

• 论 著 •

P120ctn 基因沉默促进舌癌细胞上皮-间质转化*

潘夏薇¹, 陈 钟¹, 陈 江^{2△}

(1. 厦门医学高等专科学校口腔医学系, 福建厦门 361008; 2. 福建医科大学口腔医学系, 福州 350108)

摘 要:目的 探索 P120-连环蛋白(P120ctn)在口腔鳞状细胞癌(OSCC)上皮-间质转化(EMT)中的作用。方法 采用质粒 pGFP-V-RS-P120ctn shRNA 转染人舌鳞癌细胞(TSCCA), 采用实时荧光定量聚合酶链反应、Western blot 检测细胞中 P120ctn、E-钙黏蛋白(E-cad)、N-钙黏蛋白(N-cad)和波形蛋白(Vim)的 mRNA 和蛋白表达的变化, 通过 Transwell 细胞侵袭及细胞迁移试验检测转染前、后细胞迁移和侵袭能力的变化。结果 用质粒 pGFP-V-RS-P120ctn shRNA 转染 TSCCA 后发现, 随着 P120ctn 表达的明显降低, E-cad 的 mRNA 和蛋白表达水平明显降低, N-cad 和 Vim 的 mRNA 和蛋白表达水平明显升高, 细胞迁移和侵袭能力明显提高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 在 OSCC 中 P120ctn 可能通过调控 EMT 标记物 E-cad 的表达参与 EMT 的发生, 调节肿瘤的侵袭和转移。

关键词: P120-连环蛋白; 上皮-间质转化; 口腔; 鳞状细胞癌

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.16.008 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2017)16-2352-04

P120ctn silencing can promote the epithelial-mesenchymal transition of tongue squamous cancer cell*

PAN Xiawei¹, CHEN Zhong¹, CHEN Jiang^{2△}

(1. Department of Stomatology, Xiamen Medical College, Xiamen, Fujian 361008, China;

2. Department of Stomatology, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of P120-catenin(P120ctn) in the process of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of oral squamous-cell cancer(OSCC). **Methods** Plasmid pGFP-V-RS-P120ctn shRNA was used to transfect TSCCA cells. Real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot were adopted to test mRNA and protein expressions of P120ctn, E-cadherin(E-cad), N-cadherin(N-cad) and Vimentin(Vim), and Transwell cell invasion and cell migration assay were used to test the invasion and migration capacity before and after the transfection. **Results** After plasmid pGFP-V-RS-P120ctn shRNA was used to transfect TSCCA cells, we found that as the expression of P120ctn significantly decreased, mRNA and protein expression of E-cad decreased significantly, mRNA and protein expression of N-cad and Vim increased significantly, and cell migration and invasion capacity increased significantly($P < 0.05$). **Conclusion** In OSCC cells, P120ctn may be involved in EMT and the metastasis and invasion regulation by adjusting EMT biomarker E-cad expression.

Key words: P120-catenin; epithelial-mesenchymal transition; oral; squamous-cell cancer

肿瘤的侵袭转移包含多个信号传导通路, 过程复杂, 步骤繁多, 其发生和发展受多种因素的调控, 上皮-间质转化(EMT)被认为是肿瘤细胞侵袭和转移的主要因素之一。有研究表明, 口腔鳞状细胞癌(OSCC)发展过程中发生了 EMT, 多种 EMT 相关基因在口腔鳞癌组织和细胞系中表达异常^[1-3]。黏附能力下降是 EMT 的重要环节, E-钙黏蛋白(E-cad)作为重要的细胞黏附因子是多种恶性肿瘤发生 EMT 的关键标记物^[4-5]。作者之前的研究表明, P120-连环蛋白(P120ctn)和 E-cad 可能通过调节细胞黏附调控了 OSCC 的浸润和转移^[6], 但其与 EMT 的关系尚未阐明。本研究探索 P120ctn 在 OSCC EMT 中的作用, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 鼠抗人 P120ctn 单克隆抗体(Abcam), 鼠抗人 E-cad 单克隆抗体(Abcam), 兔抗人 N-钙黏蛋白(N-cad)多克隆抗体(Santa Cruz), 羊抗人波形蛋白(Vim)多克隆抗体(Santa Cruz), pGFP-V-RS-P120ctn shRNA (Origene), XtremeGene HP DNA 转染试剂(Roche)。DMEM 培养基(Gibco), 胎牛血清(FBS)(Gibco), TRIzol(Invitrogen), 反转录试剂盒(TaKaRa)。CO₂ 培养箱(Thermal)、倒置相差显微镜(Olym-

pus)、荧光聚合酶链反应(PCR)仪(Corbett)、Transwell 小室(Corning)。

1.2 细胞培养 人舌鳞癌细胞(TSCCA)舌癌原发灶细胞由湖北医科大学口腔医学院金辉喜博士建立武汉大学典藏中心保存, 在含 10% 胎牛血清青链霉素的 DMEM 培养液内, 5% CO₂、37℃ 培养箱内常规传代培养。

1.3 基因转染及筛选 舌癌原发灶细胞 TSCCA 接种至 6 孔板, 每孔 2 mL 3×10^5 个细胞 DMEM 培养基常规培养 24 h。用无血清培养基稀释质粒 pGFP-V-RS-P120ctn shRNA 至 1 μg/100 μL, 轻柔混匀。取 100 μL 质粒稀释液, 加入无菌管中, 吸取转染试剂 3 μL 加入其中, 轻柔混匀, 15~25℃ 孵育 30 min。将转染混合液加入每孔中轻轻混匀。37℃ 孵育 24 h 后施加筛选压力, 改用含 0.8 μg/mL 嘌呤霉素的培养基培养。反复筛选 2~3 周后, 收集具有嘌呤霉素抗性的细胞克隆增殖, 命名为 TSCCA/shP120ctn。对照组为未做任何处理的 TSCCA。

1.4 实时荧光定量 PCR 引物合成委托上海生工生物工程有限公司完成。用 Trizol 试剂提取各组细胞总 RNA 进行 cDNA 合成, 反应体系为 Oligo dT primer(50 μmol) 1 μL, dNTP Mix-

* 基金项目: 厦门医学院自然科学基金资助项目(Z2013-02)。

作者简介: 潘夏薇, 女, 讲师, 主要从事口腔鳞癌基础研究。△ 通信作者, E-mail: 310571932@qq.com。

ture 1 μL , Total RNA 5 μg , 加入 RNase free dH_2O 补至 10 μL , 在 PCR 仪上进行以下条件的反转录反应: 42 $^{\circ}\text{C}$, 15 min; -70 $^{\circ}\text{C}$, 30~60 min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。使用荧光 PCR 仪对 TSCCA 和 TSCCA/shP120ctn 细胞中的 P120ctn、E-cad、N-cad、Vim 基因进行定量检测, 反应条件 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min, 93 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 35 个循环。

1.5 Western blot 常规收获细胞, 提取蛋白上样, 加入琼脂糖凝胶电泳 10 mA 2 h, 根据 Marker 相对分子质量截取目的条带, 100 V 恒压 1 h, 湿转到聚偏二氟乙烯膜上, 5% 的脱脂奶粉封闭后加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇动孵育过夜, 洗去一抗, 辣根过氧化物酶标记 IgG 与滤膜一同温育洗膜曝光。

1.6 Transwell 细胞侵袭及细胞迁移试验 迁移试验采用培养基和 Transwell 小室放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育。消化对数生长期的 TSCCA 和 TSCCA/shP120ctn 细胞, 加入无血清培养基计数, 调整细胞浓度至 $2\times 10^5/\text{mL}$, 上室分别加入 200 μL 细胞悬液, 下室加入 800 μL 含 20% 血清的培养液, 48 h 后固定、染色, 统计结果。侵袭试验在 Transwell 上室底部中央垂直加入 100 μL 稀释后的 Matrigel, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 4~5 h 使其干成胶状, 后续步骤同迁移试验。

1.7 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计处理, 试验数据均以 3 次试验的 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间差异均采用 ANOVA 进行处理。

2 结 果

2.1 P120ctn shRNA 转染对 TSCCA E-cad mRNA 和蛋白表达的影响 用质粒 pGFP-V-RS-P120ctn shRNA 转染 TSCCA 后发现, 随着 P120ctn 表达的明显降低, E-cad 的 mRNA (图 1) 和蛋白 (图 2) 表达水平也明显降低。

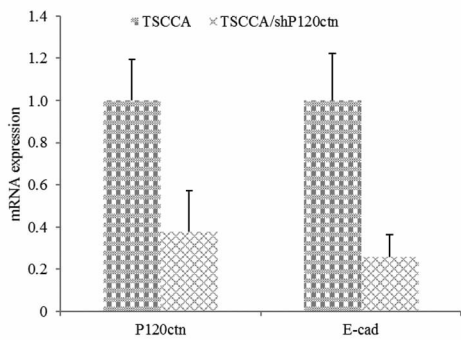
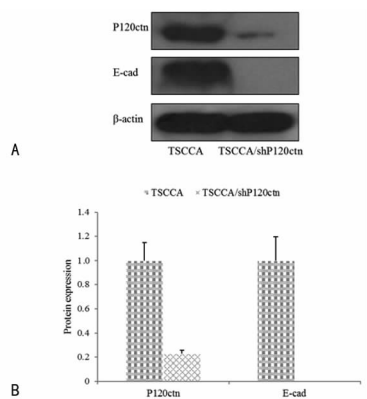


图 1 P120ctn mRNA 和 E-cad mRNA 在 TSCCA 和 TSCCA/shP120ctn 细胞中的表达



注: A 为 Wb 图, B 为统计图

图 2 P120ctn 和 E-cad 蛋白在 TSCCA 和 TSCCA/shP120ctn 细胞中的表达

2.2 P120ctn shRNA 转染对 TSCCA 中其他 EMT 标记物 mRNA 和蛋白表达的影响 用质粒 pGFP-V-RS-P120ctn shRNA 转染 TSCCA 后发现, 除 E-cad 外, TSCCA 中其他 EMT 标记物 N-cad 和 Vim 的 mRNA (图 3) 和蛋白 (图 4) 表达水平明显升高。

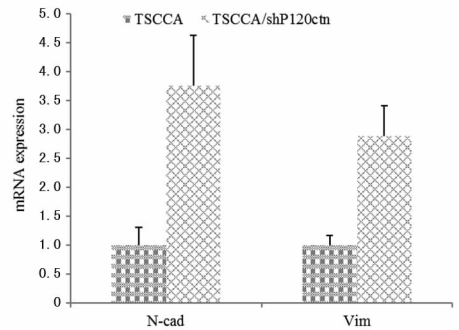
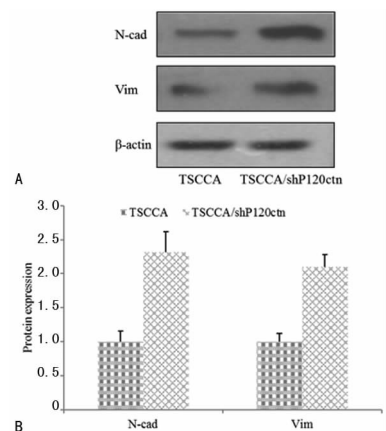
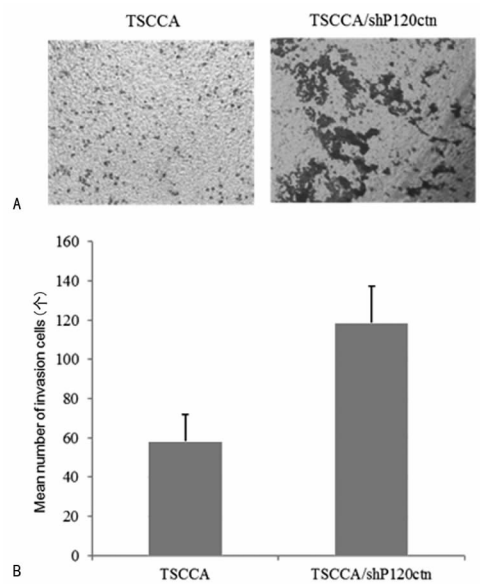


图 3 N-cad mRNA 和 Vim mRNA 在 TSCCA 和 TSCCA/shP120ctn 细胞中的表达



注: A 为 Wb 图, B 为统计图

图 4 N-cad 和 Vim 蛋白在 TSCCA 和 TSCCA/shP120ctn 细胞中的表达

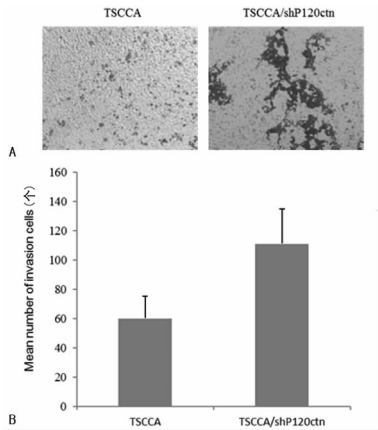


注: A 为迁移图, B 为统计图

图 5 TSCCA 和 TSCCA/shP120ctn 细胞的迁移能力对比

2.3 P120ctn shRNA 转染对 TSCCA 迁移和侵袭能力的影响 利用无基质胶及有基质胶 Transwell 试验检测 TSCCA 转染

P120ctn shRNA 前、后迁移(图 5)和侵袭(图 6)能力的变化,结果显示细胞穿过 Transwell 小室微孔的数量较转染前明显增多,差异有统计学意义($P < 0.05$),TSCCA 转染 P120ctn shRNA 后迁移和侵袭能力明显提高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



注:A为侵袭图;B为统计图

图 6 TSCCA 和 TSCCA/shP120ctn 细胞的侵袭能力对比

3 讨 论

EMT 现象包含一系列复杂的分子和细胞事件,对于多细胞生物体的胚胎发育等正常生理过程至关重要,这些变化使固有的上皮细胞发生结构和功能改变,如细胞的极性丧失,上皮细胞黏附被破坏,细胞获得典型的迁移性间充质细胞的特性,运动能力提高^[7]。近年来,EMT 被认为在各类肿瘤细胞中促进了肿瘤的发生和发展,启动了肿瘤转移程序,使肿瘤细胞能够脱离原发灶发生迁移,但其在 OSCC 细胞中的发生机制尚需进一步阐明^[8-10]。

细胞之间黏附能力下降是细胞间连接解体的重要原因,也是 EMT 的关键步骤。钙黏蛋白是膜转移相关的黏蛋白家族,它是钙依赖的细胞与细胞之间粘连作用关键的细胞黏附调节分子,分为三类:E-cad、N-cad、P-钙黏蛋白(P-cad)。E-cad、N-cad 和 Vim 是 EMT 的重要标志物,当 E-cad 表达下降,N-cad 和 Vim 表达升高时,肿瘤细胞骨架系统排列发生变化,细胞生物学形状改变,黏附功能下降,易于脱离原发灶,向周围组织侵袭和转移^[11-12]。

本研究结果发现,EMT 标记蛋白 E-cad 的 mRNA 和蛋白表达水平在 P120ctn shRNA 转染舌癌原发灶细胞 TSCCA 后明显降低。P120ctn 是 ctn 家族的新成员,ctn 是一个有相似结构的胞内糖蛋白家族,参与细胞黏附和信号传导,家族成员表达于黏附连接或桥粒。P120ctn 通过与 E-cad 的胞内肽段近膜端结合形成 ctn-钙黏蛋白复合体(CCC),一方面选择性地调节钙黏蛋白的内吞和稳定性,另一方面在 Rho 家族成员的调控中发挥重要作用。Rho 家族是调节细胞骨架动态变化和钙黏蛋白介导的细胞黏附的关键因子。P120ctn 蛋白水平的降低或 P120ctn 与 E-cad 结合能力的丧失使之从 CCC 脱离,会导致钙黏蛋白内吞,内吞的钙黏蛋白或者被溶酶体降解,或者通过 P120ctn 结合和 Rap1 GTPase 被回收至细胞膜,因此,P120ctn 对于 E-cad 这种动静结合的调节是非常重要的。P120ctn 与 E-cad 结合的关键部位也是磷酸化位点,P120ctn 上 Y228 位点的磷酸化与 OSCC 的发生密切相关^[13],某些酪氨酸和丝氨酸位点的磷酸化都与钙黏蛋白的活化和黏附能力相关^[14]。P120ctn 可能就是通过磷酸化调节 E-cad 的结合和稳定性,从而影响 CCC 的稳定性,在磷酸化降低时,细胞黏附能力会发生

异常。

此外,本研究还发现,P120ctn shRNA 转染 TSCCA 后,另外两种 EMT 标记蛋白 N-cad 和 Vim 的表达水平明显升高,且 TSCCA 迁移和侵袭的能力明显提高,由此提示 EMT 现象可能与口腔鳞癌的侵袭和转移有关,这与文献^[2]报道的结果一致。有学者在 OSCC 细胞系中观察到 E-cad 和基质金属蛋白酶(MMP)-9 的下调等上皮表型,以及 Vim 和 MMP-2 上调等间质表型。在多种 OSCC 患者的组织中或 OSCC 细胞系中也同时发现了 E-cad 表达下调和 Vim 的高表达,而且二者的表达异常与 OSCC 的局部复发、浸润和转移有关^[15]。E-cad 可以与 β -catenin 结合从而抑制 β -catenin 在细胞质的聚集,阻碍其进入细胞核与 TCF/LEF 转录因子结合,从而抑制转录因子形成。反之,当 E-cad 表达下调时,下游靶基因的异常转录启动,其中就包括 Vim。Vim 是中间纤维家族的一员,是间质细胞骨架的主要成分。上皮细胞中异常的 Vim 表达容易导致细胞骨架蛋白的质量和结构发生根本性改变,上皮细胞由原来的立方型转变为纺锤纤维型,使细胞更容易发生游走迁移。

在 EMT 过程中 E-cad 表达下调而 N-cad 表达上调的“钙黏蛋白转换”促进了肿瘤细胞的迁移和侵袭,并且与不良预后有关^[16-17]。钙黏蛋白转化过程中肿瘤细胞的恶性行为可能与 N-cad/血小板衍生生长因子受体的相互作用或 N-cad/成纤维细胞生长因子受体(FGFR)的相互作用有关,前者可能诱导了 EMT 过程中的一些重要事件,包括肌动蛋白重组、增殖和迁移,而后者可能通过与 FGF 结合抑制了 FGFR 的内化,激活了丝裂原活化蛋白激酶,提高了细胞运动能力,促进了 MMP 分泌和肿瘤细胞的侵袭。

综上所述,本文推测,在 OSCC 中 P120ctn 可能通过调控 EMT 标记物 E-cad 的表达参与 EMT 的发生,调节肿瘤的侵袭和转移,但 P120ctn 对 E-cad 的调控机制,尤其是如何通过磷酸化调节 E-cad 的结合和稳定性,还有待进一步试验研究。

参考文献

- [1] Zhou JP, Tao DT, Xu Q, et al. Expression of E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(3): 3150-3154.
- [2] Krisanaprakornkit S, Iamaroon A. Epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma[J]. ISRN Oncol, 2012, 29(5): 1-10.
- [3] Chaw SY, Majeed AA, Dalley AJ, et al. Epithelial to mesenchymal transition(EMT) biomarkers—E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin—in oral squamous cell carcinogenesis and transformation[J]. Oral Oncol, 2012, 48(10): 997-1006.
- [4] Myong NH. Loss of E-cadherin and Acquisition of Vimentin in Epithelial-Mesenchymal Transition are Noble Indicators of Uterine Cervix Cancer Progression[J]. Korean J Pathol, 2012, 46(4): 341-348.
- [5] Liu Y, Qian WY, Zhang JW, et al. The indicative function of Twist2 and E-cadherin in HPV oncogene-induced epithelial-mesenchymal transition of cervical cancer cells[J]. Oncol Rep, 2015, 33(2): 639-650.
- [6] 陈钟,董孟华,邓锋. P120ctn 在口腔鳞癌中的表达及其与细胞黏附的关系[J]. 口腔医学研究, 2013, 29(11): 1051-1053.

(下转第 2358 页)

AG、胃癌疾病筛查,不仅可以提高胃癌的早期诊断率,还可使医疗资源得以充分利用。

参考文献

[1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008; GLOBOCAN 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12):2893-2917.

[2] 杜娟,席妍,郑珂,等. 多种血清标志物联合检测在诊断老年胃癌患者中的意义[J]. *中国医药导报*, 2015, 12(20):16-19.

[3] 张玲霞,庄坤,张沥,等. 血清幽门螺杆菌抗体联合胃蛋白酶原检测在胃癌和癌前病变筛查中的应用[J]. *中华消化杂志*, 2016, 36(9):582-587.

[4] 中华医学会消化病学分会. 中国慢性胃炎共识意见[J]. *现代消化及介入诊疗*, 2007, 11(1):55-62.

[5] 王法成,景晶晶,王选杰,等. 早期与进展期胃癌患者胃黏膜“血清学活检”指标差异比较[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2015, 24(2):156-160.

[6] 周军,车虎森,何雪琴,等. 血清胃蛋白酶原 I、II 在慢性萎缩性胃炎筛查中的应用价值[J]. *疑难病杂志*, 2014, 13(10):1073-1075.

[7] 王朝晖,李艳华,郭古方. 蒙古族、汉族胃癌患者血清胃蛋白酶原水平及幽门螺杆菌关系的研究[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2014, 22(12):725-728.

[8] 王雪华,曹燕,张剑宏,等. 血清胃蛋白酶原联合胃泌素测定在胃癌及萎缩性胃炎中的诊断价值[J/CD]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2015, 9(10):62-65.

[9] Dinis-Ribeiro M, Yamaki G, Miki K, et al. Meta-analysis on the validity of pepsinogen test for gastric carcinoma,

dysplasia or chronic atrophic gastritis screening[J]. *J Med Screen*, 2004, 11(3):141-147.

[10] 张祥宏,王俊灵,严霞,等. 赞皇县胃癌筛查方法研究简介[J]. *中国肿瘤*, 2002, 11(7):384-385.

[11] Adhami T, Goldblum JR, Richter JE, et al. The role of gastric and duodenal agents in laryngeal injury:an experimental canine model[J]. *Am J Gastroenterol*, 2004, 99(11):2098-2106.

[12] 韦健健,马颖才. 胃泌素与胃癌发生、发展的关系研究进展[J]. *中华消化内镜杂志*, 2016, 33(4):270-272.

[13] Song DH, Rana B, Wolfe JR, et al. Gastrin-induced gastric adenocarcinoma growth is mediated through cyclin D1 [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, 285(1):G217-222.

[14] 朱琦,俞文,薛莱提·艾孜木,等. 新疆维吾尔族、汉族胃癌血清胃蛋白酶原、胃泌素-17 水平及其与幽门螺杆菌感染相关性的临床研究[J]. *胃肠病学*, 2016, 21(6):348-352.

[15] Miki K, Morita M, Sasajima M, et al. Usefulness of gastric cancer screening using the serum pepsinogen test method[J]. *Am J Gastroenterol*, 2003, 98(4):735-739.

[16] Fock KM. Review article: the epidemiology and prevention of gastric cancer[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2014, 40(3):250-260.

[17] 周俊伟. 幽门螺杆菌感染与胃癌的相关性[J]. *中华医院感染学杂志*, 2012, 22(21):4799-4800.

(收稿日期:2017-01-18 修回日期:2017-03-26)

(上接第 2354 页)

[7] Nieto MA. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells[J]. *Science*, 2013, 342(6159):709-716.

[8] Zhang K, Zhao H, Ji Z, et al. Shp2 promotes metastasis of prostate cancer by attenuating the PAR3/PAR6/aPKC polarity protein complex and enhancing epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Oncogene*, 2016, 35(10):1271-1282.

[9] D'assoro AB, Liu T, Quatraro C, et al. The mitotic kinase Aurora-a promotes distant metastases by inducing epithelial-to-mesenchymal transition in ERa(+) breast cancer cells[J]. *Oncogene*, 2014, 33(5):599-610.

[10] Caiado F, Carvalho T, Rosa I, et al. Bone marrow-derived CD11b+Jagged2+ cells promote epithelial-to-mesenchymal transition and metastasization in colorectal cancer [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(14):4233-4246.

[11] Huo C, Kao YH, Chuu CP. Androgen receptor inhibits epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion of PC-3 prostate cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2015, 369(1):103-111.

[12] Ye Z, Zhou M, Tian B, et al. Expression of lncRNA-CCAT1, E-cadherin and N-cadherin in colorectal cancer

and its clinical significance[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(3):3707-3715.

[13] Petrova YI, Spano MM, Gumbiner BM. Conformational epitopes at cadherin calcium-binding sites and p120-catenin phosphorylation regulate cell adhesion[J]. *Mol Biol Cell*, 2012, 23(11):2092-2108.

[14] Ma LW, Zhou ZT, He QB, et al. Phosphorylated p120-catenin expression has predictive value for oral cancer progression[J]. *J Clin Pathol*, 2012, 65(4):315-319.

[15] Nijkamp MM, Span PN, Hoogsteen IJ, et al. Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients [J]. *Radiother Oncol*, 2011, 99(3):344-348.

[16] Fan M, Liu Y, Xia FD, et al. Increased expression of EphA2 and E-N cadherin Switch in primary hepatocellular carcinoma[J]. *Tumori*, 2013, 99(6):689-696.

[17] Lade-Keller J, Riber-Hansen R, Guldberg P, et al. E-to N-cadherin Switch in melanoma is associated with decreased expression of phosphatase and tensin homolog and cancer progression[J]. *Br J Dermatol*, 2013, 169(3):618-628.

(收稿日期:2017-01-20 修回日期:2017-03-28)