doi:10.11659/jjssx.01E018078

·基础研究·

TGF-β1 诱导上皮间质转化促进口腔鳞癌侵袭转移

李 博,李栋梁,谭 强,朱 玉 (重庆涪陵中心医院烧伤整形科, 重庆 408000)

[摘 要] **目的** 探讨转化生长因子-β1(TGF-β1)在人口腔鳞状细胞癌细胞株 Tca8113 上皮间质转化(EMT)发生中的作用。**方法** 采用不用浓度的 TGF-β1 处理 Tca8113 细胞 24 h,普通倒置光学显微镜下观测处理前后细胞形态学改变;分别采用 Real time-PCR 和 Western blot 法检测细胞中上皮间质转化标记物 E-cadherin、Vimentin mRNA 和总蛋白的表达;Transwell 体外细胞侵袭实验观测细胞侵袭能力变化。**结果** TGF-β1 可显著诱导口腔鳞状细胞癌 Tca8113 细胞的形态从上皮样向间质样改变,并上调 Vimentin mRNA 和蛋白的表达和下调 E-cadherin mRNA 和蛋白的表达。此外,TGF-β1 可明显促进 Tca8113 细胞的体外迁移和侵袭,而使用 TGF-β1 特异性抑制剂 LY2109761 则减弱这一效应。**结论** TGF-β1 通过启动上皮-间质转化(EMT)程序发生从而促进 TCA8113 细胞的侵袭转移。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌;上皮间质转化;转化生长因子;侵袭
[中图分类号] R739.91 [文献标识码] A [收稿日期] 2018-01-09

TGF-β1 promotes invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma by inducing epithelial-mesenchymal transition

LI Bo, LI Dong-liang, TAN Qiang, ZHU Yu (Burn and Plastic Surgery Department, Chongqing Fuling Center Hospital, Chongqing 408000, China)

Abstract: Objective To explore the role of transforming growth factor-β1(TGF-β1) in epithelial-mesenchymal transition(EMT) of oral squamous cell carcinoma cell strain Tca8113. **Methods** Tca8113 cells were treated with different concentrations of TGF-β1 for 24 hours. The morphological changes of cells were observed under an ordinary inverted light microscope. The expression levels of the epithelial-mesenchymal transition markers E-cadherin, Vimentin mRNA andtotal protein in cells were detected by Real time-PCR and Western blot respectively. Transwell in vitro cell invasion experiment was performed to observe the change of cell invasion assay ability. **Results** TGF-β1 could significantly induce morphological changes in oral squamous cell carcinoma cell strain Tca8113 from epithelial to mesenchymal transition, and can up-regulate the expression level of Vimentin mRNA and proteins and down-regulate the expression level of E-cadherin mRNA and proteins. In addition, TGF-β1 could significantly promote in vitro migration and invasion of Tca8113 cells, and such effect may be weakened by using TGF-β1-specific inhibitor LY2109761. **Conclusion** TGF-β1 promotes the invasion and metastasis of TCA8113 cells by initiating the epithelial-mesenchymal transition(EMT) process.

Keywords: oral squamous cell carcinoma; epithelial-mesenchymal transition; transforming growth factor; invasion

口腔癌发病率位居头颈部恶性肿瘤首位,占人类恶性肿瘤发病率的3%,全球每年平均新增10万例新患者[1]。口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是具有不同程度鳞状分化的上皮侵袭性肿瘤,约占所有类型口腔癌总数的90%[2]。目前针对口腔鳞癌的治疗以手术、放化疗相结合的个体化综合疗法为主,但仍有较多患者在综合治疗后出现复发和转移,其5年生存率仅为50%[2]。因此,深入探究口腔鳞状细胞癌远处侵袭转移的机制十分有必要。恶性肿瘤在生长过程中逐渐产生全身远处侵袭转移是一个极其复杂的过程,受到多种因素在多个不同阶段的序贯调控。近年来,上皮-间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)逐渐引起国内外学者的高度关注,这一过程与恶性肿瘤的远处扩散转移密切相关。EMT是指细胞在某些特殊的生理、病理生理条件下,受到内源性或外源性刺激,使得上皮细胞失去其上皮特征,并逐渐获得间质特性的过程[3-4]。上皮细胞丧失原本存在的极性、进而解除与周围细胞之间的连接并与细胞基质的接触减少、细胞骨架改变,同时伴随着细胞迁移和运动能力增强,这些都是EMT的特征性变化。EMT不仅参与胚胎早期发育和器官生成,同时也通过促进细胞侵袭转移从而参与许多恶性上皮肿瘤发展的过程[5]。

转化生长因子(transforming growth factor, TGF)是一种被证实能够被不同细胞分泌的有着广泛生物学效应的细胞因子,不仅在细胞的分裂与增殖过程中发挥重要作用,而且与新生血管形成和恶性肿瘤的发生等过程紧密相关[6-7]。此外,研究表明TGF-β信号通路的异常激活也参与了EMT过程[8-9]。然而在具有高度侵袭性的口腔鳞癌中,EMT是否参与其远处侵袭转移

过程,以及 TGF-β1 在这一生物学事件中的调控作用目前鲜有报道。本文旨在研究 TGF-β1 诱导人口腔鳞状细胞癌 Tca8113 细胞发生 EMT 及对细胞侵袭转移能力的影响。

1 资料与方法

1.1 材料

人口腔鳞状细胞癌 Tca8113 细胞购自中国科学院上海细胞生物学研究所;TGF-β1 购自 R&D 公司;TGF-β1 抑制剂 LY2109761 购自 Selleck 公司;TRIzol RNA 提取试剂购自 Takara 公司;本研究所有 PCR 引物的设计与合成均委托上海擎科生物公司完成;多克隆兔抗人 E-cadherin、Vimentin、GAPDH 一抗购自美国 Santa Cruz 公司;辣根酶标记羊抗兔 IgG 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; Protein marker 购自 Thermo Fisher 公司;ECL 发光试剂盒购自 Millipore 公司;小牛血清购自 GIBCO 公司;RPMI-1640 培养基购自 HYCLONE 公司;24 孔 transwell 小室(孔径 8 μm)购自 Corning Costar 公司;细胞基质胶(Matrigel)购自 BD 公司。

1.2 细胞培养

Tca8113 细胞株在 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度条件的细胞培养箱中用含 10% 小牛血清、100 u/mL 青霉素、100 μg/mL 庆大霉素、RPMI-1640 培养基中培养。用 0.25% 胰酶消化传代。当细胞铺满瓶底 60% 后,改换用无血清 RPMI-1640 培养基对细胞进行饥饿处理(6 ~ 8 h),再加入 TGF-β1 处理 24 h。

1.3 细胞形态学观察

将长满的 Tca8113 细胞消化、传代种于 6 孔板,待其贴壁后用无血清 RPMI-1640 培养基饥饿处理 6 ~ 8 h。第二日使用 TGF-β1 对细胞处理 48 h 后在普通倒置光学显微镜下观测 Tca8113 细胞形态变化并拍照。

1.4 RNA 提取和 real-time PCR 检测

使用冰上预冷 PBS 洗涤将处理完成的细胞洗涤 3 次,随后每个孔分别加入 1 mL Trizol 溶液,提取细胞总 RNA 为后续实验做准备。PCR 所用引物由上海擎科生物科技公司上海分公司合成,引物序列如下:GAPDH 上游引物 5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTCG-3',下游引物 5'-GGGTCATTGATGGCAACAATATC-3' ; Vimentin 上游引物 5'-CCAAACTTTTCCTCCCTGAACC-3',下游引物 5'-GTGATGCTGAGAAGTTTCGTTGA-3' ; E-cadherin 上游序列 5'-GTACTTGTAATGACACATCTC-3';下游引物 5'-TGCCAGTITCTGCATCTGC-3'。反应条件均为 95 ℃、3 min 预变性;94 ℃、30 s ;48 ℃、30 s,72 ℃、1 min,扩增 35 个循环;72 ℃延伸 10 min。

1.5 Western blot 检测

将已处理好的口腔鳞癌 Tca8113 细胞系用 PBS 洗涤 3 次随后加入 RIPA 裂解液并用细胞刮刀刮下来放入 1.5 mL EP 管中冰上裂解 30 min。随后于 12 000 r/min 离心 10 min 并将蛋白上清液冻存于 -20 ℃。使用 5 × 蛋白上样缓冲液混匀蛋白上清后于 95 ℃中加热 10 min,待其充分变性。上机跑电泳,随后转膜并置于 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h。封闭结束后使用 TBST 洗膜 5 min × 3 次,随后将膜置于多克隆兔抗人的 GAPDH、Vimentin、E-cadherin(浓度均为 1∶1 000)中 4 ℃孵育过夜。次日,洗膜 5 min × 3 次后,置于辣根酶标记羊抗兔 IgG 中室温孵育 2 h。TBST 洗膜 5 min × 3 次后,采用 ECL 化学发光法金鼎显影。应用 Quantity One 软件分析条带灰度值并作统计分析。

1.6 细胞迁移与侵袭实验

将 Matrigel 胶(matrigel 原液与无血清培养基之比为 1∶3)铺在小室上面,置于 37 ℃培养箱中待用。将口腔鳞癌 Tca8113 细胞系在无血清 RMPI-1640 培养基中饥饿处理 6 h 后,将其消化、重悬,上室加入无血清细胞悬液 200 μL(细胞量 4×10^5/mL),下室加入含 20% FBS 的 RMPI-1640 培养基,每孔 600 μL,培养箱中培养 48 h。处理完成后取出小室,用 PBS 洗涤3 次,并用湿棉签轻柔擦除上室面的细胞,随后置于 4% 多聚甲醛中固定 20 min。取出室温下风干 3 ~ 5 min,随后置于结晶紫染料中染色 15 min。最后用 PBS 洗涤 3 次,并置于倒置显微镜下观察穿过微孔膜的细胞数量,并进行统计分析。

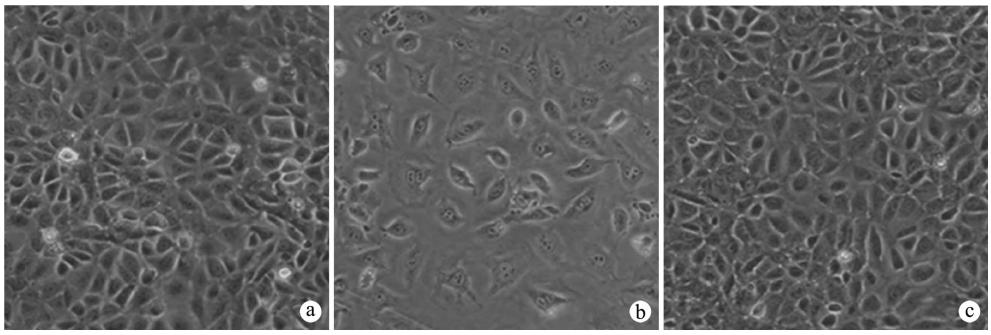
1.7 统计学方法

所有数值用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计分析采用软件 SPSS 12.0 行单因素方差分析(Student-Newman-Keuls test)计算组间差异,$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TGF-β1 促进上皮样 Tca8113 细胞向间质样细胞转化

Tca8113 细胞经过 10 ng/mL 浓度 TGF-β1 刺激 24 h 后,在普通倒置光学显微镜下观察拍照发现,Tca8113 细胞在对照组中形态为典型的上皮样结构,而经 10 ng/mL TGF-β1 处理的 Tca8113 细胞大部分细胞形态变为细长梭形,呈现明显的间质细胞形态(图 1)。

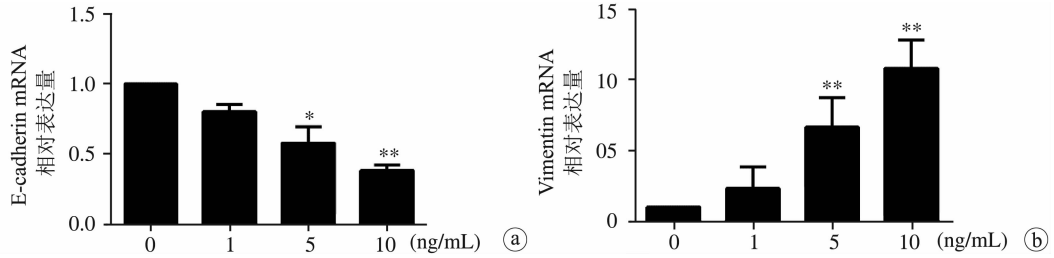


a:空白对照组(0 ng/mL TGF-β1);b: TGF-β1 处理组(10 ng/mL TGF-β1);c: TGF-β1 + TGF-β1 siRNA 组(10 ng/mL TGF-β1 + LY2109761)

图 1 Tca8113 细胞经 10 ng/mL 浓度 TGF-β1 处理 24 h 后的形态学变化(×400)

2.2 TGF-β1 对 Vimentin、E-cadherin mRNA 表达的影响

经过不同浓度(0 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL)TGF-β1 处理 24 h 后,RT-PCR 结果显示,与空白对照组相比,TGF-β1 刺激后 Tca8113 细胞 TGF-β1 处理组的上皮标记蛋白 E-cadherin mRNA 表达量随药物浓度的增加而下降,而间质标记蛋白 Vimentin mRNA 的表达量却随药物浓度的增加而逐步增加,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 2。



a:E-cadherin mRNA 相对表达量;b:Vimentin mRNA 相对表达量 *:与 0 ng/mL TGF-β1 比较,$P<0.05$;**:与 0 ng/mL TGF-β1 比较,$P<0.01$

图 2 Tca8113 细胞经不同浓度 TGF-β1 处理 24 h 后 E-cadherin 和 Vimentin mRNA 的表达量

2.3 TGF-β1 对 Vimentin、E-cadherin 蛋白表达的影响

不同浓度(0 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL)TGF-β1 处理 Tca8113 细胞 24 h 后,Western blot 结果显示 TGF-β1 刺激后,Tca8113 细胞上皮标记蛋白 E-cadherin表达量随 TGF-β1 浓度的增加而下降,而间质标记蛋白 Vimentin 的表达量却随 TGF-β1 浓度的增加相应增加,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3。

2.4 TGF-β1 抑制剂逆转上皮间质转化

使用 10 ng/mL TGF-β1 处理处理 Tca8113 细胞 24 h后,与对照组相比,上皮表型 E-cadherin 的 mRNA 和蛋白表达水平明显下降,间质表型 Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。而加用 10 ng/mL 浓度 TGF-β1 抑制剂 LY2109761 则显著逆转这 EMT 现象,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。

2.5 TGF-β1 促进 Tca8113 细胞迁移

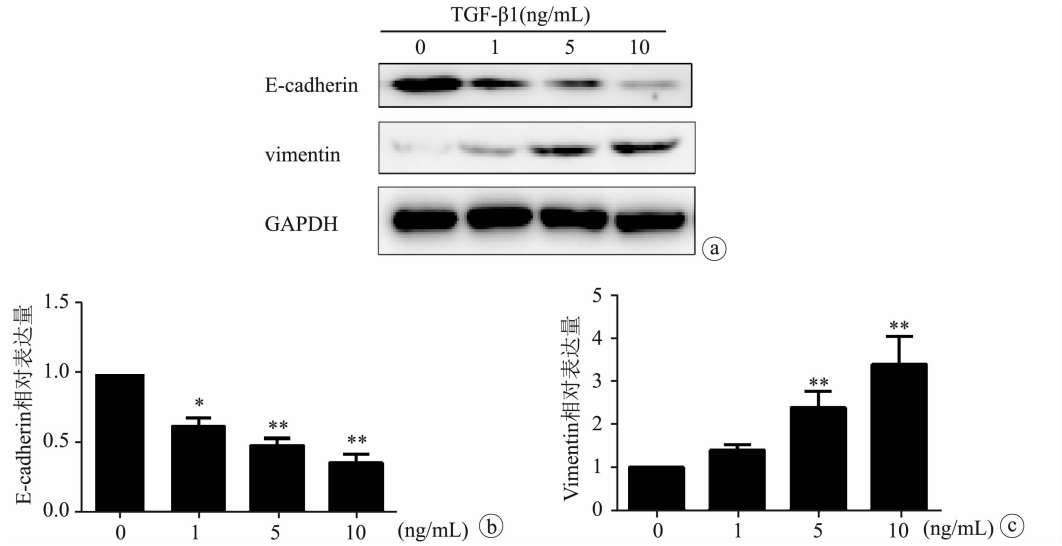
在 Transwell 小室迁移实验中,我们发现 TGF-β1 处理 24 h 后,与对照组相比 TGF-β1 处理组中 Tca8113 细胞的迁移能力显著增强,差异有统计学意义($P<0.05$),而加用 TGFβ1 特异抑制剂 LY2109761 能够逆转这一过程,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 5。

2.6 TGF-β1 促进 Tca8113 细胞侵袭

在 Transwell 小室迁移实验中,我们发现 TGF-β1 处理 24 h 后,与对照组相比 TGF-β1 处理组中 Tca8113 细胞的侵袭能力显著增强,差异有统计学意义($P<0.05$),而加用 TGFβ1 特异抑制剂 LY2109761 能够逆转这一过程,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 6。

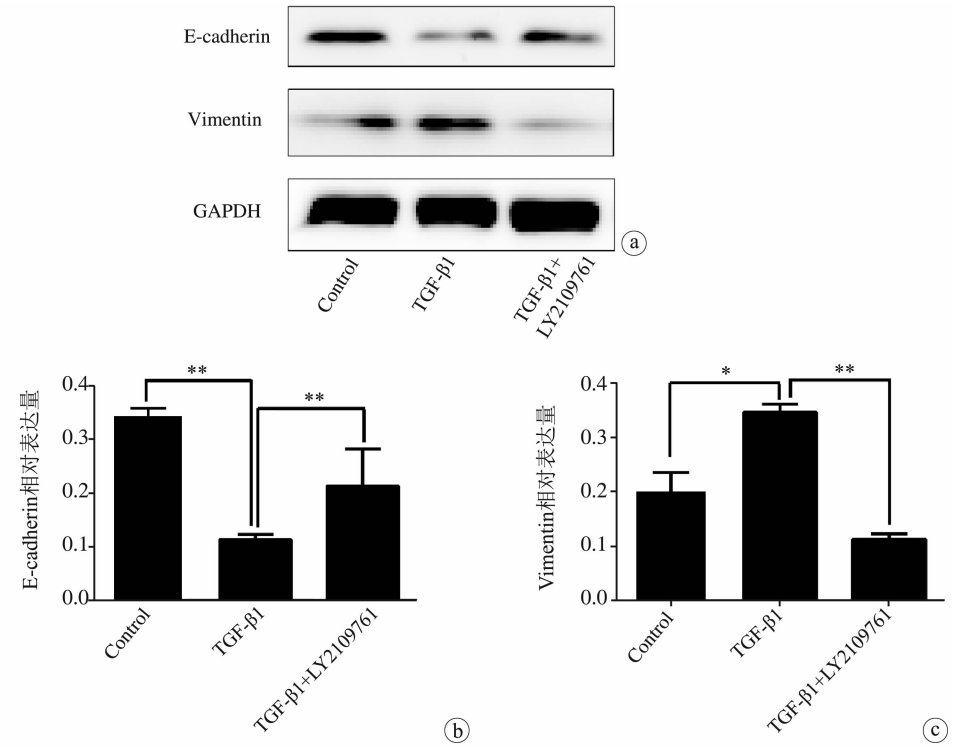
3 讨论

口腔鳞状细胞癌是最常见的头颈部恶性肿瘤,具有恶性程度高、局部生长迅速、晚期易于侵袭转移及复发等生物学特点[10-12]。恶性肿瘤的扩散转移过程受到多基因、多因素互相调控,包括以下几个阶段:肿瘤细胞首先从原发病脱离,随后随着血液循环到远处定植生长成为转移灶,在这个过程中其是通过局部浸润、血行转移、细胞增殖等步骤来序贯实现的[13-15]。如何早期发现和阻断该肿瘤的发生发展以及应用有效的治疗方法是预防与治疗口腔鳞癌的关键所在。



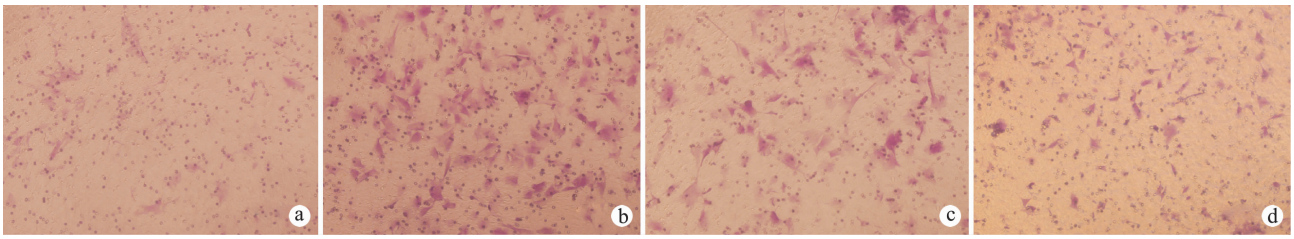
a:Wester blot 检测 E-cadherin、Vimentin 蛋白表达;b:E-cadherin 相对表达量;c:Vimentin 相对表达量 *:与 0 ng/mL TGF-β1 处理组比较,$P<0.05$;**:与 0 ng/mL TGF-β1 处理组比较,$P<0.01$

图 3 Tca8113 细胞经不同浓度 TGF-β1 处理 24 h 后 E-cadherin 和 Vimentin 蛋白的表达量



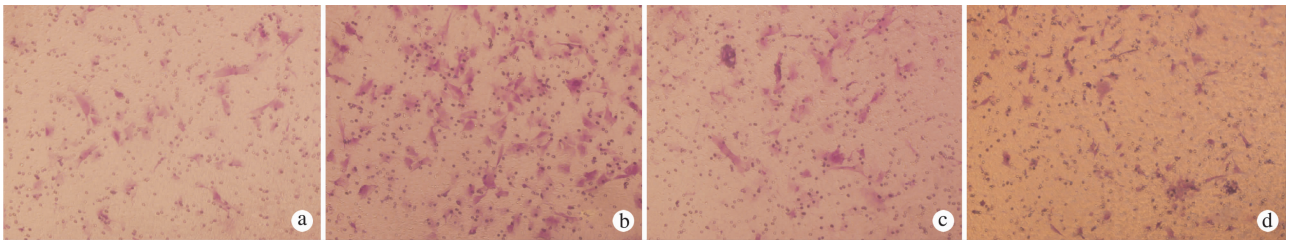
a:Wester blot 检测 E-cadherin、Vimentin 蛋白表达;b:E-cadherin 相对表达量;c:Vimentin 相对表达量 *:$P<0.05$;**:$P<0.01$

图 4 TGF-β1 抑制剂阻断 TGF-β1 诱导的 Tca8113 细胞发生 EMT



a:空白对照组;b: TGF-β1 处理组;c: TGF-β1 + LY2109761 组;d: TGF-β1 + TGF-β1 siRNA 组

图 5 TGF-β1 促进 Tca8113 细胞迁移能力增强(结晶紫染色 ×200)



a:空白对照组;b: TGF-β1 处理组;c: TGF-β1 + LY2109761 组;d: TGF-β1 + TGF-β1 siRNA 组

图 6 TGF-β1 促进 Tca8113 细胞侵袭能力增强(结晶紫染色 ×200)

越来越多的研究结果表明,EMT 广泛参与多种肿瘤的侵袭和转移生物学过程,包括乳腺癌、宫颈癌、肝癌、结肠等[16-18]。Greenburg 等[19]在实验中发现培养的上皮来源细胞逐渐获得间质细胞的特性,在这一基础上首次证实 EMT 的发生。EMT 在胚胎和器官的发育、多种纤维化疾病以及恶性肿瘤发病等过程中都发挥着重要作用。目前,口腔鳞状细胞癌中的 EMT 研究报道较少。有学者使用免疫组织化学方法检测发现,在口腔鳞状细胞癌组织中 EMT 相关指标 snail 和 Slug 呈高表达,而上皮表型 E-cadherin 呈低表达,并且 snail、slug 与 E-cadherin 呈负相关,而与患者的预后成正相关[20-22]。Krisanaparkornkit 等[23]采用 Western blot 和明胶酶谱法分别检测不同类型口腔鳞癌细胞株(HN008、HN5 和 HN6、HN15)中 EMT 与侵袭相关指标的表达情况,在多种细胞株中检测到 E-cadherin、MMP-9 的表达下调和 Vimentin、MMP-2 的表达上调。整合素尤其是 αVβ6 整合素在 EMT 中起重要作用,有学者发现在口腔鳞状细胞癌中完整的 β6 亚基能够诱导 EMT 的发生,上调 vimentin 的表达,减少 cytokeratin 和 E-cadherin 的表达,而表达不完整 β6 亚基的口腔鳞癌细胞能够保持其上皮特性并不改变 vimentin 或 E-cadherin 的表达[24]。以上研究证实 EMT 参与了口腔鳞癌的发病过程,但是口腔鳞癌中 EMT 程序是如何启动的及其对肿瘤细胞的生物学功能有何影响,目前鲜有报道。

TGF-β1 是 TGF-β 超家族的重要成员之一,是一类具有多种生物学活性的细胞因子,对细胞侵袭、凋亡、衰老以及分化等重要的生理过程进行调节[25-26]。EMT 的发生是一个复杂的过程,涉及众多分子和信号通路,TGF-β1 信号通路在 EMT 的启动和发展过程中作为主要诱导剂发挥关键作用[27-28]。多个系列研究证明,TGF-β 信号通路的异常激活是恶性肿瘤发生侵袭转移的关键调控因子[29]。肿瘤细胞内经常可检测到活化 TGF-β 的产生增加;这不仅触发 EMT 程序的启动、增强其侵袭转移能力,而且也与肿瘤微环境局部的新生毛细血管形成有关,后者可为发生迁移的肿瘤间质细胞提供营养支持[30-31]。由于 TGF-β 引发的 EMT 针对不同类型的上皮细胞具有不同的特点,因此,TGF-β 诱导 EMT 发生的机制在不同的肿瘤发生过程中确实存在着差异。目前关于 TGF-β1 能否诱导人口腔鳞状细胞癌 Tca8113 细胞发生 EMT,尚未见报道。因此,基于以上研究发现,我们推测 TGF-β1 通过诱导人口腔鳞癌 Tca8113 细胞 EMT 的发生,使其侵袭转移增加,导致肿瘤的远处转移。

在本项研究中,我们首先验证了 TGF-β1 是否能够诱导 Tca8113 细胞 EMT 的发生。结果表明,使用 10 μg/L TGF-β1 处理 24 h 后,大部分 Tca8113 细胞的形态与对照组相比明显拉长呈长梭形,呈现散在生长状态。这一结果表明 TGF-β1 能够诱导典型的 EMT 的发生。在 EMT 发生时,E-cadherin 作为上皮间黏附的主要标记蛋白其表达下调,而间质表型蛋白 vimentin 的上调使细胞相互之间的黏附力下降,使细胞的运动能力明显增强,进而引起局部肿瘤细胞向外周浸润生长及转移。接下来我们在 mRNA 和蛋白水平分别验证受 TGF-β1 刺激的 Tca8113 细胞是否发生 EMT。经过不同浓度(0 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL)TGF-β1 处理 24 h 后,RT-PCR 和 Western blot 结果显示 5 ng/mL 浓度的 TGF-β1 处理 24 h 后,Tca8113 细胞 E-cadherin 的 mRNA 和蛋白表达水平最低,而 Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达水平最高,这一结果表明 TGF-β1 成功诱导 Tca8113 细胞 EMT 的发生。在证实 TGF-β1 的确能够启动 EMT 程序之后,我们在此基础上采用 Transwell 小室实验检测 Tca8113 细胞迁移和侵袭能力的变化。经过 5 ng/mL 浓度 TGF-β1 处理 24 h 后,TGF-β1 处理组 Tca8113 细胞体外迁移及侵袭能力显著增强,而 TGF-β1 抑制剂 LY2109761 则有效减弱这一效应。这一结果进一步证实 TGF-β1 通过启动 EMT 程序进而促进 Tca8113 细胞的体外迁移与侵袭能力。本研究存在以下不足之处:①验证了 TGF-β1 诱导的口腔临床细胞癌 EMT,但 TGF-β1 调控口腔鳞状细胞癌 EMT 发

生的具体调控机制目前尚不清楚。有研究表明在乳腺癌中能够促进 ZEB1 和 ZEB2 的表达,抑制 E-cadherin 的表达。同时沉默这两种转录因子能完全抵消 TGF-β1 对 E-cadherin 的抑制作用,而间质标志蛋白,如 N-cadherin和 Vimentin 则不受 ZEB1 和 ZEB2 沉默的影响。因此,在后续研究中我们将针对 TGF-β1 对 EMT 相关转录因子的调控作用做进一步研究;②只应用一种细胞系来进行验证,在后续的深入研究中我们将采用两种以上的细胞系来进行实验,使研究结果更有说服力。

总之,本研究发现在口腔癌 Tca8113 细胞系中 TGF-β1 能够启动 EMT 程序,从而显著促进细胞侵袭和迁移能力,这为口腔鳞癌的高侵袭性提供新的理论支持。因此,深入研究 EMT 在口腔鳞癌发病中的作用机制,通过干预以及逆转肿瘤细胞的 EMT 进程,削弱恶性肿瘤细胞的侵袭潜能,这将为口腔鳞癌的个体化治疗提供新的思路和依据。

[参考文献]

[1] Malik UU,Zarina S,Pennington Sr. Oral squamous cell carcinoma:Key clinical questions,biomarker discovery,and the role of proteomics[J]. Arch Oral Biol,2016,63:53 - 65. doi:10.1016/j.archoralbio.2015.11.017.

[2] EL Attar T MA,Virji AS. Effects of indomethacin,cisplatin and Delta(12)-prostaglandin J(2) on growth of oral squamous carcinoma cells[J]. Anticancer Research,1997,17(6D):4399 - 4402.

[3] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression[J]. Nature Reviews Cancer,2002,2(6):442 - 454. doi:10.1038/nrc822.

[4] Thiery JP,Acloque H,Huang RYJ,et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. Cell,2009,139(5):871 - 890. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007.

[5] Kalluri R,Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. J Clin Invest,2009,119(6):1420 - 1428. doi:10.1172/JCI39104.

[6] Poniatowski LA,Wojdasiewicz P,Gasik R,et al. Transforming growth factor Beta family:insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications[J]. Mediators of inflammation,2015(2015):137823. doi:10.1155/2015/137823.

[7] Wheeler SE,Lee NY. Emerging roles of transforming growth factor beta signaling in diabetic retinopathy[J]. J Cell physiol,2017,232(3):486 - 489. doi:10.1089/104454900439764.

[8] Katsuno Y,Lamouille S,Derynck R. TGF-beta signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression[J]. Current opinion in oncology,2013,25(1):76 - 84. doi:10.1097/CCO.0b013e32835b651e.

[9] Kim YE,Kim JO,Park KS,et al. Transforming growth factor-beta-Induced RBFOX3 inhibition promotes epithelial-mesenchymal transition of lung cancer cells[J]. Molecules and cells,2016,39(8):625 - 630. doi:10.14348/molcells.2016.0150.

[10] Malik UU,Zarina S,Pennington SR. Oral squamous cell carcinoma:Key clinical questions,biomarker discovery,and the role of proteomics[J]. Archives of oral biology,2016,63:53 - 65. doi:10.1016/j.archoralbio.2015.11.017.

[11] Gharat SA,Momin M,Bhavsar C. Oral squamous cell carcinoma:current treatment strategies and nanotechnology-based approaches for prevention and therapy[J]. Critical reviews in therapeutic drug carrier systems,2016,33(4):363 - 400. doi:10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2016016272.

[12] Chi AC,Day TA,Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update[J]. CA:a cancer journal for clinicians,2015,65(5):401 - 421. doi:10.3322/caac.21293.

[13] Lamm D,Persad R,Brausi M,et al. Defining progression in nonmuscle invasive bladder cancer:it is time for a new,standard definition[J]. J Urol,2014,191(1):20 - 27. doi:10.1016/j.juro.2013.07.086.

[14] Hu Y,Yu X,Xu G,et al. Metastasis:an early event in cancer progression[J]. J Cancer Res Clin Oncol,2017,143(5):745 - 757. doi:10.1007/s00432 - 017 - 2465 - 8.

[15] Chen W,Zhou S,Mao L,et al. Crosstalk between TGF-beta signaling and miRNAs in breast cancer metastasis[J]. Tumour biol,2016,37(8):10011 - 10019. doi:10.1007/s13277 - 016 - 5060 - 8.

[16] Qureshi R,Arora H,Rizvi MA. EMT in cervical cancer:its role in tumour progression and response to therapy[J]. Cancer letters,2015,356(2 Pt B):321 - 331. doi:10.1016/j.canlet.2014.09.021.

[17] Bill R,Christofori G. The relevance of EMT in breast cancer metastasis:Correlation or causality? [J]. FEBS letters,2015,589(14):1577 - 1587. doi:10.1016/j.febslet.2015.05.048.

[18] Reichl P,Haider C,Grubinger M,et al. TGF-beta in epithelial to mesenchymal transition and metastasis of liver carcinoma[J]. Current pharmaceutical design,2012,18(27):4135 - 4147.

[19] Greenburg G,Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells[J]. The Journal of cell biology,1982,95(1):333 - 339.

[20] Zheng M,Jiang YP,Chen W,et al. Snail and Slug collaborate on EMT and tumor metastasis through miR-101-mediated EZH2 axis in oral tongue squamous cell carcinoma[J]. Oncotarget,2015,6(9):6797 - 6810. doi:10.18632/oncotarget.3180.

[21] Da Silva SD,Morand GB,Alobaid FA,et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers have prognostic impact in multiple primary oral squamous cell carcinoma[J]. Clinical & experimental metastasis,2015,32(1):55 - 63. doi:10.1007/s10585 - 014 - 9690 - 1.

[22] Da Silva SD,Alaoui-Jamali MA,Soares FA,et al. TWIST1 is a molecular marker for a poor prognosis in oral cancer and represents a potential therapeutic target[J]. Cancer,2014,120(3):352 - 362. doi:10.1002/cncr.28404.

[23] Krisanaprakornkit S,Iamaroon A. Epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma[J]. ISRN Oncol,2012,2012(3):681469.

doi:10.11659/jjssx.03E018109

·基础研究·

巴戟天水提取物对精索静脉曲张 SD 大鼠支持细胞波型蛋白表达的影响

丁小明[1],林文东[2] (1.泉州医学高等专科学校基础医学部解剖教研室,福建 泉州 362010;2.泉州医学高等专科学校动物实验室,福建 泉州 362010)

[摘 要] **目的** 探究巴戟天水提取物对精索静脉曲张 SD 大鼠支持细胞波型蛋白表达的影响。**方法** 选取处于青春期的健康雄性 SD 大鼠 40 只,按照数字随机表法分为假手术组、对照组、观察 1 组和观察 2 组,按组别分别使用相应剂量的生理盐水和巴戟天水提取物灌胃,然后使用 MTT 法检测细胞活性,使用实时荧光定量 PCR 法检测 mRNA 相对表达量,使用 Western blotting 法检测波形蛋白表达。**结果** 4 组大鼠支持细胞活性差异无统计学意义($P>0.05$);对照组支持细胞波形蛋白 mRNA 和波形蛋白表达水平显著低于假手术组($P<0.05$),观察 1 组和观察 2 组显著高于对照组($P<0.05$),并且观察 2 组显著高于对照组和观察 1 组($P<0.05$)。**结论** 巴戟天水提取物具有提高精索静脉曲张 SD 大鼠支持细胞波形蛋白 mRNA 表达水平和波形蛋白表达水平的作用。

[关键词] 精索静脉曲张;巴戟天;支持细胞;波型蛋白

[中图分类号] R697 [文献标识码] A [收稿日期] 2018-03-13

Effect of aqueous extracts from Morinda officinalis on expression of vimentin in sustentacular cells of SD rats with varicocele

DING Xiao-ming[1], LIN Wen-dong[2] (1. Discipline of Anatomy, Faculty of Basic Medicine, Quanzhou Medical College, Quanzhou Fujian 362010, China; 2. Animal Laboratory, Quanzhou Medical College, Quanzhou Fujian 362010, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of aqueous extracts from Morinda Officinalis on the expression of vimentin in sustentacular cells of SD rats with varicocele. **Methods** A total of 40 adolescent, healthy male SD rats were selected and divided into a sham-operated group, a control group, an observation group 1 and an observation group 2 according to the random number table. These rats were intragastrically administered with the corresponding dose of normal saline and aqueous extracts from Morinda Officinalis respectively. Then, the cell activity of rats was detected by MTT, the relative expression of mRNA in rats was detected by real-time quantitative PCR method, and the expression of vimentin in rats was detected by Western blotting. **Results** Thedifference of activity in sustentacular cells among the four groups was notstatisticallysignificant($P>0.05$). The expression levels of vimentin mRNA and vimentin in sustentacular cells of the control group was significantly lower than the sham-operated group($P<0.05$), those of the observation group 1 and the observation group 2 were significantly

[基金项目] 泉州市科技计划项目(2016Z059)

[通信作者] 丁小明,E-mail:179533609@qq.com

[24] Katoh D, Nagaharuk K, Shimojo N, et al. Binding of alphavbeta1 and alphavbeta6 integrins to tenascin-C induces epithelial-mesenchymal transition-like change of breast cancer cells[J]. Oncogenesis, 2013, 2: e65. doi:10.1038/oncsis.2013.27.

[25] Miao ZF, Li WY, Wang ZN, et al. Lung cancer cells induce senescence and apoptosis of pleural mesothelial cells via transforming growth factor-beta1[J]. Tumour Biol, 2015, 36(4): 2657-2665. doi:10.1007/s13277-014-2888-7.

[26] Zhu H, Luo H, Shen Z, et al. Transforming growth factor-beta1 in carcinogenesis, progression, and therapy in cervical cancer[J]. Tumour boil, 2016, 37(6): 7075-7083. doi:10.1007/s13277-016-5028-8.

[27] Chen Y, Zhang K, Li Y, et al. Estrogen-related receptor alpha participates transforming growth factor-beta (TGF-beta) induced epithelial-mesenchymal transition of osteosarcoma cells[J]. Cell adhesion & migration, 2017, 11(4): 338-346. doi:10.1016/j.yexcr.2015.11.020.

[28] Kim H, Choi JA, Kim JH. Ras promotes transforming growth factor-beta (TGF-beta)-induced epithelial-mesenchymal transition via a leukotriene B4 receptor-2-linked cascade in mammary epithelial cells[J]. J Biol Chem, 2014, 289(32): 22151-22160. doi:10.1074/jbc.M114.556126.

[29] Shirakihara T, Saitoh M, Miyazono K. Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by delta EF1 proteins in epithelial mesenchymal transition induced by TGF-beta[J]. Mol Biol Cell, 2007, 18(9): 3533-3544. doi:10.1091/mbc.E07-03-0249.

[30] Saitoh M. Epithelial-mesenchymal transition is regulated at post-transcriptional levels by transforming growth factor-beta signaling during tumor progression[J]. Cancer science, 2015, 106(5): 481-488.

[31] Katsuno Y, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression[J]. Current opinion in oncology, 2013, 25(1): 76-84.

(编辑:刘 艺)