

研究论文

TGF- β 1诱导人前列腺癌PC3细胞上皮间叶化的研究

陈丹扬 刘浩 王昊 王险峰 杜军*

(中山大学药学院微生物与生化药学实验室, 广州 510006)

摘要 上皮细胞间叶化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)与肿瘤侵袭转移密切相关, 转化生长因子- β (transforming growth factor-beta, TGF- β)已被证实为肿瘤EMT的主要诱导剂。该研究旨在探讨TGF- β 1对人前列腺癌PC3细胞EMT发生的诱导作用。经TGF- β 1处理的PC3细胞, 在相差倒置显微镜下观察到细胞形态由上皮型向间叶型转化; 细胞划痕和Transwell实验检测细胞的迁移能力较对照组显著增强; Real-time PCR、Western blot和细胞免疫荧光验证TGF- β 1能上调间叶型标记蛋白的表达及下调上皮型标志蛋白的表达。进一步发现, TGF- β 1对转录因子Snail的表达没有明显的影响, 但是能促进Snail的入核, 干扰Snail能逆转TGF- β 1对PC3细胞EMT发生的诱导作用。该研究表明, TGF- β 1能够介导Snail的入核而激活Snail, 促进前列腺癌PC3细胞的发生。

关键词 TGF- β 1; 上皮细胞间叶化; Snail; 前列腺癌

TGF- β 1-induced Epithelial-mesenchymal Transition in Human Prostate Cancer Cells PC3

Chen Danyang, Liu Hao, Wang Hao, Wang Xianfeng, Du Jun*

(Department of Microbial and Biochemical Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract It has been proved that epithelial-mesenchymal transition (EMT) is correlated with tumor invasion and metastasis. Transforming growth factor-beta (TGF- β) has been identified as a main inducer of EMT. The aim of this study is to investigate the effects of TGF- β 1 on EMT in human prostate cancer PC3 cells. We found that TGF- β 1 treatment could induce morphological alteration of PC3 cells from epithelial morphology to mesenchymal morphology. Wound healing assay and Transwell assay showed that TGF- β 1 significantly increases the migration of PC3 cells. Real-time PCR, Western blot and immunofluorescence staining demonstrated that TGF- β 1 up-regulates the expression of mesenchymal makers and down-regulates epithelial markers. Furthermore, TGF- β 1 treatment does not alter the expression of Snail, but promotes Snail nuclear localization. Interestingly, knockdown of Snail by siRNA dramatically attenuates TGF- β 1-induced EMT. These results demonstrated that TGF- β 1 could induce EMT in PC3 cells by promoting Snail nuclear localization.

Key words TGF- β 1; EMT; Snail; prostate cancer

收稿日期: 2013-01-15 接受日期: 2013-03-19

国家重点基础研究发展计划(973)项目(批准号: 2011CB935803)和国家自然科学基金(批准号: 81071712、81272311)资助的课题

*通讯作者。Tel/Fax: 020-39943022, E-mail: dujun@mail.sysu.edu.cn

Received: January 15, 2013 Accepted: March 19, 2013

This work is supported by the State Key Development Program for Basic Research of China (Grant No.2011CB935803) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81071712, 81272311)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-39943022, E-mail: dujun@mail.sysu.edu.cn

网络出版时间: 2013-05-24 15:02

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130524.1502.001.html>

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是发生于男性前列腺组织中的恶性肿瘤,其发病率与死亡率均逐年增加,而骨转移则是前列腺癌的重要临床特征及致死原因^[1]。前列腺癌的发生、发展依赖于基质与上皮细胞通过旁分泌调控的相互作用。转化生长因子- β (transforming growth factor-beta, TGF- β)主要由前列腺基质细胞产生,是一种具有多种生物学活性的多肽类细胞因子,以旁分泌的方式调控前列腺上皮细胞的增殖与分化。研究发现, TGF- β 在前列腺癌的发生、发展中具有双重作用。其可抑制正常前列腺上皮和早期前列腺癌细胞的增殖,而在进展期则可促进肿瘤的侵袭转移^[2]。TGF- β 可通过多种机制促进前列腺癌的进展,如促血管新生、抑制宿主免疫系统、诱导细胞自身及周围基质微环境改变等^[3]。

上皮细胞间叶化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指呈现上皮样表型的细胞失去极性,表现出增强的活动能力,在细胞基质间能够自由移动且呈现纤维样表型的转化过程^[4]。最近研究表明, EMT在肿瘤侵袭转移过程中起重要作用, TGF- β 已被证实为多种肿瘤EMT发生的主要诱导剂,进而促进肿瘤侵袭转移^[5]。研究表明,前列腺癌细胞中TGF- β 的家族成员TGF- β 1的表达水平与肿瘤细胞的侵袭能力正相关^[6],且前列腺癌中TGF- β 1高表达,往往与临床预后不良有关^[7]。本文旨在探讨TGF- β 1对人前列腺癌PC3细胞EMT发生的诱导作用及作用机制,为阐明前列腺癌细胞侵袭转移机制以及前列腺癌的防治提供新线索。

1 材料与方法

1.1 材料

人前列腺癌PC3细胞购自中国科学院上海生命科学研究所生物化学与细胞生物学研究所细胞库。DMEM培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购自Gibco公司; TGF- β 1购自Peprotech公司; E-cadherin、Vimentin、N-cadherin、Fibronectin(FN)和 β -Actin、 α -Tubulin抗体购自Santa Cruz公司; Snail抗体购自CST公司; 预染蛋白质Marker购自Fermentas公司; HRP标记山羊抗鼠IgG、山羊抗兔IgG购自北京鼎国生物技术有限公司; FITC标记的羊抗小鼠IgG、DAPI、转染试剂Lipofectamine™ 2000购自Invitrogen公司; ECL化学发光底物试剂盒购自Pierce公司; Quick Start Bradford蛋白定量试剂购自Bio-Rad公司; 反转录试剂盒、

RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司; PCR引物由上海生物工程技术有限公司合成; 其余试剂均为国产分析纯以上。

1.2 细胞培养

人前列腺癌PC3细胞用含10%胎牛血清(fetal calf serum, FBS)的DMEM培养液,于37 °C、5% CO₂的饱和湿度培养箱内培养。1~2 d换液,每3~4 d传代1次,实验时选用对数生长期细胞。

1.3 细胞划痕实验

收集细胞,用胰酶消化成单细胞悬液,按 3×10^5 /mL的密度接种于6孔板,37 °C、5% CO₂培养箱中培养12 h。取一个干净的20 μ L无菌枪头,用其尖端分别在6孔板的各组细胞上划痕。PBS清洗细胞3次,去除划下的细胞,加入含0.1% FBS的DMEM培养基。倒置显微镜下观察,取各组细胞培养孔中划痕宽度相等的位置拍照。将细胞放置于37 °C、5% CO₂的恒温培养箱中继续培养,48 h后观察同一位置的细胞并拍照。应用Image-Pro Plus软件计算各组细胞的划痕宽度,并做柱状图分析细胞迁移情况。

1.4 Transwell肿瘤细胞迁移实验

将Transwell小室放入培养板中,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,使基质胶再水化。消化细胞,用PBS洗2遍,用无血清培养基重悬。调整细胞密度至 3×10^5 /mL。取细胞悬液200 μ L加入24孔板Transwell小室。24孔板下室加入500 μ L含FBS的培养基。对种在24孔板Transwell小室的细胞进行处理。继续培养48 h后,对下室细胞进行苏木素染色,每组随机取5个视野进行计数,并做柱状图分析TGF- β 1对细胞侵袭能力的影响。

1.5 Real-time PCR

按照Trizol(Invitrogen)说明书方法提取细胞总RNA,按Primescript RT reagent Kit反转录试剂盒(TaKaRa)说明书将RNA反转录为cDNA。引物由上海生物工程技术有限公司设计并合成,引物序列如下, Vimentin上游引物: 5'-TGA GTA CCG GAG ACA GGT GCA G-3', 下游引物: 5'-TAG CAG CTT CAA CG GCA AAG TTC-3'; E-cadherin上游引物: 5'-TAC ACT GCC CAG GAG CCA GA-3', 下游引物: 5'-TGG CAC CAG TGT CCG GAT TA-3'; FN上游引物: 5'-GGA GCA AAT GGC ACC GAG ATA-3', 下游引物: 5'-GAG CTG CAC ATG TCT TGG GAA C-3'; Snail

上游引物: 5'-GAC CAC TAT GCC GCG CTC TT-3', 下游引物: 5'-TCG CTG TAG TTA GGC TTC CGA TT-3'; GAPDH上游引物: 5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC-3', 下游引物: 5'-TGG TGA AGA CGC CAG TGG A-3'。Real-time PCR反应体系及条件参照SYBR Premix Ex Tap™试剂盒(TaKaRa), $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算mRNA的相对表达量, 以GAPDH作为内参。每个实验组重复3次。

1.6 RNA干扰实验

采用DMEM培养基(含10% FBS)培养接种于6孔板的PC3细胞, 细胞密度达70%时, 参照Lipofectamne™ 2000转染试剂说明书进行转染, 用不含血清的opti-MEM培养基培养6 h之后, 更换DMEM培养基, 加入TGF- β 1处理, 连续培养48 h。Western blot检测细胞EMT标记物的表达情况。

1.7 蛋白提取和Western blot分析

收集实验细胞, 经PBS洗涤后用三去污裂解液[50 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)、150 mmol/L NaCl、0.2 g/L叠氮钠、100 mg/L Aprotin、100 mg/L PMSF、1 g/L SDS、10 g/L NP-40、5 g/L去氧胆酸钠]裂解, 离心后收集上清, 用Bradford法测定蛋白浓度; 等量蛋白样品经10%的SDS-PAGE电泳分离后, 转印至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭2 h, E-cadherin、Vimentin、N-cadherin、FN、Snail、 β -Actin、 α -Tubulin一抗均以1:1 000比例稀释, 4 °C孵育过夜。经PBST洗涤后, 加入HRP标记的特异性二抗以1:5 000比例稀释, 室温下孵育2 h, 最后用ECL化学发光试剂对X光片显影, 扫描图片。

1.8 激光共聚焦免疫荧光分析

PC3细胞以 1×10^5 /mL的密度接种于35 mm激光共聚焦培养皿中, 经TGF-1处理72 h后, 用冰冷的PBS洗3次, 4%多聚甲醛固定30 min, 正常山羊血清封闭30 min, E-cadherin、Vimentin、Snail一抗以1:200比例稀释, 4 °C孵育过夜。PBS洗涤之后, 再以FITC标记的羊抗小鼠IgG以1:500比例稀释, 室温孵育1 h, PBS洗3次, 用100 ng/mL的DAPI复染10 min, ZEISS LSM710激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

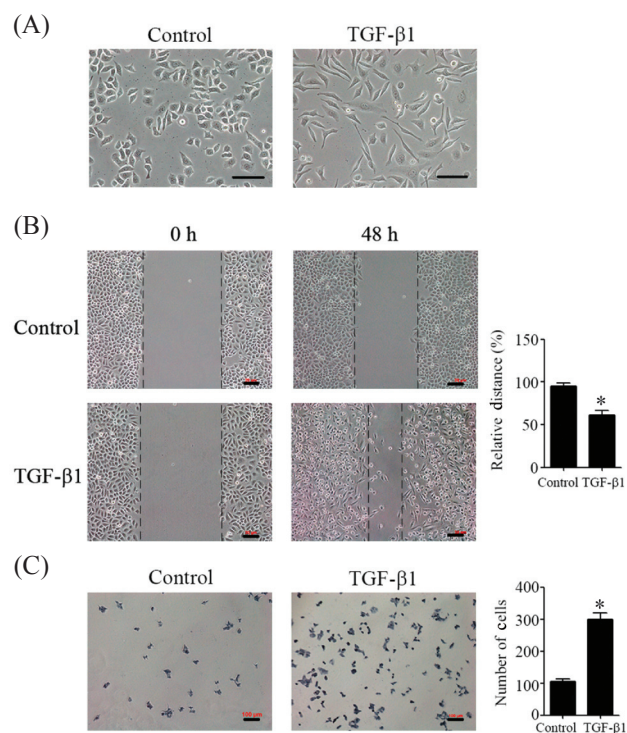
1.9 统计学方法

每组实验重复3次, 应用GraphPad Prism 5.0软件进行统计学分析, 组间比较用单因素方差分析(One-way analysis of variance), $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 TGF- β 1诱导对PC3细胞形态及细胞迁移能力的影响

TGF- β 1处理72 h后, 倒置相差显微镜观察PC3细胞形态的变化。结果发现, 对照组细胞呈多角形“铺路石样”, 细胞之间连接紧密。TGF- β 1处理条件下的PC3细胞呈梭形“间叶细胞样”, 散在生长(图1A)。进一步采用细胞划痕实验和Transwell实验检测PC3细胞的迁移能力。TGF- β 1处理48 h后, 处理组细胞中间的划痕间隙与对照组相比明显变窄(图1B)。Transwell实验结果显示, TGF- β 1处理组细胞穿过Transwell小室的数量比对照组显著性增多($P < 0.05$)(图1C)。因此, 通过肿瘤细胞划痕实验及Transwell实验, 我们初步证实TGF- β 1诱导能增强PC3细胞的迁移能力。

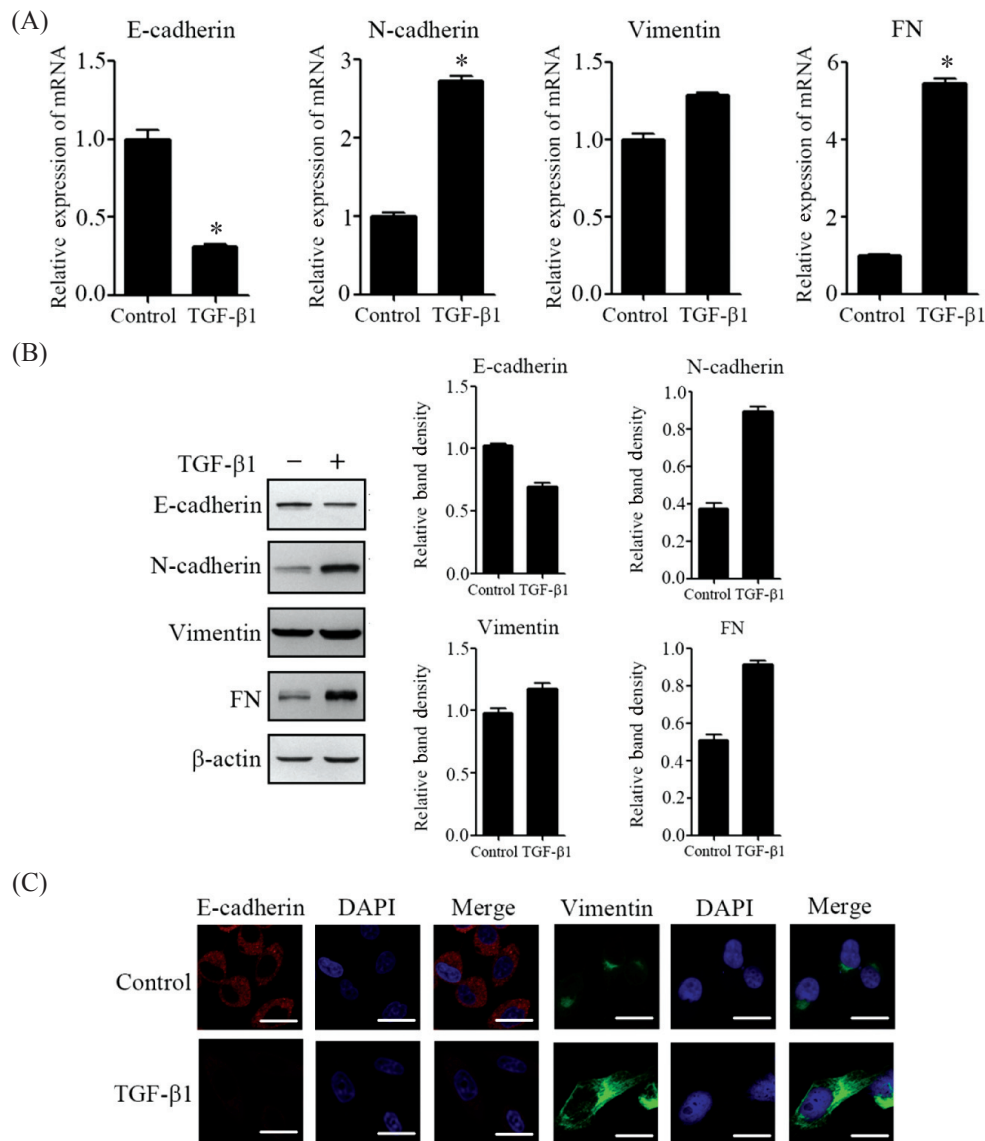


A: 相差显微镜观察TGF- β 1诱导的PC3细胞形态变化; B: 划痕实验检测TGF- β 1诱导的PC3细胞迁移能力的变化; C: Transwell实验检测TGF- β 1诱导的PC3细胞迁移能力的变化。标尺=100 μ m。

A: phase contrast images of PC3 cells treated with or without TGF- β 1 (10 ng/mL) for 72 h; B: wound healing assay of PC3 cells treated with or without TGF- β 1 (10 ng/mL) for 48 h; C: Transwell cell migration assay of PC3 cells treated with or without TGF- β 1 (10 ng/mL) for 48 h. Bar=100 μ m.

图1 TGF- β 1诱导PC3细胞形态及迁移能力的变化

Fig.1 The change of cell morphology and migration in TGF- β 1 induced PC3 cells



A: TGF- β 1诱导下, PC3细胞EMT标记物mRNA表达水平的变化; B: TGF- β 1诱导下, PC3细胞EMT标记物蛋白表达水平的变化; C: 免疫荧光染色检测TGF- β 1诱导下的PC3细胞EMT标记物表达的变化, 红色: E-cadherin, 绿色: vimentin, 蓝色: 细胞核; 标尺=20 μ m。

A: mRNA expression of EMT markers in PC3 cells treated with or without TGF- β 1 (10 ng/mL) for 72 h; B: protein expression of EMT markers in PC3 cells treated with or without TGF- β 1 (10 ng/mL) for 72 h; C: immunofluorescence staining of EMT markers in PC3 cells with TGF- β 1 treatment, Red: E-cadherin, Green: vimentin, Blue: nuclei; bar=20 μ m.

图2 TGF- β 1诱导引起PC3细胞EMT标记物表达的变化

Fig.2 The change in EMT markers expression in PC3 cells induced by TGF- β 1

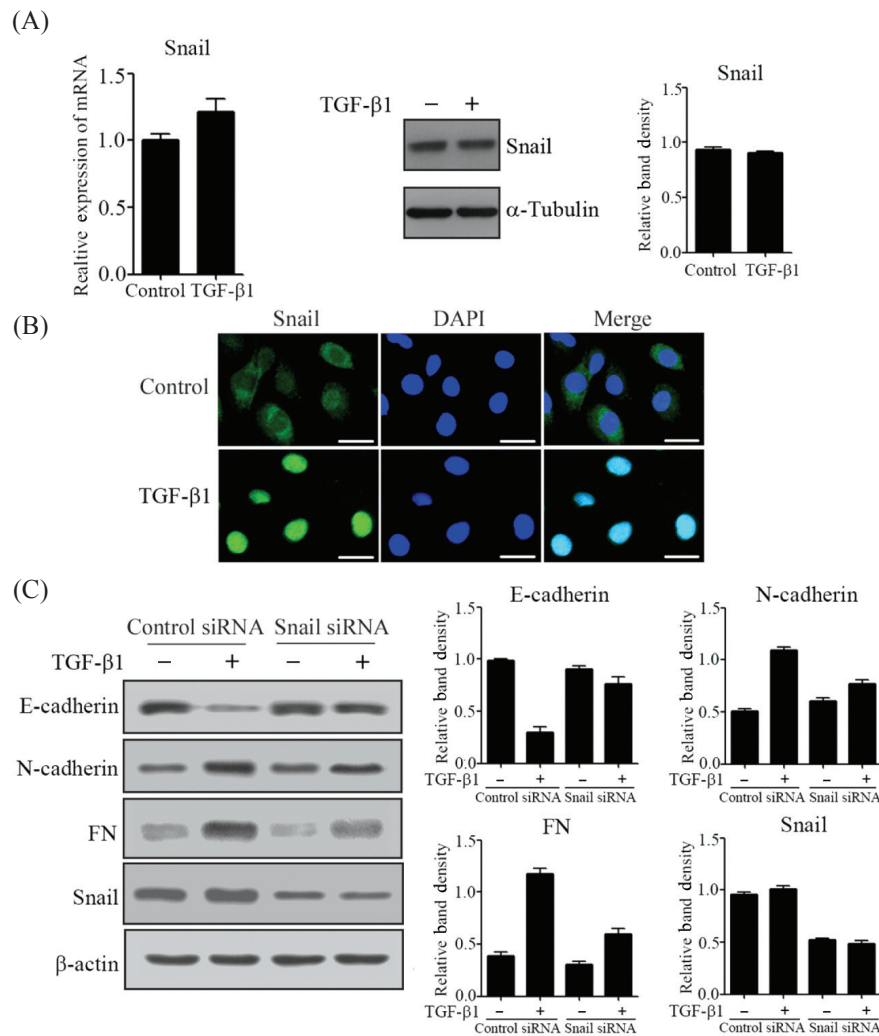
2.2 TGF- β 1诱导对PC3细胞EMT相关标志物表达的影响

TGF- β 1处理PC3细胞72 h后, 分别提取细胞总RNA和细胞总蛋白, Real-time PCR、Western blot检测细胞内上皮型蛋白标志物E-cadherin、间叶型蛋白标志物Vimentin、N-cadherin和FN的表达变化。如图2所示, TGF- β 1能够明显地抑制E-cadherin mRNA和蛋白的表达、促进Vimentin、N-cadherin以及FN mRNA和蛋白的表达(图2A和图2B)。此外, 通

过细胞免疫荧光实验也证实了Western blot的结果, E-cadherin蛋白表达明显下调, 而Vimentin蛋白表达明显上调(图2C)。

2.3 Snail在TGF- β 1诱导PC3细胞EMT发生中的作用

为了进一步解释TGF- β 1诱导PC3细胞EMT发生的分子机制, 我们对EMT过程中关键转录因子Snail进行了检测。结果发现TGF- β 1处理的PC3细胞, Snail的mRNA和蛋白表达与对照组相比没有明显的



A: Snail在TGF- β 1诱导的PC3细胞中mRNA和蛋白水平的变化; B: 免疫荧光染色检测TGF- β 1诱导的PC3细胞中Snail的入核, 绿色: Snail, 蓝色: 细胞核, 标尺=20 μ m; C: 干扰Snail之后, EMT标记物在TGF- β 1诱导下的蛋白水平的变化。

A: mRNA and protein expression of Snail in PC3 cells treated with or without TGF- β 1(10 ng/mL) for 72 h; B: immunofluorescence staining of Snail nuclear localization in PC3 cells with TGF- β 1 treatment, Green: Snail, Blue: nuclei, bar=20 μ m; C: protein expression of EMT markers in TGF- β 1-induced PC3 cells transfected with Snail siRNA for 48 h.

图3 TGF- β 1诱导PC3细胞发生EMT的机制

Fig.3 The mechanism of TGF- β 1-induced EMT in PC3 cells

变化(图3A)。然而, 免疫荧光实验发现TGF- β 1能显著促进Snail的入核(图3B)。进一步采用RNA干扰技术干扰细胞内Snail的表达再进行TGF- β 1处理, 结果发现干扰Snail能明显逆转TGF- β 1对PC3细胞上皮型蛋白标志物E-cadherin的抑制作用, 以及对间叶型蛋白标志物N-cadherin、FN的诱导作用(图3C)。

3 讨论

前列腺癌骨转移是恶性前列腺癌的主要特征之一, 是导致前列腺癌患者死亡的首要因素。研究表明, 前列腺癌中TGF- β 表达水平与临床预后不良

密切相关, TGF- β 可通过促血管新生、抑制宿主免疫系统、诱导细胞自身及周围基质微环境改变等多种机制促使前列腺癌进展^[3]。丁国芳等^[8]检测前列腺癌组织中TGF- β 的表达, 结果显示前列腺癌组织TGF- β 的表达率明显高于癌旁正常组织, 低分化癌、转移癌TGF- β 表达的阳性率明显高于高分化癌, 提示TGF- β 可促进前列腺癌的生长, 增强前列腺癌的侵袭能力, 从而导致前列腺癌的转移。

EMT是上皮细胞与周围间质相互作用过程中逐渐获得某些间叶细胞特有表型, 目前被认为是肿瘤转移的关键启动步骤, 参与包括前列腺癌在内

的多种肿瘤的侵袭、转移过程^[9]。近年来,在肿瘤发生发展及某些纤维化疾病的过程中, TGF- β 作为EMT的主要诱导剂备受关注^[5]。研究发现, TGF- β 同样参与了前列腺癌EMT过程。Ao等^[10]发现, TGF- β 可抑制非致瘤性前列腺细胞株BPH1的生长,但可诱导致瘤性的前列腺细胞株BPH1CAFTD1、BPH1-CAFTD3、BPH1CAFTD5发生EMT。Yang等^[11]发现, TGF- β 超家族成员BMP7可诱导人前列腺癌细胞株PC3发生EMT。我们发现,未处理的前列腺癌PC3细胞呈典型的上皮细胞形态,经TGF- β 1处理后大部分细胞形态向长梭形“间叶细胞样”转变,细胞间连接也变得疏松,细胞散在分布,同时细胞的迁移能力明显增强。通过检测EMT相关基因和蛋白表达分析,证实了前列腺癌PC3细胞经过TGF- β 1诱导后确实发生了EMT,其中上皮型标志蛋白E-cadherin显著下降,间叶型标志蛋白N-cadherin、Vimentin和FN显著增加,从而导致PC3细胞渐渐失去了上皮细胞的特性和功能。

肿瘤EMT发生主要受一类转录抑制因子超家族成员调控,其中Snail是肿瘤EMT发生的一个重要的调节者^[12]。众多研究表明,Snail在肿瘤组织中被异常活化,通过调控肿瘤细胞发生EMT的改变从而赋予肿瘤细胞移动和侵袭的能力^[13-14]。我们发现,干扰Snail转录因子明显逆转TGF- β 1对PC3细胞EMT的诱导作用,说明Snail转录因子是TGF- β 1诱导PC3细胞EMT发生的关键分子。此外, TGF- β 1虽然不能促进Snail的表达,但是能显著促进Snail的入核而激活Snail,进而发挥其对EMT标志蛋白的转录调控作用,使E-cadherin等上皮型蛋白标志物的表达下调, Vimentin等间叶型蛋白标志物的表达上调,最终导致EMT的发生和肿瘤转移。

总之,我们研究发现TGF- β 1能够通过介导Snail的入核而激活Snail,促进前列腺癌PC3细胞的发生以及增强细胞浸润和转移能力,为靶向抑制前列腺癌EMT发生和转移提供重要的理论基础。

参考文献 (References)

- 1 Sturge J, Caley MP, Waxman J. Bone metastasis in prostate cancer: Emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8(6): 357-68.
- 2 Danielpour D. Functions and regulation of transforming growth factor beta in the prostate. *Eur J Cancer* 2005; 41(6): 846-57.
- 3 Jones E, Pu H, Kyprianou N. Targeting TGF-beta in prostate cancer: Therapeutic possibilities during tumor progression. *Expert Opin Ther Targets* 2009; 13(2): 227-34.
- 4 Książkiewicz M, Markiewicz A, Zaczek AJ. Epithelial-mesenchymal transition: A hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells. *Pathobiology* 2012; 79(4): 195-208.
- 5 Wendt MK, Allington TM, Schiemann WP. Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition by TGF-beta. *Future Oncol* 2009; 5(8): 1145-68.
- 6 Shahrokh FS, Michael WK, Traxel E, Andrews B, Zhu K, Wheeler TM, *et al.* Association of pre- and post-operative plasma levels of transforming growth factor-beta(1) and interleukin 6 and its soluble receptor with prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 2004; 10(6): 1992-9.
- 7 Wikstrom P, Damber JE, Bergh A. Role of transforming growth factor-beta 1 in prostate cancer. *Microsc Res Tech* 2001; 52(4): 411-9.
- 8 丁国芳, 徐银峰, 杨最素. TGF- β 1在前列腺癌中的表达及其与生存率关系的研究. *浙江医学(Ding Guofang, Xu Yinfeng, Yang Zuisu. The expression of TGF- β 1 in prostate cancer and its relation with survival rat of patients. Zhejiang Yi Xue)* 2006; 28(9): 709-11.
- 9 Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(6): 442-54.
- 10 Ao M, Williams K, Bhowmick NA, Hayward SW. Transforming growth factor-beta promotes invasion in tumorigenic but not in nontumorigenic human prostatic epithelial cells. *Cancer Res* 2006; 66(16): 8007-16.
- 11 Yang S, Zhong C, Frenkel B, Reddi AH, Roy-Burman P. Diverse biological effect and smad signaling of bone morphogenetic protein7 in prostate tumor cells. *Cancer Res* 2005; 65(13): 5769-77.
- 12 Batlle E, Sancho E, Franci C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, *et al.* The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000; 2(2): 84-9.
- 13 Lee MY, Chou CY, Tang MJ, Shen MR. Epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer: Correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor overexpression, and snail up-regulation. *Clin Cancer Res* 2008; 14(15): 4743-50.
- 14 Shin NR, Jeong EH, Choi CI, Moon HJ, Kwon CH, Chu IS, *et al.* Overexpression of Snail is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric cancer. *BMC Cancer* 2012; 12: 521.