

CEACAM6 介导上皮间质转化增强胰腺癌细胞侵袭能力和耐药性的研究

陈建敏, 安 勇, 吕 楠, 薛晓峰, 张 烨, 卫积书, 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:研究 CEACAM6 对胰腺癌细胞株 SW1990 侵袭能力和耐药性的影响,并探讨上皮间质转化(EMT)在其中的作用。方法:筛选及鉴定过表达 CEACAM6 的稳定转染 SW1990-CEACAM6 细胞株,通过定量 PCR 和 Western blot 方法检测 SW1990 细胞株中 EMT 相关表型标志物的改变。通过 Transwell 实验检测过表达 CEACAM6 对 SW1990 细胞株侵袭的影响,MTT 法检测耐药指数(RI)。结果:定量 PCR 及 Western blot 验证过表达 CEACAM6 细胞株 SW1990-CEACAM6 成功建立,其倾向于向间质细胞转化:波形蛋白(Vimentin)表达明显上调,E-钙黏蛋白(E-cadherin)表达下降。功能实验证实过表达 CEACAM6 具有促进 SW1990 胰腺癌细胞株侵袭作用,同时细胞株耐药性增强。结论:CEACAM6 能够促进 SW1990 胰腺癌细胞株上皮间质转化,从而促进胰腺癌细胞的恶性转化。

[关键词] SW1990 胰腺癌细胞株; CEACAM6; 上皮间质转化; 侵袭; 耐药

[中图分类号] R735.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)12-1675-05

CEACAM6 enhances the ability of invasion and chemo-resistance in pancreatic cancer cells by inducing epithelial-mesenchymal transition(EMT)

CHEN Jian-min, AN Yong, LÜ Nan, XUE Xiao-feng, ZHANG Ye, WEI Ji-shu, MIAO Yi*

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the potential involvement of CEACAM6 in the invasion and chemo-resistance of pancreatic cancer cell SW1990 by inducing epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Methods:** After establishing and screening, CEACAM6-overexpressing cell line SW1990-CEACAM6 was observed by inverted microscope, and the changes of EMT markers were determined by Q-PCR and western blot, the invasion ability was detected by transwell, the chemo-sensitivity to gemcitabine was determined by MTT assay. **Results:** Q-PCR and Western blot confirmed that SW1990-CEACAM6 cell line was established successfully. Overexpression of CEACAM6 made the pancreatic cell line SW1990 prone to mesenchymal phenotype, such as up-regulation of vimentin and down-regulation of E-cadherin. SW1990-CEACAM6 cell has greater activity of invasion and chemo-resistance to gemcitabine ($P < 0.05$) than SW1990-EGFP cell. **Conclusion:** CEACAM6 could promote EMT and enhance malignant potential in terms of invasion and chemo-resistance in pancreatic cancer cell.

[Key words] pancreatic cancer cell line SW1990; CEACAM6; epithelial-mesenchymal transition; invasion; chemo-resistance

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(12): 1675-1679]

尽管外科技术不断提高,影像技术不断发展以及新的化疗药物不断问世,胰腺癌仍然是最致命的恶性肿瘤之一。2012年,美国胰腺癌的新发病例43 920例,死亡人数37 390例,是肿瘤导致死亡的第四大原因^[1]。胰腺癌的中位生存期仅3~6个月,5

年存活率不到5%^[2]。上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在胰腺癌发生发展过程中起着十分重要的作用。发生EMT的肿瘤细胞能够从肿瘤组织中脱离、逃逸并散布至远处定植。EMT过程中,上皮细胞失去原先的上皮特性,包括片状多边形结构的改变、细胞极性丢失以及E-钙黏蛋白(E-cadherin)的表达下调,随之呈现间质细胞特性,包括出现梭型、纺锤样外形,移动性增强^[3]。EMT是促进肿瘤进

[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

展、转移以及耐受传统化疗和靶向药物的一个关键因素^[4]。癌胚抗原相关细胞黏附分子 6(carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6, CEACAM6) 是属于 CEA 基因家族中的一个黏附分子蛋白,它在人类实体肿瘤(如结肠癌、乳腺癌、肺癌等)中广泛表达^[5-7],在胰腺导管腺癌中阳性率高达 90% 以上^[8]。研究发现 CEACAM6 是促胰腺癌细胞转移的决定性蛋白之一,过表达 CEACAM6 的胰腺癌细胞的侵袭能力明显增强^[9]。本研究主要探讨 CEACAM6 是否通过诱导细胞 EMT 过程,进而提高胰腺癌细胞株 SW1990 的侵袭和耐药能力。

1 材料和方法

1.1 材料

人胰腺癌细胞株 SW1990 购于上海中科院细胞库。DMEM 和胰蛋白酶(Sigma 公司,美国),胎牛血清(Gibco 公司,美国),吉西他滨(Lily 公司,法国),Matrigel (BD 公司,美国),Transwell(Corning 公司,美国),小鼠抗人 CEACAM6 单克隆抗体(Abcam 公司,美国),小鼠抗人 E-cadherin 单克隆抗体和羊抗人波形蛋白(Vimentin)单克隆抗体(Millipore 公司,美国),羊抗小鼠二抗、兔抗羊二抗(Santa Cruz 公司,美国),TRIzol 试剂盒(Invitrogen 公司,美国),ABI7500 系统(Applied Biosystems 公司,美国),BCA 法蛋白浓度定量试剂盒(Keygen 公司,美国),AMV 反转录试剂盒(Promega 公司,美国),流式细胞仪(BD 公司,美国),细胞培养箱(Thermo 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 建立 SW1990-CEACAM6 稳定转染细胞株

重组慢病毒质粒(Lv-CMV-CEACAM6)由南京医科大学薛晓峰博士馈赠。以 Lipofectamine[™] 2000 细胞转染试剂盒将 Lv-CMV-CEACAM6 或载体对照质粒 Lv-CMV-EGFP 分别转染包装 293T 细胞,收集 293T 细胞的病毒悬液,转染 SW1990 细胞 48 h 后在荧光显微镜下观察到绿色荧光,提示转染成功,使用流式细胞仪分选并收集带绿色荧光的细胞进行培养以供后续实验使用。将实验组细胞株命名为 SW1990-CEACAM6,对照组细胞株命名为 SW1990-EGFP。

1.2.2 RNA 提取及荧光定量 RT-PCR

TRIzol 试剂盒提取 SW1990-EGFP 及 SW1990-CEACAM6 总 RNA。测定 RNA 浓度,取 1 μ g 总 RNA 进行反转录。定量 RT-PCR 采用 TaKaRa SYBR green 试剂盒,选择 GAPDH 作为体系标准化内参。

荧光定量 PCR 引物如下:CEACAM6 正义链:5'-A-GAAGCT-AGCAGAGACCATGGGACCC-3',反义链:5'-AAATTCTAGAGGGCTGCTATATCAGAGCC-3'。GAPDH 正义链:5'-CAACGGATTTGGTCGTATTG-3',反义链:5'-GGAAGATGGTGATGGGATT-3'。RT-PCR 反应使用 ABI 7500 系统检测,定量结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。

1.2.3 Western blot 检测

用含 1%PMSF 的 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,10%SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白并转移至 PVDF 膜上,膜在含 5%脱脂奶粉的 Tris 缓冲液中封闭 2 h,分别与抗 CEACAM6 抗体、抗 E-cadherin 抗体、抗 Vimentin 抗体 4℃孵育过夜后,再分别与羊抗鼠二抗、兔抗羊二抗孵育 2 h, ECL 发光试剂盒显影。

1.2.4 细胞形态学观察

将 SW1990-EGFP、SW1990-CEACAM6 细胞株接种于培养基中(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。

1.2.5 细胞侵袭能力检测

使用直径 6.5 mm,孔径 8 μ m 的 Transwell 小室检测细胞的侵袭能力。在上室底部预铺 1 mg/ml 的 Matrigel,培养箱中放置 3 h 后,上室内接种 5×10^4 个细胞,下室中加入 0.6 ml 的含 10%胎牛血清的 DMEM 全培养液。细胞培养箱中继续培养 24 h 后用 0.1%结晶紫浸染 Transwell 小室 30 min,再用 PBS 漂洗 3 遍。倒置显微镜下观察,计数 100 倍视野中穿透细胞个数。

1.2.6 吉西他滨耐药性检测

SW1990-EGFP 和 SW1990-CEACAM6 细胞按 1×10^4 个(200 μ l)密度分别接种于 96 孔板,培养 12 h 后加入梯度浓度的吉西他滨,分别为(0.10、0.33、1.00、3.30、10.00、33.00、100.00 μ mol/L),每个浓度组设置 4 个复孔,另设对照组(不加药)和空白对照组(培养基+MTT+DMSO)。培养 72 h 后,每孔加 5 g/L 的 MTT 20 μ l,继续培养 4 h,吸去上清液,每孔加 DMSO 150 μ l,避光震荡 10 min,全自动酶标仪读板,设定波长 490 nm。分别绘制两细胞株的耐药剂量-抑制率曲线,计算 IC₅₀。细胞生长抑制率(GIR)= $1 - \frac{D(490 \text{ nm}) - \text{空白对照组 } D(490 \text{ nm})}{\text{对照组 } D(490 \text{ nm}) - \text{空白对照组 } D(490 \text{ nm})} \times 100\%$ 。

1.3 统计学方法

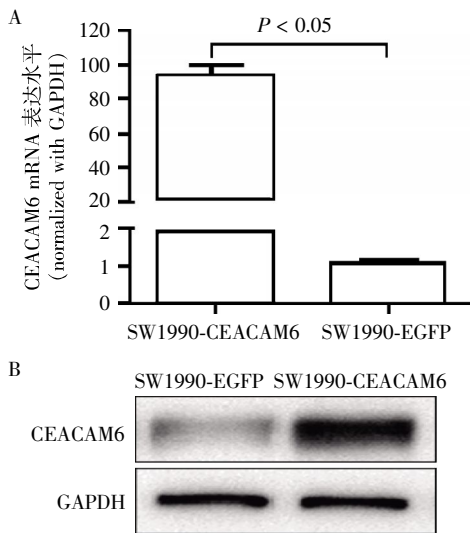
采用 SPSS17.0 统计软件对数据进行统计学分析。每个实验至少重复 3 次。所有数值以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。成组资料比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SW1990-CEACAM6 稳定转染细胞株的建立和鉴定

因 SW1990 细胞株内源性 CEACAM6 表达低, 我们选择 SW1990 作为研究细胞株, 转染 CEACAM6 过表达慢病毒, 转染后的细胞经流式分选后获得稳定转染细胞株 SW1990-CEACAM6。定量 RT-PCR 检测 SW1990-CEACAM6 中 CEACAM6 mRNA 水平约为 SW1990-EGFP 的 100 倍 ($P < 0.05, n = 3$, 图 1A)。Western blot 进一步证实稳定转染细胞株 SW1990-CEACAM6 中 CEACAM6 呈现高表达, 鉴定为细胞株 SW1990-CEACAM6 成功建立(图 1B)。

2.2 细胞形态观察



A: 定量 RT-PCR 检测 SW1990-CEACAM6 及 SW1990-EGFP 细胞株中 CEACAM6 mRNA 表达水平; B: Western blot 检测 CEACAM6 蛋白的表达水平。

图 1 建立稳定转染 SW1990-CEACAM6 细胞株

Figure 1 Generation of stable transfected SW1990-CEACAM6

光镜下观察细胞形态, SW1990-EGFP 细胞体积略大, 多边形, 团簇状生长, 呈现上皮细胞的表型; SW1990-CEACAM6 细胞体积缩小, 呈纺锤样, 细胞间连接减少, 伪足增多, 细胞排列无规则, 呈现间质细胞的表型(图 2)。

2.3 CEACAM6 促进 SW1990 细胞株 EMT

定量 PCR 检测 EMT 标志 E-cadherin、Vimentin 的 mRNA 水平, 结果显示 SW1990-CEACAM6 的 E-

cadherin 明显低于 SW1990-EGFP, 而 Vimentin 的水平明显高于 SW1990-EGFP ($P < 0.05, n = 3$, 图 3A); Western blot 的结果与定量 PCR 的结果相一致(图 3B)。

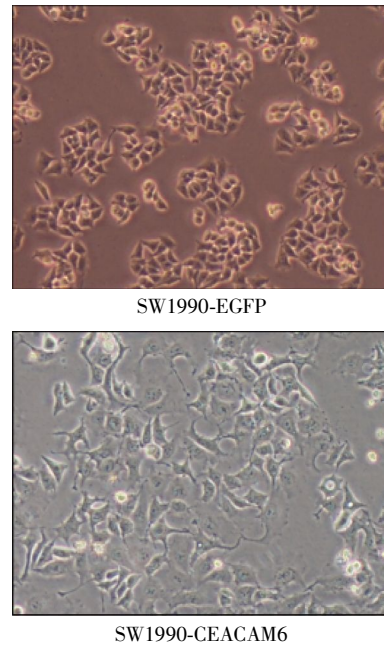


图 2 光镜下 SW1990-EGFP 与 SW1990-CEACAM6 细胞形态($\times 100$)

Figure 2 Phase contrast images of SW1990-EGFP and SW1990-CEACAM6 ($\times 100$)

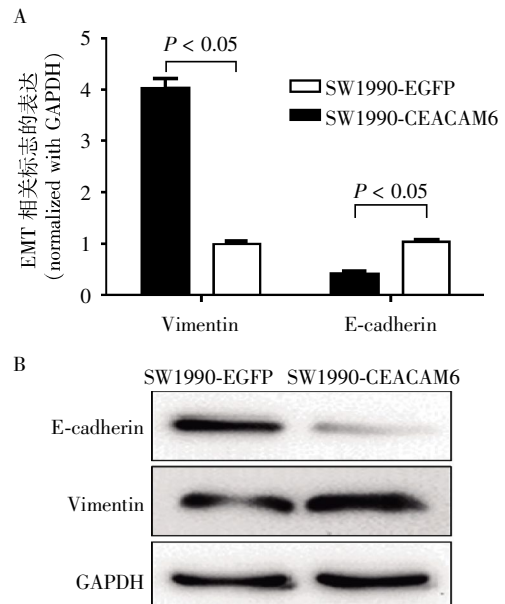


图 3 定量 RT-PCR(A)和 Western blot(B)检测 EMT 相关标志的表达

Figure 3 the expression of EMT-associated markers by Q-PCR and Western blot

2.4 CEACAM6 增强 SW1990 细胞株的侵袭能力

Transwell 小室检测细胞侵袭能力,每 100 倍视野中可见 SW1990-CEACAM6 细胞穿透数为(181 ±

18)个,而 SW1990-EGFP 细胞穿透数为(92 ± 7)个($P < 0.05, n = 10$, 图 4)。结果显示 SW1990-CEACAM6 细胞的侵袭能力明显增强。

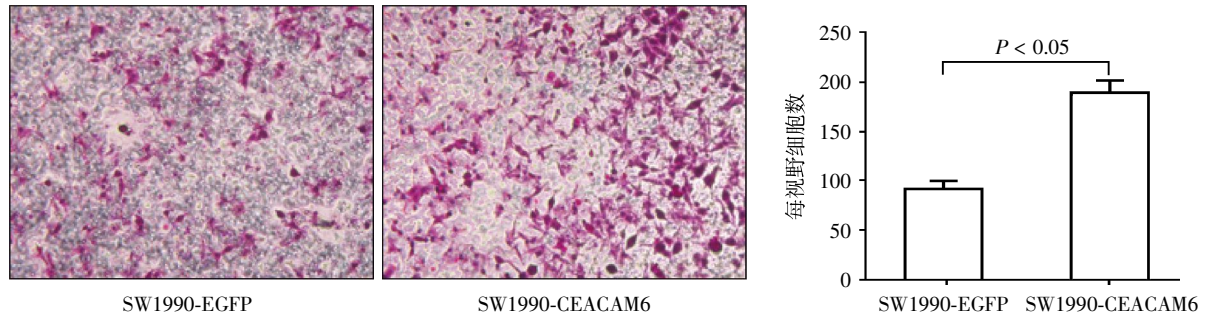


图 4 细胞侵袭能力检测(× 100)

Figure 4 The invasion activity of SW1990-EGFP and SW1990-CEACAM6 (× 100)

2.5 CEACAM6 增强 SW1990 对吉西他滨的耐药性

不同浓度的吉西他滨作用于 SW1990-CEACAM6 及 SW1990-EGFP 两种细胞株,MTT 法检测不同浓度药物作用后两种细胞株的抑制率并绘制抑制曲线(图 5)。分别计算两种细胞株的 IC50,SW1990-CEACAM6 为 (1581 ± 154)μmol/L 明显高于 SW1990-EGFP(3.85 ± 0.67)μmol/L($P < 0.05, n = 5$)。

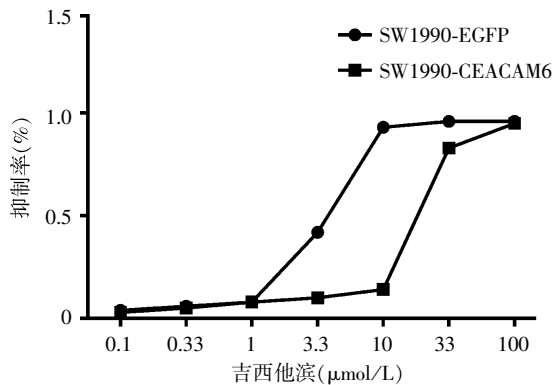


图 5 SW1990-EGFP 与 SW1990-CEACAM6 对吉西他滨的抑制率

Figure 5 The inhibition ratios of SW1990-EGFP and SW1990-CEACAM6 to gemcitabine

3 讨论

胰腺癌是恶性程度最高的致死性肿瘤之一,由于侵袭性强,缺乏有效的早期诊断方法,且对放化疗不敏感,预后极差。EMT 是胚胎发育中的一个基本过程,基本特征是上皮细胞的特征丢失并伴有间质细胞特征获得,如 E-cadherin 表达下降, Vimentin 和 fibronectin 表达上调^[10]。近年来许多研究表明,EMT 在肿瘤的转移和耐药过程中起着重要作用^[11-12],在

胰腺癌中,Rhim 等^[13]通过胰腺癌小鼠模型研究表明,EMT 可促进胰腺癌的转移。Joost 等^[14]研究发现 GLI1 抑制剂能够明显促进胰腺癌细胞的 EMT 过程, GLI1 降低将明显增强胰腺癌的转移能力。Sureban 等^[15]在对 KRAS 转基因胰腺癌小鼠模型的研究中发现,DCAMKL-1 能够调节胰腺癌细胞的 EMT 过程。本实验室王辉等^[16]发现胰腺癌耐药株 SW1990/GZ 与亲本 SW1990 相比,发生了明显的 EMT 过程。CEACAM6 作为一种具有癌基因功能的分子黏蛋白,在多种恶性肿瘤中高表达,其表达与胰腺癌患者预后密切相关,是预后的独立危险因素,抑制 CEACAM 在胰腺癌细胞中的表达可以降低其侵袭能力,促进凋亡^[17-18]。

本研究中首先建立稳定转染 CEACAM6 的 SW1990-CEACAM6 胰腺癌细胞株并鉴定,细胞形态学观察发现过表达 CEACAM6 后,细胞由多边形转变为纺锤样,出现伪足,极性丧失,细胞黏附减少,获得间质细胞特性。定量 PCR 及 Western blot 均证实上皮细胞标记物 E-cadherin 的表达明显减弱,而间质细胞标记物 Vimentin 的表达明显增强,提示细胞发生了 EMT 过程。随后体外细胞功能实验 Transwell 检测发现,与 SW1990-EGFP 细胞株相比,SW1990-CEACAM6 细胞株具有更强的侵袭能力。MTT 法检测 SW1990-CEACAM6 比 SW1990-EGFP 具有更强的吉西他滨耐药性。

目前在胰腺癌的 EMT 研究中发现,多种信号通路均能诱导胰腺癌 EMT 过程,而这些通路对 EMT 的调节点均集中在 EMT 的关键调节因子包括 Snail,Slug,ZEB1 和 Twist 等具有锌指结构的转录因子^[19-20]。本研究发现 CEACAM6 能够明显诱导胰腺

癌细胞株 SW1990 发生 EMT 过程,进而促进胰腺癌细胞的恶性潜能,而其发生调控的机制尚有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Siegel R,Naishadham D,Jemal A. Cancer statistics,2012 [J]. CA Cancer J Clin,2012,62(1):10-29
- [2] Hidalgo M. Pancreatic cancer[J]. N Engl J Med,2010,362(17):1605-1617
- [3] Kalluri R,Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. J Clin Invest,2009,119(6):1420-1428
- [4] Acloque H,Adams MS,Fishwick K,et al. Epithelial-mesenchymal transitions:the importance of changing cell state in development and disease[J]. J Clin Invest,2009,119(6):1438-1449
- [5] Jantschkeff P,Terracciano L,Lowy A,et al. Expression of CEACAM6 in resectable colorectal cancer;a factor of independent prognostic significance[J]. J Clin Oncol,2003,21(19):3638-3646
- [6] Maraqa L,Cummings M,Peter MB,et al. Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 6 predicts breast cancer recurrence following adjuvant tamoxifen[J]. Clin Cancer Res,2008,14(2):405-411
- [7] Chapin C,Bailey NA,Gonzales LW,et al. Distribution and surfactant association of carcinoembryonic cell adhesion molecule 6 in human lung [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2012,302(2):L216-225
- [8] Duxbury MS,Matros E,Clancy T,et al. CEACAM6 is a novel biomarker in pancreatic adenocarcinoma and PanIN lesions[J]. Ann Surg,2005,241(3):491-496
- [9] Duxbury MS,Ito H,Benoit E,et al. CEACAM6 is a determinant of pancreatic adenocarcinoma cellular invasiveness[J]. Br J Cancer,2004,91(7):1384-1390
- [10] Zeisberg M,Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions[J]. J Clin Invest,2009,119(6):1429-1437
- [11] Singh A,Settleman J. EMT,cancer stem cells and drug resistance;an emerging axis of evil in the war on cancer [J]. Oncogene,2010,29(34):4741-4751
- [12] Cano CE,Motoo Y,Iovanna JL. Epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic adenocarcinoma[J]. Scientific-World Journal,2010,10:1947-1957
- [13] Rhim AD,Mirek ET,Aiello NM,et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation[J]. Cell,2012,148(1-2):349-361
- [14] Joost S,Almada LL,Rohnalter V,et al. GLI1 inhibition promotes epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells[J]. Cancer Res,2012,72(1):88-99
- [15] Sureban SM,May R,Lightfoot SA,et al. DCAMKL-1 regulates epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cells through a miR-200a-dependent mechanism [J]. Cancer Res,2011,71(6):2328-2338
- [16] 王 辉,张 烨,吴峻立,等. 耐吉西他滨胰腺癌细胞株 SW1990/GZ 上皮间质转化现象的研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2012,32(3):306-309,373
- [17] Duxbury MS,Ito H,Zinner MJ,et al. CEACAM6 gene silencing impairs anoikis resistance and in vivo metastatic ability of pancreatic adenocarcinoma cells[J]. Oncogene,2004,23(2):465-473
- [18] Blumenthal RD,Hansen HJ,Goldenberg DM. Inhibition of adhesion,invasion,and metastasis by antibodies targeting CEACAM6(NCA-90) and CEACAM5 (Carcinoembryonic Antigen)[J]. Cancer Res,2005,65(19):8809-8817
- [19] Shih JY,Yang PC. The EMT regulator slug and lung carcinogenesis[J]. Carcinogenesis,2011,32(9):1299-304
- [20] de Herreros AG,Peiro S,Nassour M,et al. Snail family regulation and epithelial mesenchymal transitions in breast cancer progression[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia,2010,15(2):135-147

[收稿日期] 2012-05-27