

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 试剂分选鼻咽癌 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 that in ALDH1-negative cells, in contrast, the expression of Vimentin, Snail and Twist were higher in ALDH1-positive cells than that in ALDH1-negative cells. **Conclusion:** ALDH1 positive cells may have the properties of epithelial-mesenchymal transition. It will provide a new experimental theoretical basis for invasion and metastasis of nasopharyngeal carcinoma.

Key words: Epithelial-Mesenchymal Transition; ALDH1; Nasopharyngeal carcinoma; Cancer Stem Cell

Chinese Library Classification(CLC): R739.6 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2014)20-3819-04

前言

肿瘤干细胞(Cancer Stem Cell)是肿瘤组织中存在一种数量极少的肿瘤细胞,这类细胞具有无限增殖、自我更新的能力和多向分化潜能,是转移和复发的根源。乙醛脱氢酶 1 (aldehyde-dehydrogenase Class 1, ALDH1)是细胞内乙醛氧化的解毒酶,它广泛分布于人体的各种组织中,通过参与氧化视黄醇为视黄酸,参与基因的表达和组织分化^[1]。近年来,研究发现 ALDH1 可作为白血病^[2]、乳腺癌^[3]、肺癌^[4,5]、头颈部癌^[6]、视网膜母细胞瘤^[7]、前列腺癌^[8]、结肠癌^[9]及胰腺癌^[10]等肿瘤干细胞的功能性标记物。Wu 等首次证明 ALDH1 可作为鼻咽癌干细胞的功能性标记物^[11],鼻咽癌 ALDH1⁺ 细胞具有自我更新、增殖、侵袭、

转移能力及高成瘤能力。

上皮细胞 - 间质转化(Epithelial-Mesenchymal Transition, E-MT)是上皮细胞失去极性,获得浸润性和游走迁移能力、转变成具有间质细胞形态和特性的细胞过程。近年来,越来越多的证据证明上皮细胞 - 间质转化与肿瘤的侵袭、转移相关^[12,13]。目前认为 EMT 参与肿瘤的侵袭、转移而引起肿瘤复发,而导致这种后果的主要原因可能是 EMT 产生的细胞具有干细胞的性质。Weinberg 首先在实验中发现 EMT 产生的细胞具有干细胞的性质^[14],随后, Shimono 也证明了 EMT 与干细胞有密切相关^[15]。Morel 进一步证实了在乳腺癌中 EMT 产生的肿瘤细胞具有干细胞的性质^[16]。本研究应用免疫组化方法检测了 ALDH1 蛋白在鼻咽癌组织中的表达发现,ALDH1 蛋白在鼻咽癌细胞呈低

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81201672);湛江市科技攻关计划(2012C3104032)

作者简介:吴爱兵(1980-),男,博士,住院医师,主要研究方向:肿瘤干细胞,电话:13828253162,

E-mail:wab801016@163.com

(收稿日期:2013-12-15 接受日期:2014-01-12)

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°C 水浴锅中孵育约 40 分钟,离心 1000 $\times g$,1 min,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 \times 10⁶/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°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 \times 10⁶/mL。小心吸出内室中培养基后,加 200 μ L 细胞悬液于内室,然后加 500 μ L 含 10% 胎牛培养液于小室下室,在 37°C 培育 16 h。取出小室,用棉签轻轻擦掉未穿过膜的细胞,甲醇固定 15 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,空气风干。显微镜下随机选取 5 个高倍视野计数穿过 ECMatrix 膜的细胞数。实验重复 3 次。

1.2.4 荧光定量 PCR 从培养细胞中用 TRIzol (Invitrogen) 提取总 RNA,并且利用 oligo (dT) 引物反转录成 cDNA,进一步通过基因特异性引物:ARF5:上游 5'-ATCTGTTCACAGTCT GG-GACG-3';下游 5'-CCTGCTGGCAAATACC-3';E-cadherin:上游 5'-GACCTTCGAGACAATGTCCTCAAC-3';下游 5'-CATAGATGAGGGCTGTGTCGTA-3';Vimentin:上游 5'-GCCAGTCTCACCTTCAAC-3';下游 5'-CTACACAGCAGC-CAGATTCC-3';Snail:上游 5'-CCACTATGCCCGCTCTTT-3';下游 5'-TCAGCGGGACATCCTGAGCA-3';Twist:上游 5'-GCCAGGTACATCGACTTCCTCAC-3';下游 5'-CCTCCATC-CTCCAGACCGAGAA-3' 和 2X SYBR-Green Master Mix(DBI Bioscience,Shanghai,China) 进行荧光定量 PCR 检测。

1.2.5 蛋白免疫印迹 利用 ALDEFLUOR 试剂分选 5-8F 和 CNE2 细胞的 ALDH1⁺ 细胞和 ALDH1⁻ 细胞,提取蛋白,配制 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶,并加入 50 μ g 蛋白进行电泳。电泳结束后,转移蛋白至 PVDF 上。3% 牛血清白蛋白封闭后,分别加入 E-cadherin、Vimentin、Snail 及 Twist 抗体和 GAPDH 抗体进行孵育。然后用二抗进行孵育,用奥德赛条带扫描仪扫描蛋白条带。

1.3 统计学方法

各指标以均值 \pm 标准差 ($M \pm SD$) 来表示,采用 SPSS13.0 统计软件处理,两组采用独立 T 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ALDH1⁺ 细胞的迁移、侵袭能力

利用 ALDEFLUOR 试剂分选鼻咽癌 5-8F 和 CNE2 细胞的 ALDH1⁺ 细胞和 ALDH1⁻ 细胞(图 1),采用 Transwell 迁移实验检测 ALDH1⁺ 细胞和 ALDH1⁻ 细胞在体外的迁移能力,结果发现,与 ALDH1⁻ 细胞相比,ALDH1⁺ 细胞穿过膜的细胞数更多 (114.33 ± 5.0 ; 110.33 ± 4.72 vs 31.33 ± 2.51 ; 32.0 ± 2.65 , $P=0.000$),其

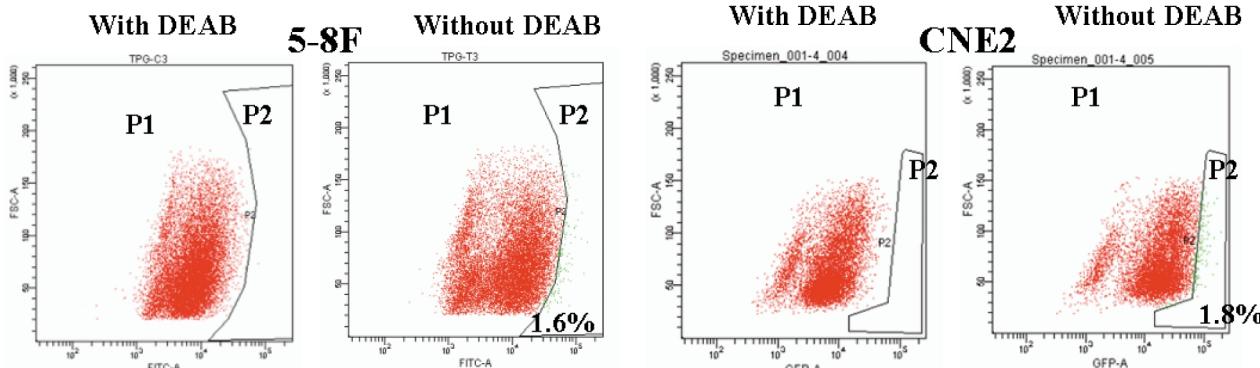


图 1 ALDEFLUOR 试剂分选 5-8F 和 CNE2 细胞的 ALDH1⁺ 细胞和 ALDH1⁻ 细胞

Fig.1 Analyzing and sorting ALDH1-positive and ALDH1-negative cells from 5-8F and CNE2 cell lines via FACS

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 ± 3.51 ; 105.0 ± 4.0 vs 31.33 ± 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。

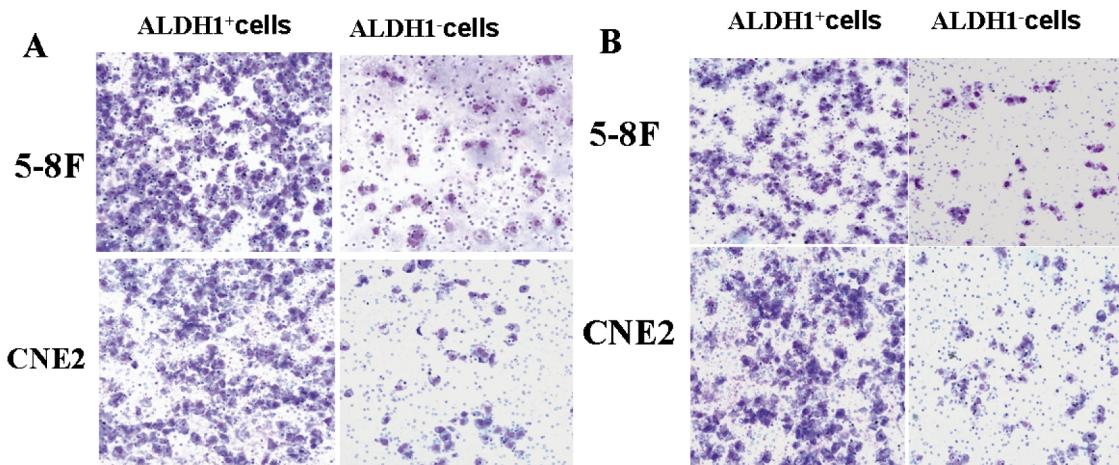


图 2 Transwell 小室和 Boyden 小室分析 ALDH1⁺ 细胞和 ALDH1⁻ 细胞的迁移及侵袭能力。A: Transwell 小室实验; B: Boyden 小室实验
Fig.2 The migrating and metastasis capability of ALDH1-positive and ALDH1-negative cells was examined by Transwell and Boyden chamber assay.

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)。

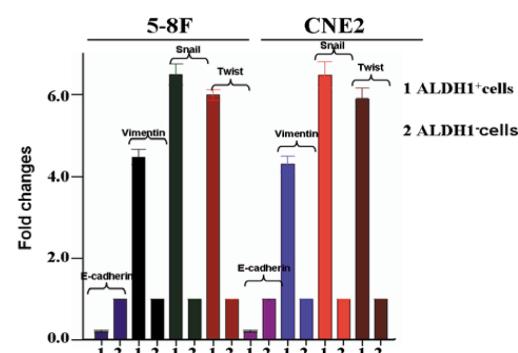


图 3 荧光定量 PCR 检测 E-cadherin、Vimentin、Snail 及 Twist 在 ALDH1⁺ 细胞和 ALDH1⁻ 细胞中的表达
Fig.3 The expression of E-cadherin, Vimentin, Snail and Twist was examined in ALDH1⁺ cells and ALDH1⁻ cells by Real-time PCR

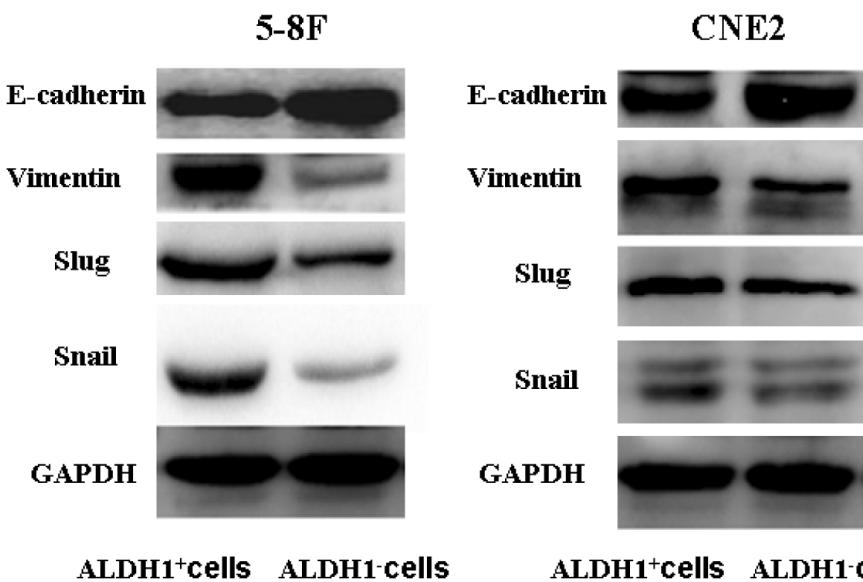


图 4 Western bolt 检测 E-cadherin、Vimentin、Snail 及 Twist 在 ALDH1⁺ 细胞和 ALDH1⁻ 细胞中的表达

Fig.4 The expression of E-cadherin, Vimentin, Snail and Twist was examined in ALDH1⁺ cells and ALDH1⁻ cells by Western bolt

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^[17]。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化乳腺上皮细胞(HMLEs)为EMT过程中^[14],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^[15]。miR-200a也可通过下调ZEB2抑制CD133/1+卵巢癌干细胞^[18]。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^[19]。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^[16]。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 mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome[J]. Cell Stem Cell, 2007, 1(5): 555-567
- [4] Ucara D, Coglea CR, Zucali JR, et al. Aldehyde dehydrogenase activity as functional marker for lung cancer[J]. Chem Biol Interact, 2009, 178(1-3): 48-55
- [5] Jiang F, Qiu Q, Khanna A, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer [J]. Mol Cancer Res, 2009, 7(3): 330-338
- [6] Chen YC, Chen YW, Hsu HS, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 385(3):307-313
- [7] Seigel GM, Campbell LM, Narayan M, et al. Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma[J]. Mol Vis, 2005, 11: 729-737
- [8] Li T, Su Y, Mei Y, et al. ALDH1A1A1 is a marker for malignant Prostate stem cells and predictor of prostate cancer patients' outcome [J]. Lab Invest, 2010, 90(2): 234-244
- [9] Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, et al .Aldehydedehydrogenase1 Is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks S Cover population during colon tumorigenesis[J]. Cancer Res, 2009, 69(8): 3382-3389
- [10] Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells[J]. Cancer Res, 2007, 67(3): 1030-1037
- [11] Wu A, Luo W, Zhang Q, et al. Aldehyde dehydrogenase 1, a functional marker for identifying cancer stem cells in human nasopharyngeal carcinoma [J]. Cancer Lett, 2013, 330(2): 181-189
- [12] Cardiff RD. Epithelial to mesenchymal transition tumors: fallacious or snail's pace?[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11 (24 Pt 1): 8534-8537
- [13] Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition?[J]. Cancer Res, 2005, 65(14): 5991-5995
- [14] 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
- [15] Shimono Y, Zabala M, Cho RW, et al. Downregulation of miRN-A-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells[J]. Cell, 2009, 138(3): 592-603
- [16] Morel AP, Lievre M, Thomas C, et al. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition [J]. PLoS One, 2008, 3(8): e2888
- [17] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J. Clin, 2011, 61(2): 69-90
- [18] Wu Q, Guo R, Lin M, et al. MicroRNA-200a inhibits CD133/1+ovarian cancer stem cells migration and invasion by targeting E-cadherin repressor ZEB2[J]. Gynecol Oncol, 2011, 122(1): 149-154
- [19] Korpal M, Lee ES, Hu G, et al. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2 [J]. J Biol Chem, 2008, 283(22): 14910-14914
- [20] Luo WR, Chen XY, Li SY, et al. Neoplastic spindle cells in nasopharyngeal carcinoma show features of epithelial-mesenchymal transition[J]. Histopathology, 2012, 61(1): 113-122