

· 基础研究 ·

TGF-β1诱导人肺腺癌PC9细胞 上皮-间质转化的研究

张慧君* 张雷* 王和勇 陈晓峰

【摘要】背景与目的 研究表明上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 不仅参与胚胎形成与发育, 而且参与肿瘤侵袭转移。此外, 人转化生长因子-β1 (transforming growth factor-beta1, TGF-β1) 已被证实为肿瘤EMT的主要诱导剂。本研究旨在探讨TGF-β1诱导人肺腺癌PC9细胞发生EMT及其对PI3K/AKT信号通道的影响。方法将体外培养的PC9细胞用不同浓度TGF-β1处理48 h, 相差倒置显微镜下观察细胞形态学变化; Western blot和细胞免疫荧光验证EMT相关标记蛋白表达变化。同时, 采用Western blot方法检测AKT和P-AKT的表达水平。结果 TGF-β1可诱导PC9细胞向间质型细胞形态转化, 并上调间质标记蛋白Fibronectin的表达及下调P-AKT的表达。结论 TGF-β1可诱导PC9细胞发生EMT, 并影响PI3K/AKT信号通道。

【关键词】 TGF-β1; 肺腺癌PC9细胞; EMT

【中图分类号】 R734.2 DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2010.01.06

Research of TGF-β1 Inducing Lung Adenocarcinoma PC9 Cells to Mesenchymal Cells Transition

Huijun ZHANG*, Lei ZHANG*, Heyong WANG, Xiaofeng CHEN

Department of Pneumology, Shanghai Pulmonary Hospital, Shanghai, 200433, China

Huijun ZHANG and Lei ZHANG contributed equally to this paper.

Corresponding author: Xiaofeng CHEN, E-mail: Cxf229900@yahoo.com.cn

【Abstract】 **Background and objective** It has been proven that epithelial-mesenchymal transition (EMT) not only correlated with embryonic development but also could promote tumor invasion and metastasis. Transforming growth factor beta-1 (TGF-β1) has been identified as the main inducer of tumor EMT. The aim of this study was to investigate the effects of TGF-β1 on EMT and PI3K/AKT signaling pathway in lung adenocarcinoma PC9 cells. **Methods** Cultured PC9 cells were treated with different concentrations of TGF-β1 for 48 h. The morphological changes were observed under phase-contrast microscopy; EMT relative marker protein changes were assessed by Western blot and immunofluorescence staining. In addition, the expression of AKT and P-AKT were also measured by Western blot. **Results** The data showed that TGF-β1 could induce PC9 morphological alteration from epithelial to mesenchymal and upregulate the expression of mesenchymal marker protein Fibronectin. Obviously, the expression of P-AKT was downregulated by TGF-β1 treatment for 48 h. **Conclusion** TGF-β1 might induce EMT of PC9 cells, accompanied by the changes of PI3K/AKT signaling pathway.

【Key words】 TGF-β1; Lung adenocarcinoma PC9 cells; EMT

This study was supported by grants from National Science Foundation of China (to Xiaofeng CHEN)(No.30872553) and (to Heyong WANG)(No.30800631) and Shanghai Science and Technology Committee (to Xiaofeng CHEN)(No.08ZR1420900).

在恶性肿瘤中, 肺癌仍是目前最常见的死亡原因。许多肺癌患者在就诊时已发生转移, 据统计90%的肺癌患者死亡由转移引起^[1], 最近研究^[2,3]表明上皮-间质转化

(epithelial-mesenchymal transition, EMT) 在肿瘤侵袭转移过程中起重要作用。

EMT是指上皮细胞失去其上皮特征, 获得间质特性的过程, 它不仅参与胚胎形态的形成、心脏的发育和慢性退行性纤维化, 而且促进肿瘤侵袭转移^[4]。此外, 细胞外信号的生长因子如HGF、EGF、TGF-β、IGF、VEGF等可经过不同的信号通道诱导细胞发生EMT, 已证实PI3K/AKT信号通路参与EMT发生^[5]。本文旨在研究

本研究受国家自然科学基金资助项目 (No.30872553和No.30800631) 和上海市自然科学基金资助项目 (No.08ZR1420900) 资助

张慧君和张雷同为第一作者

作者单位: 200433 上海, 上海市肺科医院 (通讯作者: 陈晓峰,

E-mail: Cxf229900@yahoo.com.cn)

TGF- β 1诱导人肺腺癌PC9细胞发生EMT及对PI3K/AKT信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 人肺腺癌PC9细胞为上海肺科医院肺癌免疫研究室常规传代培养；TGF- β 1购自R&D公司；单克隆兔抗人E-cadherin、多克隆兔抗人AKT和单克隆小鼠抗人p-AKT均购自Cell Signaling Technology公司；单克隆小鼠抗人Fibronectin和Vimentin购自Santa Cruz公司；辣根酶标记羊抗小鼠或抗兔IgG购自Abgent公司；FITC标志的羊抗兔IgG购自Upstates公司；DMEM购自Gibco公司。

1.2 细胞培养 PC9细胞在37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下用含10%新生牛血清、100 U/mL青霉素、100 μ g/mL庆大霉素、低糖-DMEM培养基中培养。用0.25%胰酶消化传代。细胞培养至融合70%-80%后，用无血清培养基饥饿过夜，再加入TGF- β 1处理48 h，按实验要求分组。

1.3 细胞形态学观察 将PC9细胞传代于6孔板并用无血清培养基饥饿过夜，经不同浓度（0 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL）TGF- β 1处理48 h后在相差显微镜下观察细胞形态变化并拍照。

1.4 Western blot检测 不同浓度（0 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL）TGF- β 1处理细胞48 h后，培养瓶中的贴壁细胞用4℃的PBS洗涤后转移到EP管，12 000 rpm离心5 min，弃去上清，将收集到的细胞加入细胞裂解液裂解后，取上清液-20℃储存。上样，80 V电泳积聚蛋白，100 V电压使蛋白分离并转膜，5%脱脂牛奶封闭1 h。用单克隆兔抗人的E-cadherin（1:1 000）、单克隆小鼠抗人的Fibronectin和Vimentin（1:100）、多克隆兔抗人AKT和单克隆小鼠抗人p-AKT（1:500）分别与膜接触4℃孵育过夜后，用TBST在脱色摇床下洗膜5 min×3次，在加辣根酶标记羊抗小鼠或抗兔IgG，室温下孵育1 h后，用TBST洗膜5 min×3次，加入ECL化学发光显示剂在室温下反应1 min后，用X光片曝光，然后定影、显影。

1.5 细胞免疫荧光检测 以每孔 1×10^4 个细胞接种于6孔培养板中预置的载玻片上，细胞贴壁爬片，用无血清培养基饥饿过夜，加入不同浓度（0 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL）TGF- β 1处理48 h后，取出载玻片，用0.4%多聚甲醛固定15 min，加入单克隆兔抗人的E-cadherin（1:200）、单克隆小鼠抗人Fibronectin和Vimentin（1:50）4℃过夜，加FITC标志的羊抗兔IgG和Cy3标志的羊抗小鼠IgG（1:50），37℃下孵育1 h，缓冲甘油封固，荧光显微镜

下观察并拍片。

2 结果

2.1 TGF- β 1诱导PC9细胞形态学变化观察 PC9细胞在不同浓度（0 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL）TGF- β 1处理48 h后，通过相差显微镜观察，未处理的PC9细胞呈不典型上皮细胞形态，经TGF- β 1刺激后，大部分细胞形态明显拉长，呈现明显的间质细胞形态，且5 ng/mL TGF- β 1组比1 ng/mL组更为明显。此外，细胞间连接也变得更疏松（图1）。

2.2 TGF- β 1对PC9细胞上皮及间质标记蛋白表达的影响 不同浓度（0 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL）TGF- β 1处理PC9细胞48 h后，Western blot显示TGF- β 1并不影响PC9细胞上皮标记蛋白E-cadherin和间质标记蛋白Vimentin的表达。然而，间质标记蛋白Fibronectin的表达量却随TGF- β 1浓度的增加也相应增加（图2）。另外通过细胞免疫荧光也证实了Western blot的结果（图3）。

2.3 TGF- β 1对PI3K/AKT信号通路的影响 PC9细胞经不同浓度（0 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL）TGF- β 1处理48 h后，Western blot显示P-AKT经TGF- β 1处理后其表达量降低，且1 ng/mL组和5 ng/mL组P-AKT表达量减少大致相仿（图4）。

3 讨论

肿瘤转移是恶性肿瘤进展的重要步骤，也是恶性肿瘤患者死亡的重要原因。因此研究肿瘤转移的分子机制对抑制恶性肿瘤转移、提高肿瘤患者生存率至关重要。肿瘤转移是一个复杂的、多步骤的过程，首先肿瘤细胞脱离原发灶，通过血管生成和基底膜重建进入循环系统，但进入循环系统的肿瘤细胞必须克服循环系统的各种障碍才能到达转移部位。肿瘤转移涉及多种调控机制，其中促进肿瘤细胞转移的重要机制之一就是EMT^[6,7]。

Greenburg等^[8]指出培养中的上皮细胞可获得间质细胞特性，最早提出了EMT发生的证据。在胚胎形成、肿瘤发生发展及某些纤维化疾病的过程中，TGF- β 作为EMT的主要诱导剂备受关注^[9]。TGF- β 1作为TGF- β 家族的重要成员之一，在肿瘤发生发展及某些纤维化疾病过程中已被证实为EMT的主要诱导剂^[10-13]。但是，对人肺腺癌PC9细胞来说，TGF- β 1能否诱导PC9细胞发生EMT

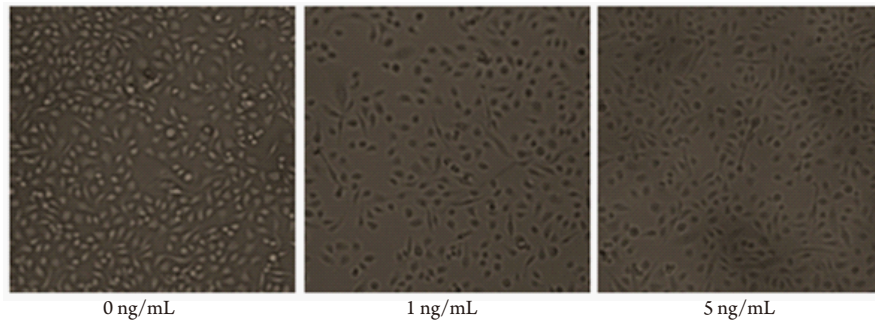


图1 PC9细胞经不同浓度(0 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL) TGF-β1处理48 h后的形态学变化

Fig 1 Morphologic changes of PC9 cells induced by different concentrations (0 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL) of TGF-β1 for 48 h

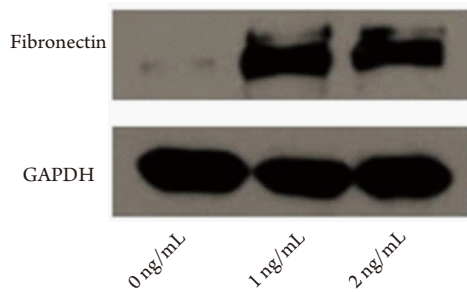


图2 Western blot检测PC9细胞EMT相关标记蛋白Fibronectin表达变化

Fig 2 The expression change of EMT related marker protein Fibronectin in PC9 cells was assessed by Western blot

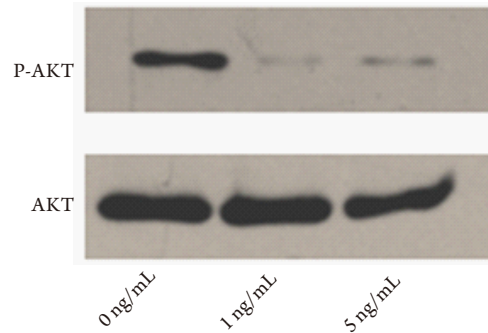


图4 Western blot检测TGF-β1对PC9细胞AKT和P-AKT的表达

Fig 4 The expression of AKT and P-AKT in PC9 cells was assessed by Western blot

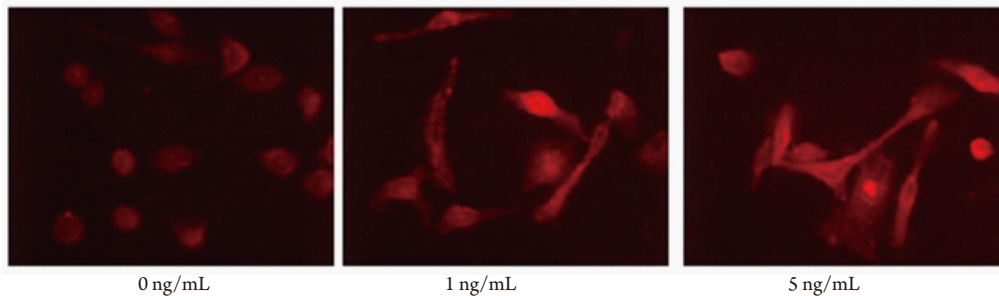


图3 细胞免疫荧光检测PC9细胞EMT相关标记蛋白Fibronectin表达变化

Fig 3 The expression change of EMT related marker protein Fibronectin in PC9 cells was detected by immunofluorescence staining

及对PI3K/AKT信号通路影响又如何? 目前尚无相关报道。

TGF-β1诱导PC9细胞发生EMT首先在细胞形态方面被证实^[7]。Kasai等^[11]指出肺腺癌A549细胞在TGF-β1作用下,由典型卵石状的上皮表型转化成纤维细胞样的间质表型,同时相邻细胞间连接也变得疏松^[11]。Yan等^[14]用低氧处理肝癌细胞发生EMT,细胞诱导形态结果与Kasai相似。本研究结果显示未处理的PC9细胞呈不典型的上皮细胞形态,经TGF-β1处理后大部分细胞形态较未处理组明显拉长,相邻细胞间连接也变得疏松。为了进一步证实经TGF-β1处理的PC9细胞可发生EMT,我们首先用Western blot验证EMT相关标记蛋白,结果显示TGF-β1处

理PC9细胞既没有下调上皮标记蛋白E-cadherin的表达,也没上调间质标记蛋白Vimentin的表达,仅仅是上调了间质标记蛋白Fibronectin的表达,细胞免疫荧光也证实了间质标记蛋白Fibronectin表达上调。Shintani等^[15]指出培养中的肿瘤细胞仅发生不完全EMT,从严格意义上讲我们不能观察到真正的EMT^[15]。Voulgari等^[16]指出发生不完全EMT的肿瘤细胞,其分子标记物和细胞特征可发生不同程度的改变^[16]。因此,在本研究中,TGF-β1可诱导肺腺癌PC9细胞发生EMT,且为不完全EMT。

TGF-β可通过酪氨酸激酶受体迅速激活PI3K/AKT信号通路^[17,18]。PI3K激酶调节亚基已被证实与TβRI和TβRII受体相关,并可提高TGF-β的激活效果^[19]。PI3K/AKT

信号通路的阻断可抑制TGF- β 诱导的细胞形态学变化,并使a-SAM表达下调和E-cadherin表达上调^[20,21]。由此可见,在EMT过程中,TGF- β 在PI3K/AKT信号通路的激活中起重要作用。Chao等^[22]指出经TGF- β 处理的肿瘤细胞的p-AKT表达量在4 h时达到高峰,之后其表达量逐渐减低。我们用TGF- β 1处理PC9细胞48 h后p-AKT的表达量较未处理组明显减少,而1 ng/mL组和5 ng/mL组的减少量并无差别,可推测PC9细胞在TGF- β 1的刺激下,p-AKT的表达随时间的变化而发生改变,但与TGF- β 1浓度关系不大。

总而言之,TGF- β 1可诱导肺腺癌PC9细胞发生不完全EMT,并影响PI3K/AKT信号通路。已证实PI3K/AKT信号通路参与胃癌的侵袭转移^[23],那么此通路对肺腺癌PC9细胞的侵袭转移能力又有何影响,还需进一步研究。

参 考 文 献

- Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(6): 449-458.
- Gavert N, Ben-Ze'ev A. Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors. *Trends Mol Med*, 2008, 14(5): 199-209.
- Nawshad A, Lagamba D, Polad A, et al. Transforming growth factor- β signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. *Cells Tissues Organs*, 2005, 179(1-2): 11-23.
- Wu Y, Zhou BP. New insights of epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2008, 40(7): 643-650.
- Zhang HJ, Wang HY, Cheng XF, et al. The research progress of epithelial-mesenchymal transition in tumor invasion and metastasis. *Chin Bull Life Sci*, 2009, 21(4): 556-559. [张慧君, 王和勇, 陈晓峰, 等. 上皮间质转化在肿瘤侵袭转移中的研究进展. *生命科学*, 2009, 21(4): 556-559.]
- Jechlinger M, Grunert S, Beug H. Mechanisms in epithelial plasticity and metastasis: insights from 3D cultures and expression profiling. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2002, 7(4): 415-432.
- Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(6): 442-454.
- Greenberg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol*, 1982, 95(1): 333-339.
- Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*, 2009, 19(2): 156-172.
- Fan JM, Ng YY, Hill PA, et al. Transforming growth factor- β regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation *in vitro*. *Kidney Int*, 1999, 56(4): 1455-1467.
- Kasai H, Allen JT, Mason RM, et al. TGF- β 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res*, 2005, 6(1): 56.
- Ellenrieder V, Hendlers SF, Boeck V, et al. Transforming growth factor β 1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. *Cancer Res*, 2001, 61(10): 4222-4228.
- Rees JR, Onwuegbusi BA, Save VE, et al. *In vivo* and *in vitro* evidence for transforming growth factor- β 1-mediated epithelial to mesenchymal transition in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res*, 2006, 66(19): 9583-9590.
- Yan W, Fu Y, Tian D, et al. PI3 kinase/Akt signaling mediates epithelial-mesenchymal transition in hypoxic hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 382(3): 631-636.
- Shintani Y, Maeda M, Chaika N, et al. Collagen I promotes epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer cells via transforming growth factor- β signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 38(1): 95-104.
- Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1796(2): 75-90.
- Lin CC, Chiang LL, Lin CH, et al. Transforming growth factor- β 1 stimulates heme oxygenase-1 expression via the PI3K/Akt and NF- κ B pathways in human lung epithelial cells. *Eur J Pharmacol*, 2007, 560(2-3): 101-109.
- Yeh YY, Chiao CC, Kuo WY, et al. TGF- β 1 increases motility and alpha-beta3 integrin up-regulation via PI3K, Akt and NF-kappaB-dependent pathway in human chondrosarcoma cells. *Biochem Pharmacol*, 2008, 75(6): 1292-1301.
- Yi JY, Shin I, Arteaga CL. Type I transforming growth factor β receptor binds to and activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*, 2005, 280(11): 10870-10876.
- Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor- β -mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem*, 2000, 275(47): 36803-36810.
- Kattla JJ, Carew RM, Heljic M, et al. Protein kinase B/Akt activity is involved in renal TGF- β 1-driven epithelial-mesenchymal transition *in vitro* and *in vivo*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 295(1): F215-225.
- Cho HJ, Baek KE, Saika S, et al. Snail is required for transforming growth factor- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition by activating PI3kinase/Akt signal pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 353(2): 337-343.
- Bae IH, Yoon SH, Lee SB, et al. Signaling components involved in Bcl-w-induced migration of gastric cancer cells. *Cancer Lett*, 2009, 277(1): 22-28.

(收稿: 2009-11-18 修回: 2009-12-22)

(本文编辑 丁燕)