

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.05.002

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2016.05.002

高表达Bcl-2下调喉癌细胞黏附能力的分子机制探讨

左建宏¹, 雷明胜², 李金成³, 文美玲¹, 李赛¹, 吕秀¹, 王雷¹, 谢金龙⁴

(1. 南华大学医学院肿瘤研究所, 湖南 衡阳 421001; 2. 张家界市人民医院呼吸内科, 湖南 张家界 427000; 3. 邵阳医学高等专科学校内科学教研室, 湖南 邵阳 422000; 4. 解放军第一六九中心医院肿瘤科, 湖南 衡阳 421002)

[摘要] 目的: 探讨高表达的Bcl-2对喉癌细胞黏附能力的影响。方法: 建立并鉴定高表达Bcl-2的稳定细胞株, 采用黏附实验检测细胞的黏附能力, 流式细胞仪和Western blotting实验分析细胞表面integrin表达的变化。结果: 成功构建高表达Bcl-2细胞株, 下调了细胞的黏附能力, 并降低了细胞表面integrin $\alpha 2\beta 1$ 的表达, 而未见对integrin αv 、integrin $\beta 4$ 、integrin $\alpha 3$ 和integrin $\alpha 5$ 的表达的影响。结论: 高表达Bcl-2可能通过下调了细胞表面integrin $\alpha 2\beta 1$ 的表达从而减低细胞的黏附能力。

[关键词] Bcl-2; 黏附能力; integrin $\alpha 2\beta 1$; 侵袭转移

The investigation of molecular mechanism of the high expression of Bcl-2 down-regulating cell adhesion in laryngeal carcinoma cells

ZUO Jianhong¹, LEI Mingsheng², LI Jincheng³, WEN Meiling¹, LI Sai¹, LV Xiu¹, WANG Lei¹, XIE Jinlong⁴

(1. Cancer Institute, Medical School, University of South China, Hengyang Hunan 421001; 2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Zhangjiajie City Hospital, Zhangjiajie Hunan 427000; 3. Department of Internal Medicine, Shaoyang Medical College, Shaoyang Hunan 422000; 4. Department of Oncology, the 169 Central Hospital of PLA, Hengyang Hunan 421002, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect of high expression of Bcl-2 on the cell adhesion ability. **Methods:** The stable cells of high expression of Bcl-2 were built and identified. The adhesion ability was assessed by adhesion assay. The expression of integrin was analyzed by FLOW and Western blotting. **Results:** Bcl-2 stable cells were successfully built. Bcl-2 overexpression decreased the cell adhesion and the expression of integrin $\alpha 2\beta 1$, however, it did not affect the expression of integrin αv , integrin $\beta 4$, integrin $\alpha 3$ and integrin $\alpha 5$. **Conclusion:** High expression of Bcl-2 may reduce the cell adhesion by down-regulating the expression of integrin $\alpha 2\beta 1$.

Keywords Bcl-2; adhesion ability; integrin $\alpha 2\beta 1$; invasion and migration

收稿日期 (Date of reception): 2015-08-09

通信作者 (Corresponding author): 谢金龙, Email: xiejinlong1967@sina.com

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (81272960) 和湖南省科技厅重点项目资助 (2013WK2010, 2014SK2015)。This work was supported by National Nature Science Foundation of China (81272960), Key Research Program from Science and Technology Department of Hunan Province (2013WK2010, 2014SK2015), P. R. China.

喉癌是中国常见的恶性肿瘤之一, 占全身恶性肿瘤的2.1%, 多发于中老年男性, 常见的病理类型为鳞状细胞癌^[1]。近年来, 喉癌的发病率有明显增加的趋势, 5年生存率并没有明显变化^[2-3]。其治疗主要是手术, 辅助放化疗, 但无论哪种治疗方式均可以引起患者的吞咽、发音、嗅觉、言语等诸多生理问题, 从而导致很多心理和社会问题, 因此, 喉癌已经严重影响人民的生命健康。

Bcl-2基因是一种重要的抗凋亡的基因, 通过抑制凋亡而增加细胞生存优势。近年来, 研究发现了Bcl-2许多新功能, 如肿瘤多药耐药^[4]、细胞周期调节、胎盘的形和细胞归巢、血管新生^[5]以及基因调控^[6]等。因此, Bcl-2在肿瘤发病中具有十分重要的作用, 其表达上调将引起细胞生长紊乱, 最终导致肿瘤的发生和发展^[7-8]。

喉癌的浸润和转移是恶性肿瘤的基本生物学特性, 极易发生颈部淋巴结转移, 也是恶性肿瘤预后较差的原因, 是引起病人死亡的重要因素^[4]。肿瘤侵袭、转移是一个多步骤、多因素参与的极其复杂的过程。其中, 肿瘤细胞黏附能力降低并从原发灶脱落, 是发生侵袭转移的前期阶段, 因此, 本文试图研究Bcl-2对喉癌细胞表面黏附分子表达变化来探讨其侵袭转移分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

鼠抗人integrin $\beta 1$, integrin $\alpha 2$, integrin αV , integrin $\beta 4$, integrin $\alpha 3$, integrin $\alpha 5$ (Abcam公司产品), β -tubulin (BD Pharmingen); HRP标记的山羊抗小鼠IgG抗体以及FITC标记的山羊抗小鼠IgG荧光抗体(Santa cruz biotechnology 公司产品); Collagen Type I和Fibronectin (Sigma公司产品)。Bcl-2高表达细胞株(pcDNA3.1-Bcl-2/SCC10A)和空质粒Mock细胞株(pcDNA3.1/SCC10A)细胞株均在本实验室构建。用含10%小牛血清的DMEM培养基于37℃、5% CO₂培养箱中培养上述细胞以及SCC10A。

1.2 方法

1.2.1 Bcl-2 稳定高表达细胞株的建立与鉴定

重组载体pcDNA3.1-Bcl-2和空载体pcDNA3.1分别通过脂质体法转染SCC10A, 经过1个月G418筛选, 建立稳定Bcl-2高表达细胞株(pcDNA3.1-Bcl-2/SCC10A)和空质粒Mock细胞株(pcDNA3.1/SCC10A)细胞株, 并采用Western blotting实验分析

Bcl-2的表达。

1.2.2 细胞多聚体形成试验

用Trypsin-EDTA消化收集细胞, 4℃、1 000 r/min离心5 min, 弃去上清液, 加入含有0.5%小牛血清DMEM培养液, 用细胞筛网收集单个细胞, 并将细胞稀释成浓度为 2×10^4 /mL, 再将细胞加入预先用polyHEMA处理的6孔细胞培养板中, 在5% CO₂、37℃条件下培养, 然后用ZeissAxiovert倒置显微成像系统每隔1 h拍照1次, 每个细胞培养孔随机选取5个视野, 总计24 h。

1.2.3 黏附实验

以每孔200个细胞接种于用Col-I (0.1、1.0、5.0 μ g/L)或Fibronectin (Fn, 0.1、0.5、1.0 μ g/L)包被的96孔培养板中, 每孔体积200 μ L, 每组5孔, 同时设空白对照(仅加培养液), 置CO₂培养箱中孵育, 37℃继续孵育30 min, 终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液, 加入150 μ L, 用4%多聚甲醛固定, 结晶紫染色30 min, 用20 \times 物镜的显微镜计数所黏附的细胞。

1.2.4 流式细胞术检测细胞 integrin 受体的表达

在每个流式检测管中加入50 μ L 1:1 000稀释的integrin抗体, 在空白管中加入50 μ L PBS, 再在各管中分别加入50 μ L细胞悬液(约 10^6 个细胞), 并轻轻混匀。冰浴孵育1 h, 孵育完成后, 每流式检测管中加2 mL PBS、4℃下1 000 r/min离心5 min, 弃去上清, 重复洗涤3次。每管加入50~100 μ L稀释好的FITC标记二抗后, 于冰浴或在4℃冰箱中避光孵育45 min, 洗涤细胞3次(方法同上), 并上机检测。

1.2.5 Western blotting 实验

收集细胞, 用PBS洗涤3次, 加入裂解液裂解细胞, 离心收集上清液。BCA(Pierce 公司产品)法测蛋白质的浓度, SDS-PAGE, 转膜, 依次孵育一抗和二抗, ECL检测蛋白质表达。

1.3 统计学处理

采用SPSS16.0统计软件包进行数据处理, 数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 进行 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高表达的 Bcl-2 降低了喉癌细胞形成多细胞聚集体的能力

应用Western blotting实验分析Control、Mock和Bcl-2三组细胞株中Bcl-2的表达, 研究结果显示

在重组载体pcDNA3.1-Bcl-2转染的细胞株(Bcl-2细胞株)Bcl-2的表达明显高于空载pcDNA3.1/SCC10A转染的细胞株(Mock细胞株)和未转染组细胞株(Control)(图1A)。在实验初始阶段, 3组细胞均以单个细胞形式悬浮在培养液中; 在6 h时间点, 在SCC10A组和Mock细胞均可见少量的细胞聚集体形成, 而Bcl-2实验组主要还是以单个细胞形式存在; 在9 h时间点, 这个现象明显加剧; 在24 h时

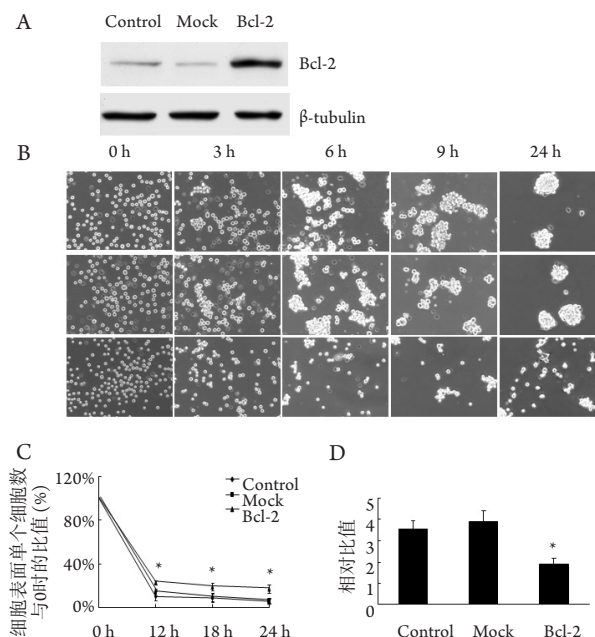


图1 高表达的Bcl-2对喉癌细胞形成多细胞聚集体的能力的影响

Figure 1 High expression of Bcl-2 in human laryngeal carcinoma cells effects on formed multicellular aggregates

(A)通过Western blotting检测在control、mock和Bcl-2三组细胞中Bcl-2的表达, β -tubulin作为上样对照; (B)3组细胞形成细胞多聚体的过程的代表性图示, 10×10 ; (C)随机选取每个时间点3个视野, 再与0时间点比较单个细胞数; (D)在24 h时间点, 三组细胞形成细胞多聚体的体积比较。

* $P < 0.05$ 。

(A) Bcl-2 expression in control, mock, and Bcl-2-transfected cells was verified by Western blotting. β -tubulin was used as a loading control; (B) the representative pictures of the process of the formation of cell aggregates in three groups; (C) 3 fields were randomly selected from each time point compared with 0 time points about single cell number; (D) at the time point of 24 h, compared the volume of cell aggregates of the three groups.

* $P < 0.05$.

间点, SCC10A组和Mock细胞主要以细胞聚集体形式存在, 单个细胞数量很少, 而Bcl-2实验组主要还是以单个细胞形式存在, 且形成的细胞多聚体数量少(图1B-C), 体积也明显少(图1D)。上述实验结果显示: 高表达的Bcl-2降低了喉癌细胞形成多细胞聚集体的能力。

2.2 高表达的 Bcl-2 对喉癌细胞黏附能力

无论在细胞基质Col-I还是fibronectin上(图2A-B), 高表达的Bcl-2均对喉癌细胞黏附能力有影响, 并且具有统计学意义。

2.3 高表达的 Bcl-2 下调了细胞 integrin $\alpha 2 \beta 1$ 受体的表达

为了进一步探讨高表达的Bcl-2降低细胞形成细胞多聚体能力和细胞黏附能力的分子机制, 本课题组开展了对细胞integrin受体表达的检测。流式细胞实验结果显示: 高表达的Bcl-2对细胞对 integrin αV , integrin $\beta 4$, integrin $\alpha 3$ 和integrin $\alpha 5$ 的表达无影响, 而明显降低了integrin $\alpha 2$ 和integrin $\beta 1$ 受体的表达(图3)。Western blotting实验也得到类似的实验结果(图4A-B)。

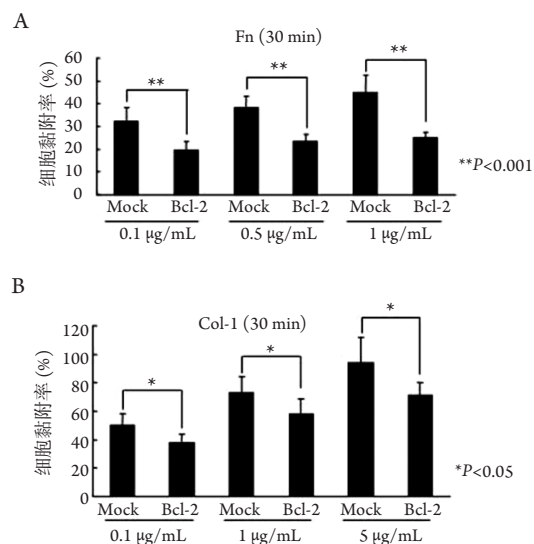


图2 高表达的Bcl-2在细胞基质Col-I(A)和fibronectin上(B)细胞黏附能力的影响

Figure 2 The high expression of Bcl-2 effect on the ability of cell adhesion on cell substrate of Col-I (A) and fibronectin (B)

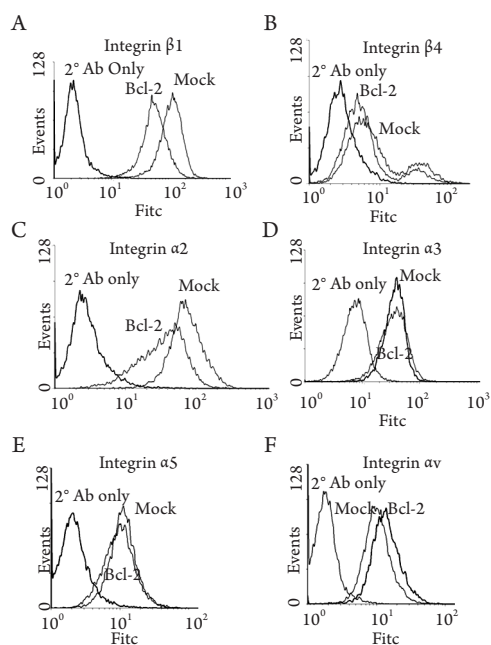


图3 流式细胞仪检测integrin表达

Figure 3 Flow cytometry was used to detect the expression of integrin

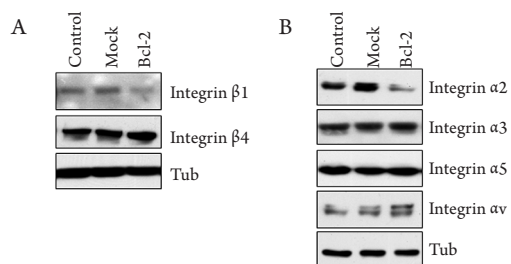


图4 Western blotting检测integrin表达

Figure 4 Western blotting was applied to detect the expression of integrin

3 讨论

整合素(integrin)是一组介导异质黏附的细胞黏附分子, 是一类膜镶嵌糖蛋白, 由 α/β 两个亚单位通过非共价键形成异二聚体复合物, 有18种 α 亚单位和11种 β 亚单位, 可形成20多种整合素。整合素可与相邻细胞上或胞外的ECM中的相应配体结合, 这样与细胞内的骨架蛋白连接起来形成跨膜复合物, 参与细胞信号传导及骨架改变, 在细胞生长、分化、细胞的迁移和黏附、细胞的凋亡、淋巴细胞归巢、形成连接和维持极性等方面起了重要作用。ECM分子包括纤黏连蛋白(fibronectin, FN)、胶原(collagen)、玻璃黏连蛋白(vitronectin, VN)、层黏

连蛋白(laminin, LM)等。

肿瘤转移与原发肿瘤处的细胞黏附分子表达异常或功能丧失或瘤细胞间黏附能力下降有关。在本项目研究中, 高表达的Bcl-2下调了细胞形成细胞多聚体的能力, 也降低了细胞的黏附能力, 这可能使喉癌细胞因为黏附能力降低, 易于使喉癌细胞从原发灶脱落, 为喉癌细胞的侵袭转移奠定了基础。

另外, 根据文献^[9-10]报道, 整合素的改变与EMT、MMPx的表达以及血管新生密切相关, 也与细胞恶性程度增加相关, 这些为整合素成为抗肿瘤治疗的一个新的药物靶点提供了新的实验的依据。

今后的工作的重点应放在整合素与喉癌关系的研究上, 以此为突破口为整合素在喉癌中的作用寻找更多的证据, 从而揭示整合素各亚基在喉癌中的作用。因此探讨整合素对喉癌的发生、发展和侵袭转移作用的分子机制, 这将拓展开发治疗喉癌新药物的视野, 具有极其重要的潜在的临床应用价值。

参考文献

- 杜灵彬, 毛伟敏, 陈万青, 等. 中国2003—2007年喉癌发病率和死亡率分析[J]. 中华流行病学杂志, 2012, 33(4): 395-398.
- DU Lingbin, MAO Weimin, CHEN Wanqing, et al. Incidence and mortality of larynx cancer in China during 2003-2007[J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2012, 33(4): 395-398.
- Zuo J, Wen M, Lei M, et al. MiR-210 links hypoxia with cell proliferation regulation in human Laryngocarcinoma cancer[J]. J Cell Biochem, 2015, 116(6): 1039-1049.
- Zuo JH, Zhu W, Li MY, et al. Activation of EGFR promotes squamous carcinoma SCC10A cell migration and invasion via inducing EMT-like phenotype change and MMP-9-mediated degradation of E-cadherin[J]. J Cell Biochem, 2011, 112(9): 2508-2517.
- Vogler M, Dinsdale D, Dyer MJ, et al. Bcl-2 inhibitors: small molecules with a big impact on cancer therapy[J]. Cell Death Differ, 2009, 16(3): 360-367.
- Iervolino A, Trisciuglio D, Ribatti D, et al. Bcl-2 overexpression in human melanoma cells increases angiogenesis through VEGF mRNA stabilization and HIF-1-mediated transcriptional activity[J]. FASEB J, 2002, 16(11): 1453-1455.
- Ma C, Zhang J, Durrin LK, et al. The BCL2 major breakpoint region (mbr) regulates gene expression[J]. Oncogene, 2007, 26(18): 2649-2657.
- Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.

- Science, 1998, 281(5381): 1322-1326.
8. Zuo J, Ishikawa T, Boutros S, et al. Bcl-2 overexpression induces a partial epithelial to mesenchymal transition and promotes squamous carcinoma cell invasion and metastasis[J]. Mol Cancer Res, 2010, 8(2): 170-182.
 9. Parvani JG, Gujrati MD, Mack MA, et al. Silencing $\beta 3$ integrin by targeted ECO/siRNA nanoparticles inhibits EMT and metastasis of triple-negative breast cancer[J]. Cancer Res, 2015, 75(11): 2316-2325.
 10. Li W, Liu Z, Zhao C, et al. Binding of MMP-9-degraded fibronectin to $\beta 6$ integrin promotes invasion via the FAK-Src-related Erk1/2 and PI3K/Akt/Smad-1/5/8 pathways in breast cancer[J]. Oncol Rep, 2015, 34(3): 1345-1352.

本文引用: 左建宏, 雷明胜, 李金成, 文美玲, 李赛, 吕秀, 王雷, 谢金龙. 高表达Bcl-2下调喉癌细胞黏附能力的分子机制探讨[J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(5): 540-544. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.05.002

Cite this article as: ZUO Jianhong, LEI Mingsheng, LI Jincheng, WEN Meiling, LI Sai, LV Xiu, WANG Lei, XIE Jinlong. The investigation of molecular mechanism of the high expression of Bcl-2 down-regulating cell adhesion in laryngeal carcinoma cells[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2016, 36(5): 540-544. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.05.002