

· 基础研究 ·

顺铂诱导宫颈癌细胞上皮间质转化的研究*

杨丞¹, 饶翔^{2△}, 丁莉利¹, 王明华¹

(1. 海南医学院病理教研室, 海南海口 571101; 2 海南省海口市人民医院病理科, 海南海口 570208)

摘要:目的 研究短时间应用顺铂是否会引发宫颈癌细胞株 HCE1 发生上皮间质转化(EMT), 明确 Twist1 是否为调控顺铂诱导宫颈癌细胞 EMT 的关键转录因子。方法 采用倒置相差显微镜、四甲基偶氮唑盐(MTT)法和免疫组织化学法分别从细胞形态、生长曲线和标志性蛋白 E-cadherin、vimentin 的表达情况。以 HCE1 细胞株为对照组, 加顺铂组(终浓度 0.1 mg/L)为实验组, 观察加入顺铂 24、48、72、96 h 后, 宫颈癌细胞株 HCE1 是否发生 EMT 及其时间点。采用 Transwell 小室实验检测肿瘤细胞体外侵袭能力, 免疫组织化学方法检测 P 糖蛋白(P-gp)蛋白表达证实 EMT 发生。半定量 RT-PCR 方法比较 EMT 前、后 Twist1 表达。结果 低剂量顺铂处理 HCE1 72 h 后, HCE1 细胞形态发生 EMT 的改变; 上皮细胞标志性蛋白细胞黏附分子(E-cadherin)表达减少、间质细胞标志性蛋白 Vimentin 表达增强, P-gp 蛋白表达增强; 对照组 HCE1 平均穿膜细胞数为(39.000 0±2.828 4)个, EMT 组 HCE1 平均穿膜细胞数为(100.166 7±3.868 7)个; RT-PCR 法测得 Twist1/内参 OD 比值在对照组 0.200 2±0.000 9, EMT 组 0.615 6±0.005 1, 组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 低剂量顺铂早期即可诱导 HCE1 发生 EMT, 发生 EMT 的 HCE1 细胞体外侵袭能力和耐药性增强, Twist1 是调控顺铂诱导宫颈癌细胞 EMT 的关键转录因子。

关键词: 宫颈癌; 顺铂; 上皮间质转化; 抗药性; 肿瘤; Twist 转录因子

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.15.017

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)15-1727-04

Study on cisplatin-induced epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer cells*

Yang Cheng¹, Rao Xiang^{2△}, Ding Lili¹, Wang Minghua¹

(1. Department of Pathology, Hainan Medical College, Haikou, Hainan 571101, China;

2. Department of Pathology, Haikou Municipal People's Hospital, Haikou, Hainan 570208, China)

Abstract: Objective To study whether transient cisplatin treatment induces epithelial-mesenchymal transition(EMT) in cervical cancer cells, and to elucidate the role of Twist 1, the master regulator of EMT, in this process. **Methods** In HCE1 cells, EMT after cisplatin treatment was examined in vitro by inverted phase contrast microscope, MTT assay, immunohistochemical method and transwell chamber migration assay at 24, 48, 72, 96h, to examine morphologic changes, growth trends, expression of protein and malignant phenotype respectively. The cisplatin-induced Twist1 expression was examined by semi-quantitative RT-PCR. **Results** Low dose cisplatin induced EMT in morphology of HCE1 cells after 72 h. The expression of E-cadherin was decreased, the expression of Vimentin and P-gp were all enhanced. The average number of penetrating cells in the control group and EMT group were (39.000 0±2.828 4) and (100.166 7±3.868 7) respectively. The OD ratio of Twist1 / internal reference measured by RT-PCR method was 0.200 2±0.000 9 in the control group and 0.615 6±0.005 1 in the EMT group, the difference was statistically significant($P<0.05$). **Conclusion** Low-dose cisplatin could induced EMT in early stage. The invasive capacity in vitro and drug resistance of HCE1 cells with EMT occurrence are all increased. Twist 1 is the key regulator of cisplatin-induced EMT of cervical cancer cells.

Key words: uterine cervical neoplasms; cisplatin; epithelial-mesenchymal transition; drug resistance; neoplasm; twist transcription factor

上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是具有极性的上皮细胞转换成具有活动能力、能够在细胞质间自由移动的间质细胞的过程。近年有学者通过比较多种耐药细胞系和其亲本细胞系的形态和检测 EMT 标记性蛋白的表达, 证实耐药细胞株发生 EMT 改变, 并使细胞侵袭力增强^[1]。但在化疗药物干预早期, EMT 能否发生、发生的时间点及其与肿瘤细胞侵袭能力和耐药性之间的关系等问题, 目前尚不清楚。本文通过体外细胞学实验研究, 以低剂量短时间给药处理, 详细观察顺铂诱导低分化宫颈癌 HCE1 细胞株 EMT 的时间点及其与肿瘤细胞侵袭能力和耐药性之间的关系, 并明确 Twist1 是否为调控顺铂诱导宫颈癌细胞 EMT 的关键转录因子。

1 材料与方

1.1 材料 实验细胞: 人低分化宫颈癌 HCE1 细胞株购自中

南大学湘雅医学院细胞中心。主要试剂: 高糖亚甲基双丙烯酰胺(dulbecco's modified eagle's medium, DMEM)培养基购自 Gibco 公司, 新生牛血清购自杭州四季青公司, 胰蛋白酶和二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自 Amersco 公司, 四甲基偶氮唑盐(3-(4,5)-dimethylthiazolium(-z-y1)-3,5-di-phenyltetrazolium bromide, MTT)试剂购自 Sigma 公司, Transwell 小室购自 Corning Coster 公司, 基底膜 Matrigel 购自 BD Biosciences 公司, 顺铂(批号: H37021358)购自山东齐鲁制药厂, 相对分子质量 300.3 Da。一抗抗体 Vimentin、E-Cadherin、P-Glycoprotein 购自 ProMab 公司。二抗羊抗鼠/兔抗体免疫组织化学试剂盒购自迈新公司。Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司, cDNA Synthesis Kit 购自 TOYOBO 公司, PCR Master Mix (0.05 units/uL Taq DNA Polymerase in reaction buffer, 4

* 基金项目: 海南省教育厅高校科学研究资助项目(Hjkj2011-33)。
△ 通讯作者, Tel: 13698980079; E-mail: raoxiang0701@sina.com。

作者简介: 杨丞(1979~), 讲师, 硕士研究生, 主要从事肿瘤病理学研

mmol MgCl₂, 0.4 mmol dNTP) 购自 Fermentas 公司, DNA Marker DL2000 购自 TaKaRa 公司, AGAROSE 购自 AMRESCO 公司, 10×DNA 上样缓冲液购自 ProMab 公司。PCR 引物用 Primer premier 5.0 软件设计, 由 Invitrogen 公司合成。引物序列及产物长度如下: Twist 上游引物: 5'-GAG TCC GCA GTC TTA CGA G-3', 下游引物: 5'-ATC CTC CAG ACC GAG AAG -3', 长度 282 bp; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 上游引物: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC -3', 下游引物: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA -3', 长度 450 bp。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养并形态观察

以 HCE1 细胞株为对照组, 加顺铂组 (终浓度 0.1 mg/L) 为实验组, 分别以相同的细胞量接种到培养瓶, 加入 10% 新生牛血清 DMEM 培养基置 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中孵育, 分别于 24、48、72、96 h 等以倒置相差显微镜观察细胞形态并拍照, 比较细胞形态差异, 寻找顺铂诱导细胞 EMT 的时间点。

1.2.2 细胞生长曲线测定方法

待以上细胞长至对数生长期, 用胰酶消化后重悬并进行细胞计数, 在 96 孔板每孔加入 100 μL (10⁴/mL) 细胞, 各设 3 个平行孔, 置 37 °C 5% CO₂ 细胞培养箱培养, 待 24 h 后吸取实验组培养液加入 100 μL 含顺铂的培养液 (终浓度 0.1 mg/L)。再过 24 h 每孔加 10 μL MTT (5 g/L), 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中继续孵育 4 h 后弃上清液, 每孔再加 200 μL DMSO, 出现蓝紫色颗粒结晶并充分溶解后于 570 nm 处测光密度 (OD) 值, 连续 6 d。然后以 OD 值为纵轴, 时间为横轴绘制细胞生长曲线, 比较生长趋势差异。

1.2.3 细胞免疫组织化学检测方法

以 HCE1 细胞株为对照组, 在 EMT 时间点的细胞为 EMT 组, 取生长状态良好的细胞玻片, D-Hank's 缓冲液清洗 2 次, 于固定液固定 10 min, 1×PBS 缓冲液 (0.01 mol/L, pH 7.2) 洗涤细胞片 5 min×3 次, 3% H₂O₂ 室温孵育 10 min, 再用 1×PBS 缓冲液洗涤 5 min×3 次; 滴加正常山羊血清封闭液, 室温 20 min, 甩去多余液体, 滴加一抗 50 μL, 4 °C 过夜; 1×PBS 缓冲液洗涤 5 min×3 次, 滴加复合二抗 (辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG), 室温静置 20 min, 1×PBS 洗涤 5 min×3 次; 二氨基联苯胺 (Diaminobenzidine, DAB) 显色约 4 min, 浸入自来水终止显色, 苏木精复染, 乙醇分化 1 s, 自来水冲洗 15 min, 入乙醇脱水二甲苯透明; 中性树胶封片, 镜检。比较两组细胞阳性染色差异。

1.2.4 肿瘤细胞侵袭实验方法

用 50 mg/L Matrigel 1 : 8

稀释液包被 Transwell 小室底部膜的上室面, 4 °C 风干; 消化细胞, 终止消化后离心弃去培养液, 用 PBS 洗涤 2 遍, 用含牛血清白蛋白的无血清培养基重悬。调整细胞密度至 5×10⁴/mL; Transwell 小室 6 孔板下室加入 1 mL 含胎牛血清 (Fetal calf serum, FBS) 的培养基, 上室加入细胞悬液, 每组设 3 个平行孔, 培养细胞 24 h。用棉签擦去基质胶和上室内的细胞, 用 95% 乙醇固定 15 min, 苏木素染色 10 min, 200 倍光镜视野下计数 5 个视野, 计算平均细胞穿孔数。

1.2.5 半定量 RT-PCR 检测 Twist1 表达方法

每组取 10⁷ 个细胞加入 1 mL Trizol 试剂消化, 室温静置 5 min 后加入 0.2 mL 氯仿, 震荡 15 s 后在 4 °C 下 12 000 r/min 离心 15 min, 将水样层转移至干净的试管, 加入 0.5 mL 异丙醇, 混匀后 -20 °C 下静置 15 min, 在 4 °C 下 12 000 r/min 离心 10 min, 移去上层悬液, 将 RNA 沉淀用 1 mL 75% 乙醇洗涤, 在振荡器上混匀后 4 °C 下 7 500 r/min 离心 5 min, 弃去上清液。适度干燥 RNA 沉淀后, 加入适量 0.1% 焦磷酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 水, 使 RNA 完全溶解。2 000 r/min 离心 20 s。紫外吸收测定法测定 RNA 在分光光度计 260 nm 和 280 nm 处的吸收值, 评估 RNA 纯度。逆转录体系如下: 总 RNA 1 μL, Oligo(dT)20 (0.01 mol/L) 1 μL, 无 RNase 水 10 μL, 5×RT Buffer 4 μL, dNTP 混合物 (0.01 mol/L) 2 μL, RNase 抑制剂 (10 u/μL) 1 μL, 逆转录酶 1 μL, 在 42 °C 反应 20 min, 99 °C 反应 5 min, 4 °C 反应 5 min, 即完成 cDNA 第一链合成。PCR 反应体系如下: cDNA 模板 1 μL, 引物 (10 μmol/L) 1 μL, PCR Master 混合液 (成分见材料) 12.5 μL, PCR 缓冲液 10.5 μL, 在 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环; 72 °C 延伸 5 min。取 8 μL PCR 产物加入 2 μL 上样缓冲液中于 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳 (90 v 30 min), 用 VDS 凝胶成像仪摄影后进行灰度扫描, 计算各扩增产物与 GAPDH 的比值。重复 3 次。

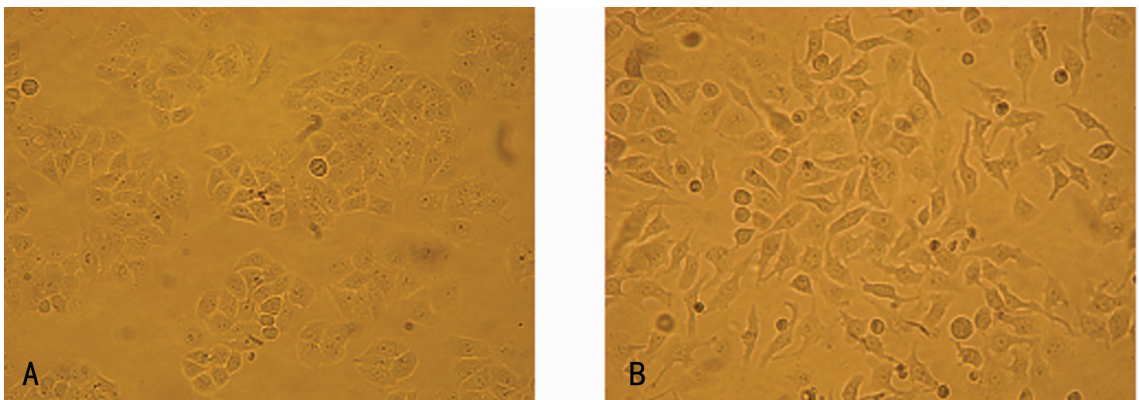
1.3 统计学处理

利用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态

分别于 24、48、72、96 h 在显微镜下比较两组细胞的形态, 发现实验组细胞在 72 h 发生 EMT 的形态改变: 连接紧密的细胞变得扁平, 更趋于梭形, 且失去了大部分细胞连接 (图 1)。72 h 即为 HCE1 发生 EMT 的时间点。



A: 对照组; B: 实验组。

图 1 两组 72 h HCE1 细胞形态 (倒置显微镜×100)

2.2 细胞生长曲线 实验组细胞生长趋势于 72 h 前稍慢于对照组,72 h 后生长趋势逐渐与对照组接近,96 h 后两组细胞均进入平台期,生长趋势基本重合,见图 2。

2.3 细胞免疫组织化学检测结果 细胞黏附分子(E-cadherin)定位于细胞膜和细胞间桥处,对照组高表达,EMT 组表达减少;vimentin 定位于细胞膜及细胞质处,对照组有表达,EMT 组表达增加;P 糖蛋白(P-gp)定位于细胞膜及细胞质处,对照组有表达,EMT 组表达增加,见图 3。

2.4 肿瘤细胞侵袭结果 对照组 HCE1 细胞的平均穿膜细胞数为(39.000 0±2.828 4)个,EMT 组 HCE1 的平均穿膜细胞数为(100.166 7±3.868 7)个,EMT 组较对照组细胞多,侵袭能力

EMT 组强于对照组,其差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 4。

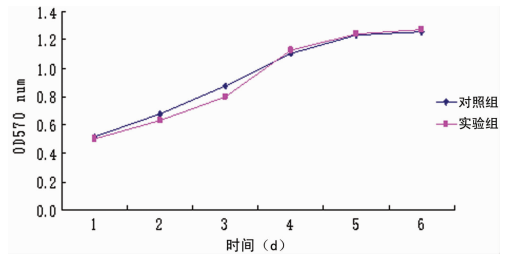
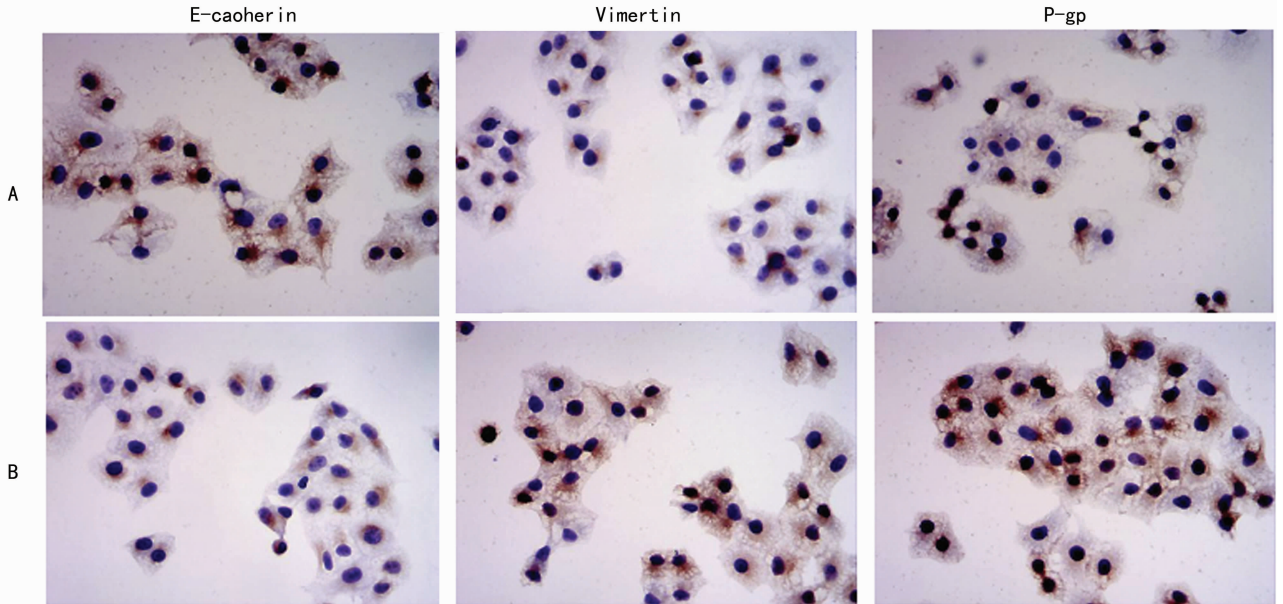
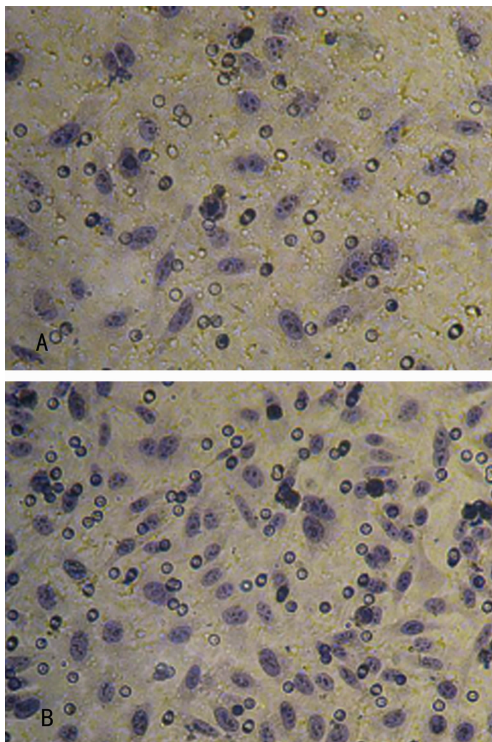


图 2 宫颈癌细胞株 HCE1MTT 生长曲线



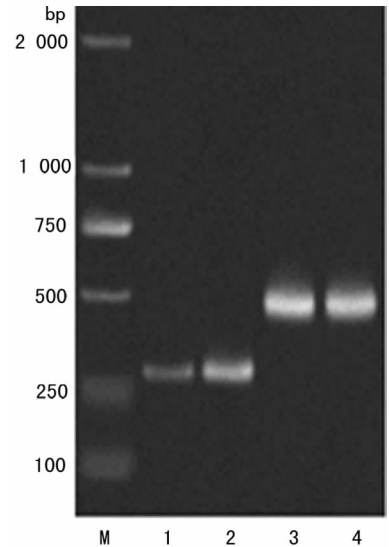
A:对照组;B:EMT 组。

图 3 两组 HCE1 细胞标志蛋白的免疫组织化学检测(SP 法×200)



A:对照组;B:EMT 组。

图 4 两组 HCE1 细胞侵袭能力检测(倒置显微镜×200)



M:DL2000 标记物;1:对照组 Twist;2:EMT 组 Twist;3:对照组 GAPDH;4:EMT 组 GAPDH。

图 5 PCR 产物的电泳结果

2.5 半定量 RT-PCR 检测 Twist1 表达 对照组 HCE1 总 RNA A260/A280 为 1.873 0,EMT 组为 1.904 0。对照组各条带 OD 值与内参 OD 比值为 0.200 2±0.000 9,EMT 组为 0.615 6±0.005 1,EMT 组 Twist1 表达比对照组增强,差异有

统计学意义($P < 0.05$),见图 5。

3 讨 论

EMT 是胚胎发育中形态生发的一个关键过程,以上皮细胞极性的丧失及间质特性的获得为重要特征,具体包括:细胞黏附分子(E-cadherin)表达减少;角蛋白为主的细胞骨架转变为波形蛋白为主的细胞骨架,从而引起细胞形态的改变^[2]。

本实验研究显示,宫颈癌 HCE1 细胞经过低剂量顺铂处理 72 h 可发生 EMT 的形态变化,上皮细胞标志蛋白 E-cadherin 表达减少、间质细胞标志蛋白 Vimentin 表达增强进一步证明 EMT 的发生。从生长曲线来看,生长曲线趋势 72 h 前实验组慢于对照组,提示顺铂对肿瘤细胞有一定的杀伤作用,引起细胞的凋亡,72 h 后生长趋势逐渐接近并与对照组重合,说明顺铂诱导宫颈癌细胞发生 EMT 后,细胞生长速度会增快,因此,低剂量顺铂诱导宫颈癌细胞发生 EMT 是一个早期事件。

顺铂是宫颈癌化疗的一线药物,但宫颈癌细胞对化疗药物获得性耐药是化疗失败的主要原因,尤其用小剂量化疗药物诱导宫颈癌细胞,更易导致耐药的产生^[3]。近年研究表明,多药耐药基因 1(multi-drug resistance gene 1,MDR-1)编码的 P-gp 的过表达与多药耐药(multi-drug resistance,MDR)发生有关^[4],而 P-gp 蛋白表达升高的肿瘤细胞具有增强的侵袭转移能力,提示化疗药物诱导肿瘤细胞耐药性和侵袭性增强之间存在内在联系^[5-6]。最近的研究证实肿瘤的侵袭转移、多药耐药还与 EMT 相关^[7-8]。本实验显示 EMT 组 HCE1 细胞体外侵袭能力增强,P-gp 蛋白表达增强,也从细胞生物学特性上证实低剂量顺铂诱导宫颈癌细胞 HCE1 发生了 EMT。从上可知化疗药物在治疗早期诱导 EMT 是使宫颈癌化疗失败的关键性原因。因此,早期阻止 EMT 的发生,对防止形成耐药性、降低转移的风险有重要意义。

本实验中顺铂诱导宫颈癌细胞 HCE1 发生 EMT 后, Twist1 表达明显高于 EMT 前,可以证实 Twist1 与宫颈癌细胞 EMT 的发生密切相关,是调节顺铂诱导 HCE1 发生 EMT 的关键转录因子。而碱性螺旋-环-螺旋家族的转录因子 Twist,已被证实存在胃癌^[9-10]、乳腺癌^[11-12]、前列腺癌^[13]、肝癌^[14]这些实体肿瘤存在过表达, Twist 表达的升高还与肿瘤的分期、预后有关^[15]。本研究结果提示,针对 Twist 的基因抑制在宫颈癌化疗中可望产生协同作用,为提高临床肿瘤化疗效果提供一种新思路。

参考文献:

[1] Zhou C, Nitschke AM, Xiong W, et al. Proteomic analysis of tumor necrosis factor- α resistant human breast Cancer cells reveals a MEK5/Erk5-mediated epithelial-mesenchymal transition phenotype [J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(6):R105.

[2] Yilmaz M, Christofori G. EMT the cytoskeleton and Cancer cell invasion[J]. Cancer Metastasis Rev, 2009, 28(1/2): 15-33.

[3] 赵晓利,李力,郭建新,等. 顺铂诱导 survivin 表达改变与

宫颈癌细胞化疗敏感性的关系[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(10):1023-1025.

[4] Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter[J]. Annu Rev Biochem, 1993(62):385-427.

[5] Li QQ, Wang WJ, Xu JD, et al. Involvement of CD147 in regulation of multidrug resistance to P-gp substrate drugs and in vitro invasion in breast Cancer cells[J]. Cancer Sci, 2007, 98(7):1064-1069.

[6] Li QQ, Wang WJ, Xu JD, et al. Up-regulation of CD147 and matrix metalloproteinase-2,-9 induced by P-glycoprotein substrates in multidrug resistant breast Cancer cells [J]. Cancer Sci, 2007, 98(11):1767-1774.

[7] Chen WJ, Wang H, Tang Y, et al. Multidrug resistance in breast Cancer cells during epithelial-mesenchymal transition is modulated by breast Cancer resistant protein[J]. Chin J Cancer, 2010, 29(2):151-157.

[8] Li QQ, Xu JD, Wang WJ, et al. Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast Cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(8):2657-2665.

[9] Ru GQ, Wang HJ, Xu WJ, et al. Upregulation of twist in gastric carcinoma associated with tumor invasion and poor prognosis[J]. Pathol Oncol Res, 2011, 17(2):341-347.

[10] Liu AN, Zhu ZH, Chang SJ, et al. Twist expression associated with the epithelial-mesenchymal transition in gastric Cancer[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 367(1/2):195-203.

[11] 欧武陵,胡胜,余伟江,等. 乳腺癌细胞 Twist 和 Trkb 的表达及其意义[J]. 武汉大学学报:医学版, 2011, 32(2): 187-190.

[12] Fu J, Zhang L, He T, et al. TWIST represses estrogen receptor- α expression by recruiting the NuRD protein complex in breast Cancer cells[J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(4):522-532.

[13] Shiota M, Zardan A, Takeuchi A, et al. Clusterin mediates TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis via Twist1 in prostate Cancer cells[J]. Cancer Res, 2012, 72(20):5261-5272.

[14] Ma JL, Han SX, Zhu Q, et al. Role of twist in vasculogenic mimicry formation in hypoxic hepatocellular carcinoma cells in vitro[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 408(4):686-691.

[15] Entz-Werlé N, Stoetzel C, Berard-Marec P, et al. Frequent genomic abnormalities at TWIST in human pediatric osteosarcomas[J]. Int J Cancer, 2005, 117(3):349-355.