

一个新的促进人胰腺癌细胞上皮-间充质转化因子: ATF-2

许元鸿, 刘哲, 郭克建, 杜瑞霞

许元鸿, 刘哲, 郭克建, 中国医科大学附属第一医院胰腺外科 辽宁省沈阳市 110001

杜瑞霞, 沈阳医学院附属奉天医院耳鼻喉科 辽宁省沈阳市 110024

许元鸿, 教授, 主要从事肝、胆、胰、胃肠肿瘤的外科治疗及实验研究工作。

辽宁省科学技术计划基金资助项目, No. 2011404013-4

作者贡献分布: 许元鸿、刘哲及郭克建对此文贡献均等; 此题由许元鸿与郭克建设计; 研究过程由刘哲与杜瑞霞完成; 数据分析由刘哲与杜瑞霞完成; 论文撰写由许元鸿、刘哲及郭克建完成。

通讯作者: 许元鸿, 教授, 110001, 辽宁省沈阳市南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院普通外科。

xuyuanhongcmu@126.com

电话: 024-83283350

收稿日期: 2012-06-02 修回日期: 2012-07-12

接受日期: 2012-08-01 在线出版日期: 2012-08-28

ATF2, a novel factor promoting epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells

Yuan-Hong Xu, Zhe Liu, Ke-Jian Guo, Rui-Xia Du

Yuan-Hong Xu, Zhe Liu, Ke-Jian Guo, Department of Pancreatic Surgery, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Rui-Xia Du, Department of Otorhinolaryngology, the Affiliated Fengtian Hospital of Shenyang Medical University, Shenyang 110024, Liaoning Province, China

Supported by: the Liaoning Provincial Science and Technology Project, No. 2011404013-4

Correspondence to: Yuan-Hong Xu, Department of Pancreatic Surgery, the First Hospital of China Medical University, 155 Nanjing North Road, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. xuyuanhongcmu@126.com

Received: 2012-06-02 Revised: 2012-07-12

Accepted: 2012-08-01 Published online: 2012-08-28

Abstract

AIM: To investigate whether ATF2 together with TGF- β 1 can induce epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human pancreatic cancer cell line Capan2.

METHODS: Capan2 cells were induced with TGF- β 1 after transfection with PGEX-ATF2, and the negative control group was treated with DMSO. Cell morphological alternations were examined by phase contrast microscopy. The expression of mesenchymal marker vimentin and

epithelial markers E-cadherin and ATF2 were detected by Western blot. Cell migration was determined by Transwell motility assay.

RESULTS: Compare to the negative control group, cells transfected with ATF2 and treated with TGF- β 1 showed loss of cell-cell contacts, fibroblastic morphology, decreased expression of E-cadherin, up-regulated expression of vimentin and ATF2, and increased migration ability ($P = 0.008$).

CONCLUSION: ATF2 together with TGF- β 1 can induce EMT in human pancreatic cancer cell line Capan2. ATF2 may be a new molecular target for therapy of pancreatic cancer.

Key Words: Pancreatic cancer; Transforming growth factor- β 1; Epithelial-mesenchymal transition; Activating transcription factor 2

Xu YH, Liu Z, Guo KJ, Du RX. ATF2, a novel factor promoting epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(24): 2265-2269

摘要

目的: 研究活化转录因子2(activating transcription factor-2, ATF2)在人胰腺癌细胞系Capan2中高表达能否促使转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)诱导Capan2细胞上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)。

方法: 应用PGEX-ATF2质粒瞬时转染Capan2细胞系, 并继续用TGF- β 1诱导, 以仅加DMSO组为空白对照组, 倒置显微镜观察细胞形态学变化, Western blot检测E-cadherin、vimentin、ATF2的表达。Transwell小室侵袭实验验证侵袭能力的变化。

结果: 与空白对照组细胞相比, 转染ATF2并用TGF- β 1诱导的Capan2细胞系能够明显改变细胞形态, 并且使得E-cadherin的蛋白水平表达明显下调, vimentin、ATF2的蛋白水平表

■背景资料

胰腺癌是常见的恶性肿瘤。由于其早期发生微转移及其临床症状出现较晚而令其治疗效果不佳; 活化转录因子2(ATF2), 作为AP-1类的因子之一, 在多种恶性肿瘤中均有不同程度的表达, 极可能成为胰腺癌研究的新方向。

■同行评议者

陈光, 教授, 吉林大学第一医院消化器官外科

■研发前沿

关于恶性肿瘤侵袭、转移机制的研究目前已经成为研究肿瘤发生与发展的热点; ATF2, 作为与EMT密切相关的因子, 极可能为胰腺癌特别是针对胰腺癌早期转移的治疗提供新的靶点。

达则显著上调, 细胞侵袭能力也显著增加($P = 0.008$)。

结论: ATF2能够与TGF- β 1联合共同诱导Capan2细胞系产生EMT, 从而对胰腺癌的分

关键词: 胰腺癌; 转化生长因子 β 1; 上皮-间充质转化; 活化转录因子2

许元鸿, 刘哲, 郭克建, 杜瑞霞. 一个新的促进人胰腺癌细胞上皮-间充质转化因子: ATF-2. 世界华人消化杂志 2012; 20(24): 2265-2269
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2265.asp>

0 引言

在美国, 胰腺癌在各种癌症死因中列第4位. 其早期诊断困难, 对化疗及其他疗法相对不敏感, 5年生存率仅为3%-5%^[1]. 进一步解析胰腺癌发生、发展的分子机制, 对胰腺癌的诊断和治疗将产生深远的影响. 活化转录因子2(activating transcription factor-2, ATF2), 作为AP-1成员之一, 其亮氨酸拉链结构(bZIP)由C端的亮氨酸二聚化结合区和N端的碱性DNA结合区组成^[2,3]. 鼠NMuMG细胞由TGF- β 介导的细胞上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)可由于P38 MAPK通路特异性的抑制剂SB202190的加入而使磷酸化的ATF2表达降低^[4]. EMT自20余年前被提出以来, 一直受到广泛的关注. 经典的诱导EMT的因子为TGF- β , 另外还有表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)等. EMT使细胞失去极性, 丢失细胞间紧密连接和黏附连接, 获得了浸润性和游走迁移能力. 目前已经在乳腺癌、口腔鳞癌、肝癌、胰腺癌等多种癌症中得到证明^[5-8]. 本实验中, 我们证明转染ATF2后的Capan2细胞对TGF- β 1的刺激更加敏感, 形成EMT. 我们推测ATF2可以与TGF- β 1协同作用使得EMT的产生变得更加容易.

1 材料和方法

1.1 材料 兔抗羊E-cadherin、vimentin单克隆抗体及兔抗ATF2多克隆抗体购自Santa Cruz公司; TGF- β 1购自Repro tech公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染: 人胰腺癌细胞株Capan2由中国医科大学普外实验室盛伟伟博士馈赠.

培养于含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基中, 置于37 °C、50 mL/L CO₂培养箱中, 每2 d换液1次, 每3-4 d传代1次. 表达ATF2质粒pGEX-ATF2由美国(Center for Cancer and Stem Cell Biology, Houston, USA) Jin C.教授馈赠. 当细胞在6孔板上培养达到70%-80%融合时, 用Lipofectamine 2000将PGEX-ATF2或PGEX-质粒按照说明书瞬时转染至Capan2细胞中, 48 h后转染ATF2及空白PGEX质粒的Capan2细胞继续用含有10 μ g/L TGF- β 1的DMEM培养基培养, 空白对照组仅加等量的DMSO, 48 h后, 倒置相差显微镜观察细胞形态变化.

1.2.2 Western blot检测: Western blot蛋白印迹检测ATF2、E-cadherin、vimentin表达: 严格按照RIPA蛋白裂解液试剂盒说明书进行各组蛋白的提取, 将蛋白与5 \times 蛋白上样缓冲液以4:1混合后煮沸变性5 min, 置于10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 分离的蛋白转移至PVDF膜上之后, 用5%脱脂奶粉配置的TBST室温封闭2 h, 加入ATF2(1:800)、E-cadherin(1:800)、vimentin(1:1000)、GAPDH(1:1500)一抗后4 °C封闭过夜, 辣根过氧化物酶标记的二抗室温2 h, TBST洗膜, 5 min \times 4次, 化学发光法(electrochemiluminescence, ECL)显色. 实验重复3次.

1.2.3 Transwell小室侵袭实验: Transwell小室上铺100 mg/L Matrigel生物胶50 μ L, 下室中加入含150 mL/L胎牛血清的DMEM培养基600 μ L. 所有实验细胞均调整密度为1 \times 10⁶个/孔, 种于小室上室, 放于培养箱中培养24 h. 取出PBS冲洗后, 4%多聚甲醛固定, 0.1%结晶紫染色, 200倍显微镜下计数, 任意选取5个视野, 以其平均细胞数为侵袭至膜上的细胞数, 每组重复3次实验, 求取平均数为结果.

统计学处理 所有计量资料均采用mean \pm SD表示, 采用SPSS13.0软件对结果进行分析, 应用 t 检验统计分析; $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 转染ATF2可以促进细胞形态学的转变 与空白对照组相比, Capan2细胞在转染ATF2后更容易受到TGF- β 1的刺激, 大部分细胞变成梭形, 呈现明显的间叶细胞的形态(图1A, D). 单独ATF2转染或单独TGF- β 1刺激组则没有出现明确细胞形态学的变化(图1B, C).

2.2 AT细胞上皮相关标志物的表达 应用Western blot的方法检测上皮相关标志物E-cadherin和间

■相关报道

目前研究报道证明, ATF2作为AP-1成员之一, 他可以同c-Jun、CREB形成二聚体, 同时在黑色素瘤细胞中, ATF2的表达与患者的预后密切相关.

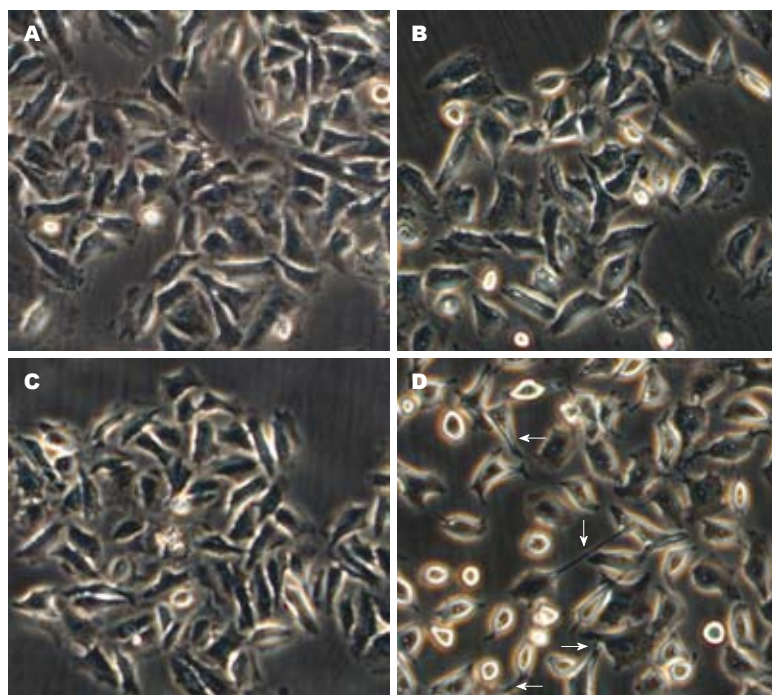


图 1 Capan2细胞的形态学变化. A: 空白对照组; B: 转染ATF2组; C: TGF-β1诱导组; D: 转染ATF2联合TGF-β1刺激组.

■创新盘点

本研究将PGEX-ATF2质粒转染至胰腺癌细胞系Capan2中, 而此高表达ATF2的细胞系则促使TGF-β1诱导形成EMT, 此研究国内外未见报道.

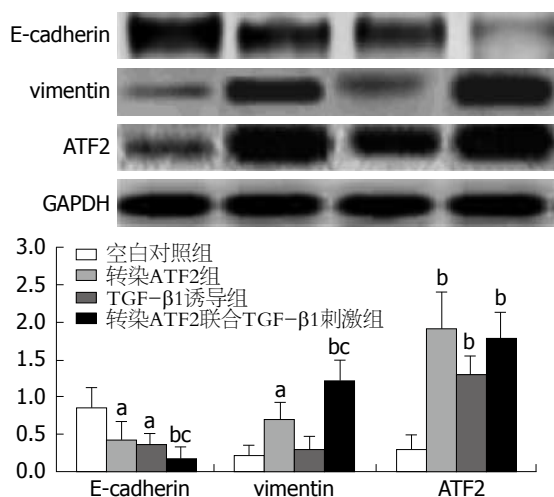


图 2 不同转染组中Capan2细胞相关基因蛋白的表达变化. ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs 转染ATF2联合TGF-β1刺激组.

质相关标志物vimentin以及ATF2的蛋白表达. 与空白对照组、转染ATF2组及TGF-β1诱导组细胞相比, 转染ATF2联合TGF-β1刺激组细胞vimentin、ATF2表达显著升高, 而E-cadherin的表达则是显著降低. 细胞的侵袭能力增高(图2), 提示明确的上皮向间质转化的趋势. 细胞的侵袭能力也是EMT的标志之一, 为此我们应用Transwell细胞侵袭实验验证各组细胞的侵袭能力. AT细胞的侵袭能力明显大于其他组细胞(图3).

3 讨论

在本实验中, 我们在已经转染ATF2的Capan2细

胞培养基中加入10 μg/L TGF-β1, 48 h后观察到大部分细胞形态学发生显著变化, 同时Western blot也检测到了vimentin、ATF2表达的升高及E-cadherin表达的降低, 而在A或T细胞中这种变化不明显. 这提示我们, ATF2可以与TGF-β1协同作用使Capan2细胞产生EMT. EMT目前受到了广泛的关注, 他与肿瘤的侵袭、转移, 特别是早期转移有极为密切的关系, 而且可以通过多条途径诱导产生. TGF-β与其受体结合后, 激活细胞内Smad信号通路, 通过抑制E-cadherin的表达来诱导EMT发生^[9,10]; 韩磊等^[11]则发现, Genistein具有明显的抑制EMT的作用; 而在人胰腺癌中, Collagen I通过激活JNK1而使得胰腺癌的N-cadherin表达上调从而增加其侵袭能力^[12], 单独转染带有SNAIL的质粒便可使BxPC3细胞产生EMT^[13]. 癌基因k-Ras的突变是胰腺癌发生早期关键事件之一, 大约有30%的早期胰腺癌及几乎100%进展期胰腺癌伴有此基因的突变^[14-16]. 被激活的k-Ras可以通过包括MEKK/SEK/JNK/AP-1(ATF-2/Jun)途径在内的多种传导途径来诱导细胞的转化^[14-16]. c-Jun在胰腺癌中的表达增高, 证明Ras/AP-1传导途径有可能参与胰腺癌的发生.

而ATF2作为AP-1成员之一, 他可以同c-Jun、CREB形成二聚体^[17,18], 在黑色素瘤细胞中, ATF2的表达与患者的预后密切相关^[19]. 在乳腺癌中ATF2稳定表达则与肿瘤细胞对DNA的损伤耐受有关^[20]. ATF2对脑的正常发育非常关键, 因为敲除ATF2的小鼠大脑发育异常, 同时

应用要点

本研究主要探讨过表达ATF2的胰腺癌细胞系Capan2在TGF- β 1的诱导下形成了典型的EMT, 为进一步研究胰腺癌的治疗提供了新的方向。

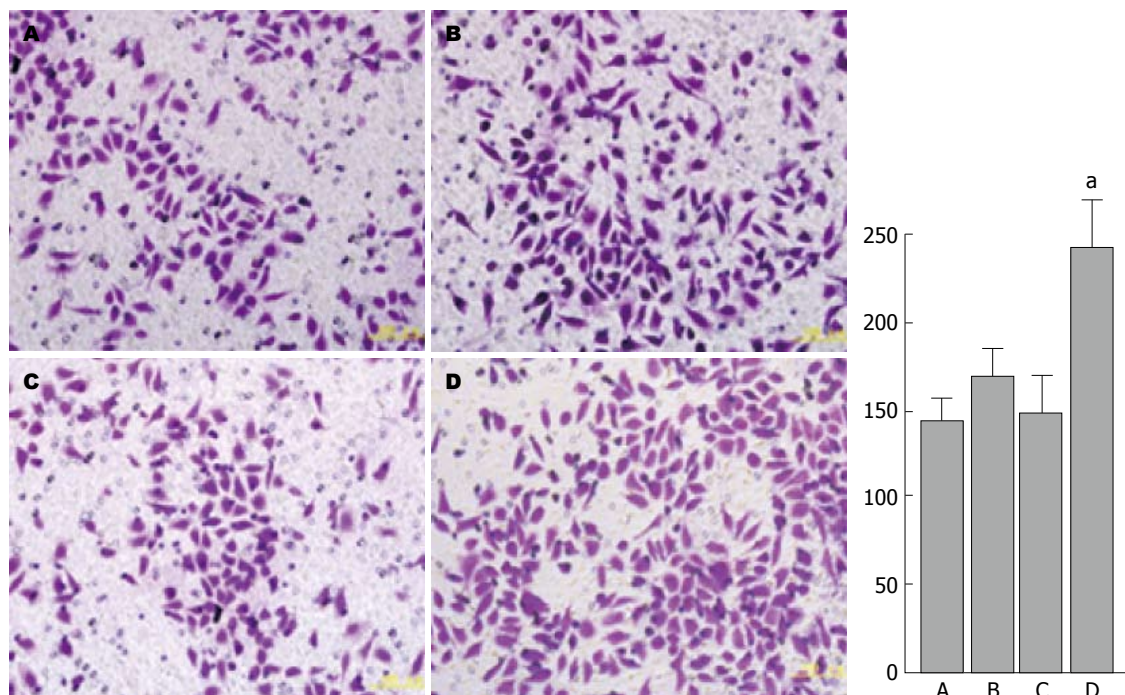


图3 不同转染组中Capan2细胞的transwell细胞侵袭实验对比。A: 空白对照组; B: 转染ATF2组; C: TGF- β 1诱导组; D: 转染ATF2联合TGF- β 1刺激组。^a $P < 0.01$ vs 空白对照组、转染ATF2联合TGF- β 1刺激组。

造成内耳、小脑及脑室的结构缺陷^[21]。在人结肠癌细胞系中加入托芬那酸(tolfenamic acid, TA)刺激后, 磷酸化的ATF2表达升高, 同时伴有ATF3的表达水平的升高。我们在前期研究中还发现作为AP-1类因子的抑制因子, JDP2可以逆转由TGF- β 1诱导产生的人胰腺癌Panc-1细胞系的EMT^[22]。而且ATF2的表达升高是通过P38 MAPK、JNK、ERK通路的激活来实现的^[23]。由上所述, ATF2极可能通过诸如ERK、JNK等通路与胰腺癌的EMT之间存在关联, 但是其确切机制目前研究仍是空白。

总之, 转染ATF2的胰腺癌Capan2细胞对TGF- β 1的诱导变得敏感, 产生EMT。由此可见, ATF2与胰腺癌的侵袭、转移密切相关, 将为胰腺癌的分子靶向治疗提供新的方向。

4 参考文献

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006; 56: 106-130
- Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 1988; 240: 1759-1764
- Glover JN, Harrison SC. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* 1995; 373: 257-261
- Bakin AV, Rinehart C, Tomlinson AK, Arteaga CL. p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGF β -mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J Cell Sci* 2002; 115: 3193-3206
- Wendt MK, Smith JA, Schiemann WP. Transforming growth factor- β -induced epithelial-mesenchymal transition facilitates epidermal growth factor-dependent breast cancer progression. *Oncogene* 2010; 29: 6485-6498
- Maseki S, Ijichi K, Tanaka H, Fujii M, Hasegawa Y, Ogawa T, Murakami S, Kondo E, Nakanishi H. Acquisition of EMT phenotype in the gefitinib-resistant cells of a head and neck squamous cell carcinoma cell line through Akt/GSK-3 β /snail signalling pathway. *Br J Cancer* 2012; 106: 1196-1204
- Giangreco A, Lu L, Vickers C, Teixeira VH, Groot KR, Butler CR, Ilieva EV, George PJ, Nicholson AG, Sage EK, Watt FM, Janes SM. β -Catenin determines upper airway progenitor cell fate and preinvasive squamous lung cancer progression by modulating epithelial-mesenchymal transition. *J Pathol* 2012; 226: 575-587
- Wang Z, Li Y, Ahmad A, Banerjee S, Azmi AS, Kong D, Sarkar FH. Pancreatic cancer: understanding and overcoming chemoresistance. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8: 27-33
- Thuaud S, Valcourt U, Petersen M, Manfioletti G, Heldin CH, Moustakas A. Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 2006; 174: 175-183
- Thuaud S, Tan EJ, Peinado H, Cano A, Heldin CH, Moustakas A. HMGA2 and Smads co-regulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2008; 283: 33437-33446
- 韩磊, 郭克建, 周文平, 陈希涛. Genistein对TGF- β 1诱导人胰腺癌细胞上皮-间质转化的作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2359-2363
- Shintani Y, Hollingsworth MA, Wheelock MJ, Johnson KR. Collagen I promotes metastasis in pancreatic cancer by activating c-Jun NH(2)-terminal

- kinase 1 and up-regulating N-cadherin expression. *Cancer Res* 2006; 66: 11745-11753
- 13 Nishioka R, Itoh S, Gui T, Gai Z, Oikawa K, Kawai M, Tani M, Yamaue H, Muragaki Y. SNAIL induces epithelial-to-mesenchymal transition in a human pancreatic cancer cell line (BxPC3) and promotes distant metastasis and invasiveness in vivo. *Exp Mol Pathol* 2010; 89: 149-157
 - 14 Torrisani J, Bournet B, Cordelier P, Buscail L. [New molecular targets in pancreatic cancer]. *Bull Cancer* 2008; 95: 503-512
 - 15 Mackenzie RP, McCollum AD. Novel agents for the treatment of adenocarcinoma of the pancreas. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009; 9: 1473-1485
 - 16 Furukawa T. Molecular pathology of pancreatic cancer: implications for molecular targeting therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: S35-S39
 - 17 Benbrook DM, Jones NC. Heterodimer formation between CREB and JUN proteins. *Oncogene* 1990; 5: 295-302
 - 18 van Dam H, Castellazzi M. Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene* 2001; 20: 2453-2464
 - 19 Berger AJ, Kluger HM, Li N, Kielhorn E, Halaban R, Ronai Z, Rimm DL. Subcellular localization of activating transcription factor 2 in melanoma specimens predicts patient survival. *Cancer Res* 2003; 63: 8103-8107
 - 20 Papassava P, Gorgoulis VG, Papaevangelidou D, Vlahopoulos S, van Dam H, Zoumpouris V. Overexpression of activating transcription factor-2 is required for tumor growth and progression in mouse skin tumors. *Cancer Res* 2004; 64: 8573-8584
 - 21 Mei Y, Yuan Z, Song B, Li D, Ma C, Hu C, Ching YP, Li M. Activating transcription factor 3 up-regulated by c-Jun NH(2)-terminal kinase/c-Jun contributes to apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *Neuroscience* 2008; 151: 771-779
 - 22 许元鸿, 刘哲, 郭克建. JDP2对TGF-β1诱导的人胰腺癌细胞系Panc-1上皮向间质转化的抑制作用. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 2931-2936
 - 23 Lee SH, Bahn JH, Whitlock NC, Baek SJ. Activating transcription factor 2 (ATF2) controls tolfenamic acid-induced ATF3 expression via MAP kinase pathways. *Oncogene* 2010; 29: 5182-5192

■同行评价

该论文设计合理, 实验数据及图表详实可靠, 方法具有一定创新性, 为临床治疗胰腺癌提供了很好的借鉴。

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成t_{1/2}或T_{1/2}¹, V_{max}不能V_{max}, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, *et Arn. var. glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{max}, C_{max}, V_d, T_{1/2} CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.