

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.13.008
网络首发 http://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.r.20190603.0910.010.html(2019-06-04)

上皮间质转化与卵巢癌细胞顺铂耐药的相关研究*

张为家¹, 苏小岩¹, 李 爽¹, 曾 海^{1,2△}

(1. 长江大学附属第一医院肿瘤科, 湖北荆州 434000; 2. 武汉大学中南医院肿瘤放疗科, 武汉 430071)

[摘要] **目的** 研究人卵巢癌细胞顺铂耐药与上皮间质转化(EMT)的关系。**方法** 以顺铂低剂量诱导结合间歇大剂量冲击的方法建立卵巢癌顺铂耐药细胞株 A2780/DDP、OVCAR3/DDP。观察亲本细胞(A2780、OVCAR3)与耐药细胞(A2780/DDP、OVCAR3/DDP)形态;采用 Transwell 细胞迁移实验及细胞侵袭实验检查各细胞迁移、侵袭能力,Western blot 检测 EMT 标记物 E-cadherin、Vimentin 的表达,免疫荧光检测 E-cadherin 的亚细胞定位。以 5 ng/mL TGF-β 体外诱导卵巢癌细胞 A2780 发生 EMT 改变,MTS 检测其对顺铂化疗敏感性的影响。**结果** A2780/DDP、OVCAR3/DDP 较 A2780、OVCAR3 的 IC₅₀ 分别提高了 9.58、13.19 倍。A2780/DDP、OVCAR3/DDP 呈间充质细胞特点,获得侵袭、迁移能力,且上皮分子标志物 E-cadherin 表达下调,间充质分子标志物 Vimentin 表达上调。TGF-β 体外诱导卵巢癌细胞发生 EMT 改变后对顺铂敏感性明显降低。**结论** EMT 与卵巢癌细胞顺铂耐药密切相关。

[关键词] 卵巢肿瘤;顺铂;药物耐受性;上皮-间质转化

[中图法分类号] R737.31 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)13-2192-05

Study on correlation between epithelial-mesenchymal transition and cisplatin resistance in ovarian cancer cells*

ZHANG Weijia¹, SU Xiaoyan¹, LI Shuang¹, ZENG Hai^{1,2△}

(1. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434000, China; 2. Department of Radiochemotherapy and Medical Oncology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China)

[Abstract] **Objective** To study the relationship between cisplatin resistance and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human ovarian cancer cells. **Methods** The cisplatin resistant cell lines A2780/DDP and OVCAR3/DDP of ovarian cancer were established by low dose induction combined with interval large dose of cisplatin. The morphology of parent cells(A2780, OVCAR3) and drug-resistant cells (A2780/DDP, OVCAR3/DDP) were observed. The migration and invasion abilities of above cells were detected by Transwell cell migration test and cell invasion experiment. The expressions of EMT markers E-cadherin and Vimentin were detected by Western blot. And the subcellular localization of E-cadherin was detected by immunofluorescence. The EMT change in ovarian cancer cells A2780 occurred by 5 ng/mL TGF-β in vitro induction. Its influence on the sensitivity of cisplatin chemotherapy was detected by MTS. **Results** The IC₅₀ of A2780/DDP and OVCAR3/DDP increased by 9.58 times and 13.19 times of their parent cell lines A2780 and OVCAR3. Both A2780/DDP and OVCAR3/DDP cells were characterized by mesenchymal cell morphology, and acquired the ability of invasion and migration, moreover the expression of epithelial marker protein E-cadherin was down-regulated and that of mesenchymal marker protein Vimentin was up-regulated. In addition, the sensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin after TGF-β inducing EMT change in vitro was significantly reduced. **Conclusion** EMT is closely correlated with the cisplatin resistance in ovarian cancer cells.

[Key words] ovarian neoplasms; cisplatin; drug tolerance; epithelial-mesenchymal transition

卵巢癌发病率居女性生殖系统恶性肿瘤第三位，病死率高居第一位，全球每年因卵巢癌死亡的患者约 14 万^[1]。卵巢癌起病隐匿、早期症状不典型，使得多数卵巢癌患者确诊时已为晚期，手术难以彻底清除肿

* 基金项目:长江大学博士科研启动基金项目(WJ2016MB212)。 作者简介:张为家(1983—),主治医师,博士,主要从事肿瘤耐药及临床肿瘤放疗研究。 △ 通信作者, E-mail: zenghai0716@163.com。

瘤病灶。以铂类药物为基础的联合化疗是晚期卵巢癌的一线治疗方式,然而多数患者在化疗过程中产生耐药,导致肿瘤复发转移,这是卵巢癌治疗失败的重要原因之一^[2-3]。因此,探索卵巢癌顺铂耐药的分子机制成为卵巢癌研究的难点与热点。

上皮间质转化(EMT)是指上皮细胞在内外因素刺激下转化为具有间充质表型的生物学过程。最新研究表明,EMT 与肿瘤转移、肿瘤干细胞形成及肿瘤耐药等多种恶性生物学行为密切相关^[4-5]。目前,关于卵巢癌顺铂耐药与 EMT 之间的关系研究较少。本研究建立卵巢癌顺铂耐药细胞株,比较耐药细胞和亲本细胞表型差异;另外体外诱导卵巢癌细胞发生 EMT,观察对顺铂化疗敏感性的影响,以期探讨 EMT 与卵巢癌细胞顺铂化疗耐药间的关系,为阐明卵巢癌顺铂耐药提供新的研究思路。

1 材料与方法

1.1 细胞及试剂 人卵巢癌细胞株 A2780、OVCAR3 购自中国科学院上海细胞生物所;新型甲胺化合物(MTS)、顺铂及转化生长因子 β (TGF- β)购自美国 Sigma 公司;RPMI 1640 培养基和胎牛血清购自广州英韦创津公司;Transwell 小室购自美国 Millipore 公司;鼠抗人 E-cadherin、vimentin、免疫荧光标记二抗和羊抗鼠 IgG-HRP 二抗购自美国 Cell Signaling 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及顺铂耐药细胞株的建立 A2780、OVCAR3 细胞用含 10% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素的 RPMI1640 培养基于 37 °C 5% CO₂ 的培养箱中培养。通过顺铂间歇诱导和大剂量冲击相结合的方法建立顺铂耐药的人卵巢癌细胞株 A2780/DDP、OVCAR3/DDP^[6]。耐药细胞培养液中加入终浓度为 5 μ mol/L 顺铂维持耐药表型,撤药培养 1 周后进行实验。

1.2.2 MTS 实验 将处于对数生长期的细胞按每孔 3 000 个接种到 96 孔板,待培养细胞贴壁后加入浓度为 0.1、1.0、10.0、20.0、40.0、80.0 及 100.0 μ mol/L 的顺铂。培养 72 h 后加入 MTS (5 g/L) 每孔 20 μ L,孵育 2 h,于酶标仪上测定波长 490 nm 吸光度值(A_{490})。每孔重复 3 次。由 A 值计算出各药物浓度处理组的生存率,依据药物浓度与其生存率绘制量效曲线图。

1.2.3 Transwell 细胞迁移实验 在 Transwell 的聚偏氟乙烯(PVDF)膜的外表面涂一层 fibronectin (10 μ g/mL,50 μ L),37 °C 孵育 2 h 后放入每孔加有 600 μ L 培养基的 24 孔板内,在 Transwell 的内室加入细胞浓度为 2×10^5 个/mL 细胞悬液 200 μ L,于

37 °C 培养箱孵育 48 h,取出 Transwell 小室,用棉签擦去内室面未迁移细胞,4.0% 甲醛固定,0.1% 结晶紫染色后在显微镜下挑取 10 个高倍视野计数,重复 3 次。

1.2.4 Transwell 细胞侵袭实验 将基质胶铺于小室底部,小室下层加入含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液 500 μ L,上层加入无血清的 RPMI 1640 培养液 100 μ L。制备细胞悬液,上室加入细胞浓度为 2×10^5 个/mL 细胞悬液 200 μ L,培养 48 h,染色和计数方法同迁移实验。

1.2.5 Western blot 检测 取生长状态良好的细胞,用预冷的 PBS 漂洗 3 次,加入含 cocktail 蛋白酶抑制剂的 RAPI 蛋白裂解液冰上裂解 30 min;吸取裂解混合液离心取上清液即为细胞总蛋白。测定总蛋白浓度后按每孔 50 μ g 进行 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳分离蛋白,电转移至 PVDF 膜后以 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h;加入稀释后的一抗 4 °C 孵育过夜,PBST 洗涤后加 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h,ECL 底物显色。

1.2.6 免疫荧光检测 制备细胞爬片,以 4.0% 冷的多聚甲醛室温固定 30 min,0.1% 曲拉通透化 2~5 min,2.0% BSA 室温封闭 60 min。加入稀释的 E-cadherin 单克隆抗体 4 °C 孵育过夜,加入稀释的荧光标记二抗于 37 °C 孵育 1 h。5 μ g/mL DAPI 染色 2 min,抗淬灭封片剂封片,于荧光显微镜下观察,拍照。

1.2.7 TGF- β 体外诱导 用 5 ng/mL TGF- β 体外诱导卵巢癌细胞 A2780 发生 48 h 后 EMT 改变,检测细胞迁移、侵袭能力及 EMT 标记物表达以验证 EMT 表型。

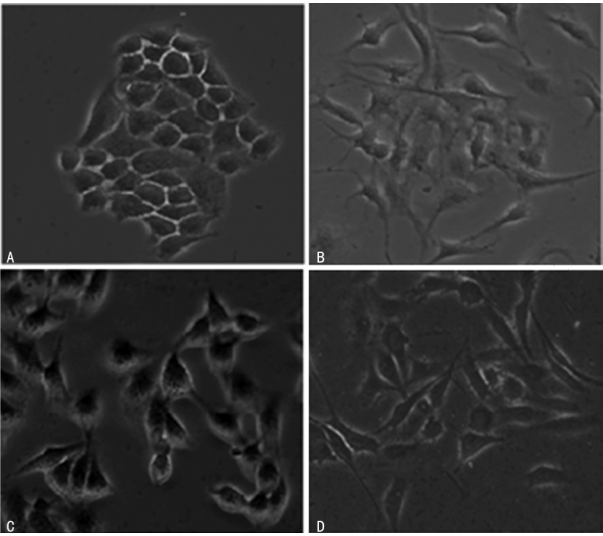
1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组独立样本比较采用 t 检验,多组间比较采用 One-Way ANOVA 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢癌细胞顺铂耐药的鉴定 MTS 结果显示,A2780/DDP 的 IC₅₀ 值为 (71.86 ± 6.52) μ mol/L,A2780 的 IC₅₀ 值 (7.50 ± 0.98) μ mol/L,IC₅₀ 值升高 9.58 倍($\chi^2 = 15.495, P < 0.01$);OVCAR3/DDP、OVCAR3 的 IC₅₀ 值分别为 (61.75 ± 7.28) 、 (4.68 ± 1.18) μ mol/L,IC₅₀ 值升高 13.19 倍($\chi^2 = 19.318, P < 0.01$)。

2.2 卵巢癌细胞顺铂耐药形态学观察及迁移、侵袭能力检测 A2780/DDP、OVCAR3/DDP 发生了形态学改变,具有间充质细胞形态学特点,细胞变得狭长、呈纺锤形、伸出伪足、细胞之间疏散,见图 1。Tran-

swell 细胞迁移、侵袭实验结果显示 A2780/DDP、OVCAR3/DDP 细胞迁移及侵袭能力均明显高于亲本细胞 A2780、OVCAR3,见图 2。



A: A2780; B: A2780/DDP; C: OVCAR3; D: OVCAR3/DDP
图 1 卵巢癌亲本细胞及耐药细胞形态学差异(×200)

2.3 卵巢癌亲本细胞与顺铂耐药细胞 EMT 标记物 E-cadherin、Vimentin 表达 A2780/DDP、OVCAR3/DDP 中上皮分子标志物 E-cadherin 表达缺失,而间充质分子标志物 Vimentin 表达明显上调,见图 3。亲本细胞 A2780、OVCAR3 中 E-cadherin 位于细胞膜,表

达量高;耐药细胞 A2780/DDP、OVCAR3/DDP 细胞膜上未见 E-cadherin 的表达,见图 4。

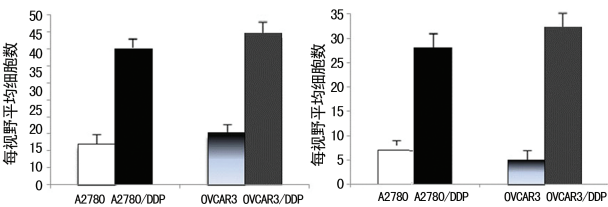


图 2 卵巢癌亲本细胞及耐药细胞迁移和侵袭能力比较

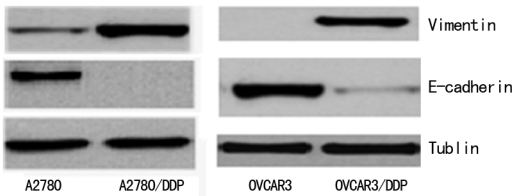


图 3 卵巢癌亲本细胞及耐药细胞中 E-cadherin 和 Vimentin 表达

2.4 TGF-β 体外诱导对卵巢癌细胞的影响 TGF-β 处理的 A2780 细胞迁移、侵袭能力明显高于对照组,且 E-cadherin 蛋白表达下调、Vimentin 蛋白表达上调。MTS 结果显示,TGF-β 体外诱导卵巢癌细胞 A2780 发生 EMT 改变后,细胞的 IC₅₀ 值由 (7.50 ± 0.68) μmol/L 上升为 (37.56 ± 3.28) μmol/L,差异有统计学意义(χ² = 7.956, P < 0.01),见图 5。

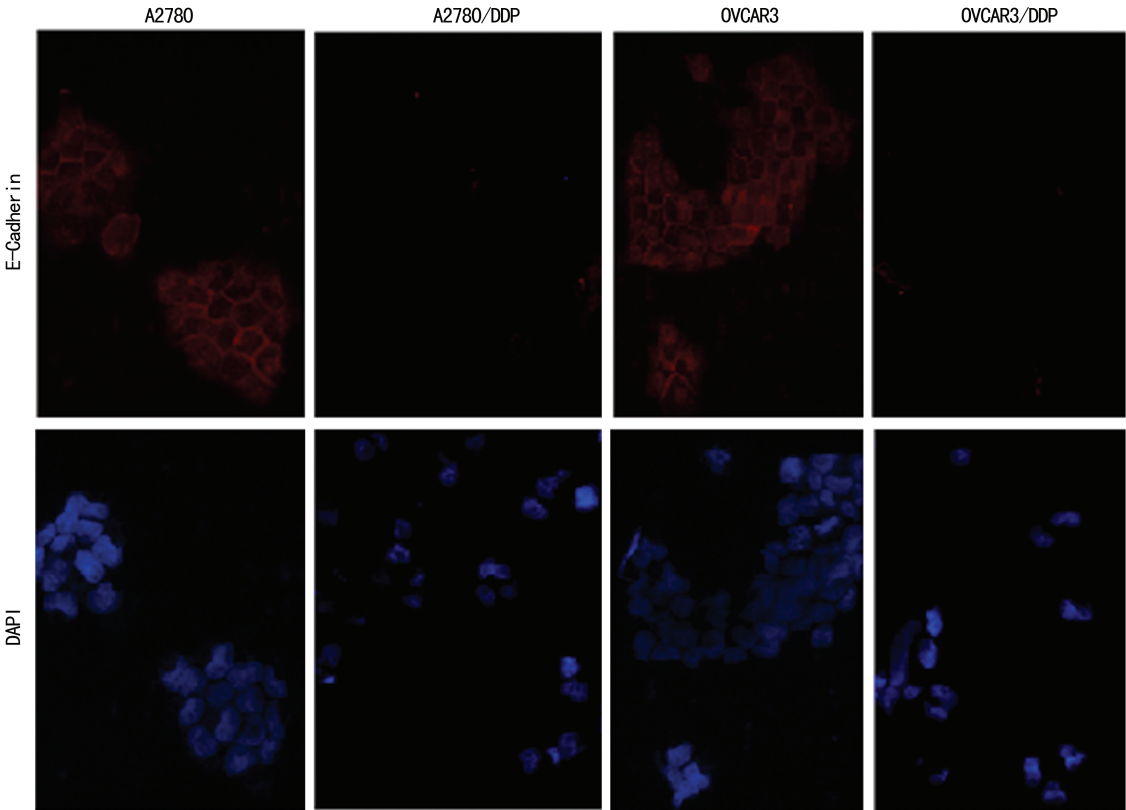


图 4 卵巢癌亲本细胞及顺铂耐药细胞中 E-cadherin 的表达及定位(×400)

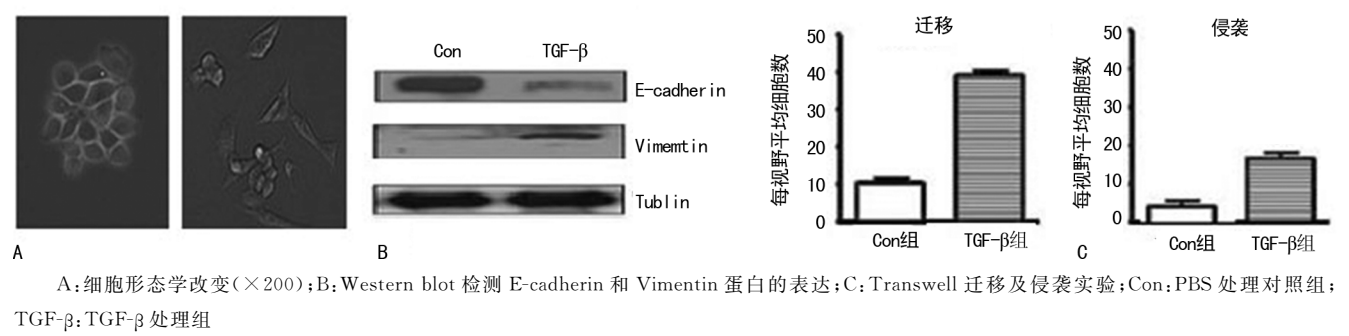


图 5 TGF-β 体外诱导对卵巢癌细胞的影响

3 讨 论

铂类为主的联合化疗治疗卵巢癌患者的首次有效率为 70%~80%，但 80% 以上患者 2~3 年后对铂类产生继发性耐药^[7]。耐药细胞具有更强的侵袭转移特性，晚期卵巢癌患者常死于铂类耐药后的广泛转移，使其 5 年生存率仅为 46% 左右^[8]。寻找卵巢癌铂类化疗耐药的机制一直是肿瘤学界研究的热点。越来越多的证据表明，EMT 是将肿瘤转移与耐药联系起来的关键因素，而抑制肿瘤细胞 EMT 或可同时抑制肿瘤细胞的耐药与侵袭能力^[9-11]。但目前尚缺乏 EMT 参与卵巢癌铂类耐药的研究证据。

EMT 是指在特定生理病理条件下，上皮细胞失去极性，转化成间质细胞，并获得侵袭和迁移能力的过程^[12]。研究发现，EMT 与多种恶性肿瘤如乳腺癌、卵巢癌、结肠癌和食管癌等的发生、发展密切相关，EMT 成为近年来抗肿瘤研究领域的热点之一^[13-14]。E-cadherin 的表达减少是 EMT 发生的重要标志，可导致肿瘤细胞间黏附能力降低，迁移活动能力增强，在肿瘤侵袭转移中发挥重要作用^[15]。Vimentin 是间质细胞的重要标记物之一，可使细胞黏着斑的空间结构发生改变，增加肿瘤细胞的黏附与迁移能力^[16]。本研究显示，A2780/DDP、OVCAR3/DDP 细胞形态发生生长梭形改变；进一步检测发现 E-cadherin 的表达明显下调，而 Vimentin 的表达明显上调；Transwell 细胞迁移、侵袭实验进一步证实了耐药细胞的侵袭能力明显增加。上述研究结果符合 EMT 过程中的分子生物学特征。为进一步明确 EMT 与卵巢癌细胞顺铂耐药的关系，本实验从反方面以 TGF-β 诱导处理卵巢癌细胞发生 EMT 后，检测出对顺铂的生长抑制作用明显降低。以上研究结果高度提示 EMT 可能为卵巢癌顺铂耐药监测及逆转顺铂耐药的潜在靶点。

目前有研究发现，顺铂耐药的非小细胞肺癌获得典型的 EMT 表型，细胞膜蛋白 E-cadherin 表达缺失、Vimentin 的表达增加，细胞侵袭转移能力增加^[17]。有报道顺铂耐药的胃癌细胞通过 CIP2A/PP2A/AKT 信号轴发生 EMT 改变，另外报道顺铂耐药的头

颈部肿瘤细胞获得典型的 EMT 特征，CD44 分子通过 microRNA-200c/ZEB-1 参与其调节^[18-19]。以上研究提示 EMT 与多种上皮源性肿瘤细胞对顺铂化疗耐药密切相关，EMT 能否成为临床铂类耐药的有效预测分子，有待更多其他类型肿瘤及临床组织病理学验证。多种信号转导通路参与 EMT 的发生，与 TGF-β、Wnt/β-catenin、zeb-1/Snail/Slug/Twist 转录因子，MiRNA 及 LncRNA 调控机制、微环境等因素有关^[20-21]。本研究中卵巢癌细胞顺铂耐药发生 EMT 的信号调控机制尚有待进一步深入研究。

综上所述，本研究从卵巢癌顺铂耐药细胞株发生 EMT 改变与诱导卵巢癌细胞发生 EMT 对化疗敏感性降低两个角度证实了 EMT 与卵巢癌顺铂耐药密切相关，为未来监测卵巢癌顺铂耐药、逆转耐药的治疗提供新的研究策略。

参考文献

[1] JAYSON G C,KOHN E C,KITCHENER H C,et al. Ovarian cancer[J]. Lancet,2014,384(9951):1376-1388.

[2] ÁYEN Á,JIMÉNEZ MARTÍNEZ Y,MARCHAL J A,et al. Recent progress in gene therapy for ovarian cancer[J]. Int J Mol Sci,2018,19(7):1930.

[3] 冯敏,邢人鑫,邢薇,等. Gab2 在卵巢癌中的表达及其与铂类药物化疗耐药的相关性研究[J]. 重庆医学,2017,46(21):2931-2933.

[4] NANTAJIT D,LIN D,LI J J. The network of epithelial-mesenchymal transition: potential new targets for tumor resistance[J]. J Cancer Res Clin Oncol,2015,141(10):1697-1713.

[5] SATO R,SEMBA T,SAYA H,et al. Concise review: stem cells and Epithelial-Mesenchymal transition in cancer: biological implications and therapeutic targets [J]. Stem Cells,2016,34(8):1997-2007.

[6] AI Z,LU Y,QU S,et al. Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeting HIF-1-regulated cancer metabolism[J]. Cancer Lett,2016,373(1):36-44.

[7] ORONSKY B,RAY C M,SPIRA A I,et al. A brief review of the management of platinum-resistant-platinum-