

放射抗拒性食管癌细胞株 KYSE-150R 上皮-间质转化特性鉴定

谢聪颖^{1,2}, 苏华芳², 景钊², 张力², 薛圣留², 邓霞²,
吴式琇², 伍钢¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院, 湖北 武汉 430023;

2. 温州医学院附属第一医院, 浙江 温州 325000)

摘要: [目的] 鉴定放射抗拒性食管癌细胞株 KYSE-150R 获得上皮-间质转化(EMT) 表型。 [方法] 食管鳞状细胞癌细胞株 KYSE-150 经分次反复照射、单克隆培养, 筛选出具有放射抗拒性细胞株 KYSE-150R。克隆形成实验计算细胞存活率, 拟合生存曲线并计算放射生物学参数。高倍显微镜下观察细胞形态学变化。采用 RT-PCR、Western Blot 和免疫荧光检测上皮表型标志物 E 钙黏蛋白(E-cad)、间质表型标志物波形蛋白(VIM)和转录因子 Slug、Snail 与 Twist 的表达。 [结果] 构建的食管癌细胞株 KYSE-150R 比其亲本对射线更加抗拒, 经传代 50 代后仍保留放射抗拒性。放射抗拒的食管癌细胞株 KYSE-150R 发生 EMT 相符的形态学改变: 细胞呈纺锤体状, 极性消失。与母株相比, KYSE-150R 中 E-cad 表达下降, VIM、Slug 及 Snail 表达上调, Twist 表达未见明显变化。免疫荧光染色证实细胞膜 E-cad 蛋白的丢失, 上调的 β -catenin 移位至细胞核。 [结论] 放射抗拒的食管癌细胞株 KYSE-150R 获得了 EMT 表型, 其与食管癌放射抗拒的形成有关。

关键词: 放射抗拒; 食管肿瘤; 上皮间质转化; KYSE-150R 细胞株

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)07-0504-04

Identification of Epithelial-mesenchymal Transition Phenotype in Radioresistant Esophageal Carcinoma Cell Line KYSE-150R

XIE Cong-ying^{1,2}, SU Hua-fang², JING Zhao², et al.

(1. Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China; 2. First Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

Abstract: [Purpose] To identify the acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype in radioresistant esophageal carcinoma cell line KYSE-150R. [Methods] The radioresistant cell line KYSE-150R was established by fractionated irradiation (FIR) and monoclonal culture. Cell survival was accounted by clonogenic assays and the morphological changes were observed by microscopy. RT-PCR, Western Blot and immunofluorescence were performed to examine expression of E-cadherin, vimentin, Slug, Snail and Twist. [Results] The established esophageal carcinoma cell line KYSE-150R showed higher radioresistance than parental cell line. The KYSE-150R cell line maintained radioresistant phenotype for at least 5 months with 50 passages after the cessation of radiation. KYSE-150R cells showed phenotypic changes consistent with EMT: spindle-cell shape, and loss of polarity. Compared with mother cell line the expression of E-cadherin downregulated and the expression of vimentin, Snail and Slug upregulated in KYSE-150R cells. However, the expression of Twist did not show marked changes. [Conclusion] Radioresistant KYSE-150R cells acquire phenotype of EMT, and it might relate to radioresistance for esophageal carcinoma.

Subject words: radiation resistance; esophageal neoplasms; epithelial-mesenchymal transitions; KYSE-150R cell line

目前晚期食管癌的标准治疗方式是同步放化疗, 但仍然有 50% 左右的患者在接受同步放化疗后

出现局部复发, 提高放射剂量只会增加放射毒性而不能提高临床疗效^[1,2]。食管癌放疗结束后, 通常出现小灶区的复发或进展, 意味着部分肿瘤细胞出现再生长, 提示存在放射抗拒性癌细胞。放疗抗拒的机制非常复杂, 普遍认为实体肿瘤的肿瘤干细胞

通讯作者: 伍钢, 主任, 教授, 主任医师, 博士生导师, 博士; 华中科技大学同济医学院附属协和医院肿瘤中心, 湖北省武汉市解放大道 1277 号(430023); E-mail: wugang18@yahoo.cn。

收稿日期: 2012-04-26; **修回日期:** 2012-05-29

(CSC)引起放疗或化疗的抗拒^[3],并导致现代的治疗手段失败,但这种观点在最近受到了挑战。有研究表明^[4],上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是引起化疗抗拒性的原因。而同时,有多方面的迹象将 EMT 与放疗的抗拒联系在了一起。本研究拟通过梯度剂量法建立放射抗拒食管癌细胞株 KYSE-150R,并鉴定其具有上皮-间质转化表型。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器及试剂

细胞和试剂:人食管鳞癌细胞株 KYSE-150 购自 JCRB (Japanese Collection of Research Biore-sources)。细胞培养基 RPMI 1640 购自 GIBCO 公司。胎牛血清购自杭州四季青公司。SYBR Green PCR Master Mix(No.081 1321,UK) 购自 Applied Biosystems 公司。

主要仪器:倒置相差显微镜(德国 Leica);直线加速器(VARIAN2300C/D);流式细胞仪 FACS Cal-ibur(Beeton Dickinson 公司);ABI7500 型荧光定量 PCR 仪。

1.2 实验方法

细胞培养:细胞株 KYSE-150 贴壁培养在含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,置 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,0.25%胰酶 f 内含 0.02%EDTA 消化传代。

放射抗拒性细胞株 KYSE-150R 的建立:采用直线加速器 6MV X 线照射,照射野 10cm×10cm(25cm² 培养瓶),源靶距 100cm,剂量率 200cGy/min,照射时培养瓶底面朝上,上置 1.5cm 的固体水模板。取处于指数生长期的 KYSE-150 细胞,用 X 射线照射 100cGy,立即放回孵箱中培养,待细胞生长至 90%时,胰酶消化传代,待细胞增殖进入指数生长期时,再次 X 线照射 100cGy,重复以上过程,剂量逐步递增,共计 100cGy 3 次、200cGy 3 次、400cGy 3 次,累计剂量 2 100cGy,筛选得到放射抗拒性细胞株 KYSE-150R,细胞冻存于液氮中备用。在整个诱导过程中亲本 KYSE-150 细胞用同样的方法同步进行传代培养,但不予 X 线照射。

克隆形成实验测定放射敏感性:设 0、2、4、6、8、10Gy 共 6 个剂量点,应用成克隆实验法计算细胞存

活分数,用 Sigmaplot 软件,以多靶单击模型 $S=1-(1-e^{-D/D_0})^N$ 拟合细胞存活曲线。

细胞形态学观察:取对数生长期的单层培养细胞,倒置相差显微镜下观察两种细胞的形态学改变。

RT-PCR 检测:Trizol 试剂一步法提取总 RNA,采用 ABI7500 型荧光定量 PCR 仪,SYBR Green 荧光染料掺入法相对定量。以内参 GAPDH 为参照,计算 VIM、Slug、Snail 及 Twist 基因差异表达的倍数。

Western Blot 检测:将指数生长期细胞用一次性刮刀轻轻刮下,提取蛋白,作 SDS-PAGE 电泳,电泳后转膜,转膜后封闭 2h,一抗(1:1 000)孵育 4℃过夜,2 抗(1:10 000)孵育 1h,ECL 曝光,胶片用 Gel-Pro3.1 软件分析。

免疫荧光染色:取指数生长期细胞,细胞贴壁且完全伸展后终止培养,甲醇固定,进行双重免疫荧光染色,一抗(E-钙黏蛋白,E-cad:单克隆鼠抗; β -catenin:单克隆兔抗) 1:100 稀释 4℃过夜,二抗(山羊抗鼠 PE,驴抗兔 FITC)1:200 孵育 1h,DAPI 复染细胞核,倒置荧光显微镜下观察。

1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 数据分析软件,两两比较用 t 检验,多组数据比较用 one-way ANOVA 分析,拟合的细胞存活曲线用秩和检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 放射敏感性测定

根据克隆形成实验得到的平均存活分数,拟合曲线见图 1。结果显示 KYSE-150R 细胞 SF₂、D₀(平

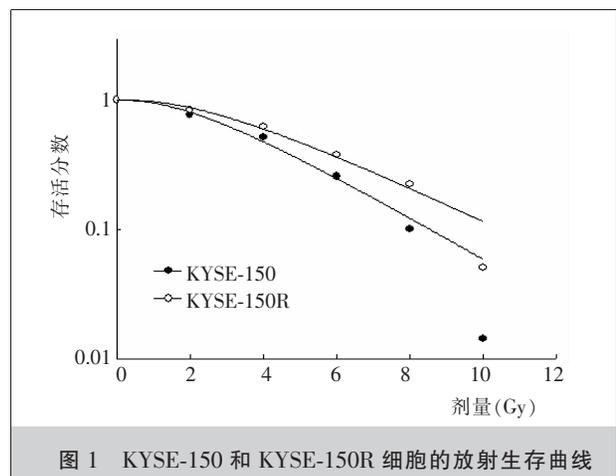


图 1 KYSE-150 和 KYSE-150R 细胞的放射生存曲线

均致死剂量)、Dq(准阈剂量)及N值均高于 KYSE-150 细胞,提示 KYSE-150R 细胞比其亲本更具放射抗拒性,两者 D₀、Dq 比较,差异均有显著性(P<0.05),见表 1。

2.2 KYSE-150R 形态学观察

在形态上,相较母株, KYSE-150R 细胞的形状也更加不规则,细胞呈纺锤体状,极性消失,在培养液中细胞与细胞间的黏性也相对疏松,这表明 KYSE-150R 细胞可能存在部分间质特性(图 2)。

2.3 KYSE-150 与 KYSE-150R 细胞株 EMT 相关转录因子和蛋白表达水平

在有 EMT 表型的 KYSE-150R 细胞株中,波形蛋白(Vimentin, VIM)表达显著增加(P=0.03),转录因子 Slug、Snail 表达上调, Twist 表达未见明显变化(图 3)。蛋白印迹分析结果清楚地显示了 KYSE-150R 细胞 E-cad 蛋白水平有着显著下降(P=0.017)(图 4)。免疫荧光染色结果证实细胞膜 E-cad 蛋白的丢失,上调的 β-catenin 移位至细胞核(图 5)。

3 讨论

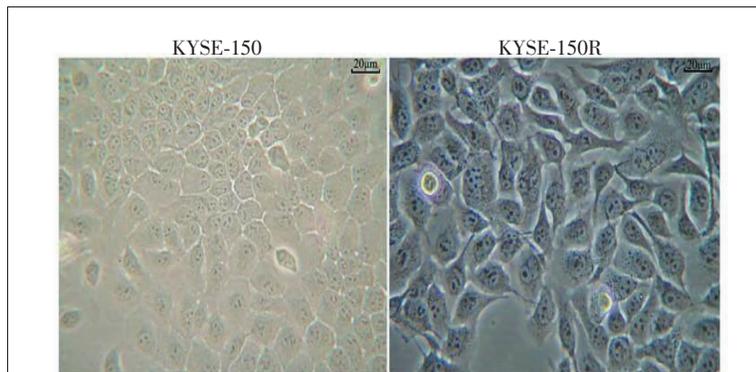
上皮-间质转化(EMT)是指在某些特殊的生理或病理条件下,上皮细胞向间质细胞发生转化的现象,以上皮细胞极性丧失并获得间质细胞表型和运动能力为特征^[5]。EMT 对胚胎发育过程中的组织塑型及细胞迁移形成器官至关重要,并在纤维化和肿瘤发生、发展中也发挥着重要作用^[4]。研究表明^[6,7],EMT 可能参与了肿瘤获得性化疗抗拒的形成,并逐渐成为肿瘤研究领域的热点之一,为肿瘤化疗抗拒性的逆转提供了可能的新靶点。很多侵袭性肿瘤中都有细胞发生 EMT,且与肿瘤对化疗耐受密切相关,但多数研究是关于化疗中产生的 EMT 肿瘤细胞,极少涉及放射治疗^[8]。

本课题组应用梯度剂量法建立起食管鳞癌放射抗拒性细胞系 KYSE-

表 1 KYSE-150 和 KYSE-150R 细胞的放射敏感性参数

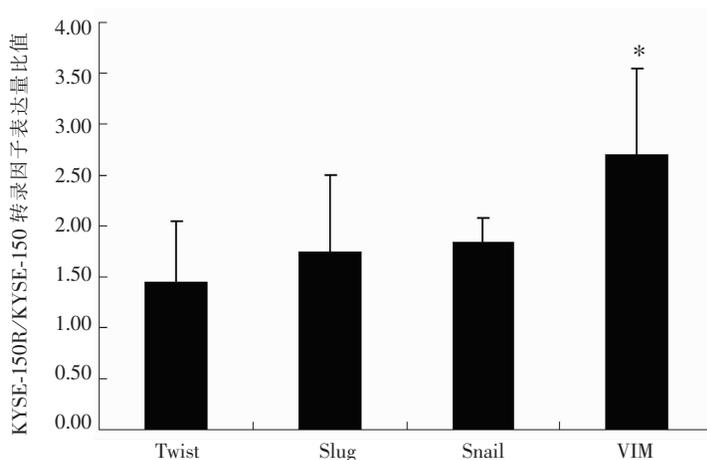
细胞	SF ₂	D ₀	Dq	N
KYSE-150	0.80	2.65	2.50	2.57
KYSE-150R	0.87	3.21*	3.16**	2.68

*:P<0.05, **:P<0.01。



显微镜下见 KYSE-150 细胞形态较规则,呈片状生长,折光度较好;KYSE-150R 细胞的形状不规则,细胞呈纺锤体状,极性消失。

图 2 KYSE-150 和 KYSE-150R 细胞的形态学差异



相比 KYSE-150 组, KYSE-150R 组 VIM 显著增加, 转录因子 Slug、Snail 表达上调, Twist 表达未见明显变化, *: P<0.05。

图 3 RT-PCR 检测相关基因的表达

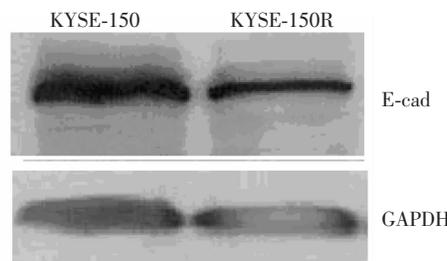
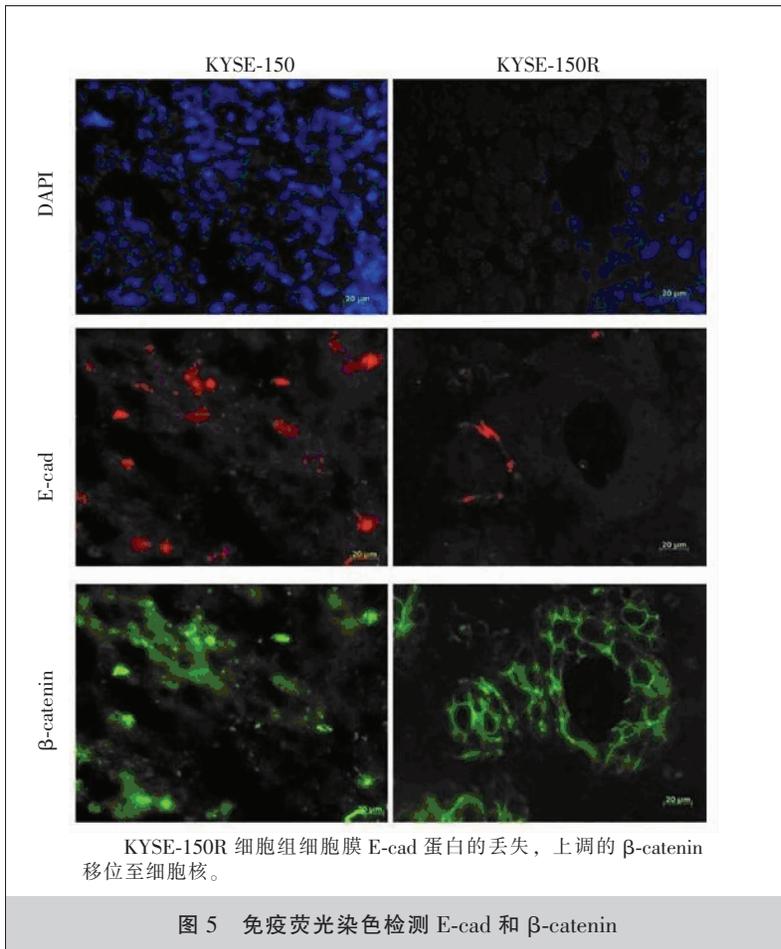


图 4 Western Blot 检测两组细胞 E-cad 蛋白表达



150R, 其 D_0, D_q 与其母株相比有显著提高, 提示 KYSE-150R 细胞获得了明显的放射抗拒性^[9,10]。进一步研究发现, 放射抗拒的食管癌细胞株 KYSE-150R 获得了上皮—间质转化(EMT)表型, 细胞明显出现了纺锤型改变。我们用蛋白印迹分析和免疫荧光染色方法, 分析了母细胞株与耐放射细胞株的 E-cad 蛋白与 β -catenin 的变化。细胞膜 E-cad 蛋白的丢失, 上调的 β -catenin 移位至细胞核, 而这些正是 EMT 过程的标志。同时 RT-PCR 结果显示在有 EMT 表型的 KYSE-150R 细胞株中, 转录因子 VIM 的表达水平显著增加, Slug、Snail 表达上调, Twist 表达未见明显变化。在先前的研究中, 有发现转录因子, 如 Snail 和 Twist 等在 EMT 中起一定的作用^[11,12]。但在我们的研究中却相反, 相比其母株, KYSE-150R 的 Twist 的表达水平没有显著提高, 表明在食管癌细胞中, 该因子与辐射诱导的 EMT 没有显著相关性。

综上, 放射抗拒性细胞经历了完全的或部分的上皮—间质转化, 并有明确的分子模型。EMT 可以

反映人类癌症细胞接受治疗或选择压力的过程, 本研究在食管癌细胞放射抗拒性实验中发现放疗后食管癌上皮细胞具有向间质转化的现象, 提示放疗过程产生的 EMT 与放射抗拒的发生有关, 值得深入研究。

参考文献:

- [1] Cooper JS, Guo MD, Herskovic A, et al. Chemoradiotherapy of locally advanced esophageal cancer: long-term follow-up of a prospective randomized trial (RTOG 85-01). Radiation Therapy Oncology Group[J]. JAMA, 1999, 281(17):1623-1627.
- [2] Minsky BD, Pajak TF, Ginsberg RJ, et al. INT 0123 (Radiation Therapy Oncology Group 94-05) phase III trial of combined-modality therapy for esophageal cancer: high-dose versus standard-dose radiation therapy[J]. J Clin Oncol, 2002, 20(5):1167-1174.
- [3] Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, et al. Cancer stem cells — perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells[J]. Cancer Res, 2006, 66(19):9339-9344.
- [4] Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, et al. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer[J]. Cancer Res, 2009, 69(14): 5820-5828.
- [5] Thiery JP, Acloque H, Huang RY, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. Cell, 2009, 139(5):871-890.
- [6] Ahmed N, Abubaker K, Findlay J, et al. Epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes facilitate chemoresistance in recurrent ovarian cancer[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2010, 10(3):268-278.
- [7] Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance[J]. Cancer Sci, 2010, 101(2):293-299.
- [8] 任建华, 李瑞明, 李超, 等. 放射抗拒食管癌细胞系的建立及抗拒机制研究[J]. 中国肿瘤, 2009, 18(1): 912-915.
- [9] 张力, 李海英, 吴式琇. X 线反复照射人食管鳞癌细胞系 KYSE-150 的生物效应研究[J]. 中华放射肿瘤学, 2010, 19(1):60-63.
- [10] Jing Z, Gong L, Xie CY, et al. Reverse resistance to radiation in KYSE-150R esophageal carcinoma cell after epidermal growth factor receptor signal pathway inhibition by cetuximab[J]. Radiother Oncol, 2009, 93(3):468-473.
- [11] Ansieau S, Bastid J, Doreau A, et al. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence[J]. Cancer Cell, 2008, 14(1):79-89.
- [12] Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumor progression: an alliance against the epithelial phenotype?[J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(6):415-428.