

人卵巢癌 A2780 细胞侵袭转移与 HES1 相关性的实验研究

吴利英 王明义 辛晓燕[△] 陈必良

(第四军医大学西京医院妇产科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨人卵巢癌细胞 A2780 中的 HES1 表达与人卵巢癌侵袭及转移的关系。方法:分别运用实时 RT-PCR、Western Blotting 及细胞免疫荧光法检测 γ 分泌酶抑制剂作用前后 A2780 细胞中 HES1 的表达水平,Transwell 小室试验及 MTT 法分别用于检测细胞的侵袭、迁移及黏附能力。结果:下调 A2780 细胞中 HES1 的表达水平后,A2780 细胞的黏附、侵袭及转移能力下降,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论:HES1 的表达与人卵巢癌细胞的侵袭及转移密切相关,下调其表达可抑制卵巢癌细胞的黏附、侵袭及转移能力。

关键词 卵巢癌;DAPT;HES1;侵袭;转移

中图分类号 R737.31 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)05-829-04

The Study of Relationship between HES1 and Invasion and Metastasis Potency of Human Ovary Cancer Cell A2780

WU Li-ying, WANG Ming-yi, XIN Xiao-yan^A, CHEN Bi-liang

(Department of Gynecology and Obstetrics, Xijing Hospital, Fourth Military Medicine University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between HES1 and the invasion and metastasis ability of A2780 cells by down-regulating its expression. **Methods:** The RNA level of HES1 was detected by real-time RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) method. Western Blotting was used to detect the protein level of HES1. The adhesion assay was used to detect the cancer cell adhesion abilities, the invasion and migration abilities were detected by Transwell chambers. **Results:** After down-regulating the expression of HES1, the adhesion, invasion and migration abilities of A2780 cells decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** The expression of HES1 may be correlated with invasion and metastasis potency of human ovary cancer and downregulating its expression can inhibit the adhesion, invasion and migration abilities.

Key words: Ovary cancer; DAPT; HES1; Invasion; Metastasis

Chinese Library Classification(CLC): R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)05-829-04

前言

肿瘤的转移和复发是肿瘤治疗失败的主要原因,也是导致恶性肿瘤患者死亡的主要原因所在。肿瘤细胞的黏附、侵袭、转移是肿瘤细胞扩散过程中的三个重要环节,其中涉及一系列及其复杂的相互作用的过程^[1]。卵巢癌是妇科第二常见的恶性肿瘤,由于其起病隐匿,并缺乏可靠的早期诊断方法,其死亡率位居第一。虽然手术及化疗方法不断改进和创新,卵巢癌自今仍是妇科的头号杀手^[2]。这些都要求我们进一步研究探索,寻找一个可以控制卵巢癌发生发展的方法。

Notch 信号通路在细胞生长过程中决定着细胞命运,同时也在许多恶性肿瘤发生发展、浸润及血管形成过程中起着重要作用^[3-5]。HES1 是 Notch 信号通路下游、影响细胞增值及分化的靶基因^[6-8]。本实验运用 γ -分泌酶抑制剂 DAPT ([N-[N-(3,5-Di-fluoro-phenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine-butyl ester]) 阻断

Notch 信号通路,下调 A2780 细胞中 HES1 的表达,探讨 HES1 与 A2780 细胞的黏附、侵袭及迁移能力的关系和意义。

1 材料与方法

1.1 主要药品和试剂

DMEM(Sigma 公司),HES1 兔抗人多克隆抗体(Santa cruz 生物公司),FITC 标记羊抗兔 IgG(武汉博士德生物工程有限公司),Transwell 小室(PET 滤膜孔径为 8.0 μ m,美国 Millipore 公司),DAPT 为 ALEXIS 生化公司产品,人卵巢癌细胞 A2780 细胞株(第四军医大学妇产科实验室)。

1.2 细胞培养

人卵巢癌细胞株 A2780 细胞由本实验室长期 -196℃ 冻存。复苏后,常规培养于含有 10% 小牛血清、100 IU/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养基中,在 37℃、饱和湿度及 5% CO₂ 的培养箱中进行长期培养传代。

1.3 实时 RT-PCR 实验检测 HES1 mRNA 的表达

细胞培养传代后,取对数生长期细胞,细胞用 Trizol 裂解后按 RNA 提取方法提取细胞总 RNA,并用紫外分光光度计检测其浓度及纯度。 β -actin (ID: 563571) 及 HES1 引物均由 TaKaRa 公司设计合成。 β -actin 上游引物 5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3', 下游引物 5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3'; HES1 上游引物 5'-TGG AAA TGA CAG

作者简介 吴利英(1983),女,硕士研究生,医师,主要从事妇科肿瘤方面的研究工作。E-mail: wuliyingmagic@foxmail.com

Tel: 15191814048

△通讯作者 辛晓燕(1952),女,博士生导师,主要从事妇科肿瘤的研究及诊治工作

(收稿日期:2011-08-11 接受日期:2011-09-05)

TGA AGC ACC TC-3', 下游引物 5'-TCG TTC ATG CAC TCG CTG AAG-3'。实时 RT-PCR 过程按照产品说明书操作,反转录条件:37 °C 水浴 15 分钟,85 °C 5 秒钟;RT-PCR 反应条件:95 °C 变性 10 秒、95 °C 退火 5 秒,60 °C 延伸 31 秒。经 ABI PRISM 7000 所得的 CT 值用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析处理。

1.4 Western blotting 检测细胞中 HES1 的表达

分别提取 γ -分泌酶抑制剂 DAPT 作用 24 h、48 h 前后的蛋白质,经 100 °C 变性处理 5 min,再经聚丙烯酰胺凝胶 (12% 的分离胶、5% 的堆积胶) 电泳,然后转移至硝酸纤维素膜,分别加入一抗 (β -actin 和 HES1) 和 FITC 标记的二抗。膜与抗体室温反应 2 h,每次反应后用 ECL wash buffer 室温洗 3 次,每次 10 min。最后进行 ECL 化学发光显影,全自动 X 光片洗片机洗片。结果采用凝胶图像分析仪进行分析。

1.5 细胞免疫荧光法检测 HES1 表达及定位

将无菌盖玻片置于 6 孔培养板中,再将用胰蛋白酶消化对数生长期的细胞悬液接种于各孔。其中实验组加含 75 μ mol/L DAPT 及 10% 小牛血清的 DMEM 培养基,实验组和对照组各设 3 个平行孔。常规培养 24 h,取出盖玻片,PBS 洗 3 次,预温的多聚甲醛固定 10 min,PBS 洗 3 次。5% 的 BSA 封闭 30 min,PBS 洗 3 次,加入 HES1 兔抗人多克隆抗体 (1:100),4 °C 保存过夜。PBS 洗 3 次,每次 10 min。加 FITC 标记羊抗兔 IgG (1:50),避光室温下孵育 30 min。PBS 洗 3 次,加 DAPI 作用 10 min,PBS 洗 3 次,缓冲甘油 (PBS:甘油=1:9) 封片,置于荧光显微镜下观察并拍照。

1.6 细胞黏附实验 (MTT 法)

取对数生长期的细胞,常规胰蛋白酶消化制备单细胞悬液,计数并调整细胞浓度。96 孔培养板每孔铺细胞外基质胶 70 μ l,置于超净台内风干。收集对数生长期的细胞悬液于 0.1% BSA 的 DMEM 培养基中,使终浓度为 5×10^5 /ml,每孔加入细胞悬液 100 μ l,37 °C 孵育,分别于 30 min、60 min、90 min 和 120 min 时弃去培养液,PBS 洗 3 次,加入 MTT 20 μ l,37 °C 孵育 4 h,吸弃上清,加入二甲亚砜 150 μ l,微量振荡器振荡 10 min,待蓝色沉淀完全溶解后于酶标仪测定 A490 nm 波长。其中实验组加含 75 μ mol/L DAPT 及 10% 小牛血清的 DMEM 培养基,实验组与对照组每个时间段各设 6 个平行孔。

1.7 细胞侵袭与迁移实验

将对数生长期的细胞置于含 0.1% BSA 的 DMEM 培养基中培养过夜,用少量含 0.1% BSA 的 DMEM 培养基水化已经包被了 PET 膜的 Transwell 小室。小室的下室中加入培养了 24 小时的细胞悬液 500 μ l,胰蛋白酶消化后重悬于含 0.1% BSA 的 DMEM 培养基中,调节细胞浓度至 1×10^6 /ml,上室中分别加入

100 μ l,置于 5% CO₂ 培养箱中孵育 24 小时后,取出带膜的小室,PBS 中充分洗膜,并用 PBS 浸湿的棉签轻轻擦净上室的细胞,再用 70% 的甲醇固定 10 min,滤膜自然 Giemsa 染色 90 min,蒸馏水中充分漂洗后取下 PET 膜,细胞面朝上置于载玻片上,缓冲甘油封片,在 400 倍显微镜下计数穿过滤膜的细胞数,拍照。每膜随机取 6 个视野,每组设 3 个平行滤膜。细胞迁移实验与侵袭实验类似。结果用 mean $\pm$ SD 表示,采用 Student's T 检验进行分析, $\alpha=0.05$ (two tail), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实时 RT-PCR 检测细胞中 HES1 mRNA 的表达

由图 1 可见,DAPT 作用后,A2780 中 HES1 mRNA 的表达均明显被抑制,且随着时间的延长抑制作用越明显,差异有统计学意义 ($P<0.001$)。

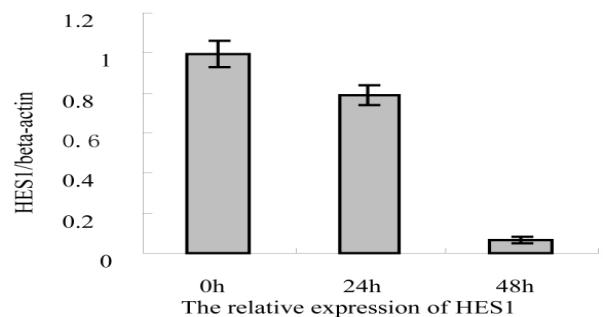


图 1 A2780 细胞中 HES1 mRNA 的表达情况

Fig. 1 The expression of HES1 mRNA in A2780 cell

2.2 Western blotting 检测细胞中 HES1 蛋白水平的表达

由图 2 可见,DAPT 作用后 A2780 中的 HES1 蛋白的表达均明显被抑制,且随着时间的延长抑制作用越明显,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

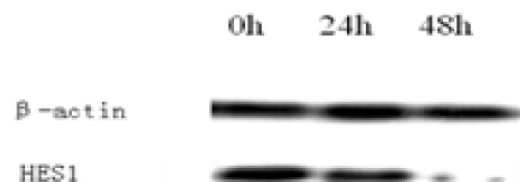


图 2 HES1 蛋白的表达

Fig. 2 The expression of HES1 protein

2.3 细胞免疫荧光法检测 HES1 表达

由图 3 可看出,HES1 在 A2780 细胞主要以核表达为主,

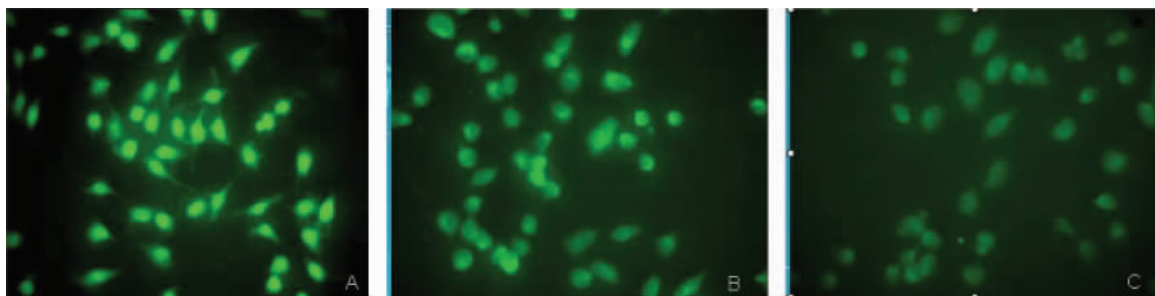


图 3 HES1 蛋白的表达及定位

Fig. 3 The expression and location of HES1 protein

胞浆也有少量表达,DAPT作用后,HES1在A2780细胞中几乎全部为核表达,且表达量下降,绿色荧光逐渐减弱,呈时间依赖性。

2.4 细胞侵袭与迁移能力

在400倍显微镜下观察,发现DAPT作用后,A2780细胞的侵袭及转移能力均下降:侵袭实验中对照组穿膜细胞数为 73.3 ± 4.28 ,DAPT组的穿膜细胞数为 22.4 ± 2.77 ,差异有统计学意义($P < 0.01$);迁移实验中对照组穿膜细胞数为 134.8 ± 5.37 ,DAPT组的穿膜细胞数为 90.3 ± 3.79 ,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 细胞黏附力检测

由图4显示的OD值可见,DAPT能够降低A2780细胞的黏附能力($P < 0.05$),且120 min后对A2780细胞黏附力的抑制作用更加明显($P < 0.01$)。

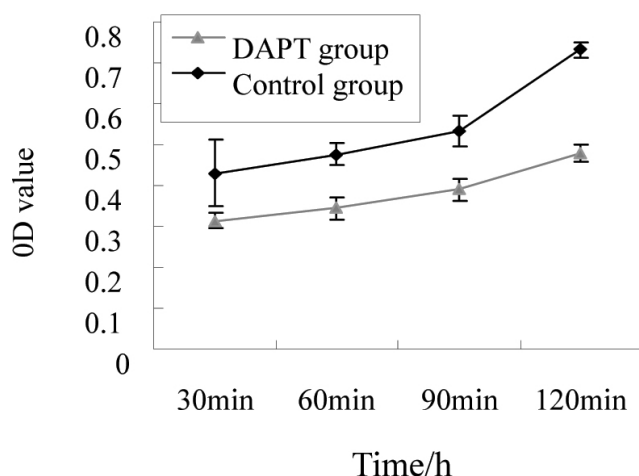


图4 A2780的黏附能力

Fig.4 The adhesion ability of A2780 cell

3 讨论

癌细胞的黏附、侵袭、转移是癌细胞扩散过程中的三个重要环节,其中细胞黏附是肿瘤细胞发生侵袭及转移的前提,是肿瘤扩散的关键步骤。Notch信号通路是三大经典的信号通路之一,在生物体细胞的分化及增殖方面发挥重要的作用,该途径的异常激活与多种疾病的发生发展相关,且在不同肿瘤中Notch基因发挥不同的作用^[9]。目前在哺乳动物细胞中已经发现的有Notch1、Notch2、Notch3和Notch4四种受体蛋白以及Delt-like-1(Dll-1)、Dll-3、Dll-4和Jagged-1、Jagged-2五种配体^[10],相邻细胞受体及配体之间相互作用诱导 γ 分泌酶介导的蛋白水解酶的释放导致Notch胞内段(NICD)的断裂^[11],NICD可进入细胞核与转录抑制因子CBF1结合,最终导致Hes、Hey等基因的释放^[12,13]。Notch能够通过CBF-1而对HES1发挥间接的调控作用,因此下调Notch的表达可间接抑制HES1的表达。

研究认为Notch1蛋白的过表达与多种肿瘤的发生发展有密切的关系^[14-18],研究证明在卵巢癌中Notch1蛋白有异常表达,Hopfer O等通过研究发现,活化的Notch1及其下游基因HES1在卵巢腺癌中的表达明显高于在卵巢腺瘤及正常卵巢组织中

的表达,并发现Notch1及其下游基因HES1在卵巢癌细胞系A2780中有表达^[19]。王明义等发现Notch1信号蛋白在卵巢癌中的表达与卵巢癌的恶性程度呈正比例关系,可能与早期癌变的启动有关^[20]。而本课题组前期研究显示,在A2780细胞中Notch1的相对表达量最高, γ -分泌酶抑制剂阻断Notch信号通路后,可通过下调Notch1及HES1的表达来抑制人卵巢癌A2780细胞的生长增殖^[21],说明HES1与人卵巢癌细胞的生长增殖有关。

目前,国内外对于HES1与卵巢癌黏附、侵袭及转移关系的研究未见报道。本研究RT-PCR结果及Western Blotting检测结果显示DAPT作用后A2780细胞中HES1 mRNA及蛋白水平的表达均下降,并表现为时间依赖性。细胞免疫荧光显示HES1在A2780细胞中主要以核表达为主,胞浆也有少量表达;DAPT作用后,HES1在A2780细胞中几乎全部为核表达,且表达量下降,绿色荧光逐渐减弱,呈时间依赖性,这与RT-PCR及Western Blotting结果相一致。细胞黏附及侵袭转移试验结果提示,DAPT下调HES1的表达后A2780细胞的黏附、侵袭及转移活性均下降。综合以上结果来看,在卵巢癌的黏附、侵袭及转移过程中HES1发挥重要的作用,在体外下调其表达可抑制人卵巢癌细胞的黏附、侵袭及转移活性,有可能是治疗卵巢癌的重要分子靶点。因此,对HES1的进一步研究也可能为卵巢癌的治疗提供新思路。

参考文献(References)

- [1] Reiss K, Ludwig A, Saftig P, et al. Breaking the tie: disintegrin-like metalloproteinases as regulators of cell migration in inflammation and invasion[J]. Pharmacol-Ther, 2006,111(3):985-1006
- [2] Paley PJ. Ovarian cancer screening: are we making any progress[J]. Curr Opin Oncol, 2001, 13(5):399-402
- [3] Wang Z, Zhang Y, Li Y, et al. Down-regulation of Notch-1 contributes to cell growth inhibition and apoptosis in pancreatic cancer cells[J]. Mol Cancer, 2006,5(3):483-493
- [4] Balint K, Xiao M, Pinnix CC, et al. Activation of Notch1 signaling is required for beta-catenin-mediated human primary melanoma progression [J]. J Clin Invest, 2005,115(11):3166-3176
- [5] Buchler P, Gazdhar A, Schubert M, et al. The Notch signaling pathway is related to neurovascular progression of pancreatic cancer[J]. Ann Surg, 2005,242(6):791-800
- [6] Kobayashi T, Mizuno H, Imayoshi I, et al. The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells[J]. Genes Dev, 2009,23(16):1870-1875
- [7] Suh JH, Lee HW, Lee JW, et al. Hes1 stimulates transcriptional activity of Runx2 by increasing protein stabilization during osteoblast differentiation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 367(1):97-102
- [8] Himes AD and Raetzman LT. Premature differentiation and aberrant movement of pituitary cells lacking both Hes1 and Propl[J]. Dev Biol, 2009,325(1):151-161

- [9] Weng AP, Aster JC. Multiple niches for Notch in cancer: context is every-thing [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2004, 14(1): 48-54
- [10] Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate[R]. *Development*, 2004, 131(5):965-973
- [11] Fortini ME. Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling[R]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(9):673-684
- [12] Iso T, Kedes L and Hamamori Y. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2003, 194(3):237-255
- [13] Kadesch T. Notch signaling: the demise of elegant simplicity [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2004, 14(5):506-512
- [14] Zagouras P, Stifani S, Blaumueller CM, et al. Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(14):6414-6418
- [15] Leethanakul C, Patel V, Gillespie J, et al. Distinct pattern of expression of differentiation and growth-related genes in squamous cell carcinomas of the head and neck revealed by the use of laser capture microdissection and Cdna arrays[J]. *Oncogene*, 2000, 19(28):3220-3224
- [16] Jundt F, Schulze Probsting KS, Anagnostopoulos I, et al. Jagged1 induced Notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells[J]. *Blood*, 2004, 103(9):3511-3515
- [17] Sjolund J, Martin J, Sugata M, et al. Suppression of renal cell carcinoma growth by inhibition of Notch signaling in vitro and in vivo[J]. *Clin Invest*, 2008, 118(1): 217-228
- [18] Maliekal TT, Bajaj J, Giri V, et al. The role of Notch signaling in human cervical cancer: implications for solid tumors[J]. *Oncogene*, 2008, 27(38):5110 - 5114
- [19] Hopfer O, Zwahlen D, Fey MF, et al. The Notch pathway in ovarian carcinomas and adenomas [J]. *Br J Cancer*, 2005, 93(6):709-718
- [20] Wang MY, Wang J, Wang L, et al. Notch1 expression correlates with tumor differentiation status in ovarian carcinoma[J]. *Medical Oncol*. 2010, 27(4):1329-1335
- [21] 吴利英, 王明义, 辛晓燕. γ 分泌酶抑制剂对人卵巢癌细胞生长的抑制作用及其机制 [J]. *现代肿瘤医学*. 2010, 18(4): 647-649
- Wu Li-ying, Wang Ming-yi, Xin Xiao-yan. γ -secretase inhibitors on human ovarian cancer cell growth inhibition and its mechanism [J]. *Journal of Modern Oncology*, 2010, 18(4): 647-649

(上接第 835 页)

- [10] Chung UI. Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development [J]. *J Clin Invest*, 2001, 107(3): 295-304
- [11] Itaha AR. a gli-mpse of hedgehog[J]. *Cell*, 1997, 90(9):193-196
- [12] Litingtung Y. Sonic hedgehog is essential to foregut development[J]. *Nat Genet*, 1998, 20(5):58-61
- [13] Koyama E. Development of stratum intermedium and its role as a Sonic hedgehog-signaling structure during odontogenesis [J]. *Dev Dyn*, 2001, 222(2): 178-191
- [14] Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis[J]. *Nature*, 2004, 432: 324-331
- [15] Clatworthy JP, Subramanian V. Stem cells and the regulation of proliferation, differentiation and patterning in the intestinal epithelium: emerging insights from gene expression patterns, transgenic and gene ablation studies[J]. *Mech Dev*, 2001, 101(1-2): 3-9
- [16] Ruiz. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells [J]. *Nat. Rev. Cancer*, 2002, 2, 361-372