论著

文章编号:1000-5404(2005)17-1722-03

大鼠胶质瘤细胞系C6趋化因子受体CXCR4和甲酰肽受体FPR的表达

陈剑鸿[1],卞修武[1],杨世昕[1],王吉民[2] ([1]第三军医大学西南医院病理科,重庆 400038, [2]Laboratory of Molecular Immunoregulation, Center for Cancer Research, National Cancer Institute at Frederick, National Institute of Health, USA)

提 要: 目的 观测大鼠源性胶质瘤细胞系C6趋化细胞因子受体CXCR4和甲酰化肽受体(formyl peptide receptor, FPR)的表达水平并探讨其与瘤细胞分化和血管生成的关系。**方法** 传代培养大鼠源性胶质瘤细胞系C6,采用免疫细胞化学方法检测CXCR4和FPR表达,并对细胞分化标记物胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和波形蛋白(vimentin)以及血管内皮生长因子(VEGF)表达水平进行检测。**结果** C6细胞呈长梭形,突起细长,GFAP表达较强,vimentin呈强表达。该细胞高表达CXCR4和FPR,并呈VEGF强阳性。**结论** C6细胞分化程度低,其高表达的趋化因子受体CXCR4和FPR可能与胶质瘤血管生成有密切关系。

关键词: 胶质瘤;化学趋化因子受体;细胞分化;血管生成因子

中图法分类号: R392.11; R394.3; R730.264 **文献标识码**: A

Expression of chemokine CXCR4 and formyl peptide receptor FPR in rat C6 glioma cell line

CHEN Jian-hong[1], BIAN Xiu-wu[1], YANG Shi-xin[1], WANG Ji-min[2] ([1]Department of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China, [2]Laboratory of Molecular Immunoregulation, Center for Cancer Research, National Cancer Institute at Frederik, National Institute of Health, USA)

Abstract: Objective To detect the expression of chemoattractant receptors, CXCR4 and formyl peptide receptor (FPR), in rat glioma cell line C6 and to explore their relation to tumor differentiation and angiogenesis. **Methods** The expression of CXCR4 and FPR by C6 cells were detected with immunocytochemistry. The differentiatial degrees were also detected to analyze the relationship of chemoattractant receptors with angiogenesis and malignancy of glioma. **Results** C6 cells were of a long spindle shape, expressing high level of vimentin but relatively low level of glial fibrillary acidic protein (GFAP). C6 cells were positive for CXCR4 and FPR in the cytoplasm and strongly positive for vascular endothelial growth factor (VEGF). **Conclusion** C6 cell line is poorly differentiated and highly expresses chemoattractant receptors CXCR4 and FPR, both of which might be related to the angiogenic potentials.

Key words: glioma; chemoattractant receptor; cell differentiation; angiogenic factor

趋化因子及其受体如CXCR4不仅在炎症中诱导白细胞的浸润,而且越来越多的研究表明它们在肿瘤侵袭和血管生成机制中也十分重要[1,2]。我们新近的研究发现,CXCR4和甲酰化肽受体(formyl peptide receptor, FPR)在肿瘤转移和血管生成中起重要作用[3,4]。恶性胶质瘤具有明显的浸润生长和富于血管的特性[5],但胶质瘤细胞趋化因子受体表达与其分化程度和血管生成因子之间的关系尚不清楚。本研究以国内外常用的大鼠胶质瘤细胞系为材料,检测其分化程度、趋化因子受体CXCR4和FPR的表达水平及其与血管生成因子之间的关系,探讨趋化因子受体在胶质瘤细胞恶性生物学特性中的意义。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

C6细胞引自美国典型培养物中心(American Type Culture Collection, ATCC),来源于大鼠实验性胶质瘤。用含10%小牛血清的DMEM完全培养基置37 ℃、5% CO_2混合气体的孵箱(相对湿度为95%)中培养。细胞换液时间为2~3 d,传代3~5 d,传代前用0.25%胰蛋白酶消化2~5 min。细胞生长于24

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270526, 30370552),国际抗癌联盟(UICC)资助项目(0661/2002)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270526, 30370552) and the Fund from International Union Against Cancer (0661/2002)

作者简介:陈剑鸿(1970-),女,贵州省六盘水市人,博士研究生,主管药师,主要从事抗癌药物方面的研究。电话:(023)68754438

通讯作者:卞修武,电话:(023)68752247,E-mail: bianxiuw@263.net

收稿日期:2004-07-25;**修回日期**:2004-11-15

孔培养板或直径 35 mm 培养皿中的盖玻片上，待细胞接近长满盖玻片时（约传代后 48 h），取出盖玻片，10% 中性甲醛固定 20 min，自然晾干，备用。

1.2　常规 HE 染色及免疫细胞化学染色

将上述盖玻片用玻璃笔一分为 4，其中 1 小张用于 HE 染色，其余作免疫组化染色。免疫组化所用一抗包括兔抗人抗胶质纤维酸性蛋白（GFAP）多克隆抗体（美国 Biogenex 公司，1∶1 000）、小鼠抗人波形蛋白（vimentin）单克隆抗体（美国 Biogenex 公司，1∶1 000）、小鼠抗人 CXCR4 单克隆抗体（美国 Sigma-Aldrich 公司，1 μg/ml）、小鼠抗人 N-甲酰化肽受体 FPR（美国 Santa Cruz Biotechnology 公司，1∶50）、鼠抗人 VEGF 单克隆抗体（美国 Sigma 公司，1∶200）。所用二抗分别为生物素化抗兔或抗小鼠 IgG，Envision^{+TM}（DAKO 公司）。染色前细胞先经 1% Triton X-100 处理 10 min。常规免疫组化染色方法检测趋化因子受体 CXCR4 和 FPR 的表达水平，DAB-H_2O_2（美国 DAKO 公司）显色，常规封片。按常规分别设立阳性对照、阴性对照和替代实验。光镜观察目标细胞免疫染色情况，按明显阳性的细胞比例进行半定量：+，阳性标记率≤10%；++，阳性标记率≤50%；+++，阳性标记率≤75%。++++，阳性标记率≥75%。

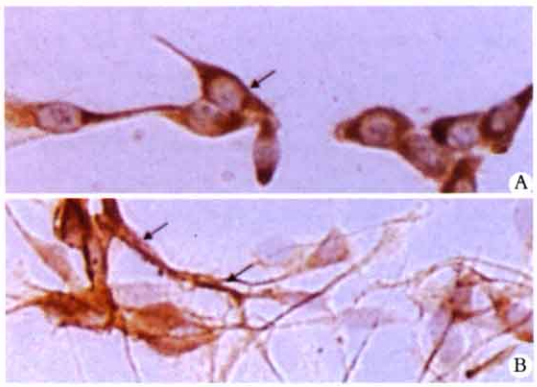
2　结果

2.1　形态学观察

C6 细胞接种后贴壁快，约 1 h 后即由圆形变为小星芒状，细胞体小，突起细而很长；细胞生长速率快。HE 染色见 C6 细胞胞质突起细长，双极性；核大深染，呈圆形和椭圆形，染色质丰富，分裂象易见。

2.2　免疫细胞化学染色结果

阳性细胞呈现胞浆棕黄色着染（胞核苏木精复染），其中 GFAP 和 vimentin 阳性定位于胞体和胞突部分的胞质，GFAP 呈弱阳性，vimentin 和 VEGF 呈强阳性反应（图 1）。CXCR4 和 FPR 阳性反应以胞体胞质和胞膜为主。大部分 CXCR4 染色呈强阳性（图 2），阳性定位于胞质和胞膜；FPR 染色也呈阳性（图 3），定位与 CXCR4 相似。半定量结果见表 1。



Arrow indicates positive reaction in the cytoplasm and cellular process

图 1　C6 细胞呈现 vimentin（A）和 VEGF（B）表达（Envision^{+TM} 免疫染色 ×400）

Fig 1　Vimentin（A）and VEGF（B）expression by C6 cells（Envision^{+TM} system ×400）

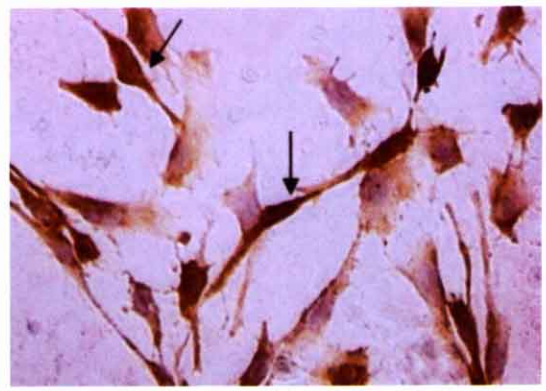


图 2　C6 细胞呈现 CXCR4 表达（箭头所示）（Envision^{+TM} 免疫染色 ×400）

Fig 2　CXCR4 expression by rat C6 cells indicated with arrow（Envision^{+TM} system ×400）



图 3　C6 细胞表达 FPR（箭头所示）（Envision^{+TM} 免疫染色 ×400）

Fig 3　FPR expression by rat C6 cells indicated by arrow（Envision^{+TM} system ×400）

表 1　C6 细胞系表达中间丝蛋白、血管生成因子和趋化因子受体情况

Tab 1　Expression of intermediate filament proteins, angiogenic factor and chemoattractant receptors by C6 cell line

Expressed proteins	GFAP	vimentin	CXCR4	FPR	VEGF
Expression levels	++	++++	+++	++++	+++
Localization of expression	Pl and Pr	Pl and Pr	Cm and Pl	Cm and Pl	Pl and Pr

Pl: cellular plasm; Pr: cellular process; Cm: cytoplasmic membrane

3　讨论

3.1　关于 C6 细胞的分化程度

C6 胶质瘤细胞是经 N-亚硝基甲脲诱发的大鼠脑胶质瘤细胞，是国际上通用的胶质瘤细胞系，它与人类脑胶质母细胞瘤病理特征一致，常作为人们研究胶质瘤良好的细胞模型。

GFAP 与 vimentin 是两种中间丝蛋白。其中，GFAP 是脑星形细胞中间丝的结构蛋白，也是该细胞的特异性分化标志物。vimentin 主要存在于间充质来源的细胞，也广泛存在于多种非间充质细胞，尤其是体外培养的细胞中。已有研究证明，GFAP 与 vimentin 在星形细胞发育和分化阶段的表达具有一定的时空顺序，即在星形细胞分化成熟中，GFAP 的表达逐渐增高，vimentin 表达逐渐减少。在中枢神经组织损伤、胶质瘤发生时，这种表达发生改变。

GFAP 与 vimentin 具有很高的共同表达率，可共同表达于同一细胞内，在同一中间丝上以共聚体（copolymers）的形式存在，二者的表达水平在星形细胞肿瘤分化和恶变过程中呈现相反的趋势[6,7]。本研究以这两种中间丝蛋白为分化标记物，检测了 C6 胶质瘤细胞的分化程度。结果显示，C6 细胞系的细胞突起多而细，呈现 vimentin 高表达，GFAP 表达相对较弱，表明其恶性程度较高。

3.2 胶质瘤细胞趋化因子受体表达及其意义

已有的资料提示，趋化因子及其受体与肿瘤的发生和发展过程存在密切关系[3,8]。趋化因子与其受体结合后可促进肿瘤细胞增殖、迁移和血管生成，也有部分趋化因子与其受体结合呈现相反的作用。研究肿瘤趋化因子受体的表达成为目前探讨肿瘤侵袭和血管生成的热点之一。

胶质瘤组织中的浸润细胞和瘤细胞均表达多种趋化因子，其中 SDF-1（CXCL12）与其受体 CXCR4 结合，产生生物效应。在人脑原位组织，恶性胶质瘤细胞高表达 CXCR4 受体，而低恶性程度的少突胶质细胞瘤表达 CXCR2。但有些恶性胶质瘤细胞系可不表达 CXCR4，如 T98G。CXCR4 是一种 G 蛋白耦联的 7 次跨膜受体，研究表明，CXCR4 表达于 T 细胞、单核细胞和中性粒细胞，能够介导这些细胞的趋化作用。这些蛋白在胶质瘤中的生物学特征还不清楚，但可以认为它们可能与胶质瘤细胞的恶性程度有关。最近发现多形性胶质母细胞瘤存在 CXCR4 上调表达，该受体受到抑制后会妨碍细胞在体外的增殖，同时 Rubin 等实验结果显示，CXCR4 活化后可引起其下游分子激活，促进细胞存活、增殖和迁移。采用 CXCR4 的小分子拮抗物 AMD3100 可通过增加瘤细胞凋亡、减少瘤细胞增殖，抑制颅内胶质母细胞瘤和髓母细胞瘤异种移植瘤的生长。我们近来的研究也显示，CXCR4 激活后可上调瘤细胞 VEGF 产生，促进血管生成。这些结果提示 CXCR4 可能是恶性胶质瘤的一个治疗靶点[9,10]。

甲酰化肽（formyl peptides）是炎症和免疫反应时多形核白细胞的趋化物，它与两种不同的 G 蛋白耦联受体即甲酰化肽受体（formyl peptide receptor，FPR）和低亲和性甲酰肽受体样 1（the low affinity formyl peptide receptor-like-1，FPRL1）结合，启动信号转导，引起细胞激活和迁移[11]。我们证明了它在人恶性胶质瘤中具有促进增殖和诱导血管生成作用[4]。本研究结果显示，来源于实验性大鼠胶质瘤的 C6 细胞表达有 FPR，并与 VEGF 表达呈现一致性，提示 FPR 可能在恶性胶质瘤的血管生成因子表达及其促发的血管生成中有重要作用。但这一结果的意义尚待进一步研究。

参考文献：

[1] Balkwill F. Chemokine biology in cancer[J]. Semin Immunol, 2003, 15(1): 49-55.

[2] Zhou Y, Larsen P H, Hao C, *et al*. CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival[J]. J Biol Chem, 2002, 277(51): 49481-49487.

[3] Hu J Y, Deng X, BIAN X W, *et al*. The expression of functional chemokine receptor CXCR4 is associated with the metastatic potential of human nasopharyngeal carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(13): 4658-4665.

[4] Zhou Y, Bian X W, Le Y, *et al*. Formylpeptide receptor FPR and the rapid growth of malignant human gliomas[J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(11): 823-835.

[5] Bian X W, Chen J H, Jiang X F, *et al*. Angiogenesis as an immunopharmacologic target in inflammation and cancer[J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4(12): 1537-1547.

[6] 卞修武. 胶质纤维酸性蛋白基因调控及其在胶质瘤诱导分化中的作用[J]. 中华病理学杂志, 1999, 28(3): 222-223.

[7] Rutka J T, Murakami M, Dirks P B, *et al*. Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review[J]. J Neurosurg, 1997, 87(3): 420-430.

[8] Fu H, Dahlgren C, Bylund J. Subinhibitory concentrations of the deformylase inhibitor actinonin increase bacterial release of neutrophil-activating peptides: a new approach to antimicrobial chemotherapy[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(8): 2545-2550.

[9] Le Bon B, Van Craynest N, Daoudi J M, *et al*. AMD3100 conjugates as components of targeted nonviral gene delivery systems: synthesis and *in vitro* transfection efficiency of CXCR4-expressing cells[J]. Bioconjug Chem, 2004, 15(2): 413-423.

[10] Rubin J B, Kung A L, Klein R S, *et al*. A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(23): 13513-13518.

[11] VanCompernolle S E, Clark K L, Rummel K A, *et al*. Expression and function of formyl peptide receptors on human fibroblast cells[J]. J Immunol, 2003, 171(4): 2050-2056.

（编辑 王 红）