

NID1促进人卵巢癌细胞OVCAR-3侵袭转移及分子机制的研究

朱远远^{1,2} 张春冬^{1,2} 王义涛^{1,2} 王森^{1,2} 朱慧芳^{1,2} 李轶^{1,2} 雷云龙^{1,2}
卜友泉^{1,2} 张莹^{1,2*}

¹重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室, 重庆 400016;

²重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016)

摘要 Nidogen-1(NID1)是新发现的一个候选卵巢癌诊断标志物,该研究旨在初探其在卵巢癌细胞中的生物学功能。首先构建稳定过表达外源NID1的人卵巢癌细胞系OVCAR-3,然后采用划痕实验和Transwell迁移和侵袭实验检测细胞的迁移侵袭能力,并通过荧光定量PCR和Western blot检测细胞中上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关蛋白和ERK/MAPK通路蛋白的表达情况。结果显示,与空载细胞相比,稳定过表达NID1的OVCAR-3细胞其划痕愈合能力、细胞迁移和侵袭能力均明显增强。较之空载细胞的上皮细胞样外形,稳定过表达NID1的OVCAR-3细胞呈间质细胞样外形,其上皮细胞标志分子E-cadherin表达下调,间质细胞标志分子(包括Vimentin和N-cadherin)和EMT相关转录因子Twist-2表达上调。此外,稳定过表达NID1的OVCAR-3细胞中ERK1/2的磷酸化水平升高,经ERK/MAPK通路的抑制剂U0126下调ERK1/2的磷酸化水平后其E-cadherin、Vimentin、N-cadherin和Twist-2表达水平出现逆转。这些结果提示,NID1可能通过激活ERK/MAPK通路促进卵巢癌细胞的EMT过程,进而增强其侵袭转移的能力。

关键词 NID1; 卵巢癌; 转移; 侵袭; EMT

Study of NID1-promoted Migration and Invasion and Its Molecular Mechanism in Ovarian Cancer Cell OVCAR-3

Zhu Yuanyuan^{1,2}, Zhang Chundong^{1,2}, Wang Yitao^{1,2}, Wang Sen^{1,2}, Zhu Huifang^{1,2}, Li Yi^{1,2},
Lei Yunlong^{1,2}, Bu Youquan^{1,2}, Zhang Ying^{1,2*}

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

²Molecular Medicine and Cancer Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract Nidogen-1 (NID1) is found to be a novel candidate diagnostic biomarker of ovarian cancer in our previous study, but its role in the development of ovarian cancer is unclear. In this study, we firstly established the OVCAR-3 monoclonal cell line with stable ectopic expression of NID1, and then assessed its migratory and invasive abilities by wound healing assay, Transwell migration and invasion assays. Subsequently, we utilized quantitative RT-PCR and Western blot to detect proteins relating to epithelial-mesenchymal transition (EMT) and ERK/MAPK signaling pathway in the NID1-overexpressed OVCAR-3 cells. The results showed that NID1-overexpressed

收稿日期: 2014-09-11 接受日期: 2014-11-12

国家自然科学基金(批准号: 81302263), 重庆市科委自然科学基金(批准号: cstc2014jcyjA10026)和重庆市教委科学技术研究项目(批准号: KJ130326、KJ1400207)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485991, E-mail: zhangying078@aliyun.com

Received: September 11, 2014 Accepted: November 12, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81302263), Natural Science Foundation Project of Chongqing (Grant No.cstc2014jcyjA10026) and Scientific and Technological Research Program of Chongqing Municipal Education Commission (Grant No.KJ130326, KJ1400207)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485991, E-mail: zhangying078@aliyun.com

网络出版时间: 2015-01-22 16:16 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150122.1616.001.html>

OVCAR-3 cells exhibited significantly greater motility and invasiveness comparing with those of the control group; NID1 overexpression also led to the enhanced EMT phenotype, including the fibroblastic morphology, the reduction of the epithelial marker E-cadherin, the enhancement of mesenchymal markers (Vimentin and N-cadherin) and the transcription factor Twist-2. Furthermore, the levels of phosphorylated ERK1/2 were increased in NID1-overexpressed OVCAR-3 cells. After decreasing the ERK1/2 phosphorylation in these cells treated with an MEK inhibitor, U0126, the expressions of EMT relevant marks were regressed. Taken together, our findings reveal that NID1 promotes ovarian cancer metastasis, probably through the activation of the ERK/MAPK signaling pathway to propel EMT.

Keywords NID1; ovarian cancer; migration; invasion; EMT

全世界每年新增约20万名卵巢癌患者, 每年卵巢癌患者死亡人数约14万^[1]。尽管卵巢癌发病率相对较低, 但却是恶性程度最高的妇科肿瘤, 其死亡/发病率在美国女性常见的十种肿瘤中仅低于胰腺癌和肺癌^[2]。临床诊断为早期(I期和II期)的卵巢癌患者五年生存率为80%~95%, 而晚期(III期和IV期)卵巢癌患者的五年生存率仅为10%~30%; 然而超过三分之二的病例在被确诊为卵巢癌时已进展到晚期, 此时癌细胞已经发生转移^[3]。缺乏早期诊断标志物、容易早期转移扩散以及耐受化疗药物是造成卵巢癌死亡/发病率高的的重要因素。由于缺乏生理屏障, 卵巢癌细胞可直接蔓延到盆腹腔, 浸润子宫、腹膜及脏器浆膜, 形成广泛的腹膜种植。此外, 卵巢癌的腹腔外转移主要依靠淋巴转移而不是血行转移。鉴于卵巢癌容易快速而广泛转移扩散的特点, 除了早期低级别的卵巢癌患者, 其他患者在术后均需辅以化疗^[4]。目前, 卵巢癌转移扩散的分子机制不甚清楚。因此, 深入研究卵巢癌侵袭转移的分子机制并从中筛选有效的预后标志物和治疗靶标, 对于改善卵巢癌的临床治疗效果并降低其死亡率具有重要的指导意义。

上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指上皮细胞通过重编程向间质细胞表型转变的生物学过程, 这个过程通常伴随着E-cadherin、 α -catenin等上皮细胞标志分子表达下降, 而Vimentin、N-cadherin等间质细胞标志分子表达升高。EMT参与胚胎发育、伤口愈合和器官纤维化、肿瘤发生演进等过程^[5]。大量研究表明, 在上皮性肿瘤的侵袭转移过程中, EMT是一个关键性的启动事件^[6]。在癌变早期, 上皮细胞发生EMT, 改变细胞极性, 失去与基膜连接等上皮表型, 从而获得较强的迁移侵袭等间质表型。这样的细胞将突破基膜限制, 浸润

周围组织并进行扩散。最后, 它们在新种植部位通过间质-上皮转化(mesenchymal-epithelial transition, MET)形成转移灶。卵巢癌中最常见的类型是卵巢上皮癌, 占原发卵巢癌的75%~90%。因此, EMT同样是卵巢癌细胞获得侵袭转移能力的重要过程。

Nidogen(也称为Entactin)家族是一类细胞外基质结合蛋白, 包括NID1和NID2。NID1作为分泌型糖蛋白, 是基膜的重要组成成分。基膜是位于上皮细胞基底面的一层网状结构, 上皮细胞癌变等过程中发生的细胞侵袭转移与基膜的降解密不可分^[7]。目前, 关于NID1在肿瘤中的研究报道极少^[8-9]。已有报道称, NID1可促进HEK293细胞伸展^[10], 又或者促进伤口愈合^[11-12]。在前期工作中, 我们构建了卵巢癌相关分泌/释放蛋白质组, 从该数据库中筛选并验证了数个可辅助卵巢癌诊断的候选血浆蛋白质标志物。作为候选标志物之一, NID1在卵巢癌患者血浆中的蛋白水平显著升高, 与其他候选蛋白进行联合检测可进一步提高诊断的灵敏性和特异性。另外, NID1在携带淋巴结转移的卵巢癌患者血浆和肿瘤组织中的蛋白水平均高于无淋巴结转移的卵巢癌患者。NID1在卵巢癌发生演进中的作用并不清楚, 但基膜、EMT和肿瘤侵袭转移三者之间的密切关联以及NID1的高表达与淋巴结转移的相关性, 提示NID1可能促进卵巢癌的侵袭转移。本研究通过构建稳定过表达外源NID1的卵巢癌细胞系OVCAR-3, 初步分析NID1对细胞侵袭转移的影响及其分子机制, 为进一步探讨NID1作为候选的卵巢癌预后标志物和治疗靶标的研究价值提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株与菌株

人浆液型卵巢癌细胞株OVCAR-3由重庆医科

大学附属第一医院妇产科令狐华教授惠赠。菌株 trans5 α 购于TRANS公司。

1.2 主要试剂

RPMI-1640培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(0.25%)、青霉素-链霉素溶液(内含10 kU/mL青霉素和10 mg/mL链霉素)购于Hyclone公司。G418试剂购于北京鼎国生物技术有限公司。脂质体转染试剂 Lipofectamine™ 2000购于Invitrogen公司。OPTI-MEM I培养基购于GIBCO公司。总RNA提取试剂盒 Total RNA Kit I和质粒小量抽提试剂盒 Plasmid Mini Kit I购自Omega Bio-Tek公司。反转录试剂盒 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit和荧光定量PCR试剂 SYBR® PremixEx Taq™购自TaKaRa公司。Western blot配胶试剂盒、细胞裂解液、PMSF和SDS-PAGE蛋白电泳上样缓冲液(5 \times)购于碧云天生物技术有限公司。蛋白浓度测定试剂盒BCA Protein Assay Kit和发光试剂盒SuperSingal West Dura购于Thermo Scientific公司。鼠抗人NID1单克隆抗体购于R&D SYSTEMS公司。兔抗人E-cadherin多克隆抗体购于Proteintech公司。兔抗人ERK1/2单克隆抗体、兔抗人phospho-ERK1/2单克隆抗体、兔抗人Vimentin单克隆抗体和HRP标记的兔二抗购于Cell Signaling Technology公司。兔抗人N-cadherin单克隆抗体购于Abcam公司。兔抗人Twist-2多克隆抗体购于MERCCK Millipore公司。兔抗人GAPDH多克隆抗体购于杭州贤至生物科技有限公司。HRP标记的鼠二抗购于Santa Cruz公司。U0126试剂购于Cell Signaling Technology公司。BD基底膜基质胶购于BD公司。Transwell小室(24孔,孔径8.0 μ m)购于MERCCK Millipore公司。

1.3 细胞培养

OVCAR-3细胞培养于RPMI-1640培养基中,内含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素,于CO₂培养箱(37 °C、5% CO₂)静置培养。待细胞生长状态良好且达到约80%融合度时,用0.25%胰蛋白酶消化传代,用于后续实验。

1.4 构建稳定过表达外源NID1的OVCAR-3细胞株

人源NID1真核表达质粒委托上海吉凯基因化学技术有限公司构建,并同时提供对应的空载质粒GV144。将质粒转化DH5 α 感受态细胞进行扩增,采用Plasmid Mini Kit I抽提质粒DNA,经测序验证无误后备用。参考Lipofectamine™ 2000转染试剂说

明书,将NID1真核表达质粒和GV144质粒分别转染6孔板OVCAR-3细胞(细胞融合度约为80%),建立OVCAR-3-NID1组和OVCAR-3-vector组。次日,细胞在添加G418(终浓度为150 μ g/mL)培养基中继续培养。一周后,采用有限稀释法筛选单克隆细胞株。该单克隆细胞株和稳定转染GV144质粒的OVCAR-3细胞株分别命名为OVCAR-3-NID1-MC和OVCAR-3-vector。

1.5 抑制剂U0126对细胞的处理

将OVCAR-3-NID1-MC细胞种于6孔板,于CO₂培养箱(37 °C、5% CO₂)静置培养。次日(细胞融合度约为80%),添加终浓度为50 mol/L的U0126试剂(使用DMSO溶剂配制),对照组添加等体积DMSO溶剂。处理24 h后,提取细胞总RNA和总蛋白。

1.6 总RNA的提取及反转录

使用Total RNA Kit I提取OVCAR-3-NID1-MC细胞和OVCAR-3-vector细胞总RNA,经NanoDrop Spectrophotometer测定其浓度和D₂₆₀/D₂₈₀比值。以500 ng总RNA的用量采用PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit进行反转录。

1.7 荧光定量PCR检测

采用荧光试剂SYBR® PremixEx Taq™进行定量PCR检测,反转录的cDNA产物稀释20倍后作为PCR的模板。引物序列见表1。反应体系为10 μ L,每组样品设置3个重复。反应程序如下:95 °C预变性10 s;

表1 定量PCR引物序列

Table 1 List of primers used for quantitative PCR analysis

基因名称	引物序列
Gene name	Primer sequences
<i>NID1</i>	F388: 5'-TTA TCC CCC TCC ATC ACT CA-3' R539: 5'-CTC TTG CCT TTC TGG TCT GG-3'
<i>CDH1</i>	F764: 5'-TGA AGG TGA CAG AGC CTC TGG AT-3' R915: 5'-TGG GTG AAT TCG GGC TTG TT-3'
<i>CDH2</i>	F1685: 5'-ATC AAC CCC ATA CAC CAG CC-3' R1790: 5'-ACT AAC CCG TCG TTG CTG TT-3'
<i>VIM</i>	F1369: 5'-CCA AAC TTT TCC TCC CTG AAC C-3' R1510: 5'-GTG ATG CTG AGA AGT TTC GTT GA-3'
<i>Twist-2</i>	F1246: 5'-TCT CCG TGA TTG CTT GGC TA-3' R1374: 5'-AGC AGG ATA CAC AGC CAC AC-3'
<i>GAPDH</i>	F833: 5'-ACC TGA CCT GCC GTC TAG AA-3' R1060: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'

CDH1、*CDH2*和*VIM*基因编码的蛋白产物分别是E-cadherin、N-cadherin和Vimentin。

CDH1, *CDH2* and *VIM* genes encoded E-cadherin, N-cadherin and Vimentin, respectively.

95 °C变性5 s, 58 °C退火15 s, 72 °C延伸15 s, 总共39个循环; 72 °C至95 °C融解曲线分析5 s。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析定量PCR的结果^[13]。

1.8 总蛋白提取和Western blot

收集的细胞用1×PBS洗涤3次后, 加入适量细胞裂解液(含有1% PMSF), 冰上放置30 min。随后, 以4 °C、14 000 r/min离心10 min。收集上清液, 并采用BCA Protein Assay Kit测定细胞总蛋白浓度。使用SDS-PAGE蛋白电泳上样缓冲液(5×)和去离子水配制待电泳的蛋白样品, 然后置于100 °C加热5 min。采用适宜浓度的SDS-PAGE分离胶分离蛋白样品, 随后依次进行湿转法转膜(250 mA)、室温封闭1 h(5%脱脂奶粉)、一抗4 °C孵育过夜、TBST洗膜3次(10 min/次)、二抗37 °C孵育1.5 h、TBST洗膜3次(10 min/次)。最后使用Super Singal West Dura发光试剂盒检测目的蛋白, X胶片曝光后再显影和定影。一抗的稀释比分别为: NID1(1:250)、E-cadherin(1:500)、N-cadherin(1:1 000)、Vimentin(1:1 500)、Twist-2(1:3 000)、ERK1/2(1:2 000)、phospho-ERK1/2(1:2 000)、GAPDH(1:2 000)。二抗的稀释比分别为: 鼠二抗(1:4 000)、兔二抗(1:5 000)。其中以GAPDH作为内参蛋白。

1.9 划痕实验

用marker笔在60 mm细胞培养皿背面划好分区, 将密度为 2.5×10^5 /mL的细胞种入上述培养皿。次日(待细胞融合度约100%), 用200 μ L枪头在皿中画线, 1×PBS洗涤细胞3次后, 加入含2% FBS的培养基, 于CO₂培养箱(37 °C、5% CO₂)静置培养, 此时标记为第0天, 并在显微镜下拍照记录。随后, 每隔24 h更

换培养基并拍照记录。

1.10 细胞侵袭转移实验

往24孔板加入500 μ L含10% FBS的RPMI-1640培养基, 然后将Transwell小室置于24孔板中。取100 μ L细胞悬液(含5 000个细胞)加入Transwell小室上层, 之后将24孔板置于CO₂培养箱(37 °C、5% CO₂)静置培养24 h。取出小室, 弃掉培养基, 1×PBS洗涤3次后, 经甲醇固定10 min、0.5%结晶紫染色20 min、1×PBS洗涤数次后, 用棉签擦去小室上层未迁移细胞, 自然晾干后于光学显微镜下随机选取5个独立视野(100×), 对迁移到小室下层的细胞进行计数。对于侵袭实验, 实验前预冷的BD基底膜基质胶用不含血清的RPMI-1640培养基以1:8稀释, 然后取60 μ L稀释胶均匀铺到Transwell小室上层, 放入CO₂培养箱过夜。随后取出小室, 往上层加入100 μ L无血清的RPMI-1640培养基水化30 min。取100 μ L细胞悬液(含 1×10^4 细胞)加入Transwell小室上层。后续实验操作同迁移实验。

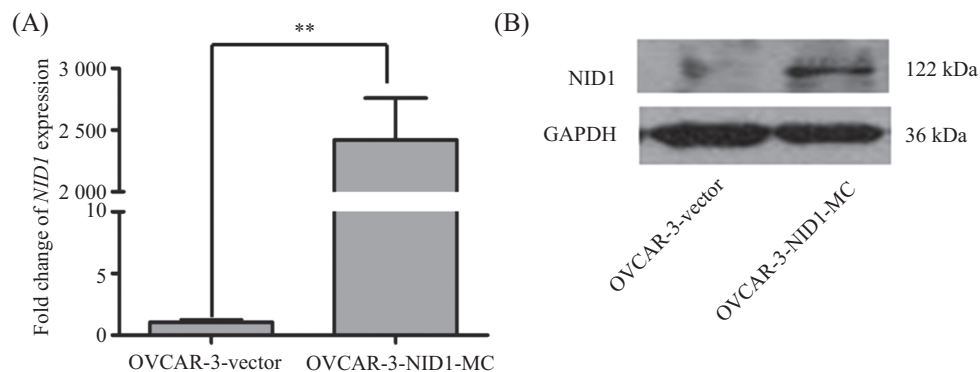
1.11 数据统计

利用SPSS 17.0软件进行统计学分析。两组数据间的比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 稳定过表达外源NID1的OVCAR-3细胞株的筛选和鉴定

使用人源NID1真核表达质粒及对应的空载质粒GV144分别转染OVCAR-3细胞后, 经G418筛选一周获得稳定细胞株。其中, 前者再通过有限稀释



A: 定量RT-PCR检测OVCAR-3-vector和OVCAR-3-NID1-MC细胞中NID1的mRNA水平, $**P < 0.01$; B: Western blot检测OVCAR-3-vector和OVCAR-3-NID1-MC细胞中NID1的蛋白水平, 以GAPDH为内参蛋白。

A: quantitative RT-PCR for NID1 in total cell lysates of OVCAR-3-vector and OVCAR-3-NID1-MC cells, $**P < 0.01$; B: Western blot for NID1 in total cell lysates of OVCAR-3-vector and OVCAR-3-NID1-MC cells. GAPDH served as an internal control of protein loading.

图1 稳定过表达外源NID1的OVCAR-3细胞株的鉴定

Fig.1 Determination of the OVCAR-3 monoclonal cell line with stable ectopic expression of NID1

法筛选到单克隆细胞株,即OVCAR-3-NID1-MC细胞。此后,继续采用G418维持OVCAR-3-NID1-MC细胞和OVCAR-3-vector细胞培养环境的选择压力。提取两组细胞总RNA与总蛋白作进一步确认。经定量RT-PCR和Western blot鉴定,OVCAR-3-NID1-MC细胞中NID1的mRNA和蛋白质水平均显著高于OVCAR-3-vector细胞(图1),表明已成功获得稳定过表达外源NID1的单克隆OVCAR-3细胞。

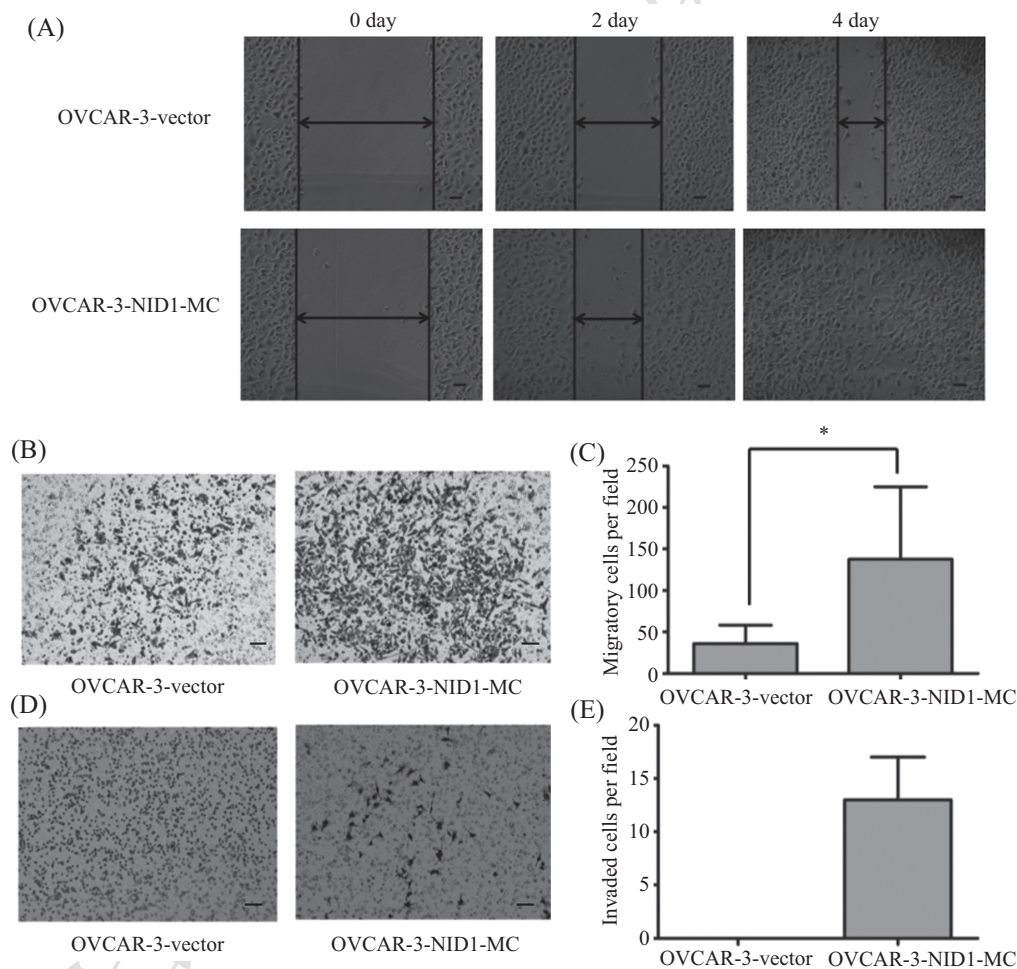
2.2 稳定过表达NID1增强OVCAR-3细胞的迁移和侵袭能力

首先采用划痕实验检测细胞的侧向迁移能力,

如图2A所示,OVCAR-3-NID1-MC细胞的侧向迁移速度明显快于OVCAR-3-vector细胞。随后的Transwell侵袭转移实验表明,与OVCAR-3-vector细胞相比,OVCAR-3-NID1-MC细胞的转移能力($P=0.021$)和侵袭能力($P=0.083$)均明显升高(图2B~图2E)。上述体外实验结果提示,NID1可促进卵巢癌细胞OVCAR-3的侵袭和转移。

2.3 稳定过表达NID1促进OVCAR-3细胞发生EMT

鉴于EMT是卵巢癌细胞获得侵袭转移能力的重要生物学过程,我们进一步检测了OVCAR-

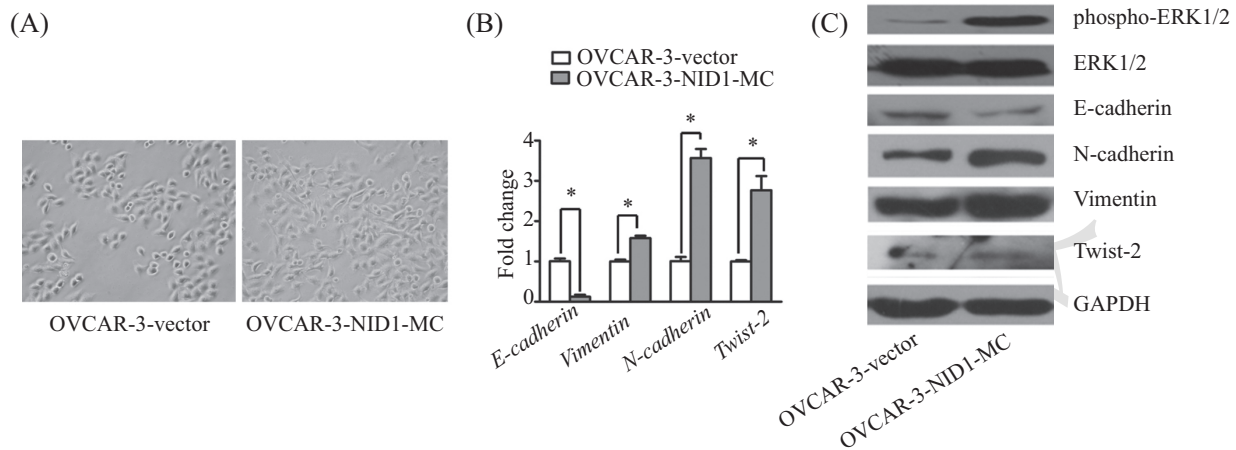


A: 光镜下观察划痕实验中OVCAR-3-vector和OVCAR-3-NID1-MC细胞的侧向迁移能力,展示时间点为第0, 2, 4 d; B: 光镜下观察Transwell转移实验中迁移到小室下层的OVCAR-3-vector和OVCAR-3-NID1-MC细胞(100 \times); C: Transwell转移实验中迁移到小室下层的OVCAR-3-vector和OVCAR-3-NID1-MC细胞数量统计分析; D: 光镜下观察Transwell侵袭实验中迁移到小室下层的OVCAR-3-vector和OVCAR-3-NID1-MC细胞(100 \times); E: Transwell侵袭实验中迁移到小室下层的细胞数量统计分析。标尺=100 μ m, 数据以mean \pm S.D.表示, 实验重复2~3次, 每次实验设置3个复孔。* $P < 0.05$ 。

A: representative scraping wounds formed by OVCAR-3-vector and OVCAR-3-NID1-MC cells were measured at 0, 2 and 4 days after wounding; B: migratory cells from OVCAR-3-vector and OVCAR-3-NID1-MC cells were photographed at 100 \times magnification; C: five fields of migratory cells from OVCAR-3-vector and OVCAR-3-NID1-MC cells were enumerated; D: invaded cells from OVCAR-3-vector and OVCAR-3-NID1-MC cells were photographed at 100 \times magnification; E: five fields of invaded cells from OVCAR-3-vector and OVCAR-3-NID1-MC cells were counted. Scale bars=100 μ m. Means and S.D. were shown from two or three independent experiments performed in duplicates. * $P < 0.05$.

图2 OVCAR-3-NID1-MC细胞迁移和侵袭能力分析

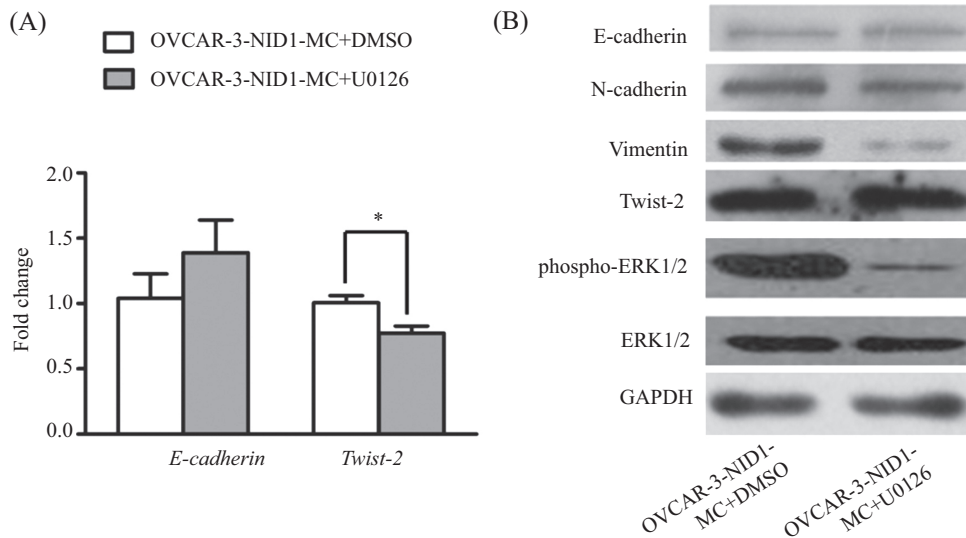
Fig.2 Migration and invasion assays of OVCAR-3-NID1-MC cells



A: 光镜下观察OVCAR-3-NID1-MC细胞形态(200×); B: 定量RT-PCR检测OVCAR-3-vector和OVCAR-3-NID1-MC细胞中*E-cadherin*、*Vimentin*、*N-cadherin*和*Twist-2*的mRNA水平。* $P < 0.05$; C: Western blot检测OVCAR-3-vector和OVCAR-3-NID1-MC细胞中*E-cadherin*、*Vimentin*、*N-cadherin*、*Twist-2*、ERK1/2和phospho-ERK1/2的蛋白水平,以GAPDH为内参蛋白。

A: representative views of OVCAR-3-vector and OVCAR-3-NID1-MC cells were photographed at 200× magnification; B: quantitative RT-PCR for *E-cadherin*, *Vimentin*, *N-cadherin* and *Twist-2* in total cell lysates of OVCAR-3-vector and OVCAR-3-NID1-MC cells. * $P < 0.05$; C: Western blot for *E-cadherin*, *Vimentin*, *N-cadherin*, *Twist-2*, phospho-ERK1/2 and total ERK1/2 in total cell lysates of OVCAR-3-vector and OVCAR-3-NID1-MC cells. GAPDH served as an internal control of protein loading.

图3 OVCAR-3-NID1-MC细胞EMT表型分析
Fig.3 The EMT of OVCAR-3-NID1-MC cells



A: 定量RT-PCR检测U0126处理后的OVCAR-3-NID1-MC细胞中*E-cadherin*和*Twist-2*的mRNA水平, * $P < 0.05$; B: Western blot检测U0126处理后的OVCAR-3-NID1-MC细胞中ERK1/2、phospho-ERK1/2、*E-cadherin*、*Vimentin*、*N-cadherin*和*Twist-2*的蛋白水平,以GAPDH为内参蛋白。

A: quantitative RT-PCR for *E-cadherin* and *Twist-2* in total cell lysates of OVCAR-3-NID1-MC cells after U0126 treatment, * $P < 0.05$; B: Western blot for *E-cadherin*, *N-cadherin*, *Vimentin*, *Twist-2*, phospho-ERK1/2 and total ERK1/2 in total cell lysates of OVCAR-3-NID1-MC cells after U0126 treatment. GAPDH served as an internal control of protein loading.

图4 ERK/MAPK通路对OVCAR-3细胞的EMT进程的影响
Fig.4 ERK/MAPK pathway favored NID1-induced EMT of OVCAR-3

3-NID1-MC细胞与EMT的关联。如图3A所示,与OVCAR-3-vector细胞的“立方体”外形相比, OVCAR-3-NID1-MC细胞呈现“梭形”外形。与此同时,定量RT-PCR和Western blot的结果均显示,较之OVCAR-3-vector细胞, OVCAR-3-NID1-MC细胞的

上皮细胞标志分子*E-cadherin*表达降低,间质细胞标志分子*Vimentin*和*N-cadherin*表达升高。另外,EMT相关转录因子*Twist-2*在OVCAR-3-NID1-MC细胞中的水平也升高(图3B和图3C)。这些结果提示, NID1促进卵巢癌细胞OVCAR-3的EMT进程。

2.4 NID1通过激活ERK/MAPK通路改变EMT相关分子的表达

我们借助文献分析推测, NID1可能经由ERK/MAPK通路作用于OVCAR-3细胞的EMT过程。如图3C所示, 与OVCAR-3-vector细胞相比, OVCAR-3-NID1-MC细胞ERK1/2磷酸化水平显著升高。随后, 我们采用ERK/MAPK通路的抑制剂U0126处理OVCAR-3-NID1-MC细胞, 其上皮细胞标志分子E-cadherin表达升高, 间质细胞标志分子Vimentin和N-cadherin表达下降, EMT相关转录因子Twist-2表达亦下降(图4)。以上结果表明, NID1可能通过激活ERK/MAPK通路来促进卵巢癌细胞OVCAR-3发生EMT。

3 讨论

NID1是细胞外基质特化结构——基膜的重要成分, 主要由间质细胞表达。基膜是位于上皮细胞基底面的一层网状结构, 其组成具有明显的异质性, 即基膜的组成蛋白在不同组织中具有一定的特异性, 但其主要成分包括Collagen IV、Lamins、Perlecan和Nidogen。目前认为, 滋养层细胞植入、器官形成、血管生成、上皮细胞癌变等过程中发生的细胞侵袭转移与基膜的降解密不可分。基膜如何被降解、基膜降解后释放的NID1等组分如何影响癌变等疑问均亟待解答。基膜组成异质性的特点也提示, NID1的异常表达将改变基膜的整体结构和功能, 进而参与肿瘤的发生发展。关于NID1在肿瘤中的研究报道极少, 如NID1基因的启动子区在胃肠肿瘤中呈现高频率的甲基化^[8]; NID1基因的两个SNP位点与黑色素瘤相关^[9]; NID1蛋白和NID2蛋白在良性卵巢肿瘤组织、卵巢交界性肿瘤组织、卵巢癌组织中的表达水平依次下降^[14]。与该结果略显矛盾的是, 我们前期发现NID1在卵巢癌患者血浆中的蛋白水平显著升高, 可作为候选卵巢癌血清诊断的标志物^[15]。同样地, NID2亦被报道为候选卵巢癌血清标志物, 它在卵巢癌患者血清中的蛋白水平显著高于健康人群^[16]。

已有报道, NID1和肿瘤内皮标志7(tumor endothelial marker 7)相互作用, 促进HEK293细胞伸展^[10]; NID1通过结合Fibrinogen促进伤口愈合^[11]; 敲除NID1的小鼠其伤口愈合有缺陷^[12]。从比较医学的角度分析, 肿瘤侵袭转移和伤口愈合具有相似之处。另外, 我们的前期临床数据显示, NID1在携带

淋巴结转移的卵巢癌患者血浆和肿瘤组织中的蛋白水平均高于无淋巴结转移的卵巢癌患者。这些结果提示, NID1可能影响肿瘤细胞的侵袭转移。在本研究中, 我们构建了稳定过表达NID1的人卵巢癌细胞系OVCAR-3, 发现NID1过表达可明显促进OVCAR-3细胞的侵袭和转移(图2), 此结果与我们的预期猜想相符。

EMT是上皮性来源肿瘤侵袭转移过程中的一个关键性的启动事件, 上皮细胞通过EMT来改变细胞极性, 丧失与基膜的连接, 获得更强的迁移侵袭能力, 突破基膜限制, 浸润周围组织并进行扩散。EMT、基膜与肿瘤侵袭转移三者之间的紧密联系也预示着基膜组成蛋白NID1通过EMT过程促进卵巢癌细胞的侵袭转移。稳定过表达NID1的OVCAR-3细胞除了发生“立方形”上皮细胞外形向“梭形”间质细胞外形的转变之外, 其上皮细胞标志分子E-cadherin的mRNA水平和蛋白水平均下调, 而间质细胞标志分子Vimentin和N-cadherin的mRNA水平和蛋白水平均上调。这些结果足以说明, NID1可促进卵巢癌细胞的EMT, 进而推动后者侵袭转移。另外, NID1的过表达还上调了促EMT的转录因子Twist-2的表达, 其mRNA水平的改变比蛋白水平的改变更为明显。促EMT的转录因子包括Snail家族(Snail和Slug)、Zeb家族(Zeb1和Zeb2)、Twist家族(Twist-1和Twist-2)等, 它们通过抑制上皮细胞标志分子和/或激活间质表型相关分子的基因转录来促进EMT过程。Twist-2使卵巢癌细胞株SKOV-3的E-cadherin表达下降、N-cadherin和 β -catenin表达升高, 增强细胞的侵袭能力^[17]。另外, Twist-2可抑制顺铂诱导的卵巢癌细胞株OV2008凋亡, 增强其顺铂耐受性^[18]。缺氧可诱导卵巢癌细胞株HO-8910表达Twist-2, 进而提高其存活能力^[19]。我们的研究发现, Twist-2很可能是NID1促进卵巢癌细胞株OVCAR-3发生EMT的促转录因子。

诱导肿瘤细胞EMT涉及众多信号转导通路。首先, 胞外信号分子主要以受体-配体结合方式激活胞内信号转导通路, 包括TGF- β /Smads通路、Integrin通路、NF- κ B通路、Hedgehog通路、Notch通路、Wnt/ β -catenin通路、MAPK通路及PI3K/AKT通路^[20]。这些信号通路活化后一般将上调促EMT的转录因子, 比如Snail、Slug、Twist-1、Twist-2、Zeb1和Zeb2。这些转录因子将减弱上皮细胞标志蛋白的表达和/

或增强间质细胞标志蛋白的表达^[21]。在哺乳类细胞中存在三条并行的MAPK信号通路,分别是ERK/MAPK通路、JNK/SAPK通路和P38 MAPK通路。在ERK/MAPK通路中,ERK1/2被其上游信号分子MEK1/2磷酸化而激活,激活的ERK1/2不仅可以磷酸化核内转录因子来调控细胞增殖与分化,还可以磷酸化胞浆内的细胞骨架成份来调节细胞形态和细胞骨架重塑。本研究集中关注ERK/MAPK信号通路与EMT的关联,我们发现,NID1过表达可上调OVCAR-3细胞中的ERK1/2磷酸化水平(图3C),再使用MEK1/2的抑制剂U0126下调细胞ERK1/2的磷酸化水平后,其EMT相关标志分子的表达水平出现逆转,这进一步确认了NID1可通过激活ERK/MAPK通路促进卵巢癌细胞发生EMT,进而增强后者的侵袭和转移。值得注意的是,在U0126处理细胞后,间质细胞标志分子Vimentin和N-cadherin的蛋白水平明显降低,而上皮细胞标志分子E-cadherin的蛋白水平没有明显变化,仅呈现出mRNA水平的升高。这提示,稳定过表达NID1的OVCAR-3细胞经U0126处理后呈现不完全MET(partial MET)的过程。另外,经U0126处理后的细胞中*Twist-2*的mRNA有所下降,但其蛋白水平没有明显变化。已有报道,ERK1/2可增强促EMT的转录因子*Twist-1*的表达来促进黑色素瘤细胞侵袭^[22],但ERK1/2与*Twist-2*的关系还未曾有报道。因此,在NID1激活ERK/MAPK通路促进卵巢癌细胞EMT的过程中,*Twist-2*是否为ERK/MAPK通路作用的关键分子,我们还需加以验证。

综上所述,本研究初步证实NID1通过EMT促进卵巢癌细胞侵袭转移,其中涉及ERK/MAPK通路的活化,这为深入研究NID1如何激活ERK/MAPK通路以及后者如何促进卵巢癌细胞的EMT提供了重要的工作基础。

参考文献 (References)

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013; 63(1): 11-30.
- Clarke-Pearson DL, Clarke-Pearson MD. Clinical practice. Screening for ovarian cancer. *N Engl J Med* 2009; 361(6): 170-7.
- Naora H, Montell DJ. Ovarian cancer metastasis: Integrating insights from disparate model organisms. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(5): 355-66.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139(5): 871-90.
- Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(6): 442-54.
- Kruegel J, Miosge N. Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67(17): 2879-95.
- Ulazzi L, Sabbioni S, Miotto E, Veronese A, Angusti A, Gafa R, *et al.* Nidogen 1 and 2 gene promoters are aberrantly methylated in human gastrointestinal cancer. *Mol Cancer* 2007; 6: 17.
- Nan H, Xu M, Zhang J, Zhang M, Kraft P, Qureshi AA, *et al.* Genome-wide association study identifies nidogen 1 (NID1) as a susceptibility locus to cutaneous nevi and melanoma risk. *Hum Mol Genet* 2011; 20(13): 2673-9.
- Lee HK, Seo IA, Park HK, Park HT. Identification of the basement membrane protein nidogen as a candidate ligand for tumor endothelial marker 7 *in vitro* and *in vivo*. *FEBS Lett* 2006; 580(9): 2253-7.
- Wu C, Chung AE. Potential role of entactin in hemostasis. Specific interaction of entactin with fibrinogen A alpha and B beta chains. *J Biol Chem* 1991; 266(28): 18802-7.
- Baranowsky A, Mokkalapati S, Bechtel M, Krugel J, Miosge N, Wickenhauser C, *et al.* Impaired wound healing in mice lacking the basement membrane protein nidogen 1. *Matrix Biol* 2010; 29(1): 15-21.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.
- 陈燕, 金平, 乔秀强. Nidogen-2、Nidogen-2在卵巢上皮性肿瘤组织中的表达及临床意义. *现代妇产科进展* (Chen Yan, Jin Ping, Qiao Xiuqiang. Express and clinical significance of Nidogen-1 and Nidogen-2 in ovarian epithelial tumors. *Prog Obstet Gynecol* 2014; 6(23): 473-5.
- Zhang Y, Xu B, Liu Y, Yao H, Lu N, Li B, *et al.* The ovarian cancer-derived secretory/releasing proteome: A repertoire of tumor markers. *Proteomics* 2012; 12(11): 1883-91.
- Kuk C, Gunawardana CG, Soosapillai A, Kobayashi H, Li L, Zheng Y, *et al.* Nidogen-2: A new serum biomarker for ovarian cancer. *Clin Biochem* 2010; 43(4/5): 355-61.
- Shankar H, Simhan S. Transient neuronal injury followed by intravascular injection during an ultrasound guided stellate ganglion block. *Anesth Pain Med* 2013; 2(3): 134-7.
- Wang T, Li Y, Tuerhanjiang A, Wang W, Wu Z, Yuan M, *et al.* Twist2 contributes to cisplatin-resistance of ovarian cancer through the AKT/GSK-3beta signaling pathway. *Oncol Lett* 2014; 7(4): 1102-8.
- Mao Y, Xu J, Song G, Zhang N, Yin H. Twist2 promotes ovarian cancer cell survival through activation of Akt. *Oncol Lett* 2013; 6(1): 169-74.
- De Craene B, Bex G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(2): 97-110.
- Muthuswamy SK, Xue B. Cell polarity as a regulator of cancer cell behavior plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2012; 28: 599-625.
- Weiss MB, Abel EV, Mayberry MM, Basile KJ, Berger AC, Aplin AE. TWIST1 is an ERK1/2 effector that promotes invasion and regulates MMP-1 expression in human melanoma cells. *Cancer Res* 2012; 72(24): 6382-92.