论著

文章编号:1000-5404(2013)08-0750-04

Ln5γ2对胃癌细胞迁移、侵袭的影响

曾冬竹,郝迎学,余佩武,罗华星,杨卫军,张 帆 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军普通外科中心,微创胃肠外科中心)

[摘要] **目的** 探讨Ln5γ2对胃癌SGC-7901细胞迁移、侵袭的影响及可能机制。**方法** 实验分为对照组、Ln5γ2趋化组、上皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor,EGFR)干扰组、空载体组。以Ln5γ2诱导趋化SGC-7901,观察穿过铺和未铺Matrigl胶的Transwell小室滤膜的细胞数目。采用ELISA和免疫荧光方法检测细胞缓冲液中MMP-2和MMP-9浓度以及细胞骨架结构改变。**结果** Ln5γ2诱导趋化SGC-7901,穿过铺和未铺Matrigl胶的Transwell小室滤膜的细胞数目明显高于对照组($P<0.01$),EGFR干扰后数目与对照组无显著差异($P>0.05$)。EGFR干扰组细胞MMP-2和MMP-9浓度下降,细胞骨架结构模糊,伪足形成减少或消失。**结论** Ln5γ2可以促进胃癌SGC-7901侵袭迁移,可能机制为通过EGFR改变细胞骨架结构,影响MMPs的分泌。

[关键词] Ln5γ2;胃癌;侵袭;迁移

[中图法分类号] R392.11;R73-37;R735.2 [文献标志码] A

Effects and mechanism of Ln5γ2 on SGC-7901 cells' invasion and migration

Zeng Dongzhu, Hao Yingxue, Yu Peiwu, Luo Huaxing, Yang Weijun, Zhang Fan (Center of General Surgery, Center of Minimally Invading Gastrointestinal Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the effects and possible mechanism of Ln5γ2 on the invasion and migration in SGC-7901 cells. **Methods** Four groups of gastric cancer SGC-7901 cells were studied, including an Ln5γ2 chemotaxis group, an EGFR interference group, an empty vector group and a control group. After Ln5γ2 chemotaxis of SGC-7901 cells, cell numbers passing through the Transwell membrane with or without Matrigel glue were observed. The concentrations of MMP-2 and MMP-9 in the cell buffer were tested by ELISA. The cell skeleton changes of the four groups were examined by laser co-focal microscopy. **Results** The numbers of cell passing through the Transwell membrane with or without Matrigel glue in the Ln5γ2 chemotaxis group were greater than those of other groups ($P<0.01$). However, the numbers showed no difference after EGFR interference ($P>0.05$). MMP-2 and MMP-9 contents in the EGFR interference group declined obviously. The structure of cell skeleton was faintness and the formation of pseudopodium was reduced. **Conclusion** Ln5γ2 improves the invasion and migration of SGC-7901 cells. The possible mechanism is Ln5γ2 binding to EGFR, then changing the cell skeleton and reducing MMPs secretion.

[**Key words**] Ln5γ2; gastric cancer; invasion; migration

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30901426) and the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2008BB5130). Corresponding author: Yu Peiwu, E-mail:yupeiwu01@vip.sina.com

恶性肿瘤发生远处转移是导致患者预后不良的主要原因,而肿瘤细胞侵袭入血是肿瘤发生转移和再转移的前提[1]。就分子水平而言,肿瘤的转移表型主要由细胞表面受体及其相关的信号分子,与受体作用的配体等决定的。而肿瘤表型的变化与肿瘤细胞周围的微环境关系密切,肿瘤微环境包括一些基质成分和单核巨噬细胞。近期研究发现,在肿瘤微环境中Ln5γ2与肿瘤细胞的相互作用被认为是肿瘤侵袭和转移的关键事件[2-3]。本研究通过体外合成Ln5γ2因子,观察其对胃癌细胞迁移、侵袭的影响,并在抑制细胞表面EGFR的情况下,再观察其作用,同时检测细胞骨架和基质金属蛋白酶(MMPs)的变化,从而探讨Ln5γ2与胃癌细胞迁移、侵袭的关系和可能机制,为临床抑制胃

[基金项目] 国家自然科学基金(30901426);重庆市自然科学基金(CSTC2008BB5130)

[通信作者] 余佩武,E-mail:yupeiwu01@vip.sina.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130325.0917.001.html(2013-03-25)

癌细胞侵袭转移提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人胃癌细胞 SGC-7901(中国科学院上海细胞所),pGCsi-shEGFR 重组质粒、pGCsi-GFP 环形质粒(上海吉凯公司设计合成),Transwell 小室(美国 Corning Costar 公司),Matrigel(美国 B&D Biosciences 公司),MMP-2、MMP-9 human ELISA KIT96T 试剂盒(武汉博士德生物),Phalloidin-FITC、β-tubulin(美国 Sigma 公司),脂质体细胞转染试剂 Lipofectamine™ 2000(美国 Invitrogen 公司),酶联免疫检测仪(BIORED 公司)。

1.2 方法

1.2.1 体外合成 Ln5γ2 Domain Ⅲ片段 Ln5γ2 的活性部分为 Domain Ⅲ片段,根据 Ln5γ2 Domain Ⅲ基因序列,目的氨基酸序列为:ENPDIECADCPIGFYNDPHDPRSCKPCPCHNGFSCSV-MPETEEVVCNNCPPGVTGARCELCADGYFGDPFGEHGPVRPCQ-PCQCNNNVDPSASGNCDRLTGRCLKCIHNTAGIYCDQCKAGYFG-DPLAPNPADKCRACNCNPMGSEPVGCRSDGTCVCKPGFGGPNC-EHGAFSCPACYNQVKIQMDQ,设计引物:LAMC2d3 上游:5′-GGATCCGAGAATCCTGACATTGAG-3′,LAMC2d3 下游:5′-CTC-GAGCTGATCCATCTGAATCTTCAC-3′,片段大小为 567 bp,进行原核表达后,采用肠激酶进行酶切,去除 Trx 及 S-Tag 标签,同时利用后续的 His 标签进行纯化。

1.2.2 细胞培养 胃癌细胞 SGC-7901 于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液 5% CO_2 37 ℃培养箱中传代培养。每 1 周传代 1 次,每隔 2、3 天换液 1 次。

1.2.3 质粒转染 用脂质体 Lipofectamine™ 2000 将 pGCsi-shEGFR 及对应的空载体质粒转染人胃癌细胞 SGC-7901,转染前 1 d 取对数生长期的 SGC-7901 细胞 2.5×10^5 个接种于直径 35 mm 培养皿,培养于不含抗生素的 DMEM 培养液(含 10% 胎牛血清)。次日观察细胞长至 70% ~90% 融合,按试剂操作说明进行转染。经 G418 400 μg/mL 筛选 3 周后,用克隆环挑出单克隆进行扩大培养及鉴定。

1.2.4 侵袭迁移实验 首先观察 Ln5γ2 对 SGC-7901 细胞的趋化作用。实验组在 Transwell 小室下层加入 6 μg/μL Ln5γ2 Domain Ⅲ,小室上室加入 1×10^5 个细胞,每组设 3 个复孔。孵育 24 h 将小室取出,甲醇固定 30 min,苏木精染色 5 min,水洗,伊红复染 15 min,水洗。用棉签擦掉未穿过膜的细胞,随机于镜下取上下左右中心 5 个视野,计数穿膜细胞数,取平均数。Transwell 侵袭实验:Transwell 小室滤膜上室面均匀涂 1∶5 DMEM 稀释的 Matrigel 胶约 50 μg/小室,制备好的小室用紫外线照射 1 h 杀菌,使用前加入少量无血清的培养液,水化,余下步骤同 Transwell 迁移实验。对照组在 Transwell 小室下层只加入 10% BSA-DMEM 培养液,其余实验条件同实验组。

为了研究 Ln5γ2 趋化 SGC-7901 的可能机制,又将实验组分为转染了 pGCsi-shEGFR 的 SGC-7901 细胞的 EGFR 干扰组和转染了空载体的空载体组,其余条件同上,最后,随机于镜下取上下左右中心 5 个视野,计数穿膜细胞数,取平均数细胞计数。

1.2.5 Ln5γ2 对胃癌细胞 MMP-2 和 MMP-9 的影响 重复上述侵袭迁移实验,用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测培养基中 MMP-2 和 MMP-9 的浓度。收集 3 组细胞的培养上清液,离心去除细胞碎片,按照 ELISA 试剂盒的操作说明对细胞培养上清液进行检测,在酶联免疫检测仪上测 492 nm 波长的光密度值[D(492)值]。通过标准品的浓度及 D(492)值绘制出标准曲线,根据样品的 D(492)值在该曲线上查出相应的 MMP-2、MMP-9 含量。

1.2.6 激光共聚焦显微镜观察细胞骨架变化 将 3 组细胞处理结束后更换培养液继续培养 6 h,再按照 Phalloidin-FITC(5 μg/mL)和 β-tubulin(1∶100)试剂说明书进行微丝、微管免疫荧光染色,甘油封片后置于激光共聚焦显微镜(Leica TCS NT 德国)下观察。

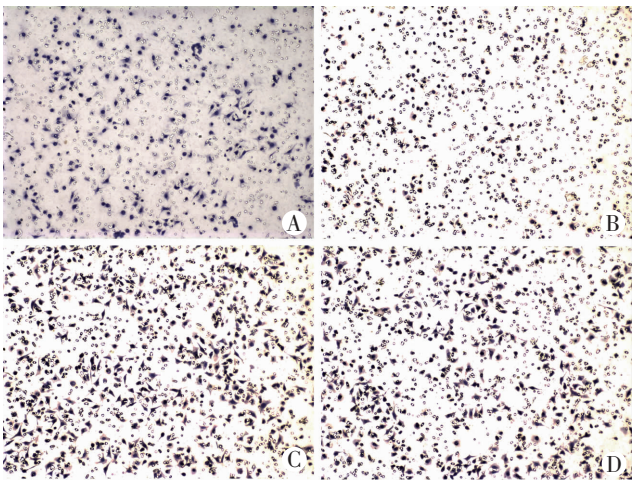
1.3 统计学处理

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件,进行多因素重复测量方差分析及单因素方差分析。

2 结果

2.1 迁移运动实验

SGC-7901 细胞对照组、Ln5γ2 趋化组、EGFR 干扰组和空载体组穿透滤膜细胞数目分别为(110 ± 15)、(128 ± 20)、(20 ± 8)、(116 ± 15),EGFR 干扰组与其他 3 组比较差异有统计学意义($P<0.01$,图 1)。



A:对照组;B:EGFR 干扰组;C:Ln5γ2 趋化组;D:空载体组

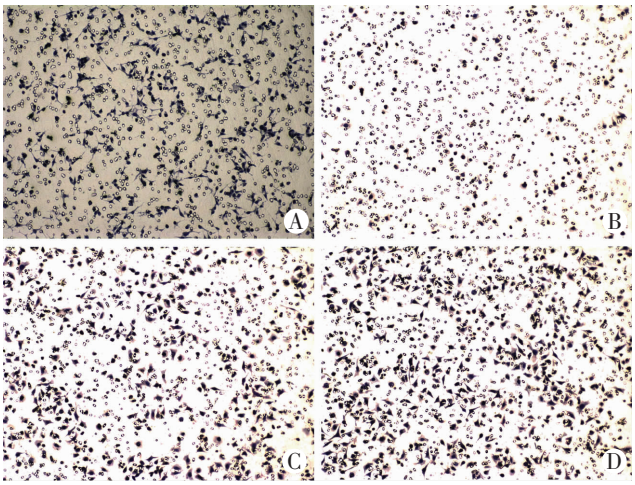
图 1 迁移运动实验观察 Ln5γ2 对 SGC-7901 趋化运动的影响 (×200)

2.2 体外侵袭实验

作用于 SGC-7901 细胞后,对照组、Ln5γ2 趋化组、EGFR 干扰组和空载体组穿透滤膜细胞数目分别为(78 ± 11)、(90 ± 13)、(13 ± 5)、(69 ± 10),EGFR 干扰组与其他 3 组比较差异有统计学意义($P<0.01$,图 2)。

2.3 MMP-2 和 MMP-9 表达变化

Ln5γ2 作用于 SGC-7901 细胞后,EGFR 干扰组细胞缓冲液中 MMP-2、MMP-9 含量较对照组明显减少($P<0.01$),空载体组与对照组比较无显著差异($P>0.05$)。见表 1。



A:对照组;B:EGFR 干扰组;C:Ln5γ2 趋化组;D:空载体组

图2 迁移运动实验观察 Ln5γ2 对 SGC-7901 侵袭运动的影响（×200）

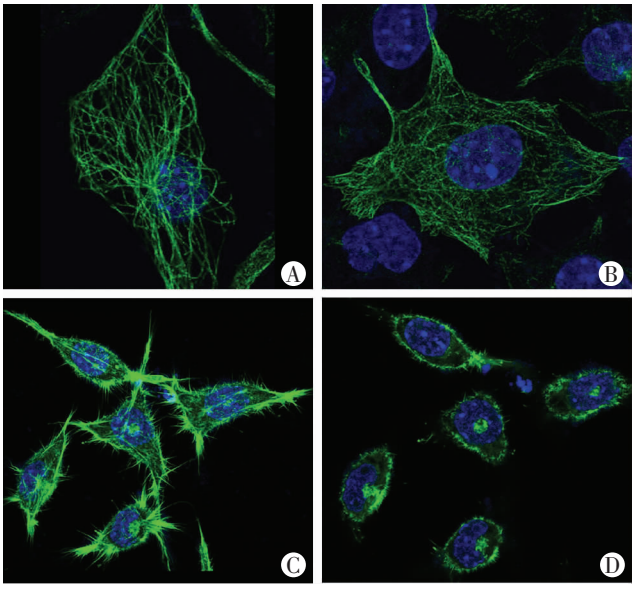
表1 Ln5γ2 对各组 SGC-7901 细胞作用后缓冲液中 MMP-2、MMP-9 表达的变化（ng/mL，$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

组别	MMP-2	MMP-9
对照组	186.16±48.22	211.53±40.75
EGFR 干扰组	72.19±40.55[a]	58.29±42.87[a]
空载体组	213.45±50.17	241.26±48.72

a：$P<0.01$，与对照组比较

2.4 细胞骨架变化

Ln5γ2 作用于 SGC-7901 细胞后，空载体组细胞微丝、微管结构清晰，边缘锐利，细胞膜伪足形成正常，与对照组无明显差异。干扰 EGFR 组细胞微丝、微管结构模糊，伪足形成减少或消失（图3）。



A:对照组微管结构;B:EGFR 干扰组微管结构;C:对照组微丝结构;D:干扰 EGFR 组微丝结构

图3 激光共聚焦显微镜观察 Ln5γ2 作用后对照组和 EGFR 干扰组 SGC-7901 细胞骨架变化（×2 000）

3 讨论

Laminins 即层粘连蛋白是一组位于基底膜的非胶原糖蛋白，与细胞的粘附有关。目前发现 Laminin 家族包含 14 个成员，分别由不同的 α、β、γ 亚基组成，在不同的组织中执行不同的生物学功能，如细胞粘附、迁移、增殖、生长和分化[4-5]。Laminin5 是 Laminin 家族的一个亚型，由 α_3、β_3、γ_2 链组成，每一个链由不同的基因编码组成，分别为 LAMA3（18q 11.2）、LAMB3（1q 32）、LAMC2（1q 25－31）[6-7]。研究发现在几种恶性肿瘤的侵袭前沿高表达 Laminin5，特别是它的 γ_2 亚单位，包括乳癌、结肠癌、胃癌和其他类型的肿瘤，在有远处转移的肿瘤细胞中表达强度更高[8-9]。但 Ln5γ2 在侵袭前沿的肿瘤细胞中高表达的意义尚不清楚。

本研究发现 Ln5γ2 诱导的胃癌 SGC-7901 细胞发生迁移与侵袭的数目明显高于对照组。进一步研究发现在干扰 EGFR 的情况下 Ln5γ2 诱导的胃癌 SGC-7901 细胞发生迁移与侵袭的数目与对照组相比较有显著差异。说明 Ln5γ2 对胃癌细胞的影响可能是通过细胞表面的 EGFR 受体发挥作用的。Ln5γ2 的短臂中包含着 Domains Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ，其中 Domain Ⅲ包含着若干个表皮生长因子（EGF）样氨基酸序列，而肿瘤细胞趋向 EGF 做定向移动，已在乳腺癌的动物模型中观察到。并且过表达 EGF 受体与许多肿瘤的转移和不良预后有关，包括小细胞肺癌、乳腺癌、胃癌和前列腺癌[10-12]。所以我们认为 Ln5γ2 促进胃癌细胞迁移和侵袭可能是依靠其短臂上 EGF 样重复序列作用于细胞表面的 EGFR。

进一步研究发现在细胞 EGFR 受到干扰的情况下，Ln5γ2 对胃癌 SGC-7901 细胞的细胞骨架和缓冲液中 MMP-2 和 MMP-9 的影响较大。EGFR 干扰组细胞微丝、微管模糊不清，细胞伪足形成减少或消失。MMP-2 和 MMP-9 浓度明显低于对照组和空载体组。说明 Ln5γ2 对胃癌细胞迁移、侵袭的影响可能是通过与 EGFR 受体相互作用，进而影响细胞骨架重排和基质金属蛋白酶（MMPs）的分泌。据此推测 Laminin 促进肿瘤细胞侵袭、转移的机制可能是：①诱导肿瘤细胞的增殖和分化；②对肿瘤细胞具有趋化性（chemotactic）和趋触性（haptotactic），促进肿瘤细胞迁移；③Laminin 还可诱导各种酶降解细胞外基质促进肿瘤细胞侵袭。Laminin 家族包含众多亚型，在肿瘤侵袭转移中发挥作用不同，其具体机制还有待进一步研究。

参考文献：

[1] Wang W, Goswami S, Sahai E, *et al*. Tumor cells caught in the act of invading: their strategy for enhanced cell motility[J]. Trends Cell Bi-

ol, 2005, 15(3): 138 – 145.
[2] Patarroyo M, Tryggvason K, Virtanen I. Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis[J]. Semin Cancer Biol, 2002, 12(3): 197 – 207.
[3] Giannelli G, Fransvea E, Bergamini C, *et al*. Laminin-5 chains are expressed differentially in metastatic and nonmetastatic hepatocellular carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(10 Pt 1): 3684 – 3691.
[4] McKee K K, Harrison D, Capizzi S, *et al*. Role of laminin terminal globular domains in basement membrane assembly[J]. J Biol Chem, 2007, 282(29): 21437 – 21447.
[5] Ramadhani D, Tsukada T, Fujiwara K, *et al*. Laminin isoforms and laminin-producing cells in rat anterior pituitary[J]. Acta Histochem Cytochem, 2012, 45(5): 309 – 315.
[6] Givant-Horwitz V, Davidson B, Reich R. Laminin-induced signaling in tumor cells[J]. Cancer Lett, 2005, 223(1): 1 – 10.
[7] Carafoli F, Hussain S A, Hohenester E. Crystal structures of the network-forming short-arm tips of the laminin β1 and γ1 chains[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e42473.
[8] Aoki S, Nakanishi Y, Akimoto S, *et al*. Prognostic significance of laminin-5 gamma2 chain expression in colorectal carcinoma: immunohistochemical analysis of 103 cases[J]. Dis Colon Rectum, 2002, 45(11): 1520 – 1527.
[9] Masuda R, Kijima H, Imamura N, *et al*. Laminin-5γ2 chain expression is associated with tumor cell invasiveness and prognosis of lung squamous cell carcinoma[J]. Biomed Res, 2012, 33(5): 309 – 317.
[10] Hussain S A, Carafoli F, Hohenester E. Determinants of laminin polymerization revealed by the structure of the α5 chain amino-terminal region[J]. EMBO Rep, 2011, 12(3): 276 – 282.
[11] Kuo P L, Huang M S, Cheng D E, *et al*. Lung cancer-derived galectin-1 enhances tumorigenic potentiation of tumor-associated dendritic cells by expressing heparin-binding EGF-like growth factor[J]. J Biol Chem, 2012, 287(13): 9753 – 9764.
[12] Chen Y M, Kikkawa Y, Miner J H. A missense LAMB2 mutation causes congenital nephrotic syndrome by impairing laminin secretion [J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(5): 849 – 858.

(**收稿**:2012-10-08;**修回**:2012-12-21)
(编辑 龙 亮)

文章编号:1000-5404(2013)08-0753-01

个案与短篇

CTA 诊断腹部创伤性动脉瘤合并动静脉瘘 1 例

曹 晖[1],冉启胜[1],陈金华[1],曹国强[2] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所:放射科[1],呼吸内科[2])

[**关键词**] CT 血管造影;创伤性动脉瘤;静脉瘘
[**中图法分类号**] R826.61 [**文献标志码**] B

1 临床资料

患者,男性,19 岁,因"活动后胸闷、气促伴腹胀 4 个月"于 2011 年 9 月 25 日入我院。平素体质良好,无特殊疾病史,半年前有腹部刀伤的病史,伤后曾经接受肠管吻合术。4 个月前逐渐出现胸闷、气促伴腹胀以及左侧下肢浮肿。院外诊断为结核性多浆膜腔积液,经抗结核治疗 4 个月效果不佳,先后引流腹腔积液 55 kg。体格检查:生命体征尚平稳,两肺呼吸音减弱,无啰音,心音低钝,心率 110 次/min,左下腹听诊可闻及喷射样血管杂音。左侧下肢肿胀。胸部正位片,左侧肋膈角变钝,心影明显增大,成烧瓶状。初步诊断为:①结核性多浆膜腔积液?②扩张型心肌病并心衰?

入院后行腹部增强 CT 检查,腹部 CT 血管造影(CTA)。使用荷兰飞利浦公司 128 排 VCT,螺旋扫描模式,管电压 120 kV,管流电 385 mA,扫描层厚/层距 0.625 mm。采用自动追踪触发扫描法,注入非离子型造影剂碘海醇(350 mg/mL) 85 mL;并追加生理盐水 30 mL。采用 180°定位扫描,扫描范围包括整个腹部,屏气扫描完成检查。动脉期25 s,静脉期 47 s,延迟期约 120 s。对图像进行常规 5 mm 重建,静脉期增加冠状 5 mm 重建。对动脉期进行最大密度投影(MIP)、多平面重组(MPR)、容积再现(VR)后显示:下腔静脉、髂总静脉、髂内外静脉等早期显影,下腔静脉及左侧髂总静脉且明显扩张。右侧髂总动脉起始部扩张呈球样,压迫左侧髂总静脉,右侧髂总动脉-下腔静脉可见瘘口,大小 10.2 mm(图 1、2)。CTA 拟诊为右侧髂总动脉瘤合并下腔静脉瘘。DSA 显示大量造影剂从右髂总动脉直接流入下腔静脉,证实诊断无误。治疗:经 DSA 引导腹主动脉、髂总动脉覆膜支架植入术。腹膜支架植入后下腔静脉及左侧髂总静脉均未再显影,提示瘘口被封闭(图 3)。植入支架第 6 天,患者早期置入的腹部引流管未再流出腹腔积液,患者胸闷、心悸腹胀等症状基本消失。复查胸片提示心影较入院时明显缩小,患者顺利出院。

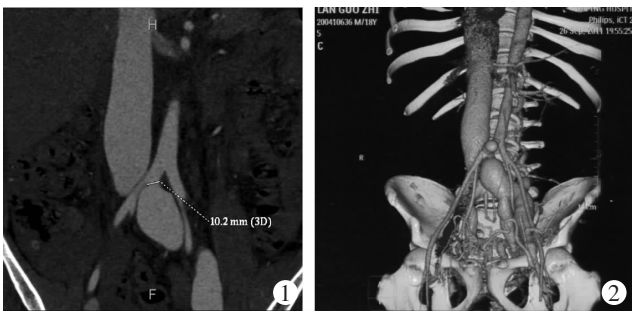


图 1 CTA 显示患者下腔静脉和髂总动脉

图 2 腹部动脉期 VR 重建 *右髂总动脉瘤形成,并压迫左侧髂总静脉*

[**通信作者**] 冉启胜,E-mail:ran110131420@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130325.0918.014.html(2013-03-25)

(下转 758 页)