

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.36.002

EMT 在大肠癌细胞奥沙利铂耐药中的作用及分子机制研究*

向德兵¹,董 嵩¹,全 晋¹,孙贵银^{1△},李梦侠²,王 东²

(1. 重庆市江津区中心医院肿瘤科 402260;2. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心,重庆 400042)

[摘要] 目的 探讨上皮-间叶转化(EMT)在大肠癌耐药中的作用及分子机制。方法 采用药物浓度递增的方法建立大肠癌 LOVO 细胞奥沙利铂(L-OHP)耐药细胞株 LOVO/L-OHP,免疫荧光和蛋白质印迹法(Western blot)检测 LOVO 和 LOVO/L-OHP 细胞 E-cadherin 和 Vimentin 表达;Western blot 检测核转录因子 Snail、Twist 表达;噻唑蓝(MTT)检测细胞增殖。结果 与 LOVO 细胞比较,LOVO/L-OHP 皮表型消失,细胞膜 E-cadherin 表达减弱(22.63±3.25)%(P<0.01),获得间叶细胞表型,表达 Vimentin(475.42±58.36)%(P<0.01)。LOVO/L-OHP 细胞株 Twist 表达轻度增加(116.42±18.36)%(P>0.05),Snail 表达显著增加(382.18±41.33)%(P<0.01)。siSnail 上调 E-cadherin 表达(246.82±31.57)%(P<0.01),下调 Vimentin 表达(28.75±3.96)%(P<0.01);siSnail 显著增强 LOVO/L-OHP 细胞株 L-OHP 化疗敏感性,对照组和 siSnail 组的 IC₅₀ 分别为 23.75 μg/mL 和 12.42 μg/mL。结论 EMT 在大肠癌细胞 L-OHP 耐药中可能起重要作用,抑制 EMT 可恢复耐药细胞化疗敏感性。

[关键词] 结直肠肿瘤;上皮细胞;奥沙利铂;RNA,小分子干扰;Snail

[中图分类号] R73

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)36-5045-04

The role and molecular mechanism of epithelial-mesenchymal transition in chemoresistance to oxaliplatin in colorectal cancer cells*

Xiang Debing¹, Dong Hong¹, Quan Jin¹, Sun Guiyin^{1△}, Li Mengxia², Wang Dong²

(1. Department of Oncology, Jiangjin Central Hospital, Chongqing 402260, China; 2. Cancer Center,

Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role and molecular mechanism of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in chemoresistance to oxaliplatin in colorectal cancer cells. **Methods** Oxaliplatin resistant LOVO/L-OHP cells were established by gradually increasing the concentration of oxaliplatin and intermittent treatment with high-dose concentration on parental cells (LOVO). The expression of E-cadherin and Vimentin was detected by indirect immunofluorescence and Western blot analysis. The expression of Snail and Twist was detected by Western blot analysis. cell proliferation was detected by MTT. **Results** Compared with LOVO cells, the epithelial phenotype of LOVO/L-OHP cell line was lost, and the expression of E-cadherin was decreased (22.63±3.25)%(P<0.01), an increase in the mesenchymal marker Vimentin (475.42±58.36)%(P<0.01). LOVO/L-OHP cell line Twist expression was slightly increased (116.42±18.36)%(P>0.05), Snail expression was significantly increased (382.18±41.33)%(P<0.01). The expression of siSnail increased E-cadherin (246.82±31.57)%(P<0.01). The expression of Vimentin (28.75±3.96)%(P<0.01); siSnail significantly enhanced sensitivity to oxaliplatin based chemotherapy in LOVO/L-OHP cell line, IC₅₀ control group and siSnail group were 23.75 μg/mL and 12.42 μg/mL. **Conclusion** EMT may play an important role in chemoresistance to oxaliplatin in colorectal cancer cells, inhibition of EMT can restore chemosensitivity of resistant colorectal cancer cells

[Key words] colorectal neoplasms; epithelial cells; oxaliplatin; RNA, small interfering; Snail

大肠癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,化疗是大肠癌综合治疗的主要方法之一,奥沙利铂是大肠癌的一线化疗药物,但肿瘤细胞获得性耐药是肿瘤化疗失败的主要原因,其发生机制目前仍不十分清楚。上皮-间叶转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)现象在上皮源性肿瘤细胞中普遍存在,其重要特征就是肿瘤细胞的细胞膜 E-cadherin、β-catenin 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。近年的研究显示,EMT 可能参与了肺癌、胰腺癌和乳腺癌等肿瘤细胞耐药^[1-4]。本项目建立大肠癌奥沙利铂耐药细胞株,比较耐药细胞和亲本细胞表型差异及 EMT 信号途径关键分子(E-cadherin、Vimentin、Snail、Twist 等)的表达差异,抑制 EMT 信号途径对耐药细胞化疗

敏感性的影响,以期获得 EMT 参与大肠癌耐药的证据。

1 材料与方法

1.1 材料 人大肠癌 LOVO 细胞株引自美国 ATCC。LipofectamineTM2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司。鼠抗人 β-actin 单克隆抗体、MTT 和二甲亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司,鼠抗人 E-cadherin、Vimentin、Snail 和 Twist 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,抗鼠 IgG-HRP 二抗、IgG-TRITC 二抗和化学发光试剂购自美国 Pierce 公司, RPMI 1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购自美国 Hyclone 公司。奥沙利铂(L-OHP)购自江苏恒瑞医药有限公司。

1.2 方法

1.2.1 大肠癌 L-OHP 耐药细胞株 LOVO/L-OHP 的建立

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30972874);重庆市卫生和计划生育委员会科研项目(2011-2-445,2011-2-447,2012-1-106,2012-2-381)。作者简介:向德兵(1972-),主任医师,博士,主要从事大肠癌信号转导和实验治疗研究。△ 通讯作者,E-mail:Sunriseok@126.com。

采用药物浓度递增的方法。取对数生长期 LOVO 细胞, 调整细胞密度为 1×10^5 /mL, 加入终浓度为 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 L-OHP 培养液连续作用 48 h, 弃去上清液; 加入不含 L-OHP 的培养液继续培养, 消化传代, 再用含终浓度为 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 L-OHP 培养液连续作用细胞 48 h。如此反复换液、传代, 逐步提高 L-OHP 的浓度, 当细胞在含 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 L-OHP 培养液中稳定生长时, 以含加倍浓度大剂量 L-OHP 作用 LOVO 细胞, 最终获得对 L-OHP 耐药的 LOVO 细胞, 即 LOVO/L-OHP。

1.2.2 Snail siRNA 表达质粒构建和细胞转染 Snail siRNA 和对照 siRNA 序列根据课题组以前的文献^[5], 两端分别引入 BamH I 和 HindIII 酶切位点粘端, 分别合成发卡样单链 DNA, 退火后与 siRNA 载体 pSilencer 连接。随机选取两个转化菌隔夜培养, 抽提质粒, 对插入序列进行测序。得到重组载体 pSilencer-Snail siRNA 和 pSilencer-Control siRNA, 简称 si-Snail 和 siCon。按 LipofectAmineTM 2000 操作说明转染 LOVO/L-OHP 细胞。转染 12 h 后换液, 加入含有抗生素的完全培养基 37 °C、50 mL/L CO₂ 培养 24 h 进行实验。

1.2.3 噻唑蓝(MTT)法检测细胞存活率 常规培养 LOVO/L-OHP 细胞, 以 4×10^3 /孔接种于 96 孔板培养, 24 h 后吸除原培养液, 更换新 RPMI 1640 培养液, 以 0~100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 L-OHP 处理细胞, 另设只加培养液, 不加细胞和药物的为空白组。每组 3 个复孔。将各组细胞继续培养 72 h 后, 进行 MTT 实验, 每孔加 20 μL MTT (5 g/L) 溶液, 继续培养 4 h, 终止培养, 弃上清, 每孔加入 DMSO 150 μL , 振荡 10 min, 使结晶充分溶解, 用酶标仪在 490 nm 波长处测定各孔的吸光度 (A) 值。

1.2.4 免疫荧光染色 对数期生长的 LOVO 及 LOVO/L-OHP 细胞接种于 6 孔板内盖玻片上, 每孔 1×10^5 个细胞, 培养 48 h 后免疫荧光染色检测 E-cadherin 和 Vimentin 表达。盖玻片预冷甲醇固定 10 min, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗 2 次, 0.5% Triton X-100 室温 15 min, PBS 冲洗 2 次, 然后以 30 mL/L 正常山羊血清工作液封闭 30 min, 吸掉封闭液, 加入鼠抗人一抗 (1:1000) 溶液, 4 °C 过夜。PBS 冲洗 2 次, 加入羊抗小鼠 IgG-TRITC 二抗溶液 (稀释度 1:500), 37 °C 孵育 30 min。PBS 冲洗 2 次, 加入 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNA 酶, 室温下孵育 30 min; 加入 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 核酸荧光染料 TOPRO-3 复染 5 min, PBS 冲洗 2 次。自然晾干切片, 缓冲甘油封片, 在 Leica TCS SP 激光共聚焦显微镜下观察和扫描。以 PBS 替代一抗作为阴性对照。

1.2.5 Western blot 分析 收集细胞, 常规提取细胞总蛋白。取等量蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳 (分离胶浓度为 10%, 积层胶浓度为 5%)。电泳后转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭后, 加入一抗, 4 °C 孵育过夜后室温下摇床孵育 1 h, 加入 HRP 标记的羊抗小鼠二抗, 室温下摇床孵育 1 h。以 ECL 试剂盒显色。用 Bio-Rad 公司 Quantity one 凝胶扫描分析系统扫描 X 线片, Labwork 3.0 图像分析软件进行图像分析, 测定各条带光密度值, 结果以积分光密度值 (IOD) 表示。

1.3 统计学处理 以 CalcuSyn Demo Version 2 统计软件计算 IC₅₀。以 SPSS 17.0 版专用统计分析程序对各组数据进行单因素方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大肠癌 LOVO/L-OHP 细胞形态学改变 建立了大肠癌 L-OHP 耐药细胞株 LOVO/L-OHP, 形态学观察发现其发生了 EMT, 上皮细胞特性消失, 具有间叶细胞形态学特点, 细胞极性消失, 排列松散, 出现较多伪足。见图 1。

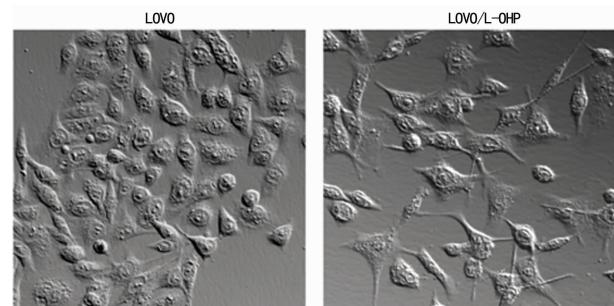


图 1 耐药细胞株 LOVO/L-OHP 细胞形态学 ($\times 400$)

2.2 大肠癌 LOVO/L-OHP 细胞 E-cadherin 和 Vimentin 表达 免疫荧光检测结果显示 LOVO/L-OHP 上皮表型消失, 细胞膜 E-cadherin 表达减弱, 获得间叶细胞表型, 表达 Vimentin, 见图 2。Western blot 结果与免疫荧光结果一致, 分别以 LOVO 细胞的 E-cadherin 和 Vimentin 表达水平为 100%, LOVO/L-OHP 细胞 E-cadherin 表达水平为 (22.63 ± 3.25)% (P<0.01), Vimentin 表达水平为 (475.42 ± 58.36)% (P<0.01), 见图 3。

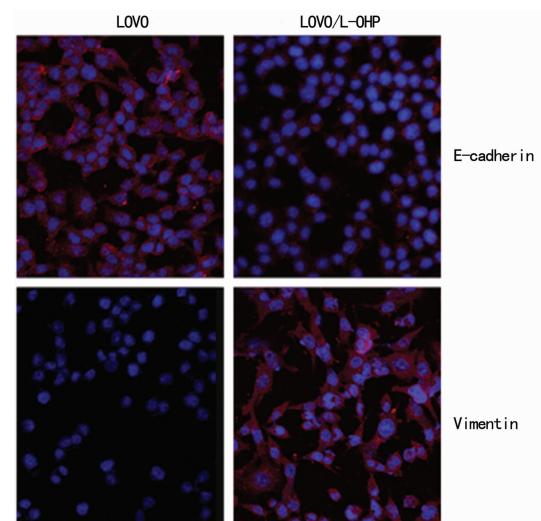


图 2 免疫荧光检测 LOVO/L-OHP 细胞 E-cadherin 和 Vimentin 表达 ($\times 200$)

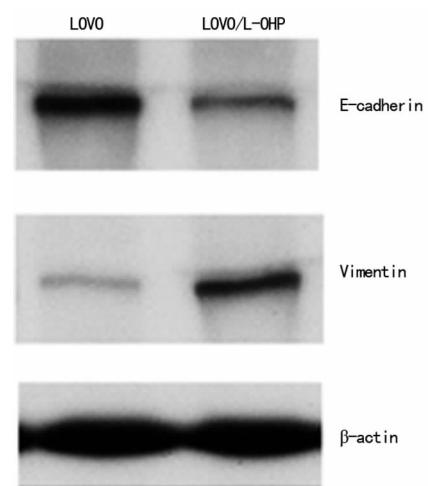


图 3 Western blot 检测 LOVO/L-OHP 细胞 E-cadherin 和 Vimentin 表达

2.3 大肠癌 LOVO/L-OHP 细胞 Snail 和 Twist 表达 分别以 LOVO 细胞的 Snail 和 Twist 表达水平为 100%, LOVO/L-

OHP 细胞 Snail 表达水平为 $(382.18 \pm 41.33)\%$ ($P < 0.01$), Twist 表达水平为 $(116.42 \pm 18.36)\%$ ($P > 0.05$)。见图 4。

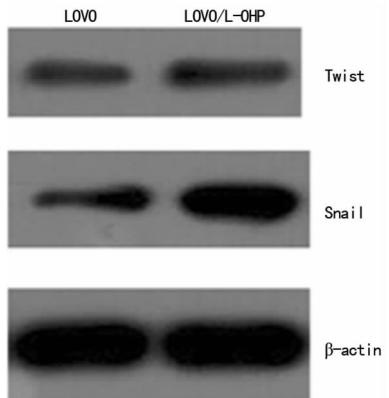


图 4 Western blot 检测 LOVO/L-OHP 细胞 Snail 和 Twist 表达

2.4 siSnail 对 LOVO/L-OHP 细胞 E-cadherin 和 Vimentin 表达的影响 siSnail 和对照 siCon 转染 LOVO/L-OHP 细胞 48 h 后, Western blot 检测 LOVO/L-OHP 细胞 E-cadherin 和 Vimentin 表达, 分别以对照组 siCon 的 E-cadherin 和 Vimentin 表达水平为 100%, siSnail 组 E-cadherin 表达水平为 $(246.82 \pm 31.57)\%$ ($P < 0.01$), Vimentin 表达水平为 $(28.75 \pm 3.96)\%$ ($P < 0.01$)。见图 5。

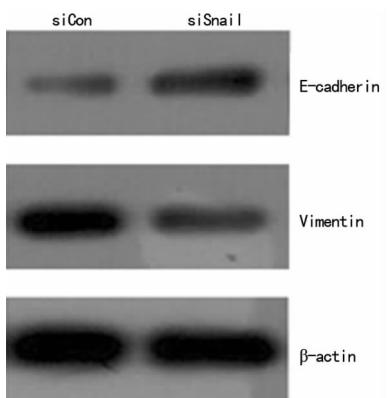


图 5 Western blot 检测 LOVO/L-OHP 细胞转染 siSnail 后 E-cadherin 和 Vimentin 表达

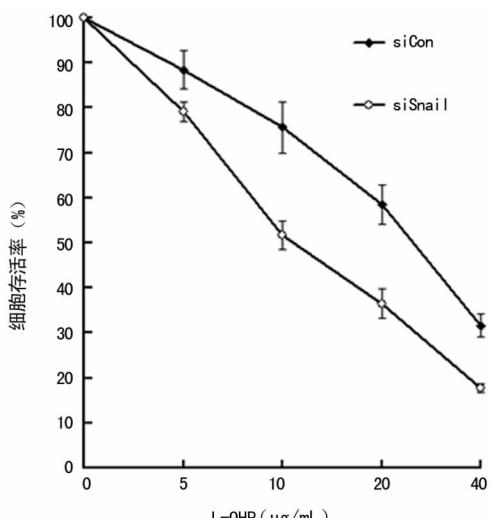


图 6 不同剂量 L-OHP 处理后 LOVO/L-OHP 细胞存活曲线

2.5 siSnail 体外增强 LOVO/L-OHP 细胞 L-OHP 化疗敏感性 L-OHP 作用 72 h 后 LOVO/L-OHP 细胞的存活曲线图可见, 随着 L-OHP 浓度的增加, LOVO/L-OHP 细胞存活率逐渐下降, 与对照组 siCon 比较, siSnail 组下降更明显, L-OHP 每个剂量点均差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。siCon 和 siSnail 组的 IC_{50} 分别为 $23.75 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $12.42 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。见图 6。

3 讨 论

EMT 是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。大量的研究发现 EMT 在肿瘤细胞的侵袭和转移中起关键作用^[6]。新近研究发现 EMT 在肿瘤化疗耐药中可能起更重要的作用^[7]。顺铂和培美曲塞耐药的肺癌细胞、氟尿嘧啶耐药的乳腺癌细胞、吉西他滨耐药的胰腺癌细胞等均出现了典型的 EMT 形态学改变和表型特征^[1-4], 且抑制 EMT 可恢复耐药细胞化疗敏感性^[4]。因此上皮源性肿瘤细胞发生 EMT 在化疗药物耐药中可能发挥重要作用, 进一步探讨 EMT 在大肠癌细胞 L-OHP 耐药中的作用及分子机制具有重要的意义。

本研究建立了大肠癌 L-OHP 耐药细胞株 LOVO/L-OHP, 形态学观察发现 LOVO/L-OHP 细胞的上皮细胞特性消失, 具有间叶细胞形态学特点, 出现较多伪足。免疫荧光及 Western blot 检测结果显示 LOVO/L-OHP 细胞 E-cadherin 表达减弱, 获得间叶细胞表型, 表达 Vimentin。因此大肠癌 L-OHP 耐药细胞出现了典型的 EMT 表型特征。Li 等^[8]研究发现阿霉素耐药的大肠癌细胞也发生了 EMT, 其机制与阿霉素上调 TGF-β 信号有关; Todem 等^[9]在氟尿嘧啶耐药的大肠癌细胞也观察 EMT 现象, 且抑制 EMT 可恢复耐药细胞化疗敏感性。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细胞内信号转导机制调控, 细胞外多种信号通过与细胞表面特异受体结合, 活化不同的核内转录因子, 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。Snail 已被证明与上皮性肿瘤进展过程中触发 EMT 有关, 是 EMT 发的关键点。Snail 的表达与 E-cadherin 的减少或缺失相关, 而且充当 E-cadherin 转录的直接抑制子^[10]。Twist 是另一个调控 EMT 的重要转录因子, 其诱导 EMT 的机制即通过 E-box 基序直接或间接结合 E-cadherin 启动子, 从而抑制 E-cadherin 表达^[11]。本研究发现, 与亲代大肠癌 LOVO 细胞比较, LOVO/L-OHP 细胞 Snail 表达显著增强 ($P < 0.01$), Twist 表达轻微升高 ($P > 0.05$)。进一步构建 siSnail 表达质粒, 转染 LOVO/L-OHP 细胞后可逆转 EMT, E-cadherin 表达上调 ($P < 0.01$), Vimentin 表达下调 ($P < 0.01$), 且 siSnail 可显著增强 LOVO/L-OHP 细胞 L-OHP 化疗敏感性。因此, 研究结果显示大肠癌 L-OHP 耐药及 EMT 可能主要是通过 Snail 转录因子发挥作用。

综上所述, 本研究证实大肠癌 L-OHP 耐药细胞发生 EMT, 上皮表型消失, 获得间叶细胞表型, 其机制可能与 L-OHP 诱导 Snail 表达升高有关。本研究为深入探索大肠癌细胞 L-OHP 耐药的分子机制及逆转策略提供了实验数据。

参考文献

- [1] Liang SQ, Marti TM, Dorn P, et al. Blocking the epithelial-to-mesenchymal transition pathway abrogates resistance to anti-folate chemotherapy in lung cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(5): e1824.
- [2] Wang H, Zhang G, Zhang H, et al. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype and cancer stem cell-like properties in cisplatin-resistant lung cancer cells through AKT/β-catenin/Snail signaling pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 723(2): 156-166.
- [3] Zhang WJ, Feng ML, Zheng GP, et al. Chemoresistance to 5-fluorouracil induces epithelial-mesenchymal transition via up-regulation of Snail in MCF7 human breast cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417(2): 679-685.
- [4] Namba T, Kodama R, Moritomo S, et al. Zidovudine, an anti-viral drug, resensitizes gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells to gemcitabine by inhibition of the Akt-GSK3 beta-Snail pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(3): e1795.
- [5] 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.
- [6] Torzilli PA, Bourne JW, Cigler TA. A new paradigm for mechanobiological mechanisms in tumor metastasis[J]. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22(5/6): 385-395.
- [7] Fischer KR, Durrans A, Lee S, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance[J]. *Nature*, 2015, 527(7579): 472-476.
- [8] Li JP, Liu H, Yu JP, et al. Chemoresistance to doxorubicin induces epithelial-mesenchymal transition via upregulation of transforming growth factor signaling in HCT116 colon cancer cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(1): 192-198.
- [9] Toden S, Okugawa Y, Jascur T, et al. Curcumin mediates chemosensitization to 5-fluorouracil through miRNA-induced suppression of epithelial-to-mesenchymal transition in chemoresistant colorectal cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2015, 36(3): 355-367.
- [10] Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, et al. Correlation of snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas[J]. *Oncogene*, 2002, 21(20): 3241-3246.
- [11] Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis[J]. *Cell*, 2004, 117(7): 927-939.

(收稿日期:2016-07-18 修回日期:2016-09-16)

(上接第 5044 页)

- potential by inhibiting the transcription factor Twist in vivo and in vitro [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014, 140(7): 1125-1136.
- [5] Debottin N, Parnes M, Kadouche J, et al. Overcoming the formulation obstacles towards targeted chemotherapy: in vitro and in vivo evaluation of cytotoxic drug loaded immunonanoparticles [J]. *J Control Release*, 2008, 127(3): 219-230.
- [6] Inoue K, Torimura T, Nakamura T, et al. Vandetanib, an inhibitor of VEGF receptor-2 and EGF receptor, suppresses tumor development and improves prognosis of liver cancer in mice [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(14): 3924-3933.
- [7] Jayasinghe C, Simiantonaki N, Habedank S, et al. The relevance of cell type- and tumor zone-specific VEGFR-2 activation in locally advanced colon cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34(1): 42.
- [8] 殷香保, 邬林泉, 黄跃英, 等. 三氧化二砷聚乙二醇-聚乳酸偶联人源抗血管内皮细胞生长因子受体 2 隐形纳米粒的抗肝癌机制探讨[J]. 中国全科医学, 2015, 18(23): 2805-2809.
- [9] 殷香保, 邬林泉, 黄长文, 等. 阿霉素纳米-VEGFR2 单抗交联物的抗肝癌作用[J]. 广东医学, 2014, 35(19): 2972-2975.
- [10] Wang YX, De Baere T, Idee JM, et al. Transcatheter embolization therapy in liver cancer: an update of clinical evidences [J]. *Chin J Cancer Res*, 2015, 27(2): 96-121.
- [11] 赵刚, 苏庆, 李静, 等. 聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物及其微粒给药系统的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(1): 36-40.
- [12] 张乐, 周世文. 三氧化二砷 PLGA 纳米粒的制备及工艺优化[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(11): 1249-1251.
- [13] Moyle CW, Cerezo AB, Winterbone MS, et al. Potent inhibition of VEGFR-2 activation by tight binding of green tea epigallocatechin gallate and apple procyanidins to VEGF: relevance to angiogenesis [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2015, 59(3): 401-412.
- [14] Iacovelli R, Sternberg CN, Porta C, et al. Inhibition of the VEGF/VEGFR pathway improves survival in advanced kidney cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Curr Drug Targets*, 2015, 16(2): 164-170.
- [15] 戴丽娟, 鄢成伟, 李淑珍, 等. 抗 VEGFR2/抗 CD3 双特异单链抗体的表达及初步活性检测[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(8): 883-886.
- [16] 马满玲, 郭美华, 杨丽杰, 等. 三氧化二砷新剂型的研究进展[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(7): 489-492.

(收稿日期:2016-07-09 修回日期:2016-09-20)