

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.15.004

文章编号: 1005-8982(2018)15-0016-05

表皮生长因子对 Hela 细胞紧密连接蛋白 3 表达的影响及其可能机制*

刘芳, 桂定清, 张力忆

(四川省达州市中心医院 妇产科, 四川 达州 635000)

摘要:目的 探讨表皮生长因子(EGF)对宫颈癌 Hela 细胞紧密连接蛋白 3(Claudin-3)表达的影响及其可能机制。**方法** 培养 Hela 细胞至贴壁,接种至 3 组 6 孔板,分别进行如下处理:①以 0.0、0.5、5.0、10.0 及 100.0 ng/ml EGF 处理 8 h,测评不同浓度 EGF 对 Claudin-3 蛋白及其信使 RNA(mRNA)的影响;②培养基中加入 10 ng/ml EGF,分别于培养 0 min、10 min、30 min、1 h、2 h、4 h、8 h、24 h,测评 Claudin-3 蛋白及 mRNA 水平、EGF 相关作用通路各蛋白磷酸化情况;③分别以 EGF 受体(EGFR)、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3-K)、促分裂素原活化蛋白激酶(MAPK)、p38、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)阻断剂干预 1 h,随后加入含 EGF 10 ng/ml 的培养基培养,测评 Claudin-3 蛋白及 mRNA 水平。**结果** EGF 对 Hela 细胞 Claudin-3 蛋白及 mRNA 的表达有促进作用,且 10 ng/ml EGF 的促进作用最明显,该促进作用随 EGF 刺激时间的延长而增强。EGF 刺激后,EGFR、蛋白激酶 B(AKT)、细胞外调节蛋白激酶 1/2(ERK1/2)、p38、JNK 均发生磷酸化,各阻断剂均能特异性阻断 EGF 诱导的上述磷酸化现象。阻断 EGFR、PI3-K、MAPK、p38 及 JNK 信号通路均能有效抑制 Claudin-3 蛋白的表达。**结论** EGF 能够增加 Hela 细胞 Claudin-3 的表达,其机制可能涉及 EGFR、PI3-K、MAPK、p38 及 JNK 信号通路。

关键词: 表皮生长因子;紧密连接蛋白 3;宫颈癌;促分裂素原活化蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶;磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B;p38;c-Jun 氨基末端激酶

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

Effect of epidermal growth factor on expression of Claudin-3 in Hela cells*

Fang Liu, Ding-qing Gui, li-yi Zhang

(Department of Obstetrics and Gynecology, Dazhou Central Hospital, Dazhou, Sichuan 635000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of epidermal growth factor (EGF) on expression of Claudin-3 in Hela cells. **Methods** Hela cells were cultured to adherent growth. In the first group, cells were treated with different concentration of EGF for 8 hours (0, 0.5, 5.0, 10.0, 100.0 ng/ml). In the second group, cells were treated with 10 ng/ml EGF for different time of duration (0 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h and 24 h). In the third group, cells were treated with antagonist of EGFR, phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-K), mitogen-activated protein kinase (MAK), p38, or c-Jun N-terminal kinase (JNK) followed by treatment of 10 ng/ml EGF for 24 h. Expression of Claudin-3 was identified on protein and mRNA level. Phosphorylation of EGF signal pathway related proteins were tested. **Results** EGF promoted expression of Claudin-3 in time-dependent manner, and optimistic dose was 10 ng/ml. Phosphorylation of EGFR, protein kinase B (AKT), extracellular regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2), p38 and JNK were significantly upregulated after EGF stimulation, which was reversed by all molecular inhibitors. Blockage

收稿日期: 2017-07-31

* 基金项目: 四川省卫生和计划生育委员会科研课题 (No: 150055)

of EGFR, PI3-K, MAPK, p38 and JNK effectively ameliorated EGF induced increase of Claudin-3 protein.

Conclusion EGF increases expression of Claudin-3 in HeLa cells through EGFR, PI3-K, MAPK, p38 and JNK signaling pathways.

Keywords: epidermal growth factor; claudin-3; cervical cancer; MAPK/ERK; PI3-k/AKT; p38; JNK

宫颈癌为常见妇科恶性肿瘤, 肿瘤细胞侵袭转移是影响患者预后的重要原因^[1], 探明其侵袭转移机制有助于开展靶向性治疗以提升预后。目前研究证实, 细胞黏附能力的丧失可能导致细胞连接的破坏, 进而促进肿瘤的浸润和转移^[2], 上皮细胞的黏附主要依靠黏附连接和紧密连接, Claudin 蛋白是紧密连接的重要蛋白^[3]。已有报道^[4-5]证实, 多种 Claudin 蛋白在包括宫颈癌在内的多种癌症组织中表达量增加, 且有研究^[6]证实表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 能够促进宫颈癌细胞转移。本文研究 EGF 对宫颈癌细胞紧密连接蛋白 3 (Claudin-3) 表达的影响及该影响的形成机制, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器

主要材料: 人宫颈癌 HeLa 细胞株 [购自中国科学院细胞库 (上海)]。主要试剂: EGF (购自美国 Peprotech), 总 RNA 提取试剂盒 (购自美国 Invitrogen), 总蛋白提取试剂盒 (购自上海伟进), PCR 试剂盒 (购自日本 TaKaRa), 磷酸酶抑制剂、EGF 受体 (EGF receptor, EGFR) 阻断剂 (ZD1839)、磷脂酰肌醇 3- 激酶 (phosphatidylinositol-3 kinase, PI3-K) 阻断剂 (LY294002 及 Wortmannin)、促分裂素原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 阻断剂 (PD98059 及 U0126)、p38 阻断剂 (SB203580)、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinases, JNK) 阻断剂 (SP600125) (均购自美国 Sigma), Western blot 试剂盒 (购自北京中山金桥), PCR 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 前期细胞培养 HeLa 细胞株接种于含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养基, 在 37℃、5% 二氧化碳 CO₂、饱和湿度条件下培养。细胞生长至 70% ~ 80% 融合后, 消化并将细胞以 2 × 10⁶ 个 / 孔的密度接种于 6 孔板, 同样条件下培养 24 h, 达到贴壁生长状态。去除培养基, 以无血清 DMEM 培养基继续培养 16 ~ 18 h, 开展后续处理。

1.2.2 实验路径 所培养的 HeLa 细胞分别用于开

展 3 项实验, 且各项研究均设 3 个复组: ①分别加入含有 EGF 终浓度 0.0、0.5、5.0、10.0、100.0 ng/ml 的 DMEM 培养基, 培养 8 h, 搜集细胞, 检测 Claudin-3 蛋白及信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 的表达情况; ②加入含有 EGF 终浓度 10 ng/ml 的 DMEM 培养基, 分别在培养 0 min、10 min、30 min、1 h、2 h、4 h、8 h、24 h, 搜集细胞, 检测不同时间 Claudin-3 蛋白及 mRNA 的表达情况和 EGFR、蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT)、细胞外调节蛋白激酶 1/2 (extracellular regulated protein kinases 1/2, ERK1/2)、p38、JNK 磷酸化情况; ③分别加入不含任何阻断剂、含 ZD1839 终浓度 10 nmol/L、含 LY294002 终浓度 20 nmol/L、含 Wortmannin 终浓度 5 nmol/L、含 PD98059 终浓度 20 nmol/L、含 U0126 终浓度 10 nmol/L、含 SB203580 终浓度 10 nmol/L、含 SP600125 终浓度 10 nmol/L 的 DMEM 中培养 1 h, 再加入终浓度为 10 ng/ml 的 EGF 培养后, 搜集细胞, 测评各阻断剂特异性阻断效果和 Claudin-3 蛋白及其 mRNA 的表达情况。

1.2.3 mRNA 检测 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 技术检测 Claudin-3 mRNA 表达情况。引物设计见表 1。反应条件: 55℃ 水浴 40 min; 94℃ 变性 40 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 40 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min。反应体系: PCR Mater Mix 10 μl、cDNA 模板 5 μl, 正向及反向引物 20 nmol/L, 无菌水定容至 20 μl。检测结果采用 2^{-ΔΔCt} 表示。

1.2.4 蛋白水平检测 采用 Western bolt 法检测各蛋白水平。搜集细胞总蛋白, 采用 Bradford 法测定蛋白浓度, 取各样本总蛋白 50 μg, 将体系混匀后, 加热煮沸 5 ~ 10 min, 立即置于冰上, 完全冷却后瞬间离心, 上样, 加入一抗, 4℃ 孵育过夜, 洗膜后加入二抗, 加入 DAB 底物显色液, 获得并分析凝胶图像。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组比较采用 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析和 SNK-*q* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

表 1 Claudin-3 mRNA 检测引物设计

引物	序列	片段大小 /bp
Claudin-3	正向: 5'-CACCACCACCAACACCAC-3'	249
	反向: 5'-CAAGTATTGGCGGTCACC-3'	
β-actin	正向: 5'-GTGGACATCCGCAAAGAC-3'	302
	反向: 5'-AAAGGCTGTAACGCAATCAA-3'	

2 结果

2.1 细胞培养结果

接种至 6 孔板后, 培养至 24 h, 细胞贴壁良好, 可基本覆盖孔壁, 且细胞存活率高, 经显微镜观察, 其细胞形态呈多边形或不规则状, 且细胞有聚集生长特性, 连接紧密。见图 1。

2.2 不同终浓度 EGF 对 Claudin-3 蛋白及 mRNA 表达的影响

总体分析显示, 不同终浓度处理后, HeLa 细胞中 Claudin-3 蛋白及 mRNA 表达水平比较, 差异有统计学意义 (均 $P=0.000$)。经两两比较, 显示且以 10 ng/ml 终浓度 EGF 处理, 上调幅度最大。见表 2 和图 2。

2.3 10 ng/ml EGF 处理后 Claudin-3 蛋白及 mRNA 不同时间表达情况

处理 24 h 后, Claudin-3 蛋白表达增加 ($t=75.685$, $P=0.000$); 随着处理时间的延长, Claudin-3 mRNA 表达呈上升趋势 ($F_{\text{时间}}=157.114$, $P=0.000$)。见图 3。

2.4 EGF 对 EGFR、AKT、ERK1/2、p38 和 JNK 磷酸化的影响

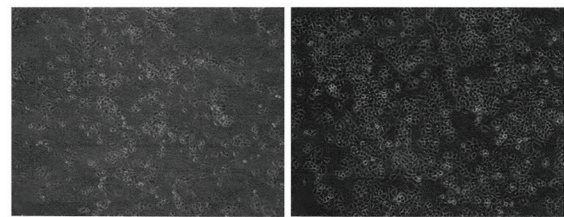
验证显示, EGF 处理后, HeLa 细胞内 EGFR、AKT、ERK1/2、p38 和 JNK 均出现磷酸化现象, 且 AKT、JNK 磷酸化在处理 30 min 最明显, EGFR、ERK1/2、p38 磷酸化在处理 10 min 最明显。见表 3。

2.5 信号阻断剂对 EGFR、AKT、ERK1/2、p38 及 JNK 磷酸化的影响

验证显示, ZD1839 能够特异性阻断 EGFR 磷酸化; LY294002、wortmannin 能够特异性阻断 AKT 磷酸化; PU98059、U0126 能够特异性阻断 ERK1/2 磷酸化; SB203580 能够特异性阻断 p38 磷酸化; SP600125 能够特异性阻断 JNK 磷酸化。

2.6 各信号通路阻断对 Claudin-3 蛋白表达的影响

阻断 EGFR、AKT、ERK1/2、p38 及 JNK 磷酸化后, 经 10 ng/ml EGF 干预 24 h 后, Claudin-3 蛋白表达均受到抑制 ($P<0.05$), 见图 4。



A 培养 12 h B 培养 24 h

图 1 细胞培养结果

表 2 不同终浓度 EGF 处理后 Claudin-3 蛋白及 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

指标	EGF 终浓度					F 值	P 值
	0 ng/ml	0.5 ng/ml	5.0 ng/ml	10.0 ng/ml	100.0 ng/ml		
Claudin-3 蛋白	0.452 ± 0.056	0.782 ± 0.067	0.978 ± 0.056	1.429 ± 0.073 [†]	1.051 ± 0.103	72.516	0.000
Claudin-3 mRNA	0.113 ± 0.036	0.403 ± 0.016	1.198 ± 0.054	3.174 ± 0.165 [†]	2.707 ± 0.098	676.418	0.000

注: † 与其他浓度比较, $P<0.05$

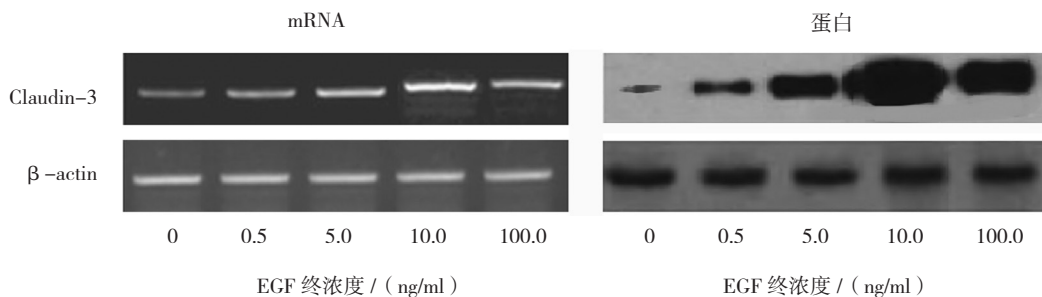


图 2 不同终浓度 EGF 处理后 Claudin-3 蛋白及 mRNA 表达情况

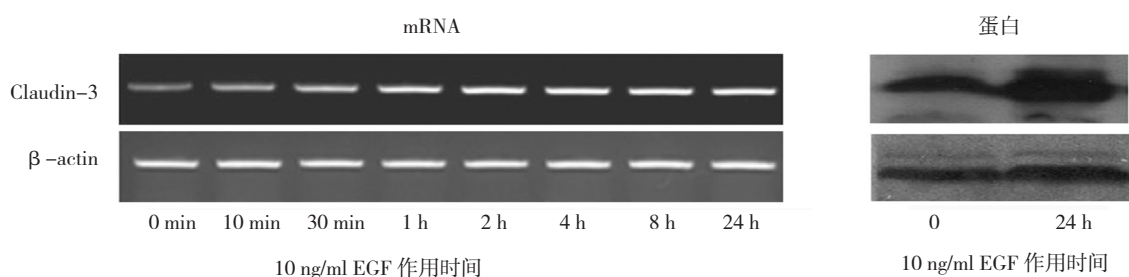


图 3 10 ng/ml EGF 处理后 Claudin-3 蛋白及 mRNA 不同时间表达情况

表 3 EGF 处理后 EGFR、AKT、ERK1/2、p38 及 JNK 磷酸化情况 ($\bar{x} \pm s$)

蛋白	0 min	10 min	30 min	1 h	2 h
EGFR	0.058 ± 0.013	0.358 ± 0.068 [†]	0.185 ± 0.037	0.138 ± 0.052	0.108 ± 0.042
AKT	0.113 ± 0.052	0.242 ± 0.038	0.430 ± 0.058 [†]	0.371 ± 0.032	0.305 ± 0.037
ERK1/2	0.068 ± 0.024	0.385 ± 0.037 [†]	0.258 ± 0.028	0.241 ± 0.038	0.218 ± 0.028
p38	0.085 ± 0.017	0.351 ± 0.035	0.337 ± 0.031	0.305 ± 0.028	0.258 ± 0.017
JNK	0.152 ± 0.035	0.213 ± 0.044	0.415 ± 0.034 [†]	0.385 ± 0.026	0.344 ± 0.031

蛋白	4 h	8 h	24 h	F 值	P 值
EGFR	0.117 ± 0.037	0.105 ± 0.058	0.112 ± 0.021	155.427	0.000
AKT	0.228 ± 0.058	0.217 ± 0.017	0.233 ± 0.058	83.175	0.000
ERK1/2	0.205 ± 0.031	0.189 ± 0.052	0.174 ± 0.038	105.884	0.000
p38	0.225 ± 0.035	0.247 ± 0.035	0.183 ± 0.032	271.510	0.000
JNK	0.305 ± 0.028	0.258 ± 0.018	0.251 ± 0.035	192.681	0.000

注: † 与其他时间比较, $P < 0.05$

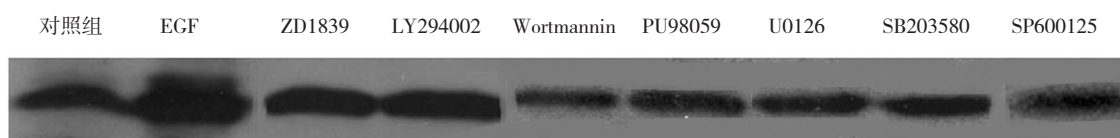


图 4 各信号通路阻断对 Claudin-3 蛋白表达的影响

3 讨论

侵袭和转移是影响宫颈癌患者预后的重要因素, 目前研究显示细胞间黏附力的丧失可导致细胞连接破坏, 为肿瘤细胞侵袭和转移创造条件^[7], Claudins 是形成紧密连接的主要骨架^[8], 其表达的上调或下降均可导致紧密连接的重组, CUNIFFE 等^[9]报道指出 Claudin-1、Claudin-7 单一过表达不增加宫颈癌发生率, 但均过表达可能预示宫颈恶性病变, 同时两者过表达有助于抑制 HeLa 细胞的侵袭和转移能力, 针对性研究 Claudin-3 与宫颈癌相关性的报道较少, 但针对乳腺癌^[10]、胃癌等^[11]恶性肿瘤的报道提示其过表达可能与肿瘤恶性程度正相关, 本研究则发现 Claudin-3

在宫颈癌 HeLa 细胞系中也存在高表达现象, 这与 Claudin-3 生物学作用有关, 其能促进细胞受体二聚化, 并使细胞质位点磷酸化而与多种不同信号序列蛋白结合而促使信号传导。大量研究证实 EGFR 在宫颈癌等恶性肿瘤细胞中存在过表达, 其活化后能够促进肿瘤细胞的浸润、增殖及肿瘤血管的形成^[12-13], 但该过程是否有 Claudin-3 的参与, 及 EGFR 对 Claudin-3 的调节机制, 目前尚未完全明确, 本研究则有助于解决该问题。

本研究发现, EGF 在转录和翻译水平, 均诱导 HeLa 细胞上调 Claudin-3 的表达, 且该作用存在时间和浓度依赖型, 说明 EGFR 信号通路能够影响 Claudin-3

的表达,可能是 EGFR 过表达导致肿瘤恶性化程度升高的机制之一,ZHANG 等^[14]针对肺癌的病例研究有类似结论。EGFR 的主要下游信号涉及 MAPK 和 PI3-K 通路,其中前者又包括 ERK1/2、p38 和 JNKs 等不同类型^[15],本研究应用相应阻断剂阻断 EGFR 下游信号通路,EGF 处理后,Hela 细胞内 EGFR、AKT、ERK1/2、p38 及 JNK 均出现磷酸化现象,提示 Hela 细胞中 EGFR 信号通路激活后,各下游通路均被激活,经阻断剂预处理则能够特异性阻断对应下游通路的激活,说明研究方案是可行的。本研究发现 EGFR 对 Claudin-3 的调节作用与 AKT、ERK1/2、p38 及 JNK 信号通路均有关,这说明在 Hela 细胞中,EGFR 能够通过多种信号通路调节 Claudin-3 的表达,de SOUZA WF 等^[16]针对结直肠癌的报道也提示 ERK1/2、PI3-K/AKT 信号通路能够影响 Claudin-3 的表达,进而影响结直肠癌的侵袭与转移能力;LI 等^[17]报道则显示 p38 通路也可影响 Claudins 蛋白的表达;其他亦有研究^[18]提示,JNK 信号通路与 Claudin-3 表达有关。可见,由于 EGFR 多个下游信号通路均可影响 Claudin-3 的表达,可能难以通过对单一下游信号通路的阻断抑制 Claudin-3 的表达,进而提升患者预后,直接干预上游信号通路可能是更好的解决方案。

综上所述,本研究显示 EGF 能够增加 Hela 细胞 Claudin-3 的表达,其机制可能涉及 EGFR、PI3-K、MAPK、p38 及 JNK 信号通路。

参 考 文 献:

- [1] OBEL J, SOUARES Y, HOY D, et al. A systematic review of cervical cancer incidence and mortality in the Pacific Region[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(21): 9433-9437.
- [2] RUNKLE E A, MU D. Tight junction proteins: from barrier to tumorigenesis[J]. *Cancer Lett*, 2013, 337(1): 41-48.
- [3] GÜNZEL D, YU A S. Claudins and the modulation of tight junction permeability[J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(2): 525-569.
- [4] 李波,肖凤仪,李小洲,等.生长抑素对 Hela 细胞中 Claudin-3 和 Claudin-4 基因表达的调节作用[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(7): 1249-1252.
- [5] LI X, HIDA M, TADA M, et al. Development of an anti-claudin-3 and -4 bispecific monoclonal antibody for cancer diagnosis and therapy[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014, 351(1): 206-213.
- [6] MUTHUSAMI S, PRABAKARAN D S, YU J R, et al. EGF-induced expression of fused toes homolog (FTS) facilitates epithelial-mesenchymal transition and promotes cell migration in ME180 cervical cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2014, 351(2): 252-259.
- [7] KWON M J. Emerging roles of claudins in human cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(9): 18148-18180.
- [8] ZHANG X, RUAN Y, LI Y, et al. Tight junction protein claudin-6 inhibits growth and induces the apoptosis of cervical carcinoma cells in vitro and in vivo[J]. *Med Oncol*, 2015, 32(5): 148.
- [9] CUNNIFFE C, BRANKIN B, LAMBKIN H, et al. The role of claudin-1 and claudin-7 in cervical tumorigenesis[J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(6): 2851-2857.
- [10] KOLOKYTHA P, YIANNOU P, KERAMOPOULOS D, et al. Claudin-3 and claudin-4: distinct prognostic significance in triple-negative and luminal breast cancer[J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2014, 22(2): 125-131.
- [11] WANG H, YANG X. The expression patterns of tight junction protein claudin-1, -3, and -4 in human gastric neoplasms and adjacent non-neoplastic tissues[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(1): 881-887.
- [12] SHOSTAK K, CHARIOT A. EGFR and NF- κ B: partners in cancer[J]. *Trends Mol Med*, 2015, 21(6): 385-393.
- [13] SONG X, SHI B, HUANG K, et al. miR-133a inhibits cervical cancer growth by targeting EGFR[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(3): 1573-1580.
- [14] ZHANG L, WANG Y, ZHANG B, et al. Claudin-3 expression increases the malignant potential of lung adenocarcinoma cells: role of epidermal growth factor receptor activation[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(14): 23033-23047.
- [15] TOMAS A, FUTTER C E, EDEN E R. EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer[J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24(1): 26-34.
- [16] de SOUZA W F, FORTUNATO-MIRANDA N, ROBBS B K, et al. Claudin-3 overexpression increases the malignant potential of colorectal cancer cells: roles of ERK1/2 and PI3K-Akt as modulators of EGFR signaling[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74994.
- [17] LI H J, GUO L M, YANG L L, et al. Electromagnetic-pulse-induced activation of p38 MAPK pathway and disruption of blood-retinal barrier[J]. *Toxicol Lett*, 2013, 220(1): 35-43.
- [18] WANG Y, SUN T, SUN H, et al. SCF/C-Kit/JNK/AP-1 signaling pathway promotes claudin-3 expression in colonic epithelium and colorectal carcinoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(4): 765.

(王荣兵 编辑)