

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.02.001

TGF- β 1 对人皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞增殖的影响及可能的机制^{*}

何仁颖^{1,2}, 何 威¹, 李航宇³, 张 斌^{1,4 Δ}

1. 中国人民解放军陆军军医大学第二附属医院皮肤科, 重庆 400037; 2. 重庆市人民医院皮肤科, 重庆 400014; 3. 中国人民解放军陆军军医大学第一附属医院烧伤科, 重庆 400038; 4. 重庆市中医院/重庆市第一人民医院皮肤科, 重庆 400011

摘 要:目的 探讨转化生长因子- β 1(TGF- β 1)对人皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞增殖的影响及可能的机制。

方法 将 HaCaT 细胞和人皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞在不同浓度及时间的 TGF- β 1 作用后,采用 MTT 法检测其增殖情况,RT-PCR 法检测其 TGF- β 受体 mRNA 表达水平的变化。**结果** 不同浓度的 TGF- β 1 均能显著抑制 HaCaT 细胞的增殖,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),且随着 TGF- β 1 浓度的升高,其抑制作用逐渐增强;但在 A431 细胞中,不同浓度的 TGF- β 1 组与对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。用相同浓度的 TGF- β 1 分别作用不同时间后,HaCaT 细胞的增殖受到明显抑制,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。但在 A431 细胞中,其抑制作用不明显,与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。RT-PCR 结果显示,随着 TGF- β 1 浓度的升高,A431 细胞中 TGF- β 受体 I mRNA(TGF- β R I mRNA)表达逐渐下降。相同浓度 TGF- β 1 作用下,TGF- β R I mRNA 的表达在一定时间范围内呈时间依赖性下调趋势。**结论** 皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞对 TGF- β 1 引起的生长抑制不敏感,这可能是通过调控 TGF- β 1 受体表达水平所致。

关键词:转化生长因子- β 1; 鳞状细胞癌; 细胞增殖

中图法分类号:R739.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)02-0145-04

Influences of TGF- β 1 on expressions of human cutaneous squamous carcinoma

A431 cells and its possible mechanism^{*}

HE Renying^{1,2}, HE Wei¹, LI Hangyu³, ZHANG Bin^{1,4 Δ}

1. Department of Dermatology, Xinqiao Hospital, Army Medical University, Chongqing 400037, China; 2. Department of Dermatology, Chongqing General Hospital, Chongqing 400014, China; 3. Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Army Medical University, Chongqing 400038, China; 4. Department of Dermatology, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital/Chongqing First People's Hospital, Chongqing 400011, China

Abstract: Objective To investigate the effect of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) on the proliferation of human squamous cell carcinoma A431 cells and its possible mechanism.

Methods HaCaT cells and skin squamous cell carcinoma A431 cells were treated with TGF- β 1 at different concentrations and time. The proliferation of HaCaT cell and A431 cell was detected by MTT assay. The expression of TGF- β receptor mRNA was detected by RT-PCR. **Results** Different concentrations of TGF- β 1 could significantly inhibit the proliferation of HaCaT cell ($P < 0.05$), and the inhibitory effect increased gradually with the increases of TGF- β 1 concentration. However, in the skin squamous cell carcinoma A431 cell group, there was no significant difference between the different concentrations of TGF- β 1 group and the control group ($P > 0.05$). After the same concentration of TGF- β 1 was applied for different time, the proliferation of HaCaT cells was significantly inhibited, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The inhibition was positively correlated with time in a certain time range. However, in the skin squamous cell carcinoma A431 cell group, the inhibitory effect was not obvious, and there was no significant difference ($P > 0.05$). The results of RT-PCR showed that with the increase of TGF- β 1 concentration, the expression of TGF- β receptor I mRNA (TGF- β R I mRNA) in skin squamous cell carcinoma A431 cells and control cells decreased gradually. After the same concentration of TGF- β 1 was applied for different time, the change of TGF- β R I mRNA had showed a time-depend-

^{*} 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81502369)。

作者简介:何仁颖,女,副主任医师,主要从事皮肤病学方面的研究。 ^{Δ} 通信作者,E-mail:562868146@qq.com。

本文引用格式:何仁颖,何威,李航宇,等. TGF- β 1 对人皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞增殖的影响及可能的机制[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(2):145-148.

ent downward trend. **Conclusion** Skin squamous cell carcinoma A431 cells are not sensitive to growth inhibition by TGF- β 1, which may be caused by regulation of TGF- β 1 receptor expression levels.

Key words: transforming growth factor- β 1; squamous cell carcinoma; cell proliferation

皮肤鳞状细胞癌是一种来源于表皮角质形成细胞的常见恶性肿瘤,好发于颜面部,且随着时间的推移容易发生转移,严重影响患者的外貌及健康。随着环境污染的加重,鳞状细胞癌的发病率逐年升高。近年来研究表明,转化生长因子- β 1(TGF- β 1)在调节细胞生长、分化、凋亡和在维持皮肤内环境稳定方面均发挥着至关重要的作用,是重要的调节者和参与者^[1]。既往研究发现,在人皮肤鳞状细胞癌组织中有 TGF- β /Smad 信号转导通路的存在,且其中几种 TGF- β 1 受体的表达存在变化^[2]。然而,TGF- β 1 的表达是否与人皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞的增殖过程有关,相关报道甚少。为此,本研究通过观察 A431 细胞和 HaCaT 细胞在不同 TGF- β 1 作用浓度和作用时间后,细胞的增殖情况和细胞中 TGF- β 受体 mRNA 表达的变化情况,来进一步探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料来源 人角质形成细胞 HaCaT 细胞和人皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞均购于中国医学科学院上海细胞所。

1.2 仪器与试剂 人重组 TGF- β 1 (美国 PEPRO-TECH 公司)、胎牛血清(天津灏洋生物制品科技有限责任公司)、DMEM 培养液(美国 Gibco 公司)、胰蛋白酶和 Tripure Isolation Reagent (美国 Roche 公司)、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 和 PrimeScript[™] RT Reagent Kit(日本 TaKaRa Bio 公司)、DMSO(常州市科丰化工有限公司)、MTT 试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司)、凝胶成像分析仪(美国 Alpha Innotech 公司)、荧光定量 PCR 反应扩增仪和酶标仪(Model 550 version 2.24, 美国 Bio-Rad 公司)、DU800 核酸/蛋白检测仪(美国 Beckman Coulter 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及分组 将 HaCaT 细胞和 A431 细胞以每孔 5×10^3 个接种于 96 孔板,在 5% CO₂, 37 °C 的细胞培养箱中,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 液培养 24 h 至贴壁。按以下分组要求向细胞培养液中添加 TGF- β 1 后换液培养:(1)浓度组,按 TGF- β 1 终浓度 0、5、10、20、100 ng/mL 分为 5 组,持续作用 48 h。(2)时间组,TGF- β 1 终浓度为 20 ng/mL 时,分别作用 12、24、48、72 h。另设空白对照。每组设 6 个复孔,结果重复检测 3 次。

1.3.2 MTT 法检测 TGF- β 1 对细胞增殖的影响 将 50 μ L MTT 溶液加入各孔,继续培养 4 h 后弃上清液。加入 DMSO 液 150 μ L,充分震荡溶解后于 490 nm 处测定各孔吸光度值($A_{490 \text{ nm}}$),计算细胞活性率。

1.3.3 RT-PCR 测定 TGF- β 1 对细胞中 TGF- β 受体

mRNA 表达的影响 分别将培养好的人皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞和 HaCaT 细胞进行 RNA 提取,并对各自 RNA 样本的纯度和浓度进行检测。按照 PrimeScript[™] RT Reagent Kit 说明中的具体操作步骤进行反转录反应。严格按照试剂盒操作说明配制相应的反应体系。扩增条件:95 °C 10 s,95 °C 5 s,60 °C 30 s,72 °C 45 s,共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。

1.4 统计学处理 应用 SPSS16.0 统计学软件对数据进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 相同作用时间下不同浓度的 TGF- β 1 对细胞增殖的影响 在作用时间相同的情况下,不同浓度的 TGF- β 1 对 HaCaT 细胞的增殖均能产生显著的抑制作用,见图 1,与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而在不同浓度的 TGF- β 1 对 A431 细胞的增殖无明显抑制作用,与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),这提示 TGF- β 1 对 A431 细胞产生的抑制作用不明显。

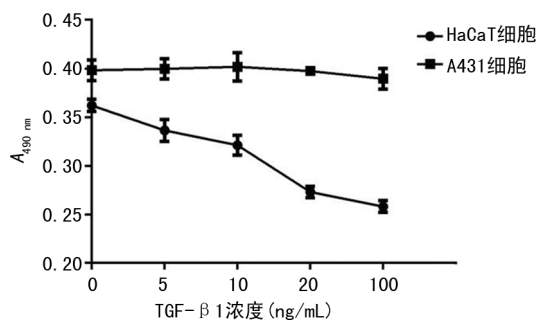


图 1 不同浓度 TGF- β 1 对 HaCaT 细胞和 A431 细胞增殖的影响(MTT 法)

2.2 相同浓度的条件下 TGF- β 1 不同作用时间对细胞增殖的影响 在 TGF- β 1 浓度均为 20 ng/mL 的情况下,分别作用不同时间,TGF- β 1 对 HaCaT 细胞的增殖产生了明显的抑制作用,见图 2,与对照组细胞相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而 TGF- β 1 对 A431 细胞增殖产生的抑制作用不明显,与对照组细胞相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 3。

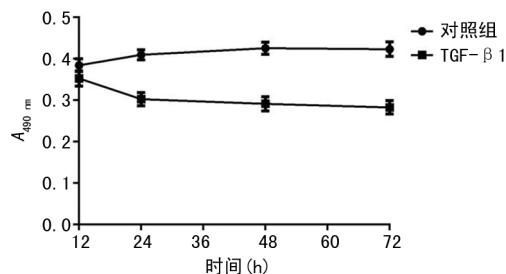


图 2 TGF- β 1 不同作用时间对 HaCaT 细胞增殖的影响

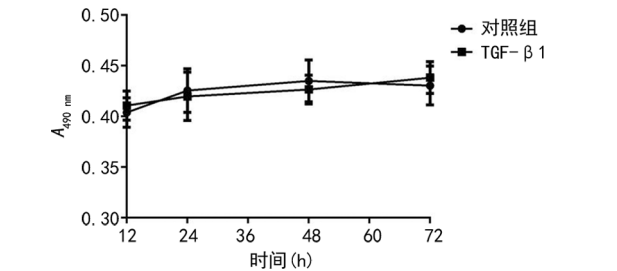


图 3 TGF-β1 不同作用时间对 A431 细胞增殖的影响

2.3 TGF-β1 对 HaCaT 细胞 TGF-β 受体 mRNA 表达的影响 在相同的作用时间下(均为 48 h),在一定浓度范围内,随着 TGF-β1 浓度的增加,HaCaT 细胞的 TGF-β 受体 I mRNA(TGF-βR I mRNA)、TGF-

β 受体 II mRNA(TGF-βR II mRNA)的表达呈下降趋势,见表 1。在 TGF-β1 浓度均为 20 ng/mL 时,HaCaT 细胞 TGF-βR I mRNA、TGF-βR II mRNA 的表达随着 TGF-β1 作用时间的延长呈下降趋势,见表 2。

2.4 TGF-β1 对 A431 细胞 TGF-β 受体 mRNA 表达的影响 在作用相同 48 h 条件下,在一定浓度范围内,随着 TGF-β1 浓度的增加,A431 细胞的 TGF-βR I mRNA、TGF-βR II mRNA 的表达逐渐下降,见表 3。在 TGF-β1 浓度均为 20 ng/mL 的条件下,A431 细胞中 TGF-βR I mRNA 的表达在一定时间范围内,随着 TGF-β1 作用时间的延长逐渐下降,见表 4。

表 1 不同浓度 TGF-β1 对 HaCaT 细胞 TGF-β 受体 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

TGF-β 受体 mRNA	5 ng/mL	10 ng/mL	20 ng/mL	100 ng/mL
TGF-βR I mRNA	0.743±0.028	0.623±0.023	0.594±0.013	0.654±0.026
TGF-βR II mRNA	0.452±0.021	0.386±0.021	0.334±0.016	0.282±0.018

表 2 TGF-β1 不同作用时间对 HaCaT 细胞 TGF-β 受体 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

TGF-β 受体 mRNA	12 h	24 h	48 h	72 h
TGF-βR I mRNA	0.651±0.027	0.461±0.045	0.291±0.042	0.376±0.022
TGF-βR II mRNA	0.724±0.045	0.646±0.035	0.344±0.027	0.451±0.031

表 3 不同浓度 TGF-β1 对 A431 细胞 TGF-β 受体 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

TGF-β 受体 mRNA	5 ng/mL	10 ng/mL	20 ng/mL	100 ng/mL
TGF-βR I mRNA	0.671±0.028	0.332±0.018	0.294±0.021	0.268±0.021
TGF-βR II mRNA	0.371±0.011	0.356±0.011	0.201±0.012	0.192±0.014

表 4 TGF-β1 不同作用时间对 A431 细胞 TGF-β 受体 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

TGF-β 受体 mRNA	12 h	24 h	48 h	72 h
TGF-βR I mRNA	0.631±0.025	0.352±0.022	0.309±0.018	0.217±0.028
TGF-βR II mRNA	0.668±0.031	0.554±0.014	0.371±0.018	0.291±0.021

3 讨 论

TGF-β 信号传导通路十分复杂,主要由 TGF-β 受体介导。TGF-β 受体分为 I 型受体(TGF-βR I)、II 型受体(TGF-βR II)和 III 型受体(TGF-βR III)^[3]。经典的 Smads 信号通路主要是由 TGF-β 与 TGF-βR II 的胞外段相结合后磷酸化激活 TGF-βR I,通过下游的 Smad4 蛋白完成 TGF-β 信号由细胞质转入细胞内的过程^[4]。TGF-βR III 因结构上不含激酶活性区,故不直接参与信号转导,主要起调节的作用^[5]。TGF-β/Smad 信号途径异常与多种上皮来源的恶性肿瘤密切相关,在乳腺癌、胃癌、前列腺癌、膀胱癌、子宫内膜癌及宫颈癌等肿瘤中均存在 TGF-β 的过度表达;在人的头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、食管鳞状细胞癌(ESCC)和皮肤鳞状细胞癌中也存在 TGF-β1 过

表达的情况^[6]。TGF-β 在肿瘤细胞中过度表达,不仅可以直接影响肿瘤细胞的浸润和转移,还能刺激血管生长,起到促进肿瘤发展的作用^[7]。TGF-β 对肿瘤的直接影响可以通过 Smads 依赖途径或干扰 Smads 依赖途径介导完成,除经典的 Smads 信号通路外^[8-9],还有其他非经典的不依赖于 Smads 蛋白信号通路的交互作用,如 MAPK 信号通路,它包括 ERK、JNK、p38、MAP 激酶等^[10-11]。

对于大部分上皮细胞来源的恶性肿瘤而言,TGF-β1 主要通过抑制肿瘤细胞的增殖,诱导细胞生长停滞和凋亡来发挥作用^[3]。但也有研究者观察到,部分肿瘤细胞对 TGF-β 的抑制作用不敏感,可以逃避 TGF-β 介导的生长抑制作用,这可能与肿瘤细胞表面 TGF-β 受体的表达异常有关,同时,TGF-β 介导的抑

制作用与 TGF- β R I 或者 TGF- β R II 的表达密切相关,在人类 ESCC 中,约 53.8% 的患者表现出 TGF- β R I 的表达降低,这与肿瘤的侵袭深度、转移和病理分期有关^[12]。在人小细胞肺癌细胞系中,HOUGAARD 等^[13]发现 TGF- β R II 的表达明显降低。此外,编码 TGF- β 受体和 Smads 的基因耗竭或突变会导致小鼠模型自发性肿瘤的发生,且与人类癌症的不良存活率相关^[14]。如果两种受体的表达存在缺陷,或者其中一种存在表达缺陷,就可能直接导致其抑制增殖的作用丧失。在 HNSCC 患者中也发现,在细胞恶性转化过程中,TGF- β R I 发生突变的概率较小,但 70% 以上的患者会出现 TGF- β R II 表达的降低或消失^[15]。TGF- β R II 耗竭可以使内源性 TGF- β 1 的表达增加,由此产生的 TGF- β 1 过度表达可能会增加血管生成和炎症反应,从而促进 HNSCC 中肿瘤的进展^[14]。TGF- β R II 发生突变的概率较大,较多见。研究表明,在口腔鳞状细胞癌(OSCC)患者中 TGF- β R II 表达出现降低或消失,在晚期 OSCC 患者中,TGF- β R II 的 E221V/N238I 突变可增强 TGF- β 信号传导、导致更具侵入性的表型改变^[16]。TGF- β R II 的缺陷与 SCC 的病情进展密切相关。

本研究也发现,在一定剂量和作用时间范围内,TGF- β 1 对 HaCaT 细胞增殖的抑制作用十分明显;而在 A431 细胞中,TGF- β 1 的抑制作用却不显著。当 TGF- β 1 作用后,在 A431 细胞和 HaCaT 细胞中均出现了 TGF- β 受体 mRNA 表达水平的下降,说明与 HaCaT 细胞相比,TGF- β 1 对 A431 细胞的作用更加明显。TGF- β 受体是 TGF- β 信号传导的必要条件,如果 TGF- β 受体表达水平下降或缺失,会导致 TGF- β 信号下传受阻。由此推测,A431 细胞可能通过诱导 TGF- β 受体的表达下调,使得 TGF- β 信号下传受到阻碍,其抑制作用失效,使得表皮内环境稳态遭到破坏,导致皮肤肿瘤细胞的抑癌基因功能丧失,癌基因被激活,最终导致肿瘤的形成。

参考文献

- [1] PICKUP M, NOVITSKIY S, MOSES H L. The roles of TGF β in the tumour microenvironment [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(11): 788-799.
- [2] 张斌, 何威, 杨扬, 等. 体外培养人皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞 Smad2 和 Smad3 mRNA 的表达 [J]. *临床皮肤科杂志*, 2008, 37(5): 290-292.
- [3] MORIKAWA M, DERYNCK R, MIYAZONO K. TGF- β and the TGF- β family: Context-Dependent roles in cell and tissue physiology [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8(5): a021873.
- [4] WU F, WEIGEL K J, WANG X J. Paradoxical roles of TGF- β signaling in suppressing and promoting squamous cell carcinoma [J]. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*,

- 2017, 50(1): 1-8.
- [5] 陈玉红, 狄翠霞, 张倩婧, 等. TGF- β /Smads 信号传导通路在肿瘤中的作用 [J]. *生理科学进展*, 2018, 49(3): 187-192.
- [6] PASCHE B. Role of TGF- β in cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2001, 186(2): 153-168.
- [7] XU C, LU G, LI Q, et al. Selenium modulates MMP2 expression through the TGF β 1/Smad signalling pathway in human umbilical vein endothelial cells and rabbits following lipid disturbance [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2017, 42: 59-67.
- [8] VAN C A, MADEJ W, GARCIA D V A, et al. TGF β 1-induced SMAD2/3 and SMAD1/5 phosphorylation are both ALK5-kinase-dependent in primary chondrocytes and mediated by TAK1 kinase activity [J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, 19(1): 112.
- [9] DAI J, XU M, ZHANG X, et al. Bi-directional regulation of TGF- β /Smad pathway by arsenic: a systemic review and meta-analysis of in vivo and in vitro studies [J]. *Life Sci*, 2019, 220: 92-105.
- [10] NAKAMURA Y, HATTORI N, IIDA N, et al. Targeting of super-enhancers and mutant BRAF can suppress growth of BRAF-mutant colon cancer cells via repression of MAPK signaling pathway [J]. *Cancer Lett*, 2017, 402: 100-109.
- [11] WONGNOPPAVICH A, DUKAEW N, CHOONATE S, et al. Upregulation of maspin expression in human cervical carcinoma cells by transforming growth factor β 1 through the convergence of Smad and non-Smad signaling pathways [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(5): 3646-3652.
- [12] FUKAI Y, FUKUCHI M, MASUDA N, et al. Reduced expression of transforming growth factor-beta receptors is an unfavorable prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Inter J Cancer*, 2003, 104(2): 161-166.
- [13] HOUGAARD S, NORGAARD P, ABRAHAMSEN N, et al. Inactivation of the transforming growth factor beta type II receptor in human small cell lung cancer cell lines [J]. *Br J Cancer*, 1999, 79(7): 1005-1011.
- [14] SLATTERY M L, HERRICK J S, LUNDGREEN A, et al. Genetic Variation in the TGF-beta Signaling Pathway and Colon and Rectal Cancer Risk [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Pre*, 2011, 20(1): 57-69.
- [15] WHITE R A, MALKOSKI S P, WANG X J. TGFbeta signaling in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Oncogene*, 2010, 29: 5437-5446.
- [16] PARK I, SON H K, CHE Z M, et al. A novel gain-of-function mutation of TGF-beta receptor II promotes cancer progression via delayed receptor internalization in oral squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2012, 315: 161-169.