

褪黑素抑制缺氧引起的 SGC-7901 人胃癌细胞上皮-间充质转化

陈宜刚¹, 许蕊^{2*}

(¹泰州职业技术学院医学技术学院, 江苏 泰州 225300; ²南京医科大学生理学系, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究褪黑素对缺氧引起的 SGC-7901 人胃癌细胞上皮-间充质转化(EMT)的作用,并初步揭示其分子机制。方法:在建立缺氧诱导 SGC-7901 人胃癌细胞发生 EMT 的基础上,通过免疫印迹方法检测蛋白表达水平、免疫荧光的方法检测蛋白在细胞中的分布和表达,研究褪黑素对 EMT 过程的作用。结果:缺氧使 SGC-7901 人胃癌细胞发生 EMT,表现为形态发生改变,上皮标志物表达量减少,间充质标志物表达增加,褪黑素可抑制缺氧条件下活性氧簇(ROS)的产生和缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)的表达及 EMT。结论:在缺氧条件下 SGC-7901 人胃癌细胞可发生 EMT,褪黑素可抑制该过程。这些结果揭示了褪黑素在缺氧引起的肿瘤细胞 EMT 过程中发挥的抑制作用,为褪黑素的临床应用提供了重要的理论依据。

[关键词] 缺氧;SGC-7901 人胃癌细胞;上皮-间充质转化;褪黑素

[中图分类号] R735.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)11-1508-06

doi:10.7655/NYDXBNS20131105

Melatonin inhibits hypoxia induced epithelial- mesenchymal transition of SGC-7901 gastric cancer cells

Chen Yigang¹, Xu Rui^{2*}

(¹College of Medical Technology, Taizhou Polytechnic College, Taizhou 225300; ²Department of Physiology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To elucidate the function of melatonin on hypoxia-induced epithelial- mesenchymal transition (EMT) of SGC-7901 gastric cancer cells and to reveal the mechanisms underlying. **Methods:** After hypoxia for 96h, expression of epithelial and mesenchymal makers of SGC-7901 gastric cancer cells was detected using Western blot and immunofluorescence was employed to investigate distribution of proteins to see if EMT acured. Then we treated SGC-7901 gastric cancer cells by 1 mmol/L concentration of melatonin under hypoxia environment to see if EMT was inhibited. **Results:** Hypoxia induced morphological change of SGC-7901 gastric cancer cells, as well as decreased E-cadherin and increased vimnetin and α -SMA. The reactive oxygen species (ROS) and exprssion of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) both abolished by treatment of melatonin, so as EMT. **Conclusion:** We found that melatonin can abolish hypoxia-induced EMT of SGC-7901 gastric cancer cells, which can be used for clinical application.

[Key words] hypoxia; SGC-7901 gastric cancer cells; EMT; melatonin

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(11): 1508-1513]

我国是胃癌高发国家,我国每年新发胃癌患者 40 万,死亡 30 万,已成为肿瘤患者的主要死因^[1]。胃癌及其他恶性肿瘤中常存在缺氧现象,这是由于肿瘤细胞比正常的内皮细胞生长快而消耗了更多的氧气所致^[2]。缺氧环境能够诱导肿瘤细胞发生上皮-间充质转化(EMT),促进肿瘤细胞迁移能力增加^[3]。

在 EMT 过程中,上皮型肿瘤细胞获得间充质样细胞的特征,表现为迁移及浸润能力、对胞外基质的消化能力都明显提升^[4],细胞表面的上皮标志物如 E-cadherin、zonula occludens-1 (ZO-1)、desmoplakin 表达水平下降,而间充质标志物如 Vimentin、N-cadherin、 α -SMA、Twist 表达上调^[5]。同时缺氧环境可以诱导活性氧簇(ROS)产生^[6],研究发现在多种人类肿瘤细胞系中,细胞内 ROS 产量增加是缺氧环境诱导 EMT 现象发生的关键^[7]。

褪黑素是由松果体合成分泌的一种吲哚类神经

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81201614)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: xurui20062624@163.com

内分泌激素^[8],褪黑素及其代谢产物都具有抗氧化作用,能直接清除 ROS^[9-11]。有研究发现褪黑素能够抑制缺氧条件下细胞中 ROS 的产生^[12]及缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)的表达^[13],但其在缺氧诱导的 EMT 过程中是否发挥作用尚无研究。本工作旨在研究褪黑素是否对缺氧诱导的 EMT 过程有抑制作用,我们研究发现,褪黑素能够抑制缺氧条件下胃癌细胞内 ROS 的产生,进而降低 HIF-1 α 的表达,从而抑制缺氧诱导的 EMT 过程。

1 材料和方法

1.1 材料

SGC-7901 人胃癌细胞系购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

褪黑素(Sigma 公司,美国),鼠抗 E-cadherin 单克隆抗体(BD 公司,美国),鼠抗 GAPDH 单克隆抗体(Millipore 公司,美国),兔抗 α -SMA 单克隆抗体、兔抗 Vimentin 单克隆抗体、兔抗 N-cadherin 单克隆抗体(Abcam 公司,美国),兔抗 HIF-1 α 单克隆抗体(Cell Signaling Technology 公司,美国),羊抗鼠和羊抗兔 IgG-HRP(Santa Cruz 公司,美国),ECL 发光试剂盒(Millipore 公司,美国),FITC 标记鬼笔环肽、FITC 标记羊抗鼠 IgG、罗丹明标记羊抗兔 IgG(Sigma 公司,美国),活性氧簇探针 DCFH-DA(Invitrogen 公司,美国),水溶性封片剂(Southern Biotech 公司,英国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

SGC-7901 人胃癌细胞使用添加 10%(V/V)胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,于 5% CO₂、常氧(21% O₂)或缺氧(2% O₂)、饱和湿度的 37℃细胞培养箱中培养。

1.2.2 蛋白提取和 Western blot 实验

实验按常规步骤进行^[14],SGC-7901 人胃癌细胞经不同处理后,用蛋白裂解液(1% SDS,100 mmol/L Tris,pH7.4,5 mmol/L EDTA,150 mmol/L NaCl,1 mmol/L 正钒酸钠,混合蛋白酶抑制剂)裂解,提取总蛋白,BCA 比色法测定蛋白浓度。取等量总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,250 mA 湿法转印 120 min,将蛋白转印到硝酸纤维膜上,用 5%脱脂奶粉(TBST 稀释)室温封闭 1 h。加入相应的一抗(1:1 000)4℃孵育过夜,TBST 洗膜 5 min \times 3 次,羊抗鼠或羊抗兔 IgG-HRP(1:2 000)室温孵育 1 h,TBST 洗膜 5 min \times 3 次,加入 ECL 化学发光液后,利用凝胶成像系统

进行拍照记录。

1.2.3 F-肌动蛋白染色及细胞免疫荧光

SGC-7901 人胃癌细胞在处理后的盖玻片上进行爬片,按实验要求经不同处理后用 4%多聚甲醛固定,0.2% TritonX-100 对细胞进行破膜处理,1% BSA 室温封闭 1 h,若要对细胞 F-肌动蛋白进行染色,则将盖玻片扣在终浓度为 2 μ g/ml 的 FITC-鬼笔环肽液滴上,37℃避光孵育 1 h 后即可在荧光显微镜下观察;若需对细胞内特定蛋白进行染色,则可将盖玻片扣在 1:50 稀释的一抗液滴上,置于湿盒中,4℃过夜。PBS 溶液清洗 5 min \times 3 次,将盖玻片扣在 1:200 稀释的二抗液滴上,湿盒中 37℃孵育 1 h,PBS 溶液清洗 5 min \times 3 次,水溶性封片剂封片,在荧光显微镜下观察并拍照记录。

1.2.4 细胞内过氧化氢水平的检测

将 CM2-DCFHDA (50 μ g CM2-DCFHDA + 17.2 μ l DMSO)用 DMEM 按照 1:1 000 的比例进行稀释,使终浓度为 5 μ mol/L,将处理好的细胞去除培养液,加入 2 ml CM2-DCFHDA 稀释液,在细胞培养箱中孵育 20 min。用 DMEM 洗涤细胞 3 次,以充分去除未进入细胞内的 CM2-DCFHDA,荧光显微镜观察并拍照。

1.3 统计学方法

采用 SPSS11.0 软件进行统计学分析,采用 *t*-test 法分析, $P \leq 0.05$ 表示有统计学差异。每组实验独立重复 3 次或以上。

2 结果

2.1 缺氧诱导 SGC-7901 人胃癌细胞发生形态改变

缺氧可以通过诱导肿瘤细胞发生 EMT,进而促进肿瘤细胞的迁移^[15]。因此我们分别将 SGC-7901 人胃癌细胞在常氧条件(5%CO₂,21%O₂)和缺氧条件(5%CO₂,2%O₂)培养 96 h,结果发现采用缺氧条件培养的肿瘤细胞发生了明显的形态改变,由彼此间紧密连接的卵圆形上皮样细胞,转变为分散的呈梭形的间充质样细胞(图1A)。免疫荧光结果表明缺氧条件下培养使得细胞中 E-cadherin 的表达水平明显降低,且 E-cadherin 在细胞膜上的分布明显减少, α -SMA 在常氧条件下表达较少,缺氧条件下表达量显著上升(图 1B)。发生 EMT 的细胞常会出现细胞骨架的重排^[16],因此我们使用了 FITC 标记的鬼笔环肽对细胞骨架 F-肌动蛋白进行了染色,结果发现常氧培养时,细胞间 F-肌动蛋白排列整齐致密,缺氧培养后,细胞表面产生明显的褶皱凸起(图1B),

说明缺氧可引起细胞骨架重排。

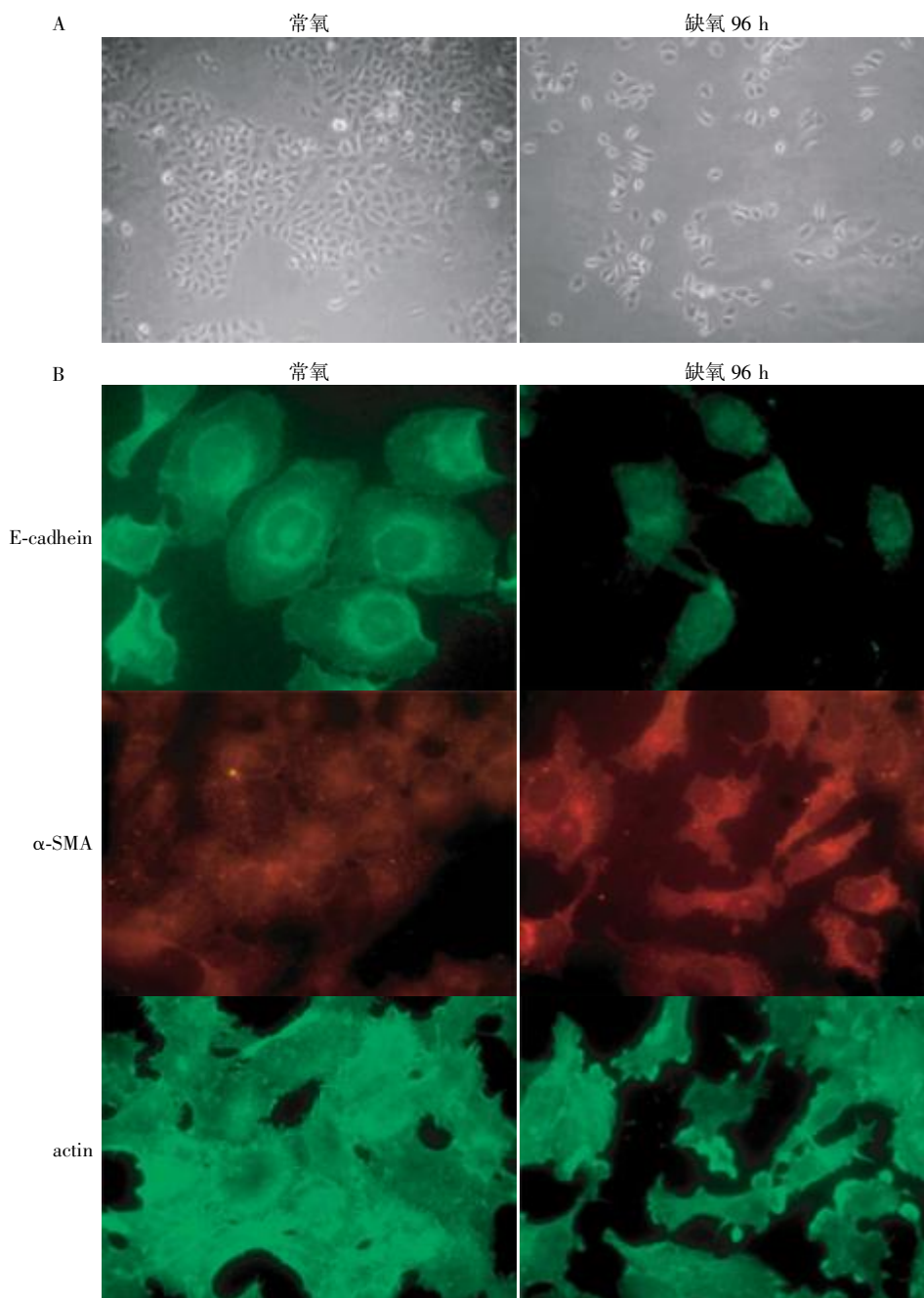
2.2 缺氧诱导 SGC-7901 人胃癌细胞发生 EMT

为了确定细胞是否发生了 EMT,通过免疫印迹的方法检测了上皮标志物 E-cadherin 和间充质标志物 α -SMA、Vimentin 和 N-cadherin 的蛋白表达水平的改变。结果发现缺氧条件培养可使细胞中上皮标志物 E-cadherin 的表达水平显著下降 ($P < 0.01, n = 3$),而间充质标志物 α -SMA、Vimentin 和 N-cadherin 的表达水平则较常氧条件培养的细胞有明显的提高

($P < 0.01, n = 3$, 图 2)。以上结果清楚表明 SGC-7901 人胃癌细胞在氧浓度为 2% 的缺氧条件下培养 96 h 后发生了 EMT。

2.3 NAC 抑制 SGC-7901 人胃癌细胞 EMT 过程

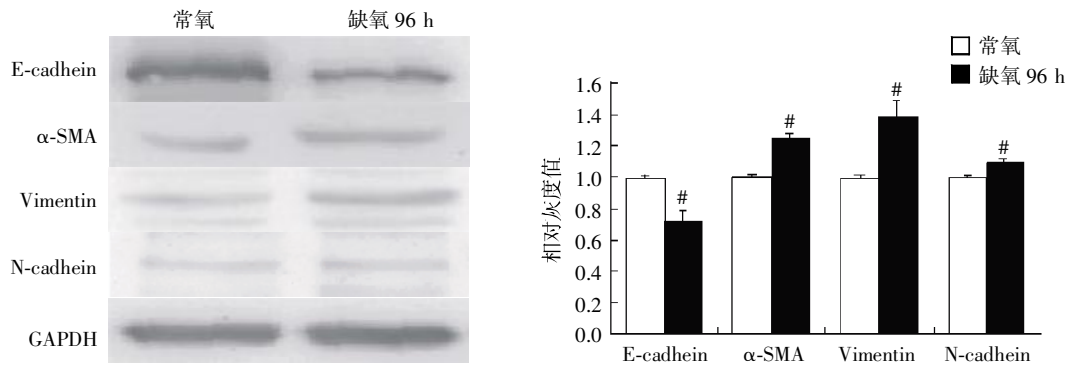
缺氧引起的肿瘤细胞 EMT 可能与依赖于 ROS 产生的 HIF 有关^[6]。N-乙酰基半胱氨酸(NAC)是一种使用广泛的抗氧化剂。本研究使用了活性氧探针 CM2-DCFHDA 对细胞内 ROS 水平进行了检测,绿色荧光的强度可表明细胞内 ROS 的水平。结果发



A: 缺氧诱导胃癌细胞形态发生改变($\times 40$); B: 缺氧引起胃癌细胞 E-cadherin、 α -SMA 表达改变及细胞骨架重排($\times 400$)。

图 1 缺氧诱导 SGC-7901 人胃癌细胞发生形态改变

Figure 1 Hypoxia-induced morphological change of SGC-7901 human gastric cancer cells



两组间比较,* $P < 0.01$ 。

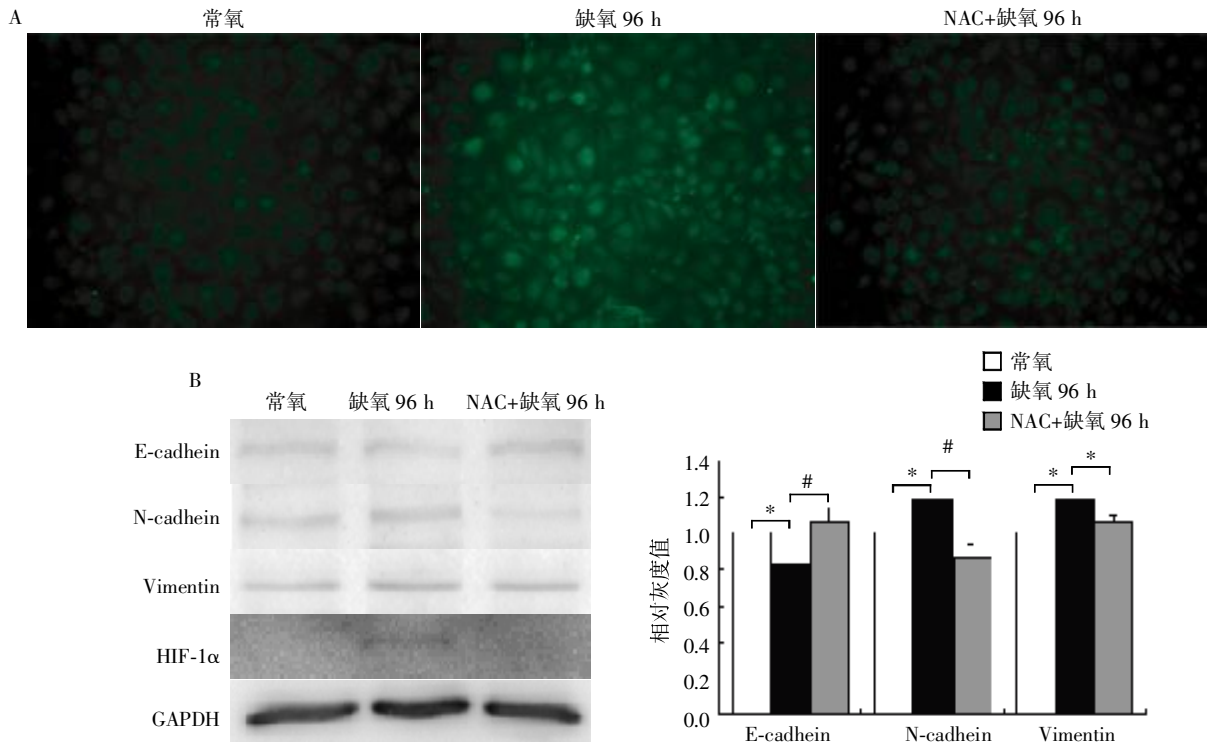
图 2 缺氧诱导 SGC-7901 人胃癌细胞发生 EMT

Figure 2 Hypoxia-induced EMT of SGC-7901 human gastric cancer cells

现,缺氧条件下培养时,细胞内 ROS 含量丰富,在缺氧的同时用 NAC 对细胞进行处理后,胞内 ROS 的产生明显减少(图 3A)。同时,用 NAC 处理后,缺氧引起的 HIF-1 α 表达增加、E-cadherin 水平减少($P < 0.01$)和 N-cadherin($P < 0.01$)、Vimentin($P < 0.05$)水平增加都得到了显著抑制(图 3B)。以上结果表明,NAC 可以通过清除 ROS,减少 HIF-1 α 的表达,从而阻断缺氧引起 EMT。

2.4 褪黑素抑制 SGC-7901 人胃癌细胞发生上皮-间充质转化

褪黑素具有很强的抗氧化性,并被证明能够清除缺氧条件下线粒体产生的 ROS^[17]。因此我们推测褪黑素可能可抑制缺氧条件下恶性肿瘤细胞的 EMT。研究结果发现,褪黑素(1 mmol/L)对缺氧产生的 ROS 具有显著的清除作用(图 4A)。同时,褪黑素可明显抑制缺氧引起的 HIF-1 α 上调、E-cadherin 水平减少($P < 0.05$)和 N-cadherin($P < 0.05$)、Vimentin 水平增加($P < 0.05$,图 4B)。以上结果表明,褪黑素的强抗氧化性能够清除缺氧产生的 ROS,进而抑制缺氧引起的 HIF-1 α 上调及其产生的促 EMT 效应。

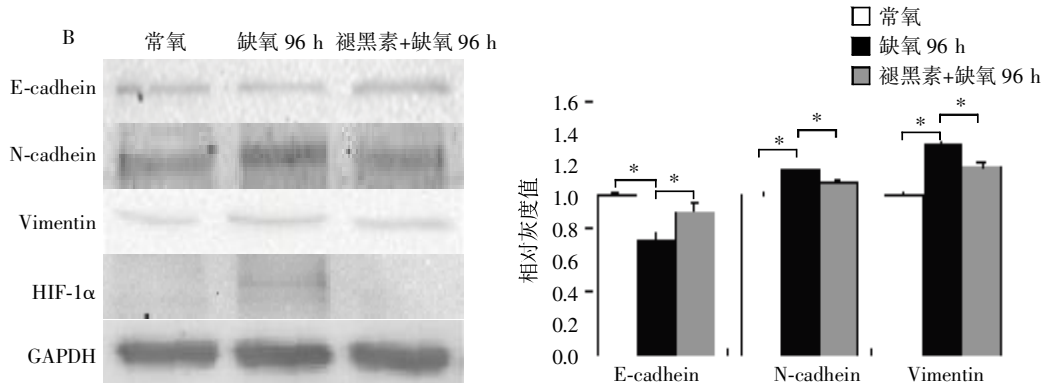
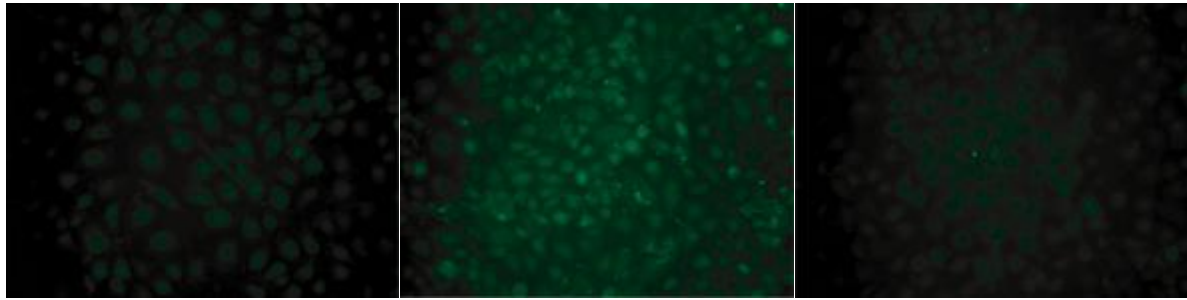


A: NAC 抑制 ROS 产生($\times 40$); B: NAC 抑制肿瘤细胞发生 EMT, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$ ($n = 3$)。

图 3 NAC 抑制 SGC-7901 人胃癌细胞发生 EMT

Figure 3 NAC inhibited-hypoxia induced EMT of SGC-7901 human gastric cancer cells

A



A;褪黑素抑制 ROS 产生;B;褪黑素抑制细胞发生 EMT。*P < 0.05。

图 4 褪黑素抑制 SGC-7901 人胃癌细胞发生 EMT

Figure 4 Melatonin inhibited-hypoxia induced EMT of SGC-7901 human gastric cancer cells

3 讨论

缺氧是肿瘤微环境的特征之一,90%的实体瘤中存在缺氧^[2]。HIF-1 是调控缺氧反应的主要转录因子,它调控着 100 多种下游基因转录^[18]。HIF-1 是一个异源二聚体蛋白,由 HIF-1α 和 HIF-1β 两个亚基组成。HIF-1α 的表达严格受控于细胞氧浓度,常氧条件下可迅速通过蛋白酶体途径降解,缺氧时其半衰期显著延长,并与 HIF-1β 结合形成一个完整的 HIF-1 转录因子。由于 HIF-1β 可在细胞中稳定表达,不受细胞内氧浓度的影响,因此 HIF-1 的转录活性主要取决于 HIF-1α 的表达量。本研究发现 SGC-7901 人胃癌细胞在 2% 氧浓度的缺氧条件下培养 96 h 后发生了明显的 EMT 现象,不仅细胞形态由彼此相互连接的卵圆形改变为梭形(图 1A),同时上皮标志物的表达显著减少,间充质标志物的表达明显增加(图 2)。HIF-1α 能够直接或间接调节包括 Twist1、Snail、Slug、ZEB1、ZEB2 和 E12/E47 在内的 EMT 调节因子,从而介导缺氧诱导的 EMT^[19-20]。另一方面,研究证明缺氧条件下 HIF-1α 的稳定表达依赖于 ROS 的产生,后者能够抑制蛋白 vHL 的活性,使得 HIF-1α 不能发生泛素化和降解,从而蛋白水平提高,并调控下游 EMT 调节因子的表达^[21]。

NAC 是一种常见的抗氧化剂,研究表明 NAC 可以抑制 TGF-β1 诱导的大鼠上皮细胞发生上皮间充质转化^[22],在人类胰腺癌细胞系中 NAC 能够减少 ROS 的产生,进而抑制缺氧引起的 EMT^[3]。在本研究中证实,NAC 可以显著降低细胞内 ROS 的生成及 HIF-1α 的上调,同时缺氧诱导的 EMT 也受到明显阻抑(图 3)。褪黑素是松果体合成的一种神经内分泌激素,也是一种很强的抗氧化剂,离体实验表明褪黑素能够抑制 H₂O₂ 诱导的氧化应激反应^[23]、减少 ROS 的产生^[12],在体实验还发现褪黑素能够减少 NADPH 依赖的 ROS 生成,减轻胆管结扎造成的死亡和肾损伤^[24]。另外,在 HCT116 人结直肠癌细胞系中的研究发现,褪黑素具有抗血管生成的作用,这一作用的发挥是通过抑制 HIF-1α 的稳定来实现的^[13]。本研究结果发现,褪黑素能够强烈抑制细胞内 ROS 的产生,同时缺氧诱导的 HIF-1α 上调以及上皮标志物 E-cadherin 表达的减少和间充质标志物表达 N-cadherin、Vimentin 的增加亦被明显抑制,即显著抑制了缺氧诱导的 EMT 过程(图 4B)。

综上所述,本文研究了褪黑素对缺氧诱导的 SGC-7901 人胃癌细胞 EMT 过程的抑制作用,阐明了这一抑制作用发挥的可能机制,这一研究结论为褪黑素在抑制肿瘤恶化方面的临床应用提供了一定

的参考和理论依据。

[参考文献]

- [1] Yang L. Incidence and mortality of gastric cancer in China[J]. *World J Gastroenterol*,2006,12(1):17-20
- [2] Harris AL. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth[J]. *Nat Rev Cancer*,2002,2(1):38-47
- [3] Shimojo Y,Akimoto M,Hisanaga T,et al. Attenuation of reactive oxygen species by antioxidants suppresses hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis of pancreatic cancer cells[J]. *Clin Exp Metastasis*,2013,30(2):143-154
- [4] Cannito S,Novo E,Compagnone A,et al. Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial-mesenchymal transition in cancer cells [J]. *Carcinogenesis*,2008,29(12):2267-2278
- [5] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies [J]. *Curr Opin Cell Biol*,2003,15(6):740-746
- [6] Klimova T,Chandel NS. Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF [J]. *Cell Death Differ*,2008,15(4):660-666
- [7] Cannito S,Novo E,di Bonzo LV,et al. Epithelial-mesenchymal transition;from molecular mechanisms,redox regulation to implications in human health and disease [J]. *Antioxid Redox Signal*,2010,12(12):1383-1430
- [8] Reiter RJ. Melatonin;the chemical expression of darkness [J]. *Mol Cell Endocrinol*,1991,79(1-3):153-158
- [9] Tan DX,Manchester LC,Terron MP,et al. One molecule, many derivatives;a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species [J]. *J Pineal Res*,2007,42(1):28-42
- [10] Allegra M,Reiter RJ,Tan DX,et al. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species[J]. *J Pineal Res*,2003,34(1):1-10
- [11] Tomás-Zapico C,Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes[J]. *J Pineal Res*,2005,39(2):99-104
- [12] Liu X,Gong Y,Xiong K,et al. Melatonin mediates protective effects on inflammatory response induced by interleukin-1 beta in human mesenchymal stem cells [J]. *J Pineal Res*,2013,55(1):14-25
- [13] Park SY,Jang WJ,Yi EY,et al. Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1alpha stabilization under hypoxia[J]. *J Pineal Res*,2010,48(2):178-184
- [14] 金建明,杜 军. 超氧阴离子和细胞外信号调节激酶在金雀异黄素抑制人乳腺癌细胞浸润中作用的研究[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*,2012,32(10):1351-1355
- [15] Shimojo Y,Akimoto M,Hisanaga T,et al. Attenuation of reactive oxygen species by antioxidants suppresses hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis of pancreatic cancer cells[J]. *Clin Exp Metastasis*,2013,30(2):143-154
- [16] Shin HW,Cho K,Kim DW,et al. Hypoxia-inducible factor 1 mediates nasal polypogenesis by inducing epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Am J Respir Crit Care Med*,2012,185(9):944-954
- [17] Keith B,Johnson RS,Simon MC. HIF1 α and HIF2 α :sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression[J]. *Nat Rev Cancer*,2011,12(1):9-22
- [18] Yang MH,Wu MZ,Chiou SH,et al. Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis [J]. *Nat Cell Biol*,2008,10(3):295-305
- [19] Yang MH,Wu KJ. TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF-1);implications in metastasis and development[J]. *Cell Cycle*,2008,7(14):2090-2096
- [20] Pan Y,Mansfield KD,Bertozi CC,et al. Multiple factors affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in vivo and in vitro[J]. *Mol Cell Biol*,2007,27(3):912-925
- [21] Aitio ML. N-acetylcysteine--passe-partout or much ado about nothing[J]. *Br J Clin Pharmacol*,2006,61(1):5-15
- [22] Rhyu DY,Yang Y,Ha H,et al. Role of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells [J]. *J Am Soc Nephrol*,2005,16(3):667-675
- [23] Bai J,Dong L,Song Z,et al. The role of melatonin as an antioxidant in human lens epithelial cells[J]. *Free Radic Res*,2013,47(8):635-642
- [24] Tain YL,Chen CC,Lee CT,et al. Melatonin regulates L-arginine transport and NADPH oxidase in young rats with bile duct ligation;role of protein kinase C [J]. *Pediatr Res*,2013,73(4-1):395-401

[收稿日期] 2013-06-03