

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.03.010

· 基础研究 ·

终末糖基化产物对结肠癌 SW620 细胞 EMT 及肿瘤干细胞标志物的影响

伍鑫,程勇,庞云,唐康,张百川(重庆医科大学附属第一医院 胃肠外科,重庆 400016)

[摘要] **目的:** 探讨终末糖基化产物(advanced glycation end products, AGEs)对结肠癌 SW620 细胞上皮间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)及肿瘤干细胞标志物 CD133 的影响及其作用机制。**方法:** 用不同浓度(0、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的 AGEs 处理 SW620 细胞后,采用划痕实验检测细胞的迁移能力;Transwell 小室检测细胞的侵袭能力;流式细胞术检测 CD133⁺ 细胞的含量;Western blotting 检测 AGEs 受体(receptor of AGEs, RAGE)、E-cadherin、Vimentin、ERK1/2、p-ERK1/2、CD133 蛋白的表达情况。**结果:** 与对照组(0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)比较,AGEs 处理组(50、100、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)在 AGEs 作用后,SW620 细胞 24 h 迁移距离[(1.55 \pm 0.15)、(1.58 \pm 0.19)、(1.75 \pm 0.21) vs (0.95 \pm 0.18) mm, 均 $P < 0.05$]及 48 h 迁移距离[(2.11 \pm 0.22)、(2.21 \pm 0.37)、(2.68 \pm 0.23) vs (1.60 \pm 0.24) mm, 均 $P < 0.05$]均明显增加;穿过 Matrigel 胶的数量明显增加[(176 \pm 19.52)、(194 \pm 17.70)、(220 \pm 25.5) vs (125 \pm 26.06) 个, 均 $P < 0.05$];CD133⁺ 细胞比例明显增加[(4.75 \pm 1.49)、(10.34 \pm 1.54)、(14.45 \pm 2.41)% vs (0.77 \pm 0.41)%, 均 $P < 0.05$]。与对照组比较,AGEs 处理组(50、100、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)Vimentin、RAGE、p-Erk1/2、CD133 蛋白表达明显增加;而 ERK1/2 蛋白无明显变化;E-cadherin 蛋白表达明显减少。**结论:** AGEs 可以提高结肠癌 SW620 细胞体外的侵袭迁移能力,促进 EMT 的发生,诱导肿瘤干细胞的生成。其机制可能通过 AGE-RAGE 受体配体的激活,上调 p-ERK1/2,从而调控 EMT 相关蛋白的表达,促进肿瘤干细胞的生成。

[关键词] 终末糖基化产物;结肠癌;上皮间质转化;肿瘤干细胞

[中图分类号] R735.3⁺4; R730.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)03-0355-05

Effects of advanced glycation end products on epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell associated markers in human colon cancer cell line SW620

WU Xin, CHENG Yong, PANG Yun, TANG Kang, ZHANG Baichuan(Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of advanced glycation end products(AGEs) on epithelial-mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cell associated marker CD133 in human colon cancer cell line SW620 and their mechanism of actions. **Methods:** After the SW620 cells were treated with AGEs at different concentrations of 0, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, migration and invasion abilities of the SW620 cells were detected by wound healing test and Transwell chamber assay, respectively, percentage of CD133⁺ cells was tested by flow cytometry, and protein expression levels of receptor of AGEs (RAGE), E-cadherin, Vimentin, ERK1/2, p-ERK1/2 and CD133 were detected by Western blotting. **Results:** After the treatment of AGEs, compared with the control group (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$), cellular migration distances in experiment groups (50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were significantly improved after 24 h ([1.55 \pm 0.15], [1.58 \pm 0.19], [1.75 \pm 0.21] vs [0.95 \pm 0.18] mm, all $P < 0.05$) and 48 h ([1.60 \pm 0.24], [2.11 \pm 0.22], [2.68 \pm 0.23] vs [1.60 \pm 0.24] mm, all $P < 0.05$). In addition, treating the cells with AGEs (50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 48 h remarkably increased number of the cells crossed Matrigel *in vitro* ([176 \pm 19.52], [194 \pm 17.70], [220 \pm 25.50] vs [125 \pm 26.06], all $P < 0.05$) and percentages of CD133⁺ cell ([4.75 \pm 1.49], [10.34 \pm 1.54], [14.45 \pm 2.41]% vs [0.77 \pm 0.41]% , all $P < 0.05$). Expressions of RAGE, Vimentin, p-ERK1/2 and CD133 proteins were significantly increased in the treatment groups comparing with control group;

[基金项目] 重庆市自然科学基金资助项目(No. cstc2012jjA0038)。Project supported by the Natural Science Foundation of Changqing (No. cstc2012jjA0038)

[作者简介] 伍鑫(1990 -),男,重庆永川人,硕士生,主要从事胃肠道肿瘤基础与临床研究, E-mail: 1037132850@qq.com

[通信作者] 程勇(CHENG Yong, corresponding author), E-mail: chengyongcq@aliyun.com

[优先发表] http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20160428.1630.002.html

however, the expression of E-cadherin protein was decreased, while that of ERK1/2 protein had not obvious change. **Conclusion:** AGEs could enhance migration and invasion abilities of the SW620 cells *in vitro*, promote occurrence of EMT, and induce tumorigenesis of cancer stem cells. Activating ligand of AGE-RAGE, up-regulating p-ERK1/2 protein and regulating expression of the EMT protein might be a possible mechanism for tumorigenesis of cancer stem cells.

[**Key words**] advanced glycation end products(AGEs); colon cancer; epithelial-mesenchymal transition(EMT); cancer stem cells

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(3): 355-359. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.03.010]

糖类与蛋白质通过美拉德式反应生成终末糖基化产物(advanced glycation end products, AGEs)^[1], 因此在糖尿病患者体内含有较高水平的 AGEs^[2]。AGEs 通过与分布在细胞膜表面的终末糖基化产物受体(receptor of AGEs, RAGE)结合发挥作用^[3]。目前研究^[4-6]表明, 糖尿病患者有较高的肿瘤发生风险, 其机制尚不明确。上皮间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)在肿瘤细胞的侵袭、迁移中扮演了重要角色^[7], 同时 EMT 被认为可以诱导肿瘤干细胞的生成^[8]。本研究以外源性 AGEs 作用结肠癌 SW620 细胞, 观察细胞的迁移、侵袭能力, 以及对 EMT 和肿瘤干细胞标志物的影响, 并探讨可能的作用机制。希望通过本研究的理论基础以 AGEs-RAGE 为靶点为结肠癌伴糖尿病患者的肿瘤治疗带来新的曙光。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

人结肠癌 SW620 细胞株购于中国科学院上海细胞库。RPMI 1640 培养基购于 Hyclone; 胎牛血清购于 PANS; AGE-BSA 购于 Biovision; 抗体 E-钙调蛋白(cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、ERK1/2、p-ERK 购于 CST; 抗体 RAGE 购于 Abcam; 抗体 CD133-PE 购于 Miltenyi; GAPDH 抗体, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 和辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 购于 Preprotech; Transwell 小室(8 μm)、ECL 发光液和抗体 CD133 购于 Millipore; Matrigel 胶购于 BD 公司; 全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于凯基生物。

1.2 SW620 细胞培养及 AGEs 配制

SW620 细胞常规培养于含有 10% 胎牛血清的 1640 培养基中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱内培养。10 mg/ml 的 AGEs 按照实验分组用培养基配制成 0、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度。

1.3 细胞划痕实验检测 AGEs 对 SW620 细胞迁移的影响

先在 6 孔板的各孔底部划 3 条横线, 取对数生长

期细胞接种于 6 孔板中, 待细胞长满 80% 后, 用消毒的 10 μl Tip 划垂直于底部横线的划痕区, PBS 清洗 3 次, 换成含不同浓度 AGEs 的 2% 胎牛血清培养基。显微镜下观察并拍下 0、24、48 h 的划痕照片, 用 Image pro plus 软件分析各组细胞的迁移距离。

1.4 Transwell 小室检测 AGEs 对 SW620 细胞侵袭的影响

Matrigel 胶 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜解冻, 用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 1640 培养基按照 1:3 稀释胶, 取 50 μl 稀释后的 Matrigel 胶加入小室内, 再将小室放入 24 孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后使其凝固。取对数生长期的细胞, 用含不同浓度 AGEs 的无血清培养基调成 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞悬液, 取 200 μl 加入上室, 下室分别加入 700 μl 含不同浓度 AGEs 和 10% 胎牛血清的培养基。常规培养 48 h 后, 取出小室, 用棉签擦去小室内的 Matrigel 胶和细胞, 4% 甲醛溶液固定, 结晶紫染色, 拍照计数细胞的数量。

1.5 流式细胞术检测 AGEs 对 SW620 细胞中 CD133⁺ 细胞比例的影响

取不同浓度 AGEs 作用 48 h 后的细胞, PBS 重悬, 调整细胞密度至 $1 \times 10^7/\text{ml}$, 取 100 μl 细胞悬液于 EP 管中, 每管加入 10 μl CD133-PE 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 30 min, PBS 洗 3 次后用 1% 甲醛溶液重悬, 流式细胞术检测 CD133⁺ 细胞的比例。

1.6 Western blotting 检测 RAGE、E-cadherin、Vimentin、ERK1/2、p-ERK1/2、CD133 蛋白的表达

采用全蛋白提取试剂盒提取不同浓度 AGEs 作用 48 h 后的细胞蛋白, BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 并定量。每孔 20 μl 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后再将蛋白转到 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 一抗比例(E-cadherin 1:2 000、Vimentin 1:2 000, ERK1/2 1:1 000, p-ERK1/2 1:1 000, RAGE 1:1 000, CD133 1:500, GAPDH 1:2 000), 二抗室温孵育 2 h, ECL 化学发光, 收集图像并进行灰度值分析。

1.7 统计学处理

所有实验重复 3 次, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用

Spss16.0 软件进行单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AGEs 提高 SW620 细胞体外迁移能力

细胞划痕实验结果(图 1)显示,AGEs 处理 24 h

后,与对照组比较各处理组 SW620 细胞体外迁移距离,明显增加[(1.55 ± 0.15)、(1.58 ± 0.19)、(1.75 ± 0.21) vs (0.95 ± 0.18)mm, 均 $P < 0.05$];AGEs 处理 48 h 后更显著,[(2.11 ± 0.22)、(2.21 ± 0.37)、(2.68 ± 0.23) vs (1.60 ± 0.24)mm, 均 $P < 0.05$]。

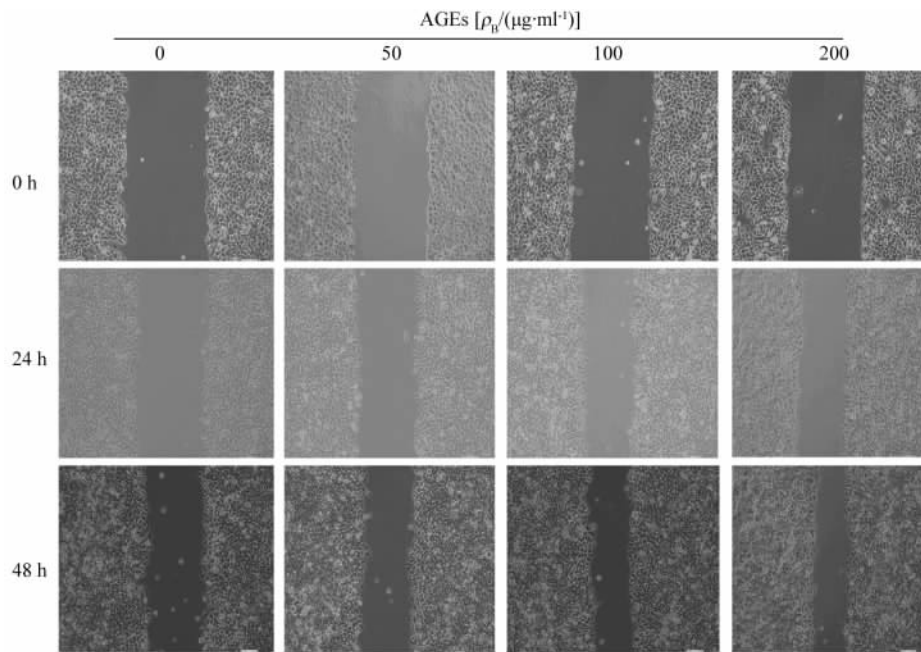


图 1 AGEs 促进 SW620 细胞迁移(×100)

Fig. 1 AGEs promoted the migration of SW620 cells (×100)

2.2 AGEs 增加 SW620 细胞体外侵袭能力

Transwell 小室侵袭实验结果(图 2)显示,AGEs 处理 48 h 后,与对照组比较,各处理组穿过 Matrigel 胶的细胞数明显增加[(176 ± 19.52)、(194 ± 17.70)、(220 ± 25.50) vs (125 ± 26.06)个, 均 $P < 0.05$]。

2.3 AGEs 增加 SW620 细胞中 CD133⁺ 细胞的比例

流式细胞术检测 CD133⁺ 细胞比例结果(图 3)显示,AGEs 处理 48 h 后,各处理组 CD133⁺ 细胞比例明显多于对照组[(4.75 ± 1.49)%、(10.34 ± 1.54)%、(14.45 ± 2.41)% vs (0.77 ± 0.41)% , $P < 0.05$]。

2.4 AGEs 对 SW620 细胞内 E-cadherin、Vimentin、RAGE、ERK1/2、p-ERK1/2 和 CD133 表达的影响

Western blotting 检测结果(图 4)显示,AGEs 处理 48 h 后,与对照组比较,各处理组 Vimentin、RAGE、p-Erk1/2、CD133 表达增加,Erk1/2 无明显变化,E-cadherin 表达降低。

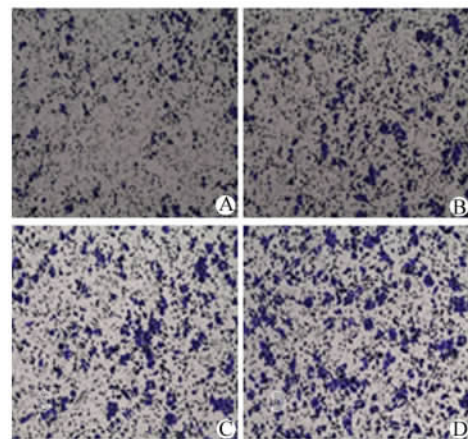


图 2 AGEs 促进 SW620 细胞侵袭(×100)

Fig. 2 AGEs promoted the invasion ability of SW620 cells (×100)

A: 0 µg/ml; B: 50 µg/ml; C: 100 µg/ml; D: 200 µg/ml

3 讨论

糖尿病已为全球主要健康问题,且发病率正逐年增加^[9]。糖尿病患者存在较高的肿瘤发生风险,且肿瘤的复发、转移及全因死亡率亦显著增加,但是其具体机制尚不明确。糖类与蛋白质在体内通过美拉德反应生成 AGEs,因此在糖尿病患者体内含有较高浓度的 AGEs。AGEs 与分布在细胞膜表面的受体 RAGE 相结合而发挥作用,该受体与配体结合在糖尿病引起的并发症方面起着重要的作用,如糖尿病肾病和视网膜眼病等^[10-11]。

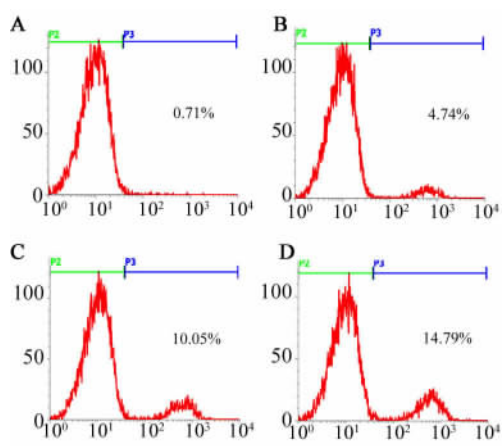


图3 AGEs 提高 CD133⁺ SW620 细胞的比例

Fig.3 AGEs increased the proportion of CD133⁺ SW620 cells

A: 0 μg/ml; B: 50 μg/ml; C: 100 μg/ml; D: 200 μg/ml

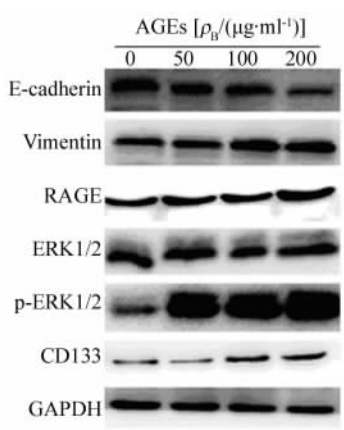


图4 AGEs 对 SW620 细胞相关蛋白表达的影响

Fig.4 Influence of AGEs on the expression of related proteins in SW620 cells

EMT 在肿瘤的侵袭、迁移过程中发挥重要的作用。Mani 等^[12]通过诱导乳腺上皮细胞发生 EMT, 成功获得乳腺上皮干细胞。更有研究^[8]指出,通过 EMT 可生成乳腺癌肿瘤干细胞。Reya 等^[13]提出的肿瘤干细胞学说认为,肿瘤干细胞是肿瘤发生、发展的关键因素。其具有自我更新、无限增殖和诱导耐药的特点。随着该学说的不断发展,有研究^[14]结果表明,CD133 可以作为肿瘤干细胞的标志物。

本研究结果显示,外源性 AGEs 作用于结肠癌 SW620 细胞 48 h 后其侵袭能力明显增强,观察细胞 24 h、48 h 的迁移距离明显增加,该结果与 Abe 等^[15]在黑素瘤研究报道一致。同时在蛋白表达水平上还发现,AGEs 作用 48 h 后,处理组上调了 SW620 细胞 RAGE 受体和间质细胞标志物 Vimentin 的表达,下调了上皮细胞标志物 E-cadherin 的表达。有研究^[16-17]指出,AGEs 促进细胞的侵袭、迁移能力主要通过 ERK 信号通路,本研究也证实了这一点。结果表明,AGEs 上调其受体 RAGE 并与之结合后,激活 ERK 信号通路,活化 p-ERK1/2 上调间质细胞标志物波形蛋白,下调上皮细胞标志物钙调蛋白,使结肠癌 SW620 细胞发生 EMT。本研究还进一步探索了肿瘤干细胞标志物 CD133 的变化,流式细胞术检测结果显示,AGEs 作用 48 h 后,增加了肿瘤干细胞标志物 CD133 的表达,由此笔者推测,AGEs 促进了结肠癌 SW620 细胞发生 EMT,并诱导肿瘤干细胞的生成。

综上,本研究证实了 AGEs 在体外可以增加结肠癌 SW620 细胞的侵袭、迁移能力,促进细胞发生 EMT,诱导肿瘤干细胞的生成。不但拓展了在糖尿病增加肿瘤风险上的认识,而且为肿瘤伴糖尿病患者的治疗提供了新的思路和实验依据。

[参考文献]

- [1] BIERHAUS A, HOFMANN M A, ZIEGLER R, et al. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept [J]. Cardiovasc Res, 1998, 37 (1998); 586-600. DOI:10.1016/S0008-6363(97)00233-2.
- [2] MUSTAFA I, AHMAD S, DIXIT K, et al. Glycated human DNA is a preferred antigen for anti-DNA antibodies in diabetic patients [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2012, 95(1): 98-104. DOI: 10.1016/j.diabres.2011.09.018.
- [3] LOPEZ-DIEZ R, RASTROJO A, VILLATE O, et al. Complex tissue-specific patterns and distribution of multiple RAGE splice variants in different mammals [J/OL]. Genome Biol Evol, 2013, 5 (12): 2420-2435 [2015-11-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3879976/>. DOI: 10.1093/gbe/evt188.
- [4] XU H L, FANG H, XU W H, et al. Cancer incidence in patients

- with type 2 diabetes mellitus: a population-based cohort study in Shanghai [J]. BMC Cancer, 2015, 15(1): 852. DOI: 10.1186/s12885-015-1887-4.
- [5] LARSSON S C, GIOVANNUCCI E, WOLK A. Diabetes and colorectal cancer incidence in the cohort of Swedish men [J]. Diabetes Care, 2005, 28(7): 1805-1807. DOI: 10.2337/diacare.28.7.1805.
- [6] ELWING J E, GAO F, DAVIDSON N O, et al. Type 2 diabetes mellitus: the impact on colorectal adenoma risk in women [J]. Am J Gastroenterol, 2006, 101(8): 1866-1871. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2006.00651.x.
- [7] IWATSUKI M, MIMORI K, YOKOBORI T, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance [J]. Cancer Sci, 2010, 101(2): 293-299. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01419.x.
- [8] MOREL A P, LIEVRE M, THOMAS C, et al. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition [J/OL]. PLoS ONE, 2008, 3(8): e2888 [2015-11-12]. <http://journal.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0002888>. DOI: 10.1371/journal.pone.0002888.
- [9] YANG W, LU J, WENG J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. N Engl J Med, 2010, 362(12): 1090-1101. DOI: 10.1056/NEJMoa0908292.
- [10] ZHANG Y, LAPIDOS K A, GAL-MOSCVICI A, et al. A receptor-based bioadsorbent to target advanced glycation end products in chronic kidney disease [J]. Artif Organs, 2014, 38(6): 474-483. DOI: 10.1056/NEJMoa0908292.
- [11] SHI L, YU X, YANG H, et al. Advanced glycation end products induce human corneal epithelial cells apoptosis through generation of reactive oxygen species and activation of JNK and p38 MAPK pathways [J/OL]. PLoS ONE, 2013, 8(6): e66781 [2015-11-12]. <http://journal.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0066781>. DOI: 10.1371/journal.pone.0066781. DOI: 10.1371/journal.pone.0066781.
- [12] MANI S A, GUO W, LIAO M J, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells [J]. Cell, 2008, 133(4): 704-715. DOI: 10.1016/j.cell.2008.03.027.
- [13] REYA T, MORRISON S J, CLAEKE M F, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells [J]. Nature, 2001, 414(6859): 105-111. DOI: 10.1038/35102167.
- [14] RICCI-VITIANI L, LOMBARDI D G, PILOZZI E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells [J]. Nature, 2007, 445(7123): 111-115. DOI: 10.1038/nature05384.
- [15] ABE R, SHIMIZU T, SUGAWARA H, et al. Regulation of human melanoma growth and metastasis by AGE-AGE receptor interactions [J]. J Invest Dermatol, 2004, 122(2): 461-467. DOI: 10.1046/j.0022-202X.2004.22218.x.
- [16] SHARAF H, MATOU-NASRI S, WANG Q, et al. Advanced glycation endproducts increase proliferation, migration and invasion of the breast cancer cell line MDA-MB-231 [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852(3): 429-441. DOI: 10.1016/j.bbdis.2014.12.009.
- [17] KO S Y, KO H A, SHIEH T M, et al. Cell migration is regulated by AGE-RAGE interaction in human oral cancer cells in vitro [J/OL]. PLoS ONE, 2014, 9(10): e110542 [2015-11-12]. <http://journal.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0110542>. DOI: 10.1371/journal.pone.0110542.
- [收稿日期] 2015 - 12 - 25 [修回日期] 2016 - 03 - 25
[本文编辑] 党瑞山

· 读者 · 作者 · 编者 ·

化学元素和核素符号规范书写的要求

化学符号虽然是化学专业的学术交流语言,但在生物医学领域也有很广泛的使用。化学符号的书写有其特殊的规律和要求,生物医学论文中必须重视化学符号书写的规范化。根据 GB3102.8-93《物理化学和分子物理学的量和单位》的规定,把化学元素和核素符号书写的规范要求介绍如下:

1. 元素或核素的单字母符号均用正体大写,双字母符号首字母正体大写,第二个字母用正体小写。
2. 核素的核子数(质子数)应标注在元素符号的左上角,例如: ^{60}Co , ^{32}P , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{125}I 等;过去习惯把核子数标注在元素符号右上角的写法是错误的,例如: N^{14} , Co^{60} 等。
3. 离子价态的字符应标注在元素符号的右上角,例如: H^+ , Cl^- , O^{2-} , Mg^{2+} , Al^{3+} , PO_4^{3-} 等,不应写成 O^{-2} , O^{--} , Mg^{+2} , Mg^{++} , Al^{+++} , PO_4^{-3} 等。
4. 激发态的字符(电子激发态用* ; 核子激发态用正体 m,也可用*)标注在元素或核素符号的右上角,例如: $^{110}\text{Ag}^{\text{m}}$, $^{110}\text{Ag}^*$, He^* , NO^* 等。
5. 分子中核素的原子数标注在核素符号右下角,例如: H_2 , FeSO_4 等。
6. 质子数(原子序数)标注在元素符号左下角,例如: $_{82}\text{Pb}$, $_{26}\text{Fe}$ 等。
7. 对于形状相似的元素符号、化合物的化学式符号,书写时应注意区分,如:Co(钴)—CO(一氧化碳),No(锘)—NO(一氧化氮),Ba(钡)—Ra(镭),Nb(铌)—Nd(钕)—Np(镎),HF(氟化氢)—Hf(铪)等。

(本刊编辑部)