重庆维普 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)09-1063-05

胃癌细胞血管生成拟态的形态学及机制研究

张 婧,高 青

(重庆医科大学附属第一医院消化内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:血管生成拟态(Vasculogenic mimicry,VM)是近年来发现的一种全新的肿瘤微循环模式。本研究通过体外三维培养的方式对胃癌细胞血管生成拟态进行形态学的研究,并探讨其可能的分子机制。方法:体外三维培养 SGC-7901 细胞,观察其是否可以形成血管生成拟态。免疫细胞化法检测参与血管生成拟态形成的胃癌细胞中 MMP-2 与 MT1-MMP 的表达水平。观察 PI3K 信号通路抑制剂对 MMP-2 和 MT1-MMP 的表达水平及对胃癌细胞血管生成拟态的影响。结果:胃癌细胞 SGC-7901 在体外三维培养条件下能够形成血管生成拟态。参与血管生成拟态的癌细胞中 MMP-2 与 MT1-MMP 高表达。PI3K 信号通路抑制剂能够抑制 MMP-2 与 MT1-MMP 的表达,导致 SGC-7901 细胞血管生成拟态的能力明显降低。结论:体外三维培养时胃癌细胞 SGC-7901 具有形成血管生成拟态的能力。PI3K 信号通路的抑制剂可以抑制胃癌血管生成拟态的形成,其机制之一可能是通过抑制 MMP-2 与 MT1-MMP 的表达。

【关键词】胃癌细胞;血管生成拟态;发生机制

【中国图书分类法分类号】R735 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-29

Morphology and mechanism research of gastric cancer vasculogenic mimicry

ZHANG Jing, et al

(*Department of Gastrointestry, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: Vasculogenic mimicry(VM) is a new microcirculation form of tumor cells which found resent years. This research observed whether gastric cancer SGC-7901 cells can form vasculogenic mimicry in 3-dimentional culture and had a primer examination on its mechanism. *Methods*: Put SGC-7901 cells in 3-dimentinal culture and observed if it could form vasculogenic mimicry. Immunohischemistry tested the MMP-2 and MT1-MMP level of 3-dimentional cultured SGC-7901 cells. Observe the effect of PI3K way inhibitor on MMP-2、MT1-MMP level and VM formation of gastric cancer cells. *Results*: Gastric cancer SGC-7901 cells can form VM in 3-demintional culture. MMP-2 and MT1-MMP highly expressed in gastric cancer cells that took part in the tube structure. PI3K way inhibitor decreased MT1-MMPmRNA and MMP-2 protein level and inhibited VM formation of SGC-7901cells. *Conclusion*: Gastric cancer SGC-7901 cells had the ability to form vasculogenic mimicry in vitro 3-dimentional culture.One of its mechanism was probably through decreasing MT1-MMP and MMP-2 level.

【Key words】 Gastric tumor; Vasculogenic mimicry; Mechanism

血管生成拟态是近年来发现的一种全新的肿瘤微循环模式。它是指高度恶性肿瘤细胞模拟血管内皮细胞形成的一种具有输送血液的管道结构。该理论的提出对以往的肿瘤微循环模式提出了挑战,同时也是一个重要的补充。它从一方面解释了恶性肿瘤的快速生长和早期转移,从而为肿瘤的治疗提供了一个新的方向。目前的研究发现,在恶性黑色素瘤[1]、肝癌[2]、胆囊癌[3]、双向分化肿瘤[4]等种存在着 VM 现象。在胃癌中是否也存在该种管道结构,相关研究还比较少。本研究通过体外三维培养的方式对胃癌细胞中血管生成拟态现象进行研究,并对其发生的相关机制进行初步的探讨。

作者介绍: 张 婧(1982-),女,硕士,研究方向:消化道肿瘤的基础与临床。

通讯作者: 高 青,男,主任医师,E-mail:gaoqing27@yahoo.com.cn。

1 材料与方法

1.1 细胞株

胃癌细胞株 SGC-7901 由重庆医科大学基础医学院病生教研室提供。10%FBS 为 TBD 公司产品,倒置显微镜为日本 Olympus 公司产品。

重庆维普 http://www.cqvip.com

1.2 细胞的三维培养及染色

胃癌细胞的三维培养:24 孔培养板中每孔放入 1 张经消毒的 10mm × 10mm 盖玻片。在每张盖玻片的中央滴加 20μl 的鼠尾Ⅰ型胶原(美国 BD 公司),室温下每孔加入等量的无水乙醇,停留 5min,再加入 45μl 的 PBS,室温停留 5min,弃去,重复用 PBS 洗涤 1 次。取对数生长期的胃癌 SGC-7901 细胞,调整细胞浓度为 1×10^2 个 /ml,每孔中加入 1ml 细胞悬液,37℃,5%CO_2 条件下培养,每日更换新鲜的培养液,倒置显微镜下观察,进行 PAS 及 HE 染色。

1.3 免疫细胞化学法检测参与形成 VM 的 SGC-7901 细胞中 MMP-2 及 MT1-MMP 的表达

常规进行细胞的三维培养 72h。弃去其中的培养液,PBS 冲洗,95% 乙醇固定,0.3%H_2O_2- 甲醇液封闭内源性过氧化物酶,血清封闭,滴加兔抗人 MMP-2,MT1-MMP 多克隆抗体(武汉博士德公司),4℃湿盒过夜,滴加二抗(羊抗兔免疫组化试剂盒购自深圳晶美公司),37℃孵育 20min,DAB 显色,显微镜下观察结果。

1.4 LY294002 对胃癌细胞中 VM 生成的影响

常规进行细胞的三维培养,37℃,5%CO_2 孵育 1h,弃去其中的培养液。对照组和试验组每组设为 12 个复孔,试验组每孔加入含有 20μmol/L LY294002(美国 Cell signaling 公司)的培养液,试验组则每孔加入含有等体积 DMSO 的培养液,37℃,5%CO_2 条件下继续培养。每日更换 1 次培养液,培养 72h 后,倒置显微镜下观察结果,PAS 染色。选择 VM 结构相对集中的区域进行,每孔随机取上下左右中 5 个视野进行计数。

1.5 RT-PCR 检测 LY294002 对胃癌细胞中 MT1-MMPmRNA 表达水平的影响

实验组和对照组的设置同 1.4。人 MT1-MMPmRNA 引物使用 Primer5.0 软件进行合成,上游引物:5'-TGGCGGGTGAGGAATAAC-3',下游引物:5'-GCAGCATCAATCTTGTCGGT-3'。产物大小 330bp。使用内参照为 GADPH,上游引物:5'-GACCACCTGGTGCTCAGTGT-3',下游引物为:5'-GGAAGGTGAAGGTCGGGTC-3'。产物大小为 842bp。细胞中总 RNA 的抽提按照试剂盒说明书进行,RT:45℃逆转录 30min,99℃变性 5min,4℃保存。PCR 反应条件:94℃变性 2min, 94℃变性 30s,56℃延伸 30s,70℃退火 1min,总共 30 个循环,产物保存于 -70℃。取 RT-PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,比较实验组和对照组 MT1-MMPmRNA 吸光度, 对其进行半量分析。

1.6 Western blot 法检测 LY294002 对胃癌细胞中 MMP-2 蛋白表达的影响

实验组和对照组的设置同 1.4。细胞中总蛋白的提取按照试剂盒(购自碧云天公司)说明书进行,提取后进行蛋白浓度的测定,蛋白垂直电泳时按照等量加样。电泳条件:浓缩胶 80V,20min,分离胶 100V,40min,转膜条件:20mA,恒流,16h。脱脂奶粉封闭 2h,孵育兔抗人 MMP-2 多克隆一抗(稀释度为 1 : 100,购自武汉博士德公司),4℃过夜,孵育 HPR 标记的羊抗兔二抗(稀释度为 1:2 000,购自联科生物技术有限公司),37℃,2h。ECL 显色,凝胶成像仪下观测结果。

1.7 统计学方法

实验结果采用两样本均数比较的 t 检验,$P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 胃癌细胞株 SGC-7901 三维培养形态学观察

SGC-7901 细胞在接种后 8h 部分细胞开始变为长梭形,类似于血管内皮细胞,沿着胶原纤维生长,接种 24h 开始排列成线性结构、环形结构等形态,培养 72h 后则可以看到典型的环状 VM 结构,网络状结构。如图 1 为倒置显微镜下观察培养 72h 后的 VM 结构,视野中为 2 个背靠背的环形 VM,如箭头所示,参与形成 VM 的 SGC-7901 细胞变形,由多边形变为长梭形,类似于血管内皮细胞。图 2 为培养 72h 后 HE 染色结果,图中可以看到环形、半环形

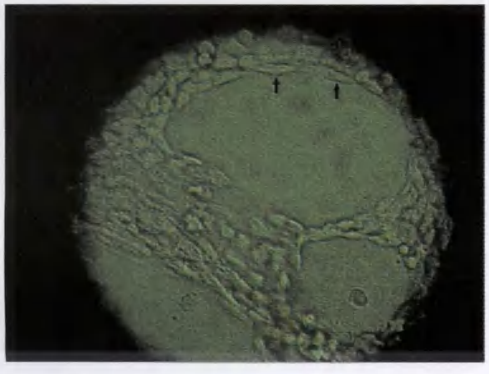


图 1 倒置显微镜下观察 SGC-7901 细胞血管生成拟态的形成 ×400

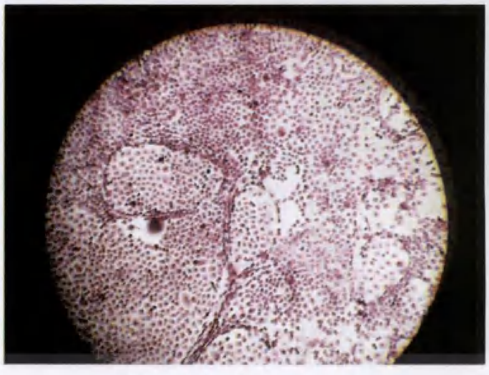


图 2 普通光学显微镜下观察 SGC-7901 细胞血管生成拟态的形成 HE 染色 ×200

重庆维普 http://www.cqvip.com

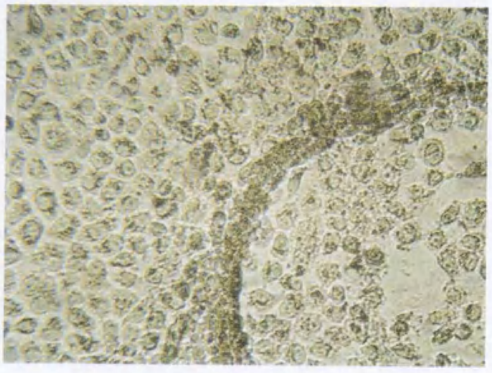


图 3 免疫细胞化学法检测参与血管生成拟态形成的 SGC-7901 细胞中 MMP-2 表达 ×400

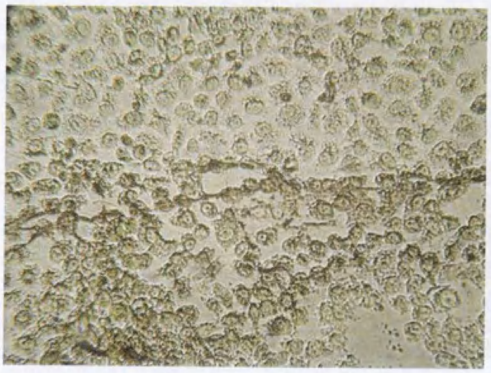
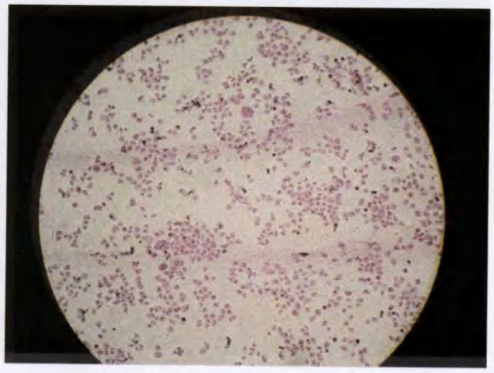


图 4 免疫细胞化学法检测参与血管生成拟态形成的 SGC-7901 细胞中 MT1-MMP 表达 ×400



使用 20μmol/L LY294002 处理后 SGC-7901 细胞没有明显的血管生成拟态形成

图 5 实验组血管生成拟态的形成 PAS ×200



对照组 SGC-7901 细胞有多个拟态血管的形成，表现为多个环状结构

图 6 对照组血管生成拟态的形成 PAS ×200

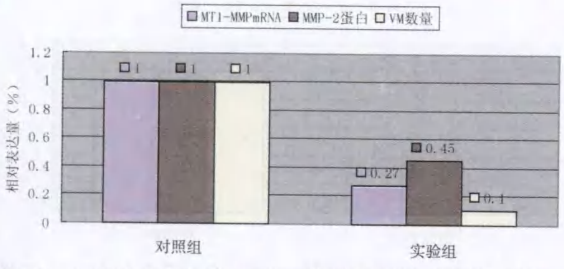


图 7 LY294002 对 SGC-7901 细胞中 MT1-MMPmRNA、MMP-2 蛋白表达及 VM 数量的影响

以及线形的 VM 结构，中央为 3 个背靠背的环形结构构成的网络状结构。

2.2 免疫细胞化学检测参与形成 VM 的 SGC-7901 细胞中 MMP-2 与 MT1-MMP 表达

图 3 为 MMP-2 免疫细胞化学染色结果，图中所示的是一个呈半环形的 VM 结构，可以看到，参与形成半环形结构的 SGC-7901 细胞染色较周围的其他细胞明显加深。图 4 则为 MT1-MMP 染色结果，图中央为 1 个环形的 VM 结构，参与形成的SGC-7901 细胞被染成棕黄色，周围的细胞染色也加深，而靠外围的细胞染色则较淡。

2.3 LY294002 对胃癌细胞 SGC-7901VM 形成的抑制作用

见图 5，为实验组细胞培养 72h 后 PAS 染色结果，视野中几乎看不到典型的 VM 结构出现。图 6 则为对照组，视野中可以看到多个环状结构，显微镜挑选 VM 结构相对集中的区域进行计数，对照组 VM 结构的数量为(5.12 ± 0.72)个，实验组则为(0.52 ± 0.49)个。差别具有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 RT-PCR 结果

实验组 MT1-MMPmRNA 相对表达量为(0.20 ± 0.10)，对照组则为(0.74 ± 0.10)。差别具有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 Western blot 结果

实验组 MMP-2 蛋白表达量较对照组明显降低。对照组蛋白相对表达量为(0.65 ± 0.15)，实验组则为(0.29 ± 0.13)，差别具有统计学意义($P<0.05$)。

实验组与对照组相比 MT1-MMP 与 MMP-2 的

重庆维普 http://www.cqvip.com

相对表达量分别下降了 73%与 55%,从而导致了VM数量下降为对照组的 10%。

3 讨 论

实体肿瘤的生长有赖于血管的形成。经典的肿瘤血管生成理论认为,当肿瘤的直径达到 2mm 时,需要激活内皮细胞形成自身的血管,否则就会因为缺血缺氧发生坏死。但在 1999 年美国 Maniotis 等[5]根据对人眼葡萄膜黑色素瘤微循环的研究,首次提出了一种与经典的肿瘤血管生成途径完全不同、不依赖机体内皮细胞的全新肿瘤微循环模式,即血管生成拟态的概念。从一方面为高度恶性肿瘤细胞快速生长和早期转移提供了一个新的可能的解释。Folberg 等[6]在有关 VM 的阐述中定义了几种形态的VM,包括有或无分支的弧形、封闭的环形、网络状、平行或交叉的直线形。在经典的二维培养体系中,细胞离开了体内与细胞外基质共同构成的整体环境,因而其表现的许多生物学特性与在体内存在较大的差异。本研究通过体外三维培养的方式为离体的胃癌细胞提供一个类似于体内的三维环境。在形态学试验中可以看到胃癌细胞由正常的多边形变为长梭形,类似于血管内皮细胞。Folberg 等[7]人在研究中发现参与形成 VM 的黑色素瘤细胞侵袭能力降低,不能再增殖,而在形态学上从上皮样细胞变为纺锤形细胞。说明了恶性肿瘤细胞的可塑性是VM 形成的机制之一。

基质金属蛋白酶是一组重要的细胞外基质降解酶,它们通过对细胞外基质中不同成分的降解,在肿瘤的侵袭、转移中起到重要的作用。在该家族中MMP-2在肿瘤细胞介导的细胞外基质的降解中起到重要的作用,而 MT1-MMP 则是 MMP-2 活化的条件。Richard 等[8]人在他们的研究中发现,高度恶性黑色素瘤细胞中 MMP-2 与 MT1-MMP 较低侵袭性黑色素瘤细胞高表达,并且在培养液中加入二者相应的抗体后,VM 现象受到抑制。Sood AK 等[9]在有关卵巢癌 VM 的研究中也得出了类似的结论。并且他们发现在 MMP-2、MT1-MMP 高表达的病例标本中坏死现象少见并且 VM 存在。在本实验中,免疫细胞化学结果说明二者在胃癌细胞 VM 的形成中也起到重要的作用,其高表达可以促进胃癌细胞 VM 的形成。

PI3K 信号通路参与细胞的增殖、分化和凋亡等过程。近年的研究发现其活性异常不仅可以导致细胞的恶性转化,而且与肿瘤细胞的迁徙、粘附、肿瘤血管的生成及细胞外基质的降解等相关。PI3K 信号通路是调节 MT1-MMP 和 MMP-2 的重要因素,而二者在胃癌细胞 VM 的形成中起到重要的作用。本实验结果和 Angela 等人[10]在有关恶性黑色素瘤细胞中 VM 现象的实验结论类似。这说明 PI3K 信号通路可以通过上调 MT1-MMP 和 MMP-2 的表达来促进胃癌细胞 VM 的形成。因此它可能成为抑制 VM 生成的一个新靶点。

VM 现象是一种有关肿瘤微循环模式的全新理论。有关其研究目前还处于起步阶段。相关的研究发现,VM 的发生可能和肿瘤细胞自身基因表达的变异、分子信号传递的改变[11]、肿瘤细胞自身的可塑性以及肿瘤组织微循环[12]的影响等等方面。有研究显示 VM 与高度恶性肿瘤的生长、侵袭和转移以及患者的预后都有十分重要的关系。目前针对肿瘤血管生成的治疗只是针对肿瘤自身血管,并没有考虑到 VM 这种微循环模式的存在。胃癌在临床上仍然是常见病,多数患者在发现时已属中晚期,预后不佳。有关 VM 的研究可能为其治疗提供一个新的途径。

参 考 文 献

[1] 孙保存,张诗武,赵秀山,等.恶性黑色素留血管生成拟态的研究[J]. 中华病理学杂志,2003;32(6):539-543.

[2] 赵 静,黄江生,杨爱军,等.肝细胞癌中血管生成拟态的三维培养及织学研究[J]. 癌症,2007;26(2):123-126.

[3] 范跃祖,孙 伟,张文忠,等.原发性胆囊癌患者的肿瘤血管生成拟态及其临床意义[J]. 中华医学杂志,2007;87(3):145-149.

[4] Sun BC,Zhang SW,Zhao XL, et al. Pilot study of mechanism on vasculogen-ic mimicry in bi-directional differentiated malignant tumors[J]. The Chinese-German Journal of Clinical Oncology,2005;4(1):50-52.

[5] Maniotis AJ,Folberg R,Hess A,et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro:vasculogenic mimicry [J]. Am J Pathol,1999;155(3):739-752.

[6] Folberg R,Maniotis A.Vasculogenic mimicry[J]. APMIS,2004;112(7-8):508-525.

[7] Folberg R,Arbieva Z,Moses J,et al.Tumor cell plasticity in uveal melanoma:microenvironment directed dampening of the invasive and metas-tatic genotype ang phenotype accompanies the generation of vasculogenic mimicry patterns[J]. Am J Pathol,2006;169(4):1376-

(下转第 1135 页)

重庆维普 http://www.cqvip.com

成脊柱或双下肢全长图像，图像密度均匀性、拼接质量及临床测量能够达到医疗的需要，但 CR 图像的空间分辨率和信噪比不及 DR 图像[3-4]。MRI 系统的全脊柱拼接成像有报告，MRI 能够获得密度均匀性好且拼接准确的理想的全脊柱影像，但缺点是 MR扫描病人不能直立检查，而脊柱侧弯需要观察重力状态下的侧弯程度，且 MRI 检查费用昂贵[5]。

近年来，DR 在图像拼接技术方面有很大提高，DR 拼接图像的原始图像采集方式有两种。一种图像拼接，往往是 X 线管垂直上下移动的同时，DR 平板探测器跟随 X 线管实现同步移动。另一种图像拼接，X 线管相对静止在一个感兴趣区中心位置，当 DR 平板探测器在上下做垂直运动的同时，X 线管上下转动角度。这两种方式只要有合适的图像拼接软件都可以满足临床诊断和治疗的需要，我院采用的是第一种方式，对 35 例骨科患者进行了全景拼接成像(见表 1)，获得较为满意的全脊柱侧弯病人术前、术后拼接图像和双下肢拼接图像(见图 1~3)。个矮的患者下肢全景成像通常两次曝光采集可完成。部分疾病的拼接图像临床医师不要求观察骨盆，仅显示从股骨开始的全景像，曝光采集两次完成，可降低患者的辐射剂量。准确拼接全脊柱和下肢图像的关键有两个要点，一个是轴线，二是缝线，图像轴线要对齐且不能成角，图像的衔接处不能分离且重叠较少，才能保证图像不变形，使测量更加准确。Canon 图像处理软件有一定的缺陷，无图像平滑处理，因此全景图像的密度均匀性不是很理想，但拼接的脊柱和下肢的全长图像及角度、长度测量可以满足骨科临床医疗需要。

参 考 文 献

[1] 张旭峰，严壮志，N.R.Wanigasekara，等.基于拼接技术的医学 X 光片全景成像[J]. 航天医学与医学工程，2005；18(5)：360-364.

[2] Yaniv Z，Joskowics L.Long bone panoramas from fluoroscopic X-ray images[J]. IEEE Trans Medical Imaging，2004；23(1)：26-36.

[3] 凌寿佳，黄仲奎，龙莉玲，等.全脊柱 CR 单次曝光与多次曝光成像的比较[J]. 实用放射学杂志，2006；22(10)：1285-1287.

[4] 白亚妮，贺洪德，邓振生.CR 在双下肢全长投照技术中的应用[J]. 实用放射学杂志，2006；22(9)：1141-1142.

[5] 杨 勇，贾勤刚，徐常杰，等.MRI 全脊柱移床扫描对脊柱疾病的诊断[J]. 实用放射学杂志，2004；20(7)：614-616.

(责任编辑：冉明会)

(上接第 1053 页)

[9] Akishita M，Wu L.Inhibitory effect of angiotensin Ⅱ type 2 receptor on arterial remodeling after aortic binding in mice[J]. Circulation，2000；102(14)：1684-1689.

[10] Siragy HM，Inagami T，Ichiki T，et al.Sustained hypersensitivity to angiotensin Ⅱ and its mechanism in mice lacking the subtype-2 (AT_2) angiotensin Ⅱ receptor[J]. Proc Natl Acad Sci USA，1999；96(11)：6506-6510.

[11] Jozef B，Ellen OW，Minori T，et al. Angiotensin Ⅱ type 2 receptor blockade amplifies the early signals of cardiac growth response to angiotensin Ⅱ in hypertrophied hearts[J]. Circulation，1999；99(1)：22-25.

[12] Lakó-Futó Z，Szokodi I，Sármán B，et al.Evidence for a functional role of angiotensin Ⅱ type 2 receptor in the cardiac hypertrophic process In vivo in the rat heart[J]. Hyper-tension，2003；108(19)：2414-2422.

[13] Masaki H，Kurihara T，Yamaki A，et al.Cardiac-specific over-rexpression of angiotensin Ⅱ AT_2 receptor causes attenuated response to AT_1 receptor-mediated pressor and chonotropic effects[J]. J Clin Invest，1998；101(3)：527-535.

(责任编辑：谭乐勤)

(上接第 1066 页)

1389.

[8] Richard EBS，Elisabeth AS，Naohiko K，et al. Cooperative interactions of laminin 5 γ2 chain，matrix metalloproteinase-2，and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vas- culogenesis by aggressive melanoma[J]. Cancer Res，2001；61(17)：6322-6327.

[9] Anil KS，Mavis SF，Jeremy EC，et al. Functional role of matrix metal-loproteinases in ovarian tumor cell plasticity[J]. Am J Obstet Gynecol，2004；190(4)：899-909.

[10] Angla RH，Elisabeth AS，Richard EBS，et al. Phosphoinositide-3-kinase regulates membrane type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry[J]. Cancer Res，2003；63(16)：4757-4762.

[11] Hess AR，Seftor EA，Gruman LM，et al. VE-cadherin regulates EphA2 in aggressive melanoma cells through a novel signaling pathway：implications for vasculogenic mimicry[J]. Cancer Biol Ther，2006；5(2)：228-233.

[12] Seftor EA，Meltzer PS，Kirschmann DA，et al. The epigenentic reorogra-mming of poorly aggressice melanoma cells by metastatic microenvironment[J]. J Cell Mol Med，2006；10(1)：174-196.

(责任编辑：谭乐勤)