

网络出版时间: 2019-5-30 10:50 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190527.1648.009.html>

HIF-1 α -Snail 轴介导不同氧环境下结肠癌 EMT-MET 转化

雷 星¹ 陈 熹² 张 迪² 单 涛²

摘要 目的 结肠癌乏氧微环境可促进肿瘤 EMT(上皮-间质化)发生,而肿瘤归巢新环境相对富氧环境可介导 MET(间质上皮化)过程,本研究旨在探讨肿瘤的转移 EMT-MET 二阶段过程的具体机制。方法 利用不同氧浓度培养箱培养结肠癌细胞系 COLO 205,实验分三组[低氧组(氧浓度 5%);常氧组(氧浓度 21%);适度高氧组(氧浓度 30%)] RT-PCR 及 Western blot 检测细胞中 Snail、HIF-1 α mRNA 及蛋白表达量。利用 HIF-1 α 特异性阻断剂抑制 HIF-1 α 信号通路后检测 EMT 指标 E-cadherin、vimentin 变化及 Snail 表达。结果 PCR 及 Western blot 结果显示,低氧组癌细胞 HIF-1 α mRNA 及蛋白表达量均上升($P < 0.05$)。用 HIF-1 α 特异性阻断剂抑制 HIF-1 α 信号通路后 EMT 指标 E-cadherin/vimentin 表达下降($P < 0.05$)。结论 氧浓度差异介导 EMT-MET 过程的关键机制可能与 HIF-1 α -Snail 信号通路作用有关。

关键词 HIF-1 α ; Snail; 表皮间质化; 间质表皮化; 结肠癌中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)06-0908-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.06.015

结肠癌是常见消化系统肿瘤之一,发病率列世界第三,病死率列世界第四^[1]。全球范围内结肠癌的发病率和病死率呈现上升的势头^[2]。目前,早期治疗结肠癌是手术为主、化疗为辅的综合疗法,但其易复发和易转移的特点常常导致治疗失败^[3],结直肠癌仍严重影响我国人民生命健康^[3]。因此,寻找治疗干预的新靶点具有重要意义。

上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)指上皮到间质细胞的转化,它赋予细胞转移和入侵的能力,包括干细胞特征、减少凋亡与衰老和促进免疫抑制,不仅在发育过程中起着关键的

作用,而且还参与组织愈合、器官纤维化和癌症发生等过程^[4]。上皮-间质转化又是一个动态的可逆过程^[5],Thiery et al^[6]总结了肿瘤两步转移理论,认为原发上皮肿瘤依靠 EMT 程序来进行浸润和全身播散,播散的瘤细胞到达远处组织时,依靠逆转的过程间质表皮化(mesenchymal-epithelial transition, MET)最终定植形成转移灶。既往研究证实在结肠肿瘤中原发部位(低氧)及归巢部位(常氧或适度高氧)氧浓度差异参与 EMT-MET 两步转移过程,而目前 EMT-MET 过程中时空调控关键环节的确切机制尚未阐明。研究证明, TGF- β 、Wnt/ β -catenin、Notch、Hedgehog、IL-6/STAT3 以及 HIF-1 α 等信号通路的激活会调控下游 Snail1、Snail2、Twist1、Twist2、ZEB1 和 ZEB2 等转录因子,开启 EMT 进程^[7]。而原发部位(低氧)及归巢部位(常氧或适度高氧)氧浓度差异是否可通过 HIF-1 α -Snail 通路,是否可用来解释肿瘤两步转移复原机制还未见完全明确。该研究在体外模拟原发灶低氧环境,归巢部位常氧或适度高氧环境,运用激光共聚焦、qRT-PCR、Western blot 等方法,观察 HIF-1 α -Snail 通路是否介导 EMT、MET 形态变化,探索结肠癌发生转移机制,为治疗研究提供新依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司);RIPA 裂解液试剂盒(上海碧云天公司);DMEM 培养液、胎牛血清(美国 HyClone 公司);抗 E-cadherin 抗体(sc92614)、vimentin 抗体(sc80975)、HIF-1 α 抗体(cat. no. sc13515)、Snail 抗体(cat. no. sc393172)和 β -actin 抗体(cat. no. sc517582)购自美国 Santa Cruz 生物公司。

1.2 细胞培养和处理 COLO 205(人结肠癌细胞系)购自美国 ATCC 公司。胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养基用于培养细胞。细胞生长达到 80% 融合时,开始给与干预,分为:低氧组(氧浓度 5%)、常氧组(氧浓度 21%)、适度高氧组(氧浓度 30%)。其中,常氧组直接置于普通 CO₂ 培养箱中培养,低氧及高氧组则置于自制培养器

2018-12-12 接收

基金项目: 陕西省教育厅专项基金(编号: 15JK1818); 西安交通大学第二附属医院科研基金青年项目[编号: YJ(QN)201521]

作者单位: ¹ 延安大学附属医院普外科, 延安 716000

² 西安交通大学第二附属医院普外科, 西安 710004

作者简介: 雷 星,男,副主任医师;

单 涛,男,副研究员,责任作者, E-mail: shantao820304@163.com

皿中(10 cm × 15 cm × 25 cm),持续通入含有5%、30% O₂ 和5% CO₂ 的混合气体。培养48 h后更换培养基为3 ml 无血清基础培养基,置于普通CO₂ 培养箱中培养24 h后收集细胞,进行下一步试验。

1.3 细胞免疫 荧光细胞培养 常规铺片,滴加PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)于已知抗原标本片,润洗10 min,使标本片具有一定湿度。滴加PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)适当稀释抗体后,覆盖已知抗原标本片。玻片置于有盖搪瓷盒内(37 °C, 30 min)。随后取出置于玻片架上,先用PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)冲洗1~2次,然后按顺序PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)三缸浸泡,每缸5 min,不时振荡。取出玻片,用滤纸吸去多余水分,滴加1滴荧光标记的抗人球蛋白抗体。将玻片平放在盖搪瓷盒内(37 °C, 30 min)。取出覆以盖玻片。荧光显微镜下观察。

1.4 RT-PCR 细胞系 COLO 205 总 RNA 应用 TRIzol 试剂进行提取。使用 2 μg RNA 合成第一条 cDNA 链(RevertAid)。PCR 引物设计: E-cadherin 上游引物: 5'-CAATGGTGTCCATGTGAACA-3', 下游引物: 5'-CCTCCTACCCTCCTGTTCG-3'; vimentin 上游引物: 5'-CGCTTCGCCAACTACAT-3', 下游引物: 5'-AGGGCATCCACTTCACAG-3'; Snail 上游引物: 5'-CGCGCTCTTTCCTCGTCAG-3', 下游引物: 5'-TCCCA-GATGAGCATTTGGCAG-3'; β-actin 上游引物: 5'-ATCGTGCGTGACATTAAGGAGAAG-3', 下游引物: 5'-AGGAAGGAAGGCTGGAAGACTG-3'。PCR 反应条件: 变性(94 °C, 3 min), 再进行35循环(94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 35 s), 退火(72 °C, 5 min)。内参使用 β-actin。PCR 产物置于1.5%琼脂糖凝胶电泳后于紫外光下观察。

1.5 Western blot 检测蛋白 取 5 × 10⁵ 个对数生长期细胞加入预冷细胞裂解缓冲液(0.5 ml)冰上孵育(30 min)。离心取上清液,测定蛋白含量(BCA法),凝胶电泳分离蛋白(10% SDS-PAGE),目的蛋白半干转到硝化纤维膜上。后用含5%脱脂牛奶TBST进行封闭1 h,一抗孵育过夜(4 °C),辣根过氧化物酶(HRP, 1:1 500)结合的二抗(Santa Cruz公司)室温孵育2 h,用增强型化学发光试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)显色,照相并分析结果。

1.6 统计学处理 使用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,采用 One-way ANOVA 方差分析法,首先利用 Levene 方法进行方差齐性检验,确定方差齐性且

整体比较组间差异有统计学意义后进一步作多重比较,多重比较采用 LSD 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同氧浓度对结肠癌 Snail mRNA 及蛋白表达的影响 为了明确低氧是否影响癌细胞 Snail 表达,Western blot 的方法检测了 Snail 在 mRNA 及蛋白水平的表达情况。RT-PCR 结果显示低氧组 Snail mRNA 水平较常氧/高氧组明显升高($F = 55.21$, $P < 0.05$)。Western blot 结果显示低氧组 Snail 的蛋白表达水平则较常氧/高氧组显著上调($F = 129.75$, $P < 0.05$) (图1)。以上结果进一步证实了

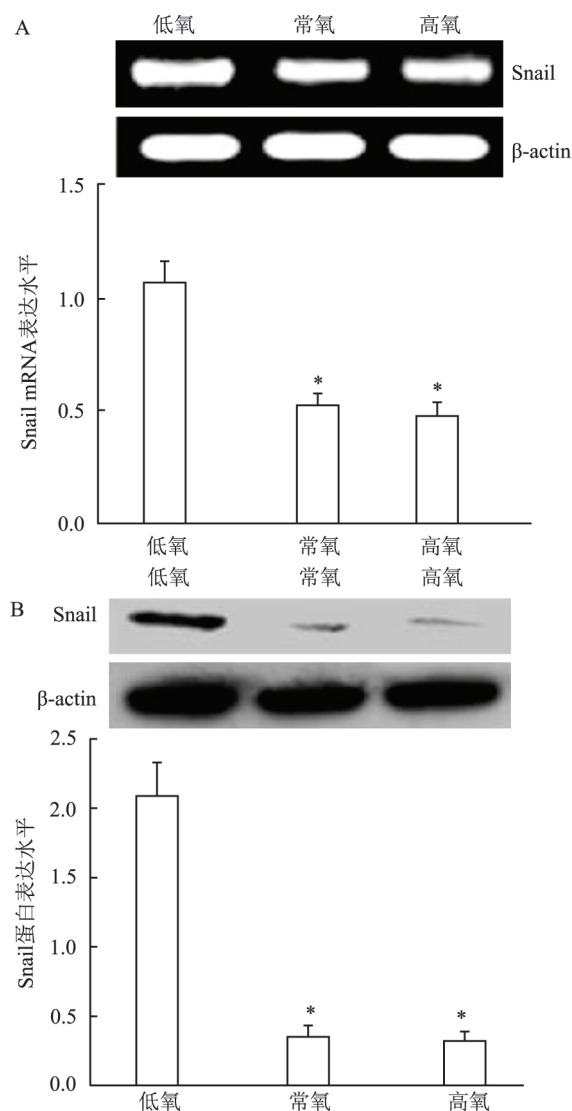


图1 RT-PCR及Western blot结果

A: RT-PCR 检测 Snail mRNA 水平; B: Western blot 检测 Snail 蛋白水平; 与低氧组比较: * $P < 0.05$

低氧上调 Snail 表达可能是诱导 EMT 发生的关键转录点。相反, 归巢环境下常氧或高氧状态下向 MET 转变。

2.2 低氧通过 HIF-1 α 通路调控结肠癌 Snail mRNA 及蛋白的表达 Western blot 检测其表达情况, 结果显示低氧组 HIF-1 α 的蛋白表达水平较常氧/高氧组显著上调 ($F = 126.59$, $P < 0.05$) (图 2B)。以上结果进一步证实了低氧下结肠癌细胞中 HIF-1 α 通路处于活化状态。为了验证低氧下结肠癌细胞中

HIF-1 α 通路与结肠癌细胞 EMT 有关, HIF-1 α 特异性阻断剂预处理细胞 24 h 后再用不同氧浓度处理, 检测 Snail 蛋白的表达。结果显示, 加入阻断剂组 Snail 蛋白的表达与常氧组 ($P = 0.23$) / 高氧组无差别 ($F = 0.60$, $P = 0.58$)。相应的 E-cadherin、Vimentin 表达较常氧/高氧组无差别。以上结果证实了结肠癌细胞中 HIF-1 α -Snail 调控轴是低氧诱导 EMT 发生关键机制, 相应地常氧/高氧环境下 HIF-1 α -Snail 调控轴失活可诱导 MET 转变。

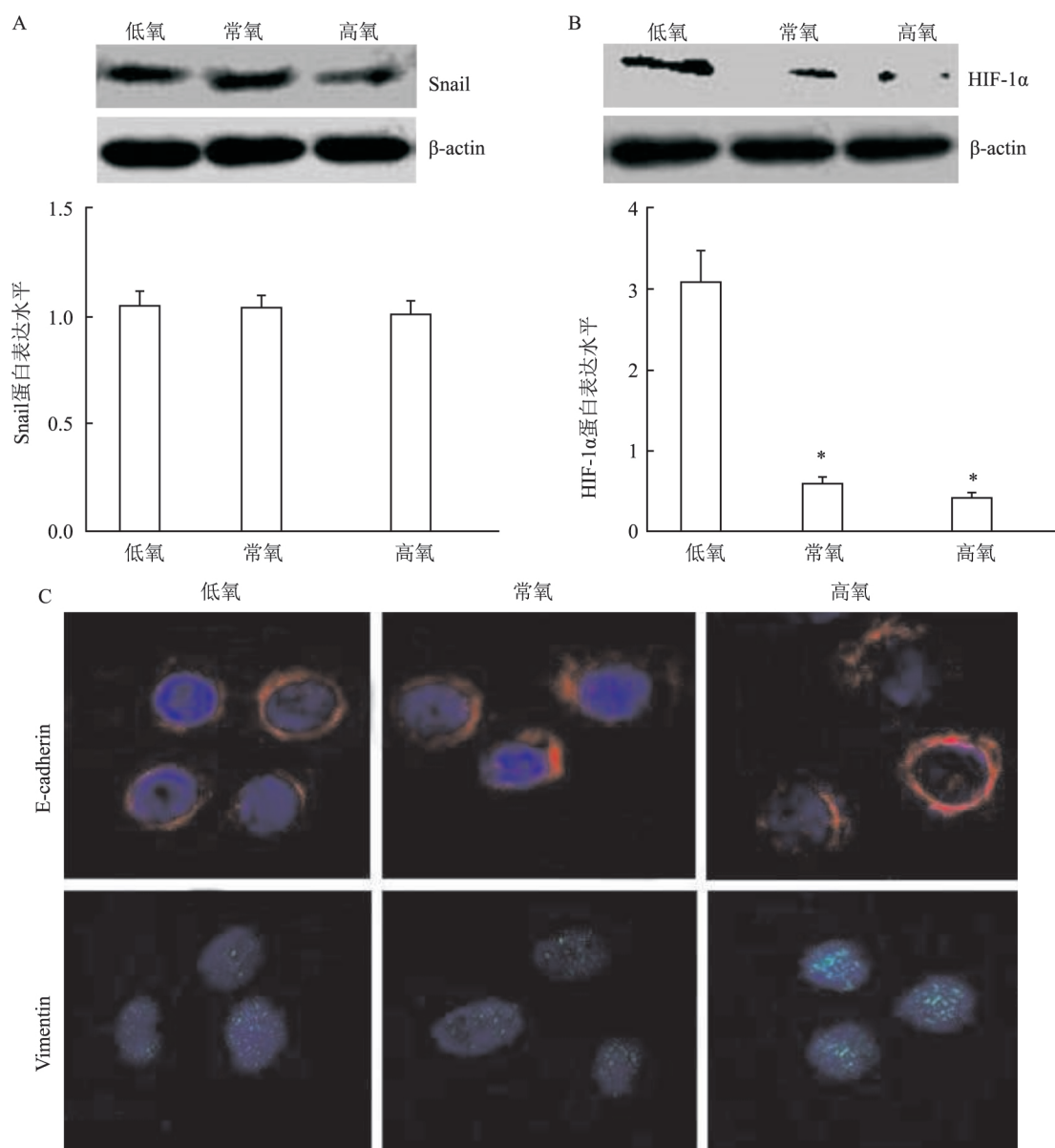


图2 HIF-1 α 通路调控结肠癌 Snail mRNA 及蛋白的表达

A: Western blot 结果显示 HIF-1 α 的蛋白表达水平; B: 阻断 HIF-1 α Snail 蛋白的表达情况比较 (组间比较: $P > 0.05$); C: 阻断 HIF-1 α , E-cadherin/Vimentin 各组表达较常氧/高氧组无差别; 与低氧组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

EMT 给了癌细胞"双腿"让它们能够脱离原位肿瘤,并通过促进血管生成和内渗帮助肿瘤细胞进入血液循环,形成循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)^[5]。肿瘤细胞发生 EMT,除了可以促进 CTCs 产生,还可以促进 CTCs 存活,CTCs 定植通过 MET 形成肿瘤转移灶^[5]。但目前 EMT-MET 这一时空调控关键环节的确切机制尚未阐明。此研究证实肿瘤原发处低氧微环境可通过 HIF-1 α -Snail 调控轴调控细胞 EMT 发生,而常氧/高氧环境下则发生相反的现象。此结果证实假说,即已习惯乏营养环境下生存的肿瘤细胞进入归巢富氧微环境后,失去低氧诱导,迫使肿瘤细胞发生 EMT-MET 转换,形成新的转移灶,一旦肿瘤在空间上生长到一定体积后,又建立新的乏氧微环境,再次形成新的恶性循环,以此方式不停的促进肿瘤进展。

缺氧是实体肿瘤在发生、发展的过程中,局部微环境最显著特征^[8]。胃癌中已经证实存在明显的缺氧状态,胃癌的这种缺氧环境与其高侵袭特征密切相关^[9]。因此低氧的肿瘤组织内癌细胞的生物学行为更趋向恶性,形成更具侵袭性的类型,并表现出对治疗的抵抗性。低氧浓度的确可以影响间质-上皮可塑性,介导 EMT 发生^[9]。Huang et al^[10]研究表明缺氧依靠 HIF-1 α 正向调节 Slug 的表达,通过 EMT 程序获得高侵袭转移能力。本研究结果和上述结果一致,也再次证实了此结论。并在此基础上本试验继续在富氧环境下观察到 MET 现象。提示氧浓度的差异在肿瘤转移的不同阶段,均对 EMT 和 MET 之间转换过程产生重要影响。这种原发灶低氧环境和归巢部位富氧环境的差异有可能是 EMT-MET 转换的新视角,但更深入的机制研究仍需进一步验证。

EMT 赋予肿瘤细胞一些新特性,主要有增加细胞迁移侵袭,使其突破基膜,促进肿瘤细胞进入血液循环,形成 CTCs。Tsuji et al^[11]和 Thiery et al^[6]证实只有发生 EMT 的细胞侵入相邻组织和血管,表明发生 EMT 是产生 CTCs 的重要前提。转移到远部位 CTCs 适应周围基质环境后,还会再经历一个 MET 转换,重新获得增殖特性,进而形成转移灶^[12]。研

究这种可逆并且瞬时的 EMT-MET 转换将是一个重要方向,无疑有大量未知问题亟待解决。深入研究 CTCs-EMT 产生和转化的机制及其生物学意义必将有助于揭开肿瘤发生、发展和转移之谜,并且可为制定新的肿瘤靶向治疗策略提供依据。

参考文献

- [1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 159(1): 68-81.
- [3] Favoriti P, Carbone G, Greco M, et al. Worldwide burden of colorectal cancer: a review [J]. *Updates Surg*, 2016, 72(1): 112-7.
- [4] Tsai J H, Yang J. Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis [J]. *Genes Dev*, 2013, 27(20): 2192-206.
- [5] Chen T, You Y, Jiang H, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): a biological process in the development, stem cell differentiation and tumorigenesis [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 11(1): 34-43.
- [6] Thiery J P, Acloque H, Huang R Y, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease [J]. *Cell*, 2009, 139(5): 871-90.
- [7] Cano A, Perez-Moreno M A, Rodrigo I, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression [J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(2): 76-83.
- [8] Ikeda Y, Hisano H, Nishikawa Y, et al. Targeting and treatment of tumor hypoxia by newly designed prodrug possessing high permeability in solid tumors [J]. *Mol Pharm*, 2016, 13(7): 2283-9.
- [9] Yang S W, Zhang Z G, Hao Y X, et al. HIF-1 α induces the epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer stem cells through the Snail pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(6): 9535-45.
- [10] Huang C H, Yang W H, Chang S Y, et al. Regulation of membrane-type 4 matrix metalloproteinase by SLUG contributes to hypoxia-mediated metastasis [J]. *Neoplasia*, 2009, 11(12): 1371-82.
- [11] Tsuji T, Ibaragi S, Shima K, et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by growth suppressor p12CDK2-AP1 promotes tumor cell local invasion but suppresses distant colony growth [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(24): 10377-86.
- [12] Hong Y, Zhang Q. Phenotype of circulating tumor cell: face-off between epithelial and mesenchymal masks [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(12): 5663-74.

网络出版时间: 2019-5-30 10:50 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190527.1648.010.html>

TRPC1 与硝苯地平及环孢素 A 诱导的牙龈增生的相关性研究

李楠楠 朱婷婷 李午丽 李 颂

摘要 目的 探讨经典瞬时受体电位通道 1 (TRPC1) 与硝苯地平 (Nif) 及环孢素 A (CsA) 单独及联合诱导的牙龈增生的相关性。方法 一定浓度的 Nif 和 CsA 单独及联合作用于体外培养的人牙龈成纤维细胞 (HGF), 1、3、5、7 d 后, CCK8 法检测药物作用下 HGF 增殖活性的变化, 实时荧光定量 PCR 和 Western blot 分别检测各组细胞 TRPC1、增殖细胞核抗原 (PCNA)、凋亡标记分子 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) mRNA 和蛋白表达水平的变化及差异, 免疫细胞化学染色法检测各组细胞 TRPC1 的表达变化及差异情况。结果 CCK8

结果显示, Nif、CsA 和 Nif + CsA 均可促进 HGF 的增殖; 实时荧光定量 PCR 和 Western blot 结果表明, Nif 和 CsA 单独及联合作用于 HGF 后均可显著上调 Bcl-2 和 TRPC1 的表达, 但 PCNA 的表达并没有显著变化; 免疫细胞化学染色法结果提示, TRPC1 在 Nif 和 CsA 单独及联合刺激的细胞中其表达量明显升高。结论 HGF 在 Nif 和 CsA 单独及联合作用下, 其 TRPC1 的表达量均明显上升, 提示 TRPC1 可能在药物性牙龈增生的发病过程中发挥一定的作用。

关键词 人牙龈成纤维细胞; 药物性牙龈增生; TRPC1; 硝苯地平; 环孢素 A

中图分类号 R 781.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)06-0912-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.06.016

2019-03-04 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1508085SQH222); 安徽医科大学博士科研资助资金 (编号: XJ201632)

作者单位: 安徽医科大学口腔医学院, 安徽医科大学附属口腔医院, 口腔疾病研究安徽省重点实验室, 合肥 230032

作者简介: 李楠楠, 女, 硕士研究生;

李 颂, 女, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 3197053337@qq.com

药物性牙龈增生 (drug induced gingival overgrowth, DIGO) 是服用某些特定药物后口腔中发生的副作用, 目前引起牙龈增生的药物主要有硝苯地平 (nifedipine, Nif) 和环孢素 A (cyclosporin A, CsA)。

HIF-1 α -Snail axis mediates EMT-MET transformation in colon cancer under different oxygen conditions

Lei Xing¹, Chen Xi², Zhang Di², et al

(¹Dept of General Surgery, Yan'an University Affiliated Hospital, Yan'an 716000; ²Dept of General Surgery, The Second Affiliated Hospital of Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004)

Abstract Objective The hypoxic microenvironment of colon cancer can promote the occurrence of tumor epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), and the new environment of tumor metastasis homing can mediate the process of mesenchymal-to-epithelial transition (MET). This study is aimed to explore the key mechanism of metastasis through the two stage of the EMT-MET process. **Methods** The colon cancer cell line COLO 205 was cultured in different oxygen concentration incubators. The experiment was divided into three groups: hypoxia group (oxygen concentration 5%), normoxia group (oxygen concentration 21%), moderate hyperoxia group (oxygen concentration 30%). Snail, HIF-1 α mRNA and protein expression were examined by PCR and Western blot. Then, HIF-1 α specific blocker was used to suppress HIF-1 signaling pathway, E-cadherin, vimentin and Snail were examined. **Results** The results of PCR and Western blot showed that the expression of HIF-1 α mRNA and protein in hypoxic group increased, and which could be reversed by HIF-1 α specific blocker. **Conclusion** Differences in oxygen concentration at primary sites (hypoxic) and homing sites (normoxic or hyperoxic) are important in the EMT-MET process and the mechanism may involve HIF-1 α -Snail signaling.

Key words HIF-1 α ; Snail; epithelial-to-mesenchymal transition; mesenchymal-to-epithelial transition; pancreatic cancer