bFGF 诱导肺腺癌细胞系 A549 上皮间质转化

蔡宏凤[1] 王慎旭[1] 卢媛媛[1] 王 福[2] 张荣庆[1] 曹 丰[1△]

(1 第四军医大学第一附属医院西京医院心血管内科 陕西 西安 710032；2 西安电子科技大学 陕西 西安 710071)

摘要 目的：探讨上皮间质转化（epithelial-mesenchymal transition，EMT）过程在肺癌侵袭转移中的作用。**方法：**体外培养 A549 细胞，以 bFGF（10ng / ml）进行干预后，倒置相差显微镜观察细胞形态学变化；间接免疫荧光观察上皮细胞标志物 E-cadherin 和间质细胞标志物 vimentin 蛋白表达的变化；采用细胞划痕试验检测 bFGF 对 A549 细胞迁移能力的影响；采用 transwell 小室试验检测 bFGF 对 A549 细胞侵袭能力的影响。**结果：**bFGF（10ng / ml）干预后，在倒置相差显微镜下观察，A549 细胞形态变成了梭形，形态如同成纤维细胞。间接免疫荧光显示 A549 细胞 E-cadherin 表达随时间延长逐渐减弱，而 vimentin 表达逐渐增强。细胞划痕试验显示，bFGF 干预后细胞迁移能力提高。Transwell 小室试验显示，bFGF 干预后细胞侵袭能力提高。**结论：**bFGF 在体外诱导肺腺癌细胞系 A549 细胞发生上皮间质转化，上皮间质转化是肺癌侵袭转移的重要机制之一。

关键词：碱性成纤维细胞生长因子 bFGF；A549 细胞；上皮间质转化；肺癌

中图分类号：R734.2 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2012)07-1241-03

bFGF Induced Epithelial-Mesenchymal Transition of Human Lung Adenocarcinoma Cell Line A549

CAI Hong-feng[1△], WANG Shen-xu[1], LU Yuan-yuan[1], WANG Fu[2], ZHANG Rong-qing[1], CAO Feng[1△]

(1 Department of Cardiovascular medicine of the Forth Military Medical University，710032，Xi'an,China;

2 Xian Electronic Science and Technology University, Xi'an,710071,China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of epithelial to mesenchymal transition (EMT) on the invasion and metastasis of lung cancer. Methods: A549 cells cultured in vitro were treated by bFGF (10ng/ml), then the morphological changes were detected by inverted phase contrast microscopy; The expression of the epithelial marker E-cadherin and mesenchymal marker vimentin was detected by Indirect immunofluorescence; The effect of bFGF on migration of A549 was detected by scarification assay; The effect of bFGF on invasion of A549 was detected by transwell assay. Results: After treated by bFGF (10ng/ml), A549 cells turn from pebble shape to fusiform shape, a myofibroblast-like morphology. The expression of E-cadherin decreased, and the expression of vimentin increased. Scarification test showed that the migration potential of A549 cells was significantly increased after bFGF treatment. The invasive capacity of A549 increased after bFGF treatment. Conclusion: bFGF may contribute to EMT in lung adenocarcinoma cell line A549. EMT is an important mechanism for invasion and metastasis of lung cancer.

Key words: Basic fibroblast growth factor; A549 cell; Epithelial-mesenchymal transition; Lung cancer

Chinese Library Classification: R734.2 Document code: A

Article ID :1673-6273(2012)07-1241-03

前言

肺癌是最常见的恶性肿瘤。目前，肺癌的治疗主要是手术、放疗和化疗。近年，尽管诊断和治疗手段不断提高和改进，肺癌患者的五年生存率并没有明显提高，主要原因是肿瘤的浸润转移。因此，阐明肿瘤的浸润转移机制，从而采取有效的措施降低肺癌患者的病死率已成为肺癌研究的重点[13]。目前，上皮间质转化（epithelial-mesenchymal transition，EMT）与肿瘤浸润转移的关系日益成为人们关注的热点。EMT 是胚胎发育、组织重建和伤口修复的基础过程，同时是肿瘤浸润、转移的一个非常重要的机制，与肿瘤后期的转移和纤维化关系密切。上皮细胞发生上皮间质转化的重要特征有：上皮细胞表型标志物 E-cadherin 表达下调，间质细胞表型标志物 vimentin 表达上调；上皮细胞极性丧失，细胞间黏附性降低，迁移和运动能力增强[12]。EMT 的发生是一个复杂的过程，多种细胞因子和信号通路参与其调控。其中，TGF-β 是一个比较明确的可诱导上皮发生 EMT 的重要诱导因子，而且研究已颇多。bFGF 是重要的有丝分裂促进分子，在正常生理和病理过程中参与生长发育和组织损伤的修复，是形态发生和分化的诱导因子，同时是上皮间质转化的诱导因子。但是，bFGF 在肺癌 A549 细胞上皮间质转化和浸润转移过程中的作用尚报道很少，因此本研究通过 bFGF 诱导 A549 细胞发生上皮间质转化，探讨 bFGF 在上皮间质转化和浸润转移过程中的作用，为肺癌的治疗打开一个新思路。

作者简介：蔡宏凤（1985-），女，硕士研究生，主要研究方向：上皮间质转化与肿瘤的联系和机制研究

△通讯作者：曹丰，电话：029-18992898022，

E-mail: wind8828@gmail.com

(收稿日期：2011-08-27 接受日期：2011-09-23)

1 材料与方法

1.1 实验试剂

A549 细胞株（第四军医大学西京医院心血管内科实验

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

室），bFGF (PeproTech 公司)，1640 培养基（GIBCO 公司），胎牛血清（Hyclone），E-cadherin 鼠抗人单抗（Santa Cruz 公司），vimentin 鼠抗人单抗（Santa Cruz 公司），羊抗鼠 cy3 标记的 IgG（北京博奥森生物技术有限公司），transwell 小室（Coster 公司），matrigel 基质胶（BD 公司），DAPI 染色液（碧云天生物技术研究所）

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 细胞培养 A549 细胞用含 10%胎牛血清的 1640 细胞培养基，在 5%的 CO_2 饱和湿度、37 ℃恒温培养箱中常规培养。

1.2.2 倒置相差显微镜观察细胞形态 当细胞生长融合至 70%～80%，用无血清细胞培养基继续培养 24 h 后，换成含 10 ng / ml bFGF 的无血清细胞培养基培养 72 h。倒置相差显微镜观察 A549 细胞的形态变化并照相。

1.2.3 间接免疫荧光 以每孔 1×10^5 个细胞接种于 6 孔培养板预置的载玻片上，细胞贴壁爬片后，用无血清培养基培养 24 h 后，换成含 10 ng / ml bFGF 的无血清细胞培养基培养，对照组为不含 bFGF 的无血清培养基。在培养 48 h 后，取出载玻片，用 4%多聚甲醛 37 ℃固定 30 min，1× PBS 洗涤细胞 5 min× 3 次。0.3% Triton X-100 室温孵育 30 min，1× PBS 洗涤细胞 5 min× 3 次。1%的 BSA 封闭液 37 ℃孵育 30 min，1× PBS 洗涤细胞 5 min× 3 次。滴加稀释后一抗 E-Cadherin 单克隆抗体(1∶100)，vimentin 单克隆抗体（1:100），37 ℃，60 min。1× PBS 洗涤细胞 5 min× 3 次，滴加荧光素 cy3 标记二抗（1:50），37 ℃温育 60 min。1× PBS 洗涤细胞 5 min× 3 次，然后 DAPI 染色液衬染胞核。缓冲甘油封片，荧光显微镜观察并拍照。

1.2.4 细胞划痕试验 以每孔 2×10^5 个细胞接种于 6 孔培养板中，用含 10%胎牛血清的 1640 培养基培养，直至使细胞呈现单层贴壁生长状态并达到 100%融合，继续用无血清培养基培养 24 h。用灭菌的 200 μl 移液器枪头在孔板底部呈“一”字形划痕，以 PBS 洗涤刮下的漂浮细胞，实验组加入含 10 ng / ml bFGF 的无血清细胞培养基，对照组为不含 bFGF 的无血清培养基。分别于划痕后 0、48 h 给细胞拍照，观察划痕愈合能力。

1.2.5 Transwell 小室侵袭试验 将 matrigel 预先用 4 ℃的无血清 1640 培养基 1:10 稀释，取 100 μl 稀释液包被孔径为 8 μm 的 transwell 小室底部的聚碳酸酯膜，使膜上所有的微孔被 matrigel 覆盖，37 ℃过夜干燥。备好的 transwell 用紫外线照射 2 h，使用前加入少量的无血清培养基水化，37 ℃，30 min。常规消化细胞，终止消化后离心收集细胞沉淀，PBS 洗涤 1～2 遍，用含 10 ng / ml bFGF 的无血清培养基重悬细胞，调整细胞浓度为 1×10^5 / ml。弃去 transwell 上室内液体，通过间隙往小室外加入含 10%胎牛血清的 1640 细胞培养基 600 μl，在小室内加入细胞悬液 100 μl。5%CO_2、37 ℃孵育 48 h。取出 transwell 小室，PBS 淋洗，95%酒精固定 10 min，用棉签小心擦去微孔膜上层的细胞，4 g / L 台盼蓝溶液染色，在倒置显微镜下计数迁移到微孔膜下层的细胞。

1.3 统计学分析

所有数据应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，两组均数的比较用 t 检验，$P<0.05$ 被认为是差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

研究发现，与对照组（即不含 bFGF 的无血清培养基培养细胞组）比，实验组（即含 bFGF 的无血清培养基培养细胞组）细胞形态发生了变化，而且细胞间的连接变得较松散，（图 1）。

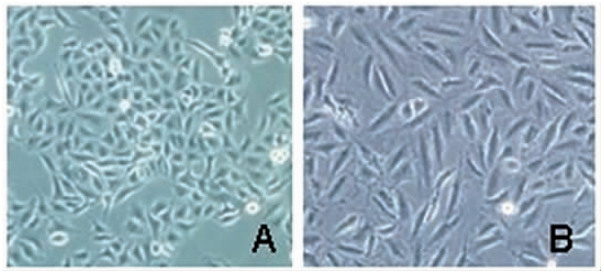

图 1 bFGF 对 A549 细胞的形态学影响（100×）：A 对照组 B 处理组

Fig.1 The effect of bFGF on A549 morphology(100×): A control group B treatment group

2.2 间接免疫荧光

在荧光显微镜下观察，发现对照组 A549 细胞高表达 E-cadherin 蛋白，胞浆见强阳性荧光，而低表达 vimentin 蛋白，胞浆见弱阳性荧光。实验组细胞（即含 bFGF 的无血清培养基培养细胞组）E-cadherin 蛋白表达明显下调，胞浆见弱阳性荧光，而 vimentin 蛋白表达明显上调，胞浆见强阳性荧光，（图 2）。

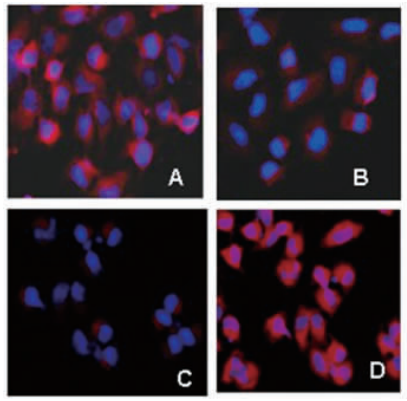

图 2 bFGF 诱导 A549 细胞在 EMT 过程中 E-Cadherin 和 vimentin 的表达(100×):

A 对照组 E-cadherin 表达 B 实验组 E-cadherin C 对照组 vimentin 表达 D 实验组 vimentin 表达

Fig.2 The expression of E-cadherin and vimentin in EMT induced by bFGF on A549(100×):

A The expression of E-cadherin in control group B The expression of E-cadherin in treatment group C The expression of vimentin in control group D the expression of vimentin in treatment group

2.3 细胞划痕试验

研究发现，实验组细胞在 48h 后，划痕几乎全部愈合，而对照组只有少数细胞越过划痕边缘，可见，实验组细胞迁移能力明显增强，（图 3）。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

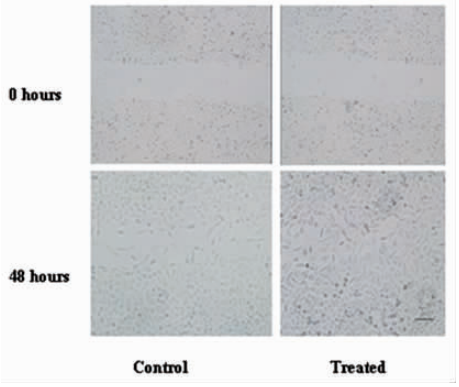

图 3 bFGF 对 A549 细胞迁移能力的影响(100×)

Fig.3 The effect of bFGF on migration of A549(100×)

2.4 Transwell 小室侵袭试验

实验组细胞 48 h 后穿过 transwell 侵袭小室的每高倍镜视野细胞数比对照组细胞明显增多。可见,实验组细胞较对照组细胞侵袭能力增强,(图 4)。

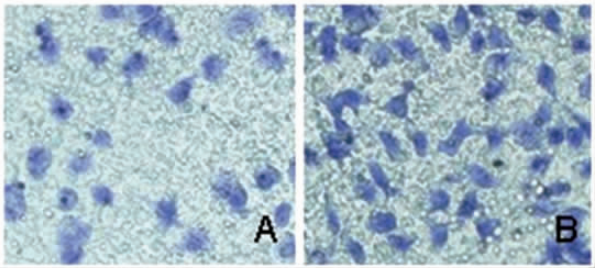

图 4 bFGF 对 A549 细胞侵袭能力的影响(× 100):A 对照组 B 处理组

Fig.4 The effect of bFGF on invasion of A549 (100×):A control group B treatment group

3 讨论

肿瘤的浸润转移是肿瘤患者死亡的主要原因,研究肿瘤的浸润转移机制对提高肿瘤患者的生存率和降低患者的死亡率是非常重要的。肿瘤的浸润转移是一个非常复杂的过程,涉及多种因素和多种机制。目前,上皮间质转化在肿瘤浸润转移中的作用引起研究者的关注。大量研究证明,上皮间质转化与肿瘤浸润转移有关,是肿瘤浸润转移的重要机制[9]。

上皮间质转化是上皮细胞与周围间质细胞相互作用过程中逐渐获得了某些间质细胞所特有的性状的现象,不仅存在于胚胎发育过程中,同时存在于多种慢性疾病的发病以及肿瘤的进展过程中。发生上皮间质转化的细胞在经历了短暂的结构改变后,细胞的迁移和运动能力增强,因此,通过上皮间质转化获得侵袭转移能力的肿瘤是最可怕的。上皮间质转化的过程包括:(1) 细胞间连接解体,细胞分散。(2) 细胞骨架的重排,细胞运动能力增强。(3) 细胞基因型的改变:包括间叶性标志物表达上调,如:vimentin,fibronectin,N-cadherin 等;上皮性标志物表达下调,如:E-cadherin、β-catenin 等。在基础研究中,E-cadherin 和 vimentin 是鉴定 EMT 发生的重要标志物。发生 EMT 的细胞获得较强的侵袭和运动能力。

上皮间质转化是一个复杂的过程,多种细胞因子和转录因子参与其调控。其中 bFGF 是调节上皮间质转化的一个诱导因子。bFGF 是促有丝分裂原,具有促进创伤愈合、组织修复、促进血管增生、胚胎发育和分化的功能。同时 bFGF 可以通过自分泌和旁分泌的作用刺激肿瘤细胞,促进肿瘤细胞的生长,对肿瘤血管的新生有显著作用。目前,研究已证实肺癌细胞存在上皮间质转化,但有关 bFGF 在肺癌上皮间质转化中的研究尚少见报道。

因此,本研究用 bFGF 处理后,A549 细胞形态发生了变化,细胞间接触减少,黏附性降低。通过细胞划痕试验结果显示,经诱导 48 h 后的 A549 细胞迁移能力明显增强。同时通过 transwell 小室侵袭试验结果显示,经诱导 48 h 后的 A549 细胞侵袭能力明显提高。免疫荧光结果显示,诱导后细胞 E-cadherin 上皮表型标志物表达下调,而 vimentin 间质细胞表型标志物表达上调。以上结果表明,bFGF 在诱导肺癌细胞 A549 上皮间质转化中具有一定的作用,为进一步探讨 EMT 在肺癌细胞浸润转移中的作用提供理论基础。

总之,bFGF 在诱导肺癌细胞 A549 上皮间质转化中起重要作用,上皮间质转化是肿瘤浸润转移的重要机制之一。然而,上皮间质转化的发生涉及很多因素的协调合作,目前我们对上皮间质转化的分子机制研究还不够,因此,肺癌上皮间质转化引发的问题和发生过程中的信号通路还需要进一步研究。bFGF 在肺癌上皮间质转化中的作用,进一步研究其相关的细胞信号转导机制,通过阻断此过程有可能改善肺癌浸润和转移的效应,为治疗肺癌提供更好的方法,从而有助于我们更好的阐明恶性肿瘤发生发展与浸润转移的机制。

参 考 文 献(References)

[1] Li Y, Bhargava MM, Joseph A, et al. Effect of hepatocyte growth factor/scatter factor and other growth factors on motility and morphology of non-tumorigenic and tumor cells [J].In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1994, 30A(2):105-110

[2] Savagner P, Valles AM, Jouanneau J, et al. Alternative splicing in fibroblast growth factor receptor 2 is associated with induced epithelial-mesenchymal transition in rat bladder carcinoma cells[J]. Mol Biol Cell, 1994, 5(8):851-862

[3] Harada K, Sato Y, Ikeda H, et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by biliary innate immunity contributes to the sclerosing cholangiopathy of biliary atresia[J].J Pathol, 2009, 217(5):654-664

[4] Yamauchi Y, Kohyama T, Takizawa H, et al. Tumor necrosis factor-alpha enhances both epithelial-mesenchymal transition and cell contraction induced in A549 human alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1[J].Exp Lung Res, 2010, 36(1):12-24

[5] Chang CJ, Chao CH, Xia W, et al. p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs [J].Nat Cell Biol, 2011, 13(3):317-323

[6] Iwano M, Plieth D, Danoff TM, et al. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis [J].J Clin Invest, 2002, 110(3): 341-350

[7] Mabry SM, Ekekezie, II. TRIP-1 regulates TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition of human lung epithelial cell line A549[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011, 300(5):L799-807

(下转第 1264 页)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

以作为患者复发预后的预测参考指标。

参 考 文 献(References)

[1] 张思维,等. 中国部分市县膀胱癌发病趋势比较研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 2009, 30: 4
Zhang Si-wei, Ma Jian-hui, Li Ming, et al. Incidence trends of bladder cancer in cities and counties in China[J]. Chinese Journal of Urology, 2009, 30: 4

[2] Negri E, La Vecchia C. Epidemiology and prevention of bladder cancer[J]. Eur J Cancer Prev, 2001, 10: 7-14

[3] Davis-Dao CA, Henderson KD, Sullivan-Halley J, et al. Lower risk in parous women suggests that hormonal factors are important in bladder cancer etiology[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2011, 20: 1156-1170

[4] McGrath M, Michaud DS, De Vivo I. Hormonal and reproductive factors and the risk of bladder cancer in women [J]. Am J Epidemiol, 2006, 163: 236-244

[5] Wu JT, Han BM, Yu SQ, et al. Androgen receptor is a potential therapeutic target for bladder cancer[J]. Urology, 2010, 75: 820-827

[6] Miyamoto H, Yang Z, Chen YT, et al. Promotion of bladder cancer development and progression by androgen receptor signals [J]. J Natl Cancer Inst, 2007, 99: 558-568

[7] Teng J, Wang ZY, Jarrard DF, et al. Roles of estrogen receptor alpha and beta in modulating urothelial cell proliferation [J]. Endocr Relat Cancer, 2008, 15: 351-364

[8] Younes M, Honma N. Estrogen receptor beta[J]. Arch Pathol Lab Med, 2011, 135: 63-66

[9] Gelmann EP. Molecular biology of the androgen receptor [J]. J Clin Oncol, 2002, 20: 3001-3015

[10] Chavalmane AK, Comeglio P, Morelli A, et al. Sex steroid receptors in male human bladder: expression and biological function [J]. J Sex Med, 2010, 7: 2698-2713

[11] Kontos S, Kominea A, Melachrinou M, et al. Inverse expression of estrogen receptor-beta and nuclear factor-kappaB in urinary bladder carcinogenesis[J]. Int J Urol, 2010, 17: 801-809

[12] Shen SS, Smith CL, Hsieh JT, et al. Expression of estrogen receptors-alpha and -beta in bladder cancer cell lines and human bladder tumor tissue[J]. Cancer, 2006, 106: 2610-2616

[13] Sonpavde G, Okuno N, Weiss H, et al. Efficacy of selective estrogen receptor modulators in nude mice bearing human transitional cell carcinoma[J]. Urology, 2007, 69: 1221-1226

(上接第 1243 页)

[8] Restrepo-Angulo I, Sanchez-Torres C, Camacho J. Human EAG1 potassium channels in the epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer cells[J].Anticancer Res, 2011, 31(4):1265-1270

[9] Yoshida GJ, Saya H. Encounter of cancer cells with bone. The Significance of Cancer Stem Cells and Epithelial-Mesenchymal Transition in Tumor Invasion and Metastasis [J].Clin Calcium, 2011, 21 (3): 411-417

[10] Nakamura T, Matsumoto K, Kiritoshi A. Induction of hepatocyte growth factor in fibroblasts by tumor-derived factors affects invasive growth of tumor cells: in vitro analysis of tumor-stromal interactions [J]. Cancer Res, 1997, 57(15):3305-3313

[11] Sasaki M, Ito T, Kashima M, et al. Erythromycin and clarithromycin modulation of growth factor-induced expression of heparanase mRNA on human lung cancer cells in vitro [J].Mediators Inflamm, 2001, 10(5):259-267

[12] Battula VL, Evans KW, Hollier BG, et al. Epithelial-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells [J].Stem Cells, 2010, 28 (8): 1435-1445

[13] Ramos C, Becerril C, Montano M, et al. FGF-1 reverts epithelial-mesenchymal transition induced by TGF-beta1 through MAPK/ERK kinase pathway [J].Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010, 299 (2):L222-231

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net