

化疗后残余胃癌细胞发生上皮间质转化的体外研究*

徐志远 程向东 杜义安 黄 灵

摘要 目的: 观察体外化疗能否诱导胃癌细胞发生上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)。 **方法:** 使用5-Fu (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)对胃癌细胞株SGC7901进行4个疗程的体外化疗,残余细胞继续培养,得到能稳定传代的细胞SGC7901/Fu。比较SGC7901及SGC7901/Fu在细胞形态、EMT标记物、化疗耐药性、侵袭能力、肿瘤干细胞特性等方面的差异。 **结果:** 与SGC7901比较,SGC7901/Fu呈间质细胞形态、上皮表型标记物表达下调、间质表型标记物表达上调。在SGC7901细胞及SGC7901/Fu细胞中,5-Fu的中效浓度(IC_{50})分别为(43.8 \pm 7.2) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及(64.6 \pm 5.5) $\mu\text{g}/\text{mL}$,穿过Transwell小室基底膜的细胞数分别为(51.4 \pm 8.7)个及(93.2 \pm 9.5)个,克隆形成率分别为5.2% \pm 1.0%及13.2% \pm 2.2%,CD44⁺/CD24⁻细胞亚群所占比例分别为4.13% \pm 0.81%及7.97% \pm 0.50%,两者间的差异均具有统计学意义($P<0.05$)。 **结论:** 体外化疗后残余的胃癌细胞发生EMT,同时细胞侵袭能力增强、化疗耐药性升高,并获得了肿瘤干细胞特性。

关键词 胃癌 化疗耐药 上皮间质转化 肿瘤干细胞 5-Fu

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.20130482

Epithelial-mesenchymal transition in residual gastric cells after chemotherapy: An *in vitro* study

Zhiyuan XU, Xiangdong CHENG, Yi'an DU, Ling HUANG

Correspondence to: Xiangdong CHENG; E-mail: chengxd516@126.com

Department of Abdominal Surgery, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province [Grant Nos. LY12H16029, LY13H160027]

Abstract Objective: To investigate if *in vitro* chemotherapy can induce the EMT progress in gastric cancer (GC) cells. **Method:** The GC cell line, SGC7901, was treated using 5-Fu at a concentration of 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The residual cells after four cycles of 5-Fu therapy were named as SGC7901/Fu. The morphological changes and malignant biological features, including the invasiveness and clone formation ability and the characteristics of cancer stem cell and biomarkers of EMT between SGC7901 and SGC7901/Fu, were compared. **Results:** The SGC7901/Fu cells displayed a mesenchymal appearance, decreased the expression of epithelial markers, and increased the expression of mesenchymal markers. The 50% inhibitory concentrations in the SGC7901/Fu and SGC7901 cells were (43.8 \pm 7.2) and (64.6 \pm 5.5) $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The number of cells that migrated through the basement-membrane of the Transwell chamber was 51.4 \pm 8.7 and 93.2 \pm 9.5, respectively. The rate of clone formation was 5.2% \pm 1.0% and 13.2% \pm 2.2%, respectively. The portions of the CD44⁺/CD24⁻ cells were 4.13% \pm 0.81% and 7.97% \pm 0.50%, respectively. All differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion:** The residual GC cells underwent EMT progress after 5-Fu treatment, with increased chemoresistance and ability of invasiveness and acquired the property of cancer stem cells.

Keywords: gastric cancer, chemoresistance, epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cell, 5-Fu

我国是胃癌高发地区之一,且中晚期胃癌(进展期胃癌)占很大的比例,死亡率较高,约占同期世界胃癌死亡人数的40%。化疗是胃癌综合治疗的主要手段之一,但单纯化疗失败率高、预后较差。研究表明化疗后残余肿瘤细胞的存在及其生物学行为的改变可能是导致化疗失败的根本原因^[1]。近年来以5-Fu为基础的联合化疗在胃癌治疗中显示出优势,研究5-Fu化疗后残余胃癌细胞的生物学特性具有重要意义。为此,本研究首先采用大剂量5-Fu作用于胃癌细胞株SGC7901,观察化疗后残余胃癌细胞是否

发生EMT及其他生物学行为改变。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌细胞株SGC7901购自中国科学院上海细胞库;5-Fu购自江苏南通制药公司;兔抗人E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、Bmi-1及KLF4抗体购至美国Epitomics公司;兔抗人波形蛋白(Vimentin)、Snail、Zeb2、Bmi、Klf4、Twist抗体购至英国Abcam公司;兔抗人 β -连接素(β -catenin)、Claudin-1单克隆抗体购自美国Cell Signaling Technology

作者单位:浙江省肿瘤医院腹部肿瘤外科(杭州市310022)

*本文课题受浙江省自然科学基金(编号:LY12H16029,LY13H160027)资助

通信作者:程向东 chengxd516@126.com

公司;鼠抗人CD44-FITC及CD24-PE抗体购置美国eBioscience公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞株与培养 使用含有10%胎牛血清的RPMI 1640培养液培养SGC7901细胞,置于37℃、含有5%CO₂的温箱中常规培养、传代。

1.2.2 体外化疗 将SGC7901细胞以 1×10^5 个/孔接种于6孔板中常规培养。24 h后更换培养液,待细胞长至约50%时,以含5-Fu(30 μg/mL)的培养基作用于贴壁细胞,24 h后更换为普通培养基,继续培养。待残存肿瘤细胞恢复生长活性后,按上述方法继续下一疗程的5-Fu体外化疗,共接受4个疗程,最终存活的细胞命名为SGC7901/Fu。

1.2.3 中效浓度(IC₅₀)及耐药指数的计算 采用细胞增殖试剂CCK-8计算中效浓度。将SGC7901、SGC7901/Fu细胞按 1×10^4 个/孔接种于96孔培养板中,24 h后细胞贴壁。弃培养基,再分别加入含0、5、10、20、40、60及80 μg/mL 5-Fu的培养液(100 μL/孔),培养24 h后更换为普通培养基并继续培养48 h。加入CCK-8(10 μL/孔),并设置若干空白调零孔。将96孔板放入培养箱内孵育1~2 h后取出,用酶标仪于450 nm波长处检测各孔吸光度值,并按公式计算中效浓度^[2]。耐药指数=IC₅₀实验组/IC₅₀对照组,以上实验重复3次。

1.2.4 实时RT-PCR检测 采用SYBR Green染料法进行RT-PCR反应,在96孔反应板中按说明书依次加样,置成10 μL的PCR反应体系,按说明书设置反应条件。每次检测设立3个复孔,至少重复3次。运用2^{-ΔΔCt}方法确定目的基因表达的相对水平,其中Ct值为每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时的循环数,ΔCt=目的基因Ct值-内参基因(GAPDH)的Ct值,-ΔΔCt=实验组ΔCt平均值-对照组各样品ΔCt值。引物由上海生工生物公司设计合成。

1.2.5 Western blot检测 将细胞悬于RIPA细胞裂解液,吹打均匀并室温剧烈振荡破碎40 min,间隙冰浴。收集裂解液经15 000 r/min、4℃离心15 min,取上清。蛋白定量后分装,-70℃贮存备用。Western blot步骤按标准操作,抗体稀释倍数见文献[3]。

1.2.6 Transwell实验 将Matrigel解冻后用无血清培养基按1:8的比例稀释,每个Transwell小室加入30 μL稀释过的Matrigel,37℃孵育1 h。分别消化细胞,重悬,使其浓度为 5×10^5 个/mL。在每个小室上加入100 μL细胞悬液,下室加入600 μL含有10%血清的培养液。培养孵育48 h。取出小室,吸弃上室培养液,棉签擦净滤膜上室面。甲醇固定,0.1%结晶紫染色10 min,切下滤膜,置于载玻片上。光镜(×200)下随机选择6

个视野进行计数,取平均值。

1.2.7 克隆形成实验 常规胰酶消化细胞后加培养液轻轻吹打成单细胞悬液,计数,离心。用含不同血清浓度的培养基重新稀释细胞,使其浓度为 1×10^3 个/mL。分别接种到6孔板中,1 mL/孔。继续培养14 d后取出,甲醇固定,0.1%结晶紫染色10 min,光镜(×200)下计算克隆数。

1.2.8 流式细胞仪检测细胞表面标记物 常规胰酶消化细胞后加培养液轻轻吹打成单细胞悬液,PBS洗涤3次;将细胞转移到流式玻璃管中,加入结合缓冲液100 μL/管,吹散;根据抗体说明书加入不同体积的抗体、同型对照;避光孵育10~20 min;加入结合缓冲液1 mL/管,重悬细胞,2 000 r/min离心5 min,重复3次;加入结合缓冲液0.5 mL/管,震荡吹散细胞,上机检测。

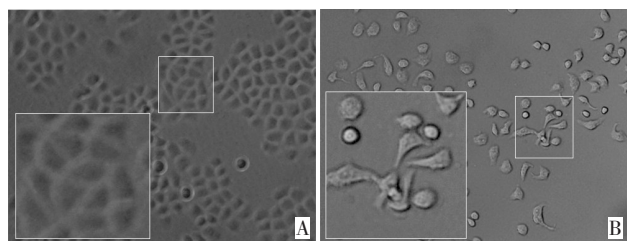
1.3 统计学处理

应用SPSS 15.0统计软件分析,两组间连续性的数据比较采用独立样本t检验,分类数据的比较应用χ²检验。*P*<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

SGC7901细胞形态规则,大小均一,呈铺路石样或多边形,细胞间结合紧密,生长较快(图1A);而SGC7901/Fu细胞大小不一,形态不规则,可见较多梭形细胞,细胞体积略增大,细胞极性消失,细胞间结合不紧密(图1B),这提示SGC7901/Fu细胞可能发生了EMT。



A:SGC7901 cells;B:SGC7901/Fu cells

图1 SGC7901及SGC7901/Fu细胞形态比较(×200)

Figure 1 Morphological comparison between SGC7901 and SGC7901/Fu cells

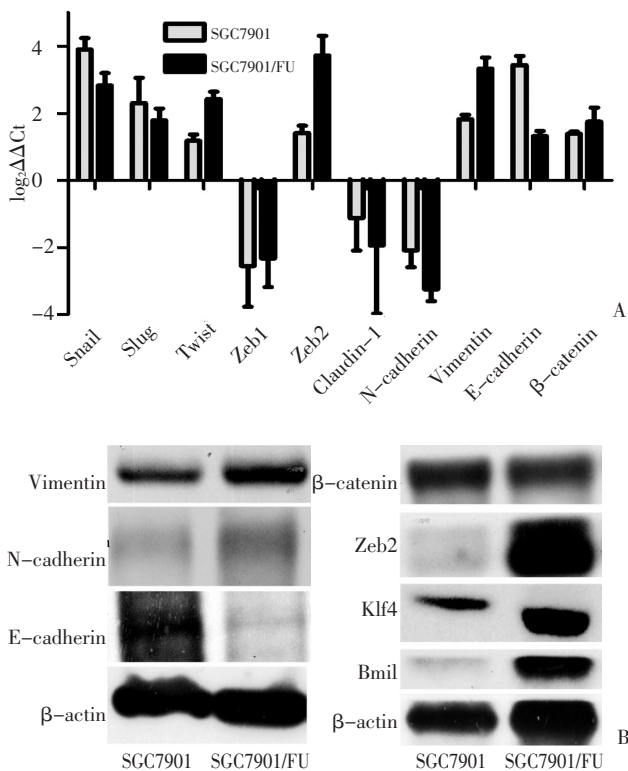
2.2 SGC7901/Fu细胞耐药性的鉴定

CCK-8法检测SGC7901及SGC7901/Fu细胞中5-Fu的中效浓度分别为 $(43.8 \pm 7.2) \mu\text{g/mL}$ 及 $(64.6 \pm 5.5) \mu\text{g/mL}$,两者的差异具有统计学意义(*P*<0.05)。SGC7901/Fu细胞的耐药指数为 1.47 ± 0.24 ,说明SGC7901/Fu细胞已产生一定的耐药性。

2.3 EMT标记物检测

本研究采用实时RT-PCR比较了SGC7901和SGC7901/Fu细胞中EMT相关标记物的表达,结果提

示SGC7901/Fu细胞中上皮表型标记物如E-cadherin、Claudin-1的表达明显下降,间质表型标记物如Vimentin、N-cadherin表达显著升高(图2A),而β-catenin的表达无明显变化。同时,EMT相关转录因子Twist及Zeb2在SGC7901/Fu细胞中表达也明显升高,而Snail、Slug等转录因子表达无明显改变。Western blot检测同样验证了上述结果(图2B)。



A: Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction test; B: Western blot test

图2 EMT及肿瘤干细胞相关基因的表达

Figure 2 Expression of EMT and cancer stem cell-related genes

2.4 Transwell细胞侵袭能力检测

Transwell实验结果显示,穿过Transwell小室基底膜的SGC7901和SGC7901/Fu细胞数分别为(51.4±8.7)个及(93.2±9.5)个,两者之间的差异具有统计学意义($P<0.05$)。提示5-Fu化疗后的残余细胞侵袭能力增强。

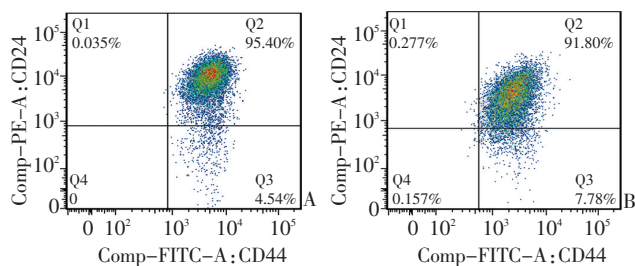
2.5 克隆形成能力检测

EMT也是诱导肿瘤干细胞形成的重要原因。因此,本实验检测了SGC7901/Fu细胞是否具有肿瘤干细胞的特性。平板克隆实验提示SGC7901及SGC7901/Fu细胞在含5%、10%血清的培养基中克隆形成能力无明显差异。当培养基中的血清含量降至0.5%时,SGC7901及SGC7901/Fu细胞的克隆形成率分别为5.2%±1.0%及13.2%±2.2%,两者之间的差异具有统计学意义($P<0.05$)。提示SGC7901/Fu细胞获得了部分肿瘤干细胞

的特性。

2.6 胃癌干细胞标记物的检测

Western blot检测提示SGC7901/Fu细胞中肿瘤干细胞相关蛋白Bmi-1及Klf4的表达均明显升高(图2B)。流式细胞技术进一步检测提示在SGC7901细胞及SGC7901/Fu细胞中,CD44⁺/CD24⁻亚群细胞所占的比例分别为4.13%±0.81%及7.97%±0.50%(图3),两者之间的差异具有统计学意义($P<0.05$)。而CD44⁺/CD24⁻细胞亚群被认为具有胃癌干细胞的特性,进一步验证5-Fu化疗可能诱导胃癌干细胞的形成。



A:SGC7901;B:SGC7901/Fu

图3 流式细胞仪检测SGC7901及SGC7901/Fu细胞中CD44⁺/CD24⁻亚群细胞比例

Figure 3 Portion of CD44⁺/CD24⁻ cells in SGC7901 and SGC7901/Fu tested via flow cytometry

3 讨论

上皮间质转化是指上皮细胞在正常生理和特定病理情况下向间质细胞转化的现象^[4],虽然目前尚缺乏严格定义,但有三个方面的改变被认为是发生EMT的重要特征^[5],1)形态学上的改变:上皮细胞多呈明显的极性排列,鹅卵石、铺路石样的外形,发生EMT后,细胞极性丧失、排列紊乱,多为梭形、纺锤形,并伴有伪足形成。2)上皮、间质表型标志物改变:发生EMT后上皮表型标记物如E-cadherin、Claudin-1等表达下调,而间质表型标记物如N-cadherin、Vimentin等表达升高。3)细胞功能的改变:发生EMT时,常伴有细胞穿透细胞外基质的能力增强,提高了细胞的侵袭、转移能力。化疗药物能诱导肿瘤细胞发生EMT,Latif等^[6]研究发现顺铂能诱导卵巢癌细胞发生EMT。本研究提示5-Fu化疗后的残余胃癌细胞同样发生了EMT,主要表现为形态改变、上皮表型标记物降低、间质表型标记物的表达升高,同时伴有侵袭能力增强。本研究还发现调节EMT的关键转录因子Zeb2、Twist在SGC7901/Fu中表达也明显升高,其中Zeb2的升高更为显著,提示Zeb2在5-Fu诱导的EMT中可能发挥了关键的调控作用。

EMT与肿瘤化疗耐药的关系也是目前研究的热点。一方面EMT与肿瘤的原发性化疗耐药有关。

Basu等^[7]在头颈部鳞癌中研究发现上皮或间质表型标记物的表达水平与化疗敏感性密切相关,该研究在临床标本中以Vimentin(+)和E-cadherin(-)为标记分离出间质表型为主的肿瘤细胞并进行药敏实验,结果发现这些细胞对紫杉醇等传统化疗药物的耐药性显著升高。另一方面EMT也与肿瘤获得性化疗耐药相关。Maseki等^[8]应用吉西他滨处理一系列头颈部上皮癌细胞,发现残余癌细胞发生了EMT现象,并提示EMT是细胞获得化疗耐药性的重要原因之一。EMT诱导化疗耐药的现象在肝癌^[9]、乳腺癌^[10]、卵巢癌^[11]等肿瘤中同样已被证实。本研究提示SGC7901/Fu细胞在发生EMT的同时也获得了部分化疗耐药性,虽然未进一步研究EMT诱导胃癌化疗耐药的机制,但可以初步推测EMT是胃癌细胞获得5-Fu化疗耐药性的可能原因之一。

已有的研究表明化疗药物作用后的残余肿瘤细胞具有干细胞特性,然而其形成机制并不明确。Scheel等^[12]首次将EMT和干细胞学说结合起来,通过外源表达转录因子Twist、Snail,成功诱导永生化乳腺上皮细胞(HMECs)发生EMT,而这些发生EMT的细胞具有明显的乳腺癌干细胞特征,从而证明了EMT与肿瘤干细胞的关系。化疗药物能通过诱导肿瘤细胞发生EMT从而促进肿瘤干细胞形成,Hegde等^[13]研究发现化疗后的肺癌细胞能通过EMT获得肿瘤干细胞的特性。本研究也发现经5-Fu化疗后的残留胃癌细胞在发生EMT的同时也获得了一些肿瘤干细胞的功能,主要表现为克隆形成能力增强、干细胞相关蛋白如Bmi1、Klf4等表达增加、CD44⁺/CD24⁻细胞亚群比例增加等,这提示5-Fu可能通过诱导EMT进而使部分胃癌细胞获得干细胞特性。虽然本研究尚缺乏直接的证据来支持上述假设,但这些结果将为后续的研究提供线索。

综上所述,5-Fu化疗后的残留胃癌细胞侵袭能力增加、获得化疗耐药性及肿瘤干细胞特性,而EMT可能是这些细胞获得上述恶性生物学行为改变的重要原因。因此,进一步研究EMT的发生机制并加以有效的干预,对克服胃癌化疗耐药、提高疗效具有重要的意义。

参考文献

1 Yang AD, Fan F, Camp ER, et al. Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(14 Pt 1):4147-4153.

2 徐志远,戴朝六,王 宁.塞来昔布对人肝癌细胞株增殖及凋亡的影响[J].肿瘤学杂志,2008,14(11):902-905.

3 Xu ZY, Ding SM, Zhou L, et al. FOXC1 contributes to microvascular invasion in primary hepatocellular carcinoma via regulating epithelial-mesenchymal transition[J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(8):1130-1141.

4 Taube JH, Herschkowitz JI, Komurov K, et al. Coreepithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(35): 15449-15454.

5 Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis[J]. Dev Cell, 2008, 14(6):818-829.

6 Latifi A, Abubaker K, Castrechini N, et al. Cisplatin treatment of primary and metastatic epithelial ovarian carcinomas generates residual cells with mesenchymal stem cell-like profile[J]. J Cell Biochem, 2011, 112(10):2850-2864.

7 Basu D, Nguyen TT, Montone KT, et al. Evidence for mesenchymal-like sub-populations within squamous cell carcinomas possessing chemoresistance and phenotypic plasticity[J]. Oncogene, 2010, 29(29):4170-4182.

8 Maseki S, Ijichi K, Tanaka H, et al. Acquisition of EMT phenotype in the gefitinib-resistant cells of a head and neck squamous cell carcinoma cell line through Akt/GSK-3 β /snail signaling pathway[J]. Br J Cancer, 2012, 106(6):1196-1204.

9 Uchibori K, Kasamatsu A, Sunaga M, et al. Establishment and characterization of two 5-fluorouracil-resistant hepatocellular carcinoma cell lines[J]. Int J Oncol, 2012, 40(4):1005-1010.

10 Zhang W, Feng M, Zheng G, et al. Chemoresistance to 5-fluorouracil induces epithelial-mesenchymal transition via up-regulation of Snail in MCF-7 human breast cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 417(2):679-685.

11 Marchini S, Fruscio R, Clivio L, et al. Resistance to platinum-based chemotherapy is associated with epithelial to mesenchymal transition in epithelial ovarian cancer[J]. Eur J Cancer, 2013, 49(2):520-530.

12 Scheel C, Weinberg RA. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links[J]. Semin Cancer Biol, 2012, 22(5-6):396-403.

13 Hegde GV, de la Cruz C, Eastham-Anderson J, et al. Residual tumor cells that drive disease relapse after chemotherapy do not have enhanced tumor initiating capacity[J]. PLoS One, 2012, 7(10):e45647.

(2013-03-27收稿)

(2013-07-22修回)

(本文编辑:张佖)