

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.19.003

热疗对 SW1990 胰腺癌细胞上皮间质转化(EMT)的影响及其作用机制*

习攀 朱美玲 顾文华 王一玮 薛文姬 郑磊贞[△]

(上海交通大学医学院附属新华医院肿瘤科 上海 200092)

摘要 目的: 探讨热疗对化疗诱导的人胰腺癌细胞株 SW1990 细胞上皮间质转化(EMT)的影响及其可能的作用机制。**方法:** 分别用不同浓度吉西他滨(0, 5, 10, 20, 30 μ M)作用于 SW1990 细胞不同时间(24, 48, 72 小时)及 30 μ M 吉西他滨作用 24h 联合热疗 43 $^{\circ}$ C 1h, 观察细胞的形态学变化, 通过四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法检测细胞的增殖情况。采用 Western blot 方法检测细胞内 E-cadherin 蛋白和剪切的 Notch1 蛋白的表达。**结果:** ① 吉西他滨在一定浓度范围内可明显抑制 SW1990 细胞的增殖($P<0.05$), 并呈浓度和时间依赖性。吉西他滨作用前 24 h 给予 43 $^{\circ}$ C 1h 热疗预处理可显著增强吉西他滨对 SW1990 细胞的抑制作用($P<0.05$) ② 吉西他滨作用 SW1990 细胞 24 小时后, 细胞数目减少, 细胞形态变大, 细胞呈梭形, 且细胞间连接减少; 而热疗预处理的联合能够逆转此种形态学变化。③ 吉西他滨作用 24 小时后, 细胞内 E-cadherin 蛋白的表达下调, Cleaved Notch1 的蛋白表达上调, 热疗预处理可明显上调吉西他滨诱导的 E-cadherin 蛋白表达下调, 并下调 Cleaved Notch1 蛋白表达的上调。**结论:** 热疗预处理显著逆转吉西他滨所诱导的人胰腺癌细胞株 SW1990 细胞的 EMT 现象, 其机制可能与 Notch 信号通路有关。

关键词: 吉西他滨; SW1990; 上皮间质转化; E- 钙粘素; Notch1

中图分类号: R73-3, R735.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)19-3611-04

Influence and Mechanisms of Hyperthermia on the Epithelial Mesenchymal Transformation(EMT) of SW1990 Cells*

XI Pan, ZHU Mei-ling, GU Wen-hua, WANG Yi-wei, XUE Wen-ji, ZHENG Lei-zhen[△]

(Department of Oncology, Xin Hua hospital affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200092, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the influence of hyperthermia on epithelial mesenchymal transformation (EMT) induced by chemotherapy in pancreatic cancer cells and its mechanism. **Methods:** SW1990 cells were treated with Gemcitabine in various concentrations (0, 5, 10, 20, 30 μ M) for different durations (24, 48 and 72 h) or 30 μ M gemcitabine combined with hyperthermia 43 $^{\circ}$ C 1 h. The cell morphological changes were observed, the proliferation of SW1990 cell was detected by MTT method, the expression of E-cadherin protein and Cleaved Notch1 protein in cell were assayed by Western blot. **Results:** ① SW1990 cell proliferation was inhibited in certain concentrations with a time and dose-dependent manner after treatment of gemcitabine ($P<0.05$); Hyperthermia 43 $^{\circ}$ C 1h pretreatment 24h before treatment of gemcitabine on SW1990 cell can enhance the gemcitabine inhibited proliferation of SW1990 cells ($P<0.05$) ② When treated with 30 μ M gemcitabine, the cells became larger, showed a spindle shape and lost cell adhere. However, which were partially reversed by pretreatment with hyperthermia. ③ The protein expression of E-cadherin reduced and Cleaved Notch1 protein up-regulated in SW1990 cells treated with gemcitabine for 24 hours; hyperthermia pretreatment can up-regulate the expression of E-cadherin protein and reduce the up-regulation of Cleaved Notch1 protein induced by gemcitabine. **Conclusion:** Hyperthermia pretreatment could obviously reverse the gemcitabine induced EMT in SW1990 cell, which may be related to the Notch pathway.

Key words: Hyperthermia; SW1990; EMT; E-cadherin; Notch1

Chinese Library Classification(CLC): R73-3, R735.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)19-3611-04

前言

胰腺癌是目前已知的恶性程度最高的肿瘤之一(死亡和发病人数之比约 0.95/1),居美国男性(位居肺、前列腺和结直肠癌之后)及女性(位居肺、乳腺和结直肠癌之后)常见癌症死亡原因的第 4 位^[1]。我国近 20 年来胰腺癌的发病率增长了约 6 倍

^[2],上海地区胰腺癌的发病率呈逐年上升趋势^[3],已正成为严重危害人类健康的主要疾病之一。超过 80 %胰腺癌患者诊断时已处于晚期,其中三分之一为局部晚期,中位生存时间仅为 6~10 个月。胰腺癌手术低切除率和术后高复发率决定了化疗在胰腺癌综合治疗中的重要地位。但目前胰腺癌的辅助治疗效果仍不是很理想,作为胰腺癌临床化疗一线药物的吉西他滨反

* 基金项目:上海市科委产学研医合作项目(11DZ1922007)

作者简介:习攀(1986-),男,硕士研究生,主要研究方向:热疗抗肿瘤的机制研究,电话:021-25078820, E-mail: gowithwind12345@163.com

[△] 通讯作者:郑磊贞,电话:021-2507-7642, E-mail: zhengleizhen2006@126.com

(收稿日期:2014-02-16 接受日期:2014-03-15)

应率也仅 28%。获得性化疗耐受及转移是胰腺癌治疗失败的主要原因。如何改善化疗耐受及转移一直是胰腺癌研究的热点及难点。

上皮间质转化 EMT 的概念于上世纪 80 年代被提出,一直是肿瘤领域研究的热点。EMT 主要表现为细胞上皮极性和连接缺失,细胞获得间质特性,分子水平表现为:具有细胞上皮特征的 E-cadherin 蛋白表达下调或缺失。EMT 是上皮细胞来源的恶性肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力的重要生物学过程。研究表明,EMT 与肿瘤侵袭转移、放化疗耐受密切相关^[4-7]。因此,探究如何改善甚至逆转肿瘤的 EMT 现象,可能为临床逆转肿瘤耐药及抑制肿瘤转移提供新的方向。

热疗(hyperthermia)是一种无创性的肿瘤治疗方法,不但对肿瘤细胞有直接的细胞毒效应,还可以增强化疗、放疗的疗效,逆转耐药,提高机体的免疫力^[8-11]。相关研究提示局部热疗有抑制肿瘤转移的作用,但其具体机制仍不清楚^[12]。鉴于 EMT 在肿瘤的转移和耐药过程中发挥的重要作用,因此我们设想热疗在逆转肿瘤耐药、抑制肿瘤转移中机制是否同肿瘤 EMT 相关。实验旨在探讨热疗对化疗诱导的胰腺癌细胞 EMT 的影响及可能的作用机制。以其为胰腺癌的治疗提供更多的依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

SW1990 细胞株购自中科院上海细胞库;吉西他滨购自 Lilly 公司、RPMI1640 培养基、胎牛血清、0.25 %胰蛋白酶和 DPBS 购自 Gibco 公司;抗 Cleaved Notch1 抗体、抗 E-cadherin 抗体购自 Cell Signaling Technology(CST)公司;抗 β -actin 抗体购自 Proteintech 公司;MTT 为 Sigma 公司产品;SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、5 $\times$ 蛋白上样缓冲液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、HRP 标记的山羊抗兔抗体和 HRP 标记的山羊抗小鼠抗体购自碧云天公司。PVDF 膜和 ECL 超敏发光液购自 Millipore 公司。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 细胞培养 SW1990 胰腺癌细胞接种于含 10 %胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,培养于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 的饱和湿度孵育箱中,隔天传代一次。

1.2.2 显微镜下观察 对照组未做任何处理,化疗组给予 30 μM 吉西他滨作用 24 小时、联合组在吉西他滨作用 24 h 前给

予 43 $^{\circ}\text{C}$ 热疗预处理 1 h,倒置显微镜 200 倍镜下观察不同处理因素作用下的 SW1990 细胞形态学变化。

1.2.3 MTT 法检测细胞的增殖情况 取对数生长期细胞,胰酶消化后,进行细胞计数,以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 将细胞接种于 96 孔培养板,每孔细胞悬液体积为 90 μL 。将细胞分为对照组和不同浓度吉西他滨组(0、5、10、20、30 μM),每孔所加药物溶液体积均为 10 μL ,每组设 3 个复孔,分别培养 24、48 和 72 h 后,加 0.5 % MTT 溶液 10 μL ,反应 4 小时后,加 150 μL 的 10 % SDS 溶解过夜,用酶标仪在 562 nm 波长下测定吸光度(A)值,并计算各组细胞的增殖抑制率,实验重复 3 次。热化疗组给予 30 μM 吉西他滨加不同的热疗联合方式(热疗 24h 后给予吉西他滨、热疗的同时给予吉西他滨、吉西他滨处理 24h 后给予热疗),其余步骤同上。增殖抑制率(%)=(1- 加药组 A 值 / 对照组 A 值) $\times$ 100%。

1.2.4 Western blot 测定蛋白表达 取对数生长期 sw1990 胰腺癌细胞株,接种于培养皿中,待细胞贴壁后,分别给予化疗或热化疗联合处理,化疗组给予吉西他滨 30 μM 处理 24h,联合组孵育箱 43 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1h,间隔 24h 后给予吉西他滨 30 μM 处理 24 h,并提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。取 40 μg 蛋白样品,与 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液按体积 4:1 混合,煮沸变性 10 分钟,上样于 8%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)中电泳,湿转至孔径 0.45 μm 的 PVDF 膜上,室温下 5 %脱脂奶粉封闭 1 小时,孵上一抗溶液 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。洗膜 3 次,各 10 分钟,二抗溶液室温下孵育 1 小时。洗膜 3 次,各 10 分钟后显影,参照 ECL 超敏发光液说明书上操作。

1.3 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS19.0 软件处理数据,两组间均数比较用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 热疗预处理对吉西他滨诱导的 SW1990 细胞增殖的影响

不同剂量的(0、5、10、20、30 μM)吉西他滨作用于 SW1990 细胞 24、48、72 h,均能够显著抑制细胞增殖($P < 0.05$),且呈时间和剂量依赖性(图 1A)。分别在吉西他滨处理前 24 h 给予热疗预处理、与吉西他滨同步处理或吉西他滨处理后 24 h 给予热疗后处理,结果显示其细胞增殖抑制率均较单纯吉西他滨处

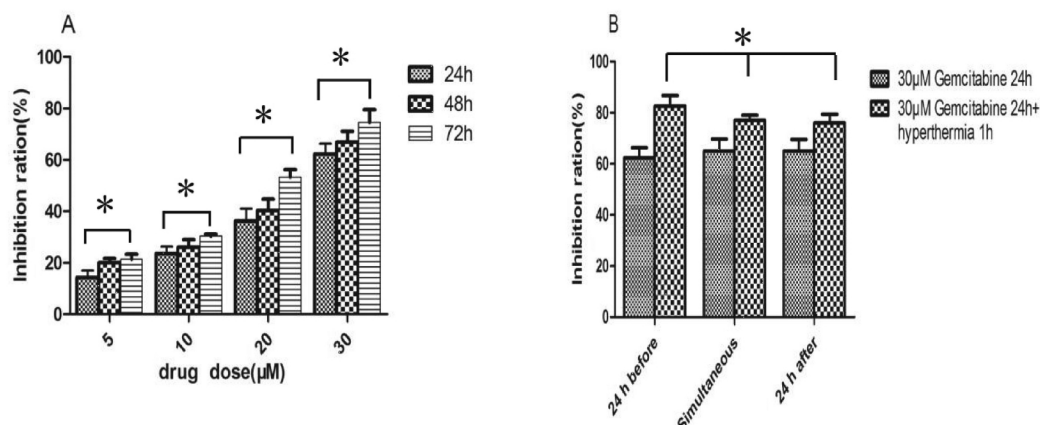


图 1 吉西他滨、吉西他滨联合热疗对 SW1990 细胞增殖的影响(* 为 $P < 0.05$)

Fig. 1 Inhibitory effect of Gemcitabine or Gemcitabine combined with Hyperthermia on the proliferation of SW1990 cells(* 为 $P < 0.05$)

理明显升高($P < 0.05$), 吉西他滨处理前 24 h 给予热疗预处理的作用最明显(图 1B)。

2.2 热疗预处理对吉西他滨诱导的 SW1990 细胞形态的影响

对照组细胞生长良好, 细胞形态均一, 呈多边形, 团簇样生长(图 2A)。30 μM 吉西他滨作用 24 小时后, 细胞体积增大, 极

性消失, 呈纺锤样, 且细胞间连接减少(图 2B 箭头示), 这提示 SW1990 细胞发生 EMT(图 2B)。但热疗 43 $^{\circ}\text{C}$ 1 h 预处理后, 给予吉西他滨处理的细胞上述特征部分逆转, 细胞连接增加(图 2C 箭头示), 提示 SW1990 细胞 EMT 被部分逆转(图 2C)。

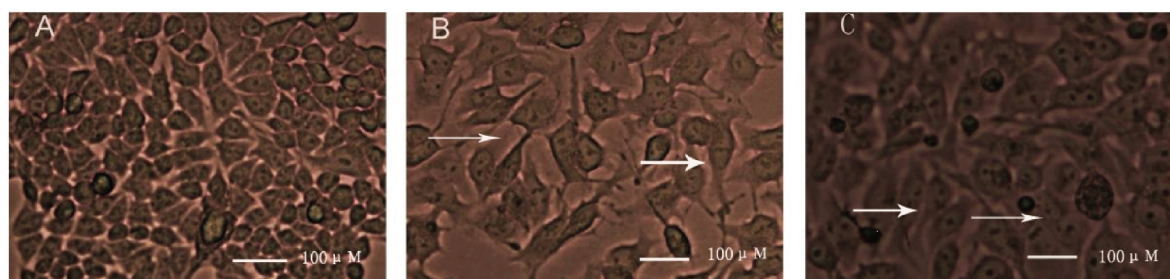


图 2 热疗预处理对吉西他滨诱导的 SW1990 细胞形态的影响(200 $\times$)

Fig. 2 Effect of pretreatment with hyperthermia on the morphology of Gemcitabine induced SW1990 cells(200 $\times$)

2.3 热疗预处理对吉西他滨诱导的 SW1990 细胞 E-cadherin 和 Cleaved Notch1 蛋白表达的影响

单独吉西他滨处理能显著下调 SW1990 细胞中 E-cadherin

蛋白并上调 Cleaved Notch1 蛋白的表达($P < 0.05$), 而热疗预处理可明显上调吉西他滨诱导的 SW1990 细胞中 E-cadherin 蛋白的表达, 下调 Cleaved Notch1 蛋白的表达($P < 0.05$)(图 3)。

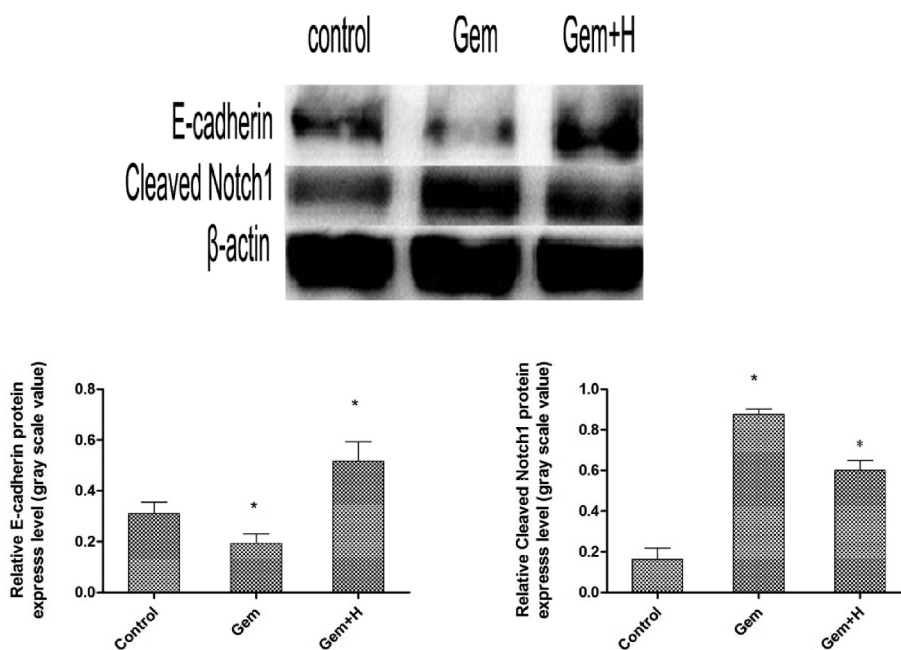


图 3 吉西他滨、吉西他滨联合热疗处理的 SW1990 细胞中 E-cadherin 和 Cleaved Notch1 蛋白的表达(*为 $P < 0.05$)

Fig. 3 Protein expression of E-cadherin and Cleaved Notch1 in sw1990 cells treated by Gemcitabine or Gemcitabine combined with Hyperthermia(*为 $P < 0.05$)

3 讨论

热疗(hyperthermia)是近几十年来发展起来的一种肿瘤治疗方法, 其利用物理能量在组织中沉淀而产生热效应, 使肿瘤组织温度上升到有效治疗温度, 并维持一段时间, 以杀死肿瘤细胞, 又不损伤正常细胞, 同放疗相比, 副反应更小, 被国际医药界称为“绿色疗法”。热疗可分为局部和全身, 已作为临床进展期恶性肿瘤患者可耐受的辅助治疗手段^[13, 14]。相关动物实验证实局部热疗能抑制肿瘤侵袭转移^[15]。

上皮间质转化(EMT)概念的首次于 1982 年被提出, 源于

在三维胶原凝胶中培养的晶状体上皮细胞出现间质细胞样形态。EMT 被认为是在胚胎发育阶段细胞形态学形成的重要过程, 同肿瘤侵袭转移、肿瘤干细胞、放化疗耐受密切相关^[4-7], 其主要特征为: 上皮细胞标志物如黏附蛋白 E-cadherin 的丢失, 以及获得细胞间质标志如波形蛋白(vimentin)。作为一个动态变化的过程, EMT 表现为上皮细胞失去分化特征, 细胞与细胞间的紧密连接以及细胞极性消失, 并获得间质细胞特性, 包括迁移性增加、侵袭性增加、耐受凋亡能力的增加。E-cadherin 的变化是 EMT 最主要的调控因素, 也是 EMT 发生最重要的衡量指标。王辉等人应用吉西他滨以体外浓度递增的方法筛选并建

立的耐药胰腺癌细胞株会发生上皮间质转化(EMT)现象^[6]。因此,吉西他滨在杀死肿瘤细胞的同时,有可能会诱导肿瘤的EMT。许多蛋白被发现与EMT发生相关(如Notch1、Snail),相关研究表明Notch1在多种肿瘤中均有表达,如胰腺癌、胃癌等^[17,18]。Notch1通路属于跨膜受体蛋白家族,参与细胞的分化、增殖、凋亡,与肿瘤的发生、发展密切相关。相关研究表明:EMT的发生与Notch1通路有关,在肿瘤细胞内,Notch1配体同受体结合,胞内区域被激活,通过上调转录因子slug下游靶基因转录,促使EMT的发生^[19,21]。Notch基因敲除后,Slug表达下调,E-cadherin蛋白表达上调^[22]。

本研究结果显示吉西他滨可以时间和剂量依赖性的方式抑制胰腺癌细胞株SW1990细胞的增殖,细胞呈纺锤样,且细胞间连接减少,呈上皮间质转化过程。而化疗前24h的进行热疗预处理1小时不仅可显著增强吉西他滨对SW1990细胞增殖的影响,而且可逆转吉西他滨诱导的EMT,主要表现为细胞间连接增加。E-cadherin的表达下调是EMT发生的重要标志,而EMT的发生意味着肿瘤细胞更易侵袭转移、更易对放化疗耐受。Cleaved Notch1蛋白是Notch1受体被剪切释放的胞内段,与其它蛋白结合激活多种代谢相关的基因表达,诱导EMT的发生。为了进一步探讨热疗对SW1990胰腺癌细胞EMT可能的作用机制,本实验检测了细胞内E-cadherin和Cleaved Notch1蛋白的表达,结果显示单用吉西他滨能够显著下调E-cadherin的表达,上调Cleaved Notch1的表达;而热疗预处理可显著上调吉西他滨诱导的E-cadherin的表达,下调Cleaved Notch1的表达。这些结果表明热疗可能通过下调Cleaved Notch1的表达;而热疗预处理可显著上调吉西他滨诱导的E-cadherin的表达,下调Cleaved Notch1的表达,同时上调E-cadherin的表达,逆转EMT,从而改善肿瘤的耐药和转移。

目前,虽然热疗已被广泛应用于各类实体肿瘤的辅助治疗,但关于其对与肿瘤耐药转移密切相关的EMT影响的研究较少。本研究结果为热疗在临床的应用提供了更多的理论支撑,但其内在的机制尚待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013 [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30
- [2] Guo X, Cui Z. Current diagnosis and treatment of pancreatic cancer in China [J]. Pancreas, 2005, 31(1): 13-22
- [3] 顾凯,吴春晓,鲍萍萍,等.上海市胰腺癌流行现状、回顾与比较分析[J]. 外科理论与实践, 2009, 14(5): 510-514
- [4] Gu Kai, Wu Chun-xiao, Bao Ping-ping, et al. Incidence of pancreatic cancer in Shanghai: a current, retrospective and comparative exploration [J]. J Surg Concepts Pract, 2009, 14(5): 510-514
- [5] Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1796(2): 75-90
- [6] Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells [J]. Cell, 2008, 133(4): 704-715
- [6] Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, et al. Molecular signature and

- therapeutic perspective of the epithelial-mesenchymal transitions in epithelial cancers [J]. Drug Resist Updat, 2008, 11(4-5): 123-151
- [7] Theys J, Juttin B, Habets R, et al. E-Cadherin loss associated with EMT promotes radioresistance in human tumor cells [J]. Radiother Oncol, 2011, 99(3): 392-397
- [8] Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer [J]. Lancet Oncol, 2002, (8): 487-497
- [9] Issels RD. Hyperthermia adds to chemotherapy [J]. Eur J Cancer, 2008, 44(17): 2546-2554
- [10] Li G, Mitsumori M, Ogura M, et al. Local hyperthermia combined with external irradiation for regional recurrent breast carcinoma [J]. Int J Clin Oncol, 2004, 9(3): 179-183
- [11] Zhang HG, Mehta K, Cohen P, et al. Hyperthermia on immune regulation: a temperature story [J]. cancer Lett, 2008, 271(2): 191-204
- [12] Fukao H, Ikeda M, Ichikawa T, et al. Effect of hyperthermia on the Viability and the fibrinolytic potential of Human cancer lines [J]. clin Chim Acta, 2000, 296(1-2): 17-33
- [13] Zagar TM, Oleson JR, Vujaskovic Z, et al. Hyperthermia for locally advanced breast cancer [J]. Int J Hyperthermia, 2010, 26(7): 618-624
- [14] Horsman MR, Overgaard J. Hyperthermia: a potent enhancer of radiotherapy [J]. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2007, 19(6): 418-426
- [15] Nagashima K, Takagi R, Hoshina H. Effect of local hyperthermia on metastases in oral squamous cell carcinoma [J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2002, 31(1): 84-89
- [16] 王辉,张辉,吴峻立,等.耐吉西他滨胰腺癌细胞株SW1990/GZ上皮间质转化现象的研究[J]. 南京医科大学学报, 2012, 32(3): 306-309
- [16] Wang Hui, Zhang Ye, Wu Jun-li, et al. Investigation of epithelial-mesenchymal transition in gemcitabine resistant cancer cell line SW1990/GZ [J]. Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(3): 306-309
- [17] Hu H, Zhou L, Awadallah A, et al. Significance of Notch1-signaling Pathway in Human Pancreatic Development and Carcinogenesis [J]. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, 2013, 21(3): 242-247
- [18] Brzozowa M, Mielańczyk Ł, Michalski M, et al. Role of Notch signaling pathway in gastric cancer pathogenesis [J]. Contemp Oncol, 2013, 17(1): 1-5
- [19] Fenouille N, Tichet M, Dufies M, et al. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulatory factor SLUG (SNAI2) is a downstream target of SPARC and AKT in promoting melanoma cell invasion [J]. PLoS One, 2012, 7(7): e40378
- [20] Wels C, Joshi S, Koefinger P, et al. Transcriptional activation of ZEB1 by Slug Leads to cooperative regulation of the epithelial mesenchymal transition like phenotype in melanoma [J]. J Invest Dermatol, 2011, 131(9): 1877-1885
- [21] Alves CC, Carneiro F, Hoefler H, et al. Role of the epithelial-mesenchymal transition regulator Slug in primary human cancers [J]. Front Biosci, 2009, 1(14): 3035-3050
- [22] Chen J, Imanaka N, Chen J, et al. Hypoxia potentiates Notch signaling in breast cancer leading to decreased E-cadherin expression and increased cell migration and invasion [J]. Brit J Cancer, 2010, 102(2): 351-360