

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20150005

Rho 信号通路抑制剂 Y27632 抑制 TGF- β 诱导的 MCF-7 细胞上皮间质转化

王楠, 庄春雨, 宋铁峰, 袁颖, 张蕊, 张同存

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 许多研究表明在乳腺癌的发生过程中上皮间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)起到十分重要的作用,转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)是公认的可以引起 EMT 的重要因子,在 EMT 过程中涉及许多信号通路,但是 Rho 信号通路在其中的作用尚未报道.本文首先建立 TGF- β 诱导人乳腺癌细胞 MCF-7 上皮间质转化的模型,利用划痕实验检测细胞迁移能力,利用实时定量荧光 PCR(real-time PCR)和免疫印迹(Western blot)实验检测间质标志基因的表达情况.进一步通过加入 Rho 通路抑制剂 Y27632 研究 Rho 通路在 TGF- β 诱导的 MCF-7 细胞 EMT 中的作用,结果证实 TGF- β 可以诱导 MCF-7 细胞 EMT,促进 MCF-7 细胞迁移,而 Y27632 抑制 TGF- β 诱导的 MCF-7 细胞 EMT 过程及其迁移.

关键词: MCF-7 细胞; 迁移; EMT; Rho 信号通路

中图分类号: Q28 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2015)06-0012-05

Inhibiting MCF-7 Cell Epithelial-mesenchymal Transition Induced by TGF- β with Rho Signaling Pathway Inhibitor Y27632

WANG Nan, ZHUANG Chunyu, SONG Tiefeng, YUAN Ying, ZHANG Rui, ZHANG Tongcun
(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: It is reported that epithelial-mesenchymal transition (EMT) plays an important role in the process of breast cancer development. TGF- β is reported to be the key factor during the EMT progress. Multiple signaling pathways are involved in EMT. Whether Rho/ROCK pathway is involved in EMT is unclear. First, TGF- β -induced EMT model was established. The migration abilities of MCF-7 were evaluated by wound-healing assay and the expression of mesenchymal markers were detected by real-time PCR and western blotting. To investigate the role of Rho pathway in TGF- β -induced MCF-7 cell EMT, specific inhibitor Y27632 was added in MCF-7 cells with/without TGF- β . The results showed that TGF- β did induce EMT and migration, and Y27632 really inhibited TGF- β -induced EMT and migration in MCF-7.

Key words: MCF-7 cell; migration ability; EMT; Rho signaling pathway

上皮间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)可以使细胞失去其上皮细胞的节点黏附性并获得间质细胞的表型和特征.在 EMT 过程中,上皮细胞连接蛋白(如 E-cadherin)的表达量降低,间质细胞标志蛋白(如 vimentin, N-cadherin)的表达升高^[1].在癌症中,EMT 使肿瘤细胞变得更有迁移能力和侵袭能力^[2],乳腺癌中 95%的癌细胞来源于上皮,

许多研究表明在乳腺癌的发生过程中 EMT 起到十分重要的作用^[3].

转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)是一种多功能的细胞因子,高表达 TGF- β 的乳腺癌病人死亡率高^[4],在乳腺癌的后期,TGF- β 促进癌症发生过程,促进乳腺癌细胞迁移和侵袭以及 EMT 的发生^[5].TGF- β 促使 EMT 的发生涉及多个信

收稿日期: 2015-01-07; 修回日期: 2015-05-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31171303); 教育部科学技术研究重点资助项目(212010)

作者简介: 王楠(1979—),女,吉林人,教授; 通信作者: 张同存,教授, tony@tust.edu.cn.

号通路,研究最多的是 TGF- β 可以通过 Smad 信号通路发挥作用,除了 TGF- β /Smad 通路, TGF- β 可以激活转化生长因子——活化激酶 1 (TGF-activated kinase, TAK1), 从而激活下游的一系列信号通路,如磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K)、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinases, JNK) 及细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 信号通路^[6]. GTPase Rho 信号通路在细胞骨架的重新排列过程中具有重要作用,与细胞的迁移能力密切相关,但是 Rho 通路是否参与 TGF- β 诱导的乳腺癌细胞 MCF-7 上皮间质转化过程尚不明确. 本文通过在 MCF-7 细胞中加入 TGF- β 构建 EMT 模型,研究 TGF- β 对 MCF-7 细胞迁移的影响,并加入 Rho 通路抑制剂 Y27632 进一步研究 Rho 信号通路在这一过程中的作用.

1 材料与方法

1.1 细胞株和细胞培养

人乳腺癌细胞 MCF-7 为本实验室保藏,在 D-MEM/F-12 培养基中加入体积分数为 10% 的胎牛血清,1% 青霉素-链霉素溶液 (100 \times),于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养. 用 0.25% 的胰酶隔天进行消化传代.

1.2 主要试剂

D-MEM/F-12 培养基, Gibco 公司; 胎牛血清, 天津康源生物技术有限公司; Human TGF- β 1, Peprrotech 公司; Y-27632 dihydrochloride、N-钙黏连蛋白 (N-cadherin) 抗体、波形蛋白 (vimentin) 抗体, Sigma 公司; IRDye[®] 800 CW 山羊抗鼠抗体、IRDye[®] 680 山羊抗兔抗体, LI-COR 公司; M-MLV 逆转录酶、Trizol 裂解液, 上海英俊生物技术有限公司; 随机引物 B0043, 上海生工生物工程有限公司; dNTP, Solarbio 公司; Bestar[®] SybGreen qPCR Mastermix, DBI[®] Bioscience 公司.

1.3 细胞加药处理

将 2×10^5 mL⁻¹ 的 MCF-7 细胞 1 mL 接种于 6 孔板中,分为 3 组: 对照组, 无血清 D-MEM/F12 处理细胞 48 h; TGF- β 处理组, 加 TGF- β (终浓度 5 nmol/L) 于无血清的 D-MEM/F12 中, 处理细胞 48 h; 抑制剂处理组, 先用含 Y27632 (终浓度 10 μ mol/L) 的 D-MEM/F-12 处理 MCF-7 细胞 30 min 后加入终浓度为 5 nmol/L 的 TGF- β 处理 MCF-7 细胞 48 h. 收集上述

细胞进行后续实验.

1.4 细胞划痕实验

2×10^5 mL⁻¹ 的 MCF-7 细胞 1 mL 接种于 6 孔板, 24 h 后用 10 μ L 枪头在细胞间按“十”字型划出痕迹, 同时加药处理, 24 h 后在倒置显微镜下进行观察拍照.

1.5 RNA 的提取

用 0.5 mL Trizol 裂解液在冰上裂解细胞 20 min, 重复吹悬使细胞充分裂解, 加入 0.1 mL 的氯仿, 剧烈振荡 15 s, 静置 2~5 min, 然后于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min. 取上层水相到另一 EP 管中, 加入等体积的异丙醇, 混匀, -20 $^{\circ}$ C 放置 30 min. 12 000 r/min 离心 15 min, 弃掉上清液, 加入 75% 乙醇 1 mL, 洗涤 RNA, 离心弃上清液, 干燥 RNA, 加入 20 μ L DEPC 溶解, 放于 -80 $^{\circ}$ C 保存.

1.6 RNA 逆转录及实时定量荧光 PCR (real-time PCR)

将提取的 RNA 用 M-MLV 逆转录方法进行逆转录, 逆转录体系为 40 μ L. RNA 20 μ L、随机引物 (B0043) 5 μ L、10 mol/L dNTPs 2 μ L 65 $^{\circ}$ C 水浴 5 min; 然后加入 5 \times buffer 8 μ L、0.1 mol/L DTT 4 μ L、RNase inhibitor 1 μ L, 37 $^{\circ}$ C 水浴 2 min; M-MLVRT 1 μ L 室温放置 10 min; 37 $^{\circ}$ C 反应 1.5 h, 70 $^{\circ}$ C 保持 10 min 终止反应.

用 Bestar[®] SybGreen qPCR Mastermix 进行 real-time PCR. 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环. 溶解曲线: 95 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 10 s. 目的基因引物: GAPDH 上游 5'-TCAACGGCACAGTCAAGG-3', GAPDH 下游 5'-AGAAGGGGCGGAGATGA-3'; N-cadherin 上游 5'-CAACTTGCCAGAAAACCTCCAGG-3', N-cadherin 下游 5'-ATGAAACCGGGCTATCTGCTC-3'; vimentin 上游 5'-GAACGCCAGATGCGTGAAATG-3', vimentin 下游 5'-CCAGAGGGAGTGAATCCAGATTA-3'; MYL9 上游 5'-GAAGAAACAGGCCAGGAGA-3', MYL9 下游 5'-GTGTAGGGAAGGGGACTGAGAGG-3'; CYR61 上游 5'-TTAGTCGTCACCCTTCTC-3', CYR61 下游 5'-TCCCCGTTTTGGTAGATTC-3'.

1.7 免疫印迹实验 (Western blot)

收集各组细胞, PBS 洗 1 次, SDS 细胞裂解液冰上裂解细胞, 100 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 12% SDS-PAGE 电泳, 电转法将蛋白转至 NC 膜. 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h 后, 分别用 GAPDH 抗体 (1:500)、N-钙黏连

蛋白抗体(1 : 200)、波形蛋白抗体(1 : 200)4 ℃孵育过夜, PBS 洗 3 次, 每次 10 min, IRDye®800 CW 山羊抗鼠抗体(1 : 5 000)、IRDye®680 山羊抗兔抗体(1 : 5 000)室温孵育 2 h 后, PBS 洗 3 次, 每次 10 min, Odyssey 成像系统进行扫膜成像. 并用 ImagJ 进行灰度分析.

1.8 统计学分析

所有实验数据均用 SPSS 13.0 统计软件计算, 实验数据均以“平均值 ± 标准差”表示. 用 *t* 检验对数据进行分析, *表示统计学上有显著性差异($P < 0.05$), **表示统计学上有极显著性差异($P < 0.01$).

2 结果与分析

2.1 TGF-β 诱导 MCF-7 细胞发生 EMT

TGF-β 是公认的能引起细胞发生 EMT 的重要因子. 在 DMEM/F12(无血清)培养基中加入 TGF-β(终质量浓度 5 ng/mL)处理细胞 48 h 后, 提取总 RNA, 用 real-time PCR 的方法检测间质细胞标志基因 N-钙黏连蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(vimentin)mRNA 水平的变化, 结果如图 1 所示. 在经过 TGF-β 处理后 N-cadherin、vimentin 的表达量升高.

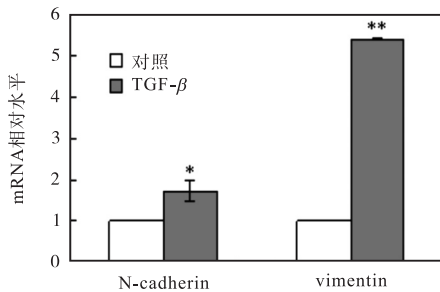


图 1 TGF-β 上调间质标志基因 mRNA 水平的表达
Fig.1 TGF-β upregulates the mRNA expression of mesenchymal markers

利用 Western blot 检测这两种标志基因蛋白水平的变化, 结果如图 2 所示. TGF-β 诱导 N-cadherin 和 vimentin 蛋白水平上调, 说明在 MCF-7 细胞中加入 TGF-β 可以促使细胞发生 EMT 过程, EMT 模型构建成功.

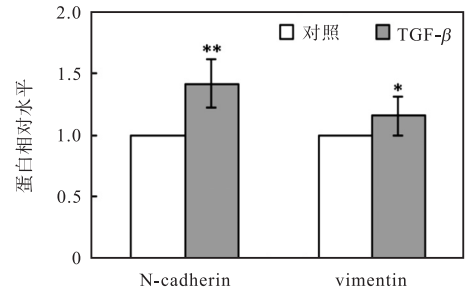
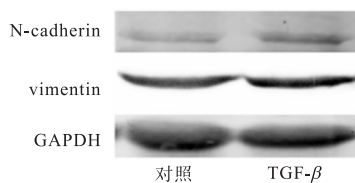


图 2 TGF-β 上调间质标志基因蛋白水平的表达
Fig.2 TGF-β upregulates the protein expression of mesenchymal markers

2.2 TGF-β 促进 MCF-7 细胞迁移

为进一步证明 TGF-β 功能上是否影响 MCF-7 细胞迁移, 利用划痕实验检测了细胞的迁移能力, 结果如图 3 所示. 加入 TGF-β 的 MCF-7 细胞的愈合程度高于没有处理的 MCF-7 细胞的愈合程度, 证明 TGF-β 促使 MCF-7 细胞的迁移.

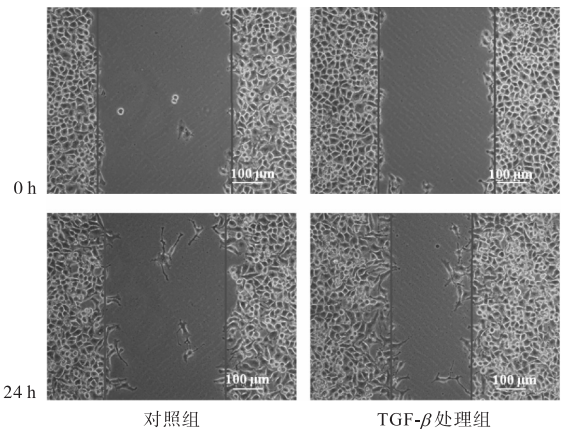


图 3 TGF-β 对 MCF-7 细胞迁移能力的影响
Fig.3 Effect of TGF-β on MCF-7 cell migration

据文献^[7-8]报道细胞外基质蛋白CYR61与细胞骨架蛋白MYL9和细胞迁移有直接的关系, 本文进一步利用 real-time PCR 的方法检测迁移标志基因 CYR61、MYL9 mRNA 水平的变化, 结果如图4所示. TGF-β 可以促进 CYR61、MYL9 mRNA 表达的升高, 进一步证明了 TGF-β 可以促进 MCF-7 细胞的迁移能力.

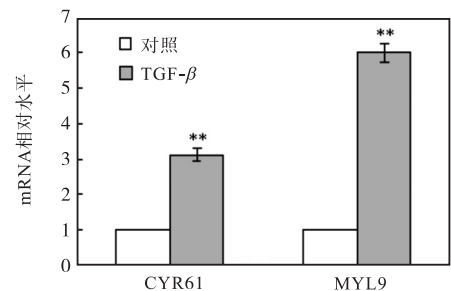


图 4 TGF-β 促进迁移标志基因表达升高
Fig.4 TGF-β upregulates the expression of migration markers

2.3 抑制 Rho 信号通路抑制 TGF- β 诱导 MCF-7 细胞发生的 EMT

GTPase Rho 信号通路在细胞骨架的重新排列的过程中具有重要作用, 与细胞的迁移能力密切相关, 然而 Rho 信号通路是否参与 TGF- β 诱导的 EMT 过程尚不清楚. 因此, 首先用 Rho 通路的抑制剂 Y27632 处理 MCF-7 细胞 0.5 h 后, 再加入 TGF- β 处理 48 h, real-time PCR 方法检测间质细胞标志基因 N-cadherin、vimentin mRNA 水平的变化, 结果如图 5 所示. TGF- β 处理组细胞高表达 N-cadherin 和 vimentin, 而抑制剂处理组与 TGF- β 处理组相比, N-cadherin 和 vimentin 的表达降低.

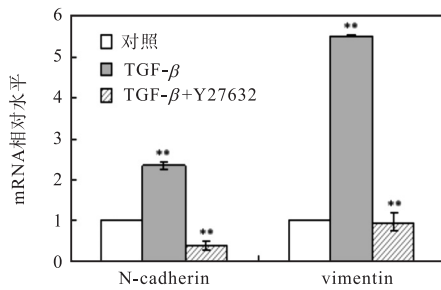


图 5 Y27632 抑制 TGF- β 诱导的 MCF-7 细胞间质标志基因 mRNA 水平的表达

Fig. 5 Y27632 inhibits the mRNA expression of mesenchymal markers induced by TGF- β in MCF-7 cells

利用 Western blot 检测这两种基因蛋白水平的变化, 如图 6 所示. 结果与 mRNA 水平的变化一致, 说明在 MCF-7 细胞中, 抑制 Rho 信号通路可以逆转由 TGF- β 引起的 EMT 的过程.

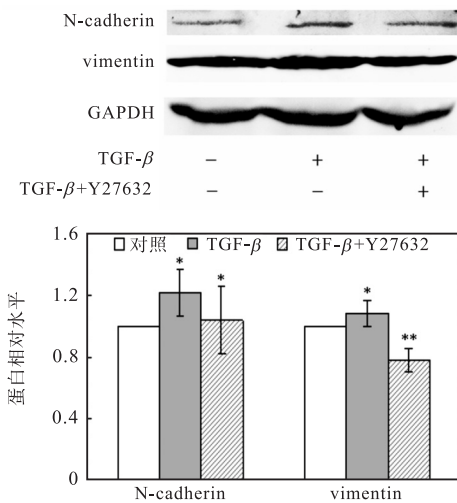


图 6 Y27632 抑制 TGF- β 诱导的 MCF-7 细胞间质标志基因蛋白水平的表达

Fig. 6 Y27632 inhibits the protein expression of mesenchymal markers induced by TGF- β in MCF-7 cells

2.4 抑制 Rho 信号通路可以抑制由 TGF- β 引起的细胞迁移

既然抑制 Rho 信号通路可以抑制由 TGF- β 引起的 EMT 的过程, 进一步研究 Y27632 是否可以抑制由 TGF- β 诱导的 MCF-7 细胞的迁移. 如图 7 所示, 证实抑制剂处理组愈合程度低于 TGF- β 处理组, 证明 Y27632 可以抑制由 TGF- β 引起的 MCF-7 细胞迁移.

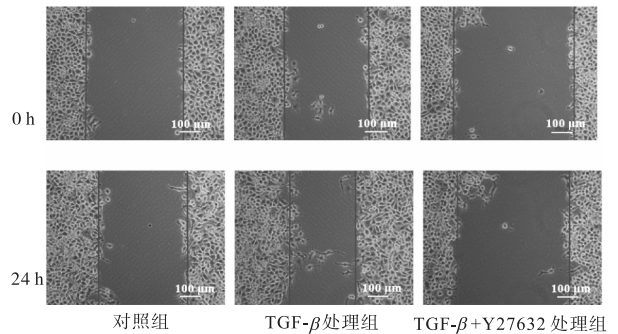


图 7 Y27632 抑制 TGF- β 引起的迁移

Fig. 7 Y27632 inhibits MCF-7 cell migration induced by TGF- β

图 8 所示迁移标志基因 CYR61、MYL9 的表达变化情况也证实 TGF- β 可以通过激活 Rho 通路促进 MCF-7 细胞迁移.

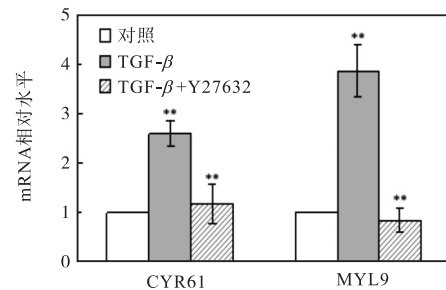


图 8 Y27632 抑制 TGF- β 引起的迁移标志基因表达

Fig. 8 Y27632 inhibits the expression of migration markers induced by TGF- β

3 讨论

EMT 过程可以使细胞上皮性的细胞(包括正常上皮和肿瘤上皮)表现出了间质细胞的特性和表征, 从而迁移能力增强. EMT 可以促进多种肿瘤细胞的迁移, 如肝癌、结肠癌、膀胱癌和恶性黑色素瘤等^[9]. 本文选用人乳腺癌细胞 MCF-7, 在 MCF-7 细胞中加入 TGF- β , 成功的使 MCF-7 细胞发生了 EMT 的过程, 间质细胞特征标志基因 N-cadherin、vimentin mRNA 和蛋白水平表达都上升, 并且通过划痕实验

证明 TGF- β 可以使 MCF-7 细胞的迁移能力增加,通过 real-time PCR 实验证明迁移标志基因上调,与文献报道一致^[10].

TGF- β 引起 EMT 的过程是一个非常复杂的过程,许多研究表明 Smad 经典通路和多条非 Smad 通路共同参与这个过程. Smad 蛋白在 TGF- β 诱导 EMT 发生的过程中起着非常重要的作用,不同 Smad 亚型发挥作用不同,肝细胞中 Smad3 促进 EMT、Smad2 抑制 EMT;在肾近曲小管上皮细胞 Smad3 和 Smad2 都促进 EMT^[11]. 除了 TGF- β /Smad 通路, TGF- β 还可以激活 TAK1,进而激活下游的信号通路, TAK1 可以使 MKK3/6 磷酸化,从而激活 JNK 和 p38^[11]; TGF- β 诱导的 Mek/Erk MAPK 信号能诱导 TGF- β 1 表达,从而 TGF- β 反应扩大^[6]. 但是作为与细胞迁移密切相关的信号通路 Rho 通路的作用研究的很少,已有报道表明, Rho 通路的抑制剂 Y27632 可以使乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞和 SUM1315 细胞的迁移能力下降^[12], Jo 等^[13]证实 MCF-7 细胞中 Rho 通路抑制剂 Y-27632 可以抑制由尿激酶型纤溶酶原激活剂 (urokinase-type plasminogen activator, uPA) 过表达引起 MCF-7 细胞的迁移能力的增加. Yang 等^[14]证实在 MCF-7 细胞中单独加入 Y27632, MCF-7 细胞的迁移能力下降, EMT 的特征标志基因的表达没有明显的变化. 本实验通过加在 MCF-7 细胞中加入 TGF- β 促使其发生 EMT 的同时加入 Rho 信号通路的抑制剂 Y27632,证明 Y27632 可以抑制 TGF- β 引起的 MCF-7 发生的 EMT 过程,间质细胞标志基因 N-cadherin、vimentin 表达下降;并且可以抑制 MCF-7 细胞由于 TGF- β 引起的迁移能力的增加,迁移标志基因 CYR61、MYL9 表达下降,细胞划痕愈合程度降低. 这些结果说明在 MCF-7 细胞中 Rho 信号通路抑制剂 Y27632 能够抑制 TGF- β 引起的 EMT 的过程. 研究^[15]报道在人视网膜色素上皮细胞中, TGF- β 通过 Smad3 诱导 RhoA 特异性鸟嘌呤交换因子 NET1 (neuroepithelial cell transforming 1) 的表达,进而激活 RhoA;在多种上皮细胞和成角质细胞中, TGF- β 可以快速激活 RhoA^[16-17]. 因此在 MCF-7 细胞中, TGF- β 可能通过激活 RhoA 活化 Rho 通路,进而促进 EMT 的发生,但是其具体机制还需要进一步的研究.

参考文献:

- [1] Nouhi Z, Chughtai N, Hartley S, et al. Defining the role of prolactin as an invasion suppressor hormone in breast cancer cells[J]. *Cancer Research*, 2006, 66(3): 1824-1832.
- [2] De Krijger I, Mekenkamp L J M, Punt C J A, et al. MicroRNAs in colorectal cancer metastasis[J]. *Journal of Pathology*, 2011, 224(4): 438-447.
- [3] 刘君君, 陈小松, 沈坤炜. 乳腺癌上皮间质转化与耐药关系的研究进展[J]. *肿瘤*, 2012, 32(11): 945-948.
- [4] Ivanovic V, Demajo M, Krtolica K, et al. Elevated plasma TGF- β 1 levels correlate with decreased survival of metastatic breast cancer patients[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 371(1/2): 191-193.
- [5] Zarzynska J M. Two faces of TGF-beta1 in breast cancer[J]. *Mediators of Inflammation*, 2014, 10: 1155-1171.
- [6] 来延奇, 林森森, 孙立, 等. TGF- β 对 EMT 的诱导及 EMT 抑制剂研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2012, 20(8): 1746-1749.
- [7] Luo Xuegang, Zhang Chunling, Zhao Wenwen, et al. Histone methyltransferase SMYD3 promotes MRTF-A-mediated transactivation of MYL9 and migration of MCF-7 breast cancer cells[J]. *Cancer Letters*, 2014, 344(1): 129-137.
- [8] Emre Y, Imhof B A. Matricellular protein CCN1/CYR61: A new player in inflammation and leukocyte trafficking[J]. *Seminars in Immunopathology*, 2014, 36(2): 253-259.
- [9] 辛灵艳, 范理宏. TGF- β 对肺癌细胞 EMT 的调节及 EMT 抑制剂的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2014, 22(3): 690-693.
- [10] Yu Jingshuang, Xie Furong, Bao Xin, et al. miR-300 inhibits epithelial to mesenchymal transition and metastasis by targeting Twist in human epithelial cancer[J]. *Molecular Cancer*, 2014, 13: 121.
- [11] 吴腾云, 张威, 曹冬梅. TGF- β 诱导上皮间充质转化的信号通路研究[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2011, 31(1): 81-86.
- [12] Liu Sijin, Robert H G, Scepansky E M, et al. Inhibition of rho-associated kinase signaling prevents breast cancer metastasis to human bone[J]. *Cancer Research*, 2009, 69(22): 8742-8751.
- [13] Jo M, Thomas K S, Somlyo A V, et al. Cooperativity between the Ras-ERK and Rho-Rho kinase pathways in urokinase-type plasminogen activator-stimulated cell migration[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(14): 12479-12485.