基础研究 文章编号:0253-3626(2010)06-0849-04

缺氧对胃癌细胞侵袭转移和血管形成的影响

张俊文,王丕龙
(重庆医科大学附属第一医院消化内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:通过体外实验,研究缺氧对胃癌细胞侵袭转移及血管形成的影响,并初步探讨其作用机制。方法:运用 3-(4,5-二甲基噻唑 -2)-2,5- 二苯基四氮唑溴盐(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide,MTT)法观察缺氧对人胃癌细胞 SGC-7901 粘附能力的影响;选用 Boyden Chamber 膜侵袭系统,观察缺氧对 SGC-7901 游走和侵袭的影响以及诱导内皮细胞形成新生血管的影响;免疫细胞化学观察缺氧对 SGC-7901 细胞转化生长因子 -β_1 (Transforming growth factor-beta 1, TGF-β_1)表达的影响。结果:缺氧处理后,SGC-7901 细胞粘贴率增加($P<0.05$),游走穿膜细胞数(167 ± 46、196 ± 9)或侵袭穿膜细胞数(84 ± 5、122 ± 8)均明显高于对照组(114 ± 7,60 ± 4,$P<0.05$),诱导内皮细胞形成管腔数(203 ± 6.21、356 ± 5.11)及长度(387 ± 5.93、439 ± 8.43)均高于对照组(129 ± 3.45,261 ± 6.28,$P<0.05$),缺氧能增加 TGF-β_1 的表达。结论:缺氧能促进胃癌侵袭转移及血管形成。其促进侵袭转移的机制可能与增加胃癌细胞异质粘附、游走、侵袭能力有关。

【关键词】胃癌细胞;缺氧;侵袭转移;血管形成;转化生长因子 -β_1
【中国图书分类法分类号】R151.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-11-25

The effects of hypoxia on invasion and angiogenesis of gastric cancer in vitro

ZHANG Jun-wen, et al
(*Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effect of hypoxia on the invasion , metastasis ,and angiogenesis of gastric cancer in vitro. *Methods*: MTT was used to study the effects of viability durng hypoxia on SGC-7901, The Boyden Chamber membrane invasion culture system was used to study invasion, metastasis, and angiogenesis. Immunocy tochemical staining was used to observe the change of TGF-β_1. *Resuts*: In the membrane invasion culture system, the numbers of invading and migrating SGC-7901 cells were significantly higher in hypoxia group than in the control group ($P<0.05$), and the numbers and length of tubes were significantly higher in hypoxia group too($P<0.05$). The adhesion rate and TGF-β_1 expression were regulater in hypoxia group ($P<0.05$). *Conclusion*: Hypoxia can inhibit the migration, invasion, and angiogenesis of SGC-7901 gastric cancer cells in vitro. The mechanism may be regulation of TGF-β_1 expression.

【Key words】Gastric cancer; Hypoxia; Invasion and metastasis; Angiogenesis; Transforming growth factor-beta

在实质性肿瘤中,由于肿瘤内血管结构和功能的异常以及肿瘤细胞的快速增殖所致的肿瘤细胞氧耗增加[1-3]导致肿瘤细胞缺氧。缺氧是实质性肿瘤微环境的基本特征之一。这一观点目前已得到充分的证实[4]。胃癌是常见的实质性肿瘤同样存在有肿瘤细胞缺氧。因此,我们通过体外实验,研究缺氧对胃癌细胞侵袭转移及血管形成的影响,并对其可能机制进行初步的探讨。

1 材料及方法

1.1 材料

人胃癌细胞株 SGC-7901、小鼠成纤维细胞株 NIH3T3、人脐静脉内皮细胞 ECV304,重庆医科大学病理生理教研室提供;Boyden 小室(Milicell-PCF 型,直径 12 μm,illipore,USA 公司产品);人工基膜 Matrigel (Serva 公司产品);四甲基偶氮唑蓝(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide,MTT),购于上海华舜生物工程有限公司;鼠抗转化生长因子 -β_1(Transforming growth factor-beta 1,TGF-β_1)单抗(工作浓度 1/200),SP 免疫组化试剂盒,购于北京中山生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 微缺氧条件的制造 运用产气袋法(GasPaK)制造微缺氧条件[5]。通过血气分析仪监测含小牛血清的 RPMI1640 培养液中 Po_2、Pco_2 和 pH 的变化,本装置在 0.5 ~ 48 h 内 Po_2、Pco_2 和 pH 定,并能达到微缺氧细胞培养的条件(1%~4%氧、5%二氧化碳及 90%氮)。

1.2.2 MTT[6]法检测缺氧对 SGC-7901 细胞粘附能力的影响

作者介绍:张俊文(1965-),男,副教授,硕士,研究方向:消化道肿瘤防治。

基金项目:重庆医科大学 2005 年创新基金(编号:cx200504)。

取对数生长期 SGC-7901 细胞配成浓度为 1×10^5 个/ml 的细胞悬液并分为对照组和缺氧组。各取细胞悬液 4 ml 分别培养瓶内。对照组在 CO_2 箱内培养(20%氧、5%二氧化碳及 75%氮)48 h,缺氧组分两组,先入 CO_2 箱内分别培养 32 h 和 44 h。再入缺氧密封盒并放入 37℃恒温水浴箱孵育 16 h 和 4 h,48 h 后取出各组细胞进行粘附能力的测定:0.1%胰蛋白酶消化,配成浓度为 1×10^5 个/ml 的细胞悬液,每孔 0.2 ml 入 96 孔培养板(每孔加用 RPMI1640 按比例稀释的 Matrigel 10 μl,成胶后紫外光消毒灭菌)常规培养,每组细胞均设对照组、30、60、90、120 min 组,每组设 8 个平行孔,重复 3 次。于 30、60、90、120 min 各时间点分别取出 8 个平行孔,吸出培养液及悬浮细胞,加入无血清 1640 0.2 ml 继续培养,于 120 min 时,离心 1500 r × 10 min 后,加 20 μl MTT 培养 4 h,加二甲亚砜(DMSO) 200 μl,在自动酶标读数仪(Bio-Rad-550型,美国,波长 570 nm)测定每孔 A 值。粘贴率 =At/A 对照 × 100%。t=30、60、90、120 min。

1.2.3 游走实验及侵袭实验检测缺氧对 SGC-7901 细胞游走、侵袭能力的影响　实验分对照组、缺氧组。每组设 5 个Boyden 小室。将人工基膜 Matrigel 40 μl 均匀铺于 Boyden 小室腔膜上。成胶后将 Boyden 小室放入 12 孔板,将 2×10^5 个 SGC-7901 细胞加入小室,12 孔板每孔加入 0.6 ml NIH3T3 细胞条件培养液。对照组置 5%二氧化碳孵箱饱和湿度 37℃培养 24 h,缺氧组分两组,先在二氧化碳孵箱分别培养 20 h 及 8 h,入微缺氧装置内继续培养 4 h 和 16 h。分别于 24 h 取出 Boyden 小室,用棉签轻擦净小室细胞及 Matrigel。95%酒精固定,HE 染色,小心撕下聚碳酸脂膜。晾干,中性树胶封片。光镜下观察 5 个视野穿膜细胞数,计算平均每个视野细胞。游走实验与侵袭实验相似,只是在 Boyden 小室腔膜上不辅 Matrigel。

1.2.4　不同氧状态下人胃癌细胞株 SGC-7901 上清的收集

取对数生长期 SGC-7901 细胞配成浓度为 1×10^5 个/ml 的细胞悬液并分为对照组和缺氧组。各取细胞悬液 20 ml 分别培养瓶内。缺氧组分两组,先在二氧化碳孵箱分别培养 68 h 及 56 h,入微缺氧装置内继续培养 4 h 和 16 h。72 h 取出各组细胞,收集各组细胞上清,离心 1 500 r × 10 min,-20℃保存待用。

1.2.5　缺氧对 SGC-7901 细胞诱导内皮细胞形成管腔的能力的影响　实验分为对照组、缺氧 4 h 组和缺氧 16 h 组,每组设 5 个 Boyden 小室。将人工基膜 Matrigel 40 μl 均匀铺 Boyden 小室腔膜上。成胶后放入 6 孔板,将 2×10^5 个人脐静脉内皮细胞 ECV304 加入小室,缺氧组每孔加 2 ml 经不同时间缺氧预处理的 SGC-7901 细胞上清液。对照组加入 2 ml SGC-7901 细胞的上清液,置 5%二氧化碳孵箱饱和湿度 37℃培养 96 h,每 24 h 更换 1 次同样处理的上清液。取出 Boyden 小室,95%酒精固定,HE 染色,小心撕下聚碳酸脂膜。晾干,中性树胶封片。10 × 10 低镜下观察 10 个管型分布均匀的视野计数管腔数,取均值。并用医学图像分析系统随机测定 10 个管腔的长度,取均值。

1.2.6　免疫细胞化学观察缺氧对 SGC-7901 细胞 TGF-β_1 表达的影响　取对数生长期的 SGC-7901 制成 5×10^4 个 /ml 的细胞悬液,每孔 2 ml 加入放有盖玻片的 6 孔板内,设对照组、缺氧 4 h 组和缺氧 16 h 组,缺氧组入 CO_2 箱内分别培养 56 h 和 68 h。再入缺氧密封盒并放入 37℃恒温水浴箱孵育 16 h 和 4 h。72 h 后分别取出各组细胞爬片,4%多聚甲醛固定,按 SP 试剂盒进行检测 TGF-β_1。AEC 显色,水溶性封片剂封片。每次染色时均以 PBS 代替 I 抗作为阴性对照。排除爬片边沿细胞,10 × 10 低倍镜下随机选取 10 个细胞分布均匀的视野,10 × 20 中倍镜下随机计数 50 个细胞/每视野。按着色强弱分 4 个等级:无着色 0 分,淡红色 1 分,褐红色 2 分,鲜红色 3 分(TGF-β 1 胞浆着色)。按公式 HSCORE = $\sum$ Pi (i+1)(i=0,1,2,3;Pi 表示评分为 i 的比例)计算 HSCORE 得分。

1.3　统计学处理

所有数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用方差分析,多组间分析采用两两多重比较,数据均用统计软件包 SAS8.0 分析。

2　结　果

2.1　缺氧对 SGC-7901 细胞粘附能力的影响

随时间延长,细胞粘附能力增加。缺氧预处理 4、16 h后,SGC-7901 细胞粘贴率同对照组比较有明显增加(P<0.05),并随缺氧时间延长而增加。见表 1。

2.2　缺氧对 SGC-7901 细胞运动、侵袭的影响

缺氧预处理后,同对照组比较,处理组游走及侵袭穿膜细胞数有非常显著增加(P<0.01)。并随缺氧时间延长而增加(P<0.05)。见表 2,图 1、2。

2.3　缺氧对 SGC-7901 细胞诱导内皮细胞形成管腔的能力的影响

ECV304 细胞在肿瘤上清的诱导下,在人工基膜 Matrigel 形成的三维空间内形成管腔样结构,通过不同肿瘤上清 96 h 诱导,光镜下见 ECV304 细胞变长,呈巢状及条状排列形成管腔。缺氧组管腔数及管腔长度有明显增加(P<0.05)。见表 3,图 3、4。

2.4　缺氧处理 SGC-7901 细胞后细胞 TGF-β_1 表达的变化

TGF-β_1 在 SGC-7901 细胞浆着色。缺氧预处理后,同对照组比较,处理组 SGC-7901 细胞 TGF-β_1 表达的 HSCORE 得分有明显上调(P<0.05)。见表 4,图 5、6。

3　讨　论

肿瘤细胞的侵袭转移包括与基膜和细胞外基质(Extracellular matrixc,ECM)的粘附、降解和穿透移行 3 个相互联系的基本过程。癌细胞的粘附分为癌细胞间的同质粘附和肿瘤细胞与基膜或其他细胞的异质粘附。其中异质粘附在肿瘤侵

表 1 MTT 法检测缺氧对 SGC-7901 细胞粘贴率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	30 min	60 min	90 min	120 min
对照组	32.98 ± 0.94	60.37 ± 0.63	66.08 ± 1.14	88.58 ± 0.91
缺氧 4 h 组	36.45 ± 1.02*	65.37 ± 0.8*	73.52 ± 0.93*	92.13 ± 0.45*
缺氧 16 h 组	43.82 ± 0.32*#	70.86 ± 0.74*#	81.14 ± 1.07*#	96.62 ± 0.86*#

*P<0.01 同对照组比较;#P<0.05 同缺氧 4 h 组比较

表 2 缺氧对 SGC-7901 细胞游走及侵袭穿膜细胞数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	游走穿膜细胞数	侵袭穿膜细胞数
对 照 组	114 ± 7	60 ± 4
缺氧 4 h 组	167 ± 4&	84 ± 5&
缺氧 16 h 组	196 ± 9&◆	122 ± 8&◆

&P<0.01 同对照组比较; ◆P<0.05 同缺氧 4 h 组比较

表 3 各实验组形成的管腔数及管腔长度($\bar{x} \pm s$)

组别	管腔数	管腔长度(μm)
对 照组	129 ± 3.45	261 ± 6.28
缺氧 4 h 组	203 ± 6.21*	387 ± 5.93*
缺氧 16 h 组	356 ± 5.11*▲	439 ± 8.43*▲

*P<0.05 同对照组比较;▲P<0.05 同缺氧 4 h 组比较

表 4 缺氧增加 SGC-7901 细胞 TGF-β1 的表达(HSCORE $\bar{x} \pm s$)

组别	HSCORE
对照 组	4.31 ± 0.32
缺氧 4 h 组	6.07 ± 0.64■
缺氧 16 h 组	7.54 ± 0.17■▼

■P<0.05 同对照组比较;▼P<0.05 同缺氧 4 h 组比较

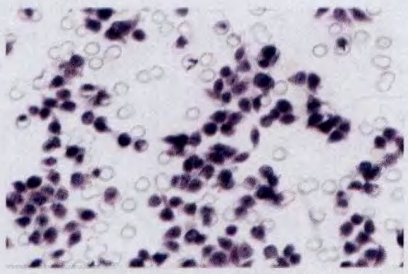


图 1 对照组细胞游走情况(HE × 200)

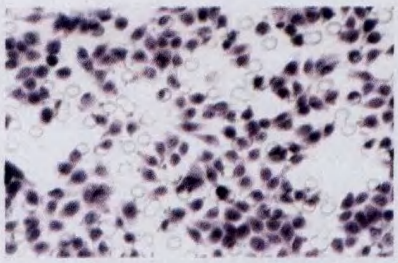


图 2 缺氧 16 h SGC-7901 游走穿膜细胞数增加(HE × 200)

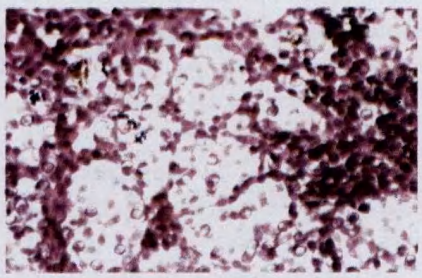


图 3 对照组管腔形成情况(HE × 200)

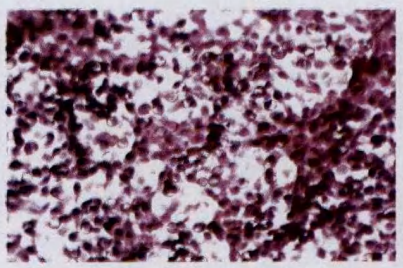


图 4 缺氧 16 h 组管腔形成情况(HE × 200)

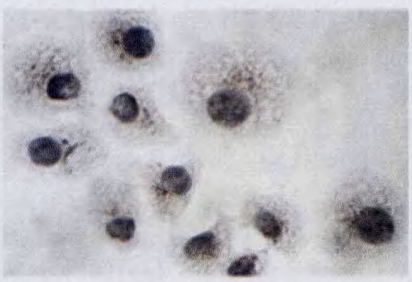


图 5 对照组弱阳性表达 TGF-β_1(SP × 400)

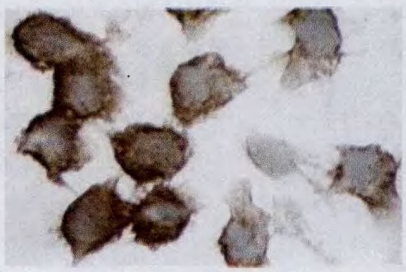


图 6 缺氧 16 h 组阳性表达 TGF-β_1(SP × 400)

袭转移中起重要作用，是侵袭转移发生的前提。自 EHS 肉瘤提取的 Matrigel，其主要成份层粘素是基膜和 ECM 的主要成份，通过整合素介导与肿瘤细胞粘附并影响以后的过程[7]。故本研究用 Matrigel 观察细胞粘附能力，所测得的粘贴率能反映 SGC-7901 细胞异质粘附的能力。实验显示，缺氧能显著提高 SGC-7901 细胞的粘贴率，表明缺氧能提高 SGC-7901 细胞异质粘附能力，从而促进了侵袭转移的发生。

肿瘤细胞本身的运动能力和侵袭力在肿瘤侵袭转移中发挥重要作用，侵袭必须穿透血管周围的细胞外基质，本研究所用的 Matrigel 与细胞外基质的成分非常相近，能有效地在体外模拟肿瘤细胞侵袭过程。实验中，观察到 SGC-7901 细胞具有较强的侵袭和运动能力。缺氧能使穿过聚碳酸脂膜的胃癌细胞数量增加，提高了胃癌细胞的侵袭和运动能力。

癌细胞侵袭需要血管形成提供营养，血管形成是肿瘤侵袭转移重要因素之一。参与过程有内皮细胞、基底膜成分和肿瘤细胞，是多种组分相互作用的结果，肿瘤细胞释放血管形成因子激活内皮细胞，并产生蛋白酶使基底膜降解，促使内皮细胞增殖、迁移。内皮细胞与肿瘤细胞相互作用形成毛细血管样结构。体外培养的肿瘤细胞上清含肿瘤细胞所分泌的多种因子。因此运用胃癌细胞上清，通过 Boyden 小室和人工基膜 Matrigel，诱导 ECV304 细胞形成管腔的方法，能显示 SGC-7901 细胞诱导内皮细胞形成血管的能力。实验显示，SGC-7901 细胞能诱导内皮细胞形成管腔，具有较强的诱导血管生成的能力。缺氧能增加管腔数及管腔长度，故能提高胃癌细胞诱导内皮细胞形成血管的能力，增加胃癌新生血管的形成。文献报道，缺氧能提高肿瘤细胞 VEGF 表达量，增加肿瘤新生血管形成[8]。因此，我们推测缺氧促进胃癌新生血管形成可能同提高胃癌细胞 VEGF 表达量有关。

TGF-β_1 作为一种生长调节因子，在肿瘤侵袭转移中发挥着重要作用。TGF-β_1 能上调肿瘤细胞与其他正常细胞间的粘附能力，增加 ECM 的合成与沉积。研究显示：侵润型或伴有淋巴结转移的胃癌患者，其血清及癌组织中 TGF-β_1 含量明显高于不伴淋巴结转移者，提示胃癌细胞 TGF-β_1 基因过度表达是胃癌侵润和淋巴结转移过程中重要的一步[9,10]。同时也发现 TGF-β_1 可以诱导新生血管形成，增加胃癌组织中 MVC，间接促进胃癌演进[11]。进一步研究发现 TGF-β_1 通过调控 VEGF 表达，诱导肿瘤新生血管形成[12]。本实验发现，缺氧可导致其 TGF-β_1 基因表达上调，表明缺氧可能通过上调胃癌细胞 TGF-β_1 的表达，提高胃癌细胞异质粘附能力及新生血管形成能力，从而促进胃癌侵袭转移。

本实验还发现，随缺氧预处理时间的延长，SGC-7901 细胞异质粘附能力、侵袭和运动能力、新生血管形成能力及 TGF-β_1 表达均有增加，是否同 SGC-7901 细胞逐渐适应缺氧，缺氧诱导因子 -1α[13]等调控细胞能量代谢、新生血管形成的基因表达上调有关，尚待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Sutherland R M.Tumor hypoxia and gene expression--implications for malignant progression and therapy[J].Acta Oncol,1998,37(6):567-574.

[2] Carmeliet P, Jain R K. Angiogenesis in cancer and other diseases [J]. Nature,2000,407(6801):249-257.

[3] Dachs G U,Tozer G M. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation[J]. Eur J Cancer,2000,36(13):1649-1660.

[4] Parker C,Milosevic M,Toi A,et al.Polarographic electrode study of tumor oxygenation in clinically localized prostate cancer[J].Int J Radiat Oncol Biol Phys,2004,58(3):750-757.

[5] Gregg L. Expression of Hypoxia-inducible Factor 1:Mechanisms and Consequences[J].Biochem-pharmacol,2000,59(1):47~53.

[6] 汤为学，骆云鹏，王瑞雪，等. 人实体瘤抗癌药物敏感试验 MTT 法的建立[J]. 重庆医科大学学报，1992，17(21)：103~108.

[7] Yasoshima T,Denno R,Kawaguchi S,et al. Establishment and characterization of human gastric carcinoma lines with high metastatic potential in the liver: changes in integrin expression associated with the ability to metastasize in the liver of nude mice[J].Jpn J Carcer Res,1996,87(2):153-160.

[8] Crisostomo P R,Wang M,Herring C M,et al. Sex dimorphisms in activated mesenchymal stem cell function[J].Shock,2006,26(6):571-574.

[9] Yoshida K,Yokozaki H,Niimoto M,et al. Expression of TGF-beta and procollagen type Ⅰ and type Ⅲ in human gastric carcinomas[J]. Int J Cancer,1989,44(3):394-398.

[10] Niki M, Okajima K, Isozaki H,et al. Measurement of the plasma transforming growth factor-beta 1(TGF-beta 1) level in patients of gastric carcinoma-compared with the serum IAP level and the lymphocyte subsets (CD3,CD4,CD8) [J].Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi,1996,93(5):303-311.

[11] Choi Y H,Choi K C,Park Y E, et al. p21 expression and mutation in gastric carcinoma: analysis by immunohistochemistry and PCR-SSCP [J]. J Korean Med Sci,1997,12(5):427-432.

[12] Saito H, Tsujitani S,Oka S, et al. The expression of transforming growth factor - β_1 is significantly correlated with the expression of vascular endothelial growth factor and poor prognosis of patients with advanced gastric carcinoma [J].Cancer,1999,86(8):1455-1462.

[13] 张俊文，王丕龙. 缺氧时缺氧诱导因子 -1α 在胃癌细胞的表达及其同细胞增殖凋亡的关系[J].肿瘤防治研究，2006,33(9):635-637.

（责任编辑：冉明会）