论著

文章编号:1000-5404(2012)02-0150-04

# 氯化钴对甲状腺乳头状癌NPA细胞上皮间质转化的影响及其机制

贾朝莉,龙方懿,刘智敏,杨俊艳,刘小花,董超然,王 妮 (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** 研究氯化钴($CoCl_2$)诱导的低氧对甲状腺乳头状癌NPA细胞上皮间质转化的影响,初步探讨HIF-1α在其中的机制。**方法** MTT检测$CoCl_2$(50、100、150、200、250 μmol/L)对细胞活力的影响,倒置显微镜观察低氧(150 μmol/L的$CoCl_2$分别作用0、12、24、48 h)对细胞形态的影响,Western blot检测低氧(150 μmol/L的$CoCl_2$分别作用0、3、6、12、24 h)对HIF-1α、E-cadherin和Vimentin表达的影响,Transwell法检测低氧(150 μmol/L的$CoCl_2$分别作用0、6 h)对细胞侵袭、转移的影响,用免疫荧光对HIF-1α蛋白进行亚细胞定位。**结果** 低氧模拟剂$CoCl_2$可抑制NPA细胞活力。随着$CoCl_2$低氧处理时间的延长,NPA细胞逐渐获得间质细胞的形态特征,HIF-1α、Vimentin表达在0~6 h逐渐增加,随后开始下降,E-cadherin表达持续降低,低氧0 h与6 h相比各蛋白表达均具有统计学差异($P<0.01$)。低氧组侵袭、转移细胞数目较对照组明显增加($P<0.01$),同时低氧组细胞HIF-1α发生核转位。**结论** $CoCl_2$模拟化学性低氧可促进NPA细胞上皮间质转化及侵袭、转移,其分子机制可能涉及HIF-1α介导的信号通路对E-cadherin、Vimentin基因表达的调控。

[关键词] 低氧诱导因子-1α;上皮间质转化;甲状腺乳头状癌

[中图法分类号] R363.25;R730.23;R736.1 [文献标志码] A

# $CoCl_2$ improves epithelial-mesenchymal transition of human papillary thyroid carcinoma cells

Jia Chaoli, Long Fangyi, Liu Zhimin, Yang Junyan, Liu Xiaohua, Dong Chaoran, Wang Ni (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 effect of $CoCl_2$ induced hypoxia on the epithelial-mesenchymal transition in human papillary thyroid carcinoma and investigate the role of HIF-1α in this process. Methods Cell vitality was evaluated by MTT assay in human papillary thyroid carcinoma NPA cells after the treatment of 50, 100, 150, 200 and 250 μmol/L $CoCl_2$. Morphological changes of NPA cells were observed by inverted microscopy after 150 μmol/L $CoCl_2$ treatment for 0, 12, 24 and 48 h. The expression levels of HIF-1α, E-cadherin and Vimentin were analyzed by Western blotting in NPA cells after 150 μmol/L $CoCl_2$ treatment for 0, 3, 6, 12, and 24 h. The invasion and metastasis potential in NPA cells after 150 μmol/L $CoCl_2$ treatment for 0 and 6 h was detected by Transwell assay. Immunofluorescence was used to detect the location of HIF-1α in NPA cells. Results $CoCl_2$ treatment resulted in suppression of NPA cell vitality in a dose-dependent manner. The longer $CoCl_2$ was treated, NPA cells gradually acquired the morphological characteristics of mesenchymal cells. The expression of HIF-1α, E-cadherin and Vimentin was gradually enhanced in 0 to 6 h after treatment, and then declined, especially in E-cadherin. Significant differences were found in the expression levels of these proteins at 0 h and 6 h ($P<0.01$). There were more cells that penetrated through the Transwell membrane in hypoxia group than in normoxic group ($P<0.01$). HIF-1α translocated to the nucleus in hypoxia group, while it didn't occur in normoxia group. Conclusion $CoCl_2$ treatment, which mimics chemical hypoxia improves the epithelial-mesenchymal transition, invasion and migration of NPA cells, which might be due to that HIF-1α mediated signal pathway regulates E-cadherin and Vimentin.

[**Key words**] hypoxia-inducible factor-1α; epithelial-mesenchymal transition; papillary thyroid carcinoma

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81072183);重庆市自然科学基金重点项目(CSTC,2011BA5038);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

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81072183), the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011BA5038) and the Key Project of Scientific Research of Chongqing Medical University (XBZD201002). Corresponding author: Liu Zhimin, E-mail: liuzm9999@yahoo.com.cn

甲状腺癌是内分泌系统最常见的恶性肿瘤,其发病率在内分泌肿瘤和头颈肿瘤中均高居首位[1]。近年来,全球甲状腺癌的发病率逐年上升,其中绝大部分由甲状腺乳头状癌(papillary thyroid cancer, PTC)所致[2]。PTC 虽然是一种分化较好的肿瘤,但约有 1/3 的患者在疾病早期会出现颈部淋巴结转移和远处转移,从而导致患者不良预后或死亡。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,上皮特性的丢失和间质细胞特性的获得是其主要特征[3]。EMT 是 PTC 侵袭转移中的重要环节,因此研究 PTC 中 EMT 发生的分子机制对该型肿瘤淋巴结转移的早期发现具有重要意义。低氧是实体肿瘤的共同特征之一。本实验应用 $CoCl_2$ 建立 PTC 低氧细胞模型,通过检测细胞低氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible facter-1α, HIF-1α)、上皮细胞钙粘蛋白(E-cadherin)、间质细胞特征性蛋白波形蛋白(Vimentin)及侵袭转移等相关指标,对 $CoCl_2$ 低氧与 PTC 细胞 EMT 及侵袭转移的关系及分子机制进行初步探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

人甲状腺乳头状癌细胞株 NPA 由香港中文大学 George G. Chen 教授惠赠。胎牛血清(杭州四季青公司)、RPMI1640 培养液(Gibco),$CoCl_2$(Geneview),RIPA 裂解液(碧云天生物技术有限公司),Transwell 小室(Millipore),ECM(extracellular matrix)基质胶(Sigma),兔抗人 E-cadherin、兔抗人 Vimentin 抗体(Bioworld),兔抗人 HIF-1α(millipore),兔抗人 β-actin、羊抗鼠普通二抗和羊抗兔普通二抗、荧光二抗(中杉金桥)。

### 1.2 细胞培养

人甲状腺乳头状癌细胞株 NPA 复苏后采用 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液,在含 21% $O_2$、5% $CO_2$ 的孵箱中 37 ℃培养,常规换液传代,取对数生长期细胞进行实验。低氧造模:细胞在消化传代贴壁后,更换含 $CoCl_2$ 的培养液后在常氧条件下继续培养。

### 1.3 MTT 法检测细胞活力

将对数期 NPA 细胞接种于 96 孔板,待细胞贴壁后更换含不同浓度 $CoCl_2$(0、50、100、150、200、250 μmol/L)的培养基,继续培养 24 h,每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20 μl 避光孵育4 h,小心吸去上清,加入 200 μl 的 DMSO 溶液,低速振荡 10 min 以溶解结晶体,在酶标仪 490 nm 波长下测定各孔光密度值[$D$(490)]。以不含 $CoCl_2$ 的孔为正常对照,以只含培养液的孔为空白对照,每组设置 7 个复孔,去掉最高值和最低值后取均值。

细胞存活率 = [$CoCl_2$ 组 $D$(490) − 空白组 $D$(490)]/[正常组 $D$(490) − 空白组 $D$(490)] × 100%

### 1.4 细胞形态学观察

150 μmol/L $CoCl_2$ 处理细胞不同时间(0、12、24、48 h)后,倒置显微镜下观察各组细胞形态变化。

### 1.5 免疫印迹

150 μmol/L $CoCl_2$ 处理细胞不同时间(0、3、6、12、24 h)后,提取各组细胞总蛋白、BCA 法定量,以 50 μg/孔上样,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。将电泳分离的蛋白电转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶室温封闭 1 h,加一抗(1∶1 000)4 ℃过夜,TBST 洗 3 次,二抗(1∶2 000)37 ℃孵育 1 h,TBST 洗 3 次,ECL 发光显影,扫描后采用 quantity one 进行灰度值分析。

### 1.6 Transwell 侵袭实验和迁移实验

侵袭实验:将 Matrigel 胶按 40 μl/小室均匀的铺在 Transwell 小室滤膜上层,置 37 ℃孵箱水化成胶。将各组细胞消化离心后调整细胞数为 $1 \times 10^5$/ml,分别取 200 μl 接种到成胶的小室内,将小室放入 24 孔板(内有 500 μl 含 15% FBS 的 RPMI1640 培养基),培养 24 h 后取出 Transwell 小室,用棉签轻轻擦净小室内的基质胶和细胞,多聚甲醛固定 15 min,风干后结晶紫染色 10 min,显微镜下随机选取 3 个视野计数,取均数表示侵袭细胞数。迁移实验:小室上室面不铺 Matrigel 胶,其余步骤同侵袭实验。

### 1.7 免疫荧光

将 NPA 细胞接种于 24 孔板中爬片,待细胞贴壁后加 $CoCl_2$(终浓度为 150 μmol/L),继续培养 6 h 后 PBS 清洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 15 min,PBS 清洗 3 次,Triton-X100 透化 10 min,PBS 清洗 3 次,山羊血清室温封闭 20 min,加 HIF-1α 一抗(1∶80)4 ℃过夜,PBS 清洗 3 次,加荧光二抗(1∶400)室温孵育 1 h,PBS 清洗 3 次,50% 甘油封片,激光共聚焦显微镜观察拍照。

### 1.8 统计学分析

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析。

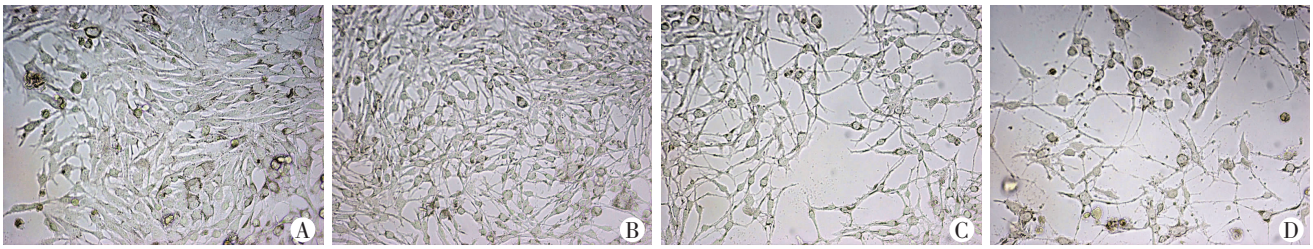
## 2 结果

### 2.1 $CoCl_2$ 低氧对细胞活力的影响

MTT 结果显示,以 50、100、150、200、250 μmol/L 的 $CoCl_2$ 刺激 NPA 细胞 24 h 后,细胞存活率分别为(104.2 ± 3.3)%、(92.6 ± 2.9)%、(90.6 ± 3.3)%、(88.0 ± 4.8)%、(58.6 ± 5.7)%。表明低氧模拟剂 $CoCl_2$ 对 NPA 细胞的生长具有抑制作用,且呈浓度依赖性。

### 2.2 $CoCl_2$ 低氧不同时间对细胞形态的影响

经 150 μmol/L 的 $CoCl_2$ 分别处理 0、12、24、48 h 后,细胞逐渐纤细呈纺锤形,向成纤维细胞形态转变,12 h 时细胞数量明显减少,胞间空隙增加(图 1)。

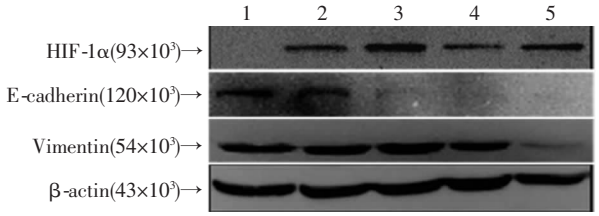



A:低氧0 h; B:低氧12 h; C:低氧24 h; D:低氧48 h

**图1 150 μmol/L $CoCl_2$处理不同时间对细胞形态的影响**(倒置显微镜 ×100)

### 2.3 $CoCl_2$低氧不同时间对HIF-1α、E-cadherin、Vimentin蛋白表达的影响

Western blot检测结果显示,HIF-1α、Vimentin的表达在0~6 h随低氧处理时间的延长而升高,6 h达到峰值后开始减弱,E-cadherin随着低氧处理时间的延长而逐渐丢失,低氧0 h与低氧6 h相比各蛋白表达均具有统计学差异($P<0.01$)。见图2、表1。




1:低氧0 h; 2:低氧3 h; 3:低氧6 h; 4:低氧12 h; 5:低氧24 h

**图2 Western blot检测低氧处理不同时间E-cadherin、Vimentin和HIF-1α的表达**

**表1 150 μmol/L $CoCl_2$处理对NPA细胞HIF-1α、E-cadherin、Vimentin表达的影响**($\bar{x}\pm s$)

| 低氧时间 | HIF-1α | E-cadherin | Vimentin |
|---|---|---|---|
| 0 h | 0.002±0.001 | 0.070±0.003 | 0.427±0.008 |
| 6 h | 0.047±0.002[a] | 0.025±0.004[a] | 0.572±0.009[a] |

a: $P<0.01$,与低氧0 h比较

### 2.4 $CoCl_2$低氧对细胞侵袭力和迁移力的影响

低氧6 h组中穿膜细胞数显著多于低氧0 h组($P<0.01$),即低氧使人甲状腺乳头状癌NPA细胞的侵袭、迁移能力明显增强(表2)。

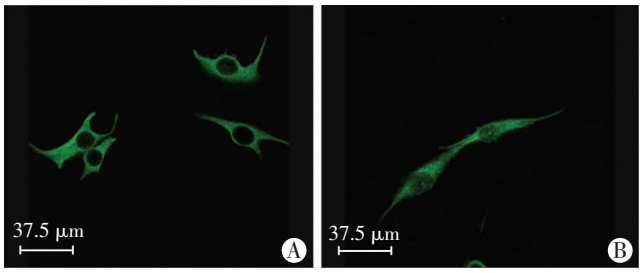
**表2 150 μmol/L $CoCl_2$处理对甲状腺乳头状癌NPA细胞侵袭转移性的影响**($\bar{x}\pm s$)

| 低氧时间 | 侵袭细胞数 | 转移细胞数 |
|---|---|---|
| 0 h | 15.6±2.8 | 25.1±5.6 |
| 6 h | 40.3±5.1[a] | 48.7±7.6[a] |

a: $P<0.01$,与低氧0 h比较

### 2.5 免疫荧光检测$CoCl_2$低氧处理时HIF-1α的核转位

通过激光共聚焦显微镜可见:对照组中HIF-1α几乎完全表达于细胞质中;而150 μmol/L的$CoCl_2$低氧处理6 h后HIF-1α在细胞质、细胞核中均有表达;此外,低氧组细胞较对照组发生了明显的形态学变化,细胞呈典型的纤维细胞形态(图3)。




A: 低氧0 h;B: 低氧6 h

**图3 免疫荧光检测低氧时HIF-1α的核转位** (激光共聚焦显微镜)

## 3 讨论

肿瘤细胞的过度生长常常使其处于相对低氧的微环境,因而部分癌组织中氧浓度较正常组织明显偏低,这已在乳腺癌、前列腺癌、宫颈癌等肿瘤组织中得到证实[4]。肿瘤低氧是放化疗成功的主要障碍,HIF-1在肿瘤低氧的细胞应答中起着关键作用[5]。本实验以FTC细胞株NPA为研究对象,采用$CoCl_2$建立低氧细胞模型,采用MTT法检测不同浓度$CoCl_2$对细胞活力的影响,根据该实验结果及参考文献[6-8]选定150 μmol/L的$CoCl_2$模拟细胞低氧。在$CoCl_2$作用下,NPA细胞感受到缺氧信息[9],HIF-1α表达在0~6 h内逐渐增加(图2)。$CoCl_2$可促使肿瘤抑制基因产物(von Hippel-Lindan, VHL)同HIF-1α分离,从而阻止HIF-1α泛素化降解[10],这可能就是胞内HIF-1α蛋白含量明显增加的原因。但由于$CoCl_2$的毒性作用会随着处理时间的延长而增强(图1C、D),因此6 h后HIF-1α蛋白稳定性又开始下降。

EMT本是胚胎发育时期的重要生理现象,却可在创伤愈合、器官纤维化及肿瘤恶化等过程中重新出现[11]。最近有研究报道,PTC的前缘侵袭性细胞失去极性和粘附性,发生EMT转变[3],并显示出E-cadherin失去表达或表达降低,Vimentin和Fibronectin获得表达[12]。在NPA细胞中,E-cadherin蛋白的表达随着$CoCl_2$处理时间的延长而降低(图2),使胞间粘附力降低,利于细胞脱离原始灶,发生局部浸润和远处转移

(表2)。在甲状腺癌中,E-cadherin 表达的下调可能是由 Snail、SIP1 等转录因子介导[13]。同时,NPA 细胞中 Vimentin 蛋白的表达随着 $CoCl_2$ 处理时间的延长而升高(图2),使细胞骨架发生改变,向纺锤形纤维细胞形态转换(图 1),易于细胞迁移运动(表 2)。Singh 等[14]认为,Vimentin 可能通过作用于其他蛋白或者影响细胞侵袭过程较晚的阶段才能最终改变细胞的迁移能力。

虽然低氧会杀死一些肿瘤细胞[4],但 HIF-1 可以调节肿瘤细胞生长,最终有利于恶性肿瘤细胞的存活[15],同时存活下来的优势细胞群具有更强的侵袭倾向。Transwell 体外侵袭、迁移实验结果显示,低氧有利于 NPA 细胞的侵袭和转移。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[13],这与本实验结果相符。在肿瘤细胞中,转录调节因子 HIF-1α 可激活多达 200 种基因,这些基因编码的蛋白质可以调节细胞代谢、增殖、迁移及血管生成等诸多生理活动[16]。那么,HIF-1 是否参与了 PTC 细胞 EMT 及侵袭、转移相关基因的调节呢? 我们尝试用免疫荧光对 HIF-1α 进行亚细胞定位,发现在低氧组中有更多的 HIF-1α 进入细胞核(图 3),提示 HIF-1α 转录功能的发挥已成为可能。

体内外研究表明,在甲状腺癌中 Snail、Slug 通过下调 E-cadherin 促进 EMT 的发生和肿瘤的侵袭转移[13]。在卵巢癌中低氧激活 HIF-1,通过上调 Snail 和 Slug 而抑制 E-cadherin,导致卵巢癌细胞发生 EMT 和侵袭转移[17]。近期也有研究报道,HIF-1α 是低氧诱导 Vimentin、α-SMA 等间质细胞特征性蛋白表达所必需的[18]。本实验研究结果显示,在 HIF-1α 高表达时,E-cadherin 表达下降而 Vimetin 表达增加;在 HIF-1α 低表达时,Vimentin 表达也随之降低。综上,我们推测 HIF-1α 可能作为转录调节因子,通过调节 Snail 转录因子而调节 E-cadherin 表达,同时诱导 Vimentin 表达增加,从而促进 PTC 细胞株 NPA 发生 EMT 转化,为其局部侵袭和远处转移提供支持。但是,HIF-1α 调节 EMT 的具体机制还需要进一步的实验研究证实。

**参考文献:**

[1] 杨焕东, 刘全凤. 分化型甲状腺癌的诊治进展[J]. 医学综述, 2008, 14(19): 2940 – 2942.

[2] 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.

[3] 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.

[4] Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome[J]. Cancer Metastasis Rev, 2007, 26(2): 225 – 239.

[5] Wang R, Zhou S, Li S. Cancer therapeutic agents targeting hypoxia-inducible factor-1[J]. Curr Med Chem, 2011, 18(21): 3168 – 3189.

[6] Wang X, Li C, Chen Y, *et al*. Hypoxia enhances CXCR4 expression favoring microglia migration *via* HIF-1alpha activation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 371(2): 283 – 288.

[7] Guo Y, Yang M C, Weissler J C, *et al*. PLAGL2 translocation and SP-C promoter activity-a cellular response of lung cells to hypoxia[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 360(3): 659 – 665.

[8] 牛慧娟, 戴平, 杨中林. 葛根素对二氯化钴造成 PC12 细胞缺氧损伤的保护作用[J]. 海峡药学, 2011, 23(3): 190 – 192.

[9] 李明洋, 傅仲学, 吴星烨, 等. 间歇性缺氧对 SW480 细胞生长及 HIF-1α 表达的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(7): 873 – 876.

[10] Chavez J C, LaManna J C. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in the rat cerebral cortex after transient global ischemia: potential role of insulin-like growth factor-1[J]. J Neurosci, 2002, 22(20): 8922 – 8931.

[11] Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells[J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1417 – 1419.

[12] 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 USA, 2007, 104(8): 2803 – 2808.

[13] 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.

[14] Singh S, Sadacharan S, Su S, *et al*. Overexpression of vimentin: role in the invasive phenotype in an androgen-independent model of prostate cancer[J]. Cancer Res, 2003, 63(9): 2306 – 2311.

[15] Harris A L. Hypoxia-a key regulatory factor for tumour growth[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(1): 38 – 47.

[16] Messmer-Blust A, An X, Li J. Hypoxia-regulated angiogenic inhibitors[J]. Trends cardiovasc Med, 2009, 19(8): 252 – 256.

[17] Kurrey N K, K A, Bapat S A. Snail and Slug are major determinants of ovarian cancer invasiveness at the transcription level[J]. Gynecol Oncol, 2005, 97(1): 155 – 165.

[18] Zhou G, Dada L A, Wu M, *et al*. Hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition requires mitochondrial ROS and hypoxia-inducible factor 1[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009, 297(6): L1120 – L1130 .

(**收稿**:2011-08-31;**修回**:2011-11-04)

(编辑 汪勤俭)