

Nodal诱导小鼠黑色素瘤B16细胞上皮-间质 转化及体外迁移和侵袭

方瑞 郭强 张帆 由振源 杜军*

(中山大学药学院微生物与生化制药实验室, 广州 510006)

摘要 考察转化生长因子- β 家族成员Nodal蛋白诱导小鼠黑色素瘤B16细胞发生上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transitions, EMT)及促进其迁移和侵袭能力的作用。该研究采用活性重组Nodal蛋白刺激体外培养的B16细胞, 观察细胞形态变化, 利用蛋白免疫印迹法及免疫荧光染色法检测EMT标志物的表达及定位。通过Transwell小室实验分析Nodal对B16细胞迁移和侵袭的影响。检测Nodal刺激后, AKT、ERK相关信号通路的活化状态, 并考察Nodal受体抑制剂SB431542对Nodal诱导的细胞EMT过程及信号活化的抑制作用。研究结果显示, Nodal可引起B16细胞发生EMT, 并具有时间和浓度依赖性。Nodal刺激后的细胞其迁移和侵袭能力都明显增强。此外, Nodal还可引起AKT、ERK信号通路的活化。以上作用均能被SB431542所抑制。该研究为深入研究Nodal在黑色素瘤恶性转化过程中的生物学作用和分子机制奠定了工作基础。

关键词 Nodal; 上皮间质转化; 黑色素瘤; 侵袭; 信号通路

Nodal Induces Epithelial-Mesenchymal Transition and Promotes Migration and Invasion of B16 Murine Melanoma Cells

Fang Rui, Guo Qiang, Zhang Fan, You Zhenyuan, Du Jun*

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

Abstract The main object of the research was to investigate the role of Nodal, a member of transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily, in inducing B16 cells epithelial-mesenchymal transition (EMT) and promoting their migration and invasion abilities. The main methods used in this study included Western blot analysis, immunofluorescence staining and transwell cell invasion assay. Briefly, the cells were treated with recombinant mouse Nodal protein at several concentrations for different time periods and observed the morphological changes with microscope. The protein levels of EMT markers such as E-cadherin and Vimentin were detected by Western blot and indirect immunofluorescence analysis. The migration and invasion abilities of B16 cells were evaluated with transwell cell assay *in vitro*. Besides, the activation of AKT and ERK signal pathways were also detected in rNodal treated cells. SB431542, a typical inhibitor of Nodal receptors, was used in the experiments to identify its blocking role on Nodal induced-EMT process. The results showed that Nodal could

收稿日期: 2013-04-27 接受日期: 2013-06-09

中国博士后科学基金(批准号: 2013M531894)和国家自然科学基金(批准号: 81272311、81071712)资助的课题

*通讯作者。Tel/Fax: 020-39943022, E-mail: dujun_tg@163.com

Received: 2013-04-27 Accepted: July 9, 2013

This work was supported by China Postdoctoral Science Foundation (Grant No.2013M531894) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81272311, 81071712)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-39943022, E-mail: dujun_tg@163.com

网络出版时间: 2013-08-16 13:56 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130816.1356.001.html>

induce EMT phenotypic changes in B16 cells in a time- and concentration-dependent manner. The mobility and invasiveness of B16 cells were both enhanced upon Nodal stimulation. Also, there might be a crosstalk between AKT, ERK and Nodal signals. All the above functions of Nodal could be inhibited by SB431542. In summary, this study demonstrated that Nodal induced EMT in B16 cells and thereby promoting their migration and invasion abilities, which will provide a foundation for further research on biological function and molecular mechanism of Nodal in melanoma malignant transformation.

Key words Nodal; EMT; melanoma; invasion; signal pathway

黑色素瘤是一类恶性度较高的皮肤癌,可从早期局部浸润迅速发展进入垂直生长期,侵入真皮层并发生肝、肺转移。在黑色素瘤的恶性转化过程中,转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族成员Nodal蛋白可能起到了重要作用。Nodal是胚胎发育过程中介导中内胚层形成的关键蛋白,其在胚胎发育早期高表达,成体组织中很难检测到Nodal的存在。近年来,有诸多研究发现,Nodal在黑色素瘤、乳腺癌、胃癌等多种恶性肿瘤中的表达显著增加^[1-5],与肿瘤临床分期及预后存在着密切关联。

通过对黑色素瘤临床资料的研究发现,Nodal蛋白在正常皮肤和低侵袭性黑色素瘤中呈不表达或低表达状态,而在超过60%的侵袭性黑色素瘤样本中高表达^[1]。另有研究发现,在黑色素细胞异常增生形成恶性肿瘤的过程中,Nodal表达明显增强,血管内皮钙黏蛋白(vascular endothelial cadherin, VE-cadherin)过度上调;当Nodal受到抑制时,内皮钙黏蛋白的表达减弱,侵袭性黑色素瘤发生良性转化,提示Nodal促进黑色素瘤恶性表型可能与其诱导肿瘤血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)有关^[6]。随着相关研究的增多及深入,Nodal在肿瘤发生发展中的生物学作用正在逐步被揭示,并有望成为新的肿瘤标志物以及肿瘤治疗的新靶点。

本课题组在研究中发现,Nodal蛋白可引起小鼠黑色素瘤B16细胞发生间质样的形态变化。由于TGF- β 是细胞上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transitions, EMT)经典的诱导因子,而Nodal与TGF- β 信号通路相似,主要通过细胞膜上丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶样I型受体ALKs(ALK4/7)和II型受体ActR II的介导,磷酸化激活Smad(Sma/Mothers Against Decapenta-plegic)家族蛋白Smad2和/或Smad3,最后Smad2、3、4形成活性三聚体转入核中,调控下游靶基因的转录^[7]。因此,我们推测Nodal信号可能也

具有类似的激活下游EMT相关基因的转录和表达的作用。

EMT被用来描述在特定的生理和病理情况下,上皮细胞向间充质细胞转分化,并伴随有细胞形态与相关基因改变的过程^[8]。早期对EMT的研究主要集中于胚胎发育、组织修复和器官纤维化。近年来,研究发现EMT还是上皮型肿瘤发生转移的一个关键步骤^[9]。在肿瘤转移早期,肿瘤细胞需要获得迁移和侵袭能力,才能离开原发灶,穿越机体组织,到达靶部位形成转移灶。发生EMT的肿瘤细胞,其细胞表面黏附力较强的E-钙黏蛋白下调,致使细胞丧失上皮极性,胞间连接疏松,获得了移动潜能^[10];同时,原先以角蛋白为主的细胞骨架结构转化为以波形蛋白为主,从而使多角形的上皮细胞转变成纺锤状,细胞的运动能力也有所增强^[11-12];此外,包括基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)在内的蛋白水解酶类表达上调,降解基底膜和细胞外基质成分,有助于细胞从癌巢脱落向局部外周组织浸润、侵袭^[13]。最终,肿瘤细胞随血液、淋巴等循环途径转移到机体其他部位,重新在靶器官或组织内滞留、着床,形成转移灶。

可见,EMT是肿瘤细胞发生浸润和继发性转移的重要机制之一。考虑到Nodal的表达与临床肿瘤恶性分期成正相关,是否由于Nodal信号的活化诱导了肿瘤细胞EMT从而促进其恶性表型尚有待证实。因此,本研究拟通过体外实验探讨Nodal诱导小鼠黑色素瘤B16发生EMT的表型变化及对细胞迁移、侵袭能力的影响,为进一步深入研究Nodal在介导肿瘤EMT中的作用和机制奠定工作基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、细胞因子及抗体 小鼠黑色素瘤细胞株B16购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资

源中心。重组小鼠Nodal蛋白购自R&D systems; 小鼠抗p-Smad2(Ser465/467)、Smad2、p-Akt(Ser473)、Akt、p-Erk1/2(Thr202/Tyr204)单克隆抗体购自Cell Signal Technology公司; 小鼠抗E-cadherin、Vimentin、Erk1/2、GAPDH单克隆抗体购自Santa Cruz公司; HRP标记山羊抗小鼠IgG购自广州鼎国生物技术有限公司。FITC标记羊抗小鼠IgG、RhoB标记羊抗小鼠IgG购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.1.2 其他试剂及耗材 小分子抑制剂SB431542购自Santa Cruz公司; RPMI 1640培养基、胎牛血清(FBS)购自Hyclone公司; 蛋白酶抑制剂混合物、磷酸酶抑制剂混合物(cocktails, 100×)购自南京凯基生物科技发展有限公司; 山羊血清封闭液购自广州洁利生物有限公司; Matrigel Basement Membrane Matrix购自BD公司; Transwell 24孔细胞培养板(8 μ m孔径)购自Corning公司; 细胞培养皿及多孔培养板购自Nest公司; 蛋白预染marker购自Fermentas公司; PVDF膜购自Bio-Rad公司; 化学发光试剂盒购自PERCE公司。其他常规试剂进口分装或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 Nodal诱导B16细胞EMT的浓度及时间效应 B16细胞以 1×10^5 /mL的密度接种至6孔培养板中, 待细胞进入对数生长期后血清饥饿12 h, 然后向细胞培养上清中加入终浓度为0.5~1.5 μ g/mL的重组小鼠Nodal蛋白(rNodal, 以含0.1% BSA的无菌1 mmol/L HCl/PBS溶液配制成浓度为100 μ g/mL的储存液), 并设溶剂对照, 于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养24 h后镜下观察。确定合适的刺激浓度后, B16细胞同上处理, 血清饥饿后加入该浓度rNodal刺激0~48 h, 镜下观察细胞形态, 并检测EMT标志物的表达情况。

1.2.2 蛋白免疫印迹检测B16细胞EMT标志物的表达情况 收集rNodal刺激0~48 h的B16细胞, 提取细胞总蛋白, 经Bradford法定量后, 进行SDS-AGE电泳分离并转印至PVDF膜。利用封闭液(5%脱脂奶粉/PBS)室温封闭90 min后, 分别孵育抗E-cadherin、Vimentin、GAPDH单抗(1:1 000), 4 $^{\circ}$ C过夜。次日用PBS-T(0.1%吐温20/PBS)洗膜3次, 室温下孵育二抗(1:5 000) 90 min。PBS-T洗膜3次后, 采用ECL化学发光试剂盒进行检测, X光片显影、定影, 分析Nodal刺激后细胞中上皮/间质标志物的表达改变。

1.2.3 免疫荧光染色检测B16细胞EMT标志物的表达及定位 B16细胞以 4×10^4 /mL的密度接种至盖

玻片上, 待细胞进入对数生长期后血清饥饿12 h, 向培养上清中加入终浓度为1 μ g/mL的rNodal, 对照组不处理。24 h后细胞用4 $^{\circ}$ C预冷的4%多聚甲醛固定30 min, 继用山羊血清室温封闭30 min, 分别加入抗E-cadherin和Vimentin抗体(封闭液1:100稀释)室温孵育1 h。PBS洗涤3次后分别与FITC或RhoB标记的羊抗鼠IgG(1:1 000稀释)室温孵育45 min。PBS洗涤3次后甘油封片, 激光共聚焦显微镜下观察。

1.2.4 SB431542对Nodal诱导EMT的抑制效应检测 B16细胞接种至6孔培养板中, 进入对数生长期后血清饥饿12 h, 然后向细胞培养上清中加入终浓度为1 μ g/mL的rNodal, 同时加入或者不加入终浓度为10 μ mol/L的SB431542(以下简称SB), 并设空白对照, 于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养24 h后, 蛋白免疫印迹法检测细胞中EMT标志物的表达。

1.2.5 Transwell细胞体外迁移、侵袭实验 在细胞迁移实验中, 取对数生长期的B16细胞血清饥饿12 h后, 分为空白对照组、rNodal组、SB组和rNodal+SB组, 分别向各组上清中加入对应药物处理24 h。然后向上室加入300 μ L无血清培养基, 置于细胞培养箱中水化4~6 h。消化收集各预处理组的B16细胞, 用含0.1% FBS的培养基重悬细胞并调整密度为 4×10^5 /mL, 各取150 μ L加入对应的培养小室中。培养板下室中加入约600 μ L含5% FBS的培养基, 上室培养基中添加相应药物(终浓度为10 μ mol/L的SB或者1 μ g/mL的rNodal)以维持刺激, 并设阴性对照。细胞培养24 h后, 吸去下室液体, 用4%多聚甲醛对已穿过基质胶进入下室贴壁生长的B16细胞进行固定, 苏木素染色, 直径上取4个视野, 拍照, 计数, 并作统计学分析。

在细胞侵袭实验中, Transwell小室水化前, 将基质胶Matrigel与4 $^{\circ}$ C预冷的RPMI 1640培养基按1:1的比例混匀, 吸取40 μ L加入上室, 37 $^{\circ}$ C包被6 h后进行水化。其余步骤同细胞迁移实验操作。

1.2.6 信号通路检测 对数生长期的B16细胞血清饥饿12 h, 向培养上清中加入终浓度为0.5或1 μ g/mL的rNodal刺激5, 15, 30, 60 min, 用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的蛋白裂解液提取细胞总蛋白, 蛋白免疫印迹法检测Smad2、Akt、Erk1/2的磷酸化状态。检测胞内Smad2、Akt、Erk1/2总蛋白时, 将曝光后的PVDF膜用PBS-T漂洗3次去除残留的发光液, 浸泡于Stripping Buffer(100 mmol/L β -巯基乙醇, 2%(w/v)

SDS, 62.5 mmol/L Tris-HCl, pH6.8)中, 于50 °C孵育并振荡20~30 min以解离结合的抗体。继而用PBS-T洗涤3次, 再分别与相应的抗Smad2、Akt、Erk1/2总蛋白及GAPDH的抗体4 °C孵育过夜, 次日洗涤, 孵育二抗, 曝光、显影。

1.2.7 SB431542对Nodal诱导信号通路活化的抑制效应 进入对数生长期的B16细胞血清饥饿12 h, 然后向细胞培养上清中加入终浓度为1 $\mu\text{g/mL}$ 的rNodal, 同时加入或者不加入终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 的SB, 设空白对照, 2 h后提取细胞总蛋白, 检测Smad2、Akt、Erk1/2的磷酸化水平。

1.2.8 统计学分析 实验数据以三次独立实验的平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用*t*检验比较两组间差异的显著性, 用SPSS 14.0软件进行统计分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

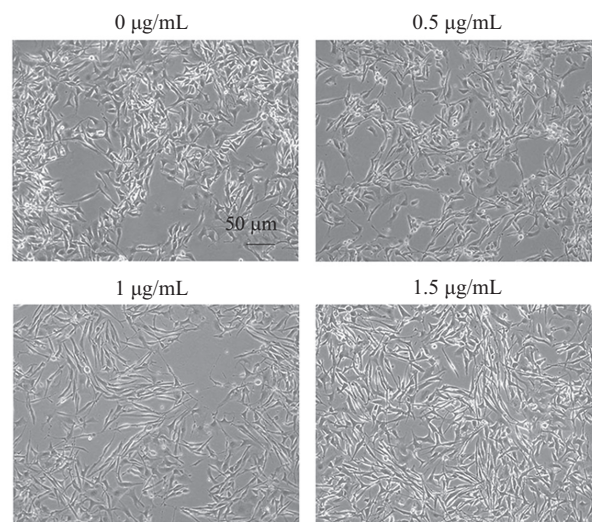
2 结果

2.1 Nodal可引起B16细胞发生间质样形态变化, 并具有浓度、时间依赖性

采用低、中、高三个浓度rNodal处理B16细胞24 h后, 镜下观察细胞形态。结果如图1所示, 与对照组相比, Nodal刺激组B16细胞形态狭长, 呈纺锤型有序排列, 其中中、高浓度组(1~1.5 $\mu\text{g/mL}$)细胞形态变化更为明显, 说明Nodal能够引起B16细胞发生间质样形态变化。

随后, 我们对Nodal诱导B16细胞发生形态变

化的时效性进行了检测。向血清饥饿过夜的B16细胞培养上清中加入终浓度为1 $\mu\text{g/mL}$ 的rNodal刺激0~48 h。结果如图2所示, B16细胞在rNodal刺激24 h后即出现明显的EMT样形态改变, 48 h后细胞呈十分典型的涡旋状排列。以上结果表明, B16细胞对于Nodal刺激较为敏感, 能够迅速产生应答并发生形态改变, 且具有一定的剂量和时间依赖性。

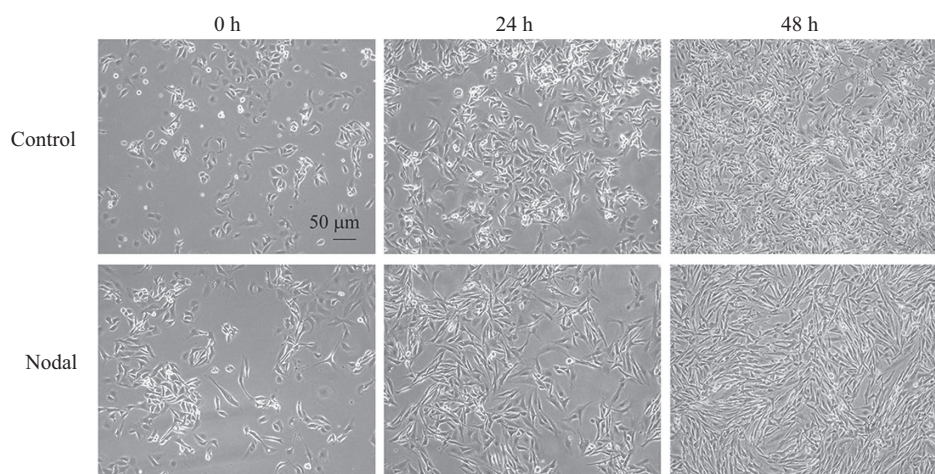


显微镜下观察0~1.5 $\mu\text{g/mL}$ 重组小鼠Nodal蛋白刺激B16细胞24 h后细胞形态的变化。

The morphological changes of B16 cells treated with recombinant mouse Nodal protein (0~1.5 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h were observed with microscope.

图1 不同浓度Nodal蛋白诱导B16细胞发生间质样形态变化

Fig.1 Morphologic changes in B16 cells upon Nodal stimulation at different concentrations

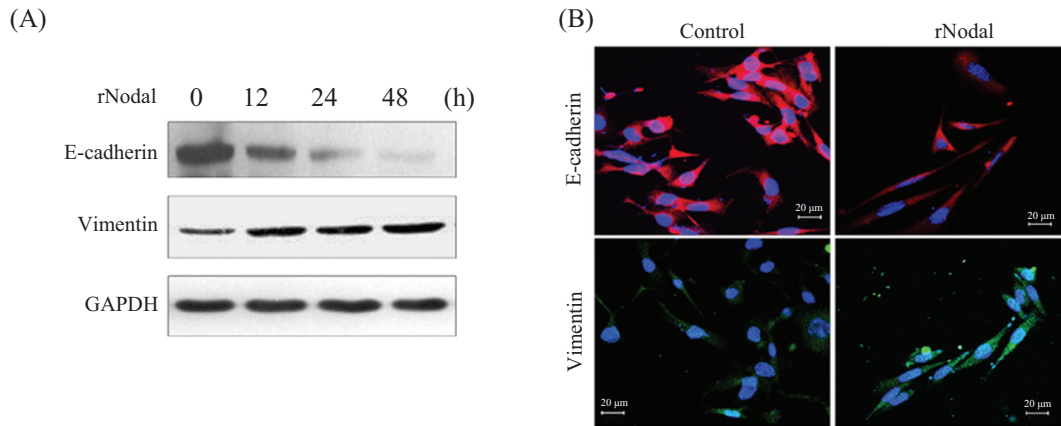


显微镜下观察体外正常培养的B16细胞以及采用1 $\mu\text{g/mL}$ 重组小鼠Nodal蛋白刺激24 h及48 h后细胞形态的变化。

The morphological changes of B16 cells treated with or without recombinant mouse Nodal protein (1 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h and 48 h were observed with microscope.

图2 Nodal刺激不同时间诱导B16细胞发生间质样形态变化

Fig.2 Morphologic changes of B16 cells upon Nodal stimulation for different time periods



A: rNodal刺激B16细胞12~48 h, 上皮标志物E-钙黏蛋白水平显著下调, 间质标志物波形蛋白上调; B: rNodal刺激B16细胞24 h, 激光共聚焦显微镜下观察细胞形态梭长、排列疏松, E-钙黏蛋白表达下调, 波形蛋白上调。标尺=20 μm。

A: the protein level of epithelial marker E-cadherin was dramatically down-regulated, while the expression of mesenchymal marker Vimentin consistently increased in B16 cells treated with rNodal for 12 to 48 h; B: the cells treated with rNodal for 24 h exhibited prolonged, loosely arranged morphology, as well as weakened E-cadherin expression and enhanced Vimentin expression. Bar=20 μm.

图3 Nodal对B16细胞EMT标志物表达变化的蛋白免疫印迹(A)及免疫荧光检测(B)

Fig.3 Western blot (A) and Immunofluorescence (B) assays of EMT markers in Nodal treated B16 cells

2.2 Nodal引起B16细胞上皮/间质标志物的表达变化

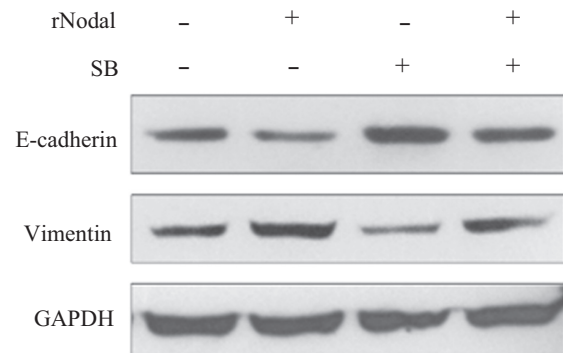
收集Nodal刺激不同时间点的B16细胞, Western blot及免疫荧光检测其中上皮标志物E-钙黏蛋白(E-cadherin)和间质标志物波形蛋白(Vimentin)的表达。结果显示, E-钙黏蛋白的表达随Nodal刺激时间的延长显著下降, 而波形蛋白的蛋白水平则持续上调(图3A)。激光共聚焦显微镜下观察对照组细胞排列紧密, E-钙黏蛋白在细胞连接处有强烈表达, 波形蛋白表达较弱; 而Nodal刺激24 h后即可观察到细胞形态梭长, 排列疏松, E-钙黏蛋白表达明显减弱, 波形蛋白表达增强(图3B)。以上结果从分子水平上证明, Nodal介导的B16细胞的形态变化为典型的EMT。

2.3 Nodal诱导的EMT可被受体抑制剂SB431542所抑制

为了进一步证实Nodal诱导B16细胞发生EMT的生物学作用, 我们在利用rNodal(1 μg/mL)刺激细胞的同时, 向培养上清中加入或不加入Nodal受体抑制剂SB(10 μmol/L), 检测细胞中EMT标志物的表达情况。结果如图4所示, SB处理对于rNodal引起的E-钙黏蛋白下调及波形蛋白上调具有明显的抑制作用。

2.4 Nodal促进B16细胞的迁移和侵袭

EMT往往是肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力, 并



当培养体系中添加SB431542后, rNodal引起的E-钙黏蛋白的下调和波形蛋白的上调现象被抑制甚至逆转。

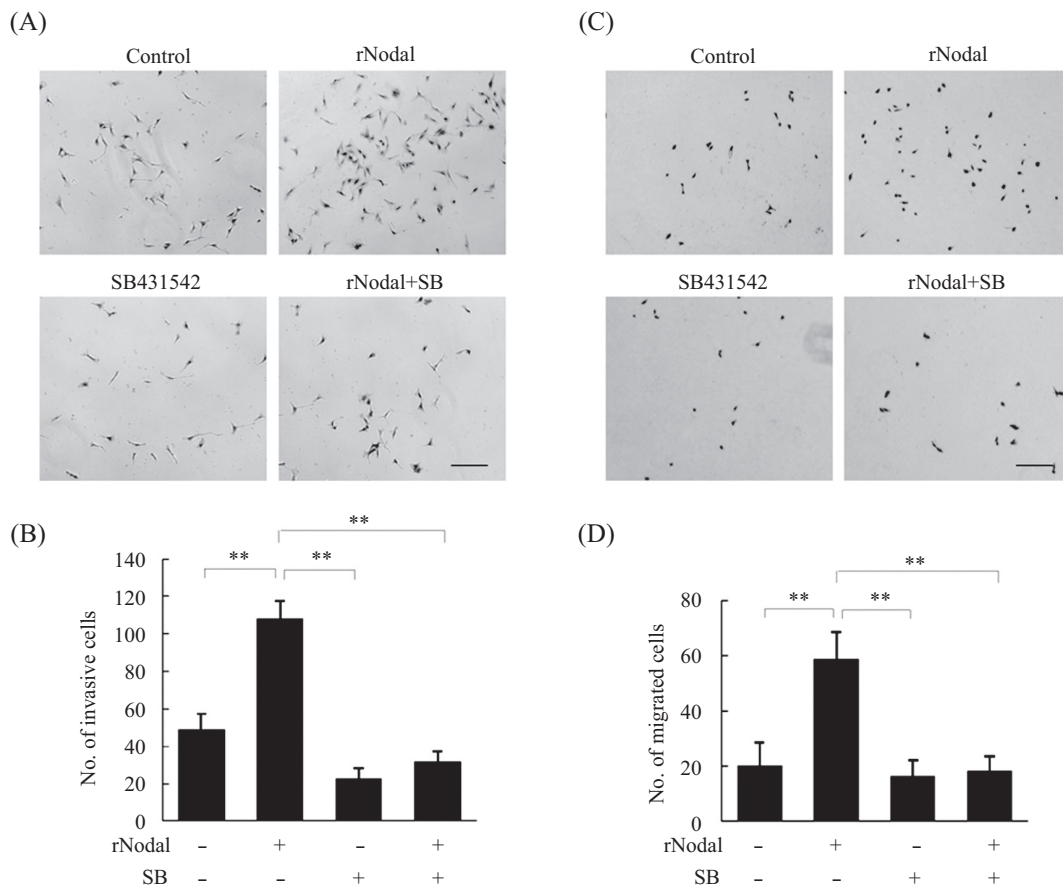
Down-regulation of E-cadherin and up-regulation of Vimentin induced by Nodal could be inhibited or even inverted in the presence of SB431542.

图4 SB对Nodal诱导EMT的抑制作用

Fig.4 Inhibition of SB on Nodal induced EMT

向周围组织浸润、发生转移的起始。因此, 我们采用Transwell小室实验对Nodal处理后的B16细胞的迁移和侵袭能力进行了检测。结果显示, rNodal作用24 h之后, 穿越小室底层仿生基底膜进入下室贴壁生长的细胞数量比对照组、SB组及Nodal+SB共同处理组的细胞均明显增多, 组间差异具有显著性(图5A和5B), 以上结果说明细胞经Nodal诱导发生EMT后, 其运动移行能力显著增强。

当培养小室底层预铺基质胶后, 穿越小室的细胞数目有所下降。但与其他三组相比, rNodal作用



A,C: Nodal组细胞迁移(A)或侵袭(C)入下室的数量与其他三组比较明显增多。SB能够抑制细胞迁移和侵袭, SB组与rNodal+SB组细胞的迁移及侵袭能力相当; B,D: B16用各处理因素处理24 h后, 对迁移(B)或侵袭(D)进入下室的B16细胞进行计数并作统计分析, $**P < 0.001$ 。标尺=100 μm 。A,C: the number of migrated (A) and invasive (C) B16 cells increased obviously in rNodal treated group. SB showed inhibition effect on cell invasion, while there was no significant difference between SB and SB plus rNodal treated group; B,D: the number of migrated (B) and invasive (D) B16 cells were counted and subjected to statistical analysis after the cells stimulated with processing factors for 24 h, $**P < 0.001$. Bars=100 μm .

图5 rNodal及SB对于B16细胞迁移(A,B)及侵袭能力(C,D)的影响

Fig.5 Effects of rNodal or SB treatment on migration (A,B) and invasiveness (C,D) of B16 cells

组依然有较多的侵袭细胞进入下室(图5C和5D), 提示Nodal诱导发生EMT的肿瘤细胞, 其分泌的蛋白水解酶量或活性有所提高, 对基质胶的降解能力增强, 从而有助于细胞的侵袭和浸润。

2.5 Nodal可引起AKT、ERK信号通路的活化

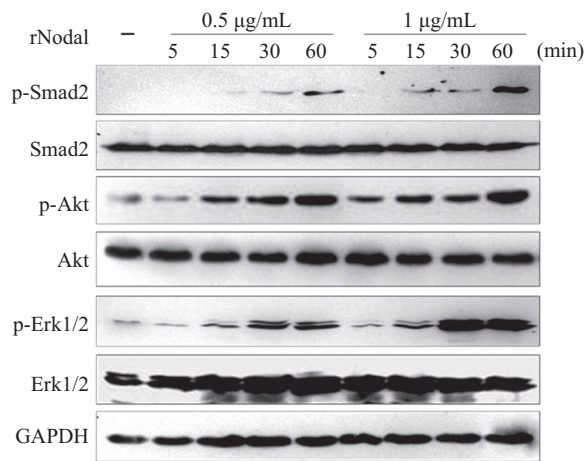
已有文献报道TGF- β 1除了经典的SMAD信号通路外, 还可激活PI3K/AKT信号通路调节EMT相关靶基因的转录^[14-15], 以及通过Ras/Raf通路激活ERK, 从而调节EMT关键转录因子Snail及其靶基因E-钙黏蛋白的转录和表达^[16-17]。鉴于Nodal是TGF- β 家族成员, 我们推测其也可能具有激活上述信号通路从而介导EMT的作用。因此, 我们对Nodal通路、AKT通路及ERK通路的活化状态进行了检测。

由于Smad2是Nodal信号通路中最先磷酸化激

活的胞内分子, 因此通过检测Smad2的磷酸化水平以反映Nodal信号的活化状态。结果如图6所示, 未处理的B16细胞中磷酸化Smad2蛋白几乎无法检出, 提示Nodal通路在体外正常培养的细胞中处于低活化状态。Akt和Erk1/2有一定程度的磷酸化, 可能与这两条通路与细胞的基础增殖、存活有关。而给予两个浓度的rNodal刺激, 均能够迅速而有效地引起Smad2、Akt和Erk1/2的磷酸化, 说明在Nodal诱导的EMT过程中, 上述三条信号通路均被激活。

2.6 AKT、ERK信号通路为Nodal特异性激活

为了进一步证实上述通路为Nodal特异性激活, 我们向培养体系中添加Nodal通路抑制剂SB, 检测Smad2、Akt和Erk1/2的磷酸化水平。结果如图7所示, Nodal诱导的Smad2、Akt和Erk1/2的磷酸化能够



B16细胞用0.5或1 µg/mL的rNodal刺激5, 15, 30, 60 min后, 蛋白免疫印迹法检测Smad2、Akt、Erk1/2的磷酸化状态。

The B16 cells treated with 0.5 or 1 µg/mL rNodal for 5, 15, 30, 60 min respectively were subjected to Western blot analysis for detection of phosphorylation of Smad2, Akt and Erk1/2.

图6 Nodal对Smad2、Akt及Erk1/2的磷酸化激活作用

Fig.6 Nodal induces phosphorylation activation of Smad2、Akt and Erk1/2

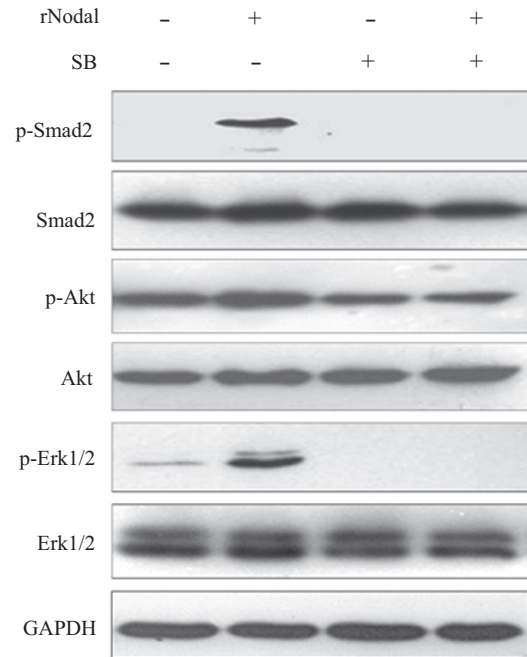
被SB所抑制, 说明AKT及ERK信号通路的激活的确由Nodal引起, 而上述三条通路在细胞EMT过程中的关系以及相互调控尚有待进一步深入研究。

3 讨论

恶性肿瘤的演进是一个多步骤的复杂过程, 包括正常细胞恶性转化、肿瘤细胞异常增殖、侵袭和转移。EMT被认为是肿瘤发生侵袭和转移的早期事件^[9]。肿瘤细胞经过EMT过程, 细胞间黏附能力下降, 迁移能力增强, 向局部组织浸润, 并发生远处转移, 最终导致肿瘤患者的死亡。

我们在研究中发现, Nodal可诱导小鼠黑色素瘤B16细胞发生上皮-间质转化。而这一过程可被Nodal受体抑制剂SB431542所抑制。由于肿瘤细胞获得迁移能力是肿瘤转移的第一步, 因此, 我们首先通过Transwell细胞迁移实验考察B16细胞的移行能力。结果发现, 经Nodal刺激后的细胞能够更加迅速的穿越仿生基底膜上的微孔, 说明细胞发生EMT后具有更强的迁移能力。

浸润能力的获得也是肿瘤细胞恶性转化过程中的一个重要环节。细胞侵袭实验中用到的Matrigel Basement Membrane Matrix来源于Engelbreth-Holm-Swarm(EHS)小鼠肉瘤的基底膜提取物。其包含层黏



B16细胞用1 µg/mL rNodal和/或10 µmol/L SB431542处理2 h后, 蛋白免疫印迹法检测Smad2、Akt、Erk1/2的磷酸化水平。

The B16 cells treated with 1 µg/mL rNodal plus 10 µmol/L SB431542 or not for 2 h were subjected to Western blot analysis for detection of phosphorylation of Smad2, Akt and Erk1/2.

图7 SB对Nodal诱导Smad2、Akt及Erk1/2的磷酸化激活的抑制作用

Fig.7 Inhibition of SB on Nodal induced phosphorylation activation of Smad2、Akt and Erk1/2

连蛋白(laminin)、IV型胶原、蛋白多糖以及细胞因子和酶类等多种基底膜成分, 已被广泛应用于体外细胞侵袭实验。研究表明, Nodal刺激后的B16细胞穿透基质胶的能力明显增强, 提示Nodal诱导的EMT可能是肿瘤细胞突破基底从而实现浸润性生长的一个重要机制。

PI3K/AKT及ERK/MAPK信号通路广泛存在于机体大多数生理及病理过程, 参与调控细胞的增殖、转分化和凋亡。这两条信号通路被证实在胚胎发育和肿瘤EMT过程中发挥作用, 并与Wnt/ β -catenin^[18]、Notch^[19]等信号通路形成复杂的调控网络。我们在研究中也发现, 上述两条通路经Nodal刺激活化, 提示它们与Nodal信号通路之间存在对话, 并可能协同调节了细胞EMT及迁移、浸润过程。

此外, 近年来不断有研究发现, EMT还具有促使肿瘤获得干细胞特性^[20]、免疫抑制^[21]、以及增强肿瘤细胞对抗凋亡和衰老^[22]等作用。因此, B16细胞迁移、侵袭能力的增强可能仅仅是Nodal诱导EMT

后某一方面的作用, 围绕Nodal在黑色素瘤恶性转化过程中的生物学功能和分子机制进行深入研究, 有望为肿瘤的临床治疗提供新靶点和新思路。

综上所述, 本研究发现TGF- β 家族成员Nodal蛋白可诱导小鼠黑色素瘤B16细胞发生EMT, 增强其移行、侵袭能力, 为肿瘤细胞降解基质, 发生浸润、转移提供便利。此外, 发生EMT的细胞中SMAD、AKT、ERK信号通路均发生活化, 提示Nodal诱导的EMT过程是个多信号共同参与的复杂过程。

参考文献 (References)

- Strizzi L, Postovit LM, Margaryan NV, Lipavsky A, Gadiot J, Blank C, *et al.* Nodal as a biomarker for melanoma progression and a new therapeutic target for clinical intervention. *Expert Rev Dermatol* 2009; 4(1): 67-78.
- 周慧俊, 钟美佐. Nodal蛋白在胃腺癌组织中的表达及意义. *山东医药*(Zhou Huijun, Zhong Meizuo. Expression and clinical significance of Nodal protein in gastric adenocarcinoma. *Shandong Medical Journal*) 2010; 50(25): 35-6.
- Figuroa JD, Flanders KC, Garcia-Closas M, Anderson WF, Yang XR, Matsuno RK, *et al.* Expression of TGF- β signaling factors in invasive breast cancers: Relationships with age at diagnosis and tumor characteristics. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 121(3): 727-35.
- Lawrence MG, Margaryan NV, Loessner D, Collins A, Kerr KM, Turner M, *et al.* Reactivation of embryonic nodal signaling is associated with tumor progression and promotes the growth of prostate cancer cells. *Prostate* 2011; 71(11): 1198-209.
- Lee CC, Jan HJ, Lai JH, Ma HI, Hueng DY, Lee YC, *et al.* Nodal promotes growth and invasion in human gliomas. *Oncogene* 2010; 29(21): 3110-23.
- McAllister JC, Zhan Q, Weishaupt C, Hsu MY, Murphy GF. The embryonic morphogen, Nodal, is associated with channel-like structures in human malignant melanoma xenografts. *J Cutan Pathol* 2010; 37 Suppl 1: 19-25.
- Shen MM. Nodal signaling: Developmental roles and regulation. *Development* 2007; 134(6): 1023-34.
- Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 2009; 119(6): 1429-37.
- Guarino M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(12): 2153-60.
- Yang AD, Camp ER, Fan F, Shen L, Gray MJ, Liu W, *et al.* Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* 2006; 66(1): 46-51.
- Zhang Q, Helfand BT, Jang TL, Zhu LJ, Chen L, Yang XJ, *et al.* Nuclear factor- κ B-mediated transforming growth factor- β -induced expression of vimentin is an independent predictor of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Clin Cancer Res* 2009; 15(10): 3557-67.
- Vuoriluoto K, Haugen H, Kiviluoto S, Mpindi JP, Nevo J, Gjerdrum C, *et al.* Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene* 2011; 30(12): 1436-48.
- Ota I, Li XY, Hu Y, Weiss SJ. Induction of a MT1-MMP and MT2-MMP-dependent basement membrane transmigration program in cancer cells by Snail1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(48): 20318-23.
- Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7(2): 131-42.
- Yi JY, Shin I, Arteaga CL. Type I transforming growth factor beta receptor binds to and activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 2005; 280(11): 10870-6.
- Javelaud D, Mauviel A. Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF- β : Implications for carcinogenesis. *Oncogene* 2005; 24(37): 5742-50.
- Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, *et al.* Ras and TGF[β] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: Dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol* 2002; 156(2): 299-313.
- Yook JI, Li XY, Ota I, Fearon ER, Weiss SJ. Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail. *J Biol Chem* 2005; 280(12): 11740-8.
- Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, Bertran E, Perez-Pomares JM, Diez J, *et al.* Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev* 2004; 18(1): 99-115.
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; 133(4): 704-15.
- Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, Kawakami Y. Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell* 2009; 15(3): 195-206.
- Gal A, Sjoblom T, Fedorova L, Imreh S, Beug H, Moustakas A. Sustained TGF β exposure suppresses Smad and non-Smad signalling in mammary epithelial cells, leading to EMT and inhibition of growth arrest and apoptosis. *Oncogene* 2008; 27(9): 1218-30.