

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.07.013

生长抑素对 Hela 细胞中 Claudin-3 和 Claudin-4 基因表达的调节作用 *

李 波¹ 肖凤仪¹ 李小洲² 王俊耐³ 杨 洁^{3△}(1 湖北省随州市中心医院妇产科 湖北 随州 441300; 2 湖北省随州市中心医院检验科 湖北 随州 441300;
3 华中科技大学附属同济医院妇产科 湖北 武汉 430030)

摘要 目的:探讨生长抑素对 Hela 细胞的生长调控作用以及对 claudin-3 和 claudin-4 基因的表达调控。**方法:**通过 Hela 细胞株培养,并以浓度为 10^{-6} 、 10^{-8} 、 10^{-10} 和 10^{-12} M 的生长抑素(SST)作用于 Hela 细胞,未经药物处理的细胞设为对照组。在处理组采用流式细胞仪检测 Hela 细胞的凋亡。并采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 分别检测 claudin-3 和 claudin-4 mRNA 和蛋白质表达量。**结果:**SST 加入 Hela 细胞培养 12 h 后, 10^{-10} M、 10^{-8} M 和 10^{-6} M 浓度的 SST 对 Hela 细胞有显著性的诱导凋亡作用。不同浓度的 SST 作用于 Hela 细胞 12 h 后, claudin-3 和 claudin-4 的 mRNA 和蛋白表达量都出现不同水平的增加。**结论:**在 Hela 细胞中 SST 可以促进 claudin-3 和 claudin-4 的基因表达,从而对宫颈癌的发展和扩散有抑制作用。

关键词:生长抑素;Hela 细胞;Claudin-3;Claudin-4

中图分类号:Q75;R737.33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)07-1249-04

The Regulation of Somatostatin on Claudin-3 and Claudin-4 Gene Expression in Hela Cells*

LI Bo¹, XIAO Feng-yi¹, LI Xiao-zhou², WANG Jun-nai³, YANG Jie^{3△}

(1 Department of Obstetrics and Gynecology, Suizhou City Central Hospital, Suizhou, Hubei, 441300, China;

2 Department of Clinicallaboratory, Suizhou City Central Hospital, Suizhou, Hubei, 441300, China;

3 Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hunbei, 430030, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the regulation of somatostatin on Hela cell growth as well as claudin-3 and claudin-4 gene expression. **Methods:** Hela cells were treated with 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} and 10^{-12} M somatostatin (SST), respectively. Untreated cells were used as control. Flow cytometry was used to detect the apoptosis of Hela cells. Realtime-PCR and Western blot were performed to assay the effect of SST on mRNA and protein expression of gene claudin-3 and claudin-4. **Results:** After treatment with SST by differential concentrations for 12 h, it was found that 10^{-10} M, 10^{-8} M and 10^{-6} M SST could induce a significant apoptosis in the Hela cells. Under different concentrations of SST, the mRNA and protein expression of claudin-3 and claudin-4 were up-regulated. **Conclusion:** In Hela cells, SST could induce claudin-3 and claudin-4 gene expression and inhibit development and diffuse of cervical cancer cells.

Key words: Somatostatin; Hela cells; Claudin-3; Claudin-4

Chinese Library Classification(CLC): Q75; R737.33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)07-1249-04

前言

子宫颈癌是人体最常见的恶性肿瘤之一。在女性生殖器官癌症中的发病率占首位。目前,根据全国的回顾调查,我国子宫颈癌的死亡率占所有癌症死亡率的第四位,且占女性患癌的第二位^[1,2]。目前临床上主要采用保守治疗、姑息治疗和辅助治疗甚至手术切除的手段给予治疗^[3]。

生长抑素(somatostatin, SST)是由腺垂体细胞分泌的一种肽类激素^[4]。SST 的主要生理功能包括抑制生长激素的分泌,抑制细胞生长^[5];抑制机体合成代谢和蛋白质合成。另外,关于 SST 对肿瘤转移的抑制作用目前已经有广泛的报道。已经有人

研究,重组人生长抑素(rhSST)能够抑制人胃癌细胞的生长^[6]。但在子宫颈癌中的研究尚未见报道。

claudin-3 和 claudin-4 基因编码的是紧密连接的跨膜蛋白^[7]。而紧密连接是肿瘤增长和浸润的关键屏障。近年的研究发现 claudin 蛋白在多种癌组织中的表达异常。如 claudin-3 和 claudin-4 在卵巢癌、胰腺癌以及前列腺癌中的表达量明显升高^[8-10]。研究还提示 claudin-3 和 claudin-4 可作为癌组织的特异性标记物,并可能成为治疗肿瘤的靶位点。目前有关 claudin-3 和 claudin-4 与子宫颈癌的研究却较少,但目前研究发现 claudin 在宫颈癌组织中表达均呈升高趋势^[11,12]。本文从 SST 对 Hela 细胞的作用入手,深入研究生长抑素对 Hela 细胞中

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81201639/H1606)

作者简介:李波(1975-),女,本科,副主任医师,主要研究方向:妇科肿瘤,电话:0722-3252026

△通讯作者:杨洁,电话:027-83663134, E-mail: tjyang@126.com

(收稿日期:2014-08-04 接受日期:2014-08-30)

claudin-3 和 claudin-4 基因表达的调控作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人宫颈癌细胞株 Hela 来自于中科院上海细胞所。

1.2 仪器与试剂

宫颈癌 Hela 细胞(中科院上海细胞所),生长抑素(Sigma 公司),流式细胞仪及试剂(美国贝克曼库尔特),实时定量 PCR 仪(美国 ABI 7500),PCR Master Mix (Fermentas 公司),Trizol 试剂(Invitrogen)。

1.3 实验方法

1.3.1 Hela 细胞系的培养 Hela 细胞株培养于含有 10% 的小牛血清的 DMEM 溶液中,然后置于 37℃、CO₂ 体积分数为 5% 的培养箱中培养。

1.3.2 生长抑素对 Hela 细胞的处理 将生长状态良好的 Hela 细胞接种于 96 孔板中,并将细胞稀释至浓度为 3×10^3 个细胞/孔。当细胞生长至 40% 融合时,实验组分别以浓度为 10^{-6} 、 10^{-8} 、 10^{-10} 和 10^{-12} M 的生长抑素(SST)作用于 Hela 细胞,未经药物处理的细胞为对照组。以上实验组和对照组设 3 个重复孔,实验重复 3 次。在细胞培养 12 h 后,收集细胞进行相关的检测。

1.3.3 流式细胞仪检测 Hela 的凋亡 将收集到的 Hela 细胞,用 PBS 洗 2 次、离心,弃上清液。然后缓慢加入预冷的 70% 乙醇,充分振荡,使细胞分散,固定 1 h。PBS 洗 2 次,加入 Annexin V/PI,避光染色 15min,上流式细胞仪检测,分析细胞凋亡比例。

1.3.4 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测 claudin-3 和 claudin-4 的表达 将收集到的细胞中的培养液彻底吸干后,加入 1 mL Trizol 裂解细胞,按照说明书的要求提取细胞的总 RNA,并取 1 μ g RNA 反转录为 cDNA。使用 ABI 7500 实时定量 PCR 仪检测 claudin-3 和 claudin-4 基因的表达,并以 GAPDH 作为内参基因(见表 1)。反应体系为 20 μ L, SYBR Green PCR Master Mix 10 μ L, cDNA 模板 5 μ L, 正反向引物浓度为 20 nmol/L, 无菌水定容至 20 μ L。反应条件为 50℃, 2 min; 95℃, 10 min; 95℃, 15s, 61℃, 45s, 40 个循环。每个样重复 3 个平行孔。实时定量 PCR 的特异性用溶解曲线的方法进行检测。最后采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 对基因的表达结果进行计算分析。

1.3.5 Western blot 检测 claudin-3 和 claudin-4 的表达 收集实验中的细胞,经蛋白提取液(含 10% 蛋白酶抑制剂)提取后,冰浴 30 min,离心后收集上清液;采用 Bradford 法测定蛋白质的浓度。将蛋白质样品和低分子量标准蛋白各 20 μ L 在聚丙烯酰胺凝胶电泳中进行分离,并转移至硝酸纤维素膜上。脱脂牛奶封闭硝酸纤维素膜后,用 claudin-3, claudin-4 和 GAPDH 抗体孵育,抗体浓度分别为 1:500, 1:500 和 1:200。二抗孵育后显色,然后用凝胶扫描仪图像分析软件进行扫描和蛋白带分析。

1.3.6 统计学分析 所有统计操作均在 SPSS11.5 统计软件中进行。多个样本均数的比较采用单因素方差分析。

2 实验结果

2.1 SST 对 Hela 细胞凋亡的影响

SST 加入 Hela 细胞孵育 12 h 小时后进行流式细胞检测细胞

凋亡,结果显示:在对照组和 10^{-12} M 组的细胞凋亡率无显著性差异,而 10^{-10} M、 10^{-8} M 和 10^{-6} M 组的细胞凋亡率则明显高于前两个组。证明 10^{-10} M、 10^{-8} M 和 10^{-6} M 浓度的 SST 对 Hela 细胞有显著性的诱导凋亡作用。

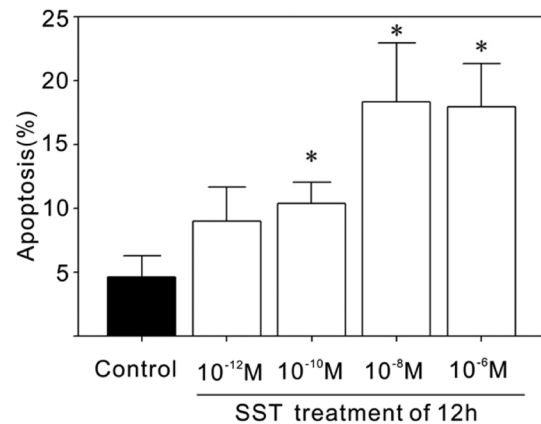


图 1 生长抑素(SST)诱导细胞凋亡。*表示与对照组有显著性差异 ($P \leq 0.05$)

Fig.1 Somatostatin(SST)induced cell apoptosis rate.* illustrates statistical difference ($P \leq 0.05$) between SST group and control group

2.2 SST 对 Hela 细胞 claudin-3 和 claudin-4 mRNA 表达的影响

不同浓度的 SST 作用于 Hela 细胞 12 h 以后, claudin-3 和 claudin-4 的 mRNA 表达量出现了差异。其中,对于 claudin-3 基因,对照组和 10^{-12} M 组之间 mRNA 表达量无显著性差异,而 10^{-10} M、 10^{-8} M 和 10^{-6} M 组的 claudin-3 mRNA 表达量则显著高于前两个组。对于 claudin-4 的 mRNA 表达量,除了 10^{-10} M SST 组与对照组无显著性差异以外, 10^{-12} M、 10^{-8} M 和 10^{-6} M 浓度的 SST 对 claudin-4 mRNA 表达有明显的促进效果。

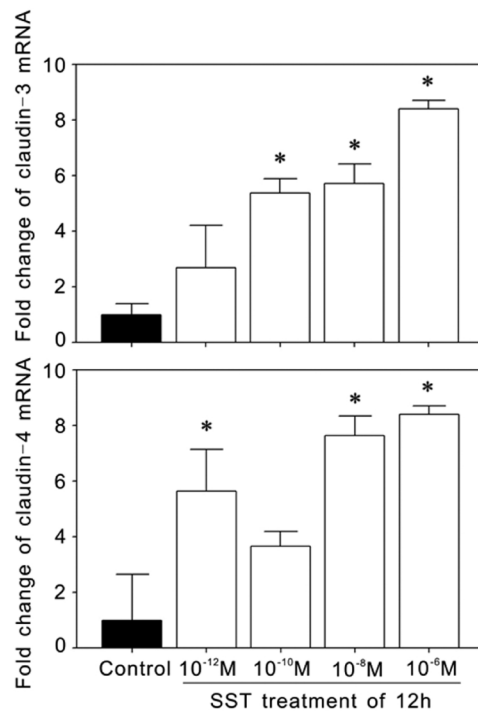


图 2 生长抑素(SST)诱导 claudin-3 和 claudin-4 mRNA 表达。*表示与对照组有显著性差异 ($P \leq 0.05$)

Fig.2 Somatostatin(SST)upregulated mRNA expression of claudin-3 and claudin-4. * Indicates a significant difference($P \leq 0.05$)

2.3 SST 对 Hela 细胞 claudin-3 和 claudin-4 蛋白质表达的影响

采用不同浓度的 SST 处理 Hela 细胞 12 h 以后,提取细胞总蛋白,并用 western blot 检测 claudin-3 和 claudin-4 蛋白质表达量。由图 3 可以看出,通过 SST 的诱导,claudin-3 蛋白表达明显增高,且有剂量依赖性效应。与此相似,claudin-4 的蛋白表达量随着 SST 处理浓度的上升而上升。SST 对 Hela 细胞的 claudin-3 和 claudin-4 蛋白质表达有明显的上调作用。

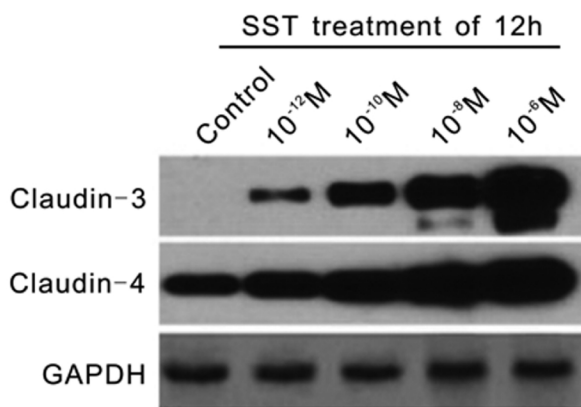


图 3 生长抑素 SST 诱导 claudin-3 和 claudin-4 蛋白表达

Fig.3 After somatostatin(SST)treated Hela cell for 12h, protein expression of claudin-3 and claudin-4 were detected

3 讨论

子宫颈癌是女性癌症中患病率较高的一种,患病后一般采用放疗、化疗以及手术切除的手段进行治疗,且治疗效果有限。目前尚无明确用何治疗药物进行治疗有较好的疗效,对该病的调控以及浸润机制,也尚未见系统的研究。

SST 是一种可能的肿瘤迁移抑制因子,而 claudin-3 和 claudin-4 基因编码的是紧密连接的跨膜蛋白^[7]。研究 SST 对 claudin-3 和 claudin-4 基因的表达调控作用有利于进一步了解 SST 对肿瘤抑制的作用机制以及 claudin-3 和 claudin-4 在肿瘤分化、迁移以及癌细胞中异常表达的分子生物学机制。因此,开展生长抑素对 Hela 细胞中 claudin-3 和 claudin-4 基因表达调节作用的研究,不仅能为开发新型抗子宫颈癌的药物提供新的方向,也能为肿瘤迁移发生以及 claudin-3 和 claudin-4 基因的调节提供理论依据。

本文通过 SST 处理 Hela 细胞,研究 SST 作为抗癌药物对宫颈癌肿瘤细胞的促凋亡作用。Mishima 等采用 MTT 法证明了 RC2160 可抑制 EGF 刺激的 HEC21A 细胞增殖^[13]。在本文中我们采用流式细胞术检测到 SST 可以诱导 Hela 细胞的凋亡。尤其是在 10^{-8} M 和 10^{-6} M 浓度下,细胞凋亡率分别达 19.53% 和 18.91%,明显对 Hela 细胞的生长有抑制作用。

另外,本研究检测了 SST 诱导 Hela 细胞的 claudin-3 和 claudin-4 基因表达。结果显示 claudin-3 和 claudin-4 基因无论是在 mRNA 水平还是在蛋白表达水平都受 SST 正调控。作为肿瘤进展过程中的重要步骤,紧密连接的破坏可能导致细胞黏附减弱。肿瘤细胞生长所需的各种营养因子及其他因子扩散,引起肿瘤细胞的极性丢失、生长失控乃至肿瘤侵袭和转移^[14]。claudin-3 和 claudin-4 在肿瘤进展过程中的具体作用可能取决

于组织的高度特异性及细胞内精确的分子信号通路。已经有证据显示,claudin-3 和 claudin-4 具有抑制肿瘤侵袭和转移的作用。Michl 等研究发现 claudin-4 在胰腺癌细胞的高表达可减弱这些细胞的侵袭性^[15]。Agarwal 等研究发现 claudin-3 和 claudin-4 在卵巢癌细胞中的表达可以促进癌细胞的运动性、侵袭力和生存力^[16]。对胰腺导管内乳头状黏液癌研究发现,claudin-4 可能参与早期癌的形成,而且 claudin-4 的表达与癌细胞的侵袭性基因表型相关^[17]。Lin 等研究发现,丢失 CLDN3 或 4 可通过激活 Akt 磷酸化而活化 PI3K 通路,导致 PI3K 活性剂 Twist 转录因子表达水平增加,表明它们的缺失可以促进上皮间质转化^[18]。claudin-3 和 claudin-4 还可激活肿瘤细胞分泌的蛋白酶,增强肿瘤的侵袭和转移能力^[19]。此外,claudin-3 和 claudin-4 已被证实与多种类型恶性肿瘤的临床预后密切相关。CLDN4 在预防肿瘤转移中扮演重要角色,可作为食管鳞状细胞癌的有效标记物^[20]。CLDN3 和 CLDN4 在三阴性乳腺癌和管腔乳腺癌是预后良好的生物标记物,可作为靶向治疗的位点^[21]。因此,在 Hela 细胞中 SST 可以促进 claudin-3 和 claudin-4 的基因表达,从而对宫颈癌细胞的发展和扩散有抑制作用。

综上所述,本研究证明了 SST 可抑制 Hela 细胞的增殖,且促进 claudin-3 和 claudin-4 mRNA 和蛋白表达。可见深入研究 SST 对 Hela 细胞的抑制作用机制,对了解并开发宫颈癌的治疗方法新的思路有重要意义。

参考文献(References)

- [1] 代志强. 宫颈病变诊治分析[J]. 中国医药指南, 2009, (17): 358-359
Dai Zhi-qiang. Diagnosis and treatment of cervical lesions [J]. Guide of China Medicine, 2009,(17):358-359
- [2] 游伟程. 癌症发病趋势和面临的挑战 [J]. 中华预防医学杂志, 2008, 42(21): 62-64
You Wei-cheng. Cancer incidence trends and challenges [J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2008, 42(21): 62-64
- [3] 石娟, 孟丽燕, 刘洋, 等. 术前化疗在妇科恶性肿瘤中的应用及预后 [J]. 医学综述, 2010, 12: 1816-1820
Shi Juan, Meng Li-yan, Liu Yang, et al. Application and Prognosis of Pre-operative Chemotherapy in Gynecologic Malignant Tumors [J]. Medical Recapitulate, 2010, 12: 1816-1820
- [4] Helyes Z, E Pinter, J Németh, et al. Anti-inflammatory effect of synthetic somatostatin analogues in the rat [J]. British journal of pharmacology, 2009, 154(7): 1571-1579
- [5] Quirion R, D Regoli, F Rioux, et al. An analysis of the negative inotropic action of somatostatin [J]. British journal of pharmacology, 2012, 66(2): 251-257
- [6] 江兴松, 张南征, 王小友. 人胃癌, 癌旁及浅表性胃炎组织生长抑素受体各亚型表达及临床意义 [J]. 徐州医学院学报, 2008, 28(10): 647-651
Jiang Xing-song, Zhang Nan-zheng, Wang Xiao-you. The expressions and their clinical significance of each subtype of SSTR in human gastric cancerous, adjacent non-cancerous tissues and those with superficial gastritis [J]. Acta Academiae Medicinae Xuzhou, 2008, 28(10): 647-651
- [7] Konecny GE, Mariani A, Keeney GA, et al. Claudin-3 and Claudin-4 expression in serous papillary, clear cell, and endometrioid endometrial cancer [J]. Gynecologic oncology, 2008, 109(2): 263

- [8] Yuan X, Lin X, Manorek G, et al. Recombinant CPE fused to tumor necrosis factor targets human ovarian cancer cells expressing the claudin-3 and claudin-4 receptors [J]. *Molecular cancer therapeutics*, 2009, 8(7): 1906-1915
- [9] Prat A, JS Parker, O Karginova, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2010, 12(5): R68
- [10] Ohtani S, M Terashima, J Satoh, et al. Expression of tight-junction-associated proteins in human gastric cancer: downregulation of claudin-4 correlates with tumor aggressiveness and survival [J]. *Gastric Cancer*, 2009, 12(1): 43-51
- [11] Sobel G, Páska C, Szabó I, et al. Increased expression of claudins in cervical squamous intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma [J]. *Hum Pathol*, 2005, 36(2):162-169
- [12] Lee JW, Lee SJ, Seo J, et al. Increased expressions of claudin-1 and claudin-7 during the progression of cervical neoplasia [J]. *Gynecol Oncol*, 2005, 97(1):53-59
- [13] Mishima M, T Yano, H Jimbo, et al. Taketani. Inhibition of human endometrial cancer cell growth in vitro and in vivo by somatostatin analog RC-160 [J]. *American journal of obstetrics and gynecology*, 1999, 181(3): 583-590
- [14] 陈奕昭, 张声, 吴春林. 紧密连接蛋白 claudins 及其在肿瘤发病中的作用[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2008, 28(6): 13-520
- Chen Yi-zhao, Zhang Sheng, Wu Chun-lin. Tight junction proteins-claudins and its role in the generation and development of tumor[J]. *International Journal of Pathology and Clinical Medicine*, 2008, 28(6): 516-520
- [15] Michl P, M Buchholz, M Rolke, et al. Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using *Clostridium perfringens* enterotoxin [J]. *Gastroenterology*, 2001, 121(3): 678
- [16] Agarwal R, T D'Souza, PJ Morin. Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity[J]. *Cancer research*, 2005, 65(16): 7378-7385
- [17] Terris B, E Blaveri, T Crnogorac-Jurcevic, et al. Characterization of gene expression profiles in intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas [J]. *The American journal of pathology*, 2002, 160(5): 1745
- [18] Lin X, Shang X, Manorek G, et al. Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition by Claudin-3 and Claudin-4[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67496
- [19] Sakata K, K Shigemasa, N Nagai, et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in common epithelial tumors of the ovary [J]. *International journal of oncology*, 2000, 17(4): 673
- [20] Shi M, Wang Z, Song L, et al. Low expression of claudin-4: an indicator of recurrence in esophageal squamous cell carcinoma after Ivor Lewis esophagectomy?[J]. *Med Oncol*, 2014, 31(5): 951
- [21] Kolokytha P, Yiannou P, Keramopoulos D, et al. Claudin-3 and claudin-4: distinct prognostic significance in triple-negative and luminal breast cancer[J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2014, 22(2): 125-131

(上接第 1267 页)

- [15] 王海燕, 顿晓熠, 柏愚, 等. 中国上消化道出血的临床流行病学分析[J]. *中华消化内镜杂志*, 2013, 30(2):83-86
- Wang Hai-yan, Dun Xiao-yi, Bai Yu, et al. Clinical epidemiologic study of upper gastrointestinal bleeding in China [J]. *Chinese Journal of Digestive Endoscopy*, 2013, 30(2): 83-86
- [16] 陈慧婷, 沙卫红, 李瑜元, 等. 2335 例上消化道出血病因及发病趋势分析[J]. *中国医药*, 2007, 2(11): 669-670
- Chen Hui-ting, Sha Wei-hong, Li Yu-yuan, et al. Etiology and incidence tendency of 2335 upper gastrointestinal bleeding cases[J]. *China medicine*, 2007, 2(11):669-670
- [17] 蔡陈效, 冀子中, 陈晓琴. 上消化道出血病因趋势及相关因素分析[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2008, 17(5):387-389
- Cai Chen-xiao, Ji Zi-zhong, Chen Xiao-qin. Analysis of etiological factor, tendency and correlative factors of upper gastrointestinal bleeding [J]. *Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2008, 17(5):387-389
- [18] 乔进朋, 鲁力锋, 张莉, 等. 下消化道出血 508 例临床分析[J]. *中华内科杂志*, 2009, 48(9):764-765
- Qiao Jin-peng, Lu Li-feng, Zhang-Li, et al. Clinical analysis of lower gastrointestinal bleeding in 508 cases [J]. *Chinese Journal of Internal Medicine*, 2009, 48(9):764-765
- [19] 杨云生, 罗莹. 不明原因消化道出血的概念及病因[J]. *中华消化杂志*, 2007, 27(6): 400-401
- Yang Yun-sheng, Luo Ying. Concept and cause of obscure gastrointestinal bleeding [J]. *Chinese Journal of Digestion*, 2007, 27(6): 400-401
- [20] 蒲燕, 殷德荣. 1297 例上消化道出血患者的临床诊断[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2010, 31(9): 1410-1411
- Pu Yan, Yin De-rong. The clinical diagnosis of 1297 patients with upper gastrointestinal bleeding [J]. *Journal of Qiqihar Medical College*, 2010, 31(9):1410-1411