文章编号:1000-5404(2012)07-0589-04

论著

细胞外 ATP 对 U87 胶质瘤细胞生长和侵袭的作用

王 晖,冯 华,陈图南,赵明月,李 博,李 飞 (400038 重庆,第三军医大学西南医院神经外科,全军神经系统疾病微创诊治专科中心,全军神经外科神经创伤防治重点实验室)

[摘要] **目的** 观察细胞外三磷酸腺苷(adenosine Triphosphate, ATP)对体外培养的 U87 人脑胶质瘤细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响。**方法** 采用 MTT 法检测不同浓度细胞外 ATP 对 U87 胶质瘤细胞增殖的影响;以相同条件下不加 ATP 作为对照组,以加入 100 μmol/L ATP 作为处理组,采用 Transwell 细胞侵袭实验检测 100 μmol/L 细胞外 ATP 对 U87 胶质瘤细胞侵袭能力的影响;用时间显微镜动态观察 100 μmol/L 的 ATP 作用下 U87 胶质瘤细胞的迁移情况。**结果** 高浓度(5 000 μmol/L)细胞外 ATP 对 U87 胶质瘤细胞增殖有显著抑制作用,较低浓度(50、100、500 μmol/L)细胞外 ATP 对 U87 胶质瘤细胞增殖无明显影响,5 000 μmol/L ATP 组与其他浓度组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);Transwell 侵袭实验中,处理组细胞跨膜细胞数为(163.83±17.81)明显多于对照组(89.83±13.27)($P<0.01$);迁移实验中,处理组细胞运动速度为(163.83±17.81)μm/h ,对照组细胞运动速度为(89.83±13.27)μm/h,2 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 100 μmol/L 的细胞外 ATP 对体外培养的 U87 胶质瘤细胞的侵袭和迁移具有明显促进作用。

[关键词] ATP;胶质瘤;侵袭;迁移
[中图法分类号] R730.23; R730.264 [文献标志码] A

Extracellular adenosine triphosphate improves growth and invasion of U87 glioma cells

Wang Hui, Feng Hua, Chen Tunan, Zhao Mingyue, Li Bo, Li Fei(Department of Neurosurgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objectives To determine the effect of extracellular adenosine triphosphate (ATP) on the growth and invasion of U87 glioma cells *in vitro*. Methods Cell counting kit-8 was used to detect the proliferation in U87 cells after the treatment of ATP at different concentrations of 0, 50, 100, 200, 500 and 5 000 μmol/L. Invasion and migration of U87 cells with 100 μmol/L ATP treatment were examined by Transwell and Time microscopy. Results The proliferation of U87 glioma was inhibited obviously by high concentration of ATP (5 000 μmol/L). However, there was no significant impact on the proliferation in U87 cells by a lower amount of extracellular ATP (50, 100 and 500 μmol/L). The invasion and migration ability of U87 cells were significantly enhanced by the using of 100 μmol/L ATP. Conclusion Extracellular ATP can significantly enhance the ability of invasion and migration in U87 cells.

[**Key words**] adenosine triphosphate; glioma; invasion; migration

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2010CB529403). the "Eleventh Five-year Plan" of National Key Technology R&D Program (2007DAI05D08) and the National Natural Science Foundation of China (30973494). Corresponding author: Li Fei, Tel: 86-23-68765265, E-mail: ffeifly7887@yahoo.com.cn

脑胶质细胞瘤是人类恶性肿瘤之一,其侵袭性生长是其难治性的重要原因之一,由于肿瘤常侵袭到重要的脑功能区,手术切除有限,其预后差,诊断后 5 年生存率不足 10%[1-2],恶性胶质瘤患者的平均生存期<1 年,2 年生存率不超过 20%[3]。因此,了解脑胶质瘤侵袭和迁移的机制对于指导肿瘤的治疗有重要的意义。肿瘤的侵袭和迁移是一个多步变化的过程,首先是细胞与细胞间黏合的减少、细胞自主运动性的增强,随后是细胞向别处的转移过程[4]。三磷酸腺苷(adenosine Triphosphate, ATP)作为中枢神经系统中不可缺少的能量物质以及参与新陈代谢外,其受体构成的信号通路还参与了细胞的增生、迁移、分化、死亡以及突触的神经传递过程[5-6]。而且,在细胞处于神经传递、低渗透压、肿瘤细胞坏死、甚至在胶质瘤细胞在生长过程中对胶质细胞的毒性作用和破坏均可以导致 ATP

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划("973"计划,2010CB529403);"十一五"国家科技支撑计划(2007DAI05D08);国家自然科学基金(30973494)
[通信作者] 李 飞,电话:(023)68765265,E-mail: ffeifly7887@yahoo.com.cn

的释放,因此胶质瘤所处微环境中 ATP 浓度的升高[7-8]。本研究应用细胞外一定浓度的 ATP 作用于体外培养的 U87 胶质瘤细胞,探讨细胞外 ATP 对 U87 胶质瘤细胞生长、侵袭和迁移中的作用以及胶质瘤所处微环境中 ATP 浓度的升高的原因,明确 ATP 对 U87 胶质瘤细胞的作用结果。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂

细胞来源:连续传代5代的人脑胶质瘤细胞系 U87,由第三军医大学西南医院病理研究所提供。主要试剂:10% 胎牛血清(FBS)、DMEM-F12 培养基购自美国 HyClone 公司;Matrigel 购自美国 Sigma 公司;聚碳酸酯微膜孔径为 8 μm 的 24 孔 Transwell 小室由美国 Corning 公司提供;ATP 购自美国 Sigma 公司;青霉素-链霉素溶液、CCK-8 试剂盒购自碧云天生物技术研究所。

1.2 细胞培养

用含有 10% 胎牛血清青霉素 100 U/ml 和链霉素 50 U/ml 的 DMEM/F12 培养基于 5% 二氧化碳、37 ℃条件下进行培养传代生长。

1.3 增殖实验

取对数生长期的 U87 细胞,常规胰酶消化,1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞,用 0.1%、1%、10% FBS 的 DMEM/F12 培养基分别加入 0、50、100、200、500、5 000 μmol/L 的 ATP,每孔 1×10^3 细胞接种于 96 孔板培养 24 h 后用 CCK-8 试剂检测,置于 5% CO_2 37 ℃孵箱中培养 4 h 后用酶标仪测定光密度值[$D(450)$],每组实验独立重复 3 次。

1.4 细胞周期检测

取对数生长期细胞消化制成单细胞悬液,计数细胞,将 1×10^6 个细胞移入离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清后,用 PBS 溶液清洗 1 次,在离心管中留约 0.5 ml PBS,加入 70% 冰乙醇 5 ml 混匀固定,4 ℃放置 48 h 以上。检测时,离心离去乙醇,PBS 清洗 1 次,在离心管中留 1 ml PBS,轻微吹打细胞团成分散状,加入 5 μl RNase(10 mg/ml),37 ℃放置 1 h,加入 PI(100 μg/ml)染液,室温避光染色 30 min,计数 10 000 个细胞,流式细胞仪检测细胞周期分析。

1.5 Transwell 侵袭实验

用含 0.1% FBS 的 DMEM-F12 培养基培养细胞 12 h,将 Matrigel 胶 80 μl 均匀平铺于 24 孔 Transwell 小室的聚碳酸酯微膜上,37 ℃孵箱预置 30 min 聚合成凝胶备用。收集经过含 0.1% FBS 的培养基处理过的细胞,用含 0.1% FBS 的 DMEM/F12 培养基悬浮细胞,上室每孔加入 2×10^4 个细胞,细胞悬液体积为 200 μl,分为 ATP 处理组和对照组,对照组下室加入含 10% FBS 的 DMEM-F12 培养基 400 μl,干扰组下室加入 400 μl 含有 10% FBS、100 μmol/L ATP 的 DMEM/F12 培养基,每组各 3 孔。随后将装有 Transwell 小室的培养板置入培养箱中培养 24 h,弃上室液体、取出小室,以湿棉签擦去聚碳酸酯微膜上未穿过膜的细胞,进行苏木精+结晶紫染色,冲洗后封片,于倒置相差显微镜下观察穿过膜的细胞数目。分别于每张膜中央部分和周围部分随机选取 3 个视野(×100),计数每一视野内穿过膜的细胞数目。

1.6 细胞外 ATP 作用下 U87 胶质瘤细胞迁移实验

实验前 12 h 收集细胞,用含有 0.1% FBS 的 DMEM-F12 培养基悬浮后种植于无菌长条形载玻片上(长 2 cm,宽 1 cm,厚度 0.5 mm),每片 100 个细胞,于含 5% CO_2、37 ℃孵箱中培养 12 h。随后于时间显微镜下,对照组为含 10% FBS 的 DMEM-F12 培养基,ATP 组为含有 10% FBS、100 μmol/L ATP 的 DMEM-F12 培养基,调节显微镜每 2 min 采集 1 次照片,分别记录 4 h。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两独立样本均数间的比较行 t 检验。

2 结果

2.1 细胞外 ATP 对 U87 胶质瘤细胞增殖的影响

实验 CCK-8 检测试剂盒分别检测了 0.1%、1%、10% 血清中各浓度梯度 ATP 对 U87 脑胶质瘤细胞作用 24 h 的细胞增殖情况。结果显示,50、100、500 μmol/L 的细胞外 ATP 对 U87 胶质瘤细胞增殖无明显作用,而较高浓度(5 000 μmol/L)细胞外 ATP 对 U87 胶质瘤细胞有显著抑制作用($P<0.05$)。见图 1~3。

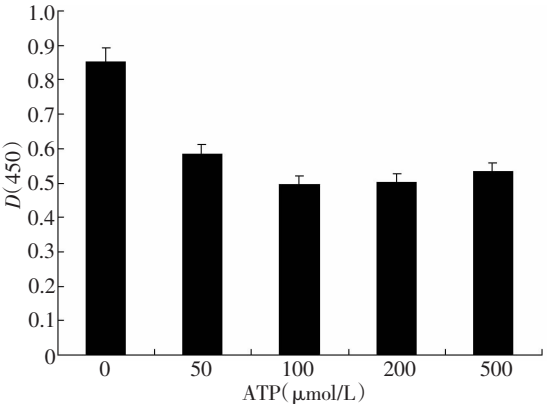
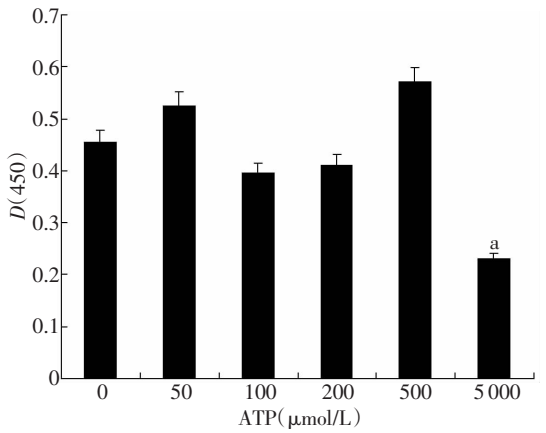
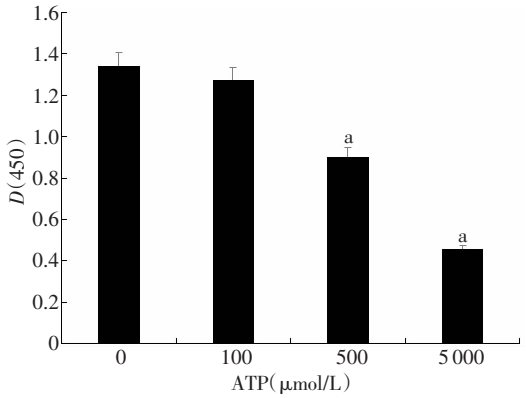


图1 0.1%血清中各浓度 ATP 对 U87 细胞 24 h 增殖情况
(5 000 μmol/L ATP 组细胞死亡)



a: $P<0.05$,与其他浓度组比较

图2 1%血清中各浓度 ATP 对 U87 细胞 24 h 增殖情况



a: $P<0.05$,与 0 和 100 μmol/L 比较

图 3 10%血清中各浓度 ATP 对 U87 细胞 24 h 增殖情况

2.2 细胞外 ATP 对 U87 胶质瘤细胞周期的影响

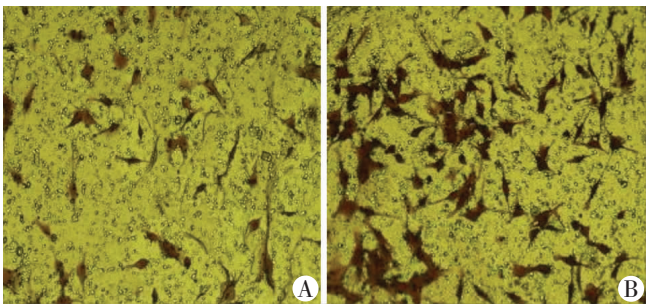
实验采用流式细胞技术检测了不同培养状态下培养 24 h 后 U87 脑胶质瘤细胞的生长周期。结果发现,处理组(100 μmol/L ATP)及对照组对 U87 脑胶质瘤细胞的生长周期无明显影响。

2.3 细胞外 ATP 对 U87 细胞迁移速度的影响情况

实验采用时间显微镜每隔 2 min 采集照片 1 次,其恒温系统也可以很好地保持细胞活性,结果发现培养基中不加 ATP 时,U87 胶质瘤细胞运动速度为(89.83 ± 13.27)μm/h,在培养基中加入 100 μmol/L 的 ATP 后,细胞运动速度为(163.83 ± 17.81)μm/h,100 μmol/L 的 ATP 可以显著增强 U87 胶质瘤细胞的运动能力,使其迁移增强($P<0.05$)。

2.4 细胞外 ATP 对 U87 细胞体外侵袭的影响

实验采用 Transwell 侵袭实验,以相同条件下不加 ATP 作为对照组,以加入 100 μmol/L ATP 作为处理组,经过 24 h 培养并处理小室,处理组细胞跨膜细胞数为(163.83 ± 17.81),明显多于对照组(89.83 ± 13.27),表明一定浓度 ATP 可以显著增强 U87 胶质瘤细胞的侵袭能力($P<0.01$)。见图 4。



A:对照组; B: ATP 处理组

图 4 细胞外 100 μmol/L ATP 对 U87 细胞 Transwell 侵袭实验 (×200)

3 讨论

ATP 是机体不可或缺的能量与代谢物质,在中枢神经系统,ATP 及其受体构成的信号通路还参与了胶质细胞的增生、迁移、分化及神经元之间的相互作用过程。近来研究发现胶质瘤细胞对细胞外 ATP 的降解速度远低于胶质细胞[8],胶质瘤细胞在生长过程中对胶质细胞的毒性作用和破坏也可导致 ATP 释放,因此胶质瘤细胞所处的微环境中 ATP 的浓度升高[7];细胞外 ATP 浓度升高对正常脑组织有细胞毒性作用,而胶质瘤细胞不但耐受性高[9],而且细胞外的 ATP 还可促进胶质瘤细胞的生长和侵袭[10-12],有研究应用 ATP 水解酶(Apyrase)可抑制大鼠脑内种植 C6 胶质瘤细胞的生长和侵袭[13-14]。这些研究表明,脑胶质瘤细胞生长的微环境中 ATP 的浓度升高,虽然细胞外 ATP 对正常脑组织有细胞毒性作用,而胶质瘤细胞不但耐受性高,而且细胞外的 ATP 还可促进胶质瘤细胞的生长和侵袭[5-6]。

本实验研究中,我们用 ATP 作为处理因素,以相同条件下不含 ATP 组作为对照,分别研究了 ATP 对 U87 胶质瘤细胞增殖、侵袭、迁移的影响。在增殖试验中,分别用 0.1%、1%、10% FBS 作为对照,用以排除血清浓度对实验的影响;再分别用设置不同梯度的 ATP 浓度作为处理组。结果表明,一定浓度的 ATP 对胶质瘤细胞增殖并无明显影响,但较高浓度(5 000 μmol/L)的 ATP 却严重抑制胶质瘤细胞的生长。但众所周知的是,恶性肿瘤之所以危害性大,其最重要的生物学特性是侵袭性生长。

为了进一步研究 ATP 对 U87 胶质瘤细胞侵袭的作用,我们用 Matrigel 以及 Transwell 小室。重建后的 Matrigel 能在聚碳酸滤膜表明形成类似天然基底膜的结构,细胞侵袭穿过重建 Matrigel 的能力反映出该细胞的侵袭能力。我们以相同条件下不加 ATP 作为对照组,以加入 100 μmol/L ATP 作为处理组,经过 24 h 培养并处理小室,统计学分析发现,处理组(100 μmol/L ATP)细胞跨膜细胞数明显多于对照组。结果表明,ATP 可以显著增强 U87 胶质瘤细胞的侵袭能力。

时间显微镜自带的恒温系统可以很好的模拟细胞生存外环境,最重要的是其自动每隔一定时间采集的照片可以直观地看到加入处理因素后细胞的运动及速度。我们采用同等条件不加 ATP 作为对照组,而加入 ATP(100 μmol/L ATP)作为处理组。结果发现加入 ATP 组可以显著增强 U87 胶质瘤细胞的运动能力,使其迁移增强。

本实验提示细胞外 ATP 可以促进胶质瘤侵袭和迁移能力。从理论上讲,本实验具有一定的研究和应用潜力,但由于肿瘤细胞侵袭和迁移涉及多种复杂过程,其相互关系及相关信号通路还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Norden A D, Wen P Y. Glioma therapy in adults[J]. Neurologist, 2006, 12(6): 279-292.

[2] Sughrue M E, Rutkowski M J, Kane A J, *et al*. Human glioma demon-

strates cell line specific results with ATP-based chemiluminescent cellular proliferation assays[J]. J Clin Neurosci, 2010, 17(12): 1573-1577.
[3] 杨鹏宇, 张建生, 李强, 等. 雷帕霉素联合嘧啶亚硝脲抑制U87-MG胶质瘤细胞增殖[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(14): 1529-1533.
[4] Steeg P S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges[J]. Nat Med, 2006, 12(8): 895-904.
[5] Fields R D, Burnstock G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions[J]. Nat Rev Neurosci, 2006, 7(6): 423-436.
[6] Rapaport E, Fishman R F, Gercel C. Growth inhibition of human tumor cells in soft-agar cultures by treatment with low levels of adenosine 5'-triphosphate[J]. Cancer Res, 1983, 43(9): 4402-4406.
[7] Deli T, Csernoch L. Extracellular ATP and cancer: an overview with special reference to P2 purinergic receptors[J], Pathol Oncol Res, 2008, 14(3): 219-231.
[8] Zhang Z, Chen G, Zhou W, *et al*. Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis[J]. Nat Cell Biol, 2007, 9(8): 945-953.
[9] Wink M R, Lenz G, Braganhol E, *et al*. Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines[J]. Cancer Lett, 2003, 198(2): 211-218.
[10] Morrone F B, Horn A P, Stella J, *et al*. Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity[J]. J Neurooncol, 2005, 71(2): 135-140.
[11] Morrone F B, Jacques-Silva M C, Horn A P, *et al*. Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines[J]. J Neurooncol, 2003, 64(3): 211-218.
[12] Huang L, Li B, Li W, *et al*. ATP-sensitive potassium channels control glioma cells proliferation by regulating ERK activity[J]. Carcinogenesis, 2009, 30(5): 737-744.
[13] Morrone F B, Oliveira D L, Gamermann P, *et al*. *In vivo* glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model[J]. BMC Cancer, 2006, 6: 226.
[14] Harden T K, Lazarowski E R. Release of ATP and UTP from astrocytoma cells[J]. Prog Brain Res, 1999, 120: 135-143.

(**收稿**:2011-12-13;**修回**:2012-01-15)
(编辑 王小寒)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2012)07-0592-01

以纤维蛋白溶解综合征为主要表现的主动脉夹层1例

张学亚 (362000 福建 泉州,福建医科大学附属第二医院血液科)

[**关键词**] 纤维蛋白溶解综合征;原发性;主要表现;主动脉夹层
[**中图法分类号**] R543.16 [**文献标志码**] B

1 临床资料

患者,男性,81岁,因发现全身瘀斑、血细胞减少5 d,发热1 d于2010年8月25日入院。入院前5 d因"突发头晕、呕吐、右上肢乏力"就诊当地医院,查头颅MRI示:多发腔隙性梗死;予丹参酮ⅡA改善循环处理,头晕、呕吐等症状缓解,但出现皮肤粘膜多处瘀斑,查血常规:WBC 8.6×10^9/L,HGB 112 g/L,PLT 76×10^9/L;凝血全套:Fib 0.67 g/L,PT和APTT等指标正常;继续丹参酮ⅡA治疗,皮肤瘀斑范围扩大,并出现发热,体温最高37.5 ℃,无畏冷,复查血常规:WBC 9.3×10^9/L,Hb 77 g/L,PLT 87×10^9/L;遂转诊我院。既往发现"高血压病"6个月,口服降压药治疗,血压控制不详,此次发病前停用降压药物。查体:体温37.5 ℃,脉搏80次/min,呼吸22次/min,血压150/80 mmHg。神志清楚,中度贫血貌,全身皮肤黏膜苍白,双手掌、右侧上臂、左侧臀部可见大片瘀斑。巩膜轻度黄染,胸骨无压痛。双肺呼吸音清,未闻及干湿性罗音。心率80次/min,心律绝对不齐,心音强弱不等,各瓣膜听诊区未闻及病理性杂音。腹平软,无压痛、反跳痛,肝脾肋下未及。双下肢无水肿,双侧病理征均未引出。8月26日辅助检查:血常规:WBC 11.1×10^9/L,HGB 82 g/L,PLT 169×10^9/L,RET 10.2%;凝血功能:PT 14.2 s(对照组11.0~16.0 s),APTT 24.6 s(对照组21.0~37.0 s),FIB 1.86 g/L(对照组2.00~4.00 g/L),D-二聚体:46.20 μg/ml(对照组0.00~0.50 μg/ml)。3P试验:阴性。FDP>20 μg/ml(对照组0~20 μg/ml)。生化检测:ALB 30.7 g/L,TBIL 42.57 μmol/L,DBIL 15.11 μmol/L,IBL 27.46 μmol/L,LDH 240 IU/L,HBDH 259 IU/L。X线胸部平片:心影呈主动脉型,左心缘饱满,向左延伸。蔗糖溶血试验:阴性;传染病3项(包括乙肝病毒抗原、抗梅毒抗体、抗HIV抗体1~2):均阴性;尿Rous试验:阴性;Coombs试验:阴性;骨髓细胞学:有核细胞增生明显活跃,红系增生明显:占68.5%;巨核细胞全片56个,成熟巨核细胞18/25个。提示:增生性贫血。肿瘤标志物:均阴性。血清免疫学检测:均阴性。ANCA:阴性;免疫抗体检查:阴性;抗心磷脂抗体:阴性。肺部CT示:主动脉弓及以下胸主动脉腔内线状高密度影分隔:动脉夹层可能。肺纵膈胸膜CT平扫+增强:扫描所示层面(主动脉弓至双肾上极水平)胸腹主动脉腔可见内膜片分隔呈真假双腔,胸主动脉段双腔增强程度相仿,腹主动脉段双腔呈单腔强化(夹层低于扫描范围)。提示主动脉弓、胸腹主动脉夹层。心脏彩超:①左、右房增大,左室肥厚;②轻度二尖瓣及主动脉瓣返流;③重度三尖瓣返流;④轻度肺动脉高压。9月23日复查凝血功能:PT 13.7 s,APTT 33.6 s,FIB 1.61 g/L。血常规:WBC 7.6×10^9/L,HGB 115 g/L,PLT 147×10^9/L,RET 1.9%。最后诊断:主动脉夹层并发原发性纤维蛋白溶解

(下转596页)

[**通信作者**] 张学亚,电话:(0595)22790268,E-mail:jakey3456@sina.com