

网络出版时间: 2018-3-16 9:31 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180315.1708.001.html>

◇基础医学研究◇

人表皮生长因子受体 2 与 wnt/ β -catenin 信号相互作用促进卵巢癌细胞转移

刘芬芬^{1,2}, 高倩^{2,3}, 程民^{1,2}, 徐婷娟^{1,2}, 任荟蓉^{1,2}, 沈国栋^{1,2}

摘要 目的 探讨卵巢癌细胞中人表皮生长因子受体 2 (HER2) 与 wnt/ β -catenin 信号是否存在相互作用及其对卵巢癌细胞转移的影响。方法 Western blot 法检测卵巢癌细胞株 SKOV3 中 HER2 和 T 细胞因子 4 (TCF4) 的表达情况, 利用慢病毒载体分别构建 HER2 或者 TCF4 表达被敲低的 SKOV3 细胞, Transwell 和细胞划痕实验比较基因表达水平改变对 SKOV3 细胞迁移能力的影响; 并通过分别使用受体刺激剂 EGF 与 wnt3a 以及靶向 TCF4/ β -catenin 的小分子抑制剂 iCRT14 处理, 观察其对细胞 HER2、 β -catenin 和 TCF4 表达量及细胞迁移能力的影响。结果 卵巢癌细胞株 SKOV3 高表达 HER2 和 TCF4。敲低 HER2 表达, β -catenin 和 TCF4 的蛋白水平会降低 ($P < 0.05$); 敲低 TCF4 表达, HER2 的蛋白水平也会降低 ($P < 0.05$); 并且其细胞迁移能力明显降低 ($P < 0.05$)。加入 EGF 后, SKOV3 细胞中 HER2 的表达量会随着刺激时间的延长而增强, 同时 β -catenin 和 TCF4 的表达也增强 ($P < 0.05$); 加入 wnt3a 后, β -catenin 和 TCF4 的表达量会随着刺激时间的延长而增强, 同时 HER2 的表达也增强 ($P < 0.05$); 加入 iCRT14 后, β -catenin 和 TCF4 的表达量会随着刺激时间的延长而降低, 同时 HER2 的表达也减弱 ($P < 0.05$); SKOV3-shHER2 和 SKOV3-shTCF4 细胞加入 EGF、wnt3a 后, 细胞迁移能力明显上升 ($P < 0.05$); SKOV3 细胞加入 iCRT14, 细胞迁移能力明显减弱 ($P < 0.05$)。结论 卵巢癌细胞中 HER2 与 wnt/ β -catenin 信号存在相互作用, 发挥共同促进卵巢癌细胞转移的作用。

关键词 卵巢癌; HER2; wnt; TCF4

中图分类号 R 737.31

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)03-0331-08
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.03.001

卵巢癌(ovarian cancer, OC)在妇科肿瘤中死亡

2017-11-21 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金面上项目(编号: 1408085MH167);
安徽省科技攻关项目(编号: 1301042094)

作者单位: ¹ 安徽医科大学附属省立医院老年医学科, 合肥 230001

² 肿瘤免疫与营养治疗安徽省重点实验室, 合肥 230001

³ 安徽医科大学生命科学院, 合肥 230032

作者简介: 刘芬芬, 女, 硕士研究生;

沈国栋, 男, 副教授, 研究员, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: gdshen@ustc.edu.cn

率排在首位, 早期缺乏特异性症状, 当出现明显症状或原发肿瘤发生转移时, 大多数病例才被发现。约 2/3 的高级别卵巢癌患者存在恶性进展, 从而引起肿瘤复发和化疗耐药。分子靶向治疗策略有助于改善卵巢癌患者的预后, 从而提高其生存率^[1]。不同信号通路之间的交互作用常常存在于在正常的胚胎器官发育中, 其异常调节会促进肿瘤的发生^[2-3]。人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2)^[4] 和 wnt/ β -catenin 信号通路^[5] 已被证实存在卵巢癌中存在异常表达及其相关信号通路过度激活的现象。研究^[6] 表明 HER2 与 wnt/ β -catenin 信号通路之间可能存在相互作用而共同促进下游信号的持续活化, 对促进肿瘤细胞自我更新及转移起到重要作用, 并推测可能与卵巢癌的耐药机制相关。该研究主要检测 HER2 与 wnt/ β -catenin 信号通路之间的相互作用, 为了解卵巢癌的发病及耐药机制提供实验证据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂 人卵巢癌细胞株 SKOV3 获赠于中国医学科学院肿瘤研究所。胎牛血清(FBS)、RP-MI1640 培养基购自美国 HyClone 公司; RIPA 裂解液、胰酶消化液、5×蛋白上样缓冲液购自上海碧云天生物技术有限公司; 蛋白磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂购自瑞士 Roche 公司; BCA 试剂盒、化学发光显影液购自美国 Thermo 公司; β -actin、 β -链蛋白(β -catenin) 兔抗人单克隆抗体、T 细胞因子 4 (T cell factor 4, TCF4) 兔抗人单克隆抗体、HER2 兔抗人单克隆抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗兔 IgG 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 人表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF) 购自美国 Peprotech 公司; 人重组 wnt3a 蛋白购自美国 R&D Systems 公司; 小分子抑制剂 iCRT14(inhibitor of β -catenin responsive transcription 14, iCRT14) 购自英国 Tocris 公司; HER2、TCF4 慢病毒购自上海汉恒生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 于 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养,含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基的解冻复苏后的人卵巢癌细胞株 SKOV3。

1.2.2 Western blot 检测 提取生长状态良好的 SKOV3 细胞总蛋白,BCA 法测定各组蛋白浓度并用 PBS 调成一致浓度,加入蛋白上样缓冲液后于水浴锅中煮沸 8 min,经 SDS-PAGE 电泳分离后湿转至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶室温条件下封闭 1 h。一抗以兔抗人 β -actin 为内参,兔抗人 β -catenin、TCF4、HER2 为目的蛋白,4 ℃ 孵育过夜。二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG。滴加显影液后使用化学发光成像仪成像并运用 Chemi Analysis 分析软件对蛋白电泳条带灰度值进行定量分析。蛋白相对定量 = 目的蛋白灰度值 / 同标本 β -actin 内参灰度值,同时将对照的蛋白相对定量设为 1。每项实验重复 3 次。

1.2.3 慢病毒感染 提前 24 h 在 6 孔板中接种适量密度的 SKOV3 细胞(约 2×10^5 /ml),待细胞生长达 50% ~ 80% 面积时即可用于感染。靶向 HER2 或 TCF4 不同位点的 shRNA-1 及 shRNA-2 包入慢病毒中(汉恒生物科技有限公司),用作感染。感染当天,将细胞换至无血清培养基中,每孔加入 10 μ l (2×10^6 TU) 慢病毒溶液并放回培养箱。6 h 后,将细胞换液至含 10% FBS 的新鲜培养基。48 h 后,在荧光显微镜下查看转染效率。用适量嘌呤霉素对其进行筛选,然后提取适量细胞检测 HER2 或 TCF4 蛋白量。

1.2.4 细胞迁移检测 收集经胰酶消化后生长状态良好的 SKOV3 细胞,离心后用无血清培养基重悬计数,分为对照组, iCRT14 组 (5 μ g/ml), shHER2 组, shTCF4 组, shHER2 + EGF 组 (10 μ g/ml), shHER2 + wnt3a 组 (10 μ g/ml), shTCF4 + EGF 组 (10 μ g/ml) 和 shTCF4 + wnt3a 组 (10 μ g/ml)。加入刺激剂混匀后,分别将 100 μ l 含 5×10^3 细胞数的各组细胞悬液加入 96 孔板中 Transwell 小室上室,每组 3 个平行孔;下室均加入 200 μ l 含有 EGF 生长因子的完全培养基,在 37 ℃ 培养箱孵育,12 h 后取出小室,用 4% 中性福尔马林固定,棉签小心擦去上室细胞,结晶紫染色,蒸馏水洗后用镊子划下小室底膜,50% 甘油封片。使用 10 $\times$ 物镜明场拍照,随机选取每个样本的 10 个视野进行计数分析。

1.2.5 划痕实验 将 SKOV3 细胞株分别接种到 6 孔板中,待细胞贴壁生长至融合度约为 80% 时,用

无菌移液器枪头沿孔中轴线轻轻划过,然后用 PBS 洗涤细胞 2 次,以除去漂浮细胞,并加入含有不同刺激剂的新鲜培养基;放入 37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养。分别于 0、20 h 后拍照,观察划痕愈合情况并测量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行分析,多组样本的比较运用单因素方差分析,方差齐者采用 LSD-*t* 检验,方差不齐者采用 Games-Howell 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 在卵巢癌 SKOV3 细胞中检测 HER2 和 TCF4 的表达量 实验结果显示人卵巢癌 SKOV3 细胞株高表达 HER2 和 TCF4,使用两种慢病毒获得敲低 HER2 的 SKOV3-shHER2 和敲低 TCF4 的 SKOV3-shTCF4 细胞,Western blot 验证敲低效果 ($P < 0.05$),其中 shHER2 #2 敲低 HER2 效果更好,shTCF4#2 敲低 TCF4 效果更好,后续实验均选择这两种慢病毒敲低的 SKOV3-shHER2 和 SKOV3-shTCF4。同时,Western blot 结果还显示,敲低了 HER2 的 SKOV3 细胞,其 TCF4 和 β -catenin 的表达也会降低;敲低了 TCF4,SKOV3 细胞中 HER2 和 β -catenin 的表达也同样降低。结果表明卵巢癌 SKOV3 细胞中,HER2 和 TCF4 的表达量呈正相关性 (HER2 蛋白: $F = 54.843$; TCF4 蛋白: $F = 109.502$; β -catenin 蛋白: $F = 33.146$; $P < 0.05$)。Transwell 实验 ($F = 122.423$, $P < 0.05$) 和划痕实验 ($F = 164.466$, $P < 0.05$) 表明,敲低 HER2 和 TCF4 后,SKOV3 细胞的转移能力明显减弱,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1~3。

2.2 在卵巢癌 SKOV3 细胞中 HER2 和 wnt/ β -catenin 信号通路的活化 为了进一步探讨卵巢癌中 EGFR 和 wnt 信号通路是否存在相互作用,通过加入不同时间梯度的 EGF、wnt3a 和 iCRT14 刺激,利用 Western blot 法检测 HER2、 β -catenin 和 TCF4 的变化。结果显示加入 EGF 后,随着时间的延长,HER2 表达量上升 ($P < 0.05$),同时 β -catenin 和 TCF4 的表达也明显增强 ($P < 0.05$);加入 wnt3a 后, β -catenin 和 TCF4 表达量上升 ($P < 0.05$),同时 HER2 的表达也明显增强 ($P < 0.05$);加入 iCRT14 后, β -catenin 和 TCF4 表达量降低 ($P < 0.05$),同时 HER2 的表达也明显减弱 ($P < 0.05$) (HER2 蛋白: $F_{\text{EGF}} = 15.603$, $F_{\text{wnt3a}} = 104.057$, $F_{\text{iCRT14}} = 32.034$; TCF4 蛋白: $F_{\text{EGF}} = 42.557$, $F_{\text{wnt3a}} = 26.138$, $F_{\text{iCRT14}} = 95.082$; β -catenin 蛋

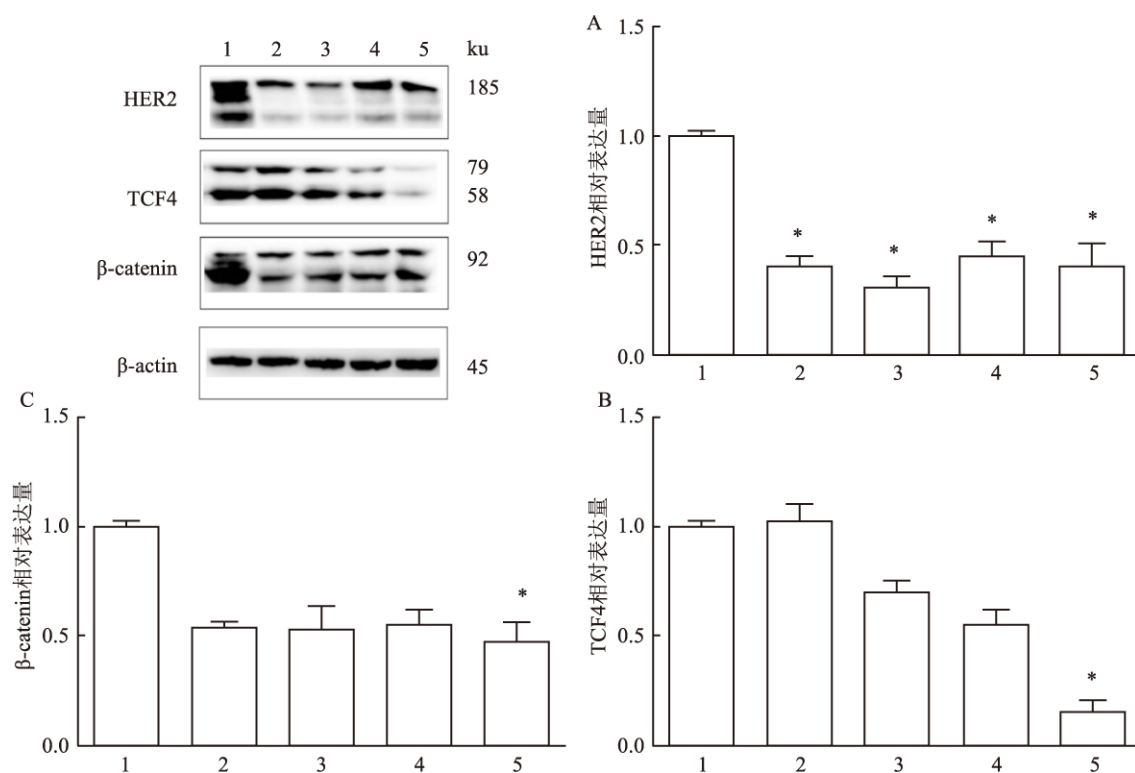


图1 Western blot 法检测 SKOV3 细胞中 HER2、β-catenin 和 TCF4 的表达

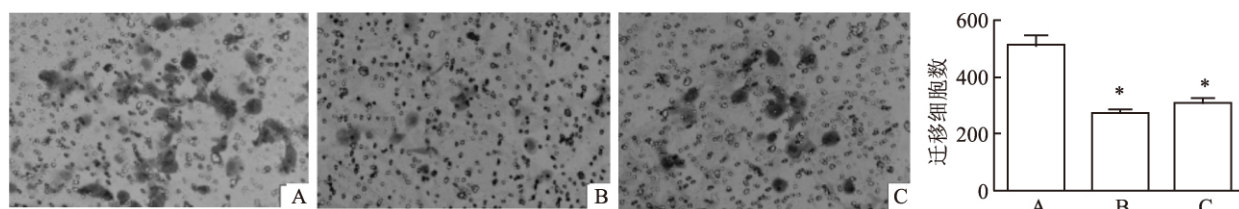
A: HER2; B: TCF4; C: β-catenin; 1: 对照组; 2: shHER2#1; 3: shHER2#2; 4: shTCF4#1; 5: shTCF4#2; 与对照组比较: * $P < 0.05$ 

图2 Transwell 实验检测敲低 HER2 和 TCF4 的 SKOV3 细胞迁移能力 ×100

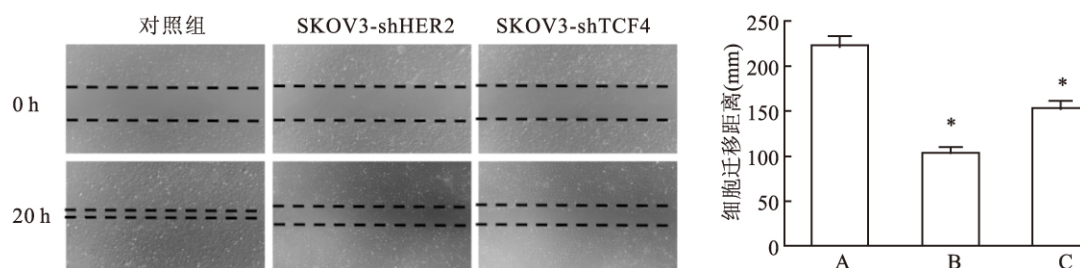
A: 对照组; B: SKOV3-shHER2; C: SKOV3-shTCF4; 与对照组比较: * $P < 0.05$ 

图3 划痕实验检测敲低 HER2 和 TCF4 的 SKOV3 细胞迁移能力 ×40

A: 对照组; B: SKOV3-shHER2; C: SKOV3-shTCF4; 与对照组比较: * $P < 0.05$

白: $F_{EGF} = 11.967$, $F_{wnt3a} = 65.840$, $F_{iCRT14} = 103.599$ 。结果表明在卵巢癌中, HER2 与 wnt/β-catenin 信号通路存在相互作用。见图 4。

2.3 Transwell 实验和划痕实验检测卵巢癌 SKOV3 细胞的迁移能力 为了验证卵巢癌中, HER2

与 wnt/β-catenin 信号通路存在相互作用, 通过加入不同时间梯度的 EGF、wnt3a 和 iCRT14 刺激, 采用 Transwell 实验和划痕实验检测 SKOV3-shHER2 和 SKOV3-shTCF4 细胞迁移能力的变化。Transwell 实验结果 (SKOV3-shHER2: $F = 535.616$; SKOV3-

shTCF4: $F = 587.493$) 显示加入 EGF(10 $\mu\text{g/ml}$) 后, SKOV3-shHER2 和 SKOV3-shTCF4 细胞迁移能力增强($P < 0.05$); 加入 wnt3a(10 $\mu\text{g/ml}$) 后, SKOV3-shHER2 和 SKOV3-shTCF4 细胞迁移能力增强($P < 0.05$); 加入 iCRT14(25 nmol/L) 后, SKOV3 细胞迁移能力明显减弱($P < 0.05$)。划痕实验(SKOV3-shHER2: $F = 367.572$; SKOV3-shTCF4: $F = 435.443$) 和 Transwell 实验结果一致。见图 5、6。

3 讨论

近年来,针对肿瘤细胞表面受体的小分子抑制剂和抗体药物在肿瘤治疗领域取得了重要进展。目

前已有多种 EGFR 或 HER2 抗体和抑制剂被批准用于乳腺癌、胃癌等肿瘤的临床治疗^[7-8]; 而多种 wnt 信号抑制药物目前正处于肿瘤治疗的不同临床试验阶段。然而,这类药物单独用于临床肿瘤治疗的效果一般都不理想,推测原因可能是一方面临床肿瘤异质性很强,靶标表达有强有弱,造成药物敏感性不足; 另一方面一种药物长期使用易导致肿瘤耐药。其中,耐药是卵巢癌复发和治疗失败的重要原因,因此,研究卵巢癌细胞 HER2 和 wnt/ β -catenin 信号通路之间的相互作用,阐明其发生相互作用的分子机制,将为揭示卵巢癌耐药性的产生原因及靶向治疗药物的联合使用提供依据,具有重要的理论与现实

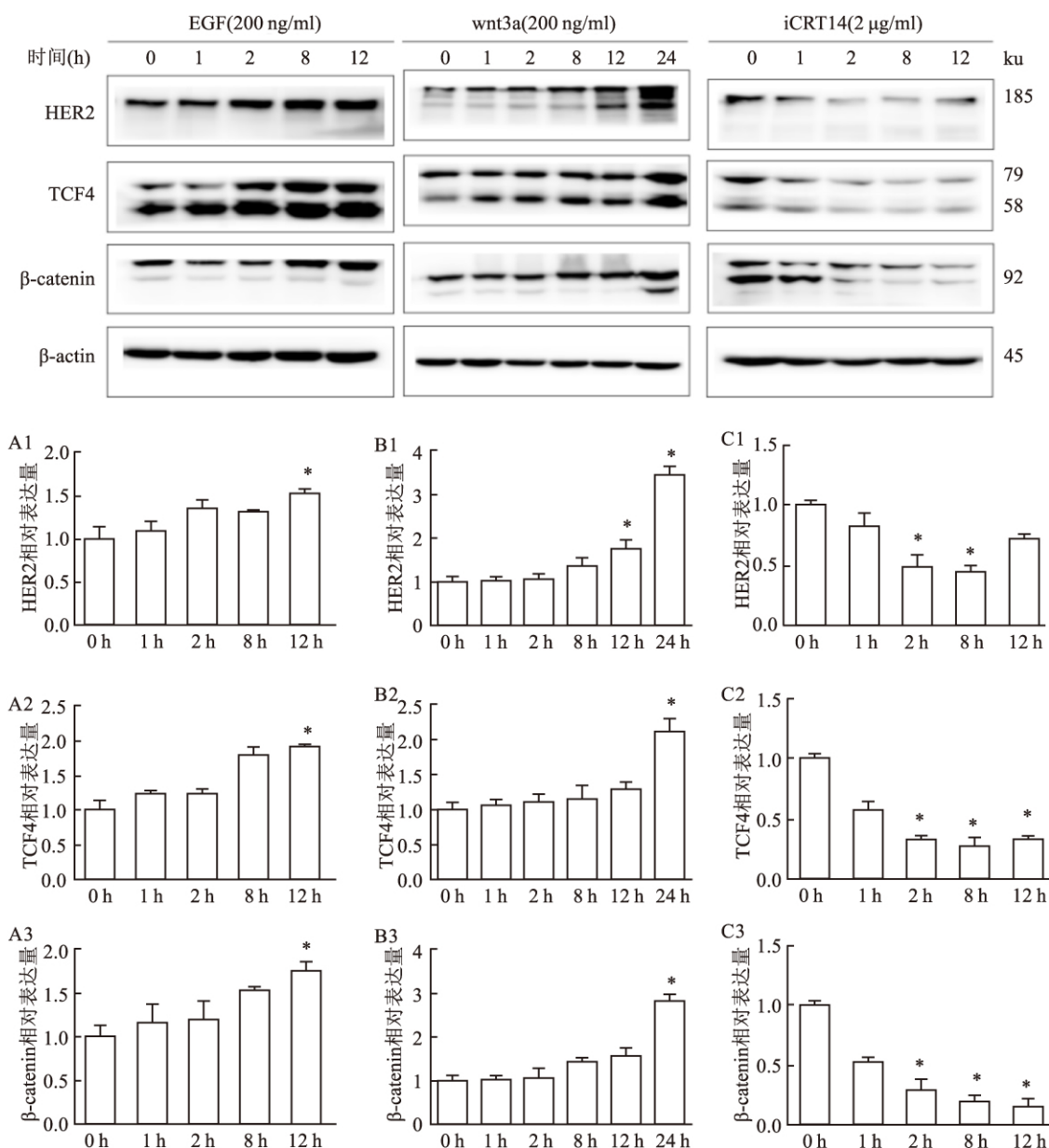


图4 Western blot 法检测加入信号刺激剂或抑制剂对 SKOV3 细胞中 HER2、 β -catenin 和 TCF4 表达的影响

A: 加入 EGF; B: 加入 wnt3a; C: 加入 iCRT14; 1: HER2; 2: TCF4; 3: β -catenin; 与 0 h 比较: * $P < 0.05$

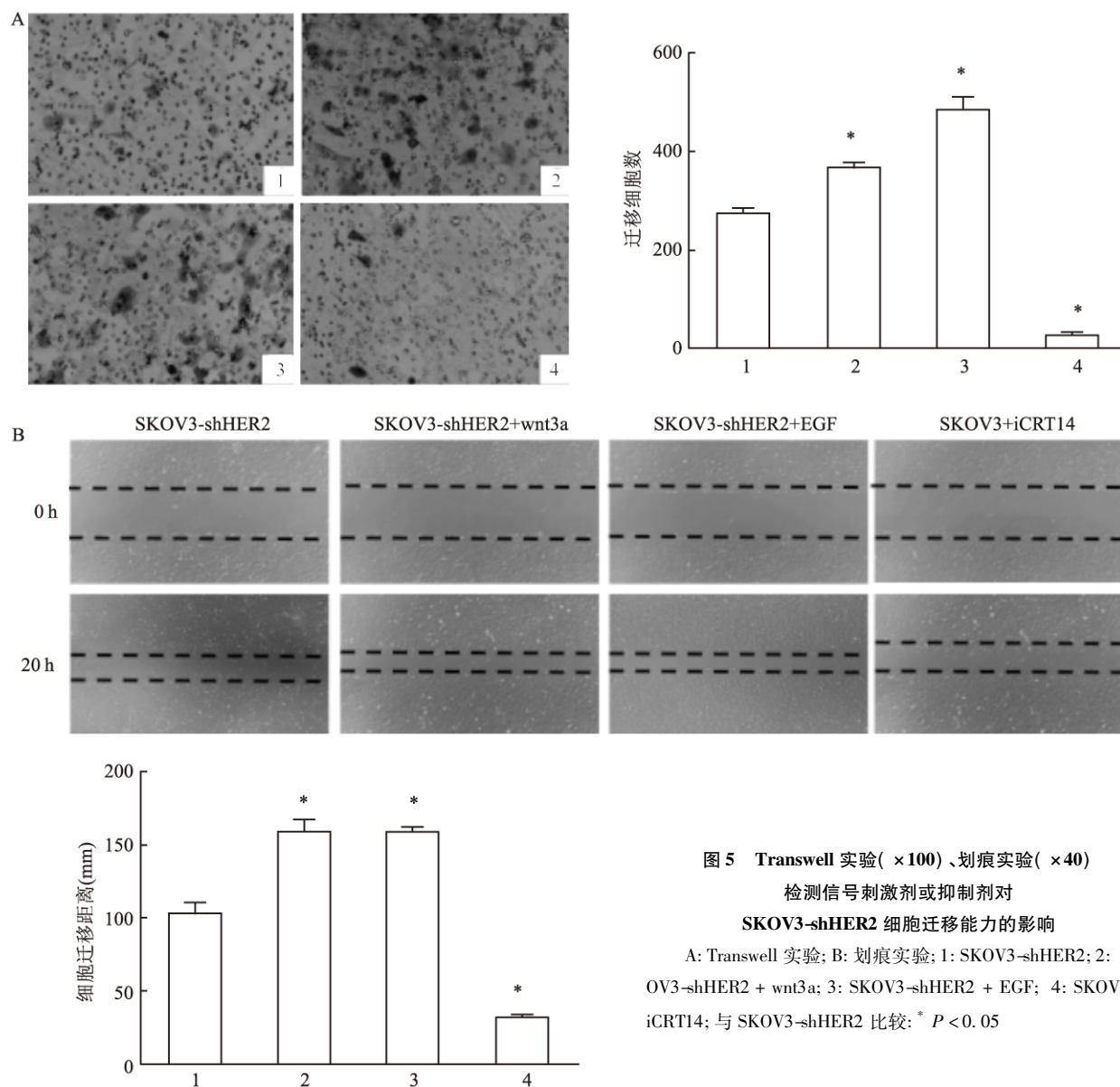


图5 Transwell 实验(×100)、划痕实验(×40)

检测信号刺激剂或抑制剂对

SKOV3-shHER2 细胞迁移能力的影响

A: Transwell 实验; B: 划痕实验; 1: SKOV3-shHER2; 2: SKOV3-shHER2 + wnt3a; 3: SKOV3-shHER2 + EGF; 4: SKOV3 + iCRT14; 与 SKOV3-shHER2 比较: * $P < 0.05$

意义。

EGFR 家族包括 HER1/EGFR/ErbB1、HER2/ErbB2/Neu、HER3/ErbB3 与 HER4/ErbB4, 其中 HER2 对 EGFR 的活化起着至关重要的作用, 尽管配体在诱导 EGFR 家族受体二聚化过程中既可以形成同二聚体也可以形成异二聚体, 但是, 这些受体在 HER2 存在的条件下都倾向于优先与 HER2 形成异二聚体, 从而促进肿瘤的生长、转移和放化疗抗性^[9]。wnt 信号通路主要包括 wnt/ β -catenin、wnt/planar cell polarity 和 wnt/Ca²⁺ 信号通路。其中 wnt/ β -catenin 是经典通路, 在生物进化中极为保守, 主要调控细胞的增殖和分化; 已有研究^[10]证实, wnt 及其通路蛋白成分过度表达或者突变等原因引起该信号通路异常活化, 使 β -catenin 不能被降解而在胞质中

积累, 一定程度时向细胞核转移, 并与转录因子 TCF/LEF 家族蛋白结合形成转录复合物, 从而激活 cyclin D1、c-myc、MMP-7、Axin2 等原癌基因, 进而导致细胞的过度增殖与凋亡减少, 细胞发生癌变。很多肿瘤细胞共表达 HER2 与 wnt 蛋白受体, 并分泌 EGF 与 wnt 等多种生长因子或可溶性蛋白, 进而形成配体/受体/MAPK、PI3K 与 wnt 信号通路之间的自分泌性正反馈激活。同时, 受体下游 MAPK、PI3K 与 wnt 信号通路也可以通过某些效应分子对自身或者对方信号通路产生负反馈抑制, 例如 MPKs、PTEN 与分泌性的 frizzled 相关蛋白等^[11-13]。同时在曲妥珠单抗(trastuzumab)抗性肿瘤细胞株中 wnt3 蛋白的高表达可以促进 wnt/ β -catenin 信号通路激活^[14]。

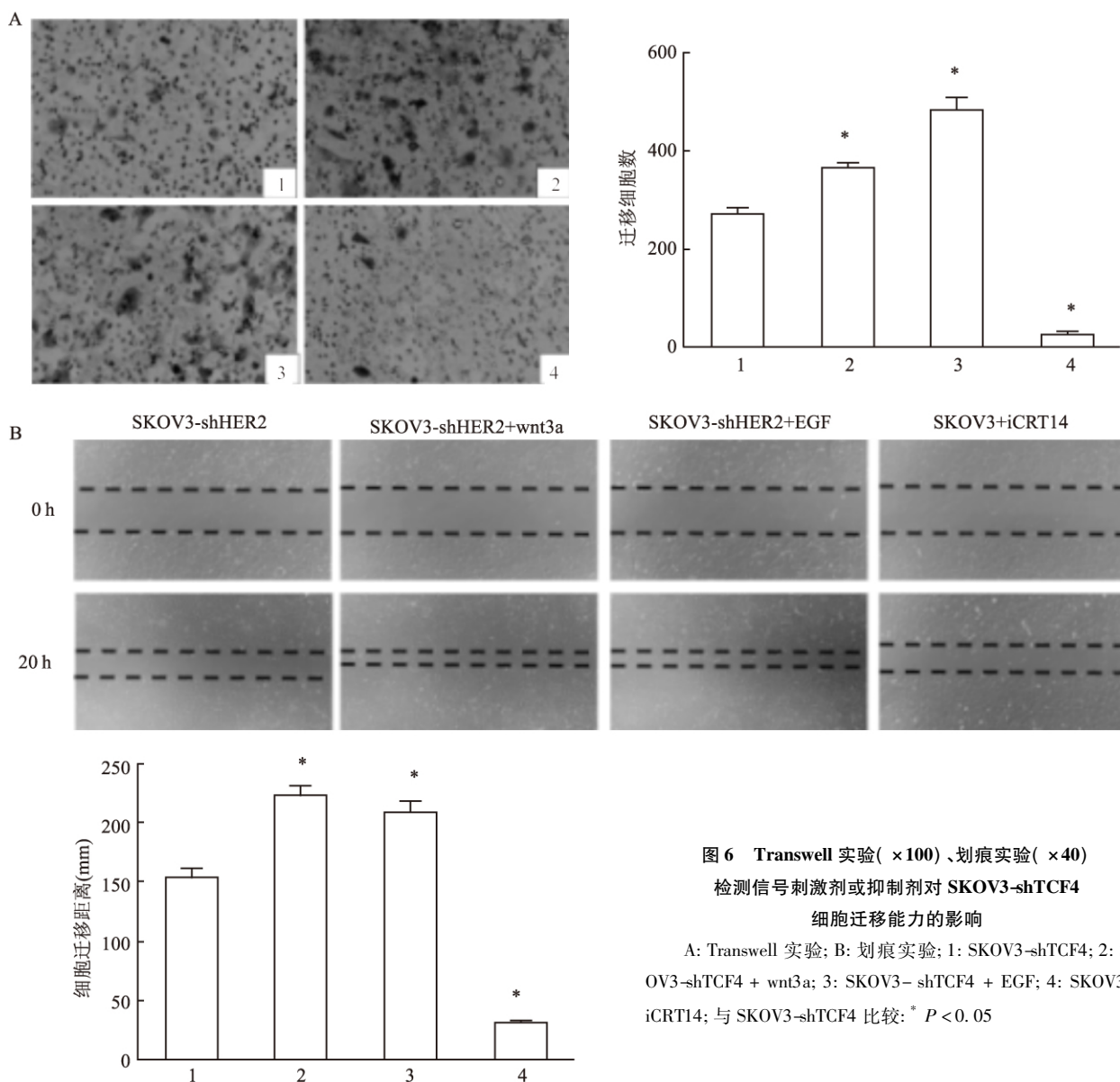


图6 Transwell实验($\times 100$)、划痕实验($\times 40$)
检测信号刺激剂或抑制剂对 SKOV3-shTCF4
细胞迁移能力的影响

A: Transwell 实验; B: 划痕实验; 1: SKOV3-shTCF4; 2: SKOV3-shTCF4 + wnt3a; 3: SKOV3-shTCF4 + EGF; 4: SKOV3 + iCRT14; 与 SKOV3-shTCF4 比较: * $P < 0.05$

由于 TCF4 和 β -catenin 是 wnt 信号通路的两个关键性节点分子,因此本实验主要通过 HER2、TCF4 和 β -catenin 来研究 HER2 和 wnt/ β -catenin 信号通路是否存在相互作用。首先构建了 SKOV3-shHER2 和 SKOV3-shTCF4 细胞株,使用 Western blot 验证敲低效果,敲低成功后,同时采用 Transwell 实验和划痕实验检测敲低前后细胞迁移能力的变化,结果表明敲低 HER2 和 TCF4 后,均引起 SKOV3 细胞迁移能力的降低。同时 Western blot 实验显示敲低 HER2、TCF4 和 β -catenin 的表达会降低,而敲低 TCF4、HER2 的表达也同样降低。结果提示 HER2 的表达和 TCF4 的表达相关。为了进一步研究 HER2 和 TCF4 之间的作用,分别使用了 wnt3a 和 EGF 以及 wnt 信号通路的小分子抑制剂 iCRT14 分

别刺激 SKOV3 细胞,Western blot 结果表明加入 EGF 后 HER2 的表达量会随着刺激时间的延长而增高,同时 TCF4 和 β -catenin 的表达也随之明显增高;加入 wnt3a 后 TCF4 和 β -catenin 的表达量会随着刺激时间的延长而增高,同时 HER2 的表达也随之明显增高;加入 iCRT1 后 TCF4 和 β -catenin 的表达量会随着刺激时间的延长而减少,同时 HER2 的表达也明显降低。在加入小分子抑制剂 iCRT14 12 h 后,HER2 和 TCF4 的表达相比之前有所增加,考虑是 iCRT14 作用效果消失。Western blot 的结果表明 HER2 和 wnt/ β -catenin 信号通路存在相互作用。为了验证这一结果,又采用 Transwell 和划痕实验检测分别在 SKOV3-shHER2 和 SKOV3-shTCF4 细胞加入 EGF 和 wnt3a 后,细胞迁移能力的变化。同时和在

SKOV3 加入 iCRT14 进行比较。结果表明,SKOV3-shHER2 细胞在加入 wnt3a 后,细胞迁移能力明显上升; SKOV3-shTCF4 细胞在加入 EGF 后,细胞迁移能力明显上升。在 SKOV3 加入 iCRT14 后,细胞迁移能力明显降低,考虑是 iCRT14 浓度(25 nmol/L) 过高。以上结果差异均有统计学意义。

综上所述,在卵巢癌 SKOV3 细胞中,存在着 HER2 和 wnt/ β -catenin 信号通路的相互作用,并促进了卵巢癌细胞的转移,可以为卵巢癌耐药性的产生原因及靶向治疗药物的联合使用提供依据。但关于 HER2 和 wnt/ β -catenin 信号通路进行相互作用的具体机制和作用靶点需要进一步研究。

参考文献

- [1] Jayson G C, Kohn E C, Kitchener H C, et al. Ovarian cancer [J]. Lancet, 2014, 384(9951): 1376-88.
- [2] Aval S F, Lotfi H, Sheervalilou R, et al. Tuning of major signaling networks (TGF- β , Wnt, Notch and Hedgehog) by miRNAs in human stem cells commitment to different lineages: possible clinical application [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 91: 849.
- [3] Zhang Z, Lei A, Xu L, et al. Similarity in gene-regulatory networks suggests that cancer cells share characteristics of embryonic neural cells [J]. J Biol Chem, 2017, 292(31): 12842-59.
- [4] Gui T, Shen K. The epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in epithelial ovarian cancer [J]. Cancer Epidemiology, 2012, 36(5): 490-6.
- [5] 戴 朦, 沈国栋, 程 民, 等. Wnt3a 和 TCF4 在人卵巢癌中的表达及临床意义 [J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(12): 1794-8.
- [6] Yamaguchi H, Chang S S, Hsu J L, et al. Signaling cross-talk in the resistance to HER family receptor targeted therapy [J]. Oncogene, 2014, 33(9): 1073-81.
- [7] 龚欢秀, 沈国栋, 胡世莲, 等. 乳腺癌 HER-2 靶向治疗的现状与前景 [J]. 中国临床保健杂志, 2016, 19(5): 552-4.
- [8] 毛必静, 张志敏, 陈 川, 等. HER2 在胃癌靶向治疗中的作用及意义 [J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(1): 31-8.
- [9] Li Y, Macdonald-Obermann J, Westfall C, et al. Quantitation of the effect of ErbB2 on epidermal growth factor receptor binding and dimerization [J]. J Biol Chem, 2012, 287(37): 31116-25.
- [10] Anastas J N, Moon R T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. [J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(1): 11-26.
- [11] Timmermanssprang E P, Gracanin A, Mol J A. High basal Wnt signaling is further induced by PI3K/mTor inhibition but sensitive to cSRC inhibition in mammary carcinoma cell lines with HER2/3 overexpression. [J]. BMC Cancer, 2015, 15(1): 1-12.
- [12] Verdu M, Trias I, Roman R, et al. Cross-reactivity of EGFR Mutation-specific Immunohistochemistry Assay in HER2-positive Tumor [J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2015, 23(8): 565-70.
- [13] 金玲燕, 陈 琦. EGFR 介导的下游信号通路与卵巢癌关系的研究进展 [J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(35): 6403-6.
- [14] Wu Y, Ginther C, Kim J, et al. Expression of Wnt3 activates Wnt/ β -catenin pathway and promotes EMT-like phenotype in trastuzumab-resistant HER2-overexpressing breast cancer cells [J]. Mol Cancer Res, 2012, 10(12): 1597-606.

Human epidermal growth factor receptor 2 interacts with wnt/ β -catenin signaling to promote ovarian cancer cell metastasis

Liu Fenfen^{1,2}, Gao Qian^{2,3}, Cheng Min^{1,2}, et al

(¹Dept of Geriatrics, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

²Anhui Provincial Key Laboratory of Tumor Immunotherapy and Nutrition Therapy, Hefei 230001;

³Dept of Biology, School of Life Science, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the interaction between human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) and wnt/ β -catenin signaling in ovarian cancer cells and its effect on ovarian cancer cell metastasis. **Methods** Western blot was used to detect the expression of HER2 and T cell factor 4 (TCF4) in ovarian cancer cell line SK-OV3. Lentivirus vector was used to respectively construct the expression of HER2 and TCF4 knocked down in SK-OV3 cell. Transwell and wound healing assay was used to compare the migration ability of cells before and after knockdown, and the effects of receptor stimulator EGF and wnt3a and small molecule inhibitor TCF4 targeting TCF4/ β -catenin were observed respectively, the effects of HER2, β -catenin and TCF4 on the expression and cell migration were observed as well. **Results** Ovarian cancer cell line SKOV3 overexpresses HER2 and TCF4 ($P < 0.05$). The protein level of HER2 was decreased ($P < 0.05$), and the cell migration ability was significantly decreased ($P < 0.05$), and the protein level of β -catenin and TCF4 was decreased ($P < 0.05$). After EGF was

TGF- β 1 介导人乳牙牙髓干细胞 分化为血管平滑肌细胞的研究

胡露露^{1,2}, 艾琦^{1,2}, 胡晓燕^{1,2}, 杨梓^{1,2}, 王银龙^{1,2}, 沈军^{1,2}

摘要 目的 血管化的主要方案是先生成血管组成细胞(血管内皮细胞和血管周细胞),然后将这些细胞构建成血管结构。由于受体自身内皮细胞和血管平滑肌细胞的稀缺性和异质性,限制了其在血管组织工程学中的广泛运用。因此,本研究对于人乳牙牙髓干细胞(SHED)是否能够诱导分化成为功能性血管平滑肌细胞(vSMCs)进行了相关方面的研究。**方法** 利用转化生长因子(TGF)- β 1作为刺激因子,诱导SHED分化为vSMCs。完成诱导后,通过RT-PCR、流式细胞术分析、Western blot和免疫荧光技术检测基因和特异性蛋白表达情况。此外,借助Matrigel血管生成功能实验来验证SHED来源的vSMCs是否能行使平滑肌细胞的功能。**结果** 通过分析平滑肌细胞特定标志物(如 α -SMA、SM22 α 、Calponin和SM-MHC)的表达,证实了TGF- β 1可以诱导SHED分化为vSMCs,且流式细胞术证实分化的效率处于较高的水平,其标志物表达比例高达 α -SMA 86.1%, SM22 α 93.9%, Calponin 56.8%, SM-MHC 88.2%。体外Matrigel血管生成功能实验表明,由SHED诱导分化的vSMCs在稳定由人脐静脉血管内皮细胞所形成的血管结构中发挥着与原代vSMCs相似的作用。**结论** 在血管组织工程中,SHED可以成功地诱导为vSMCs,能够成为血管组织工程中一种有前景的种子细胞。

关键词 组织工程学; 成血管; 乳牙牙髓干细胞; 平滑肌细胞
中图分类号 Q 813.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)03-0338-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.03.002

目前,体外构建人工血管的主要策略是利用提取的原代血管构成细胞,如人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)和功能性血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, vSMCs)重新构建血管。然而,较难的原代细胞分离技术、有限的原代细胞增殖能力,以及人体组织来源的稀缺性,严重阻碍了原代细胞的实际运用。因此,诱导干细胞成为内皮细胞或血管平滑肌细胞成为解决该问题的主要思路。

转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)目前较广泛地用于诱导干细胞分化成平滑肌细胞^[1]。研究^[2]表明,TGF-Smads信号通路对于诱导多能干细胞分化成平滑肌细胞起到关键作用。TGF- β 1既可单独也可以联合其他因子共同诱导干细胞分化为平滑肌细胞,例如TGF- β 1和骨形态发生蛋白4可以诱导脂肪干细胞分化为平滑肌细胞,TGF- β 1联合血小板衍生因子BB可以诱导人胚胎干细胞分化平滑肌细胞。因此,该研究的目的是采用TGF- β 1生长因子诱导人乳牙牙髓干细胞(stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED)分化为vSMCs,并探索分化的可能机制。

1 材料与方法

1.1 细胞提取及培养 收集脱落的乳牙,无菌下提

2017-11-21 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金资助计划(编号: KJ2011Z183、KJ2016A324)

作者单位: ¹ 安徽医科大学口腔医学院, 安徽省口腔疾病研究中心实验室, 合肥 230032

² 安徽医科大学附属口腔医院正畸科, 合肥 230032

作者简介: 胡露露, 女, 医师, 硕士;

沈军, 男, 医师, 责任作者, E-mail: queenyhoo@yeah.net

added, the expression of HER2 in SKOV3 cells increased with the prolongation of stimulation time, and the expression of β -catenin and TCF4 was also enhanced ($P < 0.05$). After adding wnt3a, the expression of β -catenin and TCF4 increased with the duration of stimulation, and the expression of HER2 was higher ($P < 0.05$). After adding iCRT14, the expression of β -catenin and TCF4 decreased with the duration of the stimulus, and the expression of HER2 decreased ($P < 0.05$). The cell migration ability of SKOV3-shHER2 and SKOV3-shTCF4 cells was significantly increased after adding EGF and wnt3a ($P < 0.05$). SKOV3 cells were treated with iCRT14, and the cell migration was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** The interaction of HER2 and wnt / β -catenin signaling in ovarian cancer cells plays a common role in promoting the metastasis of ovarian cancer cells.

Key words ovarian cancer; HER2; wnt; TCF4