

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.09.005

TRPC3 对上皮性卵巢癌细胞株迁移和侵袭的影响 *

郝小华¹ 解柔刚² 罗 层² 李 佳¹ 李胜男¹ 陈必良^{1Δ}

(1 第四军医大学附属西京医院妇产科 陕西 西安 710032;

2 第四军医大学神经生物学教研室暨脑科学协同创新中心 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨瞬时受体电位通道 C3(TRPC3)对人卵巢癌细胞迁移、侵袭能力的影响。**方法:**采用蛋白免疫印迹法和实时荧光定量 PCR 法分别检测卵巢癌细胞株 SKOV3、ES-2 和 HEY-T30 中 TRPC3 蛋白和 mRNA 的表达水平。通过 Transwell 迁移实验(不含 Matrigel 胶的 Transwell 小室)和 Transwell 侵袭实验分别检测卵巢癌细胞株 SKOV3、ES-2 和 HEY-T30 的迁移、侵袭能力。**结果:**在 SKOV3、ES-2 和 HEY-T30 三种卵巢癌细胞株中,ES-2 中 TRPC3 的蛋白和 mRNA 表达均显著高于其他两株($P<0.05$)。Transwell 迁移实验和 Transwell 侵袭实验显示卵巢癌细胞株 ES-2 的迁移、侵袭能力均显著高于其他两种细胞株($P<0.05$)。**结论:**瞬时受体电位通道 C3(TRPC3)在 ES-2 人卵巢癌细胞中高表达,并可能促进人卵巢癌细胞的迁移、侵袭。

关键词:卵巢癌;瞬时受体电位通道 C3;迁移;侵袭

中图分类号:R-33;R737.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)09-1624-04

Effect TRPC3 Act on the Migration and Invasion of Ovarian Cancer Cells*

HAO Xiao-hua¹, XIE Rou-gang², LUO Ceng², LI Jia¹, LI Sheng-nan¹, CHEN Bi-liang^{1Δ}

(1 Department of Obstetrics & Gynaecology, Xijing Hospital, The Fourth Military University Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Neurobiology and Collaborative Innovation Center for Brain Science, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of the migration and invasion of the Transient receptor potential channel (TRPC3) on the Ovarian cancer cell. **Methods:** The expression levels of the TRPC3 in human ovarian carcinoma Cell SKOV3, ES-2 and HEY-T30 were detected by western blot and fluorescent quantitative PCR. The Wound Healing assay and Transwell assay were performed to analyze the ability of Migration and invasion. **Results:** The expressions of TRPC3 in the ES-2 ovarian cancer cell lines were higher than the other two ovarian epithelial cancer cell lines by western blot and fluorescent quantitative PCR. The migration and invasion ability of the human ovarian carcinoma ES-2 is higher than the other two ovarian epithelial cancer cell line. **Conclusion:** The transient receptor potential channel C3 may contribute to the migration and invasion of human ovarian cancer cells.

Key words: Ovarian carcinoma; Transient receptor potential channel 3; Migration; Invasion

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)09-1624-04

前言

在女性生殖器恶性肿瘤中,卵巢癌的发病率居第三位,但其死亡率占却名列第一。上皮性卵巢癌(EOC)患者往往发现时已到中晚期,存在广泛的转移,严重威胁着女性的生命健康^[1-4]。由于卵巢隐匿在盆腔的深部,缺乏有效的早期监测诊断方法。既往研究显示瞬时受体电位通道 (Transient receptor potential channel, TRP 通道)与多种肿瘤的发生、预后关系密切^[5,6]。TRP 是位于细胞膜上的一类重要的阳离子通道超家族,根据氨基酸序列的同源性的不同,TRP 通道可分为 TRPC、TRPV、TRPM、TRPML、TRPP、TRPA、TRPN 七个亚家族^[7,8]。TRPC 最早发现于神经系统,逐渐到心血管系统、呼吸系统、泌尿生殖系统等发病机制的研究。TRPC 是位于细胞膜上的一种非选择性阳离子通道,当其被激活时,允许包括钙离子在内的阳离子进行跨膜转运。

TRPC 家族包括 7 个亚族成员(TRPC 1~7),除 TRPC2 外均与恶性肿瘤有关,如 TRPC1、3、5、6 在脑胶质瘤^[9-12],TRPC5 在乳腺癌^[13,14],TRPC1、3、4、6、7 在肺癌^[15-18]、TRPC6 在胃癌、结肠癌^[19,20]等,TRPC1、3、4、6 在卵巢癌^[21]等恶性肿瘤中起着至关重要的作用。既往的研究表明 TRPC3 在卵巢上皮性肿瘤中高表达,并促进卵巢癌细胞的增值和成瘤,而中晚期的卵巢癌主要存在广泛的侵袭转移,而在上皮性卵巢癌中,透明细胞癌恶性程度最高,易出现腹膜后淋巴转移和肺转移,是 OEC 中预后最差的一个亚型,那么其高迁移侵袭能力是否与 TRPC3 有关系呢?在本研究中,我们选择了三株具有代表性的上皮性卵巢癌细胞株:SKOV3 (浆液性卵巢癌细胞)、ES-2 (卵巢透明细胞癌)、HEY-T30 (卵巢癌细胞),通过比较其 TRPC3 的表达和迁移、侵袭能力,旨在探讨 TRPC3 对上皮性卵巢癌细胞株迁移侵袭的影响。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81672583)

作者简介:郝小华(1983-),女,硕士研究生,主治医师,研究方向:妇科肿瘤,电话:13379523252, E-mail: 358632447@qq.com

Δ 通讯作者:陈必良,男,主任医师,研究方向:妇科肿瘤/围产医学,电话:13909271092, E-mail: cblxjh@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2017-10-31 接受日期:2017-11-20)

1 材料与方

1.1 材料和试剂

细胞株 SKOV3 来源于人卵巢浆液性细胞癌,细胞株 ES-2 来源于人卵巢透明细胞癌,细胞株 HEY-T30 来源于人卵巢细胞癌,三种卵巢癌细胞株均属于卵巢上皮性肿瘤细胞,均购置于上海 ATCC 细胞库。McCoy5A 培养基、1640 培养基、胎牛血清均购置于 HyClone 公司。荧光定量 PCR 反转录和扩增试剂盒均购置于 TIANGEN 公司。TRPC3 引物购置于华大基因公司,GAPDH 购置于生工公司。Trizol 购置于 ITANGEN 公司。TRPC3 抗体购置于 Alomone 公司,Actin 购置于 sigma 公司,二抗购置于 sigma 公司。Transwell 小室(自带基质胶)购置于康宁公司。

1.2 细胞培养

人卵巢癌细胞株 SKOV3 和 ES-2 培养于含 10%胎牛血清的 McCoy5A 培养基中,HEY-T30 培养于含 10%胎牛血清的 1640 培养基中,并都置于 5%的 CO₂、37℃培养箱中常规培养,每 2-3 天进行细胞换液,待细胞长到约 80%时用含有依地酸二钠(EDTA)的胰酶消化传代并继续培养,取对数生长期的细胞进行实验。

1.3 TRPC3 mRNA 表达的检测

采用荧光定量 PCR 法检测。用 Trizol 提取细胞总 RNA,用酶标仪测出每种卵巢癌细胞 RNA 的浓度和纯度。按照 TIANGEN 公司的 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒说明书进行反转录,42℃ 3 min,42℃ 15 min,95℃ 3 min,再按照 TIANGEN 公司的 SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)试剂盒说明书进行荧光定量 PCR,将八排管中的反应体系(20 μL 体系)置于 StepOne 系统中,反应程序设置为 95℃ 15 min,95℃ 10 sec,60℃ 30 sec,总共 40 个循环。TRPC3 引物序列如下:上游 5'-GGTCTGGGTTCTTGAATGA-3',下游 5'-TACTGTTGTGCCTTCGTTGC-3',长度 174bp;内参 GAPDH 引物由上海生工公司合成,引物序列如下:上游 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',下游 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3',长度 452bp。该实验重复三次。

1.4 TRPC3 蛋白表达的检测

采用蛋白免疫印迹法检测。用含磷酸酶和蛋白酶抑制剂的 RIPA 强裂解液裂解三株卵巢癌细胞结合超声充分震碎,提取总蛋白。用 BCA 法进行蛋白浓度测定并将浓度定在同一水平。蛋白凝胶电泳后进行转膜 2 小时,5%(BSA+Milk)封闭液室温封闭 2 小时,后加入 TRPC3 抗体稀释液(1:1000 alomone)4℃封闭过夜,二抗室温封闭 2 小时,采用化学发光法检测 TRPC3 蛋白表达,并进行灰度值分析。该实验重复三次。

1.5 Transwell 迁移实验检测细胞迁移能力

采用 Transwell 迁移实验检测三株细胞的迁移能力。将不含 Matrigel 胶的 Transwell 小室放入 24 孔板,放入 5% CO₂、37℃培养箱孵育 10 分钟后,在小室内加入 300 μL 无血清培养基室温静置 30 分钟。将预先饥饿 12 小时的三株细胞消化离心后用无血清培养基洗涤 2 次后并重悬。用计数板进行细胞计数,浓度定位 1×10^5 个/mL,取 200 μL 加入上室,下室加入 500 μL 含 10%胎牛血清的培养基。放入 5% CO₂、37℃培养箱培养

24 小时。取出小室弃去培养基,PBS 洗两遍,用 4%多聚甲醛固定 20 分钟,0.1%结晶紫染色 10 分钟,后用棉签擦去小室内未穿过的细胞。晾干后在 10 倍镜下随机取三个视野进行拍照,计算细胞数。该实验重复 3 遍。

1.6 Transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力

采用 Transwell 侵袭实验检测三株细胞的侵袭能力。将带有 Matrigel 胶的 Transwell 小室放入 24 孔板,放入 5% CO₂、37℃培养箱孵育 10 分钟后,在小室内加入 300 μL 无血清培养基室温静置 30 分钟。将预先饥饿 12 小时的三株细胞消化离心后用无血清培养基洗涤 2 次后并重悬。用计数板进行细胞计数,浓度定位 1×10^5 个/mL,取 200 μL 加入上室,下室加入 500 μL 含 10%胎牛血清的培养基。放入 5% CO₂、37℃培养箱培养 24 小时。取出小室弃去培养基,PBS 洗两遍,用 4%多聚甲醛固定 20 分钟,0.1%结晶紫染色 10 分钟,后用棉签擦去 Matrigel 胶和未穿过的细胞。晾干后在 10 倍镜下随机取三个视野进行拍照,计算细胞数。该实验重复 3 遍。

1.7 统计学分析

采用 SPSS20.0 统计软件,计量资料比较采用 t 检验及方差分析。实验作图采用 Image J 和 Graph PadPrism 6.0 软件完成。

2 结果

2.1 三株卵巢癌细胞株 TRPC3 mRNA 的表达

常规培养三株人卵巢癌细胞株 SKOV3、ES-2 和 HEY-T30,取其对数生长期的细胞用来实验,采用荧光定量 PCR 法分别检测三株卵巢癌细胞中 TRPC3 mRNA 的表达水平,结果显示:ES-2 组 TRPC3 mRNA 的表达显著高于 SKOV3 和 HEY-T30 组($P < 0.05$),见图 1。

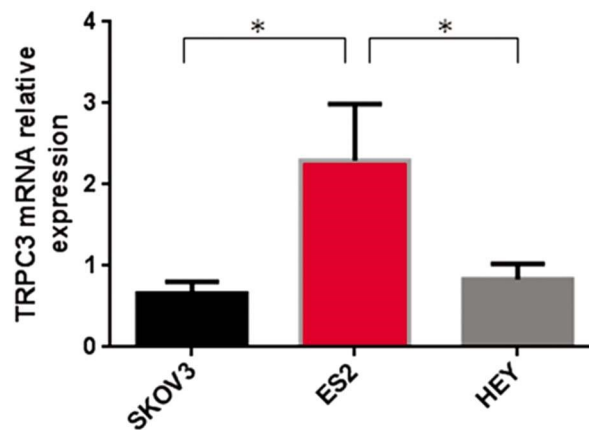


图 1 ES-2 人卵巢癌细胞中 TRPC3 mRNA 表达水平显著高于 SKOV3 和 HEY-T30 细胞

Fig.1 The expression of TRPC3 mRNA in ES-2 was higher than SKOV3 and HEY-T30 cells

2.2 三株卵巢癌细胞株 TRPC3 蛋白的表达

常规培养三株人卵巢癌细胞株 SKOV3、ES-2 和 HEY-T30,取其对数生长期细胞,采用蛋白印迹方法分别检测三株卵巢癌细胞中 TRPC3 蛋白的表达水平,用化学发光法对 TRPC3 蛋白进行显影,并进行灰度值分析。结果显示:ES-2 组 TRPC3 蛋白的表达显著高于 SKOV3 和 HEY-T30 组($P < 0.05$),见图 2。

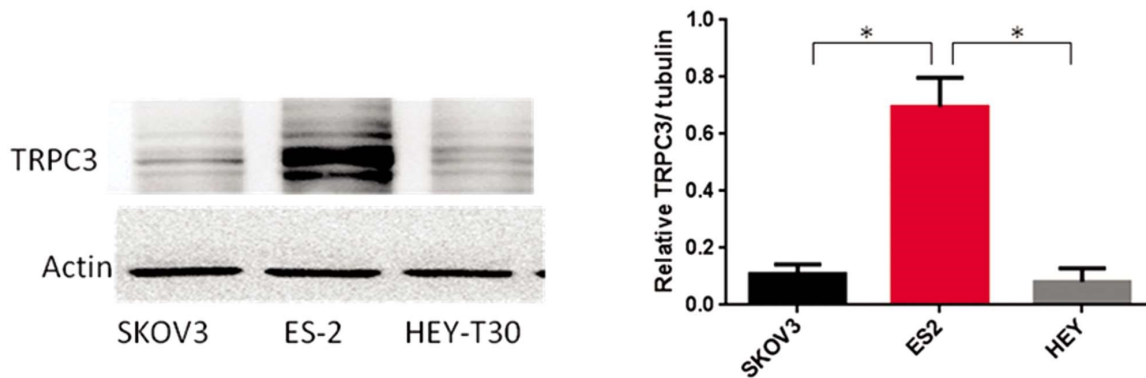


图2 ES-2人卵巢癌细胞中TRPC3蛋白表达水平显著高于SKOV3和HEY-T30细胞

Fig.2 The expression of TRPC3 tubulin in ES-2 was higher than SKOV3 and HEY-T30 cells

2.3 三株人卵巢癌细胞株的迁移、侵袭能力

将对数生长期的三株卵巢癌细胞接种在不含 Matrigel 胶的 Transwell 小室中,在细胞培养箱常规培养 24 小时后,结晶紫染色后计穿过小室膜的细胞数。实验结果显示:ES-2 人卵巢癌细胞株穿过小室膜的细胞数量较 SKOV3 和 HEY-T30 组显

著增多($P < 0.05$)。将上述三株卵巢癌细胞接种在含 Matrigel 胶的 Transwell 小室中,在细胞培养箱常规培养 24 小时后,结晶紫染色后计穿过小室基底膜的细胞数。实验结果显示:ES-2 人卵巢癌细胞株穿过小室基底膜的细胞数量较 SKOV3 和 HEY-T30 组显著增多($P < 0.05$),见图 3。

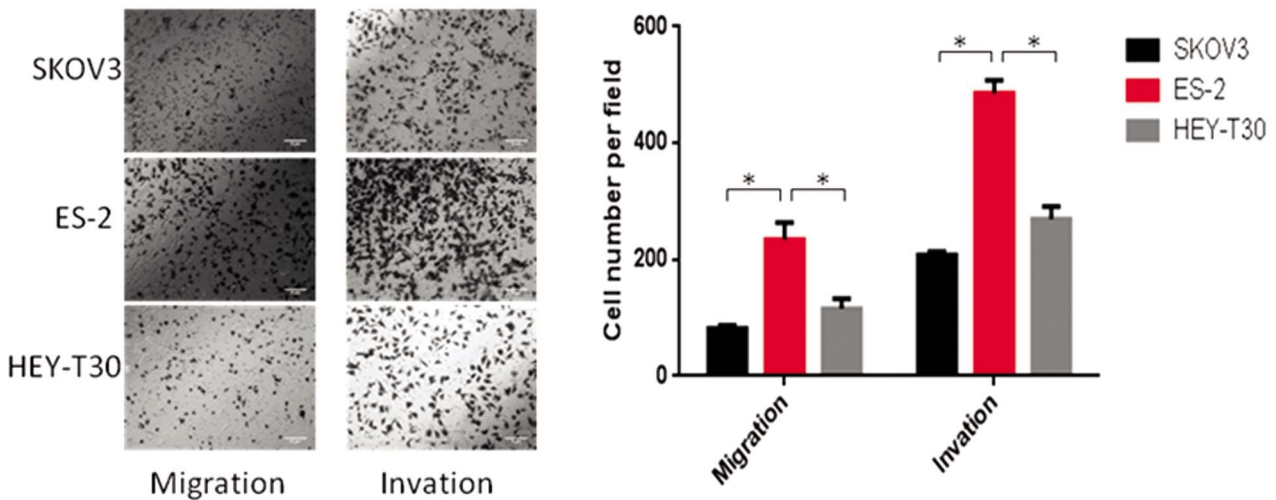


图3 人卵巢癌细胞 ES-2 迁移、侵袭能力显著高于 SKOV3 和 HEY-T30 细胞

Fig.3 The migration and invasion of ES-2 were significant higher than the SKOV3 and HEY-T30 cells

3 讨论

Ca^{2+} 是细胞内重要的第二信使之一,对肿瘤的发生、发展中起着重要的调控作用,如细胞内 Ca^{2+} 的振荡频率、振幅以及持续时间编写特定的 Ca^{2+} 代码选择性的激活基因转录因子,从而促进细胞的增值及转移^[22]。在肿瘤发生发展过程中,早期过表达的胞膜钙通道倾向于表达降低,而内质网钙通道表达升高,并伴有通道定位的改变和新通道的形成。迁移细胞中的微区钙信号可决定细胞转移的方向。细胞外 Ca^{2+} 的进入和随后细胞内 Ca^{2+} 库的耗竭是促进肿瘤细胞增殖、转移的关键因素^[23]。前期的研究表明,TRPC1 可以介导结肠癌细胞钙库操纵性钙内流(store-operated calcium entry, SOCE)过程,即当细胞外刺激物活化细胞膜 G 蛋白耦联受体或酪氨酸激酶受体后,细胞内 PLC 信号途径被激活导致钙库释放 Ca^{2+} ,钙库耗竭,此时细胞膜上的钙通道被激活并产生持续性 Ca^{2+} 内流^[24]。

TRPC 是细胞膜定位的非选择性阳离子通道,主要介导 Ca^{2+} 内流。近年研究表明,TRPC 与肿瘤的侵袭、转移和预后密切相关。在鼻咽癌 CNE2 细胞中 TRPC1 高表达,沉默 TRPC1 可以抑制其肿瘤细胞的侵袭^[25]。在非小细胞肺癌中 TRPC6 高表达,阻断或下调 TRPC6 可以降低其细胞的增殖,减弱其侵袭、转移的能力^[26]。那么,TRPC3 在上皮性卵巢癌中是否有类似作用?研究表明 TRPC3 在 EOC 中的表达高于正常卵巢组织,并且通过介导 Ca^{2+} 在 M 期促进肿瘤的生长^[18],提示 TRPC3 在 EOC 的增殖和成瘤过程中起重要作用。中晚期卵巢癌主要问题在于其侵袭、转移的性能影响了患者的预后。

本实验主要对比三株不同卵巢癌上皮细胞中 TRPC3 的表达情况以及迁移、侵袭能力。划痕实验和 Transwell 侵袭实验显示高表达 TRPC3 的卵巢癌细胞株 ES-2 的迁移、侵袭能力明显高于 SKOV3 和 HEY-T30 细胞,符合 ES-2 透明性卵巢上皮细胞的高侵袭、转移的特性。其次,TRPC3 在卵巢癌细胞株

ES-2 中的表达明显高于 SKOV3 和 HEY-T30 细胞。由此,我们推测 TRPC3 可能在卵巢上皮细胞癌的迁移、侵袭过程中起着重要的促进作用。

当然,我们需要进一步下调和上调 TRPC3 后,再对比卵巢癌细胞的迁移、侵袭能力,若下调 TRPC3 后卵巢癌迁移侵袭的能力较前明显减弱,而上调 TRPC3 后可增强卵巢癌细胞的迁移、侵袭能力,那么就可证实 TRPC3 在卵巢癌的迁移、侵袭过程中发挥着促进作用。深入了解离子通道在卵巢癌形成、发展和侵袭转移过程的作用不仅有利于更加全面地阐明卵巢癌的发病机制,也将可能为卵巢癌预防和治疗提供新的靶标和生物学干预手段。

参考文献(References)

- [1] He Jie, Tang Jian, Wen Fang, et al. Effects of Myosin II on the Proliferation, Migration and Invasion of Epithelial Ovarian Cancer Cells[J]. Antitumor Pharmacy, 2015, (03): 179-184
- [2] Matsushashi T, Takeshita T, Yamamoto A, et al. Serum CA 125 Level after Neoadjuvant Chemotherapy is Predictive of Prognosis and Debulking Surgery Outcomes in Advanced Epithelial Ovarian Cancer[J]. J Nippon Med Sch, 2017, 84(4): 170-176
- [3] Franco R M, Guimaraes M D, Moreira B L, et al. Enhancing survival with early surgical resection of endobronchial metastasis in a follow-up of ovarian carcinoma[J]. Radiol Bras, 2015, 48(2): 130
- [4] Frampton J E. Olaparib: a review of its use as maintenance therapy in patients with ovarian cancer[J]. BioDrugs, 2015, 29(2): 143-150
- [5] Han H, Yi F. New insights into TRP channels: Interaction with pattern recognition receptors[J]. Channels (Austin), 2014, 8(1): 13-19
- [6] Liu C, Montell C. Montell. Forcing open TRP channels: Mechanical gating as a unifying activation mechanism [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 460(1): 22-25
- [7] Lou Jie, Zhang Jun, Li Yan-chao, et al. The transient receptor potential channels in blood vessel: physiological function, dysfunction and the related diseases[J]. Translational Medicine Research, 2013, 3(4): 1-17
- [8] Nilius B, Szallasi A. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine [J]. Pharmacol Rev, 2014, 66(3): 676-814
- [9] Cuddapah V A, Turner K L, Sontheimer H, et al. Calcium entry via TRPC1 channels activates chloride currents in human glioma cells[J]. Cell Calcium, 2013, 53(3): 187-194
- [10] Li S, Wang J, Wei Y, et al. Crucial role of TRPC6 in maintaining the stability of HIF-1 α in glioma cells under hypoxia [J]. J Cell Sci, 2015, 128(17): 3317-3329
- [11] Richter J M, Schaefer M, Hill K. Clemizole hydrochloride is a novel and potent inhibitor of transient receptor potential channel TRPC5[J]. Mol Pharmacol, 2014, 86(5): 514-521
- [12] Uemura T, Green M, Warsh J J. Chronic LiCl pretreatment suppresses thrombin-stimulated intracellular calcium mobilization through TRPC3 in astroglia cells[J]. Bipolar Disord, 2016, 18(7): 549-562
- [13] Ma X, Chen Z, Hua D, et al. Essential role for TrpC5-containing extracellular vesicles in breast cancer with chemotherapeutic resistance [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(17): 6389-6394
- [14] Wang T, Ning K, Lu T X, et al. Increasing circulating exosomes-carrying TRPC5 predicts chemoresistance in metastatic breast cancer patients[J]. Cancer Sci, 2017, 108(3): 448-454
- [15] Zhang J, Zhu Z, Li X W, et al. Knocking down TRPC1 expression by siRNA inhibits proliferation and invasiveness of human lung adenocarcinoma cell A549 in vitro [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2013, 93(28): 2241-2243
- [16] Yang L L, Liu B C, Lu X Y, et al. Inhibition of TRPC6 reduces non-small cell lung cancer cell proliferation and invasion[J]. Oncotarget, 2017, 8(3): 5123-5134
- [17] Tajeddine N, Gailly P. Gailly, TRPC1 protein channel is major regulator of epidermal growth factor receptor signaling [J]. J Biol Chem, 2012, 287(20): 16146-16157
- [18] Zhang Z, Wang J, He J, et al. Identification of TRPCs genetic variants that modify risk for lung cancer based on the pathway and two-stage study[J]. Meta Gene, 2016, 9: 191-196
- [19] Sobradillo D, Hernandez-Morales M, Ubierna D, et al. A reciprocal shift in transient receptor potential channel 1 (TRPC1) and stromal interaction molecule 2 (STIM2) contributes to Ca²⁺ remodeling and cancer hallmarks in colorectal carcinoma cells[J]. J Biol Chem, 2014, 289(42): 28765-28782
- [20] Chen Z, Zhu Y, Dong Y, et al. Overexpression of TrpC5 promotes tumor metastasis via the HIF-1 α -Twist signaling pathway in colon cancer[J]. Clin Sci (Lond), 2017, 131(19): 2439-2450
- [21] Zeng B, Yuan C, Yang X, et al. TRPC channels and their splice variants are essential for promoting human ovarian cancer cell proliferation and tumorigenesis[J]. Cancer Drug Targets, 2013, 13(1): 103-116
- [22] Cui C, Merritt R, Fu L, et al. Targeting calcium signaling in cancer therapy[J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2017, 7(1): 3-17
- [23] Perez-Riesgo E, Gutierrez L G, Ubierna D, et al. Transcriptomic Analysis of Calcium Remodeling in Colorectal Cancer [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(5)
- [24] Sobradillo D, Hernandez-Morales M, Ubierna D, et al. A reciprocal shift in transient receptor potential channel 1 (TRPC1) and stromal interaction molecule 2 (STIM2) contributes to Ca²⁺ remodeling and cancer hallmarks in colorectal carcinoma cells[J]. J Biol Chem, 2014, 289(42): 28765-28782
- [25] He B, Liu F, Ruan J, et al. Silencing TRPC1 expression inhibits invasion of CNE2 nasopharyngeal tumor cells[J]. Oncol Rep, 2012, 27(5): 1548-1554