维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)07-0817-04

抗 CXCR4 单克隆抗体 12G5 对胃癌细胞粘附与侵袭的影响

罗 君[1],吴小翎[2]

(1. 四川省南充市中心医院消化内科,南充 637000;2. 重庆医科大学附属第二医院消化内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨抗 CXCR4 单克隆抗体 12G5 对 SGC7901 细胞与基质的粘附性与侵袭性的影响。方法:应用 MTT 法、Transwell Chamber 体外侵袭实验技术检测 12G5(5 μg/ml、10 μg/ml、20 μg/ml)对胃癌细胞株 SGC7901 粘附、侵袭和迁移能力的影响。结果:(1)10 μg/ml 的 12G5 即可使胃癌细胞粘附 Matrigel 的能力明显受抑,与对照组相比($P<0.01$)。随着时间的延长及单抗浓度的加大,实验组的粘附能力低于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。(2)SGC7901细胞对照组和实验组侵袭迁移实验穿膜细胞数分别为:121.7 ± 5.51,54.3 ± 9.07;140.3 ± 6.03,62.0 ± 11.53。实验组的侵袭迁移能力明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论:12G5 能在一定程度上抑制 SGC7901细胞的粘附性及侵袭性。

【关键词】SDF-1/CXCR4;单克隆抗体;SGC7901细胞;细胞粘附;细胞侵袭;

【中图分类号】R735.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-29

Effects of anti-CXCR4 monoclonal antibody 12G5 on adhesion and invasion of gastric cancer cells

LUO Jun, et al

(*Department of Digestion, Central Hospital of Nanchong*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of anti-CXCR4 monoclonal antibody 12G5 on adhesion and invasion of SGC7901 cells. *Methods*: The effects of 12G5 (5 μg/ml, 10 μg/ml and 20 μg/ml, respectively) on the adhesive, invasive and migrative abilities of SGC7901 cells were explored by MTT and Transwell chamber. *Results*: (1)12G5 showed a time/dose-dependent inhibition effect on SGC7901 cells adhering Matrigel, and the adhesion of gastric cancer cells was inhibited on the concentration of 10 μg/ml of 12G5, and compared with untreated group, adhesion of SGC7901 cells was signficantly lower ($P<0.01$); (2) The invaded cell numbers in invasive and metastatic experiments of SGC7901 cell lines untreated or treated with 12G5 were 121.7 ± 5.51, 54.3 ± 9.07; and 140.3 ± 6.03, 62.0 ± 11.53 respectively, the invasive and metastatic abilities of treated group were lower than those of untreated group significantl ($P<0.01$). *Conclusion*: 12G5 may inhibit adhesion and invasion of SGC7901 cells to certain extent.

【Key words】SDF-1/CXCR4; Monoclonal antibody; SGC7901 cells; Cell adhesion; Cell invasion

目前研究证实,血管内皮生长因子(Vasular endothelial growth factor, VEGF)是许多恶性肿瘤发生、发展及转移最重要的因子之一。VEGF 作用的发挥依赖同相应的受体的特异性结合。VEGF 促进肿瘤血管生成,主要通过旁分泌机制与血管内皮细胞上 KDR 和 Flt-1 结合。近期 Bachelder RE 等研究发现 VEGF 与 NRP-1 结合,可能通过自分泌信号途径增强肿瘤的存活能力[1]和侵袭活性[2]。

在肿瘤细胞表面,NRP-1 与 VEGF 结合后促使 CXCR4 表达,CXCR4 与其配体 SDF-1 相结合引起肿瘤恶性行为的发生。多种胃癌细胞也表达VEGF 和 NRP-1[3],提示胃癌细胞可能同样存在 VEGF/NRP-1 自分泌信号途径。抗 CXCR4 单克隆抗体 12G5 最初应用于 HIV 感染相关研究,能特异地与靶细胞膜上的 CXCR4 结合,有效阻抑 SDF-1 诱导的细胞趋化效应及细胞内钙离子的增加[4]。本研究中,采用 12G5 抑制 CXCR4 的表达,阻断与 SDF-1 的结合,观察胃癌细胞株 SGC7901与基质的粘附、侵袭及迁移能力,阐明抑制 CXCR4 的表达对胃癌细胞粘附

作者介绍:罗 君(1980-),女,硕士,研究方向:消化道肿瘤。

通讯作者:吴小翎,男,教授,E-mail:wuxiaoling@cqmu.edu.cn。

维普资讯 http://www.cqvip.com

及侵袭的影响,为胃癌下一步的临床治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要设备及试剂

CO_2 恒温培养箱(美国 NURARE)、倒置相差显微镜(重庆光学仪器厂)、自动酶标仪(Bio-Rad 2500 型,美国)、RPMI1640(Gibco 公司)、胎牛血清(TBD 公司生产,-20℃保存)、MTT(北方同正生物技术公司)、重组人工基底膜 Matrigel(美国 BD 公司)、Transwell Chamber(8μm 孔径,美国 Costar 公司)、抗 CXCR4 单克隆抗体 12G5(-20℃保存,重庆百威生物科技有限公司)、SDF-1(PEPROTECH EC LTD 公司)、人胃癌细胞株 SGC7901来源于重庆医科大学基础研究所。

1.2 SGC7901 细胞的培养

SGC7901细胞常规培养于 10%的 FBS 的 RPMI1640 培养液中,放置于 37℃饱和湿度、5% CO_2 的孵箱中孵育,每 1~2d 换液 1 次,3~4d 用 0.1%胰酶常规消化传代培养备用。

1.3 实验分组

实验设对照组及实验组,对照组不加 12G5,只加培养液。粘附实验组 12G5 设立 3 个浓度组,分别为 5μg/ml、10μg/ml、20μg/ml,而侵袭迁移实验组 12G5 浓度为 10μg/ml,均在细胞进入对数生长期后开始加药,处理细胞 24h 后用于实验,各组均设 3 个平行孔。

1.4 MTT 法检测 SGC7901 细胞与基质的粘附程度

Matrigel 5μg 包被 96 孔板,0.1%的胰酶消化细胞,RPMI1640 调细胞为 1×10^4 个/ml,200μl/孔加入 96 孔板,37℃,5% CO_2 恒温培养箱常规培养。分别于 30min、60min、90min、120min 各时间点弃各孔培养液,PBS 洗涤 2 次。加无血清 RPMI1640 200μl/孔,再加入 MTT 溶液 20μl/孔,于孵箱孵育 4h。吸弃 MTT 液,加 DMSO 200μl/孔,微量振荡器振荡约 10min,自动酶标仪 570nm 波长下测各孔 A_{570} 值,计算细胞粘附率。粘附率 =(实验组 A_{570} 值 / 对照组 A_{570} 值)×100%

1.5 12G5 对 SGC7901 细胞侵袭迁移能力的影响

用 24 孔 Transwell 板,Matrigel 按 40μl/孔铺在 Transwell 侵袭小室底部聚碳酯膜上(迁移实验表面不铺 Matrigel),恒温培养箱成胶 30min,超净台紫外灯照射过夜,取 10μg/ml 12G5 处理 24h 的实验组细胞,实验前再次成胶 30min,调整细胞浓度为 5.0×10^5 个/ml(应是 10^5)的细胞悬液 100μl 接种到成胶的 Transwell 小室内。同时在小室下层加 600μl 含 100ng 重组人 SDF-1 的 10%FBS 的 RPMI1640 培养液作为趋化因子,对照组上室加未经 12G5 处理的细胞,下室与实验组相同。孵箱孵育 24h。取出小室用棉头擦掉 Matrigel,PBS 洗 3 次,95%乙醇固定 15min。常规 HE 染色,揭下聚碳酯膜贴片,树胶封片,光镜观察。

1.6 统计学分析

所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS10.0 统计学软件进行 t 检验。以 $P<0.05$ 表示差异显著,$P>0.05$ 为无显著差异。

2 结 果

2.1 12G5 对 SGC7901 细胞粘附的影响

结果表明,12G5 有一定的抗胃癌细胞 SGC7901 与基质的粘附作用,10μg/ml 的 12G5 即可使胃癌细胞粘附 Matrigel 的能力明显受抑,与对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$)。随着时间的延长,胃癌细胞 SGC7901粘附在 Matrigel 上的能力增加。相对 5μg/ml 实验组,10μg/ml 及 20μg/ml 12G5 实验组的粘附能力低于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)(见表 1)。

2.2 12G5 对 SGC7901 细胞侵袭迁移能力的影响

表 2 12G5 对 SGC7901 侵袭迁移能力的影响(个,$\bar{x}\pm s$)

分组	n	侵袭穿膜细胞数	迁移穿膜细胞数
对照组	3	121.7 ± 5.51	140.3 ± 6.03
实验组 **	3	54.3 ± 9.07	62.0 ± 11.53

注:与对照组比较:**$P<0.01$

表 1 12G5 对 SGC7901 细胞与基质粘附能力的影响 (%,$\bar{x}\pm s$)

分 组	30min	60min	90min	120min
对照组	0.261 ± 0.018	0.536 ± 0.015	0.763 ± 0.017	0.971 ± 0.022
5μg/ml▲	0.255 ± 0.019	0.512 ± 0.023	0.727 ± 0.029	0.935 ± 0.036
10μg/ml*△	0.186 ± 0.012	0.369 ± 0.019	0.525 ± 0.030	0.804 ± 0.031
20μg/ml▼●	0.138 ± 0.010	0.225 ± 0.010	0.382 ± 0.031	0.531 ± 0.023

注:▲表示与对照组相比 $P>0.05$;* 表示与对照组相比 $P<0.01$;▼表示与对照组相比 $P<0.01$;△表示与 5μg/ml 组相比 $P<0.01$;●表示与 10μg/ml 组相比 $P<0.01$;在 10μg/ml 及 20μg/ml 组,相同浓度、不同时间各组两两比较有显著性差异($P<0.01$),相同时间、不同浓度各组两两比较有显著性差异($P<0.01$)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

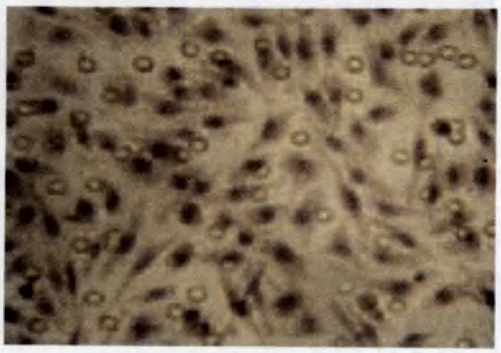


图 1 对照组 SCG7901 细胞的侵袭表现(HE×400)

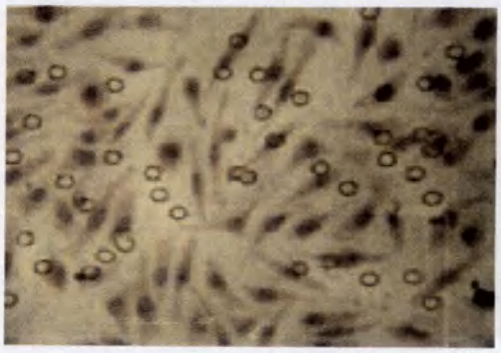


图 2 实验组 SCG7901 细胞的侵袭表现(HE×400)

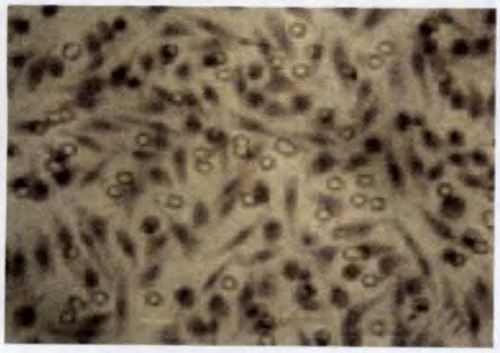


图 3 对照组 SCG7901 细胞的迁移表现(HE×400)

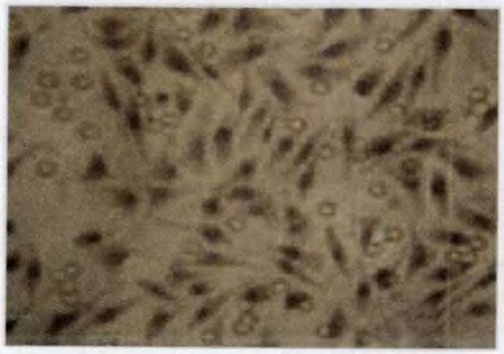


图 4 实验组 SCG7901 细胞的迁移表现(HE×400)

对照组与实验组比较差异有显著性,12G5 对 SGC7901细胞的侵袭迁移能力有显著抑制作用($P<0.01$)(见表 2,图 1~4)。

3 讨 论

目前研究证实,VEGF 是许多恶性肿瘤发生、发展及转移最重要的因子之一。VEGF 作用的发挥依赖于与其相应的受体结合。以前绝大多数的观点认为 VEGF 受体仅分布于血管内皮细胞,近来一些研究表明,VEGF 受体在一些肿瘤细胞表面也有表达。在肿瘤细胞表面,NRP-1 与 VEGF 结合后促使 CXCR4 表达,CXCR4 与其配体 SDF-1 相结合引起癌细胞的侵袭与转移。多种胃癌细胞也表达 VEGF 和 NRP-1[3],我们的前期实验已经证实表达 VEGF 和 NRP-1 的胃癌组织其淋巴结转移程度和组织侵润深度重于未表达 VEGF、NRP-1 的其他胃癌组织,提示此种胃癌细胞可能同样存在 VEGF/NRP-1 自分泌信号途径。本研究采用抗 CXCR4 单克隆抗体 12G5 抑制 CXCR4 的表达来阻断自分泌途径,观察 SGC7901 细胞与基质的粘附性与侵袭性变化,以探讨从阻断胃癌自分泌途径入手治疗胃癌的可行性。

Barbero S 等[5]研究发现人类多形性成神经胶质细胞瘤组织和两种人类胶质母细胞瘤细胞株,U87-MG 和 DBTRG-05MG 都有 CXCR4 和 SDF-1mRNA 的表达。这两种细胞在基础条件下能分泌 SDF-1,经脂多糖或 1%的胎牛血清处理后,细胞分泌 SDF-1 量大大提高。我们推测胃癌细胞株 SGC7901可能也存在 SDF-1 的自分泌,这需要我们下一步研究去证实。Kijima T 等[6]用 MTT 法研究发现 SDF-1 能增强 CXCR4 高表达的 NCI-H69 细胞的粘附达 3.14 倍。本实验中 10 μg/ml 的 12G5 即可使胃癌细胞粘附 Matrigel 的能力明显受抑。随着时间的延长,胃癌细胞 SGC7901粘附在 Matrigel 上的能力增加。但 10 μg/ml 及 20 μg/ml12G5 实验组的粘附能力明显低于对照组。表明 12G5 能有效的阻止 SGC7901细胞在基质层的粘着,证实了癌细胞自分泌途径的 CXCR4/SDF-1 轴在癌细胞向基质层粘附过程中具有重要作用。目前研究的资料显示,趋化因子及其受体可能在决定肿瘤转移部位方面发挥关键作用[7],胃癌表达的 CXCR4 可能与其他肿瘤类似, 通过与其天然配体 SDF-1 结合,具有多种生物学功能[8,9],

维普资讯 http://www.cqvip.com

它能通过刺激 DNA 合成促进肿瘤细胞的增生，通过增强细胞骨架功能提高肿瘤细胞的运动活性，通过诱导粘附分子表达增强肿瘤细胞与内皮细胞和(或)细胞外基质成分的粘附活性，进而增强肿瘤的侵润和转移活性等。但观察粘附情况，20 μg/ml 的 12G5 作用 120min 的实验组仍有一部分 SGC7901细胞附着，原因一方面可能是癌细胞分泌的其它细胞因子或粘附分子参与了胃癌细胞株 SGC7901的粘附过程，另一方面可能与 12G5 的剂量和作用时间不能达到完全阻断 CXCR4/SDF-1 结合的程度。

Muller A 等[10]研究发现，原发性乳腺癌在蛋白水平表达 CXCR4，许多乳腺癌细胞株也在mRNA 水平表达 CXCR4，CXCR4 与 SDF-1 结合能诱导乳腺癌细胞的迁移，并呈现一个剂量效应关系。SDF-1 能增强 NCI-H69 细胞的运动性，提高细胞的运动速度。SDF-1 刺激后，NCI-H69 细胞由圆形变为多边形，并且有神经突样突起形成，细胞膜边缘波动增加，丝状伪足和腹足形成频率更高[6]。本实验中对照组与 10 μg/ml 的 12G5 实验组比较差异有显著性，12G5 对胃癌细胞 SGC7901的侵袭迁移能力有显著抑制作用。

总之，通过本实验证实，抗 CXCR4 单克隆抗体 12G5 一方面可能通过下调 CXCR4 的表达，使CXCR4 与 SDF-1 的结合减少，另一方面由于 CXCR4 与其配体 SDF-1 在细胞膜表面结合，而抗 CXCR4 单克隆抗体能特异性地与靶细胞膜上的 CXCR4 结合，从而可能直接阻断了 CXCR4 与 SDF-1 的结合，使胃癌细胞的粘附、侵袭及转移能力等恶性生物学行为得到了一定程度的抑制，但不能完全阻断胃癌的恶性行为，可能与癌细胞存在其他的信号途径及复杂机制参与了胃癌的发生及转移有关，需要进一步研究证实。

参 考 文 献

[1] Bachelder RE, Crago A, Chung J, et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cell[J]. Cancer Res, 2001;61(15):5736-5740.

[2] Bachelder RE, Wendt MA, Mercurio AM. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4[J]. Cancer Res, 2002;62(24):7203-7206.

[3] Akagi M, Kawaguchi M, Liu W, et al. Induction of neuropilin-1 and vascular endothelial growth factor by epidermalgrowth factor in human gastric cancer cells[J]. Br J Cancer, 2003;88(5):796-802.

[4] Endres MJ, Clapham PR, Marsh M, et al. CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4[J]. Cell, 1996;87(4):745-756.

[5] Barbero S, Bonavia R, Bajetto A, et al. Stromal cell-derived factor lalpha stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt [J].Cancer Res, 2003;63(8):1969-1974.

[6] Kijima T, Maulik G, Ma PC, et al. Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function, and signal transduction through CXCR4 and c-Kit in small cell lung cancer cells[J]. Cancer Res, 2002;62(21):6304-6311.

[7] Joannopoulos KD, Zuberek K. Efficacious immunomodulatory activity of the chemokine stromalcell-derived factor 1(SDF-1): local secretion of SDF-1 at the tumor site serves as T-cell chemoattratant and mediates T-cell-dependent antitumor responses[J]. Blood, 2002;100(5):1551-1557.

[8] Taichman RS, Cooper C, Keller ET, et al. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone[J]. Cancer Res, 2002;62(6):1832-1837.

[9] Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, et al. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer[J]. Cancer Res, 2002;62(20):5930-5938.

[10] Muller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis[J]. Nature, 2001;410(6824):50-56.

(责任编辑：冉明会)