^4 细胞数加入每个小室(100 μ l), 放置于配套的 24 孔板上。下室加入条件培养基 600 μ l(DMEM 培养基 + 12% FBS)后, 继续培养 48 h。取出 Transwell 小室, 用棉签擦尽上室面的 Matrigel 胶和未穿通膜的细胞, 下室面用甲醇固定 10 min 后, 行常规 HE 染色 3~5 min,

置于光镜下观察拍照。随机取上下左右中5个高倍镜视野,计数小室下室面细胞数。实验重复3次,取平均数作为实验结果。

1.3 统计学方法

用SPSS 17.0统计软件进行分析,实验数据呈正态分布,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用多样本均数的方差分析进行组间样本均数的比较。所有检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 上调AEG-1在头颈鳞癌细胞Tu686中的

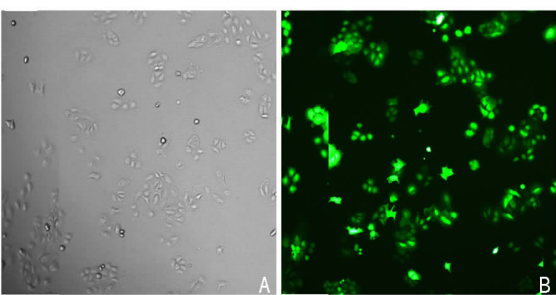


图1 荧光显微镜下观察慢性病毒载体对Tu686细胞的转染效率。A:明视野下Tu686细胞;B:荧光显微镜下Tu686细胞荧光表达情况

2.2 AEG-1蛋白过表达对头颈鳞癌Tu686细胞体外迁移能力的影响

AEG-1蛋白上调成功后,笔者采用划痕愈合实验检测Tu686细胞体外迁移能力的改变。结果显示48h后亲本细胞组、对照组、实验组细胞的划痕愈合率分别为 $(17 \pm 14)\%$ 、 $(18 \pm 8)\%$

表达

为探讨AEG-1对头颈鳞癌侵袭转移的影响,笔者首先采用慢病毒介导的AEG-1过表达质粒上调AEG-1在头颈鳞癌Tu686细胞中的表达。慢病毒感染后72h,分别于明视野(图1A)和荧光显微镜(图1B)下观察细胞以确定慢病毒感染效率,结果显示Tu686细胞的慢病毒感染率达95%以上,Western blot结果表明转染了目的基因的实验组细胞AEG-1的表达量较对照组和亲本细胞组显著升高(图2)。

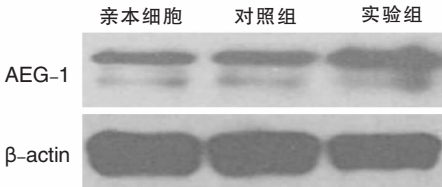


图2 Western blot检测转染AEGK-1过表达质粒后Tu686细胞AEG-1蛋白的表达情况。

及 $(80 \pm 15)\%$,见图3。采用多样本均数的方差分析表明,对照组和亲本细胞组划痕愈合率无明显差异($F = 0.155, P = 0.704$);而实验组较对照组和亲本细胞组的划痕愈合率明显增加($F = 57.840, P = 0.000; F = 78.743, P = 0.000$)。

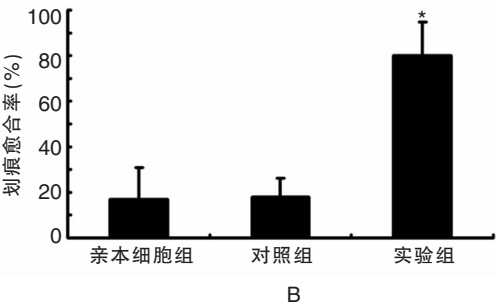
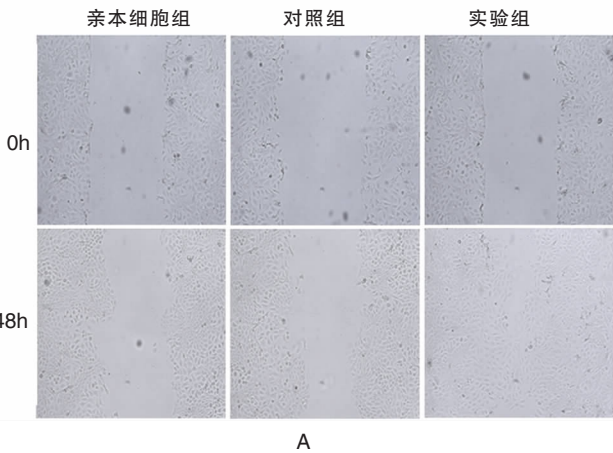


图3 细胞划痕愈合实验检测细胞迁移能力($\times 100$);48h后实验组Tu686细胞的迁移能力明显增强

2.3 AEG-1 蛋白过表达对头颈鳞癌 Tu686 细胞体外侵袭能力的影响

笔者进一步采用 Transwell 侵袭小室实验检测 Tu686 细胞体外侵袭能力的改变。结果显示实验组中穿过 Transwell 聚碳酸酯膜的 Tu686 细胞为 280 ± 16 , 而对照组和亲本细胞组分别为 153 ± 15 和 161 ± 12 (图 4)。采用多样本均数的方差分析表明, 对照组和亲本细胞组之间穿过聚碳酸酯膜的 Tu686 细胞数无明显差异 ($F = 0.808, P = 0.419$); 而实验组较对照组和亲本细胞组的穿过聚碳酸酯膜的 Tu686

细胞数明显增加 ($F = 57.961, P = 0.002; F = 247.680, P = 0.000$)。

2.4 AEG-1 蛋白过表达对头颈鳞癌 Tu686 细胞 EMT 分子标志物的影响

鉴于 EMT 改变在恶性肿瘤侵袭转移中的重要作用, 实验观察了 AEG-1 过表达对 Tu686 细胞 EMT 分子标志物 E-cadherin 及 Vimentin 表达的影响。Western blot 结果显示实验组中上皮细胞标志物 E-cadherin 的表达较对照组和亲本细胞组显著下降, 而间质细胞标志物 Vimentin 的表达则显著上调 (图 5)。

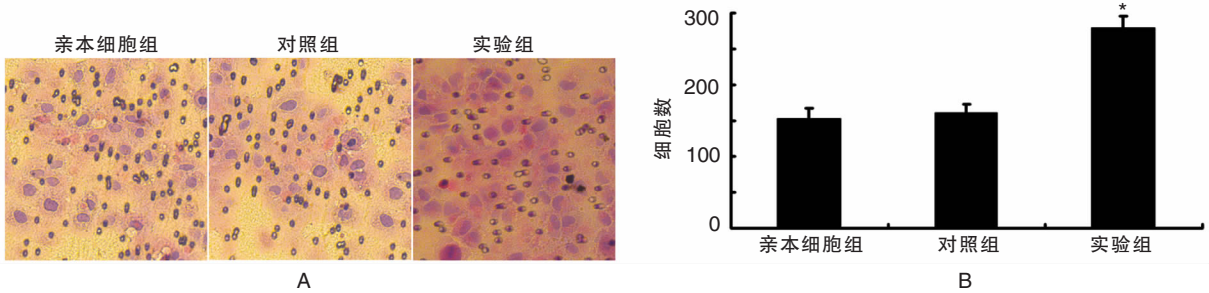


图 4 Transwell 侵袭小室实验检测细胞的侵袭能力 (HE × 100); 实验组 Tu 686 细胞的侵袭能力明显增强

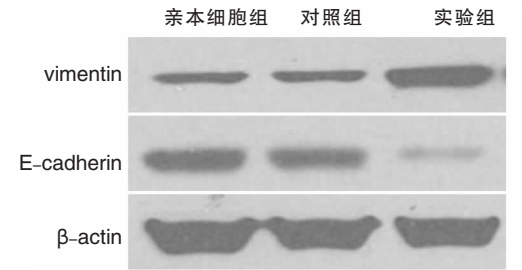


图 5 Western blot 检测 AEG-1 过表达后 EMT 分子标志物改变

3 讨论

头颈鳞癌转移是一个复杂且有多步骤参与的过程。其中, 肿瘤细胞从原发部位游离是转移最初步骤, 也是转移发生的先决条件。因此, 如果能阻止这一过程的发生, 将有可能从源头上控制肿瘤的转移。头颈鳞癌是一种上皮源性的肿瘤, 细胞之间存在着广泛的紧密连接。众多分子, 如 E-钙粘蛋白在维持上皮源性肿瘤特性以及细胞间连接中发挥着十分重要的作用。肿瘤细胞如何打破这种连接方式, 从原

发部位游离出来, 从而启动肿瘤的侵袭转移, 其机制尚不清楚。

近年来, EMT 在上皮源性肿瘤转移中的作用日益成为人们关注的热点。EMT 是细胞的一类基本形态和基因表型转化, 最先主要用于对胚胎发育的研究, 它的显著特征表现为细胞失去上皮形态学表现, 如细胞极性及紧密连接消失, 向间质细胞形态学转化, 如细胞失去相互连接及形成成纤维细胞样外观等; 与此同时, 典型的上皮细胞标志物, 如 E-Cadherin 和其他与分化相关的角蛋白等表达显著性下调或缺失, 而间质细胞的分子标志物 Vimentin 等的表达则显著上调^[5]。在多数上皮源性肿瘤中, EMT 变化已被认定是导致肿瘤侵袭转移非常重要的原因^[4, 6]。这一点在近期头颈鳞癌中得到证实^[7]。

AEG-1 是 2002 年新发现的一个癌基因, 其在乳腺癌、脑胶质瘤等肿瘤中高表达, 与肿瘤转移及预后密切相关^[8-9]。现有研究发现 AEG-1 蛋白可通过细胞增殖、促进迁移侵袭、血管增生、抗凋亡等促进肿瘤进展^[1, 10-11]。笔者前期在大样本头颈鳞癌组织标本中亦发现 AEG-1

蛋白在转移性头颈鳞癌组织中的表达显著上调,在组织学上与头颈鳞癌的颈部淋巴结转移密切相关^[3]。本研究通过体外细胞实验发现 AEG-1 过表达后能显著增强头颈鳞癌 Tu686 细胞的体外迁移侵袭能力,该研究结果表明 AEG-1 能对头颈鳞癌的侵袭转移发挥调控作用。

目前,AEG-1 在头颈鳞癌转移中的作用机制并不清楚。鉴于 EMT 在头颈鳞癌等人类恶性肿瘤转移中扮演了重要角色。本研究进一步通过在头颈鳞癌 Tu686 细胞中过表达 AEG-1 蛋白,发现其发生了 EMT 典型的分子标志物改变,阐明了 AEG-1 能够介导头颈鳞癌的 EMT 改变。该研究结果与 Li 等^[12]最近在乳腺癌的研究结果吻合,AEG-1 可通过促进乳腺癌细胞发生 EMT 改变进而增强其侵袭转移能力。上述研究结果初步提示 AEG-1 可能通过影响头颈鳞癌 EMT 改变调控头颈鳞癌的侵袭转移。

总而言之,本研究证实 AEG-1 表达上调可显著提高头颈鳞癌 Tu686 细胞的体外侵袭能力,且该侵袭能力的增加可能与 AEG-1 介导的上皮-间质转化密切相关。上述结果表明 AEG-1 有可能成为今后控制头颈鳞癌侵袭转移的潜在干预靶点。本文通过体外细胞实验发现 AEG-1 表达上调可显著提高头颈鳞癌 Tu686 细胞的体外迁移侵袭能力,且该迁移侵袭能力的增加可能与 AEG-1 介导的上皮-间质转化密切相关。

参考文献:

[1] Emdad L, Sarkar D, Su ZZ, et al. Astrocyte elevated gene-1: recent insights into a novel gene involved in tumor progression, metastasis and neurodegeneration[J]. Pharmacol Ther, 2007, 114(2): 155-170.

[2] Yoo BK, Emdad L, Su ZZ, et al. Astrocyte elevated gene-1 regulates hepatocellular carcinoma development and progression[J]. J Clin Invest, 2009, 119(3): 465-477.

[3] Liu Y, Su Z, Li G, et al. Increased expression of metadherin protein predicts worse disease-free and overall survival in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Int J Cancer, 2013, 133(3): 671-679.

[4] Scanlon CS, Van Tubergen EA, Inglehart RC, et al. Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma[J]. J Dent Res, 2013, 92(2): 114-121.

[5] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies[J]. Curr Opin Cell Biol, 2003, 15(6): 740-746.

[6] Lim J, Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development[J]. Development, 2012, 139(19): 3471-3486.

[7] Yu C, Liu Y, Huang D, et al. TGF-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transition via the TGF-beta/Smad pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Oncol Rep, 2011, 25(6): 1581-1587.

[8] Li J, Zhang N, Song LB, et al. Astrocyte elevated gene-1 is a novel prognostic marker for breast cancer progression and overall patient survival[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(11): 3319-3326.

[9] Liu L, Wu J, Ying Z, et al. Astrocyte elevated gene-1 up-regulates matrix metalloproteinase-9 and induces human glioma invasion[J]. Cancer Res, 2010, 70(9): 3750-3759.

[10] Sarkar D, Emdad L, Lee SG, et al. Astrocyte elevated gene-1: far more than just a gene regulated in astrocytes[J]. Cancer Res, 2009, 69(22): 8529-8535.

[11] Li C, Li R, Song H, et al. Significance of AEG-1 expression in correlation with VEGF, microvessel density and clinicopathological characteristics in triple-negative breast cancer[J]. J Surg Oncol, 2011, 103(2): 184-192.

[12] Li X, Kong X, Huo Q, et al. Metadherin enhances the invasiveness of breast cancer cells by inducing epithelial to mesenchymal transition[J]. Cancer Sci, 2011, 102(6): 1151-1157.

(修回日期:2013-05-09)