论著

文章编号:1000-5404(2014)04-0360-04

# TCF4对人皮肤鳞状细胞癌A431细胞株生物学行为的影响

刘 燕,熊 亚,宋志强,沈 柱,郝 飞,杨希川 (400038 重庆,第三军医大学西南医院皮肤科,重庆市皮肤性病研究所)

[摘要] **目的** 探讨T细胞因子4(T cell factor 4, TCF4)小干扰RNA(siRNA)对人皮肤鳞状细胞癌A431细胞株TCF4基因表达的抑制作用及对细胞增殖、迁移、侵袭及周期的影响。**方法** 转染TCF4 siRNA至A431细胞株。应用RT-PCR检测A431细胞TCF4 mRNA的表达,Western blot检测TCF4蛋白的表达,CCK-8方法检测上述各组细胞增殖率(1、2、3、4 d及5 d),小室迁移实验检测细胞迁移情况,Transwell实验检测侵袭情况,流式细胞仪检测细胞周期(24 h)。**结果** 与未转染A431细胞株和转染空载体的A431细胞株比较,转染TCF4 siRNA表达载体1、2、3、4 d及5 d的细胞增殖率明显降低($P<0.05$);TCF4 siRNA表达载体组细胞迁移和侵袭能力明显下降($P<0.05$);细胞周期分析发现转染TCF4 siRNA使得A431细胞株出现明显的$G_2$/M期阻滞现象。**结论** 采用TCF4特异性siRNA能够抑制皮肤鳞状细胞癌TCF4的表达,从而抑制皮肤鳞状细胞癌的增殖。

[关键词] TCF4;鳞状细胞癌;增殖;凋亡;Wnt/β-catenin信号通路

[中图法分类号] R394.3;R730.23;R739.5 [文献标志码] A

# Effect of TCF4 on biological behavior of human squamous carcinoma A431 cells

Liu Yan, Xiong Ya, Song Zhiqiang, Shen Zhu, Hao Fei, Yang Xichuan (Department of Dermatology, Chongqing Institute of Dermatovenereology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the effects of T cell factor 4 (TCF4) siRNA on TCF4 gene expression, and the migration, invasion and cell cycle of human squamous carcinoma A431 cells. Methods A431 cells were transfected with TCF4 siRNA liposome. The mRNA expression of TCF4 in A431 cells was detected by RT-PCR. The expression of TCF4 protein was detected by Western blotting. The proliferation, migration, and invasion activities and cell cycle of A431 cells were measured by CCK-8 assay, chamber cell migration assay, transwell chamber test and flow cytometry, respectively. Results TCF4 siRNA transfection could inhibit significantly the expression of TCF4 mRNA and protein in A431 cells. The rates of cell proliferation and abilities of migration and invasion were also significantly decreased after TCF4 siRNA transfection. In addition, analysis of cell cycle demonstrated a marked $G_2$/M arrest of the A431 cells treated with TCF4 siRNA. Conclusion It is concluded that TCF4 siRNA can inhibit proliferation of human squamous carcinoma cells, which may provide a rational approach in clinical therapy for human squamous carcinoma.

[**Key words**] TCF4; human squamous carcinoma; proliferation; apoptosis; Wnt/β-catenin signal way

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81271771). Corresponding author: Yang Xichuan, Tel: 86-23-68754367, E-mail: doctoryxc@qq.com

皮肤鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma, SCC)是起源于表皮和皮肤附属器角质形成细胞的一种皮肤恶性肿瘤,恶性程度高、生长迅速、易发生转移,目前病因仍不清楚[1]。经典的Wnt信号通路即Wnt/β-catenin信号通路在生物的结构形成、细胞分化、形态发生和肿瘤演进等方面起着重要作用[2]。T细胞因子4(T cell factor4, TCF4)是Wnt/β-catenin信号通路的核内信号因子,对转录调控起分子开关的作用[3-5]。近年研究报道,TCF4在肺癌、肾癌、结肠癌、胃癌、肝癌等肿瘤发生过程中表达明显增强,异常升高的TCF4刺激下游靶基因表达是这些肿瘤发生过程中共同的早期事件[6-9]。本研究通过针对TCF4的小干扰RNA表达载体,观察转染后对人皮肤鳞状细胞癌A431细胞株TCF4基因表达的抑制作用及对细胞增殖、迁移、侵袭

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81271771)

[通信作者] 杨希川,电话:(023)68754367,E-mail: doctoryxc@qq.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131127.1108.003.html(2013-11-27)

及周期的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与材料

DMEM 培养液、胎牛血清(FBS)、磷酸盐缓冲液(PBS)、0.25% 胰酶消化液购自 HyClone 公司,脂质体 Lipofectamine2000 reagent 购自 Invitrogen 公司。Si-h-TCF4 购自锐博公司,TRIzoL RNA 抽提试剂、逆转录试剂盒均购自天根公司。细胞小室 24 孔 Millicell 购自 Millipore 公司。

### 1.2 细胞培养

人皮肤鳞状细胞癌细胞株 A431 购自中国科学院上海细胞生物研究所,于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基、5% $CO_2$ 和 37 ℃孵箱中孵育。

### 1.3 转染 A431 细胞株

Control siRNA 及 TCF4 siRNA 均采用脂质体 Lipofectamine 2000 进行转染。分别设 TCF4 siRNA 组,control siRNA 组和未转染组。转染 1、2、3、4 d 及 5 d 后 CCK-8 检测,提取 RNA、蛋白进行检测。

### 1.4 RT-PCR 检测 TCF4 mRNA 表达

常规收集未转染 A431 细胞株组、转染 control siRNA 组、转染 TCF4 siRNA 组的细胞,TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,紫外分光光度法定量。取 4 μg 总 RNA 用逆转录酶进行逆转录合成 cDNA,PCR 扩增 TCF4 和 β 肌动蛋白。以 β 肌动蛋白为内参,分别取 2 μg cDNA 模板进行 PCR 反应,TCF4 上游引物为:5′-CGGCGGTGGAGGGGATGAC-3′,下游引物为:5′-GGCCGCTTCT-TCCAAACTTTCC-3′。反应条件:94 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s ,共进行 35 个循环。取 PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下照相并行扫描分析,以 TCF4/β 肌动蛋白(β-actin)表达水平行半定量分析。

### 1.5 Western blot 检测 TCF4 蛋白表达

收集细胞,加入细胞裂解液,4 ℃ 12 000 × *g* 离心 15 min,取上清液做蛋白电泳,紫外分光光度法行蛋白定量。取适量总蛋白,在 5% 浓缩胶中进行电泳分离后,电转移法将蛋白质转移至二氟化树脂(PVDF)膜,TBST 洗膜 3 次,依次加入一抗,4 ℃ 摇床过夜,二抗摇床摇 2 h,TBST 充分漂洗(10 min × 3)次后,显色,曝光后 X 线片通过 HPIAS 图像分析系统半定量分析。

### 1.6 CCK-8 方法检测细胞增殖性

实验分 A431 未转染组、A431 转染 control siRNA 组、A431 转染 TCF4 siRNA 组,分别接种于 96 孔培养板,每孔 100 μL ($3 \times 10^4$/mL),共接种 15 孔。培养 24 h 后转染 control siRNA 和 TCF4 siRNA。分别于转染后 1、2、3、4 d 及 5 d 检测。检测时,每孔加入 90 μL DMEM/高糖培养基和 10 μL CCK-8,再取 3 个没有接种细胞的孔加入相同量的培养基和 CCK-8 作为空白对照,放细胞培养箱孵育 2 h 后,用酶标仪读取各孔光密度值。

### 1.7 TCF4 对细胞迁移的影响检测

A431 细胞转染后 24 h,取出细胞制备单细胞悬液,密度为 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL。取出 3 个细胞小室放入 24 孔板中,根据实验分为 A431 未转染组、A431 转染 control siRNA 组、A431 转染 TCF4 siRNA 组。每个细胞小室加入对应分组稀释后的细胞悬液 100 μL(即每孔细胞数为 $1 \times 10^5$ 个),细胞小室的下室加入 500 μL 10% 胎牛血清的 DMEM/高糖完全培养基,放细胞培养箱培养 10 h 后小心取出细胞小室,PBS 浸泡洗涤 2 次,用预冷的 80% 乙醇固定 25min,PBS 浸泡洗涤 2 次,伊红染色 20 s,PBS 快速洗涤。取出小室放入盛有 3 mL PBS 的 6 孔板中。倒置荧光显微镜下随机取 6 个视野照相、计数(200 倍),取平均数。

### 1.8 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

-20 ℃保存 Matrigel 胶在 4 ℃冰箱过夜融化。在冰上用预冷的枪头吸取 40 μL Matrigel 胶加入冰预冷的 80 μL 无血清培养基中,充分混均。取稀释的 Matrigel 胶 30 μL 加入细胞小室上室,覆盖整个聚碳酯膜,37 ℃,30 min,取出培养板,将小室四周多余的稀释 Matrigel 胶吸掉,再放入 37 ℃使 Matrigel 胶聚合成胶备用。拿出已铺上 Matrigel 胶的细胞小室,每个细胞小室加入对应分组稀释后的细胞悬液 100 μL(即每孔细胞数为 $1 \times 10^5$ 个);细胞小室的下室加入 500 μL 10% 胎牛血清的 DMEM/高糖完全培养基,放细胞培养箱培养 24 h 后拿出固定后并染色。倒置荧光显微镜下随机取 6 个视野照相、计数(200 倍),取平均数。

### 1.9 流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡

A431 细胞转染 48 h 后做细胞周期检测。PBS 重悬细胞(约 $1 \times 10^6$ 个细胞),75% 乙醇固定, PBS 重悬细胞,加入 150 μL RNAase,37 ℃孵育 40 min 后加入 200 μL PI,4 ℃孵育 2 h,流式细胞仪检测。ModfitLT for Mac 3.0 软件分析。

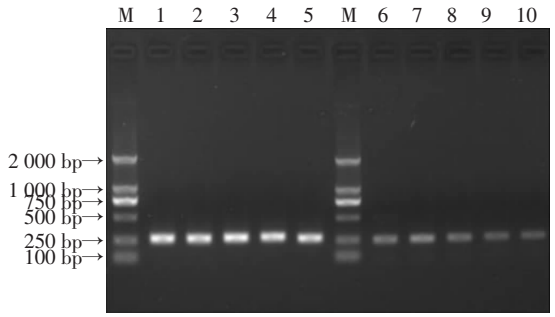
### 1.10 统计学分析

实验数据采用 SPSS 18.0 进行方差分析,*t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 TCF4 siRNA 下调 A431 细胞 TCF4 mRNA 的表达

转染 TCF4 siRNA 载体后,A431 细胞株 TCF4 mRNA 表达量为转染 control siRNA 组的(35.0 ± 2.0) %,而 A431 未转染组及 A431 转染 control siRNA 组 TCF4 mRNA 表达量相同,表明 TCF4 siRNA 具有抑制 TCF4 基因 mRNA 表达的作用。见图 1。

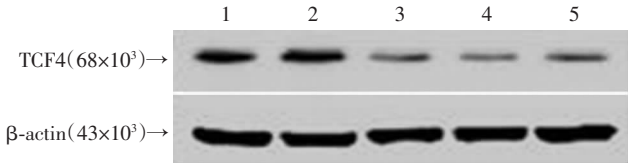



1、6:未转染组;2、7:转染 control siRNA 组;3、8:转染 TCF4 siRNA001 组;4、9:转染 TCF4 siRNA002 组;5、10:转染 TCF4 siRNA003 组;1 ~ 5:β-actin;6 ~ 10:TCF4;M:标准

**图 1 RT-PCR 检测各组转染 TCF4 siRNA 载体后 A431 细胞株 TCF4 mRNA 表达**

### 2.2 TCF4 siRNA 下调 A431 细胞 TCF4 蛋白的表达

转染 TCF4 siRNA 载体后，A431 细胞株 TCF4 蛋白表达量较 A431 未转染组及 A431 转染 control siRNA 组明显下降，而 A431 未转染组及 A431 转染 control siRNA 组 TCF4 蛋白表达量相同，表明 TCF4 siRNA 具有抑制 TCF4 蛋白表达的作用。见图2。




1：未转染组；2：转染 control siRNA 组；3：转染 TCF4 siRNA001 组；4：转染 TCF4 siRNA002 组；5：转染 TCF4 siRNA003 组

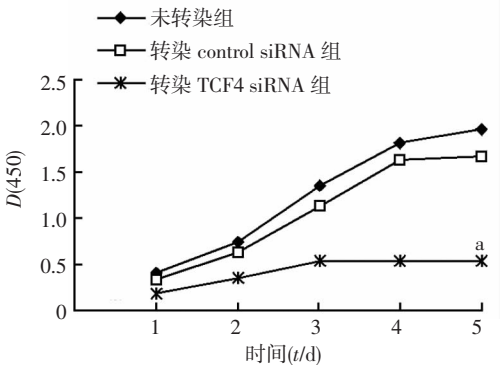
**图2 Western blot 检测转染 TCF4 siRNA 载体后 A431 细胞株 TCF4 蛋白表达**

### 2.3 TCF4 siRNA 抑制细胞增殖活性

未转染组、转染 control siRNA 组及转染 TCF4 siRNA 组细胞在1、2、3、4 d 及5 d 用 CCK-8 法检测细胞增殖活性的实验结果见图3。结果显示，转染 TCF4 siRNA 组细胞增殖活性明显降低，而转染 control siRNA 组的细胞增殖活性只比未转染组稍低，说明转染 TCF4 siRNA 的细胞株相对于转染 control siRNA 的细胞株有明显抑制作用（$P<0.05$）。

### 2.4 细胞迁移及侵袭检测结果

未转染组、转染 control siRNA 组及转染 TCF4 siRNA 组细胞用 Transwell 实验检测细胞迁移及侵袭能力，HE 染色，取6个不同200倍视野下穿过的细胞个数，实验结果见图4、5。结果显示，转染 TCF4 siRNA 组细胞迁移力和侵袭力明显降低，而转染 control siRNA 组的细胞迁移力及侵袭力与未转染组相同。提示转染 TCF4 siRNA 的细胞株相对于转染 control siRNA 的细胞株对细胞迁移能力和侵袭能力有明显抑制作用（$P<0.05$）。

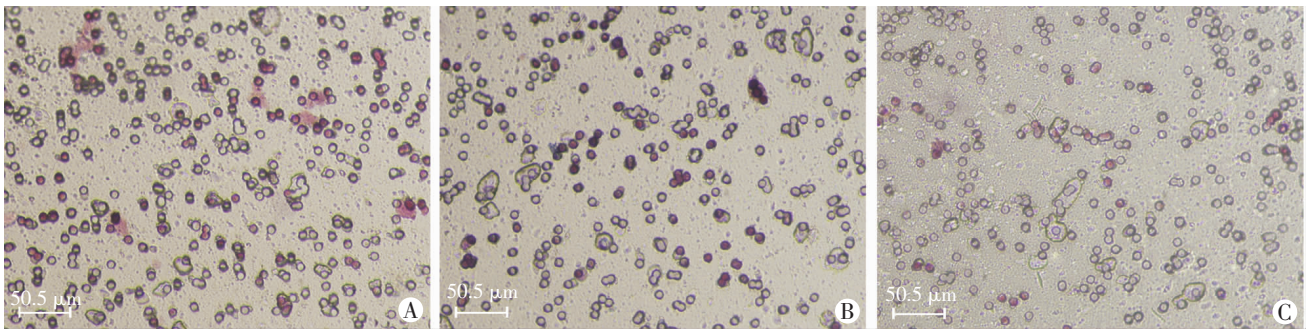



a：$P<0.05$，与未转染组和转染 control siRNA 组比较

**图3 CCK-8 法检测不同细胞组1、2、3、4 d 及5 d 细胞增殖活性变化**

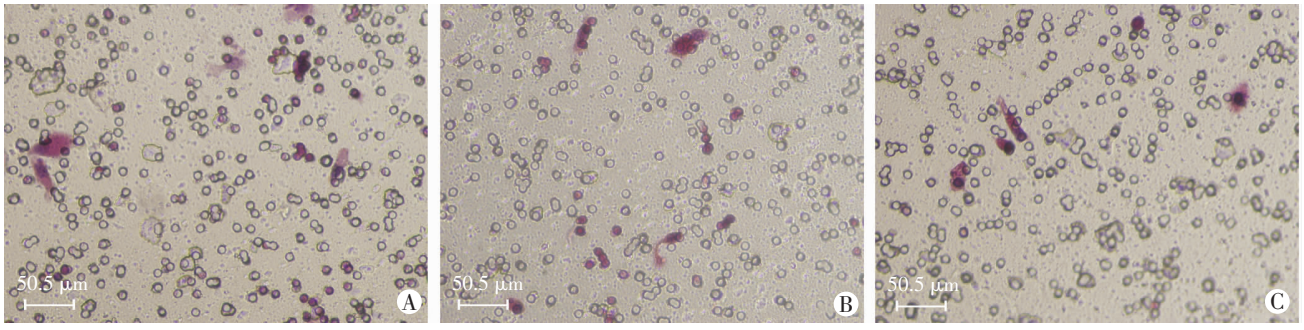
### 2.5 流式细胞仪检测细胞周期

转染 control siRNA 及 TCF4 SiRNA 48h 后，流式细胞仪分析结果显示 A431 细胞株细胞周期发生了明显的变化，转染 TCF4 SiRNA 后 $G_2$/M 期细胞为 17.17%，而转染 control siRNA 及未转染细胞组 $G_2$/M 期细胞分别 9.75% 和 4.65%，说明抑制 TCF4 的表达以后细胞更多的阻滞在 $G_2$/M 期（图6）。



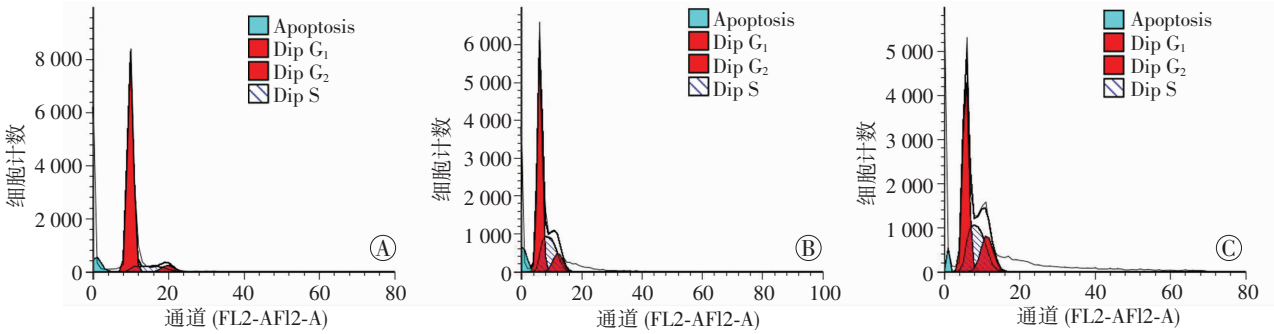

A：未转染组；B：转染 control siRNA 组；C：转染 TCF4 siRNA 组

**图4 倒置荧光显微镜观察未转染组、转染 control siRNA 组及转染 TCF4 siRNA 组细胞迁移能力** （HE ×200）




A：未转染组；B：转染 control siRNA 组；C：转染 TCF4 siRNA 组

**图5 倒置荧光显微镜观察未转染组、转染 control siRNA 组及转染 TCF4 siRNA 组细胞侵袭能力** （HE ×200）




A:未转染组;B:转染 control siRNA 组;C:转染 TCF4 SiRNA 组

**图 6　流式细胞仪检测各组细胞周期变化**

## 3　讨论

在肿瘤的发生、发展过程中,Wnt 通路的失调起着至关重要的作用。TCF4 是 TCF 家族成员之一,属核内转录因子,当 Wnt 信号激活时,细胞质内 Wnt 通路信号分子 β-catenin 积聚并转入细胞核内,与 TCF4 的氨基端相互结合形成复合体,发挥其转录激活作用,最终导致肿瘤发生的可能性增加[10-11]。近年来的研究证实 TCF4 的高表达与恶性肿瘤关系密切。Longo 等[12]研究发现,在结直肠癌中,阻断 Wnt 通路的关键蛋白 β-catenin 后,可明显抑制肿瘤生长。Joo 等[13]发现在 HCC 中,β-catenin 在细胞质中蓄积极可能是 HCC 发生的早期事件。Zhang 等[14]研究发现,β-catenin/TCF 通路在硒引起的食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma,ESCC)细胞生长抑制和凋亡中发挥着关键作用。研究显示,阻断 Wnt 信号通路后,可以有效地控制肿瘤的形成及侵袭转移,通过研究 Wnt 信号转导途径中的一些关键蛋白,可设计针对某一特定靶点的治疗恶性肿瘤的药物。

本研究选择高表达 TCF4 的皮肤鳞状细胞癌细胞株 A431 为研究对象,将 TCF4 siRNA 转染至 A431 细胞株,通过 RT-PCR 及 Western blot 检测技术,发现其有效地抑制了 A431 细胞株中 TCF4 mRNA 及 TCF4 蛋白的表达。抑制 TCF4 后,我们采用 Transwell 方法及 CCK-8 方法分别检测细胞的迁移能力、侵袭能力及增殖能力,结果发现 A431 细胞的迁移能力、侵袭能力及生长增殖均受到抑制。流式细胞仪检测细胞周期发现 TCF4 siRNA 可阻滞 A431 细胞于 $G_2$/M 期。本研究证实了 TCF4 的高表达与皮肤鳞状细胞癌密切相关,β-catenin/TCF 通路在皮肤鳞状细胞癌中起着重要作用,为下一步动物体内实验提供了理论及实验基础,为寻找皮肤鳞状细胞癌新的治疗靶点,改善患者的预后提供了理论依据。

**参考文献:**

[1] Prado R, Francis S O, Mason M N, *et al*. Nonmelanoma skin cancer chemoprevention[J]. Dermatol Surg, 2011, 37(11): 1566-1578.

[2] 顾娟, 王学东, 潘兆麟, 等. Wnt 信号通路与肿瘤的研究进展[J]. 国际肿瘤学杂志, 2012, 39(11): 827-830.

[3] Roose J, Clevers H. TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1424(2/3): M23-M37.

[4] Forrest M P, Waite A J, Martin-Rendon E, *et al*. Knockdown of human TCF4 affects multiple signaling pathways involved in cell survival, epithelial to mesenchymal transition and neuronal differentiation [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e73169.

[5] Ma B, Zhong L, van-Blitterswijk C A, *et al*. T cell factor 4 is a procatabolic and apoptotic factor in human articular chondrocytes by potentiating nuclear factor κB signaling [J]. J Biol Chem, 2013, 288(24): 17552-17558.

[6] Yan S, Zhou C, Zhang W, *et al*. beta-Catenin/TCF pathway upregulates STAT3 expression in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cancer Lett, 2008, 271(1): 85-97.

[7] Deng Y Z, Chen P P, Wang Y, *et al*. Connective tissue growth factor is overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma and promotes tumorigenicity through beta-catenin-T-cell factor/Lef signaling [J]. J Biol Chem, 2007, 282(50): 36571-36581.

[8] Zhao D H, Hong J J, Guo S Y, *et al*. Aberrant expression and function of TCF4 in the proliferation of hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402[J]. Cell Res, 2004, 14(1): 74-80.

[9] Lucero O M, Dawson D W, Moon R T, *et al*. A re-evaluation of the "oncogenic" nature of Wnt/beta-catenin signaling in melanoma and other cancers[J]. Curt Oncol Rep, 2010, 12(5): 314-318.

[10] Shitashige M, Hirohashi S, Yamada T. Wnt signaling inside the nucleus [J]. Cancer Sci, 2008, 99(4): 631-637.

[11] 张可洲, 熊亚, 杨希川, 等. MAD2B 与 TCF4 相互作用及其对毛乳头细胞功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(11): 1071-1075.

[12] Longo K A, Wright W S, Kang S, *et al*. Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissue [J]. J Biol Chem, 2004, 279(34): 35503-35509.

[13] Joo M, Lee H K, Kang Y K. Expression of beta-catenin in hepatocellular carcinoma in relation to tumor cell proliferation and cyclin D1 expression[J]. J Korean Med Sci, 2003, 18(2): 211-217.

[14] Zhang W, Yan S, Liu M, *et al*. beta-Catenin/TCF pathway plays a vital role in selenium induced-growth inhibition and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells [J]. Cancer Lett, 2010, 296(1): 113-122.

(收稿:2013-10-16;修回:2013-11-20)

(编辑　王　红)