

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.20.005

鼻咽癌 ALDH1⁺ 细胞具有上皮细胞 - 间质转化的性质 *

吴爱兵¹ 邓旭斌² 杨志雄¹ 沈 湘¹ 黎明春¹ 李姝君¹ 吴昆鹏¹

(1 广东医学院附属医院肿瘤中心 广东 湛江 524000; 2 南方医科大学肿瘤研究所 广东 广州 515000)

摘要 目的:探讨鼻咽癌 ALDH1⁺ 细胞是否具有上皮细胞 - 间质转化的性质。**方法:**利用 ALDEFLUOR 试剂筛选鼻咽癌 ALDH1⁺ 细胞和 ALDH1⁻ 细胞, Transwell 及 Boyden 小室实验分析 ALDH1⁺ 细胞和 ALDH1⁻ 细胞的侵袭、迁移能力; 实时定量 PCR 及 Western blot 检测 E-cadherin、Vimentin、Snail 及 Twist 基因在 ALDH1⁺ 细胞和 ALDH1⁻ 细胞 mRNA 和蛋白表达水平。**结果:**与 ALDH1⁻ 细胞相比, ALDH1⁺ 细胞侵袭及迁移能力明显高于 ALDH1⁻ 细胞; 而且 ALDH1⁺ 细胞中 E-cadherin 的 mRNA 和蛋白水平明显低于 ALDH1⁻ 细胞, 相反, ALDH1⁺ 细胞中 Vimentin、Snail 及 Twist 的 mRNA 和蛋白水平明显高于 ALDH1⁻ 细胞。**结论:**鼻咽癌 ALDH1⁺ 细胞可能具有上皮 - 间质转化的性质, 这将为阐明肿瘤细胞在侵袭、转移中的机制提供理论基础。

关键词: 上皮细胞 - 间质转化; 乙醛脱氢酶 1; 鼻咽癌; 肿瘤干细胞

中图分类号: R739.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)20-3819-04

ALDH1 Positive Cells Posses the Properties of Epithelial-Mesenchymal Transition*

WU Ai-bing¹, DENG Xu-bin², YANG Zhi-xiong¹, SHEN Xiang¹, LI Ming-chun¹, LI Shu-jun¹, WU Kun-peng¹

(1 Cancer Center of Affiliated Hospital, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong, 524000, China;

2 Cancer Research Institute, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, 515000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of ALDH1-positive cells on the properties of epithelial Mesenchymal Transition.

Methods: The identification of ALDH1 activity from 5-8F and CNE2 cells using the Aldefluor assay (Stem Cell Technologies, Durham, NC, USA) was followed by fluorescence-activated cell sorting analysis. The ability of ALDH1-positive and ALDH1-negative cells to migrate and metastasize was detected by Transwell and Boyden in vitro. The expressions of E-cadherin, Vimentin, Snail and Twist were evaluated by real-time PCR and Western blot. **Results:** Compared with that in ALDH1-negative cells, ALDH1-positive cells showed higher invasion and metastasis activity. The expression of E-cadherin was lower in ALDH1-positive cells than

表达,但是在间质和癌巢边缘呈高表达,尤其在梭形肿瘤细胞表达最高。而且还发现 ALDH1 表达与 E-cadherin 的表达 ($R=-0.264$; $P=0.003$) 呈负相关,但与 Vimentin ($R=0.240$; $P=0.008$) 表达呈正相关,提示 ALDH1 可能与 EMT 相关^[1]。但是 ALDH1 与 EMT 的关系还不是清楚,本文将从细胞水平探讨鼻咽癌 ALDH1⁺ 细胞是否具有上皮细胞-间质转化的性质。

1 材料和方法

1.1 材料

鼻咽癌 5-8F 和 CNE2 细胞系由南方医科大学肿瘤研究所提供,Trizol 购于 takara 公司,逆转录试剂盒为 TIANGEN 公司 TIANScript RT Kit,SYBR Premix Ex TaqTM 荧光定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司,E-cadherin 抗体 (BD 公司)ALDH1 抗体(abcom 公司),Vimentin 抗体(BD 公司),GAPDH 抗体及二抗购于中杉金桥公司。RPMI1640 为美国 Invitrogen 公司产品。胎牛血清、蛋白裂解液、PVDF 膜购自广州斯佳公司,Transwell 小室购自美国 Corning 公司,Boyden 小室购自美国 Chemicon 公司。

1.2 方法

1.2.1 ALDH1⁺ 细胞的分选 取生长状态良好的细胞,用 PBS 液洗 3 次,0.25%胰酶消化,用 PBS 液再洗 2 次,加 ALDEFLUOR 缓冲液 1 mL,加 5 μ L ALDEFLUOR 反应剂,充分吹匀;取另一干净 EP 管,管中加 5 μ L DEAB 的 ALDEFLUOR 反应抑制剂,将加了 ALDEFLUOR 反应剂的细胞悬液 500 μ L 加到加了 5 μ L DEAB EP 管中,充分吹匀,在 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中孵育约 40 分钟,离心 1000 $\times$ g,1min,加 ALDEFLUOR 缓冲液 200 μ L,应用流式细胞仪分选 ALDH1⁺ 细胞和 ALDH1⁻ 细胞。

1.2.2 Transwell 小室细胞运动实验 利用 ALDEFLUOR 试剂分选 5-8F 和 CNE2 细胞的 ALDH1⁺ 细胞和 ALDH1⁻ 细胞,0.25%胰酶消化后制成单细胞悬液,PBS 液再洗 3 次,细胞计数,调整细胞浓度为 1×10^6 /mL。加 100 μ L 细胞悬液于内室,然后加 500 μ L 含 10%胎牛培养基置于小室的下室,在 37 $^{\circ}$ C 培育 12 小时。取出小室,用棉签擦掉未穿过膜的细胞,甲醇固定 10 min,倒掉甲醇后空气干燥,用苏木素染液染色 5 min,用水轻轻冲洗数次,空气中风干。显微镜下随机选取 5 个高倍视野计数穿过膜的细胞数,实验重复 3 次。

1.2.3 Boyden 小室体外侵袭实验 利用 ALDEFLUOR 试剂分选 5-8F 和 CNE2 细胞的 ALDH1⁺ 细胞和 ALDH1⁻ 细胞,0.25%

胰酶消化后制成单细胞悬液,PBS 液再洗 3 次后,细胞计数,调整细胞浓度为 $1 \$

迁移能力更强。同样,我们利用 Boyden 侵袭实验检测 ALDH1⁺ 细胞和 ALDH1⁻ 细胞侵袭能力,ALDH1⁺ 细胞穿过基质胶的细胞数显著 ($110.33 \pm 3.51; 105.0 \pm 4.0$ vs $31.33 \pm 3.06; 26.0 \pm$

$4.58, P=0.000$), 其侵袭能力更强(图 2)。这提示,ALDH1⁺ 细胞具有更强的迁移及侵袭能力。

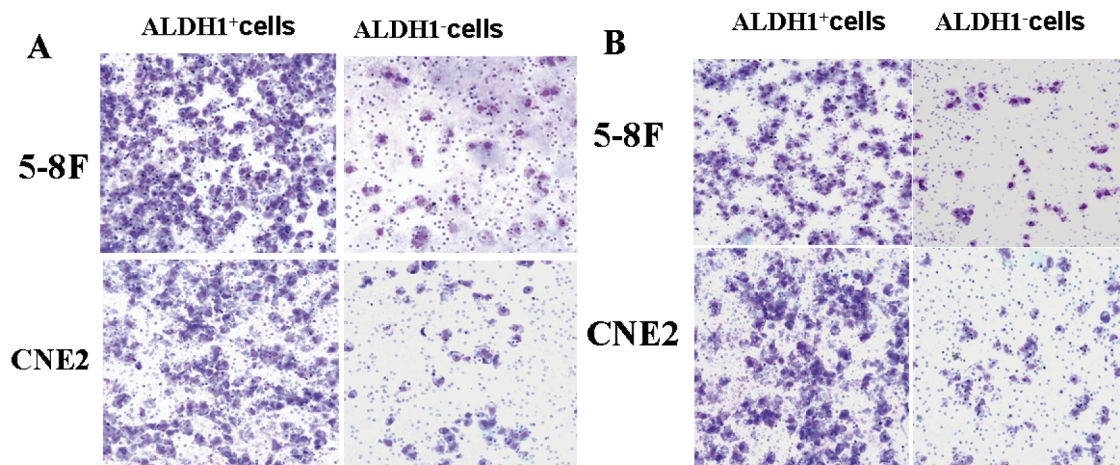


图 2 Transwell 小室和 Boyden 小室分析 ALDH1⁺ 细胞和 ALDH1⁻ 细胞的迁移及侵袭能力。A: Transwell 小室实验; B: Boyden 小室实验
Fig.2 The migrating and metastasis capability of ALDH1-positive and ALDH1-negative cells was examined by Transwell and Boyden chamber assay.

A: Transwell chamber assay; B: Boyden chamber assay

2.2 实时定量 PCR 和 Western blot 检测 E-cadherin、Vimentin、Snail 及 Twist 基因在 ALDH1⁺ 细胞和 ALDH1⁻ 细胞的 mRNA 的蛋白水平

本研究利用 Real-time PCR 检测 E-cadherin、Snail、Vimentin 及 Twist 基因在 ALDH1⁻ 细胞和 ALDH1⁺ 细胞的 mRNA 表达水平发现, E-cadherin 在 ALDH1⁺ 细胞的表达低于 ALDH1⁻ 细胞, 相反, Vimentin、Snail 及 Twist 在 ALDH1⁺ 细胞的表达高于 ALDH1⁻ 细胞 (图 3)。我们利用 Western blot 检测 E-cadherin、Vimentin、Snail 及 Twist 在 ALDH1⁺ 细胞和 ALDH1⁻ 细胞的蛋白水平发现, E-cadherin 在 ALDH1⁺ 细胞的表达也低于 ALDH1⁻ 细胞, 相反, Vimentin、Snail 及 Twist 在 ALDH1⁺ 细胞的蛋白表达高于 ALDH1⁻ 细胞, 这说明 ALDH1⁺ 细胞可能具有 EMT 的性质(图 4)。

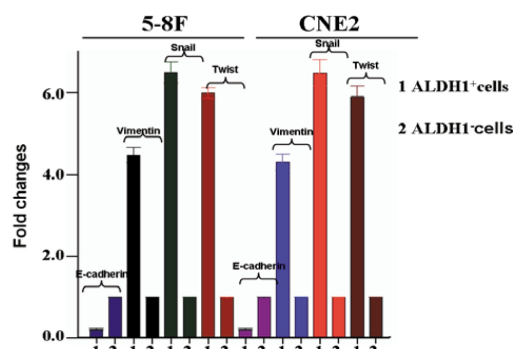


图 3 荧光定量 PCR 检测 E-cadherin、Vimentin、Snail 及 Twist 在 ALDH1⁺ 细胞和 ALDH1⁻ 细胞中的表达

Fig.3 The expression of E-cadherin, Vimentin, Snail and Twist was examined in ALDH1⁺ cells and ALDH1⁻ cells by Real-time PCR

3 讨论

鼻咽癌是一种主要发生在东南亚,尤其是中国南方地区恶性肿瘤疾病(尤其广东),发病率达20/10万,但在欧洲、美洲鼻咽癌发病率在极低,属于罕见的肿瘤^[7]。虽然放疗及化疗技术有了很大的发展,但仍有一部分患者出现转移和复发,其主要原因可能是肿瘤干细胞导致。

近年来,研究发现 EMT 产生的细胞具有干细胞性质。Weinberg 等首先发现在诱导人永生乳腺上皮细胞(HMLEs)为 EMT 过程中^[4],诱导产生的细胞除获得抗凋亡能力外,还表达干细胞的标记物,而且具有很强的肿瘤球形成能力,首次提出 EMT 产生的细胞可能具有干细胞的性质。Shimono 等发现 miR-200c 能强烈抑制正常乳腺干细胞的形成乳腺导管能力和乳腺干细胞的肿瘤形成能力^[5]。miR-200a 也可通过下调 ZEB2 抑制 CD133/1+ 卵巢癌细胞^[6]。而 miR-200 家族可通过直接靶向抑制 ZEB1/ ZEB2 的表达,进而增加 E-cadherin 的表达,阻止 EMT 的发生^[9]。Morel 等进一步证明在乳腺癌中 EMT 产生的肿瘤细胞具有干细胞的性质^[6]。Lou 等利用免疫组化技术发现在鼻咽癌组织中梭型样鼻咽癌细胞具有 EMT 的特性^[20],同时还发现 E-cadherin 的表达与 β -catenin、vimentin、bronectin、Slug 和 ALDH1 呈负相关,而 ALDH1 作为鼻咽癌干细胞功能性标记物,说明 EMT 与干细胞具有密切关系。但是肿瘤干细胞是否具有 EMT 的性质不是很清楚,为研究 ALDH1⁺ 细胞是否具有 EMT 的性质,本研究首先利用 Transwell 迁移和 Boyden 侵袭实验分析 ALDH1⁺ 细胞的迁移及侵袭能力发现,ALDH1⁺ 细胞迁移及侵袭能力显著高于 ALDH1⁻ 细胞,这与以前的研究结果一致^[10]。随后,利用实时定量 PCR 和 Western blot 检测 E-cadherin、Vimentin、Snail 及 Twist 在 ALDH1⁺ 细胞和 ALDH1⁻ 细胞的 mRNA 和蛋白水平发现,E-cadherin 在 ALDH1⁺ 细胞中的表达明显低于 ALDH1⁻ 细胞;相反,Vimentin、Snail 及 Twist 在 ALDH1⁺ 细胞中的表达明显高于 ALDH1⁻ 细胞。这也我们以前在组织中的研究结果一致^[10],这都揭示 ALDH1⁺ 细胞可能具有 EMT 的性质。

总之,与 ALDH1⁻ 细胞相比,ALDH1⁺ 细胞具有更强的迁移、侵袭能力,并且与 ALDH1⁻ 细胞相比,E-cadherin 在 ALDH1⁺ 细胞中的低表达,而 Vimentin、Snail 及 Twist 在 ALDH1⁺ 细胞中的高表达,ALDH1⁺ 细胞与 EMT 具有相关性,可能具有 EMT 的性质,这将阐明鼻咽癌的侵袭、转移机制提供理论基础。

参考文献(References)

- [1] Duester G, Mic FA, Molotkov A. Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid[J]. Chem Biol Interact, 2003, 143-144: 201-210
- [2] Pearce DJ, D Taussig, C Simpson, et al. Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples[J]. Stem Cells, 2005, 23(6): 752-760
- [3] Ginestier C, Hurm H, Charafe J, Auffret E, et al. ALDH1A1 is a marker of normal and malignant human mam