

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.22.002

TGF- β 1 对人子宫颈腺癌 HeLa 细胞上皮间质转化的影响*

杨成万,高霞,周铁军,张强

(泸州医学院附属医院病理教研室,四川泸州 646000)

[摘要] 目的 研究转化生长因子- β 1(TGF- β 1)对子宫颈腺癌 HeLa 细胞上皮间质转化的影响。方法 体外培养人子宫颈腺癌 HeLa 细胞。对照组:用不含 TGF- β 1 的无血清培养基培养 HeLa 细胞。试验组:用不同浓度 TGF- β 1(0.01、0.10、1.00、10.00 ng/mL)刺激 HeLa 细胞。在刺激后不同时间点用倒置显微镜观察其形态变化,并用半定量 RT-PCR 法和细胞免疫组织化学方法分别检测细胞中上皮间质转化相关标记物 E-cadherin、Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达水平。结果 与对照组相比,不同浓度 TGF- β 1 刺激 HeLa 细胞 48 h 时开始出现形态变化,刺激 72 h 后变化更明显,大部分细胞呈现明显的间质细胞形态;半定量 RT-PCR 检测结果显示,TGF- β 1 刺激后,HeLa 细胞的上皮标记物 E-cadherin mRNA 表达下调,间质标记物 Vimentin mRNA 表达上调且均呈浓度依赖性,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。细胞免疫组织化学结果显示,TGF- β 1 刺激后,随着 TGF- β 1 浓度的增加 E-cadherin 蛋白的表达逐渐降低,Vimentin 蛋白的表达则逐渐升高,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 TGF- β 1 可诱导子宫颈腺癌 HeLa 细胞发生上皮间质转化。

[关键词] 宫颈肿瘤;转化生长因子 β 1;上皮间质转化

[中图分类号] R737.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)22-3030-04

Effect of TGF- β 1 on epithelial-mesenchyme transition in HeLa cells of human cervical cancer*

Yang Chengwan, Gao Xia, Zhou Tiejun, Zhang Qiang

(Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of TGF- β 1 on epithelial mesenchymal transition in HeLa cells of human cervical cancer. **Methods** HeLa cells of Human cervical cancer cultured in vitro were divided into the experimental group and control group. In the control group, HeLa cells were cultured in serum-free medium without TGF- β 1. In the experimental group, HeLa cells were treated with different concentrations of TGF- β 1 (0.01, 0.10, 1.00, 10.00 ng/mL). The morphological changes of HeLa cells of human cervical cancer were stimulated by TGF- β 1 at different time points observed under an inverted microscope, while the expressions of mRNA and protein of E-cadherin and Vimentin in HeLa cells were detected by semi-quantitative RT-PCR assay and cellular immunohistochemistry respectively. **Results** Comparing with the control group, HeLa cells stimulated by TGF- β 1 for 48 h began to have morphological changes. Mesenchymal morphology changes were observed obviously after 72 h. RT-PCR analysis showed that the expression of epithelial marker E-cadherin mRNA was down regulated, while the expression of mesenchymal marker Vimentin mRNA was increased and showed a concentration dependence after the stimulation of TGF- β 1. Comparing with the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). After stimulation of TGF- β 1 in HeLa cells, cellular immunohistochemistry showed that the concentration of TGF- β 1 increased, the expression of E-cadherin protein gradually decreased, and the expression of Vimentin protein gradually increased at the same time. Comparing with the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** TGF- β 1 may induce epithelial mesenchymal transformation in HeLa cells of human cervical cancer.

[Key words] uterine cervical neoplasms; TGF- β 1; epithelial mesenchymal transition

宫颈癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,组织学类型以鳞状细胞癌居多,近 20 年来宫颈腺癌的发病率成倍增长且趋于年轻化^[1]。目前,对宫颈腺癌侵袭转移的分子生物学基础尚未完全清楚。已有研究证实转化生长因子- β 1(TGF- β 1)介导了多种恶性肿瘤如肺癌、肝癌、乳腺癌、食管癌等发生上皮间质转化(EMT)^[2-5],进而促进肿瘤发生侵袭和转移。但 TGF- β 1 是否介导宫颈腺癌发生 EMT 的相关报道很少。本试验拟通过体外培养的人宫颈腺癌 HeLa 细胞,研究 TGF- β 1 是否能诱导宫颈腺癌 HeLa 细胞发生上皮间质转化,从而为阐明宫颈腺癌浸润转移机制奠定基础,为宫颈腺癌的治疗提供了新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 人宫颈腺癌 HeLa 细胞株由泸州医学院附属医院中心实验室惠赠。

1.1.2 主要试验试剂 DMEM 高糖型培养液[赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司];胎牛血清(FBS,深圳赛泰克生物科技有限公司);0.25%胰蛋白酶溶液(上海生化公司);人重组 TGF- β 1(Peprotech 公司);二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司);总 RNA 提取试剂盒,DNA Marker I, $2 \times$ Taq PCR MasterMix(北京天根科技有限公司);RT-PCR 试剂盒(成都博瑞克生物技术有限公司);PCR 引物(生工生物工程有限公

* 基金项目:四川省教育厅科研基金项目(09ZA178)。 作者简介:杨成万(1969—),副教授,硕士,主要从事肿瘤病理学研究。

司);兔抗人 E-cadherin 多克隆抗体,鼠抗人 Vimentin 单克隆抗体(基因科技上海有限公司);Envision 两步法试剂盒,浓缩型 DAB 试剂盒(中杉金桥公司)。

1.1.3 主要仪器设备 CO₂ 细胞电热恒温培养箱(HEPA class100 型, Thermo 公司),倒置相差显微镜(TS100-F100 型,德国 Leica 公司),PCR 扩增仪(TC-512 型,英国 Techne 公司),凝胶扫描成像仪(美国 Bio-rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 人子宫颈腺癌 HeLa 细胞的培养 人子宫颈腺癌 HeLa 细胞在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下用含有 10% FBS、1 mL 青链霉素、DMEM 高糖型培养基中培养。待培养瓶内的细胞生长达到约 80.00% 融合时,即可用 0.25% 胰蛋白酶消化溶液进行细胞消化传代。传代 3 次后,细胞达到约 80.00% 融合,生长状况良好时,即可用于试验。

1.2.2 TGF-β1 刺激人子宫颈腺癌 HeLa 细胞后的形态观察 对照组:不加 TGF-β1 的无血清培养基培养的 HeLa 细胞。试验组:将 HeLa 细胞传代于 6 孔板培养,待细胞长到融合度约 50%~60% 时,换成分别含有 0.01、0.10、1.00、10.00 ng/mL TGF-β1(分别为 T₁、T₂、T₃、T₄ 组)的无血清培养基培养 72 h,期间每天换液 1 次。并于 24、48、72 h 取出 6 孔板在倒置显微镜下观察和拍摄细胞的生长形态。

1.2.3 半定量 RT-PCR 检测 E-cadherin 及 Vimentin mRNA 表达变化 各组细胞不同浓度(0、0.01、0.10、1.00、10.00 ng/mL) TGF-β1 刺激 72 h 后,按 Trizol 法提取各组细胞总 RNA;配制逆转录反应体系,进行逆转录反应,将所得逆转录反应原液置于 -20 °C 中保存;按 PCR 试剂盒说明书配制 PCR 扩增反应体系,进行 PCR 扩增反应,检测相关基因的表达量,各引物序列见表 1。E-cadherin 按以下反应程序反应:预变性,94 °C,3 min;变性,94 °C,30 s;退火,53 °C,30 s;延伸,72 °C,20 s,30 个循环;终末延伸,72 °C,3 min;4 °C 保存。Vimentin 按以下反应程序反应:预变性,94 °C,3 min;变性,94 °C,30 s;退火,56 °C,30 s;延伸,72 °C,30 s,30 个循环;终末延伸,72 °C,3 min;4 °C 保存。对 PCR 扩增反应产物进行琼脂糖凝胶电泳,应用凝胶扫描成像系统检测电泳结果,照相,与内参的吸光值比较,并计算各组细胞的 mRNA 的相对含量。

1.2.4 细胞免疫化学染色法检测 E-cadherin 及 Vimentin 蛋白的表达变化 收集对数期生长的 HeLa 细胞,消化,计数将细胞密度调整为 3.5 × 10⁵ 个/mL,接种于 6 孔板中预置的载玻片上。至细胞生长融合度约为孔底的 50%~60%,吸出原培养液,PBS 洗涤 2 次,换成分别含有 0、0.01、0.10、1.00、10.00 ng/mL TGF-β1 的无血清培养基培养 72 h,取出细胞爬片,PBS 缓冲液漂洗、室温下 4% 多聚甲醛固定 30 min。滴加一抗 E-cadherin(稀释比例 1 : 100)、Vimentin(稀释比例 1 : 100),室温孵育 2 h,滴加 A 液,室温孵育 30 min,滴加现配好的二氨基联苯胺(DAB),显色,苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。用 Image-pro plus 6.0 图像分析软件分析,对每张爬片随机摄像 5 帧,检测其阳性细胞的平均光密度值 [IOD / (N × area)],然后取平均光密度值的均值。

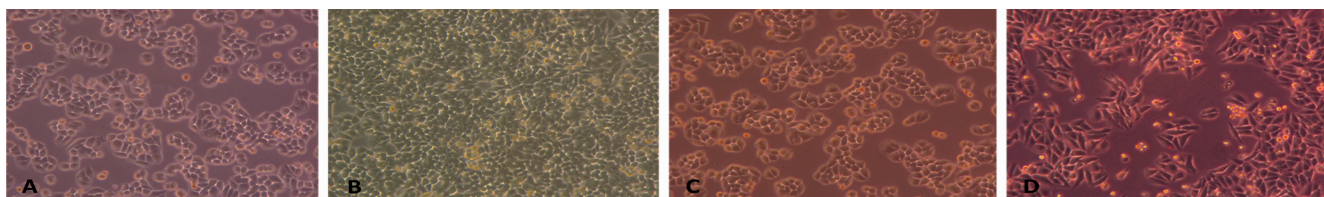
1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 来表示,多组比较采用单因素方差分析,组间多重比较用 LSD 进行检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 人子宫颈腺癌 HeLa 细胞形态学变化 倒置显微镜下观察,对照组中人子宫颈腺癌 HeLa 细胞与细胞之间连接紧密,细胞形态为多边形或立方形,细胞分布呈铺路石样,为典型的上皮细胞形态(图 1A),培养 72 h 后形态变化不大(图 1B);T₄ 组在加入 TGF-β1 0 h 或 24 h 时与对照组相比形态未发生明显变化(图 1C);刺激 48 h 时形态开始出现变化,细胞伸出许多小突出,部分失去多边形或立方形形态变为梭形;刺激 72 h 后变化更明显,试验组较对照组大部分细胞呈现明显的间质细胞形态,表现为细胞拉长呈梭形或纺锤形,细胞的间隙变宽,细胞与细胞之间的连接变得松散(图 1D)。

表 1 引物碱基序列

目的/ 内参基因	引物序列(5'-3')	序列长度 (bp)
E-cadherin	上游:AAG CCT CAG GTC ATA AAC ATC	21
	下游:CGC CTC CTT CTT CAT CAT AG	20
Vimentin	上游:CGC TTC GCC AAC TAC AT	17
	下游:AGG GCA TCC ACT TCA CAG	18



A:对照组 0 h;B:对照组 72 h;C:TGF-β1 10.00 ng/mL 0 h;D:TGF-β1 10.00 ng/mL 72 h。

图 1 TGF-β1 对人子宫颈腺癌 HeLa 细胞形态的影响(×100)

2.2 半定量 RT-PCR 检测 TGF-β1 刺激人子宫颈腺癌 HeLa 细胞株后 E-cadherin, Vimentin mRNA 表达的变化 E-cadherin mRNA 的表达随 TGF-β1 浓度的增加表达量逐渐下降,在 TGF-β1 10.00 ng/mL 浓度时下降最明显,Vimentin mRNA 的表达则随着 TGF-β1 浓度的增加表达量逐渐增高,在 TGF-β1 10.00 ng/mL 浓度时升高最明显。不同 TGF-β1 浓度组中 E-cadherin, Vimentin mRNA 的表达与对照组比较差异均有统计学意义(P < 0.05),见表 2,图 2。

表 2 TGF-β1 对人子宫颈腺癌 HeLa 细胞 E-cadherin、Vimentin mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	TGF-β1 (ng/mL)	E-cadherin mRNA	Vimentin mRNA
对照组	0.00	1.49 ± 0.03	0.31 ± 0.04
T ₁ 组	0.01	1.24 ± 0.08 ^a	0.93 ± 0.08 ^a
T ₂ 组	0.10	0.94 ± 0.11 ^a	1.09 ± 0.11 ^a

续表 2 TGF- β 1 对人宫颈腺癌 Hela 细胞 E-cadherin、Vimentin mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	TGF- β 1 (ng/mL)	E-cadherin mRNA	Vimentin mRNA
T ₃ 组	1.00	0.75 \pm 0.04 ^a	1.25 \pm 0.07 ^a
T ₄ 组	10.00	0.57 \pm 0.09 ^a	1.58 \pm 0.06 ^a

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.3 细胞免疫组织化学检测 TGF- β 1 刺激人宫颈腺癌 Hela 细胞后 E-cadherin、Vimentin 的表达变化 E-cadherin 免疫反应阳性颗粒主要位于细胞膜和细胞质,呈棕黄色。在 TGF- β 1 刺激 Hela 细胞 72 h 时,随着 TGF- β 1 浓度的升高,E-cadherin 阳性表达的细胞数量逐渐减少(图 3);Vimentin 蛋白表达阳性颗粒主要位于细胞质,呈棕黄色,随着 TGF- β 1 浓度的增加,Vimentin 阳性表达的细胞数量逐渐增多(图 4)。

免疫组织化学结果显示:E-cadherin 蛋白的表达在 72 h 时

间点,各组与对照组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$),并且随着 TGF- β 1 浓度的增加,E-cadherin 阳性表达细胞的平均光密度值逐渐减少;Vimentin 蛋白表达随着 TGF- β 1 浓度的增加,其平均光密度值则逐渐增加。各组与对照组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

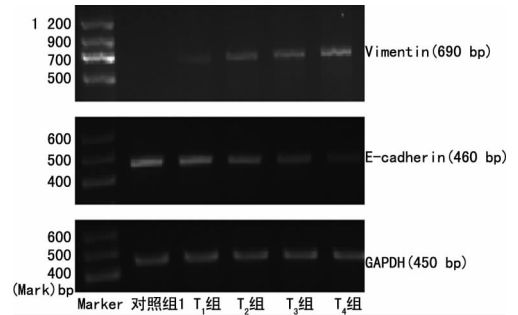
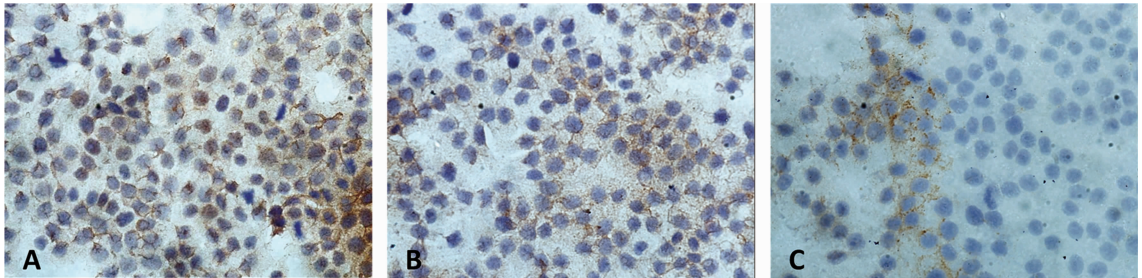
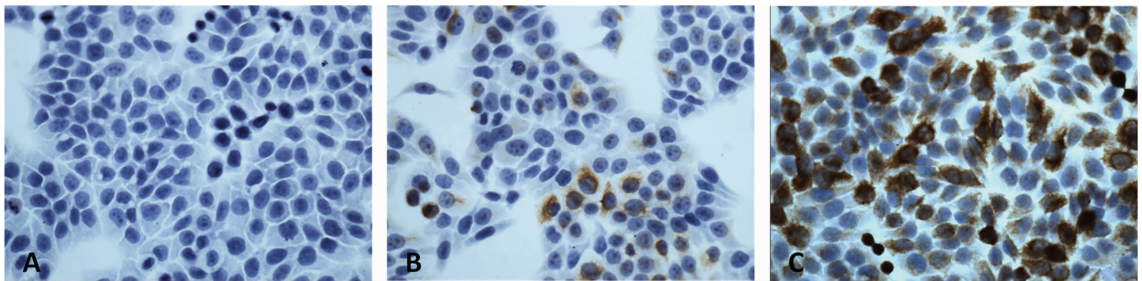


图 2 TGF- β 1 对 Hela 细胞 E-cadherin 和 Vimentin mRNA 表达的影响



A: TGF- β 1 0 ng/mL; B: TGF- β 1 0.10 ng/mL; C: TGF- β 1 10.00 ng/mL。

图 3 TGF- β 1 对人宫颈腺癌 Hela 细胞 E-cadherin 表达的影响(Envision \times 400)



A: TGF- β 1 0 ng/mL; B: TGF- β 1 0.10 ng/mL; C: TGF- β 1 10.00 ng/mL。

图 4 TGF- β 1 对人宫颈腺癌 Hela 细胞 Vimentin 表达的影响(Envision \times 400)

表 3 TGF- β 1 对人宫颈腺癌 Hela 细胞 E-cadherin 及 Vimentin 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	平均光密度值	
	E-cadherin	Vimentin
对照组	115.06 \pm 0.09	43.34 \pm 0.62
T ₁ 组	107.42 \pm 0.58 ^a	57.37 \pm 0.53 ^a
T ₂ 组	93.20 \pm 0.57 ^a	60.98 \pm 0.80 ^a
T ₃ 组	83.68 \pm 0.86 ^a	64.66 \pm 0.91 ^a
T ₄ 组	64.06 \pm 1.54 ^a	75.27 \pm 0.54 ^a

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

3 讨论

目前,研究发现上皮源性恶性肿瘤的侵袭和转移大多数与肿瘤获得 EMT 特征有关。EMT 是指上皮细胞失去其上皮特

性,获得间质特征的过程。EMT 不但参与了某些生理过程如胚胎和器官发育、组织重建、创伤愈合等,而且还参与了某些病理过程,如组织纤维化和促进肿瘤的侵袭转移^[6]。EMT 主要特点包括以下方面:(1)上皮细胞形态改变,极性消失,细胞黏附力下降,部分细胞可伸出伪足迁移和运动力增强;(2)上皮性标志物,如 E-cadherin 等表达下调;(3)间叶表型的获得,如 Vimentin 等表达上调。E-cadherin 被认为是 EMT 的上皮性的标志性蛋白^[7]。E-cadherin 表达的减少或功能的缺失,是上皮细胞紧密连接的破坏及肿瘤细胞发生侵袭的重要因素^[8]。E-cadherin 表达的下调或缺失是 EMT 的典型特征,其在多种上皮性恶性肿瘤中已被证实,如乳腺癌、胃癌、前列腺癌等^[9-12]。Vimentin 即波形蛋白是一种中间丝蛋白,广泛存在于间充质细胞中,在上皮细胞中极少表达,是间质细胞一个重要的分子标记,其在上皮性肿瘤细胞表达阳性或增高提示可能发生了

EMT, 试验证明 Vimentin 在前列腺癌、乳腺癌等多种肿瘤细胞中的高表达和该肿瘤细胞的侵袭和转移有关^[13-14]。申震等^[15]报道用免疫组织化学的方法检测子宫颈鳞癌组织中 E-Cadherin、Vimentin 的表达呈负相关, 随着子宫颈鳞癌恶性程度的升高, E-Cadherin 的表达逐渐减少, Vimentin 表达增多, 初步证实了子宫颈鳞癌侵袭生长过程中存在 EMT 现象。

TGF- β 1 是一种多功能的细胞因子, 目前已有大量试验证实其为 EMT 发生的主要诱导剂。张慧君等^[16]报道人肺腺癌 PC9 细胞在 TGF- β 1 作用下, 细胞形态拉长, 呈现明显的间质细胞形态, 细胞间连接也变得松散。蔡成等^[17]报道 TGF- β 1 作用胃癌 KATO-III 细胞后细胞形态由上皮细胞形态向间质细胞样形态转变。李婷芬等^[18]报道用 2 ng/mL TGF- β 1 刺激人肝 HL7702 细胞 72 h 后, 细胞形态拉长变成纺锤形, 细胞间隙变大。本试验研究结果显示: 用不同浓度 TGF- β 1 刺激人宫颈腺癌 HeLa 细胞 24 h 时, 其细胞形态未发生明显变化; 刺激 48 h 时, HeLa 细胞形态开始出现变化, 伸出许多小突出, 部分失去多边形或立方形态变为梭形; 刺激 72 h 后, 大部分细胞呈现明显的间质细胞形态, 表现为细胞拉长呈梭形或纺锤形, 细胞的间隙变宽, 细胞与细胞之间的连接变得松散。说明 TGF- β 1 诱导人宫颈腺癌 HeLa 细胞发生 EMT 的形态变化, 且与 TGF- β 1 作用时间有关。

为了进一步证实经 TGF- β 1 处理的人宫颈腺癌 HeLa 细胞可发生 EMT, 本试验选择用 TGF- β 1 刺激人 HeLa 细胞培养 72 h, 通过半定量 RT-PCR 和细胞免疫化学的方法检测 EMT 相关标记物 E-cadherin 和 Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达情况。本试验证明: 从细胞形态、基因和蛋白水平 TGF- β 1 可诱导宫颈腺癌 HeLa 细胞发生上皮间质转化, 且具有 TGF- β 1 刺激时间和浓度依赖性。

参考文献

- [1] Smith HO, Tiffany MF, Qualls CR, et al. The rising incidence of adenocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the United States a 24-year population-based study[J]. *Gynecol Oncol*, 2000, 78(2): 97-105.
- [2] Zhang HJ, Wang HY, Zhang HT, et al. Transforming growth factor-beta 1 promotes lung adenocarcinoma invasion and metastasis by epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 355(1/2): 309-314.
- [3] Xu Z, Shen MX, Ma DZ, et al. TGF-beta1-promoted epithelial to mesenchymal transformation and cell adhesion contribute to TGF-beta1-enhanced cell migration in SMMC-7721 cells[J]. *Cell Res*, 2003, 13(5): 343-350.
- [4] Logullo AF, Nonogaki S, Pasini FS, et al. Concomitant expression of epithelial-mesenchymal transition biomarkers in breast ductal carcinoma: association with progression[J]. *Oncol Rep*, 2010, 23(2): 313-320.
- [5] Rees JR, Onwuegbusi BA, Save VE, et al. In vivo and in vitro evidence for transforming growth factor-beta 1-mediated epithelial to mesenchymal transition in esophageal adenocarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(19): 9583-9590.
- [6] Wu Y, Zhou BP. New insights of epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2008, 40(7): 643-650.
- [7] Wells A, Yates C, Shepard CR. E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2008, 25(6): 621-628.
- [8] Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. Cadherins and cancer: how does Cadherin dysfunction promote tumor progression & quest[J]. *Oncogene*, 2008, 27(55): 6920-6929.
- [9] Elmoneim HM, Zaghloul NM. Expression of e-cadherin, n-cadherin and snail and their correlation with clinicopathological variants; an immunohistochemical study of 132 invasive ductal breast carcinomas in Egypt[J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2011, 66(10): 1765-1771.
- [10] 刘力, 谭米多, 戴洪波, 等. MMP-9 和 E-cadherin 在乳腺癌中的表达及其临床意义[J]. *肿瘤药学*, 2013, 3(3): 180-184.
- [11] Liu J, Cai J, Hui Y, et al. Expression of epithelial cadherin in early gastric cancer and its correlation to lymph node micrometastasis and clinicopathologic features[J]. *Chin J Cancer*, 2007, 26(5): 541-546.
- [12] Gravdal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, et al. A Switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(23): 7003-7011.
- [13] 王先升, 陈建, 周涛, 等. TGF- β 1 在胃癌中的表达及意义[J]. *山东医药*, 2006, 46(16): 49-50.
- [14] Araujo F, Rocha M, Mendes JB, et al. Atorvastatin inhibits inflammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF, TNF-alpha and TGF-beta1[J]. *Biomed Pharmacother*, 2010, 64(1): 29-34.
- [15] 申震, 周颖, 赵卫东, 等. Vimentin 及 E-Cadherin 在子宫颈腺癌中的表达及其与上皮细胞间质化的相关性[J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(5): 505-508.
- [16] 张慧君, 张雷, 王和勇, 等. TGF-beta1 诱导人肺腺癌 PC9 细胞上皮-间质转化的研究[J]. *中国肺癌杂志*, 2010, 13(1): 34-37.
- [17] 蔡成, 俞继卫, 吴巨钢, 等. TGF- β 1 诱导胃癌细胞上皮间质转化及促进干细胞特性获得的研究[J]. *国际外科学杂志*, 2012(12): 824-829.
- [18] 李婷芬, 王冰莹, 严永敏, 等. TGF- β 1 诱导人肝 HL7702 细胞发生上皮细胞间质转化的实验研究[J]. *江苏大学学报: 医学版*, 2012, 22(2): 93-96.