文章编号:1000-5404(2011)07-0671-04

论著

低氧诱导金属硫蛋白对甲状腺乳头状癌上皮间质转化的影响

贾朝莉,吴婷婷,龙方懿,刘智敏 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,分子医学与肿瘤研究中心)

【摘要】 **目的** 研究低氧诱导金属硫蛋白(metallothioneins, MTs)对甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的影响。**方法** 以人甲状腺乳头状癌NPA细胞为研究模型,将其分为正常氧组(21% O_2)、低氧组(5% O_2)和MTs-siRNA干扰低氧组,Western blot、RT-PCR方法检测各组细胞MTs、上皮细胞钙粘蛋白(E-cadherin)和间质细胞波形蛋白(Vimentin)的表达,Transwell/Matrigel方法检测各组细胞侵袭转移细胞数。**结果** 低氧可诱导NPA细胞表达MTs,并伴随有EMT标志性分子E-cadherin表达的下调和Vimentin表达的升高,侵袭细胞数由正常氧组15.6±2.8增加到40.3±5.1,迁移细胞数由25.1±5.6增加到48.7±7.6,均有统计学差异($P<0.01$);MTs靶向干扰可有效抑制低氧诱导的MTs蛋白表达,同时E-cadherin表达回升,Vimentin表达下降,侵袭细胞数仅增加到25.7±4.2,迁移细胞数仅增加到35.5±5.4,与低氧组比较均有统计学差异($P<0.05$)。**结论** 低氧所诱导表达的MTs对人PTC细胞发生EMT有促进作用,MTs靶向干扰可使EMT受到部分抑制。

【关键词】 金属硫蛋白;上皮间质转化;低氧;甲状腺乳头状癌
【中图法分类号】 R736.1;R364.4;R730.2 【文献标志码】 A

Hypoxia-induced metallothioneins promote epithelial-mesenchymal transition of human papillary thyroid carcinoma cells

Jia Chaoli, Wu Tingting, Long Fangyi, Liu Zhimin (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Molecular Medicine and Cancer, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To determine the effects of metallothioneins (MTs) induced by hypoxia on epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human papillary thyroid carcinoma NPA cells. **Methods** NPA cells were divided into 3 groups, normoxia (21% O_2), hypoxia (5% O_2) and hypoxia with MTs-siRNA. The expression levels of MTs, E-cadherin and Vimentin in the 3 groups of NPA cells were analyzed by Western blotting and RT-PCR. The invasion and metastasis potential of these groups were detected by Transwell/Matrigel assay. **Results** Hypoxia treatment led to inducible expression of MTs, down-regulated of E-cadherin and up-regulated Vimentin at the same time, which were marker molecules of EMT in NPA cells. Meanwhile, invasive cell population of hypoxia group was increased to 40.3±5.1 from 15.6±2.8 of normoxia group ($P<0.01$). Migrating cell population was increased to 48.7±7.6 from 25.1±5.6 of normoxia group ($P<0.01$). However, the inducible expression of MTs was effectively inhibited by transfection of MTs-siRNA vector in NPA cells, followed by increased expression of E-cadherin and decreased expression of Vimentin. Moreover, invasive and migrating cell population of the hypoxia group with MTs-siRNA were only increased to 25.7±4.2 and 35.5±5.4 ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of MTs induced by hypoxia can promote EMT in human papillary thyroid carcinoma. siRNA targeting MTs can partially inhibit EMT promoted by hypoxia.

【**Key words**】 metallothioneins; epithelial-mesenchymal transition; hypoxia; papillary thyroid carcinoma

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81072183) and the Key Project of Scientific Research of Chongqing Medical University (XBZD201002). Corresponding author: Liu Zhimin, E-mail: liuzm9999@yahoo.com.cn

近年来,全球甲状腺癌的发病率呈逐年上升趋势,甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)的升高尤为明显[1],是近年备受关注的肿瘤之一,也是内分泌系统肿瘤领域的研究热点。约有1/3的PTC患者发生颈部淋巴结转移,而高危地区和人群颈部淋巴结转移率甚至高达80%[2]。国外有学者认为,有颈部淋巴结转移者是无颈部淋巴结转移者复发危险性和

【基金项目】 国家自然科学基金(81072183);重庆医科大学重点科研项目(XBZD201002)
【通信作者】 刘智敏,E-mail:liuzm9999@yahoo.com.cn

死亡率的30倍[3]，因此PTC患者早期发生颈部淋巴转移和远处转移是导致其不良预后和死亡的主要原因。上皮间质转化（epithelial-mesenchymal transition，EMT）是具有极性的上皮细胞转变成具有活动能力、能够在细胞基质间自由移动的间质细胞的过程，是多种肿瘤侵袭转移的重要环节[4]。金属硫蛋白（metallothioneins，MTs）是一类非酶小分子多功能蛋白，具有高度可诱导性，在肿瘤前缘有侵袭性的细胞中表达增高，而低氧微环境是肿瘤侵袭转移的重要因素[5]。本研究以人PTC细胞为研究模型，用低氧处理、siRNA干扰和体外侵袭转移实验等方法研究低氧对MTs的诱导表达及其对PTC细胞发生EMT和侵袭转移的影响，阐明低氧微环境和MTs在PTC发生EMT和侵袭转移中所起的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人PTC细胞株NPA由香港中文大学George G. Chen教授惠赠。胎牛血清（FBS）、RPMI1640培养液（HyClone公司），Trizol、RIPA裂解液（碧云天生物技术有限公司），RT-PCR试剂盒、质粒提取试剂盒（大连宝生物工程有限公司），Transwell小室、Matrigel胶、纤维连接蛋白（美国BD公司），Lipofectamine2000（Invitrogen公司），兔抗人MTs、兔抗人E-cadherin、兔抗人Vimentin抗体（Abcam公司），兔抗人β-actin及HRP标记羊抗兔二抗（Santa Cruz公司），pGenesil-1质粒（晶赛公司），MT1和MT2各种功能亚型的RT-PCR引物设计序列、MTs-siRNA序列由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 细胞培养及分组

人PTC细胞株NPA复苏后用含10% FBS的RPMI1640培养液常规传代培养，取对数生长期细胞进行实验。将细胞分为正常氧组（21% O_2）、低氧组（5% O_2）和MTs-siRNA干扰低氧组。正常氧组细胞用含10% FBS的RPMI1640培养基，在含21% O_2、5% CO_2的孵箱中37 ℃常规培养；低氧组细胞在消化传代并贴壁后，转入含5% O_2、5% CO_2的孵箱中37 ℃培养；MTs-siRNA干扰低氧组细胞为MTs-siRNA表达载体转染细胞，同低氧组细胞培养。

1.3 MTs-siRNA的构建和转染

利用Invivogen公司Wizard在线软件针对低氧诱导PTC细胞株NPA表达的MT1A、E、F、X和MT2A功能亚型的编码序列，设计可以同时封闭这5种功能亚型翻译的“共用”MTs-siRNA。正义链：5′-AGAGUGCAAAUGCACCUCCUU-3′（21 bp），反义链：5′-GGAGGUGCAUUUGCACUCUUU-3′（21 bp）。将siRNA的单链退火，与pGenesil-1质粒连接，转化DH5α感受态细胞，挑取单菌落提取质粒，用Lipofectamine2000转染NPA细胞，48 h后检测MTs蛋白表达水平。

1.4 Western blot检测蛋白表达水平

提取正常氧组、低氧组、MTs-siRNA干扰低氧组48 h培养细胞总蛋白，经Bradford法定量后进行SDS-PAGE电泳，蛋白上样量为30 μg。将电泳后分离的蛋白电转至PVDF膜上，5%脱脂奶封闭1 h，加一抗4 ℃过夜，TBST洗3次，加入HRP标记的二抗，室温反应2 h，TBST洗3次，ECL发光压片显色。以β-actin为内参照。

1.5 RT-PCR分析MTs各功能亚型mRNA表达水平

MTs各种功能性异构体的Real-time PCR引物设计参照Mididoddi等[6]的方法稍作修改，根据MT1和MT2各种功能性异构体的5′和3′端非翻译区序列进行设计（表1）。提取低氧组48 h培养细胞总RNA，RT-PCR按照试剂盒说明书进行。扩增条件为：94 ℃预变性4 min，随后94 ℃ 30 s，58 ℃ 30 s，72 ℃ 45 s，共30个循环。PCR产物经15 g/L琼脂糖凝胶电泳后，用凝胶成像系统观察、拍照。

表1 MT1和MT2各种功能性异构体的Real-time PCR引物

基因	产物长度	Real-time PCR引物
MT1A	219 bp	上游 5′-CTCGAAATGGACCCCAACT-3′
		下游 5′-ATATCTTCGAGCAGGGCTGTC-3′
MT1B	287 bp	上游 5′-GCTTGTCTTGGCTCCACA-3′
		下游 5′-AGCAAACCGGTCAGGTAGTTA-3′
MT1E	246 bp	上游 5′-ATCCTCTGGGTCTGGGTTCT-3′
		下游 5′-CAGGTTGTGCAGGTTGTTCTA-3′
MT1F	232 bp	上游 5′-AGTCTCTCCTCGGCTTGC-3′
		下游 5′-ACATCTGGGAGAAAGGTTGTC-3′
MT1G	309 bp	上游 5′-CTTCTCGCTTGGGAACTCTA-3′
		下游 5′-AGGGGTCAAGATTGTAGCAAA-3′
MT1H	285 bp	上游 5′-CACCTCGGCTTGCAATGG-3′
		下游 5′-GCAAATGAGTCGGAGTTGTAG-3′
MT1X	217 bp	上游 5′-TCTCCTTGCCTCGAAATGG-3′
		下游 5′-CACAGCTGTCCTGGCATCA-3′
MT2A	259 bp	上游 5′-CCGACTCTAGCCGCCTCTT-3′
		下游 5′-GTGGAAGTCGCGTTCTTTACA-3′

1.6 体外侵袭实验

Transwell小室滤膜下室面涂纤维连接蛋白，上室面涂Matrigel基质胶，置超净工作台室温风干备用。将对数生长期的NPA细胞或MTs-siRNA转染NPA细胞制成 1×10^5/ml的单细胞悬液，取100 μl移入上室内，下室内加入400 μl含10% FBS的RPMI1640培养基，按分组要求分别在正常氧和低氧培养箱中培养48 h，每组重复3个样本。无菌下取出Transwell小室，棉签擦净小室上面细胞，用福尔马林固定下室面细胞30 min，苏木精轻度染色10 min，400倍光镜下取上下左右中方位5个视野计数，取均数表示侵袭细胞数。

1.7 体外迁移实验

Transwell小室上室面不铺Matrigel胶，其余步骤同侵袭实验。穿过滤膜的细胞为迁移细胞。

1.8 统计学分析

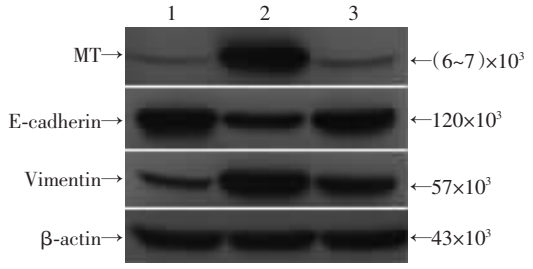
计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用SPSS 13.0软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 Western blot检测各组细胞MTs、E-cadherin和Vimentin的表达

低氧组中，MTs表达水平显著高于正常氧组及干扰低氧组；EMT标志性分子E-cadherin表达水平较正常氧组显著下降，而Vimentin表达水平较正常氧组显著升高。MTs-siRNA干

扰低氧组中,E-cadherin 表达水平较低氧组明显回升但略低于正常氧组,而 Vimentin 较低氧组表达下降但高于正常氧组。见图 1。

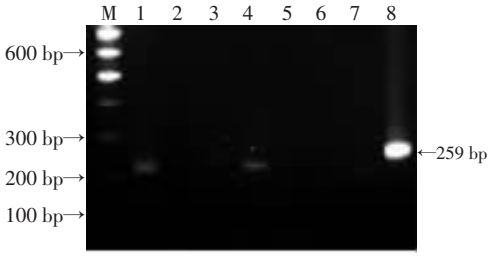


1:正常氧组 2:低氧组 3:MTs-siRNA 干扰低氧组

图 1 Western blot 检测各组细胞 MTs、E-cadherin 和 Vimentin 表达

2.2 RT-PCR 检测低氧诱导 MT1 和 MT2 各种功能亚型 mRNA 相对表达

RT-PCR 检测结果显示:低氧可诱导人 PTC 细胞株 NPA 表达 MT1A、MT1E、MT1F、MT1X 和 MT2A 亚型,其中 MT2A 表达最高(图 2)。



M:标准;1:MT1A 2:MT1B 3:MT1E 4:MT1F 5:MT1G 6:MT1H;7:MT1X 8:MT2A

图 2 RT-PCR 检测 MTs 各功能亚型的 mRNA 相对表达

2.3 Transwell/Matrigel 方法检测各组细胞侵袭迁移能力

低氧组侵袭细胞数从正常氧组的 15.6 ± 2.8 增加到 40.3 ± 5.1,迁移细胞数从 25.1 ± 5.6 增加到 48.7 ± 7.6,即低氧处理使人甲状腺乳头状癌 NPA 细胞的侵袭转移能力明显增强($P<0.01$);与低氧组比较,MTs-siRNA 干扰低氧组的侵袭细胞数仅增加到 25.7 ± 4.2,迁移细胞数仅增加到 35.5 ± 5.4,即 MTs-siRNA 干扰可使低氧增强的细胞侵袭转移力显著受到抑制($P<0.05$)。

3 讨论

肿瘤转移是指恶性肿瘤细胞脱离原发肿瘤灶,通过血管、淋巴管等转移方式,到达继发组织或器官得以继续增殖生长,形成与原发肿瘤相同性质的继发肿瘤的过程。肿瘤转移包括多个步骤,其中肿瘤细胞侵袭是其前提,而 EMT 在肿瘤细胞侵袭过程中起着重要作用。PTC 的前缘侵袭性细胞失去极性和粘附性,发生 EMT 转变[7],并显示出 E-cadherin 失去表达或表达降低,Vimentin 和 Fibronectin 获得表达[8]。此外,EMT 标志性分子 E-cadherin 失去表达或表达下调的 PTC 细胞具有更强的侵袭转移能力,与其恶性转变具有明显的相关性[9]。因此,研究阐明 PTC 发生 EMT 的分子机制,对于其侵袭转移的早期发现及其预后评估具有重要的作用和意义。

MTs 是一类非酶多功能小分子蛋白质,其氨基酸组成特点是半胱氨酸含量高达 30%。人体内包括 4 类 MT 异构体(MT1 ~ MT4),其中 MT1 和 MT2 是 MT 最主要的异构形式,具有高度可诱导性。由于基因序列的重复,MT1 具有多种亚型,而 MT2 目前也发现至少有 2 种。人 MTs 各种异构体亚型的基因集中位于 16q13,在此位点上至少有 10 个功能性(MT1A、B、E、F、G、H、X、MT2A、MT3 和 MT4)和 7 个非功能性的(MT1C、D、I、J、K、L 和 MT2B) MT 基因,只有功能性 MT 基因才能通过转录和翻译表达成有功能的蛋白质[5]。大部分哺乳动物细胞的生长、繁殖都需要基础水平的 MT 来完成金属调节过程[10]。MTs 在肿瘤前缘有侵袭性的细胞中表达增高,与肿瘤细胞侵袭性增强有关[5]。MT1 和 MT2 在乳腺、肾、肺、鼻咽、卵巢、前列腺、唾液腺、睾丸、膀胱、宫颈、子宫内膜、皮肤、胰腺等多种实体肿瘤及其黑色素瘤和急性淋巴白血病中表达增加,且与肿瘤的恶性程度、放化疗抗性和不良预后具有相关性[5]。关于 MTs 在甲状腺癌中的表达,有文献报道其表达在 PTC 组织中显著升高[11-12],但也有文献报道由于 MT 甲基化程度增高导致其表达下降[5]。前期研究发现 MT1 和 MT2 基因在甲状腺癌细胞中并非完全关闭,可以被重金属镉诱导表达,其中 MT1A、MT1F、MT1H、MT1G、MT1X、MT2A 是金属镉诱导甲状腺乳头状癌和未分化癌细胞表达的主要功能亚型,且随着这些亚型的诱导表达,进入 S 期的细胞增多,即 MT 的诱导表达可导致细胞周期移行[13-14]。

肿瘤的过渡生长使其处于相对低氧的微环境,而低氧微环境是肿瘤侵袭转移的重要因素。有研究报道,低氧可诱导前列腺癌、子宫鳞状癌细胞表达 MT2A,促进细胞增生[15-16]。本研究用低氧(5% O_2)处理 NPA 细胞 48 h,Western blot 方法检测到 MTs 大量诱导表达,并伴随有 EMT 标志性分子 E-cadherin 表达下调和 Vimentin 表达增加。由于 MT1 和 MT2 各功能亚型相对分子质量相近,在(6 ~ 7) × 10^3 范围内,且氨基酸序列同源性高(即抗原性基本相同),Western blot 方法不能将各亚型分开。随后,我们又用针对 MT1 和 MT2 各种功能亚型的特异性引物和常规 RT-PCR 方法,检测到低氧可诱导 NPA 细胞表达 MT1A、E、F、X 和 MT2A 功能亚型,其中 MT2A 明显是主要表达的功能亚型;同时,Transwell/Matrigel 体外侵袭转移实验显示侵袭细胞数及迁移细胞数均明显增加。即在低氧诱导 MTs 表达的同时,NPA 细胞的侵袭转移性增强。由于 MT1 和 MT2 各功能亚型的氨基酸序列以及

基因的编码序列具有高度的相似性，我们用siRNA序列设计软件针对低氧诱导人甲状腺乳头状癌NPA细胞表达的MT1A、E、F、X和MT2A功能亚型的编码序列，设计了可以同时封闭这5种功能亚型翻译的“共用”MTs-siRNA，并构建成表达载体转染NPA细胞，实验结果显示：这种“共用”MTs-siRNA表达载体转染NPA细胞可抑制绝大部分低氧诱导的MTs蛋白表达，侵袭细胞数和转移细胞数均较低氧组明显减少。与此同时，E-cadherin蛋白表达有所回升，而Vimentin蛋白的表达有所降低。这说明低氧可诱导人甲状腺乳头状癌细胞表达MT1和MT2的一些功能亚型，从而导致MTs蛋白积累，同时下调上皮细胞特性蛋白E-cadherin，上调间质细胞特性蛋白Vimentin，促进细胞侵袭、转移，抑制它们表达可以使EMT受到部分抑制。但低氧反应元件以及MTs是如何调节EMT相关蛋白（E-cadherin、Vimentin）等分子机制不清楚，尚待进一步研究。

参考文献：

[1] 陈竟文，宋陆军. 甲状腺癌的流行病学新特点[J]. 中国临床医学，2009，16(5)：812－813.

[2] Lee B J, Wang S G, Lee J C, *et al*. Level Ⅱb lymph node metastasis in neck dissection for papillary thyroid carcinoma[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2007, 133(10): 1028－1030.

[3] Mazzaferri E L. A vision for the surgical management of papillary thyroid carcinoma: extensive lymph node compartmental dissections and selective use of radioiodine[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94(4): 1086－1088.

[4] Thomson S, Buck E, Petti F, *et al*. Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cell lines and xenografts to epidermal growth factor receptor inhibition[J]. Cancer Res, 2005, 65(20): 9455－9462.

[5] Pedersen M O, Larsen A, Stoltenberg M, *et al*. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis[J]. Prog Histochem Cytochem, 2009, 44(1): 29－64.

[6] Mididoddi S, McGuirt J P, Sens M A, *et al*. Isoform-specific expression of metallothionein mRNA in the developing and adult human kidney[J]. Toxicol Lett, 1996, 85(1): 17－27.

[7] Bai Y, Kakudo K, Nakamura M, *et al*. Loss of cellular polarity/cohesiveness in the invasive front of papillary thyroid carcinoma and periostin expression[J]. Cancer Lett, 2009, 281(2): 188－195.

[8] Vasko V, Espinosa A V, Scouten W, *et al*. Gene expression and functional evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(8): 2803－2808.

[9] Hardy R G, Vicente-Duenas C, Gonzalez-Herrero I, *et al*. Snail family transcription factors are implicated in thyroid carcinogenesis[J]. Am J Pathol, 2007, 171(3): 1037－1046.

[10] 赵晓迎，韩方正. 金属硫蛋白研究进展[J]. 徐州医学院学报，2010，30(5)：349－350.

[11] 陈林兴，陈慎仁，陈泽钦，等. 甲状腺疾病中金属硫蛋白的表达检测及生物学意义[J]. 中华检验医学杂志，2005，28(9)：936－937.

[12] Cherian M G, Jayasurya A, Bay B H. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis[J]. Mutat Res, 2003, 533(1/2): 201－209.

[13] Liu Z M, Chen G G, Shum C K, *et al*. Induction of functional MT1 and MT2 isoforms by calcium in anaplastic thyroid carcinoma cells[J]. FEBS Lett, 2007, 581(13): 2465－2472.

[14] Liu Z M, Hasselt C A, Song F Z, *et al*. Expression of functional metallothionein isoforms in papillary thyroid cancer[J]. Mol Cell Endocrinol, 2009, 302(1): 92－98.

[15] Yamasaki M, Nomura T, Sato F, *et al*. Metallothionein is up-regulated under hypoxia and promotes the survival of human prostate cancer cells[J]. Oncol Rep, 2007, 18(5): 1145－1153.

[16] Azuma Y, Chou S C, Lininger R A, *et al*. Hypoxia and differentiation in squamous cell carcinomas of the uterine cervix: pimonidazole and involucrin[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(13): 4944－4952.

（收稿：2010-10-22 修回：2010-11-24）

（编辑 龙 亮）

欢迎订购《疑难先天性心脏病介入治疗与图解》



由宋治远、朱鲜阳、秦永文、张玉顺等教授主编的《疑难先天性心脏病介入治疗与图解》已于2011年1月由军事医学科学出版社正式出版。该书编者均为国内一流先天性心脏病介入治疗专家，具有丰富的临床经验，总结了临床常见及少见的疑难先天性心脏病介入治疗方法。全书共10章，收集了各种疑难先天性心脏病180例患者的800余幅影像资料，系统介绍了室间隔缺损、房间隔缺损、动脉导管未闭、主动脉缩窄以及复合畸形等复杂先天性心脏病介入治疗操作技巧与经验教训。本书贴近临床、图文并茂、形象具体、通俗易懂，既有临床操作技巧，又有经验教训分享，是一本难得的具有先进水平的临床参考书，相信会成为广大先天性心脏病介入治疗医师的良师益友。

本书定价198.00元，如需购买请与本刊编辑部联系。

联系人：王 红 **电话：**(023)68752189-84

E-mail：whong@mail.tmmu.com.cn