

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.30.003

血清应答因子在食管鳞癌细胞侵袭转移中的作用*

杨 蕾¹ 薛 琳² 陈景荷² 赵国宏² 苏 捷¹ 张德新^{2△}

(1 宝鸡市第二人民医院 陕西 宝鸡 721000; 2 第四军医大学西京消化病医院肿瘤生物学国家重点实验室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究血清应答因子(serum response factor, SRF)在人食管鳞癌细胞体外侵袭转移中的意义。**方法:**选用 EC9706-H、EC9706-L 和 EC109-H、EC109-L 两对高低转移细胞系,采用细胞划痕实验验证食管鳞癌高低转移细胞系体外侵袭转移能力的差异;Western blot 检测 SRF 在两对食管鳞癌高低转移细胞系中的差异表达;在 EC9706-H、EC109-H 细胞中加入 CCG (SRF 抑制剂)抑制 SRF 的表达后,检测其侵袭转移能力的变化。**结果:**细胞划痕实验验证了两对食管鳞癌高低转移细胞系侵袭转移能力的差异;Western blot 结果提示 SRF 在 EC9706-H、EC109-H 细胞中的表达水平显著高于 EC9706-L、EC109-L 细胞;在 EC9706-H、EC109-H 细胞中加入 CCG 抑制 SRF 的表达后,其侵袭转移能力明显减退。**结论:**SRF 在高转移性食管鳞癌细胞系中呈现高表达,在低转移性食管鳞癌细胞系中呈现低表达,抑制高转移性食管鳞癌细胞系中 SRF 的表达后,其侵袭转移能力下降,提示 SRF 和食管鳞癌的侵袭转移能力呈正相关。

关键词:食管鳞癌;SRF;侵袭;转移

中图分类号:R735.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)30-5810-04

The Effect of SRF on the Invasion and Metastasis of Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma*

YANG Lei¹, XUE Lin², CHEN Jing-he², ZHAO Guo-hong², SU Jie¹, ZHANG De-xin^{2△}

(1 Baoji City Second People's Hospital, Baoji, Shaanxi, 721000, China;

2 Fourth Military Medical University Xijing Hospital of Digestive Diseases State Key Laboratory of Cancer Biology, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: The aim of this study was to investigate the in vitro effect of serum response factor (SRF) on the invasion and migration of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) in vitro. **Methods:** The invasion and migration of ESCC cell lines were detected by scratch assays. The expression of SRF in ESCC cell lines were measured by western blot. CCG was used to suppress the expression of SRF in highly invasive cells of ESCC. **Results:** There were differences with the invasion and migration in the ESCC cell lines. The expression of SRF in highly invasive cells of ESCC was higher than the matched lowly invasive cells. After treatment with CCG, the invasion and migration of highly invasive cells were obviously decreased. **Conclusion:** The expression level of SRF may be positively correlated to the invasion and migration of ESCC cell lines, and SRF may be a novel molecular marker for the prediction of migration, diagnosis and therapy of ESCC.

Key words: Esophageal squamous cell carcinoma; SRF; Invasion; Metastasis

Chinese Library Classification(CLC): R735.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)30-5810-04

前言

食管癌是世界常见的消化道肿瘤,我国食管癌死亡率为15.15/10万人^[1],5年生存率仅5%~10%,其95%左右的临床病理学特征为鳞癌^[2]。食管鳞癌患者早期即可发生侵袭转移,因此对其侵袭转移机制的研究是目前研究热点^[3]。血清应答因子(serum response factor, SRF)是一个重要的转录因子,调控细胞的增殖、分化和凋亡过程中多种基因的表达^[4],在肿瘤进展过程中扮演了重要角色,其过表达可促进肿瘤细胞的侵袭转移。最近研究表明 SRF 在食管鳞癌组织中呈异常高表达^[5,6],因此推测 SRF 可能在食管鳞癌的发生和侵袭转移中起到重要的调节作用。本实验旨在通过细胞划痕、Western blot 检测 SRF 在食管鳞癌细胞中的表达水平及其与侵袭转移能力的关系,探讨 SRF 在食管鳞癌发生发展中的作用,为进一步深入研究食管鳞癌侵

袭转移机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 由第四军医大学肿瘤生物国家重点实验室保存的 EC9706-H、EC9706-L、EC109-H、EC109-L 食管鳞癌细胞系,是利用 EC9706、EC109 亲本细胞通过反复 Transwell 实验建立的食管鳞癌高低转移潜能细胞系^[7]。

1.1.2 试剂 SRF 兔抗人多克隆抗体购于美国 Santa 公司;β-actin 抗体购于 Sigma 公司;CCG 购于北京 Cayman 公司;胎牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司;高糖 DMEM 细胞培养液购于美国 Gibco 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 本实验选用对数生长期的细胞。细胞接种于含

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81272347)

作者简介:杨蕾(1979-),女,硕士研究生,主治医师,消化道肿瘤,电话:13772700276

△通讯作者:张德新,副教授, E-mail: dx66@163.com

(收稿日期:2014-03-10 接受日期:2014-04-08)

10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养液中,在 37℃ 5%CO₂ 加湿细胞培养箱内培养。

1.2.2 细胞划痕实验检测细胞系侵袭转移能力 取对数生长长期的细胞 4×10^5 个接种到 6 孔板中,用含有 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液培养,贴壁过夜。当细胞密度达 90% 左右时,弃去培养液,用 200 μ L 移液器的枪头沿培养板底部做“一”字划痕,用 PBS 洗涤细胞,重新加入培养液,37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。培养 0h、24h 倒置显微镜观察并拍照,观察细胞划痕区愈合情况。每组设 3 个平行样本,取均值,用 ImageTool 软件计算愈合面积。愈合率 = (初始划痕宽度值 - 现划痕宽度值) / 初始划痕宽度值 $\times$ 100%。

1.2.3 Western blot 检测 SRF 蛋白的表达 选取科里 EC109 和 EC9706 细胞系中的高低转移细胞亚系 EC109-H、EC109-L 和 EC9706-H、EC9706-L,分别提取总蛋白。以 EC9706-L、EC109-L 为对照组,EC9706-H、EC109-H 为实验组。进行 SDS—PAGE 电泳分离,然后电转至硝酸纤维素膜(NC 膜),丽春红染色,剪膜后洗去丽春红,用含 10%脱脂奶粉的 PBS 室温封闭 NC 膜 1h,加兔抗人 SRF 多克隆抗体(1:100)4℃ 封闭过夜;PBS 洗膜 3 次后,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG(工作浓度 1:2000)二抗,37℃ 封闭 1h;用 PBS 洗膜 3 次,每次 8min 后,在 BIO-RAD 凝胶成像系统中进行显色反应。重复 3 次实验,用 Quantity one 软件进行灰度值结果分析。

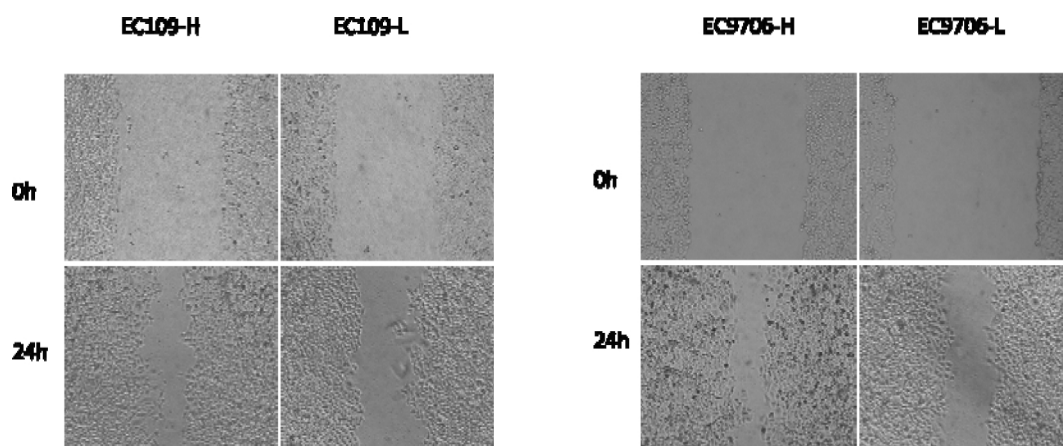


图 1 食管细胞 EC109-L、EC109-H、EC9706-L、EC9706-H 转移能力强弱差异 ($\times 40$)

Fig.1 The different invasive and metastatic potential in ESCC cell lines ($\times 40$)

2.2 SRF 在食管癌高低细胞中蛋白表达差异

Western-blot 结果显示了在 EC109-H 高转移细胞中 SRF 的蛋白表达(2.098 ± 0.095),明显高于 EC109-L 低转移细胞系的蛋白表达(1.081 ± 0.074),差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。在高

1.2.4 检测抑制细胞中 SRF 后细胞侵袭转移能力的变化 常规培养 EC9706-H、EC109-H 细胞,取对数生长长期的细胞接种于 10 cm 皿中,分为对照组、实验组。细胞贴壁后实验组中加入 0.5 mg/mL 的 CCG 药物处理,48 小时后分别提取蛋白,行 Western blot 检测实验组及对照组中 SRF 的表达量,实验步骤同上。取对数生长长期的 EC9706-H、EC109-H 细胞各 4×10^5 个,分别接种到 6 孔板中,贴壁过夜。当细胞密度达 90% 左右时,弃去培养液,做细胞划痕,重新加入培养液,并分 2 组,实验组及对照组,实验组中加入 CCG 0.5 mg/mL,对照组中加入等量的 PBS,37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养 0h、24h 后,倒置显微镜观察并拍照,观察细胞划痕区愈合情况。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件包处理数据,Wilcoxon rank sum test 用于灰度值统计分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 食管癌高低细胞系侵袭能力的比较

细胞划痕结果显示食管癌高转移细胞 EC109-H (0.695 ± 0.103)较低转移细胞 EC109-L(0.419 ± 0.055)转移能力显著升高 ($P < 0.05$);高转移细胞 EC9706-H(0.763 ± 0.021)较低转移细胞 EC9706-L(0.567 ± 0.025)转移能力显著升高 ($P < 0.01$),(图1)。

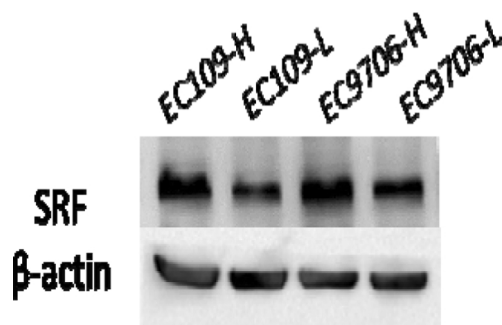
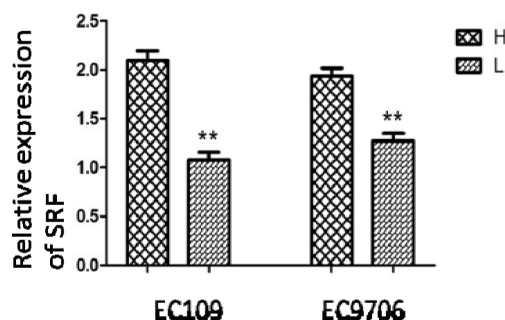


图 2 SRF 在食管癌高低转移细胞系 EC109-L、EC109-H、EC9706-L、EC9706-H 中的表达差异

Fig.2 The different expression levels of SRF in ESCC cell lines

转移细胞 EC9706-H 中,SRF 的蛋白表达为 (1.937 ± 0.080),明显高于低转移细胞 EC9701-L(1.274 ± 0.076),差异有统计学意义 ($P < 0.01$)(图 2)。



2.3 加入 CCG 后 SRF 在食管癌高转移细胞系中蛋白表达变化

Western-blot 结果显示了在对照组 EC109-H 高转移细胞中 SRF 的蛋白表达(5.633 ± 0.463),明显高于加入 SRF 抑制剂实验组 EC109-H 转移细胞系的蛋白表达(2.543 ± 0.398),差异

有统计学意义($P < 0.01$)。在对照组高转移细胞 EC9706-H 中,SRF 的蛋白表达为(5.052 ± 0.501),明显高于加入 SRF 抑制剂实验组 EC9706-H(1.394 ± 0.228),差异有统计学意义($P < 0.01$)(图3)。

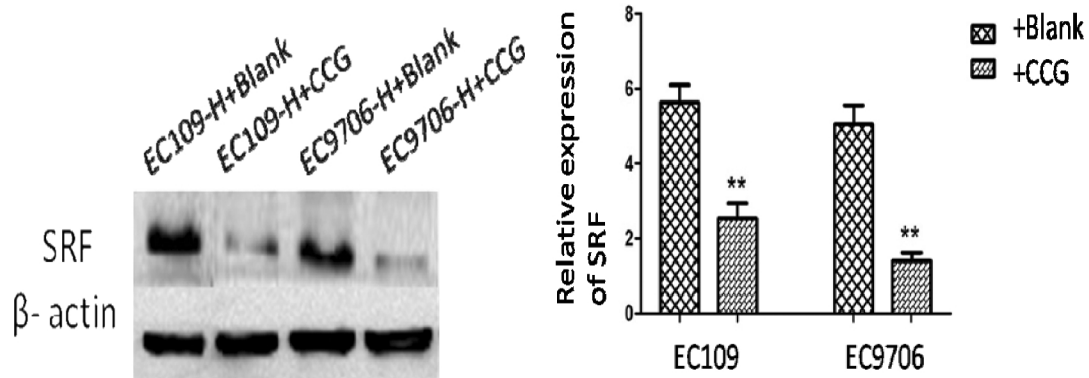


图3 SRF 在加入 CCG 后食管癌高低转移细胞系 EC109-H、EC9706-H 中的表达差异

Fig.3 The different expression level of SRF in ESCC cell lines after CCG treatment

2.4 抑制 SRF 表达后对食管癌细胞迁徙能力的影响

细胞划痕实验结果显示:划痕 24 小时后食管癌实验组高转移细胞 EC109-H (0.534 ± 0.077) 较对照组高转移细胞

EC109-H(0.795 ± 0.073)转移能力显著减少($P < 0.05$);实验组高转移细胞 EC9706-H (0.369 ± 0.123) 较对照组高转移细胞 EC9706-H(0.650 ± 0.064)转移能力显著减少($P < 0.05$)(图 4)。

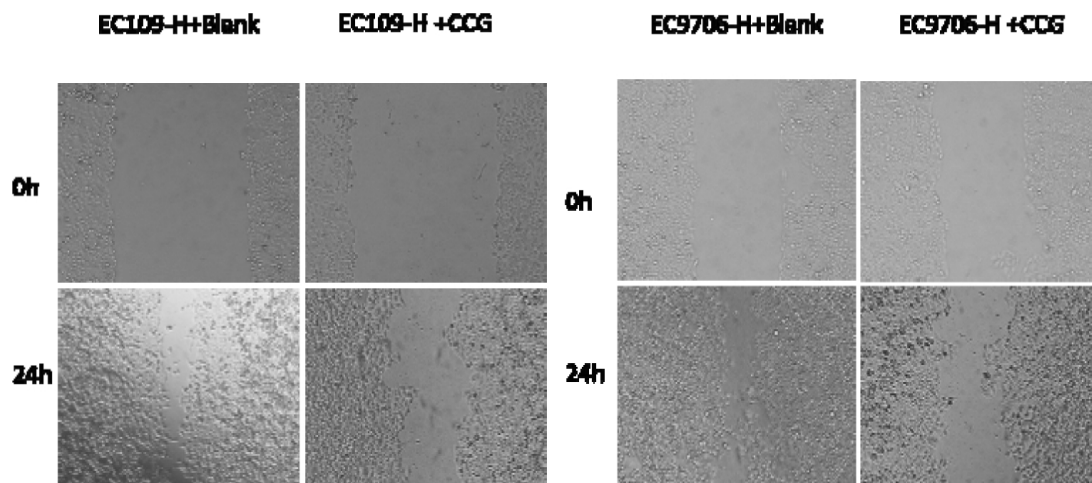


Fig.4 抑制 SRF 后食管细胞 EC109-H、EC9706-H 转移能力强弱差异 ($\times 40$)

Fig.4 The different invasive and metastatic potential in ESCC cell lines upon suppressing the SRF expression ($\times 40$)

3 讨论

侵袭转移是恶性肿瘤的主要生物学特性,与肿瘤的恶性程度、治疗效果、患者预后密切相关^[3]。食管癌患者早期即发生肿瘤的局部侵袭和远处转移,预后极差,死亡率高,以手术、放疗、化疗为主的综合治疗效果不理想^[8]。肿瘤的侵袭和转移是一个多步骤的复杂过程,涉及肿瘤细胞与宿主之间复杂的相互作用,机制仍不明确,其发生发展与许多蛋白质表达及基因有关。食管癌细胞缺乏对各种常见抗肿瘤药物的敏感性,导致其化疗的疗效低下。与其相关的分子靶点治疗是其研究的热点。因此从分子水平探讨食管癌的侵袭和转移机制,判断预后,治疗,延长患者生存期,提高生存率,是食管癌研究的关键。

SRF 是转录因子 MADS (MCM-1、agamous、dencines 和 SRF)box 家族的一个成员^[9]。基因定位于染色体 6p21.1,全长

10607bp,包含 7 个外显子,3 个结构域:血清应答元件 DNA 结合域、反式激活域和多磷酸化位点。SRF 已被确定在 300 个人类基因表达,占全部基因组的 1%。其功能极为强大,可调控相关细胞的增殖、迁移、分化、血管发生、凋亡等多种基因表达^[10-12]。SRF 作为多功能的转移因子,越来越多的证据表明其在肿瘤的产生及转移中扮演重要角色。其在肝癌组织中表达上调,且超表达的 SRF 可显著增加细胞的生长和增殖,增强肝癌细胞的侵袭转移能力,这可能与激活 Wnt/ β -catenin 途径^[13]有关。此外,抑制低分化肝癌细胞 SRF 的表达,通过干扰 SRFcDNA,明显降低转移和侵袭^[14]。在胆管癌^[15]、甲状腺癌^[16]、大肠癌^[17]、胃癌^[18-20]、前列腺癌^[21]等多种癌症中均证实 SRF 的表达与肿瘤细胞的增殖、迁徙和转移有关。在食管癌的体内研究提示^[15,6], SRF 主要定位于食管癌和正常食管上皮细胞的细胞核中,食管鳞癌中的阳性表达率高于正常黏膜组,在人食管鳞状细胞癌中表达上调。

与食管鳞癌的分化程度、浸润深度和淋巴转移密切相关。本研究首先利用食管癌高低转移细胞系证实 SRF 在食管癌的不同转移潜能细胞系中的表达量不同,在高转移性细胞中表达量明显高于低转移性细胞,再加用 SRF 抑制剂 CCG 后抑制高转移细胞系中的 SRF 因子,行细胞划痕实验证实抑制 SRF 表达后,高转移性细胞的转移侵袭能力减退。食管癌细胞的体外实验进一步证实了 SRF 在食管癌中的表达与肿瘤细胞的转移侵袭能力密切相关。

综上所述,SRF 在食管鳞癌高转移细胞系中高表达,抑制 SRF 后细胞的转移侵袭能力减退,其在食管鳞癌的发生发展中起到重要的调控作用。SRF 分子的表达水平可能成为食管癌检测的一个新的指标,抑制 SRF 的表达为食管癌治疗提供一个新的治疗靶点。

参考文献(References)

- [1] 陈灏珠,林果为. 实用内科学 [M]. 13 版. 北京:人民卫生出版社, 2009: 1959-1962
Chen Hao-zhu, Lin Guo-wei. Practice Internal Medicine [M]. 13th. Beijing: People's Medical Publishing House, 2009: 1959-1962
- [2] Tew WP, Kelsen DP, Ilson DH. Targeted therapies for esophageal cancer[J]. Oncologist, 2005, 10(8): 590-601
- [3] Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(6): 449-458
- [4] Shore P, Sharrocks AD. The MADS-box family of transcription factors [J]. Eur J Biochem 1995, 229(1): 1-13
- [5] 何喜,薛忠文,徐洪,等. 血清应答因子、平滑肌肌动蛋白在食管鳞癌中表达及意义[J]. 解剖学杂志, 2011, 34(6): 755-757
He Xi, Xue Zhong-wen, Xu Hong, et al. Clinical significance of serum response factor and α -smooth muscle actin expression in esophageal carcinoma[J]. Chinese Journal of Anatomy, 2011, 34(6): 755-757
- [6] 潘华光,于在诚,刘芝华,等. 血清应答因子在人食管鳞癌中的表达差异[J]. 安徽医科大学学报, 2009, 44(5): 562-565
Pan Hua-guang, Yu Zai-cheng, Liu Zhi-hua, et al. Serum response factor expression in esophageal carcinoma [J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2009, 44(5): 562-565
- [7] Gong T, Xue Z, Tang S, et al. Nuclear expression of twist promotes lymphatic metastasis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cancer Biol Ther, 2012, 13(8): 606-613
- [8] Sarah B Umar, David E Fleischer. Esophageal cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention[J]. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2008, 5(9): 517-526
- [9] Norman C, Runswick M, Pollock R, et al. Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element [J]. Cell, 1988, 55(6): 989-1003
- [10] Miano JM. Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression [J]. J Mol Cell Cardiol, 2003, 35(6): 577-593
- [11] Treisman R, Marais R, Wynne J. Spatial flexibility in ternary complexes between SRF and its accessory proteins [J]. EMBO, 1992, 11(12): 4631-4640
- [12] Chai J, Tamawski AS. Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing [J]. J Physiol Pharmacol, 2002, 53(2): 147-157
- [13] Kwon CY, Kim KR, Choi HN, et al. The role of serum response factor in hepatocellular carcinoma: implications for disease progression[J]. Int J Oncol, 2010, 37(4): 834 - 844
- [14] Kim KR, Bae JS, Choi HN, et al. The role of serum response factor in hepatocellular carcinoma: An association with matrix metalloproteinase [J]. Oncol Rep, 2011, 26(6): 1567-1572
- [15] Park SY, Jang KY, Kim YN, et al. Expression of MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6 in cholangiocarcinoma: prognostic impact[J]. Oncol Rep, 2009, 22(9): 649-657
- [16] Kim HJ, Kim KR, Park HS, et al. The expression and role of serum response factor in papillary carcinoma of the thyroid [J]. Int J of Oncology, 2009, 35(1): 49-55
- [17] Choi HN, Kim KR, Lee JH, et al. Serum response factor enhances liver metastasis of colorectal carcinoma via alteration of the E-cadherin/ β -catenin complex [J]. Oncol Rep, 2009, 21(1): 57-63
- [18] 赵敏,徐丁洁,徐洪,等. 胃癌 SRF E-cadherin β -catenin 的表达及其临床意义[J]. 中国肿瘤临床, 2011, 38(22): 1387-1396
Zhao Min, Xu Ding-jie, Xu Hong, et al. The Clinical Significance of SRF, E-cadherin, and β -catenin Expression in Gastric Carcinoma[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2011, 38(22): 1387-1396
- [19] Zhao M, Xu H, He X, et al. Expression of serum response factor in gastric carcinoma and its molecular mechanisms involved in the regulation of the invasion and migration of SGC-7901 cells [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2013, 28(2): 146-152
- [21] Verone AR, Duncan K, Godoy A, et al. Androgen-responsive serum response factor target genes regulate prostate cancer cell migration [J]. Carcinogenesis, 2013, 34(8): 1737-1746