

TGF- β 1 对口腔鳞癌相关成纤维细胞 FAP 表达的影响

唐婉容, 李丽华, 喻洁, 马莹, 刘英

摘要 目的 探讨转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 对癌相关成纤维细胞 (CAFs) 中成纤维细胞活化蛋白 (FAP) 表达的影响。方法 应用 10 ng/ml 的 TGF- β 1 作用于 CAFs 细胞, 设置正常成纤维细胞 (NFs) 和未经处理的 CAFs 细胞作为对照组, 采用 RT-PCR 和 Western blot 法检测细胞中 FAP 的蛋白和 mRNA 表达情况。结果 FAP 在 NFs 中几乎不表达, 而在 CAFs 中 FAP 的 mRNA 和蛋白表达均增加。与 NFs 组和 CAFs 组相比, 10 ng/ml 的 TGF- β 1 能够明显促进 CAFs 细胞分泌 FAP, 作用 12、24 h 后 FAP mRNA 和蛋白的相对表达量差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。且随着作用时间的延长, FAP 的表达持续升高, 24 h 较 12 h 表达增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 TGF- β 1 能够促进 CAFs 中 FAP 的表达, 在肿瘤上皮-间质交互作用中扮演着重要角色。

关键词 转化生长因子- β 1; 癌相关成纤维细胞; 成纤维细胞活化蛋白

中图分类号 R 783.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)09-1293-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.09.008

口腔鳞状细胞癌是最常见的口腔恶性肿瘤, 以往对口腔癌的研究较多的集中于肿瘤上皮, 但近年

来的研究^[1]显示肿瘤微环境对肿瘤的发生发展转移具有重要的调控作用。肿瘤间质中数量最多的细胞为癌相关成纤维细胞 (carcinoma-associate fibroblasts, CAFs), 研究^[2]表明 CAFs 通过其分泌功能参与肿瘤的增殖、侵袭和转移。成纤维细胞活化蛋白 (fibroblast activation protein, FAP) 是 CAFs 最具代表性的分泌产物之一, 与肿瘤的生长侵袭密切相关, 目前对 FAP 的研究集中其对肿瘤的影响, 而对 CAFs 分泌 FAP 分子机制研究较少。转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 能够促进正常成纤维细胞 (normal fibroblasts, NFs) 转化为 CAFs, 即促进肿瘤反应性间质的形成, 同时可以促进 CAFs 的重要蛋白质的表达。那么 TGF- β 1 是否可以促进 FAP 的表达, 是本研究想要探究的问题。本研究采用一定浓度的 TGF- β 1 作用于 CAFs, 利用 RT-PCR 和 Western blot 的方法, 观察 FAP 的 mRNA 和蛋白表达变化, 为研究 TGF- β 1 调控 CAFs 的生物学特性奠定基础, 也有助于了解上皮-间质之间的交互作用。

1 材料与方法

1.1 实验试剂 H-DMEM 培养基、胎牛血清、双抗 (青霉素、链霉素) (美国 HyClone 公司); rhTGF- β 1 (美国 Sigma 公司); 鼠抗人细胞角蛋白 (cytokeratin, CK) 单抗、兔抗人波形蛋白 (vimentin, VIM) 单抗、鼠抗人 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -

2017-03-17 接收

基金项目: 四川省教育厅重点项目 (编号: 14ZA0189); 川北医学院校级科研发展重点项目 (编号: CBY15-A-ZD09)

作者单位: 川北医学院口腔医学系, 南充 637000

作者简介: 唐婉容, 女, 主治医师;

刘英, 女, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 1366937083@qq.com

human immortalized oral epithelial cell (HIOEC), and to discuss the potential mechanism of HPV16 E5 in the occurrence and development of oral squamous cell carcinoma. **Methods** Open reading frame of HPV16 E5 was cloned into the lentiviral vector pLOV-N to prepare recombinant plasmid pLOV-E5, which was stably transfected into HIOEC. EGFR, p21, p53 and Rb were detected by RT-qPCR and Western blot on the mRNA level and the protein level, respectively. Cell proliferation after stable transfection was evaluated by MTT assay. **Results** After stable transfection of HPV16 E5, the protein levels of EGFR, p21 and p53 in HIOEC were markedly overexpressed, as well as the mRNA levels of p21 and p53 ($P = 0.00$, $P = 0.02$). However, the mRNA levels of EGFR had no obvious change after transfection. There were also no significant changes of Rb on the mRNA and protein levels. Compared with the control cells, the proliferation activity of HIOEC/pLOV-E5 cells was significantly increased ($P = 0.00$). **Conclusion** HPV16 E5 can stimulate the expression of EGFR, p21 and p53 as well as the proliferation of HIOEC.

Key words human papillomavirus; immortalization; epithelial cells; HPV16 E5 gene

SMA) 单抗(北京中杉金桥生物技术有限公司); RNA 抽提试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒(北京百泰克公司); cDNA 一链合成试剂盒(MBI, Fermentas 公司)、2 × PCR master mix (北京康为世纪生物技术有限公司); 凯基全蛋白抽提试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、辣根酶标记的羊抗兔二抗(jackson 分装)、ECL 检测液(南京凯基生物科技发展有限公司); 0.45 μm PVDF 膜(美国 Merck Millipore 公司)、兔 FAP 一抗(宜百康生物科技股份有限公司)、兔 β-actin 一抗(北京四正柏生物科技有限公司); 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 CAFs 和 NFs 的分离培养 无菌条件下收集川北医学院附属医院口腔颌面外科的口腔鳞癌患者手术切除的癌组织, 包括癌临近结缔组织和癌旁正常结缔组织, 共 5 例, 用于 CAFs 和 NFs 的分离培养。采用组织块贴壁法进行原代细胞的培养。超净台内用 PBS(含青霉素 100 U/ml, 链霉素 100 μg/ml) 反复冲洗组织 3~4 次, 使用眼科剪修剪组织成 1 mm³ 左右的小块, 再次冲洗组织后, 用眼科镊送入培养瓶底, 并均匀摆置, 加入含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 H-DMEM 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养 2~3 d 换液, 待细胞铺满瓶底 0.25% 胰酶消化传代, 并利用差速消化法对 CAFs 和 NFs 进行纯化。采用第 3 代细胞进行研究。

1.3 免疫组化染色鉴定 细胞鉴定分为两组(CAFs 组和 NFs 组), 免疫细胞化学染色法检测细胞中细胞角蛋白(cytokeratin, CK)、波形蛋白(vimentin, VIM)、α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA) 的表达。胰酶消化第 3 代细胞, 以 1 × 10⁵/ml 密度制备细胞爬片, 待细胞融合至 60%, PBS 冲洗 3 次 4% 多聚甲醛固定 30 min 0.5% TritonX-100 通透处理 3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶, 山羊血清封闭 15 min, 滴加稀释度为 1:200 的一抗(CK、VIM、α-SMA 抗体) 4 °C 过夜, 滴加通用型二抗孵育 30 min, DAB 显色, PBS 洗涤, 苏木精复染 3 min, 脱水、透明、中性树脂封片, 以 PBS 为阴性对照, 实验重复 3 次。光学显微镜下观察细胞的染色情况并拍照, 将胞质中出现淡棕色或棕黄色颗粒判定为阳性染色。

1.4 细胞分组 实验分为 4 组: NFs 组、CAF_s 组、TGF-β1 处理 CAF_s 细胞 12 h 组(以下简称 TGF-β1-12 h 组)、TGF-β1 处理 CAF_s 细胞 24 h 组(以下简称 TGF-β1-24 h 组)。分组处理过程中使用不含血清的培养基培养细胞。rhTGF-β1 按照说明书进行

配置 本实验参考相关文献^[3], 选择 TGF-β1 的质量浓度为 10 ng/ml, 选择观察 12 h 和 24 h 两个时间点。

1.5 RT-PCR 检测 FAP 的 mRNA 表达 使用 RNA 抽提试剂盒抽提细胞内总 RNA, 测定其浓度和纯度, 1% 琼脂糖凝胶电泳可见清晰的 18s、28s 两条带。取 1 μg 总 RNA 逆转录合成 cDNA。根据 GenBank 中目的基因序列, 设计并合成引物(表 1), PCR 扩增 fap, 反应体系 25 μl, 反应条件: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环, 72 °C 终延伸 2 min。以 β-actin 作为内参。取 PCR 产物 10 μl 于 3% 琼脂糖凝胶上电泳, Bio-Rad 凝胶成像仪扫描电泳结果, 用 Quantity One 软件进行光密度值分析, 目的基因 = 目的基因灰度值/β-actin 的灰度值。

表 1 引物及序列

| 基因 | 序列(5'→3') | 退火温度 (°C) | 产物长度 (bp) |
|---------|--------------------------|--------------|--------------|
| fap | F: CCACCGATCCAGACAGAGTA | 59 | 278 |
| | R: ATAGCAGTGGCTCCAGTCTC | | |
| β-actin | F: CACGAAACTACCTTCAACTCC | 56 | 265 |
| | R: CATACTCCTGCTTGCTGATC | | |

1.6 Western blot 检测 FAP 的蛋白表达 使用凯基全蛋白提取试剂盒抽提各组总蛋白。BCA 法蛋白定量, 调整各组的浓度一致, 样本煮沸 5 min, 上样行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 半干法转移至 PVDF 膜上 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h, 加入兔 FAP 一抗(1:10 000 稀释) 4 °C 孵育过夜, 辣根酶标记的羊抗兔二抗(1:5 000 稀释) 室温孵育 2 h, ECL 显色, 以 β-actin 蛋白作为内参, 用 Quantity One 软件进行光密度值分析, 目的蛋白 = 目的蛋白灰度值/β-actin 的灰度值。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CAFs 和 NFs 的形态观察 倒置相差显微镜观察显示, CAFs 呈长梭形, 细胞大小不一, 生长速度快, 排列无序, 密度和接触抑制丧失; NFs 呈短梭形, 无重叠生长, 排列较规则, 呈漩涡状。见图 1。

2.2 CAFs 的鉴定 从图 2 可以看出, CAFs 和 NFs 均不表达 CK, 表明细胞不是上皮源性; CAFs 和 NFs

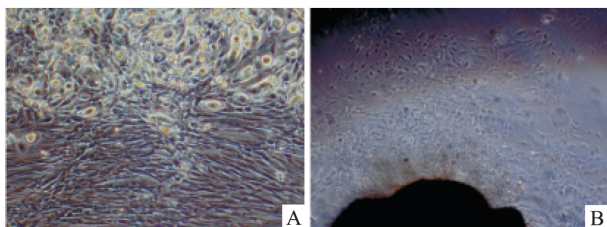


图1 CAFs和NFs在光镜下的形态 ×100
A:CAF;B:NFs

的VIM表达阳性,证明两种细胞均是间质细胞源性;另外,CAFs又称为肌成纤维细胞,特异性表达α-SMA,图中看出CAFs细胞α-SMA染色阳性,而NFs细胞α-SMA染色阴性,证明培养的是生物学行为已经发生改变的癌旁成纤维细胞。

2.3 TGF-β1对CAFs细胞中fap基因表达的影响

各组引物扩增的结果见图3,具体的数据见表2。实验结果显示,在NFs中fap几乎不表达,而在CAFs中fap的mRNA表达增加,TGF-β1作用12h后fap mRNA的相对表达量为(0.4915 ± 0.1303),作用24h后的相对表达量为(0.8899 ± 0.1484),与NFs组和CAFs组相比,fap mRNA表达明显增加,差异有统计学意义(P < 0.05)。随着TGF-β1刺

激CAFs细胞的时间延长,fap的mRNA表达持续升高,24h较12h表达增加,差异有统计学意义(P < 0.05)。

2.4 TGF-β1对CAFs细胞中FAP蛋白表达的影响

各组FAP蛋白电泳结果见图4,具体的数据见表2。实验结果显示,在NFs中FAP几乎不表达,而在CAFs中FAP的蛋白表达增加,10 ng/ml的TGF-β1能够明显促进细胞分泌FAP蛋白,TGF-β1作用12h后FAP蛋白的相对表达量为(0.0024 ± 0.0005),作用24h后FAP蛋白的相对表达量为(0.0034 ± 0.0004),与NFs组和CAFs组相比,FAP蛋白表达明显增加,差异有统计学意义(P < 0.05)。随着TGF-β1刺激CAFs细胞的时间延长,FAP蛋白表达持续升高,24h较12h表达增加,差异有统计学意义(P = 0.008)。

3 讨论

肿瘤微环境是近年来研究肿瘤相关问题的热点之一,主要由肿瘤细胞、上皮细胞、间质细胞、免疫细胞、成纤维细胞、微血管、细胞因子及细胞外基质等共同组成。CAFs是主要的基质细胞,其在表型和功能上都明显区别于NFs,对肿瘤发生发展、血管形

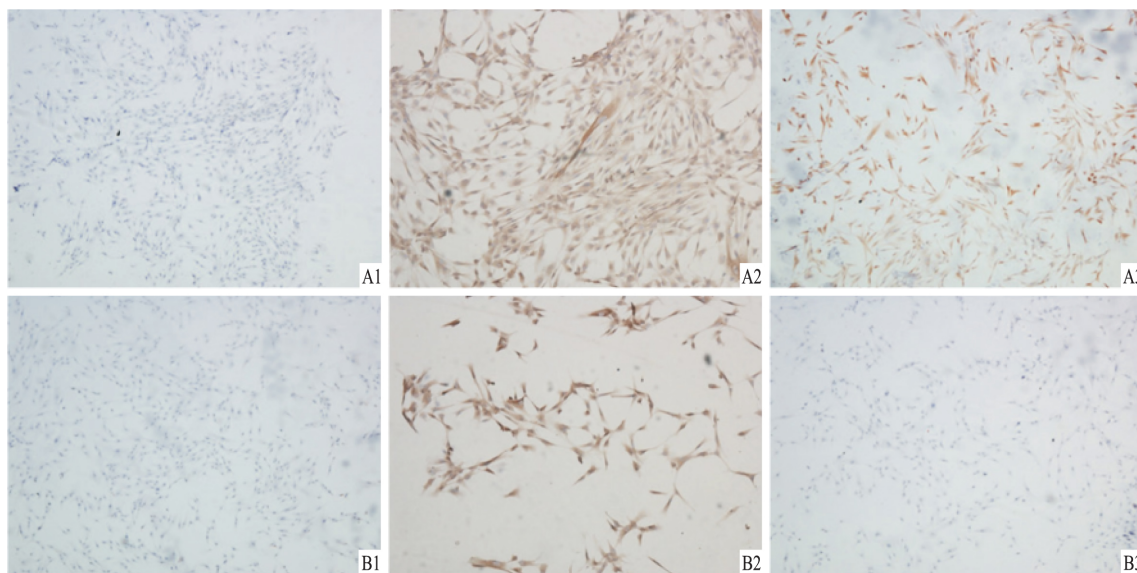


图2 细胞免疫组化鉴定 ×40

A:CAF;B:NFs;1:CK染色阴性;2:VIM染色阳性;3:α-SMA染色,CAF细胞染色阳性,NFs细胞染色阴性

表2 RT-PCR和Western blot分别检测各组细胞FAP的mRNA和蛋白表达水平(n=5, $\bar{x} \pm s$)

| FAP | NFs组 | CAF组 | TGF-β1-12h组 | TGF-β1-24h组 | F值 | P值 |
|------|-----------------|-----------------|-------------------|--------------------|-------|-------|
| mRNA | 0.0040 ± 0.0032 | 0.2929 ± 0.0847 | 0.4915 ± 0.1303*# | 0.8899 ± 0.1484*#Δ | 59.91 | <0.01 |
| 蛋白 | 0.0005 ± 0.0003 | 0.0014 ± 0.0003 | 0.0024 ± 0.0005*# | 0.0034 ± 0.0004*#Δ | 43.96 | <0.01 |

与NFs组比较:* P < 0.05;与CAF组比较:# P < 0.05;与TGF-β1-12h组比较:Δ P < 0.05

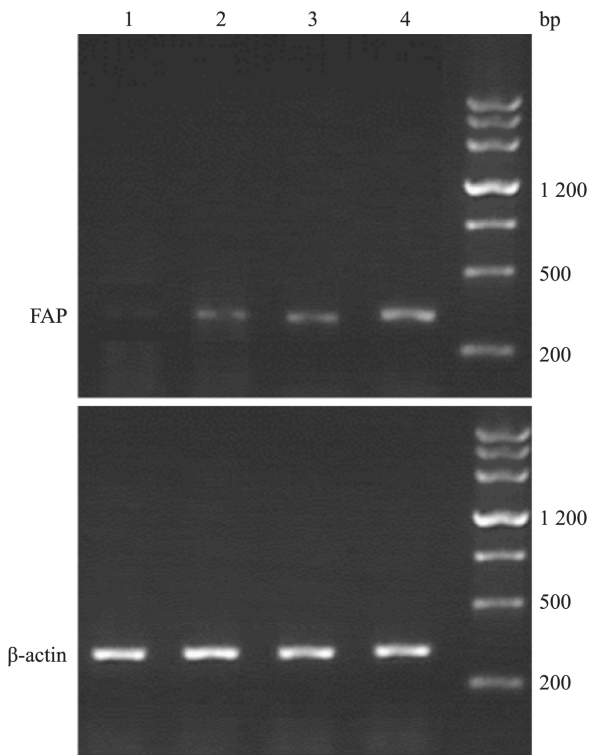


图3 TGF-β1对CAF中fap基因表达的影响
1: NFs组; 2: CAFs组; 3: TGF-β1-12 h组; 4: TGF-β1-24 h组

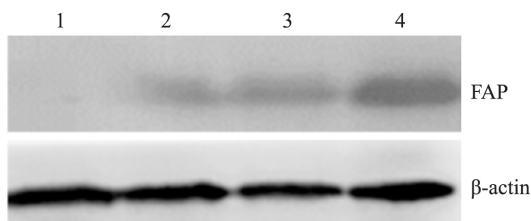


图4 TGF-β1对CAF中FAP蛋白表达的影响
1: NFs组; 2: CAFs组; 3: TGF-β1-12 h组; 4: TGF-β1-24 h组

成、浸润转移、免疫抑制等有重要作用,特别是其分泌特性是CAF对上皮细胞生物学行为产生重要影响的物质基础^[4]。FAP是CAF的标志性产物之一,最早被认为是细胞表面抗原F19,有单体与二聚体两种形式,属于丝氨酸蛋白酶类,具有二肽酶及胶原酶活性,能够分解明胶、I型胶原,还可分解细胞外基质的多种成分^[5]。FAP还有一个重要特性,它大多数由病理部位激活的成纤维细胞表达,而在大多数正常组织和良性肿瘤间质中不表达。FAP的蛋白水解酶活性可以增强肿瘤对细胞外基质的侵袭力,同样也能促进肿瘤的生长和增殖。Jia et al^[6]证实了FAP通过整合素β1/FAK途径介导肿瘤进展。Yang et al^[7]研究发现FAP可以通过STAT3-CCL2信号通路介导肿瘤细胞的免疫抑制。Lee et

al^[8]发现FAP可以通过改变纤连蛋白水平及胶原纤维结构而导致细胞外基质重建,从而增强了肿瘤的侵袭能力。

CAF细胞分泌的FAP能够影响肿瘤的发生、发展、转移和侵袭,但其具体的分泌机制不明确。本研究着眼于上皮-间质之间的交互作用,即在肿瘤微环境中,肿瘤细胞和CAF之间是相互作用、相互影响的,从这个角度来研究分析FAP的分泌机制。TGF-β1是一种多肽生长因子,存在于多种细胞和组织中,具有广泛的生物学活性,调控细胞增殖、分化、迁移、血管生成、免疫监视等。其对肿瘤的作用十分复杂,在肿瘤的初期,TGF-β1发挥肿瘤抑制因子的作用,在肿瘤的中晚期,可促进肿瘤的增殖、迁移、侵袭、血管生成、免疫抑制等^[9]。研究^[10]显示,恶性肿瘤细胞可大量分泌TGF-β1,TGF-β1可刺激成纤维细胞发生特征性改变,转化为CAF,并上调α-SMA。Kellermann et al^[11]研究发现口腔鳞癌细胞可以通过分泌TGF-β1刺激口腔NFs分化为CAF,后者又通过分泌各种细胞因子刺激鳞癌细胞的增殖。

因而本研究推测TGF-β1可能与FAP的表达有关。目前国内外关于二者详细关系的研究较少。Rettig et al^[12]证明TGF-β1可诱导体外培养的胎儿脑膜成纤维细胞FB20表达FAP增加。宋敬等^[13]应用免疫组化法检测了FAP和TGF-β1在子宫内膜癌中的表达,并对其相关性做出了分析,发现FAP和TGF-β1在癌组织中均高表达,且TGF-β1可以促进FAP的表达。Chen et al^[14]应用TGF-β1作用于人卵巢癌周围的CAF,发现可以促进FAP的表达,进而影响人高转移卵巢癌细胞HO-8910PM的增殖、黏附和迁移。在本研究中,NFs组的FAP基因和蛋白均无表达,这符合“FAP选择性表达于90%以上的上皮性肿瘤的基质成纤维细胞中”的特性。在CAF中FAP有表达,其基因相对表达量为(0.2929 ± 0.0847),蛋白相对表达量为(0.0014 ± 0.0003)。加入TGF-β1后FAP的表达较CAF组明显增加,并随着时间的延长表达继续增加,24h作用更明显,mRNA相对表达量为(0.8899 ± 0.1484),蛋白相对表达量为(0.0034 ± 0.0004)。从实验结果可以看出,10 ng/ml的TGF-β1作用于CAF能够明显上调其FAP的表达,且作用24h更明显,与本研究的推测相符合,TGF-β1与FAP的表达有关。

综上所述,本研究推测在肿瘤微环境中,肿瘤细胞和CAF之间存在局部反馈的信号网络系统,进

而相互影响, TGF- β 1 在这个互为反馈的信号系统中可能扮演着重要角色。肿瘤细胞分泌大量的 TGF- β 1 激活成纤维细胞, 使其成为具有活化表型 (α -SMA 和 FAP) 的肌成纤维细胞, 并促进 α -SMA 和 FAP 表达增加, 与此相应的, FAP 又反过来作用于肿瘤细胞, 影响其增殖、侵袭和迁移。

参考文献

- [1] Son B, Lee S, Youn H, et al. The role of tumor microenvironment in therapeutic resistance [J]. *Oncotarget*, 2016: [Epub ahead of print]
- [2] Polyak K, Haviv I, Campbell I G. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment [J]. *Trends Genet*, 2009, 25(1): 30 - 8.
- [3] Meng W, Xia Q, Wu L, et al. Downregulation of TGF- β receptor types II and III in oral squamous cell carcinoma and oral carcinoma-associated fibroblasts [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11(1): 88.
- [4] Gascard P, Tlsty T D. Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy [J]. *Genes Dev*, 2016, 30(9): 1002 - 19.
- [5] Cheng J D, Valianou M, Canutescu A A, et al. Abrogation of fibroblast activation protein enzymatic activity attenuates tumor growth [J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(3): 351 - 60.
- [6] Jia J, Martin T A, Ye L, et al. FAP- α (Fibroblast activation protein- α) is involved in the control of human breast cancer cell line growth and motility via the FAK pathway [J]. *BMC Cell Biology*, 2014, 15: 16.
- [7] Yang X, Lin Y, Shi Y, et al. FAP promotes immunosuppression by cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment *via* STAT3-CCL2 signaling [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(14): 4124 - 35.
- [8] Lee H O, Mullins S R, Franco-Barraza J, et al. FAP-overexpressing fibroblasts produce an extracellular matrix that enhances invasive velocity and directionality of pancreatic cancer cells [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 245.
- [9] Lin R L, Zhao L J. Mechanistic basis and clinical relevance of the role of transforming growth factor- β in cancer [J]. *Cancer Biol Med*, 2015, 12(4): 385 - 93.
- [10] Denys H, Derycke L, Hendrix A, et al. Differential impact of TGF- β and EGF on fibroblast differentiation and invasion reciprocally promotes colon cancer cell invasion [J]. *Cancer Lett*, 2008, 266(2): 263 - 74.
- [11] Kellermann M G, Sobral L M, da Silva S D, et al. Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and normal oral fibroblasts: induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation [J]. *Oral Oncol*, 2008, 44(5): 509 - 17.
- [12] Rettig W J, Su S L, Fortunato S R, et al. Fibroblast activation protein: purification, epitope mapping and induction by growth factors [J]. *Int J Cancer*, 1994, 58(3): 358 - 92.
- [13] 宋敬, 李越, 王秋艳. FAP 和 TGF- β 1 在子宫内膜癌中的表达及相关性 [J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2011, 45(2): 153 - 6.
- [14] Chen H, Yang W W, Wen Q T, et al. TGF- β induces fibroblast activation protein expression; fibroblast activation protein expression increases the proliferation, adhesion, and migration of HO-8910PM [corrected] [J]. *Exp Mol Pathol*, 2009, 87(3): 189 - 94.

Effects of transforming growth factor- β 1 on the expression of fibroblast activation protein in oral carcinoma-associated fibroblasts

Tang Wanrong, Li Lihua, Yu Jie, et al

(Dept of Dentistry, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000)

Abstract Objective To explore the effect of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) on the expression of fibroblast activation protein (FAP) in carcinoma-associated fibroblasts (CAFs). **Methods** CAFs cultured *in vitro* were treated with the TGF- β 1 (10 ng/ml). The normal fibroblasts (NFs) and untreated CAFs cells as control groups, Western blot analysis and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) are employed to detect the expression of FAP mRNA and protein. **Results** The results displayed that FAP was undetectable in NFs group, but the expression of FAP mRNA and protein increased in CAFs group. Compared with the control groups, FAP was significantly upregulated after treatment with 10 ng/ml TGF- β 1 in oral CAFs cells ($P < 0.05$). The expression of FAP increased continuously at 24 h compared with that at 12 h, and the difference was statistically significant. **Conclusion** TGF- β 1 can facilitate the FAP expression in CAFs, and may play important roles in the interaction between epithelial cells and adjacent mesenchyme.

Key words transforming growth factor- β 1; fibroblast activation protein; carcinoma-associated fibroblasts