

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.17.002

上皮间质转化与大肠癌奥沙利铂化疗耐药的关系研究*

贾后军¹, 向 林²

(重庆医科大学附属第一医院:1. 胃肠外科;2. 临床研究中心 400016)

[摘要] **目的** 上皮间质转化(EMT)与大肠癌化疗耐药的关系。**方法** 采用 Transwell 细胞迁移实验及 Transwell 细胞侵袭实验检测大肠癌奥沙利铂耐药细胞株 LOVO/L-OHP 与大肠癌 LOVO 亲本细胞迁移、侵袭能力,Western blot 检测 LOVO 与 LOVO/L-OHP 细胞株上皮细胞标志因子 E-cadherin 和间叶细胞标志因子 Vimentin 蛋白水平以评价 EMT 发生。然后用 GSK-3 β 特异性抑制剂 SB415286 处理 LOVO 细胞诱导 EMT,检测各组细胞迁移、侵袭能力及 E-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达评价表型改变,通过 MTT 法检测细胞增殖,Annexin-V/PI 双染检测细胞凋亡以评价 SB415286 诱导 EMT 后对大肠癌细胞株奥沙利铂化疗敏感性的影响。**结果** 耐药细胞株 LOVO/L-OHP 形态学特点,Transwell 细胞迁移侵袭实验结果,E-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达改变证实 LOVO/L-OHP 出现了典型的 EMT 表型改变。增殖与凋亡结果提示 SB415286 诱导 EMT 后大肠癌细胞株的化疗敏感性下降,导致大肠癌细胞化疗耐药。**结论** 本研究从耐药细胞株 LOVO/L-OHP 的 EMT 发生与诱导 EMT 对大肠癌细胞表型的改变和化疗敏感性的影响两个角度证实了 EMT 与大肠癌化疗耐药间的直接关系,从而为未来干预大肠癌化疗耐药性的治疗奠定基础并提供新的研究策略。

[关键词] 上皮间质转化;大肠肿瘤;奥沙利铂**[中图分类号]** R735.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)17-2308-04

The study on association between epithelial mesenchymal transition and Oxaliplatin resistance for colorectal carcinoma*

Jia Houjun¹, Xiang Lin²

(1. Department of Gastroenterological Surgery; 2. Clinical Research Center, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective** Drug resistance is the main reason for chemotherapy failure, it is to be solved how to overcome this. Recent studies indicate that epithelial-mesenchymal transition (EMT) may involved in chemotherapy resistance for some types of cancers. But it is still unknown whether EMT is involved in chemotherapy resistance for colorectal carcinoma. This study was conducted to investigate the relation between EMT and colorectal cancer chemotherapy resistance. **Methods** Abilities of migration and invasion of Oxaliplatin resistant colorectal carcinoma cell lines LOVO/L-OHP and wild type colorectal carcinoma cell lines LOVO were investigated by transwell migration and transwell invasion assays. The level of E-cadherin and Vimentin was detected by Western blot. EMT of LOVO was induced by GSK-3 β inhibitor SB415286 treatment and validated by transwell migration and transwell invasion assays and Western blot for E-cadherin and Vimentin. The sensitivity of LOVO to Oxaliplatin after SB415286 inducing EMT was evaluated by MTT and Annexin-V/PI assays. **Results** EMT phenotype was confirmed by morphology feature, results of transwell migration and invasion assays and level changes of E-cadherin and Vimentin. In addition, the results of proliferation and apoptosis tests showed that the sensitivity of LOVO to Oxaliplatin after SB415286 inducing EMT decreased significantly, which means chemotherapy resistance. **Conclusion** The direct association between EMT and chemotherapy resistance for colorectal carcinoma is proved in this study, which provides basis for intervening chemotherapy resistance and new researching strategies.

[Key words] epithelial mesenchymal transition; colorectal carcinoma; Oxaliplatin

随着人们生活水平的提高、饮食习惯的改变、人口老龄化的影响,我国大肠癌患者数和死亡人数也逐年递增。据统计,我国大肠癌每年新发病例已超过 17 万,是发病率占世界第 3 位的恶性肿瘤,其病死率排第 4 位^[1]。大肠癌的治疗目前仍主要采取以手术、化疗、放疗为主的综合治疗,其中化疗是大肠癌综合治疗的主要方法之一。新一代化疗药物(如奥沙利铂、盐酸伊立替康等)的应用在一定程度上提高了疗效,降低了复发率,但仍有 50% 以上的进展期大肠癌治疗失败。化疗耐药性的产生是肿瘤治疗失败的关键因素,如何克服肿瘤细胞化疗耐药是目前亟待解决的问题。新近研究发现,上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)不仅在多种上皮源性肿瘤的侵袭和转移中起关键作用^[2],而且在一些肿瘤化疗耐药中

可能起重要作用^[3]。因此,本研究建立大肠癌奥沙利铂(L-OHP)耐药细胞株,比较耐药细胞和亲本细胞表型差异,同时观察诱导 EMT 对大肠癌细胞表型的改变和化疗敏感性的影响,以探讨 EMT 与大肠癌化疗耐药间的关系。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 细胞株 大肠癌细胞株 LOVO,购自中国科学院上海细胞生物所。奥沙利铂耐药大肠癌细胞株 LOVO/L-OHP(前期实验已建立)。

1.1.2 主要仪器与试剂 CO₂ 细胞培养箱(Thermo Scientific FORMA 3111),FACS Calibur 流式细胞仪(BD),凝胶成像分析系统(BIO-RAD GelDoc2000),酶标仪(Thermo Scientific

* 基金项目:重庆市卫生局面上项目(2011-2-051)。 作者简介:贾后军(1975—),副主任医师,博士,主要从事大肠癌的基础与临床研究。

Multiskan Spectrum), Matrigel 基质胶/基质膜 (BD), RPMI-1640 培养基 (Hyclone), 胎牛血清 (FBS), 0.25% 胰酶溶液 (索来宝), 磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.1 mol/L, pH 7.4), Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒, 0.1% 结晶紫染料溶液, Corning 的 Transwell 小室, 奥沙利铂 (江苏恒瑞医药股份有限公司), 上皮细胞标志因子 E-cadherin 和间叶细胞标志因子 Vimentin 单克隆抗体, GSK-3 β 特异性抑制剂 SB415286 (Biosource International 公司), 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 检测试剂盒 (Sigma 公司), DMSO (Sigma 公司)。羊抗鼠 IgG 二抗 (北京博奥森), PVDF 膜 (Millipore 公司), ECL 化学发光试剂盒 (上海贝博)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 大肠癌 LOVO 亲本细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 100 mg/mL 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养液中, 37 °C, 5% CO₂、饱和湿度孵育培养。每 3 天传代 1 次。取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 耐药细胞株形态学观察和 Transwell 细胞迁移检测 在光镜下观察耐药细胞株形态学上与其亲本细胞株之间的差异, 耐药细胞株是否出现间叶细胞形态特点。Transwell 细胞迁移实验主要步骤: 无菌条件下将迁移板拿出室温下放置 10 min, 在上室加入 300 μ L 预温的无血清培养基, 室温下静置 15~30 min, 水化。用含有 0.5% FBS 低血清培养基重悬大肠癌细胞、奥沙利铂耐药细胞株, 调整浓度 (1~5) $\times 10^5$ cell/mL, 上室加 200 μ L 细胞悬液, 下室中加入含有奥沙利铂的细胞培养基 500 μ L, 37 °C 孵育 48 h。棉签擦去上室上面的非迁移细胞, 移去 Transwells, 倒置, 风干, 24 孔板中加入 500 μ L 含 0.1% 结晶紫染料, 将小室置于其中, 使膜浸没在培养基中, 37 °C 30 min 后取出, PBS 清洗。直径上取 5 个视野进行计数。

1.2.3 Transwell 细胞侵袭检测 无菌条件下将 Transwell 小室拿出室温下放置 10 min。包被基底膜, 上室每孔加入 60~80 μ L 配置好的胶 (刚好盖住基底膜, 冰上操作)。水化基底膜, 每孔加入 50 μ L 的 0.5% FBS 的培养基, 37 °C, 30 min。用含有 0.5% FBS 低血清培养基重悬大肠癌细胞、奥沙利铂耐药细胞株, 调整浓度 (1~5) $\times 10^5$ cell/mL, 上室加 200~300 μ L 细胞悬液, 下室中加入含有奥沙利铂的细胞培养基 500 μ L, 37 °C 孵育 48 h, 染色和计数同迁移实验方法。

1.2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 每 10⁶ 细胞加裂解液 200 μ L, 4 °C, 裂解 30 min, 离心取上清液测定蛋白水平, 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 垂直凝胶电泳后, 电转移至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, TBST 洗膜后分别加抗 E-cadherin (1:300)、Vimentin (1:200) 及 β -actin 一抗 (1:500), 抗体 4 °C 单独孵育过夜; TBST 液冲洗, 加标记辣根过氧化物酶的二抗室温孵育 2 h, 洗膜后 ECL 试剂显色, 分别显影成像, 凝胶成像系统进行图像分析, 以 β -actin 蛋白条带作为内参, 结果用靶蛋白/ β -actin 比值表示。

1.2.5 MTT 法检测细胞增殖 收集对数生长期的结肠癌 LOVO 亲本细胞, 消化并调整细胞悬液浓度, 分于 96 孔板, 每孔 100 μ L, 4 000 个/孔。置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 小心弃去培养基。实验根据以下分组进行, (1) 单药组 (奥沙利铂): 1.01、2.01、4.02、8.04 mg/L; (2) 联合用药组: 细胞先与 50 μ mol/L 的 GSK-3 β 特异性抑制剂 SB415286 共同孵育 12 h 后再加入上述终浓度的奥沙利铂继续培养。 (3) 对照组: 不加药及 GSK-3 β 特异性抑制剂。每组样品设 3 个复

孔。24 h 后小心吸去上清液, 加入 80 μ L 新鲜培养液, 再加入 20 μ L MTT 溶液 (5 mg/mL), 并继续培养 4 h。然后吸掉上清液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。在酶标仪 570 nm 处测量各孔的吸光度 (A) 值。计算细胞生长增值率 (%) = A (实验组) / A (对照组) \times 100%。

1.2.6 Annexin-V/PI 双染检测细胞凋亡 取对数生长期的结肠癌 LOVO 亲本细胞, 按 5 $\times 10^5$ cell/mL 以 1 mL 体积接种于 6 孔板内。培养 24 h 后, 根据以下分组分别继续培养 24 h: (1) 正常培养组 (不含奥沙利铂及酶抑制剂 SB415286); (2) 奥沙利铂 (4.02 mg/L) 组; (3) SB415286 (50 μ mol/L) 组; (4) 奥沙利铂 (4.02 mg/L) + SB415286 (50 μ mol/L) 组。胰酶消化并离心收集细胞 (1 000 r/min), 弃上清液, PBS 1 mL 洗 1 次, 离心; 加入 400 μ L binding buffer 和 10 μ L Annexin V-FITC, 4 °C 孵育 30 min; 加入 PBS 1 mL, 离心洗涤 1 次; 加入 PI 5 μ L, 室温避光 5 min。以标准程序用流式细胞仪检测, 汞激发波长 488 nm, 计数 10 000 个细胞。

2 结果

2.1 LOVO/L-OHP 细胞株形态学观察和迁移、侵袭能力检测 对前期建立的大肠癌奥沙利铂耐药细胞株 LOVO/L-OHP 在镜下观察, 具有间叶细胞形态学特点, 出现较多伪足 (图 1)。Transwell 细胞迁移实验及 Transwell 细胞侵袭实验结果发现 LOVO/L-OHP 细胞迁移侵袭能力均显著高于大肠癌 LOVO 亲本细胞, 见图 2、3。

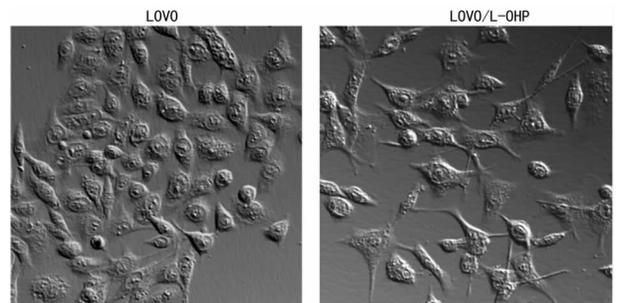
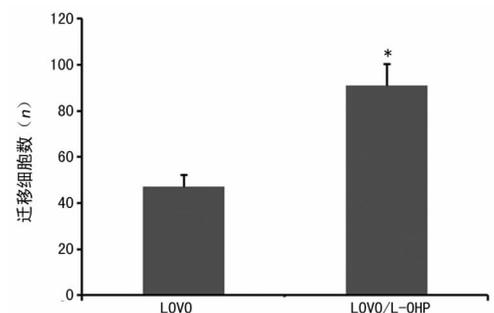


图 1 光镜下大肠癌 LOVO 亲本细胞与耐药细胞株 LOVO/L-OHP ($\times 200$)

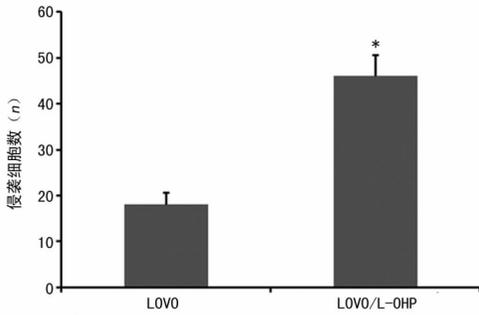


*: $P < 0.05$, 与 LOVO 比较。

图 2 大肠癌 LOVO 亲本细胞与耐药细胞株 LOVO/L-OHP 迁移实验结果

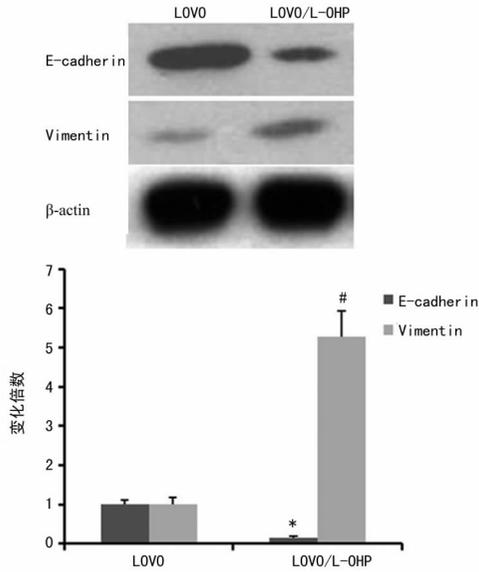
2.2 大肠癌 LOVO 亲本细胞与耐药细胞株 LOVO/L-OHP 上皮细胞标志因子 E-cadherin 和间叶细胞标志因子 Vimentin 检测 采用 Western blot 检测 LOVO 亲本细胞与 LOVO/L-OHP 细胞 E-cadherin 和 Vimentin 蛋白水平, 与 LOVO 亲本细胞相比, LOVO/L-OHP 细胞的 E-cadherin 表达下调, Vimentin

上调(图 4)。EMT 现象其重要特征就是肿瘤细胞的细胞膜 E-cadherin 上皮标记表达缺失,获得间叶细胞表型,表达 Vimentin,因而上述结果证实耐药细胞株 LOVO/L-OHP 发生了 EMT。



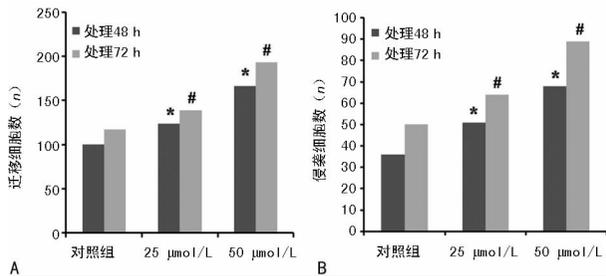
*: $P < 0.05$, 与 LOVO 比较。

图 3 大肠癌 LOVO 亲本细胞与耐药细胞株 LOVO/L-OHP 侵袭实验结果



*: $P < 0.05$, 与 LOVO E-cadherin 比较; #: $P < 0.05$, 与 LOVO Vimentin 比较。

图 4 LOVO 亲本细胞与 LOVO/L-OHP 细胞 E-cadherin 和 Vimentin 蛋白 Western blot 检测结果

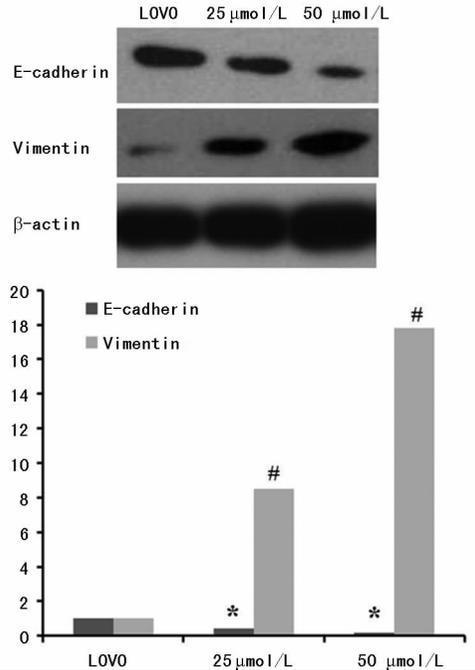


A: SB415286 处理诱导 EMT 对细胞迁移能力影响; B: SB415286 处理诱导 EMT 对细胞侵袭能力影响。*: $P < 0.05$, 与 48 h 对照组比较; #: $P < 0.05$, 与 72 h 对照组比较。

图 5 GSK-3 β 特异性抑制剂 SB415286 处理诱导 EMT 对细胞迁移、侵袭能力的影响

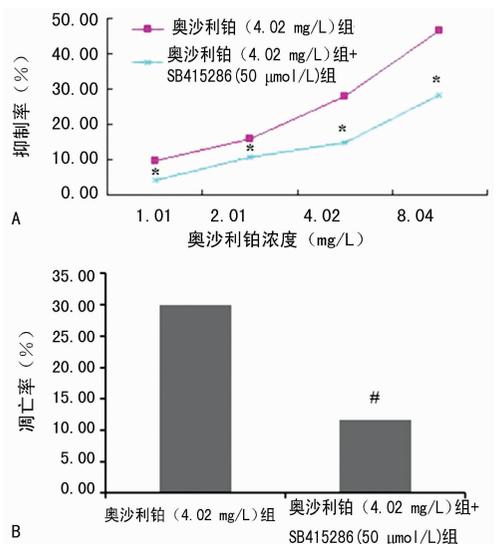
2.3 诱导 EMT 对大肠癌 LOVO 亲本细胞表型的改变 用 GSK-3 β 特异性抑制剂 SB415286 处理大肠癌 LOVO 亲本细胞

以诱导 EMT,检测各组细胞迁移、侵袭能力及 E-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达评价表型改变。结果发现 48 h 后 SB415286 处理组细胞开始迁移、侵袭能力显著高于对照组,且 50 $\mu\text{mol/L}$ 剂量 SB415286 处理组显著高于 25 $\mu\text{mol/L}$ 剂量 SB415286 处理组,呈一定的剂量依赖关系,72 h 后亦呈现相同的趋势(图 5)。用 GSK-3 β 特异性抑制剂 SB415286 (25、50 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞 48 h 后,发现 E-cadherin 蛋白显著下调,Vimentin 显著上调,亦呈一定的剂量依赖关系(图 6)。



*: $P < 0.05$, 与 LOVO E-cadherin 比较; #: $P < 0.05$, 与 LOVO Vimentin 比较。

图 6 GSK-3 β 特异性抑制剂 SB415286 处理 LOVO 亲本细胞后 E-cadherin 和 Vimentin 蛋白 Western blot 检测结果



A: 各剂量奥沙利铂处理下大肠癌细胞株抑制率; B: 奥沙利铂 (4.02 mg/L)+SB415286 (50 $\mu\text{mol/L}$)组与奥沙利铂(4.02 mg/L)组凋亡率。*: $P < 0.05$, #: $P < 0.05$, 与奥沙利铂(4.02 mg/L)组比较。

图 7 诱导 EMT 对大肠癌细胞株化疗敏感性的影响

2.4 诱导 EMT 对大肠癌细胞株化疗敏感性的影响 通过

MTT 检测发现,各剂量奥沙利铂处理下 SB415286+奥沙利铂联合用药组抑制率均低于单药组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Annexin-V/PI 双染流式细胞仪检测结果发现奥沙利铂(4.02 mg/L)+SB415286(50 μ mol/L)组凋亡率显著低于奥沙利铂(4.02 mg/L)组,见图 7。

3 讨 论

大肠癌是近二、三十年来发病数和死亡数在世界大多数国家和地区上升最快的肿瘤之一。在我国,大肠癌也是常见肿瘤之一,其中上海结直肠癌发病率已经接近西方发达国家的水平,位居恶性肿瘤发病率的第 3 位。化疗作为大肠癌治疗的重要手段,近十年来虽取得了较大进展,但疗效始终不理想,究其原因,主要在于化疗耐药性的产生。近年研究表明 EMT 参与了一些肿瘤细胞对多种化疗药物耐药性(MDR)的产生,其机制与经典的 MDR 完全不同,但目前尚缺乏 EMT 直接参与大肠癌细胞化疗耐药的直接证据。

EMT 指上皮组织丧失上皮特征而获得间叶的表型,是上皮细胞在特定的生理或病理情况下向间叶细胞转分化的现象,是胚胎发育和创伤修复等过程中的基础过程^[4]。EMT 过程首先是上皮组织基本结构消失,上皮细胞丧失细胞极性,细胞间紧密连接、锚定连接、桥粒和细胞角蛋白中间丝消失,细胞内的肌动蛋白微丝构成的细胞骨架应力纤维重新组合,并出现伪足,上皮细胞变形,迁移能力增强^[5-6]。EMT 过程是可逆的,在特定的条件下亦可发生间叶-上皮转化(MET)。

EMT 现象其重要特征就是肿瘤细胞的细胞膜 E-cadherin 等上皮标记表达缺失,获得间叶细胞表型,表达 Vimentin,细胞黏附能力减弱,迁移和侵袭能力增强^[7]。EMT 的机制主要由于上皮细胞本身或周围微环境改变,导致一系列信号传导途径激活,细胞核内相关转录因子发挥调控作用。不同程度的上皮细胞转化过程是由精确的信号转导机制调控,细胞外多种信号(Wnt、TGF、FGF-2 和 ILK 等)通过与细胞表面特异受体结合,活化不同的核内转录因子(Twist、Snail、Slug、LFE-1 和 HMGA2 等)^[8],这些转录因子的共同特征是含有能识别靶基因启动子上的 E-box 基序的 DNA 结合序列,从而调节靶基因表达,启动 EMT。

近年研究发现,上皮源性肿瘤细胞 EMT 在肿瘤细胞化疗耐药中发挥重要作用。Shah 等^[9]研究发现,吉西他滨耐药的胰腺癌细胞株出现典型的 EMT 表型改变,细胞黏附能力减弱,侵袭和迁移能力增强;细胞膜 E-cadherin、 β -catenin 表达缺失,细胞质 Vimentin 表达增强。Cheng 等^[10]报道了紫杉醇耐药的乳腺癌、Kajiyama 等^[11]也报道了紫杉醇耐药的卵巢癌等肿瘤细胞均出现了典型的 EMT 形态学改变和表型特征。而另有研究表明,过表达 Twist 和 Snail 的肿瘤细胞显示明显的化疗抵抗,敲除后可增强肿瘤细胞化疗敏感性^[12]。新近研究也发现,用 RNAi 沉默调控 EMT 信号途径关键因子 Snail 和 Twist 可增强肺癌细胞顺铂化疗敏感性^[13]。从以上研究可以看出 EMT 与多种上皮源性肿瘤化疗耐药存在密切关系,但是否为上皮源性肿瘤的特异性机制、EMT 是否同样参与其他类型肿瘤化疗耐药,以及 EMT 参与大肠癌化疗耐药的具体机制还有待深入研究。

综上所述,本研究从耐药细胞株 LOVO/L-OHP 的 EMT 发生与诱导 EMT 对大肠癌细胞表型的改变和化疗敏感性的

影响两个角度证实了 EMT 与大肠癌化疗耐药间的直接关系,获得了 EMT 参与大肠癌化疗耐药的直接证据,从而为未来干预大肠癌化疗耐药性的治疗奠定基础并提供新的研究策略。

参考文献

- [1] 徐富星. 大肠癌研究现状[J]. 国际消化病杂志, 2006(6): 365-366, 424.
- [2] Thiery JP, Acloque H, Huang RY, et al. Epithelial-Mesenchymal transitions in development and disease[J]. Cell, 2009, 139(5): 871-890.
- [3] Ahmed N, Abubaker K, Findlay J, et al. Epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes facilitate chemoresistance in recurrent ovarian cancer[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2010, 10(3): 268-278.
- [4] Hay ED. The extracellular matrix in development and regeneration. An interview with Elizabeth D[J]. Hay Int J Dev Biol, 2004, 48(8/9): 687-694.
- [5] Huber MA, Beug H, Wirth T. Epithelial-mesenchymal transition: NF-kappaB takes center stage[J]. Cell Cycle, 2004, 3(12): 1477-1480.
- [6] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(6): 442-454.
- [7] Guarino M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39(12): 2153-2160.
- [8] Gavert N, Ben-Ze'ev A. Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors[J]. Trends Mol Med, 2008, 14(5): 199-209.
- [9] Shah AN, Summy JM, Zhang J, et al. Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells[J]. Ann Surg Oncol, 2007, 14(12): 3629-3637.
- [10] Cheng GZ, Chan J, Wang Q, et al. Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel [J]. Cancer Res, 2007, 67(5): 1979-1987.
- [11] Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, et al. Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells[J]. Int J Oncol, 2007, 31(2): 277-283.
- [12] Zhuo W, Wang Y, Zhuo X, et al. Knockdown of snail, a novel Zinc finger transcription factor, via RNA interference increases A549 cell sensitivity to cisplatin via JNK/mitochondrial pathway[J]. Lung Cancer, 2008, 62(1): 8-14.
- [13] Zhuo WL, Wang Y, Zhuo XL, et al. Short interfering RNA directed against TWIST, a novel Zinc finger transcription factor, increases A549 cell sensitivity to cisplatin via MAPK/mitochondrial pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 369(4): 1098-1102.