

耐吉西他滨胰腺癌细胞株 SW1990/GZ 上皮间质转化现象的研究

王 辉,张 焱,吴峻立,徐泽宽,苗 毅*

(南京医科大学第一附属医院普外科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:观察耐吉西他滨胰腺癌细胞株(SW1990/GZ)上皮间质转化的现象。方法:倒置显微镜下观察亲代 SW1990 细胞与 SW1990/GZ 细胞的形态差别;流式细胞仪检测细胞周期;免疫印迹法(Western blot)检测上皮间质转化相关蛋白表达;Transwell 小室测定细胞侵袭迁移能力;通过表面特异抗原(CD44⁺、CD24⁺和 CD133⁺)标记流式细胞仪检测肿瘤干细胞比例。结果:在形态学上,SW1990/GZ 表现出明显的间质细胞特征,与亲代 SW1990 相比处于 G₁ 期的细胞无明显差异;SW1990/GZ 细胞低表达上皮细胞标志物 E-cadherin, 而高表达间质细胞的标记物 Vimentin;SW1990/GZ 细胞侵袭和迁移能力明显增强 ($P < 0.01$);与亲代细胞 SW1990 相比,SW1990/GZ 细胞中 CD44⁺CD24⁺细胞比例以及 CD133⁺细胞比例分别提高了 2 倍和 4 倍以上 ($P < 0.01$)。结论:SW1990 耐吉西他滨细胞株(SW1990/GZ)发生了明显的上皮间质转化过程,肿瘤干细胞比例明显增多。

[关键词] 胰腺癌;上皮间质转化;肿瘤干细胞;侵袭;迁移

[中图分类号] R735.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)03-306-05

Investigation of epithelial-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant cancer cell line SW1990/GZ

WANG Hui, ZHANG Ye, WU Jun-li, XU Ze-kuan, MIAO Yi*

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore epithelial-mesenchymal transition (EMT) in gemcitabine-resistant cancer cell line SW1990/GZ. **Methods:** Morphological characteristics of SW1990 cells and SW1990/GZ cells were observed by inverted microscope. Cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry. The expressions of EMT-associated markers were determined by Western blot. Invasion and migration of cells were detected by transwell. The proportion of cancer stem cells was analyzed by flow cytometry after labeled the surface specific antigen. **Results:** SW1990/GZ cells exhibited mesenchymal morphology, and no significant G₁ accumulation phenotype in SW1990/GZ cells compared with SW1990 cells. SW1990/GZ cells reduced expression of the epithelial marker E-cadherin but increased expression of the mesenchymal marker vimentin. SW1990/GZ cells have greater invasion and migration activity ($P < 0.01$). Compared with SW1990 cells, the number of CD44⁺CD24⁺ cells and CD133⁺ cells increased by 2 times and 4 times in SW1990/GZ cells ($P < 0.01$). **Conclusion:** SW1990/GZ cells have undergone an EMT, and are enriched with cancer stem cells.

[Key words] pancreatic cancer; epithelial-mesenchymal transition; cancer stem cell; invasion; migration

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(3): 306-309, 373]

胰腺癌恶性程度高,预后差,在西方国家中是恶性肿瘤致死的第四大原因^[1]。由于其侵袭和转移能力极强,发现时多属晚期,手术切除率低,5 年生存率仅 1%~4%,中位生存期仅为 4~6 个月^[2-3]。化疗是胰腺癌重要的辅助治疗手段,不仅能够缓解症状,延长生存时间,还可提高患者的生活质量。但是,胰腺癌

在化疗过程中存在的耐药现象影响了临床疗效^[4]。上皮间质转化在肿瘤的转移和耐药过程中起着重要作用,伴随着上皮间质转化的发生,肿瘤细胞的侵袭和迁移能力增强^[5-7],还有研究证明上皮间质转化与肿瘤干细胞关系密切^[8]。本研究通过形态学及分子生物学方法研究胰腺癌耐药细胞株的上皮间质转化现象,检测其侵袭和迁移能力,通过流式细胞仪检测耐药细胞株中肿瘤干细胞的比例并与亲代 SW1990 细胞进行比较。

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30972912)

*通讯作者, E-mail: miaoyi@njmu.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 材 料

人胰腺癌细胞株 SW1990 购于上海中科院细胞库,SW1990 耐吉西他滨细胞株(SW1990/GZ)由南京医科大学第一附属医院普外科实验室建立并保存,其耐药指数为 77.2。DMEM (美国 HyClone 公司),胎牛血清 (美国 Gibco 公司),PE 抗人 CD24、FITC 抗人 CD44 和 FITC 抗人 CD133 抗体(美国 e-Bioscience 公司),Matrigel(美国 BD 公司),Transwell (美国 Corning 公司),鼠抗人 E-cadherin 单克隆抗体和羊抗人 Vimentin 单克隆抗体(美国 Millipore 公司),羊抗鼠二抗、兔抗羊二抗(美国 Santa Cruz 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 形态学观察

将人胰腺癌细胞株 SW1990、SW1990 耐吉西他滨细胞株 (SW1990/GZ) 接种于培养基中(DMEM、10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素),在 5%CO₂,37℃恒温培养箱内培养。倒置显微镜下观察其细胞形态。

1.2.2 细胞周期检测

流式细胞仪检测细胞周期。收集细胞,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,70%乙醇固定,在-20℃环境中过夜,重新收集细胞,并 PBS 洗涤,用 500 μl 含有 0.2% Triton X-100、10 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、100 μg/ml 核糖核酸酶 A(RNase A),和 50 μl/ml 碘化丙啶(PI)的 PBS 悬浮,室温静置 30 min,上机检测。

1.2.3 Western blot

将细胞的总蛋白用 RIPA 裂解液加 1%PMSF 提取,用 BCA 法蛋白浓度定量试剂盒检测提取的蛋白浓度,10%SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质并转移至 PVDF 膜上,在含 5%的脱脂奶粉的 Tris 缓冲液中封闭 2 h,E-cadherin 抗体、Vimentin 抗体孵育过夜,羊抗鼠二抗、兔抗羊二抗孵育 2 h,ECL 发光试剂盒显影。

1.2.4 细胞侵袭和迁移能力检测

使用直径 6.5 mm,孔径 8 μm 的 Transwell 小室检测细胞的侵袭和迁移能力。将细胞以 5 × 10⁴ 个/孔的密度加入上室,含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基 0.6 ml 加入下室,侵袭实验时在上室底部预铺 1 mg/ml 的 Matrigel。细胞在 37℃下培养 24 h,用棉签去除上室中未侵袭或未迁移到基底膜背面的细

胞。侵袭或迁移到基底膜背面的细胞用 0.1%结晶紫在 37℃环境中染色 30 min,再用 PBS 漂洗。倒置显微镜下观察,计数 100 倍视野中穿透细胞个数。

1.2.5 CD44⁺CD24⁺和 CD133⁺细胞检测

取对数生长期的 SW1990 和 SW1990/GZ 细胞,分别用胰酶消化后以 1 000 r/min,离心 5 min,PBS 冲洗 2 遍,制成浓度为 1 × 10⁶ 个/ml 的单细胞悬液。各取 100 μl 细胞悬液,加入 1 μl FITC 抗人 CD44 和 5 μl PE 抗人 CD24 抗体,4℃避光孵育 30 min,对照组不加抗体。1 000 r/min 离心 5 min,PBS 冲洗 2 遍,再次重悬细胞,应用流式细胞仪检测 CD44⁺CD24⁺细胞的比例。同法加入 FITC 抗人 CD133 抗体 5 μl,检测 CD133⁺细胞比例。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件对数据进行统计学分析。每个实验至少重复 3 次。所有数值以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。成组资料比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞形态观察

光镜下观察细胞形态,亲代 SW1990 细胞体积略大,呈多边形,团簇状生长;SW1990/GZ 细胞体积缩小,呈纺锤样,且细胞间连接减少,伪足增多,细胞排列无规则(图 1)。

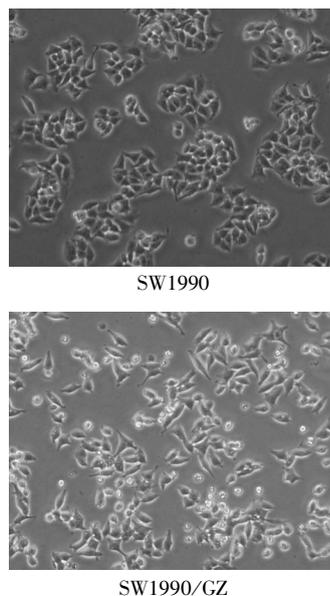


图 1 光镜下亲代 SW1990 细胞与 SW1990/GZ 细胞形态学比较(× 100)

Figure 1 Phase contrast images of SW1990 cells and SW1990/GZ cells(× 100)

2.2 细胞周期分析

细胞周期检测发现,亲代 SW1990 与 SW1990/

GZ 两组细胞处于 G₁ 期的比例无明显统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1)。

表 1 SW1990 细胞与 SW1990/GZ 细胞周期分析

Table 1 Cell cycle analysis of SW1990 cells and SW1990/GZ cells

(%, $\bar{x} \pm s$)

细胞类型	G ₁	S	G ₂
SW1990	39.07 ± 0.77	33.01 ± 2.79	27.92 ± 2.18
SW1990/GZ	39.09 ± 0.75	36.75 ± 2.46	24.16 ± 1.82

2.3 上皮间质转化相关蛋白的表达

Western blot 检测上皮间质转化相关蛋白。与亲代 SW1990 细胞相比,SW1990/GZ 细胞低表达上皮细胞标志物 E-cadherin, 而高表达间质细胞的标记物 Vimentin(图 2)。

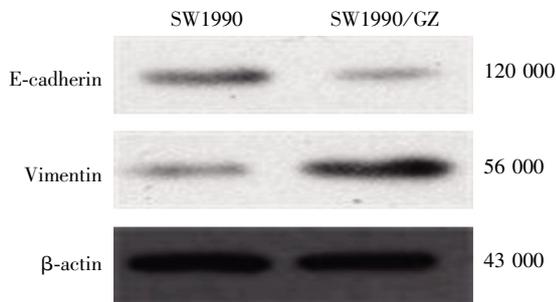


图 2 Western blot 检测上皮间质转化相关蛋白的表达

Figure 2 The expression of EMT-associated markers detected by Western blot

2.4 细胞侵袭和迁移

Transwell 小室检测细胞侵袭和迁移能力。侵袭能力方面,SW1990/GZ 细胞穿透数为(85 ± 6)个,而亲代 SW1990 细胞穿透数为(23 ± 5)个($P < 0.01$)。迁移能力方面,SW1990/GZ 细胞穿透数为(240 ± 9)个,而亲代 SW1990 细胞穿透数为(150 ± 8)个($P < 0.01$)。结果显示 SW1990/GZ 细胞的侵袭和迁移能力明显增强(图 3)。

2.5 肿瘤干细胞比例检测

流式细胞仪检测肿瘤干细胞相关标志物(图 4),结果显示 SW1990/GZ 中 CD44⁺CD24⁺细胞比例为(8.0 ± 0.5)%,与亲代 SW1990 细胞(2.4 ± 0.3)%相比,比例明显增高($P < 0.01$)。CD133⁺细胞比例检测显示,SW1990/GZ 中 CD133⁺细胞比例为(6.3 ± 0.6)%,明显高于亲代 SW1990 细胞[(1.1 ± 0.3)%, $P < 0.01$]。

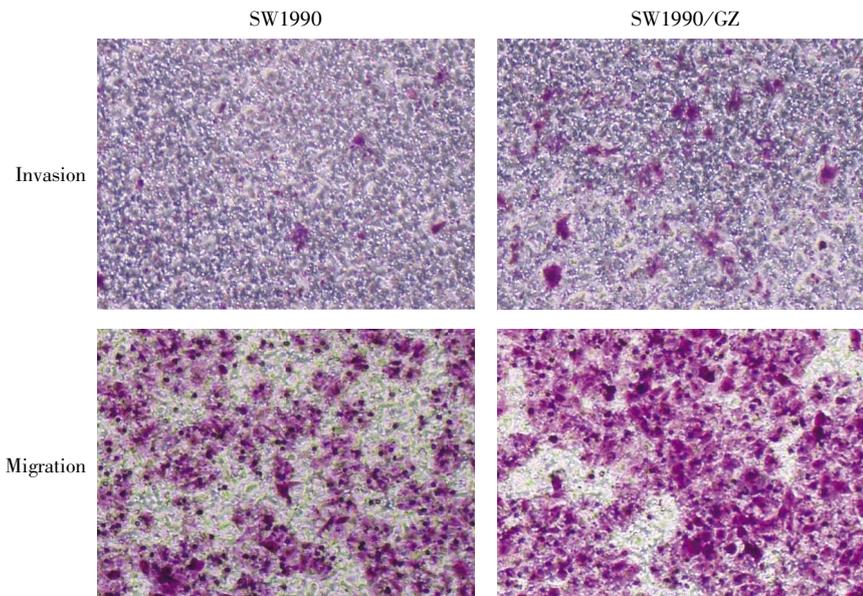


图 3 细胞侵袭和迁移能力检测(× 100)

Figure 3 Invasion and migration of cells(× 100)

3 讨论

吉西他滨(gemcitabine, GEM)已经成为晚期胰

腺癌的一线化疗药物,但疗效仍不理想,获得性的化疗耐受是胰腺癌化疗失败的主要原因之一^[4]。近年来许多研究表明,上皮间质转化在肿瘤的转移和

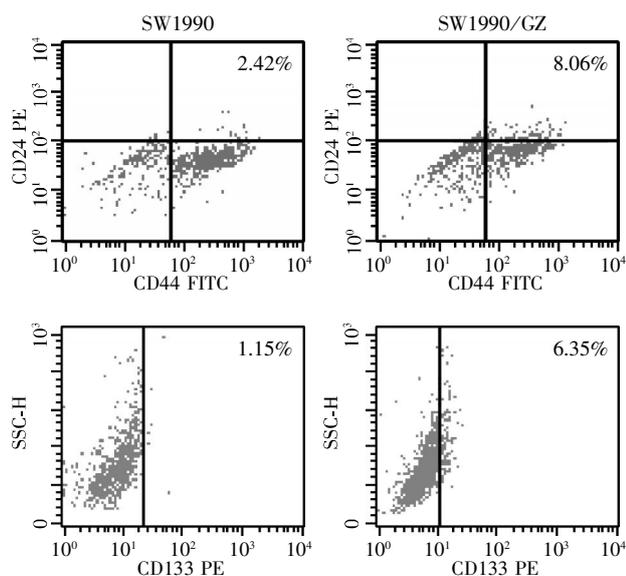


图 4 流式细胞仪检测肿瘤干细胞比例

Figure 4 The number of cancer stem cells analyzed by flow cytometry

耐药过程中起着重要作用。上皮间质转化是指上皮细胞在特定的生理和病理情况下向间质细胞转化的现象,其主要特征为上皮细胞极性丧失,与周围细胞的连接减少,并获得间质细胞特性,细胞的运动能力增强。Lee 等^[9]于 2006 年研究发现肝癌细胞中过表达 Twist,而 E-cadherin 表达下调,诱导了上皮间质转化过程的发生,发生转移的癌细胞高表达 Twist。Ke 等^[10]研究发现,从原发性胰腺癌的癌细胞 EP156 T 中筛选出具有更强侵袭和迁移能力的 EPT1 细胞,在这一筛选过程中细胞发生了上皮细胞标记减少而间质细胞标记增多的现象,即发生了上皮间质转化。

SW1990 耐吉西他滨细胞株(SW1990/GZ)由南京医科大学第一附属医院普外科实验室建立并检测了其生物学特性^[11]。本研究通过细胞形态学观察及 Western blot 检测发现,SW1990/GZ 细胞发生了明显的上皮间质转化过程,细胞形态呈纺锤样,获得间质细胞特性,上皮细胞标记物 E-cadherin 的表达明显减弱,而间质细胞的标记物 Vimentin 的表达则明显增强。由于上皮间质转化可以促进肿瘤的侵袭和迁移,随后通过 Transwell 检测发现,与亲代 SW1990 细胞相比 SW1990/GZ 细胞具有更强的侵袭迁移能力。

肿瘤干细胞在肿瘤的增殖和耐药过程中起到重要作用。肿瘤组织中具有自我更新和多向分化能力的一小部分细胞被称作肿瘤干细胞^[12]。肿瘤干细胞对化疗耐受的现象在许多肿瘤中都有报道^[13-14]。

Li 等^[15]于 2007 年首次报道了胰腺癌肿瘤干细胞的分离和鉴定,通过 3 种表面标志分子 CD44、CD24 及上皮特异性抗原(ESA)分选胰腺癌细胞,与对照组相比,CD44⁺CD24⁺ESA⁺细胞致瘤性最强,形成肿瘤的组织学特性与人原发性胰腺癌高度相似。Hermann 等^[16]随后通过 CD133 分选出了胰腺癌肿瘤干细胞。Liao 等^[8]在 2008 年报道了上皮间质转化可以产生肿瘤干细胞的现象,首次将上皮间质转化与肿瘤干细胞联系起来。

本研究通过流式细胞仪检测发现 SW1990/GZ 细胞中 CD44⁺CD24⁺细胞比例以及 CD133 阳性细胞比例较亲代细胞分别提高了 2 倍和 4 倍以上,这一结果提示肿瘤干细胞、获得性耐药及上皮间质转化三者关系密不可分。

综上所述,SW1990 耐吉西他滨细胞株(SW1990/GZ)发生了明显的上皮间质转化过程,其侵袭和迁移能力增强,肿瘤干细胞比例明显增多。上皮间质转化作为近年来研究胰腺癌耐药机制的热点方向,为胰腺癌的治疗提供了新的视角,而其发生调控的机制尚有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009 [J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249
- [2] Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al. Cancer statistics, 2004 [J]. CA Cancer J Clin, 2004, 54(1): 8-29
- [3] Philip PA, Mooney M, Jaffe D, et al. Consensus report of the national cancer institute clinical trials planning meeting on pancreas cancer treatment [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(33): 5660-5669
- [4] Fryer RA, Galustian C, Dagleish AG. Recent advances and developments in treatment strategies against pancreatic cancer [J]. Curr Clin Pharmacol, 2009, 4 (2): 102-112
- [5] Thiery JP, Acloque H, Huang RY, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease [J]. Cell, 2009, 139(5): 871-890
- [6] Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition [J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1420-1428
- [7] Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions [J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1429-1437
- [8] Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells [J]. Cell, 2008, 133(4): 704-715

(下转第 373 页)

- 125(2):754-765
- [8] Scherf W, Burdach S, Hansen G, et al. Reduced expression of transforming growth factor β exacerbates pathology in an experimental asthma model [J]. *Eur J Immunol*, 2005, 35(1):198-206
- [9] Makinde T, Murphy RF, Agrawal DK. The regulatory role of TGF- β in airway remodeling in asthma [J]. *Immunol Cell Biol*, 2007, 85(5):348-356
- [10] Lee JS, Jung ID, Jeong YI, et al. D-pinitol inhibits Th1 polarization via the suppression of dendritic cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(6):791-804
- [11] Sivakumar S, Subramanian SP. Pancreatic tissue protective nature of D-Pinitol studied in streptozotocin-mediated oxidative stress in experimental diabetic rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 622(1-3):65-70
- [12] Geethan PK, Prince PS. Antihyperlipidemic effect of D-pinitol on streptozotocin-induced diabetic Wistar rats [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2008, 22(4):220-224
- [收稿日期] 2011-03-28

(上接第 309 页)

- [9] Lee TK, Poon RT, Yuen AP, et al. Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(18):5369-5376
- [10] Ke XS, Qu Y, Goldfinger N, et al. Epithelial to mesenchymal transition of a primary prostate cell line with switches of cell adhesion modules but without malignant transformation [J]. *PLoS One*, 2008, 3(10):3368
- [11] 安 勇, 姚 捷, 卫积书, 等. 吉西他滨耐药人胰腺癌细胞株的建立及其与肿瘤干细胞的相关性研究 [J]. *中华外科杂志*, 2010, 48(13):999-1003
- [12] Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(10):755-768
- [13] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumor stem cells and drug resistance [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(4):275-284
- [14] Guzman ML, Swiderski CF, Howard DS, et al. Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(25):16220-16225
- [15] Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(3):1030-1037
- [16] Hermann PC, Huber SL, Herder T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer [J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(3):313-323
- [收稿日期] 2011-10-17

欢迎投稿 欢迎订阅