

· 论著 ·

氧化亚铜纳米粒对 B16 细胞上皮间质转化的影响

李现贵¹, 詹洁琼², 李新方¹, 余 岚¹, 马志强¹, 孙琳虹¹, 杨 峰¹ (1. 第二军医大学药学院无机化学教研室, 上海 200433; 2. 河北北方学院药学院, 河北 张家口 075000)

[摘要] **目的** 制备氧化亚铜纳米粒(cuprous oxide nanoparticles, CONPs)并研究对小鼠黑色素瘤 B16 细胞上皮间质转化的影响。**方法** 采用水热法制备氧化亚铜纳米粒。将 B16 细胞分为正常培养组和 CONPs (5、25、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)刺激培养组,于倒置相差显微镜下观察细胞形态学的变化,通过细胞划痕实验和 Transwell 检测 CONPs 对 B16 细胞迁移能力的影响,采用免疫荧光染色法和蛋白质印迹法检测 B16 细胞表型的相关分子标志物表达的变化。**结果** 合成的氧化亚铜纳米粒分布均匀,粒径约 40 nm;体外细胞实验发现 CONPs 明显地抑制了 B16 细胞的迁移和侵袭能力,并刺激 B16 细胞上皮细胞表型的 E-cadherin、Cytokeratin、Desmoplakin 的表达明显升高,而间质细胞表型的 N-cadherin、Vimentin 的表达降低。**结论** CONPs 能明显地抑制黑色素瘤细胞的侵袭转移和上皮-间质转化(EMT)过程。

[关键词] 氧化亚铜纳米粒;肿瘤侵袭转移;上皮间质转化;B16 细胞

[中图分类号] R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)03-0233-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.03.010

Cuprous oxide nanoparticles effect on the epithelial-mesenchymal transition of B16 cells

LI Xiangui¹, ZHAN Jieqiong², LI Xinfang¹, SHE Lan¹, MA Zhiqiang¹, SUN Linhong¹, YANG Feng¹ (1. Department of Inorganic Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmacy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

[Abstract] **Objective** To research the epithelial-mesenchymal transition (EMT) effects of cuprous oxide nanoparticles (CONPs) on melanoma. **Methods** Cuprous oxide nanoparticles were prepared hydrothermally. The B16 cells were cultured with cuprous oxide nanoparticles at different concentrations (5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The changes of the morphology of the B16 cell were observed under the inverted microscope. The effects of CONPs on B16 cell migration ability were detected through the Wound healing assay and the Transwell assay. Then cell immunofluorescence and western blotting were used to test the EMT related molecular markers, including E-cadherin, N-cadherin, Cytokeratin, and Vimentin. **Results** The synthesized cuprous oxide nanoparticles distribute uniformly with a diameter of 40 nm. Our study indicated that CONPs inhibited the EMT of B16 cell. A conversion process was discovered in this study. In B16 cells, CONPs inhibited B16 cell migration, promoted the expression of E-cadherin, Cytokeratin and Desmoplakin, while the expression of N-cadherin and Vimentin was repressed in protein level. **Conclusion** Cuprous oxide nanoparticles can significantly restrain the invasion and metastasis of melanoma cells and inhibit the EMT of B16 cells.

[Key words] cuprous oxide nanoparticles; invasion and metastasis of tumor; epithelial-mesenchymal transition; B16 cells

肿瘤转移是肿瘤临床治疗面临的最大挑战之一,目前仍然缺乏有效的防治肿瘤转移的方法和药物,因此,可抑制肿瘤转移的新药的发现及其作用机

制研究成为近年肿瘤研究领域的热点^[1,2]。肿瘤转移涉及过程复杂,目前认为肿瘤细胞的上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是其最重要机制之一^[3-5]。EMT 是指在特定生理病理情况下上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程,上皮细胞失去细胞极性和与基底膜的连接等上皮表型,从而获得较高的迁移与侵袭、抗凋亡和降解细胞外基质等间质细胞表型的能力^[6]。

本课题组前期研究发现氧化亚铜纳米粒(cu-

[基金项目] 国家自然科学基金项目(21401214);第二军医大学青年启动基金项目(2013QN03)

[作者简介] 李现贵,硕士研究生,研究方向:无机纳米材料. Email: 1194288028@qq.com

[通讯作者] 杨 峰,副教授,硕士生导师,研究方向:无机纳米材料. Email: yangfeng1008@126.com

prous oxide nanoparticles, CONPs)可以显著降低黑色素瘤荷瘤小鼠模型中的肺部转移结节数,表现出良好的抗肿瘤转移效果^[7,8]。Song等^[9]的研究也表明 CONPs 能通过下调血管内皮生长因子受体2的表达抑制血管生成,推测其抑制肿瘤转移的作用可能与抑制血管生成有关。为了进一步研究 CONPs 抑制黑色素瘤转移的机制,我们选用小鼠黑色素瘤 B16 细胞作为研究对象,观察 CONPs 对 B16 细胞的迁移能力和 EMT 过程的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 小鼠黑色素瘤细胞(B16细胞)(由第二军医大学医学免疫学国家重点实验室惠赠),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司),DMEM 培养基(Hyclone,美国 Thermo 公司),胎牛血清(FBS)、0.25% 胰蛋白酶溶液(Gibco-Invitrogen™,美国 Life Technologies Corporation 公司),E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 等抗体(艾博抗上海贸易有限公司),山羊抗鼠、山羊抗兔荧光标记 IgG(美国 LICOR 公司)。Odyssey 双色红外荧光成像扫描仪(美国 LICOR 公司),酶标仪(美国博腾仪器有限公司),OLYMPUS IX73 倒置荧光显微镜(上海外海生物科技有限公司),倒置显微镜(Nikon Elipse TS100,上海衡浩仪器有限公司),台式超速离心机(Centrifuge5424,Hitachi 公司),恒温振荡培养箱(Thermo Fisher Scientific 公司)。其他为实验室常用试剂与仪器。

1.2 实验方法

1.2.1 CONPs 的制备及表征 参照文献^[10]的合成方法,在试管中加入 3 ml 0.1 mol/L 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)溶液,27℃ 搅拌下加入 0.35 ml 的 0.1 mol/L CuSO₄ 溶液,再加入 10 ml 0.04 mol/L 的 NaBH₄ 溶液还原,搅拌 17 h 左右,用去离子水和乙醇离心洗涤各 3 次,干燥后于 4℃ 保存。采用透射电镜对其尺寸及外观形态进行表征。

1.2.2 细胞培养 小鼠黑色素瘤 B16 细胞在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下,在含 10% FBS、1% 双抗(青霉素和链霉素)的 DMEM 高糖型培养基中培养。待细胞生长至对数生长期,即用胰蛋白酶消化进行传代。

1.2.3 CONPs 对 B16 细胞形态的影响 将 B16 细胞接种入六孔板中(2×10⁵个/孔),待细胞生长到对数生长期时,分别加入终浓度为 0、5、25、50 μg/ml 的 CONPs 共孵育 24 h,倒置显微镜下观察细胞形态的变化,并拍照记录。

1.2.4 细胞划痕实验 取对数生长期的 B16 细胞经胰蛋白酶消化后以 2×10⁵个/孔的密度接种到六孔板中,待细胞生长到 80% 左右进行划痕实验:用 10 μl 枪头于六孔板正中部位均匀划 3 条平行直线使细胞脱落,PBS 洗脱落细胞 2 遍后,置于细胞培养箱中培养,分别于划痕后 0、24、36 h 于倒置显微镜下观察细胞的迁移情况并进行拍照。

1.2.5 Transwell 迁移实验 取对数生长期的 B16 细胞经胰蛋白酶消化后用无血清培养基重悬细胞以 5×10³个/孔的密度接种到 Transwell 小室中,同时加入不同浓度的 CONPs 共培养;下室加入 600 μl 含 10% 胎牛血清的培养基。培养 24 h 后,4% 多聚甲醛固定 15 min,结晶紫染色 15 min,用棉签擦除小室内细胞,于倒置显微镜下观察并拍照记录。

1.2.6 免疫荧光染色法 取对数生长期的 B16 细胞经胰蛋白酶消化后以 3×10⁵个/孔的密度接种到六孔板中预置的圆形细胞爬片上。待细胞生长至 70% 左右时加入 CONPs 共培养 24 h 后弃去原培养基,用 PBS 清洗 2 遍,分组培养 24 h 后,取出爬片。然后用 PBS 缓冲液漂洗两遍,室温下用 4% 多聚甲醛固定 15 min。制备湿盒,倒置法室温孵育一抗(1:100)4 h 后用 PBS 洗涤 4 次,相同方法孵育荧光二抗 30 min,PBS 洗涤用含 5% 的 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)的甘油封片。于倒置荧光显微镜下观察并拍照记录。

1.2.7 蛋白质印迹法 取对数生长期的 B16 细胞经胰蛋白酶消化后以 2×10⁵个/孔的密度接种到六孔板中,待细胞生长至对数期时分组培养 24 h,收集 B16 细胞于冰上裂解,4℃ 下 12 000 r/min 离心 5 min,收集上清液,BCA 法测定蛋白浓度。之后取处理后的蛋白样品 20 μg 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),湿转法转膜。膜采用 1% 脱脂牛奶封闭 4 h 后用 PBS 缓冲液洗涤 3 遍,分别加入适量的一抗(1:1 000)孵育 3 h,然后用 PBST 洗 3 遍;再加入适量荧光二抗(1:10 000)避光孵育 30 min,用 PBST 洗涤 3 遍后放入 PBS 缓冲液中,等待上机扫描采集数据。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本均数差的多重比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 CONPs 的制备及表征 图 1 为 CONPs 的透射电镜图,可以观察到其分布均匀、分散性较好,呈球形,平均粒径约为 40 nm,与前期实验室制备表征

的 CONPs 符合^[7,8]。

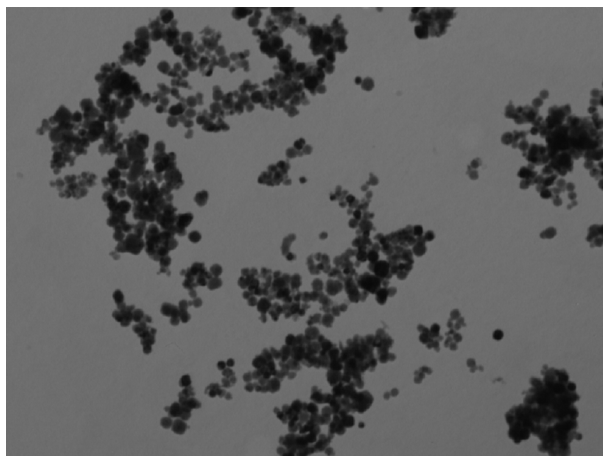


图1 CONPs的透射电镜图(×50 000)

2.2 CONPs 处理对 B16 细胞形态的影响 采用不同浓度的 CONPs 刺激 B16 细胞 24 h 后于倒置显微镜下观察细胞形态的变化。图 2 为 CONPs 处理 24 h 后 B16 细胞形态图,从图中可以观察到,未经

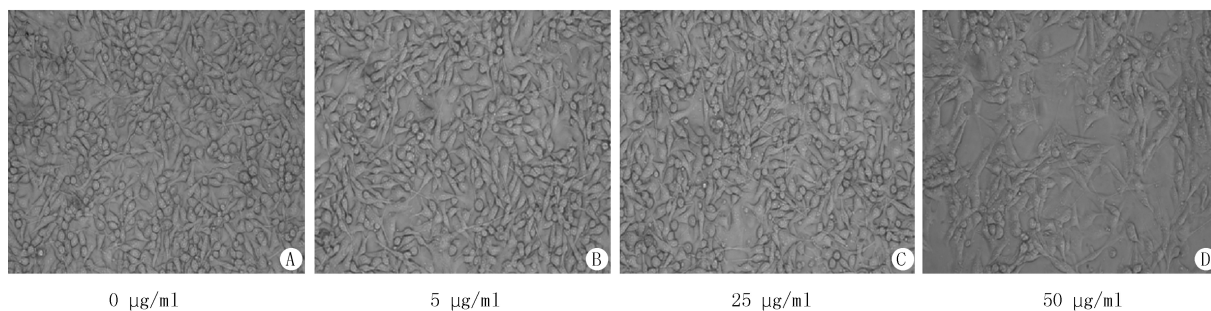


图2 CONPs 作用 24 h 后 B16 细胞的形态(×100)

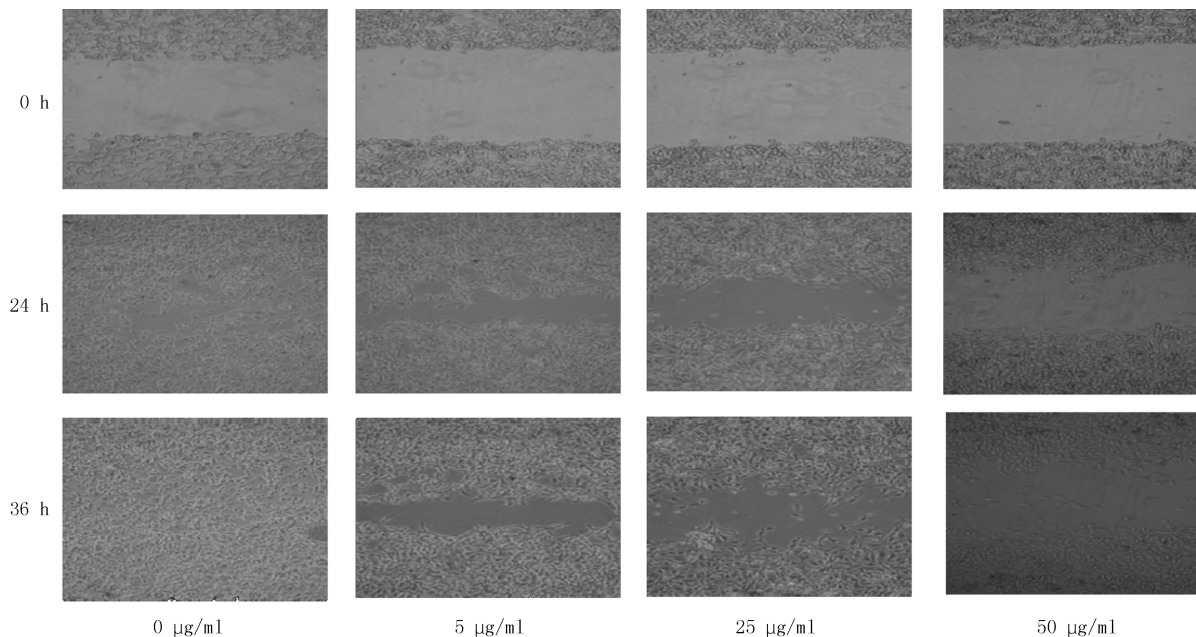


图3 CONPs 作用 24 h/36 h 后 B16 细胞划痕实验结果(×100)

CONPs 处理的细胞拉长呈梭形、纺锤体形,多数细胞表现为似成纤维状,细胞排列较为杂乱松散,表现出间质细胞表型特点。随着 CONPs 浓度的增加细胞形态由长梭形逐渐地变成规则的多边形或立方形,细胞连接紧密分布呈“铺路石样”,表现出典型的上皮细胞形态特征。

2.3 细胞划痕实验 细胞划痕修复实验结果(图 3)显示在划痕 24 h 后未经 CONPs 处理的细胞划痕已经逐渐变小至接近愈合的状态,到 36 h 后已经完全愈合,而 CONPs 处理组的细胞划痕随着 CONPs 浓度的增大而相应的变宽。其中高浓度处理组的细胞划痕最大,细胞划痕的修复能力最弱,说明 CONPs 抑制了 B16 细胞的增殖和迁移。

2.4 Transwell 迁移实验 Transwell 迁移实验结果(图 4)显示,CONPs 共培养 24 h 后,随着 CONPs 浓度的增加,B16 细胞迁移的数量明显地减少,与对照组相比 CONPs 处理组具有显著性差异,表明 CONPs 明显地抑制了 B16 细胞的转移。

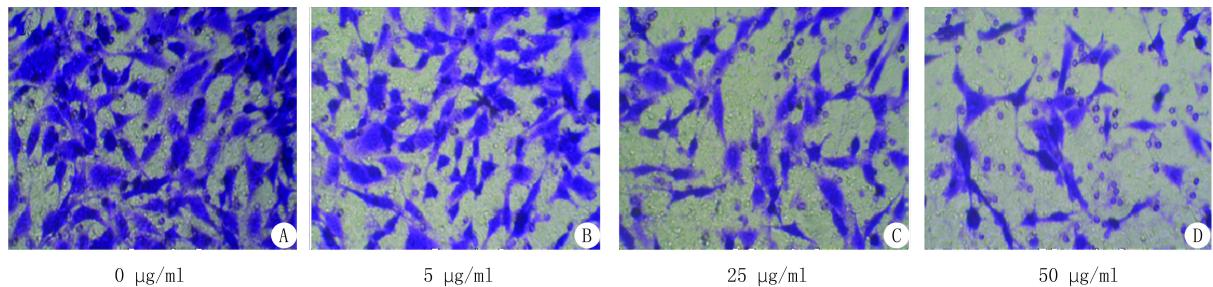


图4 CONPs作用24 h后对B16细胞迁移能力的影响($\times 200$)

2.5 细胞免疫荧光 细胞免疫荧光结果(图5)显示,CONPs处理24 h后,E-cadherin、Cytokeratin、N-cadherin、Vimentin蛋白表达发生了变化。随着CONPs浓度的增加,表征上皮细胞表型的E-cadherin、Cytokeratin的表达上调,而显示间质细胞表型特征的N-cadherin、Vimentin蛋白表达下调,说明CONPs的处理导致了B16细胞间质细胞标志物表达下调而上皮细胞标志物的表达上调,CONPs可

抑制B16细胞的EMT转化的发生。

2.6 蛋白免疫印迹实验 蛋白免疫印迹实验结果(图6)显示,随着CONPs浓度的增加表征上皮细胞表型的E-cadherin、Desmoplakin及Cytokeratin蛋白表达逐渐增加,而具有间质细胞表型特点的N-cadherin、Vimentin蛋白表达下调,这与细胞免疫荧光结果一致,说明CONPs处理抑制了B16细胞的EMT转化。

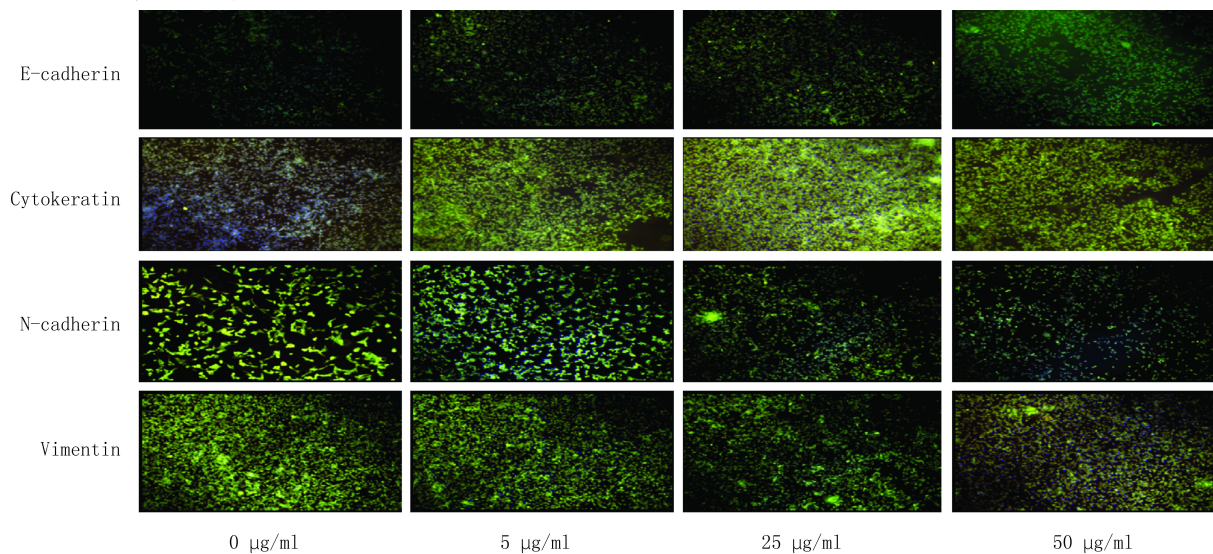


图5 免疫荧光法测定CONPs对B16细胞上皮间质分子标志物表达的影响($\times 100$)

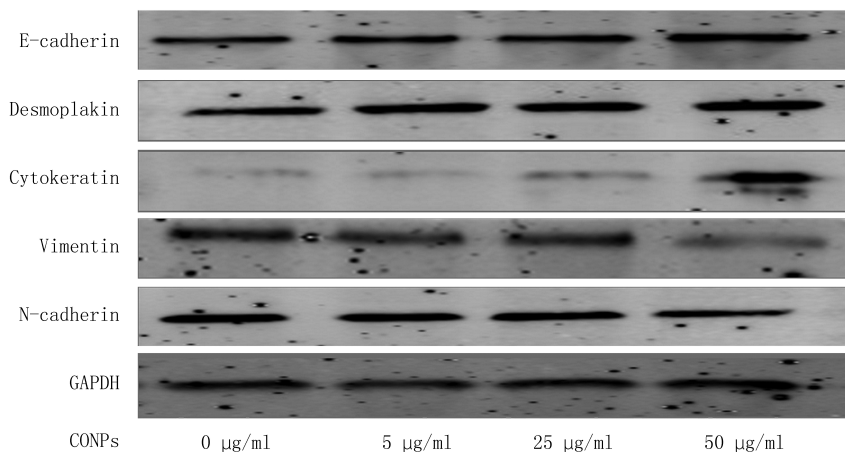


图6 蛋白免疫印迹法测定CONPs对B16细胞上皮间质分子标志物表达的影响

3 讨论

目前恶性肿瘤的死亡率已超过心脑血管疾病成为人类的第一杀手。肿瘤的侵袭和转移是造成恶性肿瘤患者难以治疗及康复的关键性因素^[1,2],肿瘤转移的机制主要有肿瘤遗传异质性、EMT、失巢凋亡抗性、血管与淋巴管生成等,其中 EMT 被认为是肿瘤转移和进一步恶化的重要机制之一^[11],其在肿瘤转移中的作用已在实验动物模型中得到证实。肿瘤细胞发生 EMT 后,失去细胞极性,细胞间连接松散杂乱,具有较强的侵袭迁移和抗凋亡的能力,细胞形态也由排列紧密规则的多边形或立方形的“铺路石样”变成似成纤维状的梭形或纺锤体形。在这个过程中,细胞标志物也发生了相应的变化,上皮细胞标志分子(E-cadherin、Desmoplakin 和 Cytokeratin)在蛋白水平上表达上调而间质细胞标志分子(N-cadherin 和 Vimentin)在蛋白水平上表达下调;在一定的条件下,CONPs 也能抑制肿瘤细胞的 EMT 过程,使得肿瘤细胞失去间质细胞特征,获得上皮细胞特点从而发生间质-上皮转化(mesenchymal-epithelial transition, MET)^[12,13]。

我们的实验结果显示,CONPs 能明显地抑制小鼠黑色素瘤 B16 细胞的增殖,并抑制 B16 细胞的 EMT 过程的发生。CONPs 作用后使得 B16 细胞由似成纤维状、部分细胞呈典型的梭形、纺锤体形等间质细胞形态特点转变为排列紧密、呈多边形的细胞形态,具有典型的上皮细胞特点,从形态学上说明了 CONPs 处理后小鼠黑色素瘤 B16 细胞发生了倾向 MET 样的转化。细胞免疫荧光和蛋白免疫印迹实验结果也进一步验证了 CONPs 抑制了 B16 细胞的 EMT 过程。

综上所述,CONPs 作为潜在的新型无机纳米药物,能明显地抑制小鼠黑色素瘤 B16 细胞的 EMT 过程和抑制肿瘤的侵袭转移。然而肿瘤转移是一个多阶段、多因素参与的复杂过程,其相关机制的阐明还需要进一步的试验研究。

【参考文献】

- [1] Wan L, Pantel K, Kang Y. Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic [J]. *Nat Med*, 2013, 19(11):1450-1464.
- [2] Torzilli PA, Bourne JW, Cigler T, et al. A new paradigm for mechanobiological mechanisms in tumor metastasis [J]. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22(5-6):385-395.
- [3] Rhim AD, Aiello NM, Mirek ET, et al. Abstract IA5: EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. [J]. *Cancer Res*, 2014, 72(14 Supplement):IA5-IA5.
- [4] Thomas N, Seyfried, Huysentruyt LC. On the origin of cancer metastasis [J]. *Crit Rev Oncog*, 2013, 18(1-2):43-73.
- [5] Foroni C, Broggin M, Generali D, et al. Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: role, molecular mechanisms and clinical impact [J]. *Cancer Treat Rev*, 2012, 38(6):689-697.
- [6] Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells [J]. *J Cell Biol*, 1982, 95:333-339.
- [7] Wang Y, Yang F, Zhang HX, et al. Cuprous oxide nanoparticles inhibit the growth and metastasis of melanoma by targeting mitochondria [J]. *Cell Death Dis*, 2012, 4(8):3133-3145.
- [8] Wang Y, Zi XY, Su J, et al. Cuprous oxide nanoparticles selectively induce apoptosis of tumor cells [J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7:2641-2652.
- [9] Song H, Wang W, Zhao P, et al. Cuprous oxide nanoparticles inhibit angiogenesis via down regulation of VEGFR2 expression [J]. *Nanoscale*, 2014, 6:3206-3216.
- [10] Wen JQ, Cheng ZH, Li QC. Cuprous oxide nanospheres as probes for light scattering imaging analysis of live cells and for conformation identification of proteins [J]. *Talanta*, 2010, 80(3):1400-1405.
- [11] 王杰军, 应明真. 恶性肿瘤的转移机制与治疗策略 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(4):305-310.
- [12] 李爱明, 赵惠民, 揭俊卿. 芒柄花黄素对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖及上皮间质转化的抑制作用 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2015, 6(6):481-486.
- [13] 解 昆, 王剑松, 肖民辉, 等. MicroRNA-143 通过抑制 EMT 机制延缓膀胱癌演进 [J]. *求医问药(学术版)*, 2012, 2(2):8-10.

[收稿日期] 2015-12-21 [修回日期] 2016-07-29
[本文编辑] 顾文华

(上接第 232 页)

- [14] 刘师兵, 陈 君, 吴少花, 等. 杨梅素诱导 HeLa 细胞凋亡的形态学研究 [J]. *吉林医药学院学报*, 2015, 36(6):418-421.
- [15] Shih YW, Wu PF, Lee YC, et al. Myricetin suppresses invasion and migration of human lung adenocarcinoma A549 cells;

possible mediation by blocking the ERK signaling pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(9):3490-3499.

[收稿日期] 2017-02-03 [修回日期] 2017-03-28
[本文编辑] 顾文华