专题报道

卵巢癌相关成纤维细胞通过上皮间质转化促进卵巢癌细胞 SKOV3 侵袭的研究

高　雯,朱　滔
(浙江省肿瘤医院,浙江 杭州 310022)

摘　要:[目的]研究癌相关成纤维细胞的条件培养基对卵巢癌细胞侵袭能力的影响及作用机理。[方法]原代培养人卵巢正常成纤维细胞(NOF)和癌相关成纤维细胞(CAF),并收取条件培养基 NOFcm 和 CAFcm。用无血清的培养基 DMEM、NOFcm 和 CAFcm 分别处理 SKOV3 细胞,诱导 SKOV3 细胞发生上皮间质转化(EMT),通过形态观察和 Western blot 验证。形态上发生上皮间质转化(EMT)的 SKOV3 细胞,用 transwell 小室及三维培养实验检测细胞的侵袭能力的改变。[结果]CAF 的条件培养基能在体外诱导卵巢癌细胞 SKOV3 在形态上发生改变:细胞连接疏松,部分细胞呈梭形,且明显下调 E-cadherin 蛋白表达量,明显上调 Vimentin 蛋白表达量。Transwell 侵袭实验显示 CAFcm 处理后的 SKOV3 穿透 matrigel 胶的细胞数(284.00±32.86)相比于无血清的 DMEM 组(60.60±11.72)和 NOFcm 组(116.60±14.22),数量明显增多(P=0.000374 和 P=0.001258);三维培养实验中只有 CAFcm 组和 NOFcm 组能形成克隆球,而在无血清的 DMEM 组不能形成克隆球,CAFcm 组(37.75±1.70)相比于 NOFcm 组(14.5+±1.29),形成的克隆球明显增大,向外侵袭能力增强,数量增多(P<0.001)。[结论]卵巢癌 CAF 通过诱导卵巢癌细胞发生 EMT,进而促进卵巢癌细胞的侵袭能力。

主题词:卵巢肿瘤;癌相关成纤维细胞;上皮间质转化;侵袭
中图分类号:R737.31　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-170X(2016)12-0988-05
doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2016.12.B002

Ovarian Cancer-associated Fibroblasts Promotes Invasion of Ovarian Cancer SKOV3 Cell Lines Through Epithelial-mesenchymal Transition

GAO Wen,ZHU Tao
(*Zhejiang Cancer Hospital*,*Hangzhou* 310022,*China*)

Abstract:[Objective] To explore the effects of cancer-associated fibroblasts(CAF) on invasion ability of epithelial ovarian cancer cells(EOC). [Methods] Normal human ovarian fibroblasts(NOF) and CAF were primarily cultured and the conditioned mediums (CM) of normal human ovarian fibroblast(NOFcm) and CAF(CAFcm) were collected. Ovarian cancer SKOV3 cells were treated with serum free medium(DMEM),NOFcm or CAFcm to induce epithelial-mesenchymal transition(EMT). EMT markers E-cadherin and Vimentin were detected by Western blot after SKOV3 cells were treated. Cell invasion ability was measured by Transwell chamber and three-dimensional cell culture. [Results] After treatment with CAFcms,SKOV3 cells had loose connections,part of the cells was spindle shaped; the E-cadherin protein level was down-regulated and Vimentin was up-regulated. Transwell assay showed that the migration and invasion of SKOV3 cells treated with CAFcm(284.00±32.86)were significantly increased,compared with NOFcm group(116.60±14.22) and DMEM group (60.60±11.72)(P=0.000374 and P=0.001258,respectively). In three-dimensional culture models,clone spheres were formed in CAFcm group and in NOFcm group,but not in DMEM group. The clone spheres in CAFcm group were bigger and more aggressive than those in NOFcm group; and the number of clone spheres in CAFcm group(37.75±1.70) was significantly increased compared with NOFcm group(14.50±1.29)(P<0.001). [Conclusion] CAF induces the EMT of ovarian cancer cells,which thereby promotes the invasiveness of ovarian cancer cells *in vitro*.

Subject words:ovarian neoplasms;cancer-associated fibroblast;epithelial-mesenchymal transition;invasion

目前,肿瘤微环境的研究是肿瘤研究领域的热点。肿瘤微环境不仅在肿瘤细胞的恶性转化过程中发挥重要作用,而且在肿瘤细胞的转移复发阶段提供必要的支持[1,2]。肿瘤微环境中有多种细胞和细胞外基质,其中最主要的细胞是癌相关成纤维细胞

基金项目:浙江省自然科学基金(LY14H160010)
通讯作者:朱　滔,副主任医师,硕士;浙江省肿瘤医院妇瘤科,浙江省杭州市拱墅区半山东路 1 号(310022);E-mail:kernor@163.com
收稿日期:2016-07-02;**修回日期**:2016-10-05

(cancer-associated fibroblasts,CAF)[3]。在对多种类型的上皮性肿瘤的研究中发现:CAF 可以促进上皮细胞的恶性转变，在肿瘤的发生和演进过程中起到了重要的作用[4]。

上皮间质转化(EMT),是指上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程，是肿瘤发生侵袭、转移的第一步 [5,6]。卵巢恶性肿瘤中85%~90%都是上皮性肿瘤,同时卵巢癌的主要转移途径是腹腔内播散和远处转移。所以研究卵巢癌 EMT 有重要的意义。那么卵巢癌中的 CAF 能否导致肿瘤的 EMT,从而促进肿瘤的侵袭转移？目前的研究还比较少。本研究初步探讨 CAF 对卵巢癌细胞 EMT 的诱导及对其侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞系和培养基

实验所用的卵巢正常成纤维细胞(NOF)和卵巢癌相关成纤维细胞(CAF)分别来自人正常卵巢标本和卵巢癌标本的原代培养细胞。组织标本来自浙江省肿瘤医院妇瘤科 2014 年收治的早期宫颈癌切除卵巢的标本 2 例 (经病理证实卵巢是正常的)和 2014 年收治的卵巢癌标本 2 例(经病理证实为高级别浆液性腺癌),标本获取前均与患者签署知情同意书,获得本人许可。成功分离到 2 株 NOF 细胞和 2 株 CAF 细胞,37℃、CO_2 体积分数为 5%的恒温培养箱培养，细胞生长状态良好。人卵巢癌细胞株 SKOV3:购自美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection,ATCC)；培养基为含 10%胎牛血清、100U/mL 青霉素及 100μg/mL 链霉素的 DEME(购于美国 Gibco 公司)，培养环境为 37℃、CO_2 体积分数为 5%的恒温培养箱。传代时用 0.25%的胰蛋白酶消化,按 1:3 的比例传代。

1.2 正常卵巢成纤维细胞和 CAF 的分离培养及条件培养基收取

细胞培养:取生长状态良好的未衰老的 NOF 和 CAF 细胞,用含 10%FBS 的 DMEM 培养基培养,48h 细胞汇合度约 80%。

收集条件培养基:取第 3 代的、生长状态良好的 NOF 和 CAF 培养 24h 后，更换无血清 DMEM 培养基，继续培养 48h 后收集上清液即为条件培养基:NOFcm 和 CAFcm。收集的条件培养基,离心机 1500r/min,10min,针筒吸取上清液用 0.22pm 一次性滤器过滤,分装后可立即使用,也可-80℃保存备用。

1.3 条件培养基处理 SKOV3 细胞

将 SKOV3 细胞在 35mm 培养皿中正常培养至 75%的密度，然后用含 NOFcm 或 CAFcm 或无血清的 DMEM 处理细胞 48h,细胞长满后传代继续处理 48h，收集细胞样品，进行蛋白质印迹法(Western blot)检测或进行细胞迁移与侵袭检测试验。

1.4 Western blot 检测

细胞收集后加入 RIPA 裂解液 (1×PBS,1% NP40,0.1%SDS,5mmol/L EDTA,0.5%去氧胆酸钠,1mmol/L 原钒酸钠) 常规方法提取细胞的总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。取 25μg 蛋白质，行 10% SDS-PAGE 电泳。电泳完毕后,4℃、90V 电转移 2h 至 PVDF 膜上。PVDF 膜用含 5%脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1h 后，加入一抗 4℃温育过夜,TBST 洗膜后,加入二抗室温孵育 1.5h,洗膜后,加入现配的增强型化学发光试剂(ECL)常规显像。以 β-actin 为内对照。其中抗体 E-cadherin 和 Vimentin 购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.5 Tanswell 法测细胞侵袭能力

本实验采用 8μm 微孔聚碳酸酯膜的 transwell 小室(购自美国 BD 公司)。首先将 Matrigel(50mg/L)胶和无血清 DMEM 培养基以 1:3 比例进行混合。小室上室铺 100μl 混合好的 Matrigel,37℃无菌保持过夜，确保 Matrigel 充分凝固。收集对数生长期的细胞，分别用无血清的 DMEM、NOF 条件培养基、CAF 条件培养基培养细胞,调整细胞浓度为 1×10^6/ml,每孔加 100μl 细胞悬液于上室,设 3 个重复孔,下室加入 10% FBS 的 DMEM 培养基 600μl。在 37℃、体积分数为 5%的 CO_2 培养箱中温育 24h 后取出小室,滤膜用 4%甲醛固定 20min。PBS 清洗 3 次,用棉签小心擦去未侵袭的滤膜表面细胞,1%结晶紫染色,之后在显微镜下拍照,本实验重复 3 次。

1.6 体外三维培养法

1.6.1 包 被

①用 0.02mol/l 乙酸稀释Ⅰ型鼠尾胶原 (购自美国 BD 公司)至 50μg/ml;②在 24 孔板中每孔加入以上 300~500μl 已稀释好的Ⅰ型鼠尾胶原，室温孵育 1h;③将 24 孔板中的液体吸走,PBS 清洗 3 次;④24

孔板可以立即使用或无菌条件下晾干备用。

1.6.2 接种细胞

24 孔板每孔最终接种 250 个细胞,先取两个试管 A、B,A 中加入培养基和一定数目的细胞,B 中加入培养基、Ⅰ型鼠尾胶原和 NaOH（比例为 5:1:0.0235),在冰上操作,A 和 B 的比例为 1:1,在冰上混含 A、B,混匀后加入到已包被好的 24 孔板中,每孔加入 1ml,仔细操作不要有气泡产生。加好之后,放进 37℃培养箱孵育。1 周之后,荧光倒置显微镜下观察克隆的形态,拍照,并计数克隆的数量。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件包进行统计学处理。计数资料采用 χ^2 检验;计量资料采用非参数检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CAF 条件培养基促进 SKOV3 细胞形态上发生 EMT

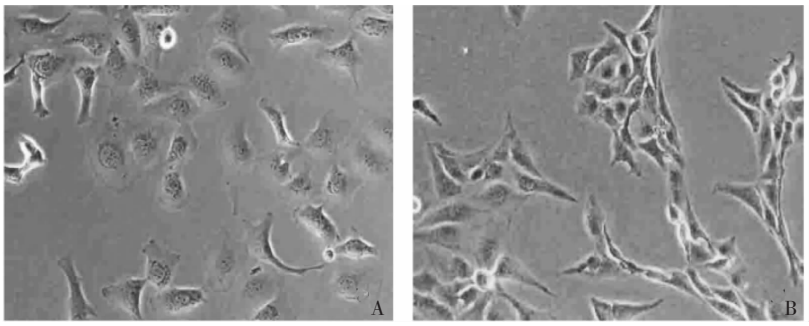
用无血清的 DMEM、NOFcm 或 CAFcm 或分别培养 SKOV3 细胞 2 代后，观察细胞生长状况及细胞形态，发现只有 CAFcm 组细胞长势良好，细胞增殖能力最强，SKOV3 细胞由多角形变为长梭形，细胞之间由之前的紧密连接,也变为间质样散在分布生长(Figure 1)。而在无血清的 DMEM 组和 NOFcm 组，由于营养物质的缺乏,细胞逐渐凋亡，不能发生形态上的 EMT。发生 EMT 后的肿瘤细胞,细胞之间紧密连接缺失,变为长梭形,细胞运动能力明显增强,是细胞侵袭转移的重要环节。

2.2 CAF 条件培养基对 SKOV3 细胞 EMT 标记蛋白表达的影响

用无血清的 DMEM、NOFcm 或 CAFcm 或分别培养 SKOV3 细胞 2 代后，通过 Western blot 检测 EMT 相关蛋白的变化，并分析其具体的灰度值。在本研究中,β-actin 的灰度值为 ;3667.90;Normal medium、NOFcm、CAFcm 组 E-cadherin 的灰度值分别为:1882.90、778.65、360.25。Normal medium、NOFcm、CAFcm 组 Vimentin 的灰度值分别为:821.43、760.60、1220.90。可以明显地观察到 CAFcm 组下调 E-cadherin 蛋白表达,上调 Vimentin 蛋白表达。E-cadherin 是肿瘤细胞表面上皮的特异性标志物,而 Vimentin 是间质细胞的特异性标志物,E-cadherin 的丢失，表明上皮之间的紧密连接遭到破坏,而 Vimentin 的增加,表明细胞具有间质的特性。说明 CAFcm 处理后细胞发生了 EMT(Figure 2)。

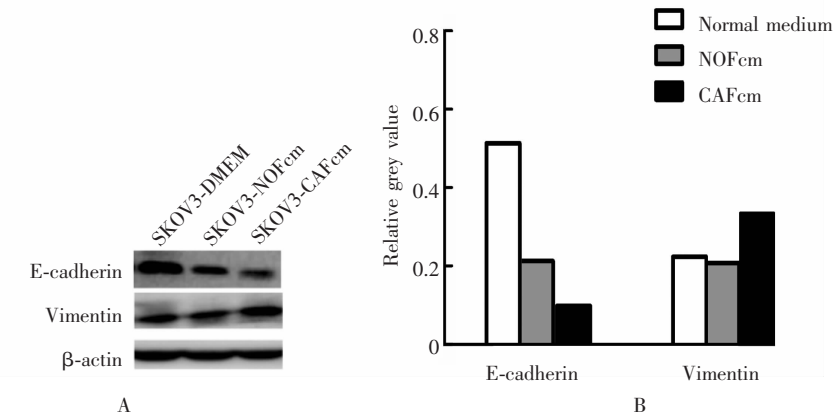
2.3 CAF 条件培养基促进 SKOV3 细胞的侵袭能力

为了检测 CAFcm 对 SKOV3 细胞的迁移侵袭能



A:Cell morphology of ovarian cancer cell line SKOV3;B:Cell morphology of SKOV3 treated by CAFcm for 2 passages(100×).

Figure 1 Cell morphology of ovarian cancer cells(×100)



A:Western blot analysis for E-cadherin and Vimentin proteins' expression; B:Relative grey value of Western blot.

Figure 2 E-cadherin and Vimentin proteins' levels in SKOV3 treated by different mediums after 48h

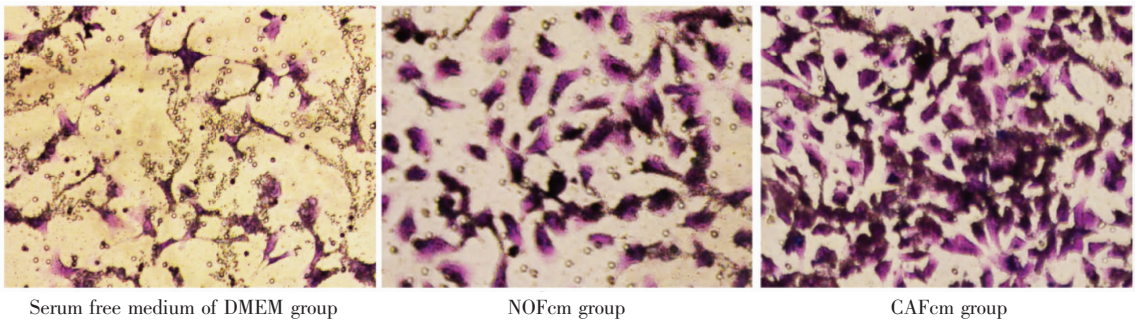
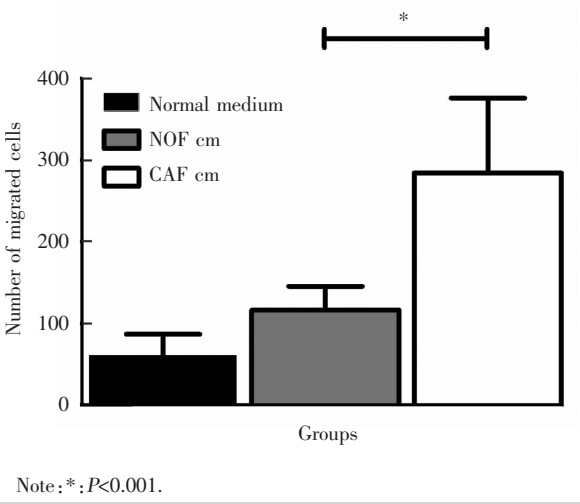


Figure 3　Cell invasion was measured by transwell assay(100×)

力的影响，本实验采用了 transwell 小室进行实验。培养 24h 后检测每高倍视野下穿过细胞膜细胞数，3 个复孔求得均数和标准差。Normal medium、NOFcm、CAFcm 组的细胞数分别为：60.60±11.72、116.60±14.22、284.00±32.86。结果表明，对比于无血清的 DMEM 组，CAFcm 处理的 SKOV3 细胞穿过膜的细胞数量明显增加（P=0.000374），同时对比于 NOFcm 组，CAFcm 处理的 SKOV3 细胞穿过膜的细胞数量明显增加（P=0.001258）。表明 CAFcm 处理后细胞的侵袭性增强(Figure 3，4)。进一步证明，CAF 可能通过其分泌的一系列因子促进肿瘤细胞的恶性行为，从而促进卵巢癌的的扩散和转移。

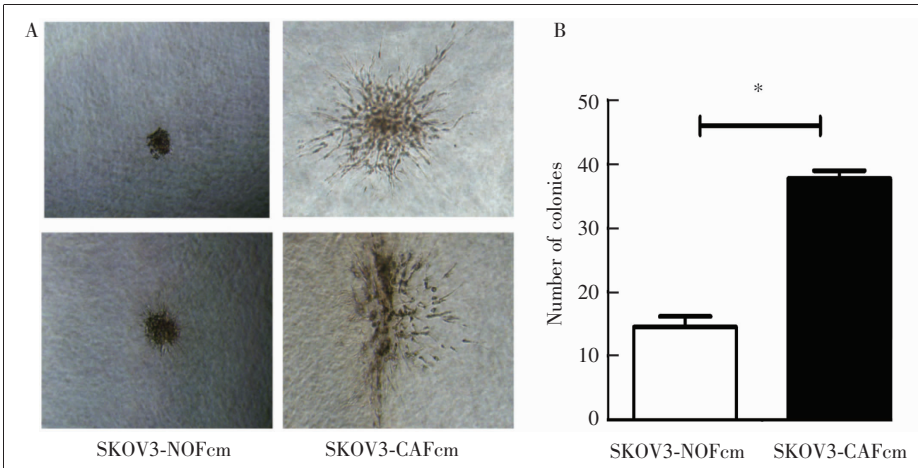


Note：*：P<0.001.

Figure 4　Quantification for the transwell assay

2.4　三维培养观察 CAFcm 处理后 SKOV3 细胞的形态和侵袭力

三维培养形成类似体内组织的结构，细胞能够沿着三维载体的孔隙生长，可以动态观察到肿瘤细胞的侵袭转移状况。结果，在无血清的 DMEM 组不能形成克隆球，NOFcm 组和 CAFcm 组形成的克隆球分别为（37.75±1.70）和（14.50±1.29）；对比于 NOFcm 组，CAFcm 组形成的克隆球明显增大（图 5A），细胞向外的侵袭性越强，数量增多(图 5B，P<0.001)。进一步表明 CAF 可以诱导肿瘤细胞发生 EMT，从而促进肿瘤的生长和侵袭。



Note：SKOV3 cells treated with different mediums for 14d(40×). *：P<0.001.

Figure 5　Morphology and amount of clone spheres in three-dimensional cell culture

3　讨　论

现在的肿瘤学观念越来越强调肿瘤与肿瘤微环

境是一个不可分割的整体[7]。卵巢癌 CAF 也是卵巢肿瘤微环境中的重要的成分，不仅在启动肿瘤的恶性转化发挥作用，而且具有促进卵巢癌细胞增殖和侵袭转移的作用[8,9]。CAF 发挥作用的方式主要是由于活化后的 CAF 分泌大量的生长因子和趋化因子到肿瘤微环境中[10]，所以在 CAF 的条件培养基中含有 CAF 分泌的大量因子。

EMT 是大多数上皮性肿瘤发生侵袭转移转移的第一步，越来越多的临床和实验研究证实 CAF 与 EMT 相关[11,12]。这是因为诱导肿瘤细胞发 EMT 的胞外信号主要包括一系列的生长因子和趋化因子等[13,14]，而这些因子很多是由 CAF 分泌的。所以在本实验中只有 CAF 条件培养基组能促进 SKOV3 细胞形态上发生上皮间质转化样改变。细胞之间的紧密连接丢失，变为散在分布的长梭形，更有利于细胞的活动。通过蛋白检测发现，这些形态发生改变的细胞，明显地下调 E-cadherin 蛋白表达，上调 Vimentin 蛋白表达，这些蛋白的变化进一步证实 CAF 的条件培养基诱导卵巢癌细胞发生了 EMT[13]。

EMT 发生可增强细胞的迁移和侵袭能力[15]，这在本研究的 transwell 小室和三维培养实验中得到了验证。CAFcm 处理后的 SKOV3 细胞的穿透 matrigel 胶的能力明显增强，而在三维培养试验中，从克隆球的形态中也可以观察到肿瘤细胞向外侵袭性也明显提高。最近的研究也认为，发生 EMT 的肿瘤细胞甚至具有部分肿瘤干细胞的特性。而在本研究的三维培养试验中 CAFcm 处理后的 SKOV3 细胞形成的克隆球在一定程度上具有干细胞的特性。三维培养模型是近年来细胞培养领域研究的热点，其利用各种方法及材料使细胞呈空间立体方式生长，使其更接近于体内生长模式，形成类似体内组织的结构，发挥其功能[16]。三维培养模型中观察到的克隆球对于体外研究肿瘤的增殖和侵袭转移具有重要的价值，因为能在体外观察到肿瘤微环境对细胞的增殖、迁移及侵袭的作用[17]。本实验的结果基本证实 CAF 通过分泌一系列的因子到条件培养基中，诱导卵巢癌发生 EMT，进而促进肿瘤的迁移和侵袭，但数据仍需要进一步在动物体内和人体卵巢癌标本组织中进行相关验证。这一初步结论为我们后续的研究提供了思路和方向，同时预示着 CAF 在肿瘤微环境中的重要性，对卵巢癌复发的早期诊断、治疗和预后可能具有理论价值和临床意义。

参考文献：

[1] Gilbertson RJ，Rich JN. Making a tumour's bed：glioblastoma stem cells and the vascular niche [J].Nat Rev Cancer，2007，7(10)：733-736.

[2] Swartz MA，Iida N，Roberts EW，et al. Tumor microenvironment complexity：emerging roles in cancer therapy[J]. Cancer Res，2012，72(10)：2473-2480.

[3] Kalluri R，Zeisberg M. Fibroblasts in cancer [J]. Nat Rev Cancer，2006，6(5)：392-401.

[4] Bhowmick NA，Chytil A，Plieth D，et al. TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia[J]. Science，2004，303(5659)：848-851.

[5] Acloque H，Adams MS，Fishwick K，et al. Epithelialmesenchymal transitions：the importance of changing cell state in development and disease[J]. J Clin Invest，2009，119(6)：1438-1449.

[6] Thomson S，Petti F，Sujka-Kwok I，et al. A systems view of epithelial-mesenchymal transition signaling states[J]. Clin Exp Metastasis，2011，28(2)：137-155.

[7] Catalano V，Turdo A，Di Franco S，et al. Tumor and its microenvironment：a synergistic interplay[J].Semin Cancer Biol，2013，23(6 pt B)：522-532.

[8] Yang Z，Xu S，Jin P，et al. MARCKS contributes to stromal cancer-associated fibroblast activation and facilitates ovarian cancer metastasis[J]. Oncotarget，2016，7(25)：37649-37663.

[9] Xing F，Saidou J，Watabe K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment [J].Front Biosci，2010，15：166-179.

[10] De Boeck A，Hendrix A，Maynard D，et al. Differential secretome analysis of cancer-associatedfibroblasts and bone marrow-derived precursors to identify microenvironmental regulators of colon cancer progression [J]. Proteomics，2013，13(2)：379-388.

[11] Acloque H，Adams MS，Fishwick K，et al. Epithelial-mesenchymal transitions：the importance of changing cell state in development and disease [J]. J Clin Invest，2009，119(6)：1438-1449.

[12] Baum B，Settleman J，Quinlan M P. Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease[J]. Semin Cell Dev Biol，2008，19(3)：294-308.

[13] Gonzalez DM，Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition[J]. Sci Signal，2014，7(344)：re8.

[14] Laberge RM，Awad P，Campisi J，et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by senescent fibroblasts[J]. Cancer Microenviron，2012，5(1)：39-44.

[15] Savagner P. Epithelial-mesenchymal transitions：from cell plasticity to concept elasticity [J]. Curr Top Dev Biol，2015，112：273-300.

[16] Frith JE，Thomson B，Genever P G. Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties and increase therapeutic potential [J]. Tissue Eng Part C Methods，2010，16(4)：735-749.

[17] Charwat V，Schutze K，Holnthoner W，et al. Potential and limitations of microscopy and Raman spectroscopy for live-cell analysis of 3D cell cultures[J]. J Biotechnol，2015，205：70-81.