

Tim-3对宫颈癌细胞侵袭迁移的影响及机制研究

余师师 张秉强* 张炳兰*

(重庆医科大学附属第一医院消化内科, 重庆 400016)

摘要 该文主要研究慢病毒介导的T细胞免疫球蛋白黏液素3(T-cell immunoglobulin mucin-3, Tim-3)对宫颈癌细胞的促肿瘤作用及其相关作用机制。首先, 采用PCR方法获取Tim-3片段, 将其克隆入pCDH载体中, 并通过酶切和测序进行鉴定; 将三个表达载体, 即重组阳性表达载体(pCDH-Tim-3)、空载体(pCDH-NC)和绿色荧光蛋白载体(pCDH-GFP), 分别与psPAX2和pMD2.G共转染至293T细胞中, 最后形成相应的慢病毒组。然后, 将三组慢病毒分别感染HeLa细胞, 获得稳定细胞株(HeLa-Tim-3、HeLa-NC、HeLa-GFP), 其中设置HeLa-NC为空载病毒阴性对照组; 最后, 通过观察HeLa-GFP组, 初步获取慢病毒感染效率; 运用流式细胞术、Western blot和细胞免疫荧光检测Tim-3的相对表达水平; 细胞划痕和Transwell检测细胞的迁移及侵袭能力; Western blot检测上皮间质转化(epithelial-to-mesenchymal, EMT)相关蛋白(E-cadherin、N-cadherin、Snail)的表达变化; 流式细胞术检测细胞凋亡率变化。该文成功构建了pCDH-Tim-3慢病毒表达载体并将其包装成慢病毒, 获得对应的稳定细胞株; 在HeLa-GFP中可以观察到大量的绿色荧光; 与HeLa-NC组相比, Western blot、流式细胞术和细胞免疫荧光检测结果均表明, HeLa-Tim-3组的Tim-3蛋白表达水平显著升高($P<0.05$); 细胞划痕实验和Transwell检测结果均表明, HeLa-Tim-3组的迁移侵袭能力明显提高($P<0.01$); 另外, Western blot检测结果表明, 与HeLa-NC组相比, HeLa-Tim-3组N-cadherin和Snail显著增多但E-cadherin明显减少($P<0.05$), 而流式细胞术检测结果表明, HeLa-Tim-3组凋亡率显著减少($P<0.001$)。因此, 高表达Tim-3宫颈癌细胞可以通过EMT转化和抑制细胞凋亡等相关作用机制来加强肿瘤的恶性进展。

关键词 Tim-3; 宫颈癌细胞; 侵袭迁移; EMT; 凋亡; 慢病毒

Effects of Tim-3 on Invasion and Migration of Cervical Cancer Cells and Its Mechanism

YU Shishi, ZHANG Bingqiang*, ZHANG Binglan*

(Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The aim of this study was to investigate effects of Tim-3 (T-cell immunoglobulin mucin-3) mediated by lentivirus on cervical cancer cells and its related mechanism. Tim-3 fragments were amplified by PCR and cloned into a pCDH vector for enzyme digestion and sequencing. Firstly, the recombinant positive expression vectors pCDH-Tim-3/pCDH-NC/pCDH-GFP, psPAX2, and pMD2.G were co-transfected into 293T cells, forming three types of lentivirus groups. Next, three groups of lentiviruses were respectively infected with HeLa cells to obtain stable cell lines (HeLa-Tim-3, HeLa-NC, HeLa-GFP). HeLa-NC was set as the control group. Finally, the efficiency of infecting lentivirus was

收稿日期: 2019-11-17 接受日期: 2020-02-20

国家青年科学基金(批准号: 81703057/H1611)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-89012020, E-mail: binglanzhang@163.com; zhbingqiang@163.com

Received: November 17, 2019 Accepted: February 20, 2020

This work was supported by the National Science Foundation for Young Scientists of China (Grant No.81703057/H1611)

*Corresponding authors. Tel: +86-23-89012020, E-mail: binglanzhang@163.com; zhbingqiang@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5215>

observed in HeLa-GFP group preliminarily. The relative expression levels of Tim-3 were detected by flow cytometry, Western blot, and cellular immunofluorescence. Abilities including migration and invasion were detected by cell scratch and Transwell. Expression of EMT (epithelial-to-mesenchymal) related to proteins (E-cadherin, N-cadherin, Snail) was detected by Western blot. The apoptosis rate was detected by flow cytometry assay. We successfully constructed a lentivirus plasmid containing Tim-3 and then packaged it as lentivirus particles. The stable cell lines of HeLa-Tim-3, HeLa-NC, and HeLa-GFP were obtained, separately. Comparing with HeLa-NC group, the expression of Tim-3 in HeLa cells was increased after infection in the HeLa-Tim-3 group ($P<0.05$). The ability of invasion and metastasis were significantly enhanced in HeLa cells with high expression of Tim-3 ($P<0.01$). The observed effect was associated with downregulation of E-cadherin and upregulation of N-cadherin and snail ($P<0.05$). Meanwhile, the apoptosis rate was also markedly inhibited ($P<0.001$). Our findings suggest that the expression of Tim-3 in cervical cancer may facilitate the tumor invasion and metastasis by promoting EMT transformation and inhibiting apoptosis.

Keywords Tim-3; cervical cancer cell; invasion and migration; EMT; apoptosis; lentivirus

宫颈癌是造成全球新增女性死亡的第四大原因, 每年有超过50万的宫颈癌患者被确诊^[1]。人乳头状瘤病毒(human papillomaviruses, HPV)的感染被认为是造成宫颈癌的主要因素之一, 它可通过局部侵袭和转移促进宫颈癌的发生发展, 其中, 高危型HPV 16和HPV 18的致癌效果尤为显著。近年来, 虽然宫颈癌的诊断技术和治疗策略有所提高, 但其具有广泛的侵袭和转移特性导致患者的致死率仍居高不下, 并且具有上皮间质表型(epithelial-to-mesenchymal, EMT)的宫颈癌更易发生侵袭和迁移, 进一步加重肿瘤的恶性发展^[2]。由于分子靶向诊治在许多实体肿瘤中具有很好的应用效果, 因此如何寻找诊治宫颈癌的潜在分子靶点已引起了学者们的广泛关注^[3]。T细胞免疫球蛋白黏液素3(T-cell immunoglobulin mucin-3, Tim-3)是Tim基因家族蛋白的成员之一, 被认为是T细胞的负性调控靶点。目前, Tim-3作为一种新的免疫检查点受体, 它在肿瘤干细胞和骨髓细胞中可诱导T细胞衰竭并抑制抗肿瘤的免疫作用^[4]。此外, 免疫检查点分子Tim-3和程序性死亡受体1(programmed death 1, PD-1)也可以限制嵌合型抗原受体修饰的T细胞(chimeric antigen receptor-modified T, CAR-T)的抗肿瘤作用^[5]。据相关研究, 在卵巢癌患者的外周血中Tim-3水平会明显升高^[6], 并且有学者通过动物实验分析, 发现下调外周血中Tim-3水平可抑制卵巢癌细胞的生长, 这使其生存率提高了60%^[7]。Tim-3不仅在肿瘤免疫中发挥着巨大作用, 还可以在多种肿瘤细胞中直接表达, 这一显著特性预示其在分子靶向治疗中拥有巨大潜力。CAO等^[7]发现, 在生殖系统肿瘤的宫颈癌组织中Tim-3表

达水平较高, 并观察到具有高表达Tim-3的患者愈后较差, 死亡率更高。虽然, Tim-3对宫颈癌细胞的促瘤作用具有显著影响, 但其相关作用机制尚不明。结合本课题组的研究及相关文献的报道^[8], Tim-3在HeLa细胞中表达并不特别丰富。因此, 为了更好地研究Tim-3对宫颈癌细胞的影响, 我们通过包装慢病毒并利用慢病毒介导的方式显著提高Tim-3在HeLa细胞中的表达, 探索Tim-3对宫颈癌细胞的促肿瘤作用及其机制, 为肿瘤的分子靶向治疗提供可靠的靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及材料

慢病毒包装质粒(psPAX2、pMD2.G)、载体质粒(pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro、pCDH-CMV-GFP)、人胚肾293T细胞和人宫颈癌HeLa细胞均由四川大学生物治疗国家重点实验室提供; PEI转染试剂由重庆医科大学药学院何百川教授惠赠; pEZ-Lv105-Tim-3购自Genecopoeia公司; EcoR I、BamH I和PCR高保真酶购自宝日医生物技术(北京)有限公司; 同源重组试剂盒及胶回收纯化试剂盒购自南京诺唯赞生物技术有限公司; 质粒提取试剂盒和DNA marker均购自天根生化科技(北京)有限公司; TOP10感受态细胞购自苏州新赛美生物科技有限公司; DMEM培养基、胎牛血清和胰蛋白酶购自Gibco公司; Human TIM-3 Antibody(AF2365)购自R&D Systems公司; E-cadherin、N-cadherin、Snail和GAPDH均购自Cell Signaling Technology公司; PE Mouse Anti-Human Tim-3(563422)购自BD Pharmingen公

司;鼠抗人GAPDH抗体购自南京巴傲得生物科技有限公司;HRP和FITC标记的二抗购自博士德生物工程有限公司;基质胶购自美国BD Pharmingen公司;Transwell小室购自康宁有限公司;其他试剂均由当地化学试剂商提供。

1.2 pCDH-Tim-3重组质粒构建

根据Genebank中报道的人*Tim-3*基因的核苷酸序列(NM_032782.4),用Primer Premier 5.0软件分别设计含pCDH质粒载体同源序列的引物。其上游引物为Tim-3-F为5'-gat tct aga gct agc gaa ttc ATG TTT TCA CAT CTT CCC TTT GAC T-3',下游引物为Tim-3-R为5'-atc ctt cgc ggc cgc gga tcc CTA TGG CAT TGC AAA GCG ACA-3'(下划线分别为EcoR I、BamH I酶切位点,加粗为质粒同源臂)。引物由深圳华大基因股份有限公司合成。以含有目的基因*Tim-3*的载体pEZ-Lv105为模板,进行PCR扩增。扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳初步鉴定,并用胶回收纯化试剂盒纯化目的片段。将纯化的*Tim-3*片段和经限制性内切酶EcoR I、BamH I双酶切的pCDH质粒通过同源重组进行连接。接着将连接产物转化至感受态细菌TOP10中,接种在含有氨苄青霉素(100 µg/mL)的LB平板培养基中,37 °C下倒置培养16 h后随机挑取10个单克隆菌落,摇菌提取质粒,经EcoR I单酶切鉴定,选择片段大小正确的重组质粒邮寄至深圳华大基因股份有限公司进行测序。测序正确的阳性重组质粒命名为pCDH-Tim-3,同时设定空载体对照组为pCDH-NC组。

1.3 细胞培养

293T细胞和HeLa宫颈癌细胞用含10%胎牛血清、1%青链霉素的DMEM高糖完全培养基培养。当细胞汇合率约为80%时,用0.25%胰蛋白酶消化并传代,置于37 °C、5% CO₂恒温培养箱中培养,此两种细胞为贴壁生长。

1.4 慢病毒的包装与稳定细胞系的构建

将293T细胞接种于培养皿中,培养至对数生长期,细胞生长密度至80%。将三种质粒包括pCDH-TIM-3、psPAX2和pMD2.G按2:2:1比例共转染至293T细胞中,同时加入PEI转染试剂。12 h后,移去旧培养基,更换为新鲜的完全培养基。分别在转染48 h和72 h时收集培养的上清液,4 °C、1 500 r/min离心5 min,除去脱落的细胞和大的细胞碎片,然后将上清用0.45 µm过滤装置过滤。用上述相同方法获得

阴性对照lenti-NC及lenti-GFP慢病毒颗粒。采用逐孔稀释法测定病毒滴度^[8],并尽快将上述含有三种慢病毒的过滤液用于感染HeLa细胞。取对数生长期的HeLa细胞,以 1.5×10^5 个/孔密度接种于24孔板,培养24 h,梯度加入嘌呤霉素,其浓度分别为0、2、4、6、8 µg/mL。在37 °C、5% CO₂培养箱中培养,筛选7天后,观察每孔细胞死亡情况,将杀死全部细胞的最小浓度确定为稳定转染细胞株的筛选浓度,其最小浓度为2 µg/mL。将HeLa细胞按 2×10^5 个/孔接种到6孔板,待其培养至40%汇合时用于慢病毒感染。根据MOI值=病毒滴度(TU/mL)×病毒体积(mL)/细胞个数,设置慢病毒MOI感染梯度(0、1、2、3、4、5),找出最合适的MOI值为1。感染慢病毒24 h后更换新鲜培养基,在感染48 h时观察HeLa-GFP细胞荧光表达情况,在感染72 h时加入浓度为2 µg/mL嘌呤霉素,并维持该浓度7天,筛选7天后即可得稳定的HeLa-Tim-3细胞株、HeLa-NC细胞株(空载病毒阴性对照组)及HeLa-GFP细胞株,以备后续实验使用。

1.5 流式细胞术检测Tim-3的表达

分别收集HeLa、HeLa-NC、HeLa-Tim-3细胞,预冷PBS洗涤细胞2次,用100 µL PBS重悬制备单细胞悬液,每管细胞加入5 µL的PE-anti-Tim-3抗体原液,同时设置对照组(在流式细胞术实验中分为三组:HeLa、HeLa-Tim-3组、HeLa-NC组。但在其他研究方法中,则分为两组:HeLa-Tim-3组、HeLa-NC组)。4 °C避光孵育30 min后使用冷的PBS洗涤2次,1 200 r/min离心3 min,最后加入500 µL PBS重悬细胞,流式细胞仪检测并分析结果。

1.6 Western blot检测相关蛋白的表达

分别提取HeLa-NC和HeLa-Tim-3的总蛋白,用RIPA裂解液提取细胞总蛋白,BCA法检测蛋白浓度(严格参照试剂盒说明书步骤操作)。将定量后的蛋白按照30 µg/孔上样后进行SDS-PAGE凝胶电泳分离,并将蛋白转移PVDF膜,然后用5%脱脂奶粉在室温下封闭2 h,加入对应的一抗[Tim-3(1:3 000)、E-cadherin(1:1 000)、N-cadherin(1:1 000)、Snail(1:1 000)、GAPDH(1:1 000)]在4 °C房间孵育过夜,用对应种属的二抗(二抗比例均为1:5 000)37 °C孵育1.5 h。最后用化学发光试剂ECL(electrochemiluminescence)于暗室显色曝光分析结果。

1.7 细胞免疫荧光检测Tim-3的表达

将HeLa-NC和HeLa-Tim-3细胞接种在96孔板

24 h。于室温下用4%多聚甲醛固定15 min, 用0.1% Triton X-100渗透5 min。于封闭液(0.5%山羊血清)中室温封闭1 h。Tim-3抗体(1:100)于4℃孵育过夜。第二天用异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)(1:100)标记二抗, 在室温下避光孵育1 h。用0.1 μg/mL DAPI复染1 min, 荧光显微镜下观察并分析结果。

1.8 Transwell检测细胞的迁移和侵袭能力

1.8.1 迁移实验 消化收集HeLa-NC和HeLa-Tim-3细胞, 小室上室加入100 μL无血清DMEM培养基制备的细胞悬液(含 5×10^4 个细胞), 下室加入含有10%的胎牛血清的完全培养基600 μL作为化学诱导剂, 培养36 h, 待细胞穿出后取出小室, 用4%的多聚甲醛固定10 min, 0.25%结晶紫染色1 min, PBS轻洗后, 将其置于倒置显微镜拍照并计数细胞。

1.8.2 侵袭实验 按5:1比例用DMEM培养基稀释基质胶, 于小室上室每孔快速加入50 μL上述混合物, 避免产生气泡, 孵箱中放置3~4 h, 待其凝固后, 加入100 μL细胞悬液(含 8×10^4 个细胞)。余下实验步骤同迁移实验。

1.9 细胞划痕实验检测细胞迁移

将HeLa-NC和HeLa-Tim-3细胞接种于6孔板中, 过夜单层铺满, 用直尺将细胞单层划伤, PBS洗涤, 加入无血清的DMEM继续孵育。分别于孵育0、24、48 h时用倒置显微镜拍照并记录相应的位置, 进行结果分析。

1.10 流式细胞术检测细胞凋亡率

用不含EDTA的胰蛋白酶收集HeLa-NC和HeLa-Tim-3两组细胞, PBS洗涤2次。使用Annexin V-FITC/PI试剂盒严格按照说明书对细胞进行处理, 并及时用流式细胞仪进行检测并分析。

1.11 统计分析

用SPSS 22.0版本进行统计分析, 用Graphpad 6.01软件进行绘图。两组数据比较采用独立样本 t 检验。每个实验均独立重复3次以上。所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 以 $P < 0.05$ 认为其差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 pCDH-Tim-3重组慢病毒表达载体的鉴定

以pEZ-Lv105质粒为模板, 经PCR扩增后, 利用琼脂糖凝胶电泳检测其扩增产物, 结果扩增条带在

906 bp左右, 与预测片段大小一致(图1A), 重组后的pCDH-Tim-3质粒用EcoR I酶切, 琼脂糖凝胶电泳结果显示为2条带, 其大小分别为770 bp的片段和7 520 bp片段(图1B), 与预测片段大小一致。测序结果与Genbank中序列完全一致(图1C)。这表明, pCDH-Tim-3重组慢病毒表达载体构建成功。

2.2 慢病毒的包装的感染效率及滴度测定

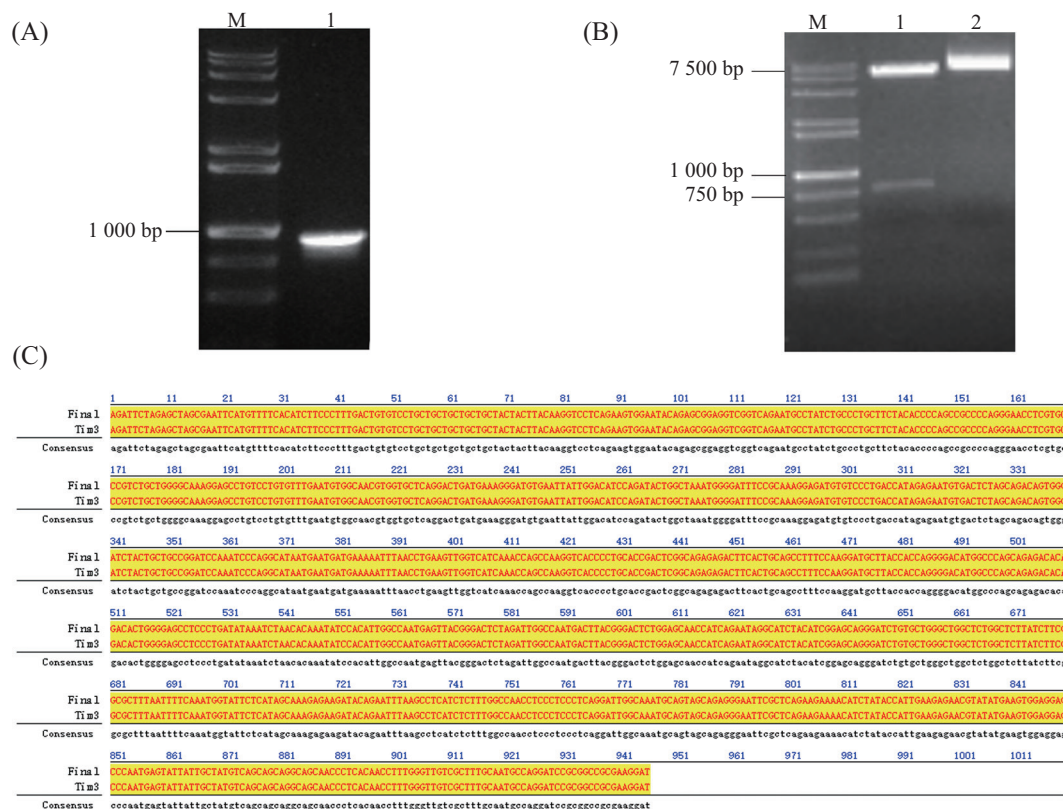
为了使Tim-3在HeLa细胞上稳定表达, 首先利用慢病毒编码绿色荧光蛋白(green-fluorescent protein, GFP)来探讨感染的条件。将pCDH-GFP、psPAX2、pMD2.G三个质粒共转染293T细胞。两天后, 利用荧光显微镜可以观察到高的转染效率(图2A), 说明大量的质粒转入细胞中。然后用包装好编码GFP的慢病毒转导HeLa细胞, 两天后, 用荧光显微镜可以观察到高感染效率(图2B)。根据病毒滴度计算公式, $20 \times 1 / (1 \times 10^{-4}) = 2 \times 10^5 \text{ TU}/\mu\text{L} = 2 \times 10^8 \text{ TU}/\text{mL}$ 计算出lenti-GFP慢病毒滴度约为 $2 \times 10^8 \text{ TU}/\text{mL}$, 同理可得lenti-Tim-3及lenti-NC的滴度为 $2 \times 10^8 \text{ TU}/\text{mL}$, 本研究中所包装的慢病毒不需要高速离心即能够满足实验对病毒液滴度的要求。实验结果表明, 当慢病毒的滴度达到 $2 \times 10^8 \text{ TU}/\text{mL}$, MOI值为1时, 细胞的感染效率最高且病毒毒性最小。同理, 分别用lenti-Tim-3和lenti-NC(MOI值均为1)感染HeLa细胞, 并用嘌呤霉素筛选7天获得HeLa-Tim-3和HeLa-NC稳定细胞株。

2.3 验证Tim-3在稳定细胞中的表达

用流式细胞术、Western blot和细胞免疫荧光同时检测HeLa-Tim-3和HeLa-NC稳定细胞株上Tim-3的表达水平。流式和Western blot结果显示, HeLa-Tim-3细胞株中的Tim-3蛋白表达显著升高(图3A、图3B、图3D和图3E)($P < 0.01$)。免疫荧光实验进一步表明, HeLa-Tim-3的荧光强度明显高于HeLa-NC组(图3C)。综上表明, 我们成功建立了稳定高表达Tim-3的HeLa细胞模型。

2.4 Tim-3促进HeLa细胞迁移、侵袭

本研究采用了细胞划痕实验和Transwell实验来研究Tim-3对HeLa细胞迁移和侵袭的影响。细胞划痕实验结果显示, 在24 h时, HeLa-Tim-3组的迁移区域小于HeLa-NC组(HeLa-Tim-3 vs HeLa-NC: 2.20 ± 0.1 vs 1.64 ± 0.6)(图4A和图4B)($P < 0.001$)。48 h时, HeLa-Tim-3组的迁移区域明显小于HeLa-NC组(HeLa-Tim-3 vs HeLa-NC: 1.23 ± 0.06 vs 0.47 ± 0.06)(图

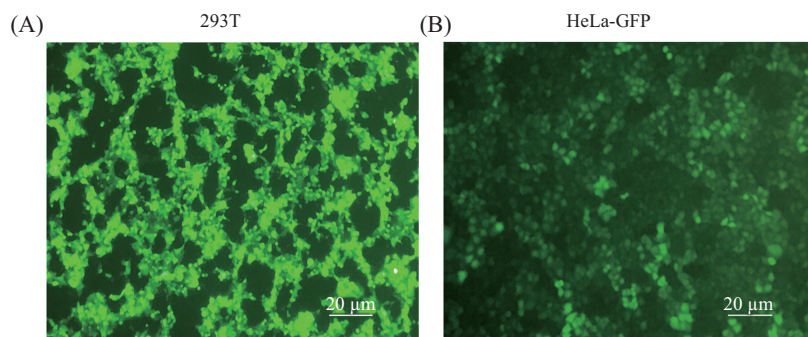


A: PCR扩增的*Tim-3*基因片段的琼脂糖凝胶电泳图。M为DNA分子量标准物, 1为*Tim-3*基因片段; B: *EcoRI*酶切重组pCDH-Tim-3表达载体的琼脂糖凝胶电泳图。M为DNA分子量标准物, 1为酶切后的pCDH-Tim-3表达载体的产物, 2为未酶切的pCDH-Tim-3表达载体; C: *Tim-3*与Genbank中*Tim-3*测序结果对比图。

A: agarose gel electrophoresis of *Tim-3* gene obtained from PCR. Lane M: DNA Marker. Lane 1: *Tim-3* gene fragment from PCR products; B: agarose gel electrophoresis of pCDH-Tim-3 identified by *EcoRI* restriction enzyme. Lane M: DNA Marker. Lane 1: products of pCDH-Tim-3 expression vector after enzyme digestion. Lane 2: pCDH-Tim-3 expression vector without enzyme digestion; C: alignment of the sequenced *Tim-3* gene with the original gene sequence of *Tim-3*.

图1 重组pCDH-Tim-3表达载体的构建

Fig.1 Construction of recombinant pCDH-Tim-3 expression vector



A: 荧光显微镜下lenti-GFP慢病毒在293T细胞中包装过程中的第48 h; B: 荧光显微镜下lenti-GFP慢病毒感染HeLa细胞的第48 h。

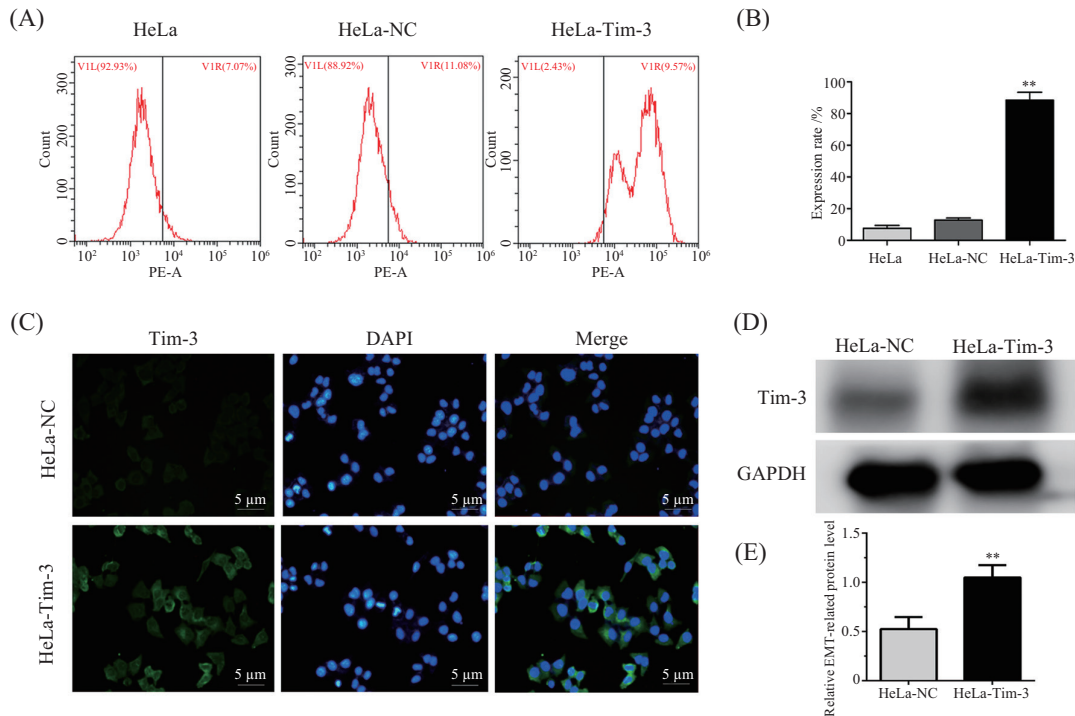
A: results of fluorescence microscopy of 293T when the lenti-GFP were packed in 293T cells for 48 h; B: results of fluorescence microscopy of HeLa-GFP when the HeLa cells were infected by lenti-GFP for 48 h.

图2 荧光倒置显微镜下的细胞

Fig.2 The cells under the inverted fluorescence microscope

4A和图4B)($P < 0.001$)。同样, Transwell迁移实验显示, HeLa-Tim-3组细胞迁移数量明显高于 HeLa-NC组 (HeLa-Tim-3 vs HeLa-NC: 306 ± 26 vs 137 ± 32)(图4C

和图4D)($P < 0.01$), 说明 HeLa-Tim-3组细胞在 24 h后迁移能力明显增强。此外, 使用预包被基质凝胶处理的小室, 同样与HeLa-NC细胞相比, HeLa-Tim-3

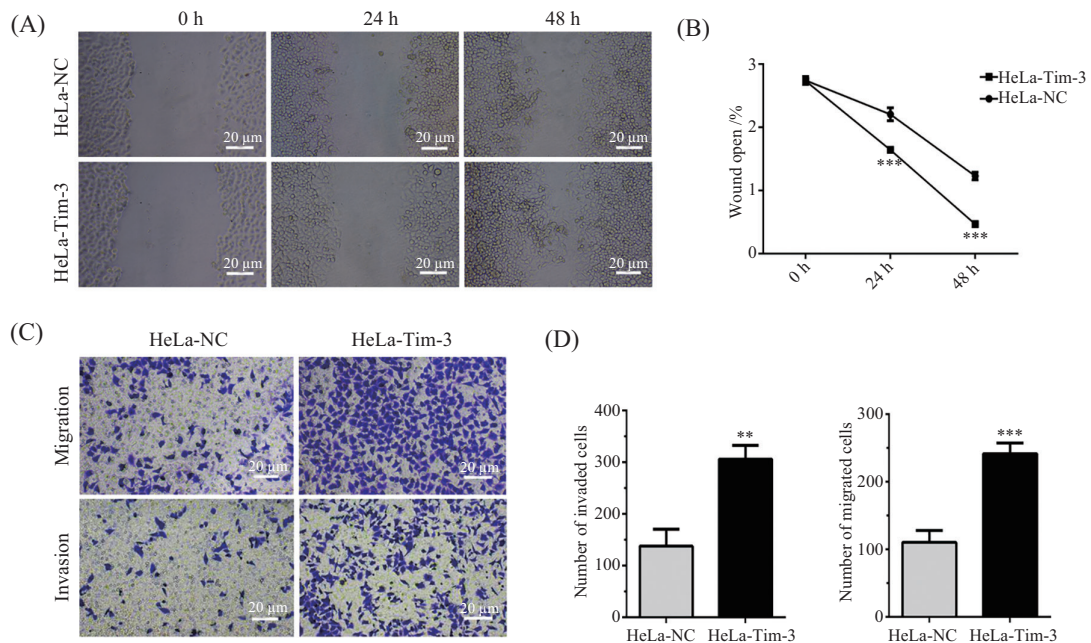


A、B: 流式细胞术检测Tim-3蛋白在各组细胞中的表达水平及统计分析; C: 细胞免疫荧光法检测Tim-3在各组细胞中的表达变化; D、E: Western blot法检测Tim-3在各组细胞中的表达变化及统计分析。** $P < 0.01$, 与HeLa-NC组相比。

A,B: results of the expression of Tim-3 in each cell group detected by flow cytometry and assay statistical analysis; C: results of the expression of Tim-3 in each cell group detected by the cellular immunofluorescence assay; D,E: results of the protein expression of Tim-3 in each cell group detected by Western blot assay and assay statistical analysis. ** $P < 0.01$ compared with HeLa-NC group.

图3 稳定高表达Tim-3的Hela细胞模型的建立

Fig.3 Establishment of HeLa cell with stable high expression of Tim-3

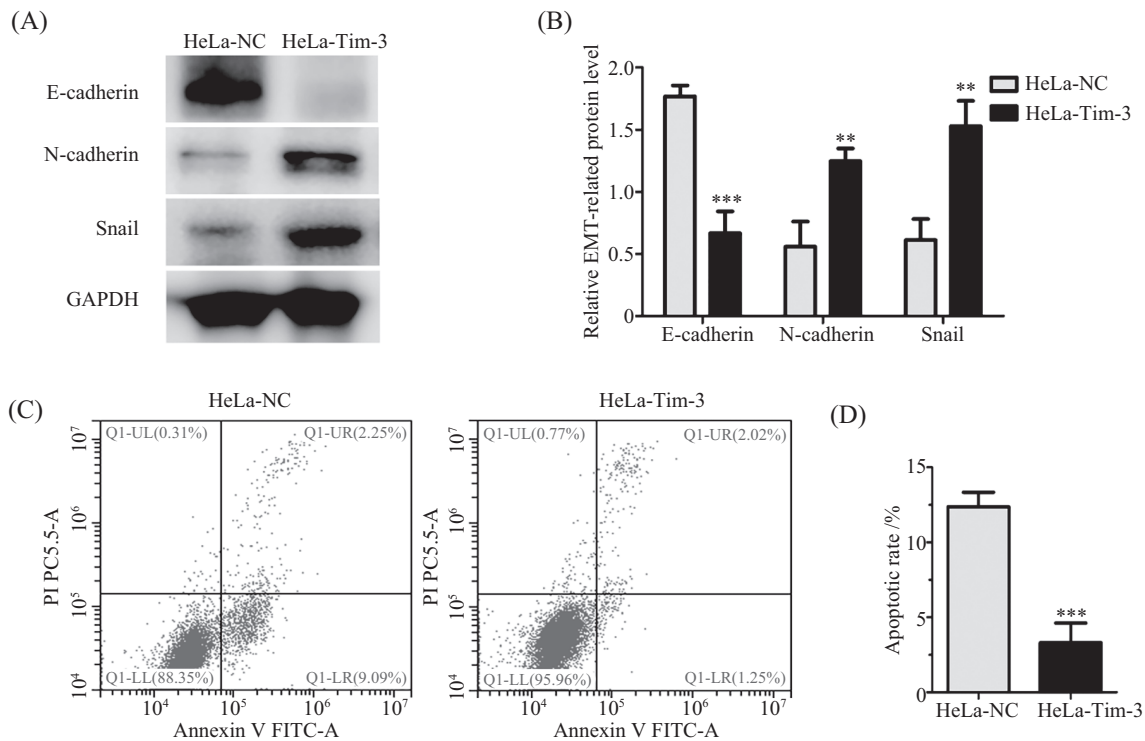


A、B: 划痕实验检测各组细胞的迁移能力及统计分析; C、D: Transwell检测各组细胞的迁移和侵袭能力及统计分析。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A,B: results of the migration ability in each cell group detected by wound-healing assay and statistical analysis; C,D: results of the abilities including migration and invasion in each cell group detected by Transwell and statistical analysis. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图4 过表达Tim-3促进HeLa细胞迁移侵袭

Fig.4 Overexpression of Tim-3 promoted HeLa cell migration and invasion



A、B: 各组细胞中EMT相关指标的蛋白水平变化及统计分析; C、D: 各组细胞在凋亡水平的变化及统计分析。** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与HeLa-NC组相比。

A,B: results of EMT-related proteins in each cell group and statistical analysis; C,D: results of the apoptosis rate in each cell group. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with HeLa-NC group.

图5 过表达Tim-3促进HeLa细胞EMT进展及抑制细胞凋亡

Fig.5 Overexpression of Tim-3 promotes EMT progression and inhibits apoptosis in HeLa cells

组细胞的侵袭性显著增加(HeLa-Tim-3 vs HeLa-NC: 241 ± 16 vs 110 ± 17)(图4C和图4D)($P<0.001$)。因此, Tim-3的上调显著促进了HeLa细胞的迁移和侵袭能力。

2.5 Tim-3促进HeLa细胞EMT进展

为了进一步了解Tim-3与宫颈癌细胞HeLa迁移和侵袭的关系, 该研究进一步探讨了其可能的机制。据研究报道, E-cadherin是一种典型的上皮细胞标志物, 而N-cadherin和Snail是间充质细胞标志物。Western blot结果显示, 高表达Tim-3的HeLa细胞中E-cadherin的表达明显降低($P<0.001$), 而相应的N-cadherin和Snail的表达明显增加(图5A和图5B)($P<0.01$)。这些结果表明, Tim-3促进了HeLa细胞EMT的转化。

2.6 Tim-3的表达抑制HeLa细胞的凋亡

为了探究Tim-3对HeLa细胞凋亡的影响, 我们采用了Annexin V-FITC/PI染色方法, 并用流式细胞仪器检测细胞凋亡率。结果发现, 与HeLa-NC组相比, HeLa-Tim-3组在早期凋亡的凋亡率明显降低

(HeLa-Tim-3 vs HeLa-NC: 3.30 ± 1.31 vs 12.37 ± 0.97)($P<0.001$)(图5C和图5D)。结果表明, Tim-3能抑制HeLa细胞的凋亡。

3 讨论

宫颈癌由于具有较强的侵袭能力和广泛转移性, 成为了导致全球女性癌症死亡的主要原因之一^[1]。手术切除、放疗和化疗是目前治疗宫颈癌的主要方式。不能进行根治性手术切除、放疗和化疗的患者总体生存率较低且常常发生肿瘤的转移^[9]。近年来, 免疫治疗和分子靶向治疗成为了治疗肿瘤的新方法, 尤其是在免疫抑制剂治疗的方面, 如PD-1抑制剂Pembrolizumab和Nivolumab已被美国FDA批准用于多种肿瘤的治疗^[10]。Tim-3作为一种较新的免疫检查点, 不仅在T细胞衰竭和抑制抗肿瘤免疫中发挥重要作用, 还在人类宫颈癌、结直肠癌、肺癌、肾癌、肝癌等多种癌细胞中存在明显的过表达^[11-16], 表明Tim-3在分子靶向治疗方面具有巨大潜力。

CAO等^[7]通过研究发现, Tim-3在宫颈癌临床组

织中有较高的表达水平,其表达与宫颈癌晚期转移和较短生存期显著相关。有研究进一步表明,利用siRNA的方式下调HeLa细胞中Tim-3蛋白的表达后能够抑制该细胞增殖及迁移能力^[17]。本研究遂通过慢病毒介导的方式提高Tim-3在HeLa细胞中表达,进一步探究其对宫颈癌的影响。慢病毒载体因其高效的感染效率和外源基因的良好表达而成为科研中的常用工具^[18]。与逆转录病毒相比,它既能感染正在分裂细胞也能感染未分裂细胞^[19],同时与腺病毒相比,也能将靶基因整合至目的细胞的基因组中并能长时间稳定表达靶基因^[20]。目前,慢病毒已经被运用于临床研究,由此可见慢病毒载体在科研和临床实践领域都具有广阔的应用前景^[21]。本研究采用的三种质粒系统包装的慢病毒不需要高速浓缩即可感染HeLa细胞,并获得了较高的感染效率。通过流式细胞术、Western blot及细胞免疫荧光的方法验证了通过慢病毒介导的方式能显著提高Tim-3在HeLa细胞中的表达,并获得长时间稳定高表达Tim-3的细胞株,这为开展后续实验奠定了坚实的基础。此外,本研究通过细胞划痕实验和Transwell的方法发现,HeLa细胞中Tim-3的过表达能促进其侵袭转移,与CAO等^[7]通过下调Tim-3在HeLa细胞中的表达能抑制其侵袭转移的研究结果相符,从而在多方面证实了Tim-3能促进宫颈癌细胞的侵袭转移。

研究表明,肿瘤细胞的侵袭转移是导致恶性肿瘤死亡的主要原因之一,其中EMT是肿瘤侵袭转移的核心事件^[2]。EMT的生物学特性主要表现在细胞极性的丧失和间质性质的获得,即在细胞发生EMT的过程中,上皮标记分子E-cadherin、Zonula Occluden-1、细胞角蛋白等表达下调,间充质标记分子N-cadherin、Vimentin、纤连蛋白等表达上调。这些分子表达的改变将引起细胞黏附降低、细胞间连接的拆卸、细胞骨架重排及细胞活力运动性增加等一系列的显微变化,促使上皮细胞转变为纤维样细胞形态进而引起肿瘤迁移侵袭的发生^[22]。此外,根据不同的生物学环境可将EMT分为三种类型:I型主要是参与胚胎形成及器官的发育;II型主要是参与组织损伤修复及器官纤维化;III型主要是和肿瘤的恶性发展相关,包括在肿瘤的发生发展、转移及耐药等方面都具有重要意义^[25-26]。在本研究中,HeLa细胞高表达Tim-3时,上皮标志物E-cadherin较HeLa-NC组明显降低。相反,间质标记物N-cadherin显著

增加。另外,HeLa细胞中参与EMT的核转录因子Snail表达也上调^[23]。因此,本研究结果提示,Tim-3可能促进EMT过程,这与Tim-3促进食管鳞癌和骨肉瘤肿瘤的发生发展的结论相似^[24-25]。

此外,本研究还揭示Tim-3的高表达可以直接抑制HeLa细胞的凋亡。细胞凋亡及其调控基因对肿瘤细胞的恶性表型有重要影响,致癌基因的突变会破坏细胞凋亡,导致肿瘤发生和肿瘤转移或进展^[26]。该研究结果与之前的报道一致,即Tim-3⁺造血干细胞升高显示未治疗的骨髓增生异常综合征细胞凋亡减少^[27]。同时,本研究证实了Tim-3能促进HeLa细胞的侵袭转移。虽然侵袭和转移是恶性肿瘤患者死亡的主要原因,抗凋亡则是肿瘤侵袭转移的关键步骤^[28],但是Tim-3促进细胞侵袭迁移与抑制其凋亡之间的具体关系尚不明确,还需进一步探索。

综上所述,本研究成功构建了含有Tim-3的慢病毒表达载体即pCDH-Tim-3。用慢病毒的方式使HeLa细胞稳定高表达Tim-3。Tim-3可促进HeLa肿瘤细胞的侵袭和转移。HeLa细胞恶性进展的相关机制可能是通过促进其EMT转化和抑制其凋亡的方式实现。因此, Tim-3可能成为治疗宫颈癌的潜在靶点之一。但本研究存在以下不足,包括未涉及相关通路及未建立动物模型等方面的研究,接下来本课题组将深入挖掘Tim-3在宫颈癌细胞中扮演的角色,开展其在更为详细的分子机制及动物实验等方面的研究。

参考文献 (References)

- [1] COHEN P A, JHINGRAN A, OAKNIN A, et al. Cervical cancer [J]. *Lancet*, 2019, 393(10167): 169-82.
- [2] BRABLETZ T, KALLURI R, NIETO M A, et al. EMT in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(2): 128-34.
- [3] CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer [J]. *Nature*, 2017, 543(7645): 378-84.
- [4] KURTULUS S, MADI A, ESCOBAR G, et al. Checkpoint blockade immunotherapy induces dynamic changes in PD-1⁺ CD8⁺ tumor-infiltrating T cells [J]. *Immunity*, 2019(50): 181-94.
- [5] CHEN J, LÓPEZ-MOYADO I F, SEO H, et al. NR4A transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours [J]. *Nature*, 2019, 567(7749): 530-4.
- [6] WU J, LIU C, QIAN S, et al. The expression of Tim-3 in peripheral blood of ovarian cancer [J]. *Dna Cell Biol*, 2013, 32(11): 648-53.
- [7] CAO Y, ZHOU X, HUANG X, et al. Tim-3 expression in cervical cancer promotes tumor metastasis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53834.

- [8] TISCORNIA G, SINGER O, VERMA I M. Production and purification of lentiviral vectors [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(1): 241-5.
- [9] SMALL W Jr., BACON M A, BAJAJ A, et al. Cervical cancer: a global health crisis [J]. *Cancer*, 2017, 123(13): 2404-12.
- [10] PASSIGLIA F, GALVANO A, RIZZO S, et al. Looking for the best immune-checkpoint inhibitor in pre-treated NSCLC patients: an indirect comparison between nivolumab, pembrolizumab and atezolizumab [J]. *Int J Cancer*, 2018, 142(6): 1277-84.
- [11] ZHOU E, HUANG Q, WANG J, et al. Up-regulation of Tim-3 is associated with poor prognosis of patients with colon cancer [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(7): 8018-27.
- [12] ZHANG Y, CAI P, LIANG T, et al. TIM-3 is a potential prognostic marker for patients with solid tumors: a systematic review and meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(19): 31705-13.
- [13] YU M, LU B, LIU Y, et al. Interference with Tim-3 protein expression attenuates the invasion of clear cell renal cell carcinoma and aggravates anoikis [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(3): 1103-8.
- [14] ZHUANG X, ZHANG X, XIA X, et al. Ectopic expression of TIM-3 in lung cancers: a potential independent prognostic factor for patients with NSCLC [J]. *Am J Clin Pathol*, 2012, 137(6): 978-85.
- [15] YAN W, LIU X, MA H, et al. Tim-3 fosters HCC development by enhancing TGF-beta-mediated alternative activation of macrophages [J]. *Gut*, 2015, 64(10): 1593-604.
- [16] 张婷, 王广涛, 张园园, 等. 敲减TIM-3对结直肠癌细胞生长及分泌免疫抑制分子的影响 [J]. *免疫学杂志*(ZHANG T, WANG G T, ZHANG Y Y, et al. Effects of TIM-3 knockdown on the growth and immunosuppressive molecules secretion of colorectal cancer cells [J]. *Immunological Journal*), 2020, doi: 10.13431/j.cnki.immunol.j.20200008.
- [17] 周超. 肿瘤相关巨噬细胞(TAM)及Tim-3在宫颈癌中的作用及机制研究 [D]. 山东: 山东大学, 2018.
- [18] GUO Z, CHENG D, XIA Z, et al. Combined TIM-3 blockade and CD137 activation affords the long-term protection in a murine model of ovarian cancer [J]. *J Transl Med*, 2013, 11(1): 215.
- [19] LIAO J, WEI Q, FAN J, et al. Characterization of retroviral infectivity and superinfection resistance during retrovirus-mediated transduction of mammalian cells [J]. *Gene Ther*, 2017, 24(6): 333-41.
- [20] 刘渤, 雷霞, 何通川, 等. 重组腺病毒介导外源性SOX9在正常关节软骨细胞中诱导软骨基质合成的体外表达 [J]. *中国骨与关节外科*(Liu B, Lei X, He T C, et al. Induction of cartilage matrix by recombinant adenoviral vector mediated expression of SOX9 in articular chondrocytes [J]. *Chinese Journal of Bone and Joint Surgery*), 2012, 5(2): 162-7.
- [21] SII-FELICE K, GIORGI M, LEBOULCH P, et al. Hemoglobin disorders: lentiviral gene therapy in the starting blocks to enter clinical practice [J]. *Exp Hematol*, 2018, 64: 12-32.
- [22] SRIVASTAVA C, IRSHAD K, DIKSHIT B, et al. FAT1 modulates EMT and stemness genes expression in hypoxic glioblastoma [J]. *Int J Cancer*, 2018, 142(4): 805-12.
- [23] CAMPBELL K, LEBRETON G, FRANCH-MARRO X, et al. Differential roles of the drosophila EMT-inducing transcription factors snail and serpent in driving primary tumour growth [J]. *Plos Genet*, 2018, 14(2): e1007167.
- [24] SHAN B, MAN H, LIU J, et al. TIM-3 promotes the metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by targeting epithelial-mesenchymal transition via the Akt/GSK-3beta/Snail signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(3): 1551-61.
- [25] FENG Z M, GUO S M. Tim-3 facilitates osteosarcoma proliferation and metastasis through the NF-kappaB pathway and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Genet Mol Res*, 2016, doi: 10.4238/gmr.15037844.
- [26] LOWE S W, LIN A W. Apoptosis in cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(3): 485-95.
- [27] TAO J L, LI L J, FU R, et al. Elevated TIM3⁺ hematopoietic stem cells in untreated myelodysplastic syndrome displayed aberrant differentiation, overproliferation and decreased apoptosis [J]. *Leukemia Res*, 2014, 38(6): 714-21.
- [28] 邹国英, 李淑娜, 张文玲. 细胞失巢凋亡与肿瘤侵袭及转移的关系[J]. *肿瘤研究与临床*(ZOU G Y, LI S N, ZHANG W L. Relationship between anoikis and tumor invasion and metastasis [J]. *Cancer Research and Clinic*), 2015(11): 781-4.