

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.03.010

· 基础研究 ·

Tim-4 促进宫颈癌细胞 SiHa 侵袭与迁移及其可能机制

姜杰, 杨明浩, 姜召玲, 王国艳, 修燕, 赵培庆(滨州医学院烟台附属医院 检验科, 山东烟台 264199)

[摘要] **目的:** 探讨 Tim-4 促进宫颈癌细胞侵袭与迁移及其相关机制。**方法:** 用实时荧光定量 PCR 法检测宫颈癌细胞系 SiHa、Hela 与宫颈上皮永生化细胞系 H8 中 Tim-4 的表达水平。在较低表达 Tim-4 的 SiHa 细胞系感染携 Tim-4 的慢病毒载体, 荧光显微镜观测 SiHa 细胞系转染 Tim-4 的表达水平。用 Transwell 及划痕实验检测 Tim-4 对宫颈癌细胞系 SiHa 的侵袭与迁移能力的影响, 用 Western blotting 检测 SiHa 细胞转染 Tim-4 后 MMP2、MMP9、E-cadherin、N-cadherin 的变化。**结果:** 宫颈癌细胞系 SiHa、Hela 与宫颈上皮永生化细胞系 H8 相比高表达 Tim-4。成功构建携 Tim-4 慢病毒载体的 SiHa 细胞系; Tim-4 明显抑制宫颈癌细胞系 SiHa 的迁移与侵袭能力, 且影响了 MMP2、MMP9 及 N-cadherin、E-cadherin 的表达水平。**结论:** 过表达 Tim-4 可促进宫颈癌细胞的侵袭与迁移能力, 其机制可能与 Tim-4 促进 SiHa 细胞 EMT 转化有关。

[关键词] Tim-4; 宫颈癌; 上皮间质转化; 侵袭; 迁移

[中图分类号] R737.33; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)03-0270-05

Effect of Tim-4 on invasion and migration of SiHa cervical cancer cell and its underlying mechanism

JIANG Jie, YANG Mingghao, JIANG Zhaoling, WANG Guoyan, XIU Yan, ZHAO Peiqing (Department of Clinical Laboratory, Yantai Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Yantai 246199, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Tim-4 on invasion and migration of cervical cancer cells and its underlying mechanisms. **Methods:** The expression levels of Tim-4 in cervical cancer cell lines SiHa, Hela and cervical epithelial immortalized cell line H8 were detected by Real-time PCR. The Tim-4 lentiviral vector was transfected into SiHa cell line. The over-expression of Tim-4 in SiHa cell line was detected by fluorescence microscopy. The effects of Tim-4 on the invasion and migration of cervical cancer cell line were detected by Transwell and scratches methods. The changes of MMP2, MMP9, E-cadherin and N-cadherin in SiHa cells were detected by Western blotting. **Results:** The expression of Tim-4 was higher in SiHa and Hela cell lines compared to that in the H8 cell line. The SiHa cell line burdening Tim-4 lentiviral vector was successfully constructed. Over-expression of Tim-4 significantly inhibited the migration and invasion of cervical cancer cell line, and affected the expression of MMP2, MMP9, N-cadherin and E-cadherin. **Conclusion:** Over-expression of Tim-4 promotes the invasion and migration by regulating the EMT transformation in cervical cell carcinoma.

[Key words] Tim-4; cervical cancer; EMT; invasion; migration

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(3): 270-274. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.03.010]

T 细胞免疫球蛋白和黏蛋白-4 (T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule-4, Tim-4) 是 2001 年发现的新型免疫调节分子, 其主要表达于巨噬细胞、DC 等抗原递呈细胞表面。本课题组前期研究^[1-5]发现, Tim-4 主要调控巨噬细胞, 在各种炎症性疾病中发挥重要生物学功能。近期研究^[6], 发现, Tim-4 在非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 中的表达显著高于正常组织, 其异常表达与肺癌的分期和预后呈负相关, 且可促进肺癌细胞生长与增殖, 但 Tim-4 与宫颈癌的侵袭与转移是否相关, 目前还未见相关报道。本研究利用宫颈癌细胞系, 拟揭示 Tim-4 如何促进宫颈癌细胞侵袭与迁移的进程, 初步阐释其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系、主要试剂和仪器

宫颈癌细胞系 SiHa、Hela 及正常宫颈上皮永

[基金项目] 山东省自然科学基金资助项目 (No. ZR2015HM031, ZR2014HM042); 山东省医药卫生科技发展计划 (No. 2016WSA03022)。

Project supported by the Nature Science Fund of Shandong Province (No. ZR2015HM031, ZR2014HM042), and the Medical and Health Science and Technology Development Plan of Shandong Province (No. 2016WSA03022)

[作者简介] 姜杰 (1974-), 女, 主管技师, 主要从事肿瘤免疫学检测方面的研究, E-mail: jiangjie1974@126.com

[通信作者] 赵培庆 (ZHAO Peiqing, corresponding author), 硕士, 副主任检验师, 主要从事肿瘤基础与临床研究, E-mail: bzjzppq@163.com

生化细胞系 H8 购自中国科学院上海细胞生物研究所, 在含有 10% 胎牛血清 (FBS, GIBCO) 的 MEM 培养基 (MEM; GIBCO, Grand Island, NY, USA) 中培养, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育。Transwell 试剂盒及 6 孔板 (#3464, Corning, USA), Tim-4 抗体为 Santa Cruz 公司产品 (sc390805, Santa Cruz Biotechnology, USA), MMP2 及 MMP9 (Ab38898, Ab32152; Abcam, USA), E-cadherin、N-cadherin (#14472, #13116; Cell Signaling Technology, Danvers, MA), Tim-4 慢病毒载体由上海吉凯基因构建。TRIzol 试剂盒购自 Invitrogen 公司, 逆转录试剂盒 Prime Script™ 购自 Promega 公司, 荧光定量 PCR (qPCR) 试剂盒购自 TaKaRa 公司。多功能酶标仪为 Thermofisher 公司产品, 光学显微镜为奥林巴斯公司产品 (BX51, Olympus, Japan)。

1.2 含 Tim-4 慢病毒载体宫颈癌细胞 SiHa 的构建

取处于对数生长期的细胞胰酶消化, 完全培养基制成 $(3\sim5)\times 10^4$ 个/ml 细胞悬液, 接种相应细胞数到培养板中, 继续培养保证感染时铺板量达到 5%~30% 左右。按照预实验结果, 加入最适病毒量进行感染, 总病毒用量计算公式: 总病毒用量 (TU) = 每皿初始铺板细胞数 × 感染皿数 × 细胞 MOI。参照预实验结果, 选择感染后最适时间点更换为常规培养基继续培养。感染 2~3 d 后参照预实验确定的感染时间点, 于荧光显微镜下观察 GFP 表达情况, 荧光率达 70%~80%, 细胞汇合度达 80% 左右时, 收集细胞进入后序实验。

1.3 qPCR 检测宫颈癌细胞中 Tim-4 的表达

TRIzol 法从宫颈癌细胞中根据试剂盒说明提取总 RNA, Nano-drop 进行总 RNA 定量, 将 1 μg 总 RNA 用于 cDNA 合成。引物序列: TIM-4: 上游为 5'-ACAGGACAGATGGATGGAATACCC-3', 下游为 5'-AGCCTTGTGTGTTTCTGCG-3'; 18S rRNA: 上游为 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3', 下游为 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'。Real-time PCR 仪上进行荧光定量 PCR。反应条件: 95 °C 变性 5 min, 95 °C 5 s 并连续 40 个循环, 60 °C 延伸 60 s。每个样本重复 3 次, 每次实验结束时进行熔解曲线分析以确保产物特异性, Tim-4 表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算。

1.4 Transwell 实验检测过表达 Tim-4 对宫颈癌细胞侵袭的影响

用 Tim-4 慢病毒载体和空载体转染 SiHa 细胞。Transwell 小室孔径为 8.0 μm, 上室用 50 mg/L Matrigel 1:8 的稀释液预先处理, 空气中干燥。细胞悬液制备前先将细胞饥饿 24 h, 然后用胰酶消化, 并用 PBS 洗涤 2 次, 最后将细胞用无血清培养基重新悬

浮, 调节细胞密度至合适范围。将 200 μl 细胞悬液加入到 Transwell 上室中, 并将 500 μl 含有 10% FBS 的培养基加入到下室中。每组设置 3 个平行孔。24 h 后 0.1% 结晶紫染色, 在光学显微镜下观察、拍照。

1.5 细胞划痕试验检测过表达 Tim-4 对宫颈癌细胞迁移的影响

用 Tim-4 慢病毒载体和空载体对照转染细胞, 常规接种 6 孔板, 每组 3 个平行孔。当细胞汇合度为 70% 后, 用 200 μl 枪头垂直划痕, 然后细胞用 PBS 清洗 3 次以去除漂浮细胞后, 加入无血清培养基移至 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 48 h, 最后进行拍照。

1.6 Western blotting 检测被感染宫颈癌细胞中 Tim-4 及 EMT 蛋白的表达

用 Tim-4 慢病毒载体和空载体转染细胞, RIPA 蛋白裂解液提取两组总蛋白, 总蛋白用 Nanodrop 2000 进行定量分析, 最后用 Tim-4、MMP2、MMP9 及 E-cadherin、N-cadherin 抗体分别进行孵育, 以 GAPDH 为内参进行比照分析。

1.7 统计学处理

利用 Graphpad Prism 5.0 软件进行统计学分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Tim-4 mRNA 在宫颈癌细胞中高表达

检测 Tim-4 mRNA 在宫颈癌 SiHa 和 HeLa 细胞中的表达结果 (图 1) 显示, Tim-4 mRNA 水平与正常宫颈上皮永生化细胞系 H8 相比, 表达量明显升高 (均 $P < 0.01$)。

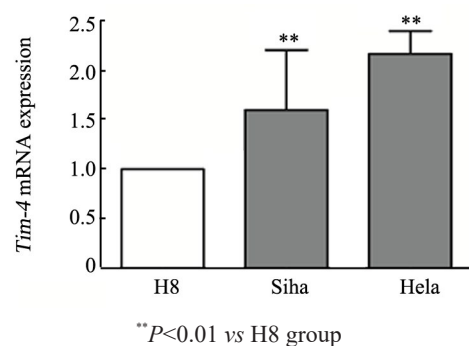


图 1 Tim-4 mRNA 在宫颈癌细胞系中高表达

Fig.1 Highly expression of Tim-4 mRNA in cervical cancer cell lines

2.2 感染慢病毒载体后宫颈癌细胞中 Tim-4 蛋白过表达

结果如图 2A 所示, 感染 Tim-4 过表达慢病毒后,

置于荧光显微镜下可见明亮GFP荧光表达,转染效率达95%以上,表明Tim-4蛋白转染成功且表达。Western blotting结果(图2B)显示,感染Tim-4慢病毒

载体后宫颈癌细胞Siha中Tim-4蛋白表达量较对照明显上调。

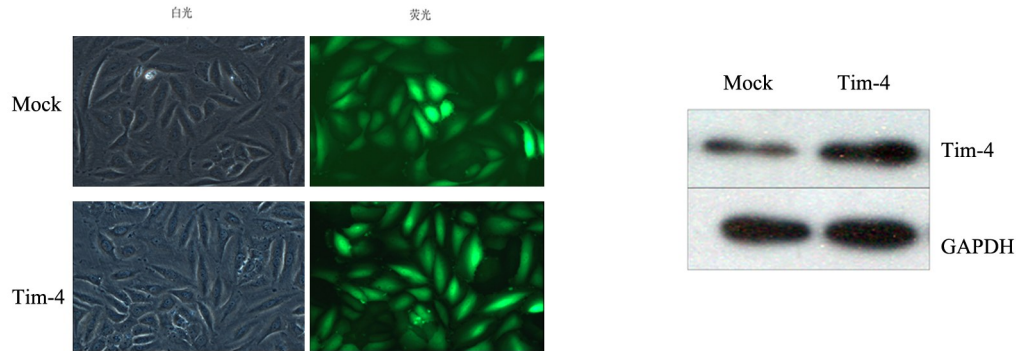
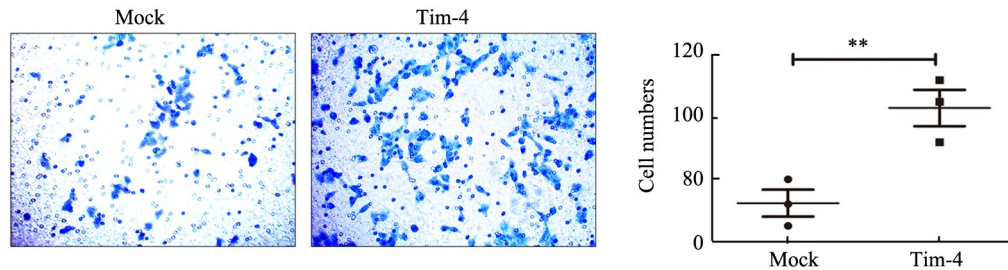


图2 过表达Tim-4后宫颈癌细胞Siha中Tim-4蛋白表达情况(×200)
Fig. 2 Over-expression of Tim-4 protein in cervical cancer Siha cells(×200)

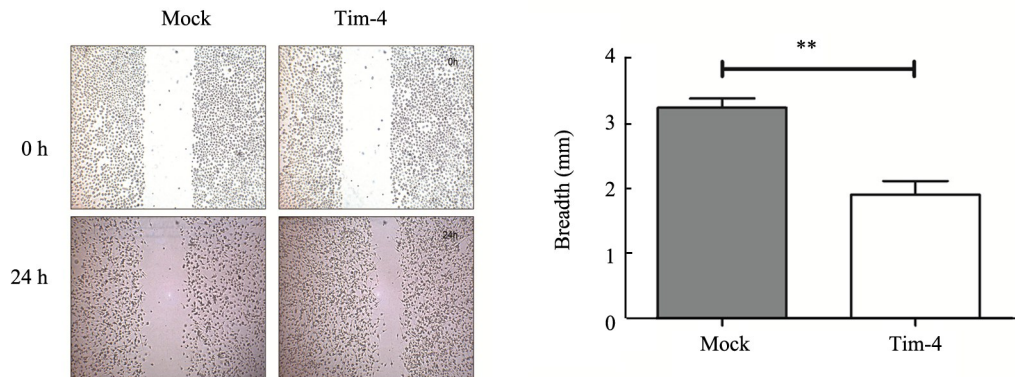
2.3 Tim-4过表达增强宫颈癌Siha细胞侵袭能力
Transwell侵袭实验检测结果(图3)显示, Tim-4过表达组Siha细胞的穿膜数明显高于空载体组($P < 0.01$),表明Tim-4可以显著促进宫颈癌细胞侵袭能力。

2.4 Tim-4显著增强宫颈癌Siha细胞的迁移能力
细胞划痕实验结果(图4)显示,用Tim-4转染宫颈癌Siha细胞后, Siha细胞迁移能力明显增强($P < 0.01$)。该结果进一步提示Tim-4参与宫颈癌的迁移与侵袭过程。



** $P < 0.01$ vs Mock group

图3 过表达Tim-4增强宫颈癌Siha细胞的侵袭能力(×200)
Fig. 3 Over-expression of Tim-4 enhances the invasion of cervical cancer Siha cells (×200)



** $P < 0.01$ vs Mock group

图4 Tim-4增强宫颈癌Siha细胞的迁移能力(×200)
Fig. 4 Tim-4 enhances the metastasis of cervical cancer Siha cells(×200)

2.5 过表达 Tim-4 促进子宫颈癌 SiHa 细胞 EMT

Western blotting 检测结果(图 5)显示,子宫颈癌细胞转染 Tim-4 后 MMP2、MMP9 和 N-cadherin 的表达水平明显高于正常对照组($P < 0.05$),但 E-cadherin 的表达则下降。结果表明 Tim-4 可以增强 MMP2、MMP9、N-cadherin 的表达,并下调 E-cadherin 的表达。表明 Tim-4 可能通过促进 SiHa 细胞 EMT,从而导致肿瘤细胞迁移和侵袭能力增强。

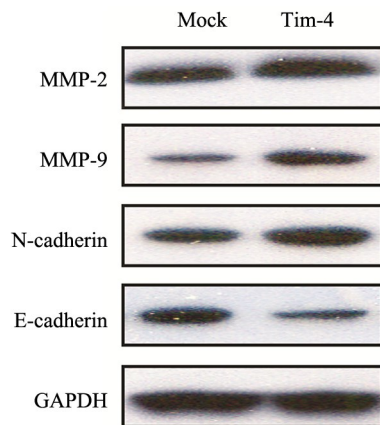


图 5 过表达 Tim-4 对子宫颈癌 SiHa 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响

Fig. 5 The effect of Tim-4 on the expression of EMT related proteins in cervical cancer SiHa cells

3 讨论

子宫颈癌是发病率仅次于乳腺癌的女性恶性肿瘤,在美国每年约有 12 000 例妇女被诊断患有子宫颈癌,且有近 4 000 人面临死亡威胁^[7]。转移与复发是导致子宫颈癌死亡的最主要原因。一般情况下,局部的扩散可通过淋巴系统到达盆腔和主动脉旁淋巴结。有研究^[8-9]表明,与局部淋巴转移相比,血液远处转移患者的死亡风险高达 5.3 倍,有远处转移的子宫颈癌患者 5 年生存率仅为 16.5%,其中位生存期仅为 8~13 个月。因此,亟待发现子宫颈癌转移新分子及其参与转移的可能机制。

Tim 家族是与肿瘤和炎症等疾病密切相关的新基因家族。Tim-4 是 Tim 家族成员之一,主要在巨噬细胞和其他抗原递呈细胞中表达。本课题组近期发现,肺癌组织中 Tim-4 异常高表达且与生存负相关;细胞实验发现其过表达显著增强肺癌细胞系的增殖能力,且上调 PCNA 和细胞周期蛋白 A、B1、D1 的表达。有趣的是,突变 Tim-4 分子结构中 Arg-Gly-Asp (RGD) 基序可消除其对肺癌细胞增殖的促进作用^[6],机制研究发现 Tim-4 通过 RGD 基序与 $\alpha\beta 3$ 整合素相互作用,促进了肺癌细胞的增殖,同时也有学者发现

Tim-4 的高表达与胶质瘤疾病进程密切相关^[10]。前期本课题组待发表结果发现 Tim-4 在子宫颈癌组织中的表达明显高于邻近组织,且 Tim-4 高表达组(++, 卅)的存活率远低于 Tim-4 低表达组(-,+),表明 Tim-4 可能在宫颈癌的转移和复发中起关键作用,但其在肿瘤转移中的确切分子机制尚不清楚。本研究中首先检测了子宫颈癌细胞中 Tim-4 mRNA 表达水平,结果提示 Tim-4 在子宫颈癌细胞系中高表达;用 Tim-4 慢病毒感染表达量较低的 SiHa 细胞系,进一步实验发现过表达 Tim-4 可显著增强子宫颈癌细胞系 SiHa 的侵袭与转移能力,提示 Tim-4 参与子宫颈癌的转移与侵袭过程。Western blotting 实验发现,转染 Tim-4 后 SiHa 细胞中 MMP2、MMP9 和 N-cadherin 的表达明显高于正常对照组,但 E-cadherin 的表达则下降。该结果表明, Tim-4 可以增强 MMP2、MMP9、N-cadherin 的表达,并下调 E-cadherin 的表达,提示 Tim-4 可能通过促进 SiHa 细胞 EMT,使肿瘤细胞迁移和侵袭能力增强。肿瘤的转移机制主要涉及原发灶局部浸润到周围基质和细胞外基质(ECM),并通过血液/淋巴管转移到远处器官与组织。该过程主要与 EMT 及其主要参与分子 E-cadherin 和 N-cadherin 相关。在 EMT 过程中,上皮型癌细胞丧失 E-cadherin 获得 N-cadherin,从而导致上皮组织中细胞-细胞连接受损以及细胞极性消失,获得干性标志,使肿瘤细胞迁移侵袭能力增强^[11]。本研究中 Tim-4 上调 N-cadherin 及下调 E-cadherin,表明 Tim-4 可以调控子宫颈癌细胞的 EMT 水平,影响肿瘤侵袭。MMP 可降解 ECM,在肿瘤的侵袭和转移中也发挥关键作用^[12]。Tim-4 上调 MMP-2 和 MMP-9,后者是非典型 Wnt/PCP 信号的下游因素^[13],该结果也提示 Tim-4 可能促进非典型的 Wnt/PCP/JNK 信号通路,加速降解 ECM,在肿瘤转移与侵袭中发挥重要功能。

总之,本研究结果初步阐释了 Tim-4 参与子宫颈癌迁移与侵袭的现象与机制。该结果提示 Tim-4 在子宫颈癌的预后中发挥重要作用,可能成为判定子宫颈癌转移及预后的新型分子标志,也为子宫颈癌复发与转移的靶向治疗提供了潜在靶点。

[参考文献]

- [1] XU L, QI J, ZHAO P, et al. T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-4 attenuates concanavalin A-induced hepatitis by regulating macrophage[J]. J Leukoc Biol, 2010, 88(2): 329-336. DOI: 10.1189/jlb.1209797.
- [2] XU L Y, QI J N, LIU X, et al. Tim-4 inhibits NO generation by murine macrophages[J/OL]. PLoS One, 2015, 10(4): e0124771[2017-12-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4408120/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0124771.

- [3] ZHAO P, WANG H, LI T, et al. Increased T cell immunoglobulin and mucin domain containing 4 (Tim-4) is negatively correlated with serum concentrations of interleukin-1beta in type 2 diabetes[J]. *J Diabetes*, 2016, 8(2): 199-205. DOI: 10.1111/1753-0407.12276.
- [4] ZHAO P, XU L, WANG P, et al. Increased expression of human T-cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-4 in peripheral blood mononuclear cells from patients with system lupus erythematosus[J]. *Cell Mol Immunol*, 2010, 7(2): 152-156. DOI: 10.1038/cmi.2009.118.
- [5] 孙辉, 孙洪珍, 张耀辉, 等. 2型糖尿病人外周血TIM4蛋白水平增高且与IL-1 β 负相关[J]. *免疫学杂志*, 2017, (7): 619-622.
- [6] ZHANG Q, WANG H, WU X, et al. TIM-4 promotes the growth of non-small-cell lung cancer in a RGD motif-dependent manner[J]. *Br J Cancer*, 2015, 113(10): 1484-1492. DOI: 10.1038/bjc.2015.323.
- [7] BRANCH B C, HENRY J, VECIL G G. Brain metastases from cervical cancer--a short review[J/OL]. *Tumori*, 2014, 100(5): e171-179 [2017-12-15]. <https://us.sagepub.com/en-us/nam/tumori-journal/journal203463>. DOI: 10.1700/1660.18186.
- [8] KIM K, CHO S Y, KIM B J, et al. The type of metastasis is a prognostic factor in disseminated cervical cancer[J]. *J Gynecol Oncol*, 2010, 21(3): 186-190. DOI: 10.3802/jgo.2010.21.3.186.
- [9] LI H, WU X, CHENG X. Advances in diagnosis and treatment of metastatic cervical cancer[J/OL]. *J Gynecol Oncol*, 2016, 27(4): e43 [2017-12-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4864519/>. DOI: 10.3802/jgo.2016.27.e43.
- [10] LI W, LI X, XU S, et al. Expression of Tim4 in glioma and its regulatory role in Ln-18 glioma cells[J/OL]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 77-82 [2017-12-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4710195/>. DOI: 10.12659/MSM.894963.
- [11] KLYMENKO Y, KIM O, STACK M S. Complex determinants of epithelial: mesenchymal phenotypic plasticity in ovarian cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2017, 9(8). DOI: 10.3390/cancers9080104.
- [12] NURNBERGER J, BACALLAO R L, PHILLIPS C L. Inversin forms a complex with catenins and N-cadherin in polarized epithelial cells[J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(9): 3096-3106. DOI: 10.1091/mbc.E02-04-0195.
- [13] NETH P, RIES C, KAROW M, et al. The Wnt signal transduction pathway in stem cells and cancer cells: influence on cellular invasion[J]. *Stem Cell Rev*, 2007, 3(1): 18-29.

[收稿日期] 2017-12-16

[修回日期] 2018-01-23

[本文编辑] 韩丹