维普资讯 http://www.cqvip.c

文章编号:0253－3626(2005)01－0009－03

与小鼠囊胚共培养后人子宫内膜癌细胞侵袭、粘附和运动性的变化

王焕英[1]，赵　劼[1]，王　媛[1]，胡　凯[1]，姚珍薇[2]，王智彪[1]

(1.重庆医科大学生物医学工程系，重庆　400016；2.重庆医科大学临床学院妇产科，重庆　400016)

【摘　要】目的：了解小鼠囊胚体外对人子宫内膜癌细胞 RL95－2 侵袭力及粘附、运动性的影响作用。方法：建立小鼠囊胚与人子宫内膜癌细胞 RL95－2 共培养模型，分别采用 Matrigel 人工重建基底膜侵袭实验、MTT 法粘附实验和 Transwell 小室趋化性运动模型，来研究与小鼠囊胚共培养后，人子宫内膜癌细胞 RL95－2 体外侵袭能力、粘附性和运动性的改变。结果：小鼠囊胚与人子宫内膜癌细胞 RL95－2 共培养后，RL95－2 细胞穿过 Matrigel 人工基底膜的细胞数明显减少(14±5.66 vs 38.08±13.43，$P<0.01$)，30min 和 60min 的粘附率均降低($P<0.01$)，穿过 Transwell 小室聚碳酸脂微孔的细胞数也显著减少(24.69±1.57 vs 59.19±2.39，$P<0.01$)。结论：小鼠囊胚可降低恶性肿瘤细胞的侵袭能力，及侵袭相关的粘附性和趋化运动性。

【关键词】胚胎；肿瘤细胞；侵袭性；共培养

【中国图书分类法分类号】R73　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2004－04－07

Effects of mouse blastocysts on invasive, adhesive and mobile capacity of human endometrial carcinoma cells in vitro

WANG Huanying, et al

(*Department of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: This study was conducted to investigate the effects of mouse blastocysts on invasive, adhesive and mobile capacity of human endometrial carcinoma cells RL95－2 in vitro. *Methods*: RL95－2 cells were co－cultured with mouse blastocysts. Changes of invasive, mobile and adhesive capacity of RL95－2 cells were measured by the number of cells to penetrate polycarbonates coated with or without Matrigel, and adhesive rate by MTT after co－culture, respectively. *Results*: After co－culture with mouse blastocysts, number of RL95－2 cells to penetrate polycarbonates coated with or without Matrigel was significantly lower (14±5.66 vs 38.08±13.43 and 24.69±1.57 vs 59.19±2.39, respectively, $P<0.01$). Adhesive rate of RL95－2 cells was also significantly decreased at 30min and 60min ($P<0.01$). *Conclusion*: Mouse blastocysts can make invasiveness of malignant tumor cells decrease, and change invasion－related adhesive and mobile capacity in vitro.

【Key words】Embryo; Tumor cells; Invasion; Co－culture

侵袭和转移特性是恶性肿瘤细胞最为重要的生物学特性，是肿瘤发生和演进过程中最危险的阶段，对患者能否治愈及预后至为关键。70%实体性肿瘤患者在确诊时已有微转移或可见的转移灶。手术仍是目前治疗肿瘤的首选方法，但术后有 40%～60%的病人发生复发与转移，80%～90%的肿瘤患者死于肿瘤的侵袭转移及相关并发症[1,2]。因此，阻止肿瘤细胞的侵袭和转移成为肿瘤治疗的关键。

早在 1829 年，法国生物学家 Lobstein 和 Recamier 就提出了肿瘤的胚胎性起源的概念。近年，对肿瘤形成与胚胎发育对比研究不断深入，大量的实验研究发现在肿瘤形成与胚胎发育之间存在着诸多的相似之处[1,3]，提示两者有内在的本质联系。本实验以小鼠囊胚与恶性肿瘤细胞体外共培养为模型，观察、研究小鼠囊胚对恶性肿瘤细胞体外黏附、运动侵袭能力的影响，为从胚胎中寻找抗肿瘤细胞侵袭转移的机制和方法提供实验基础。

作者介绍：王焕英(1976－　)，博士，
主要研究方向：胚胎与肿瘤同源性

基金项目：本实验由重庆市超声医学工程省部共建国家重点实验室资助。国家杰出青年基金 NO.30325027。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康、成年昆明系(KM)小鼠,6～8 周龄,体重 20～25g,由重庆医科大学实验动物中心提供。25℃环境下饲养,光照周期 12L:12D,自由摄水、饮食,按 2:1 比例进行雌、雄鼠合笼过夜,次晨发现阴栓者为孕第 1 天(d_1)。

1.1.2 细胞株 人子宫内膜癌细胞株 RL95－2,由重庆医科大学医学超声工程研究所提供。

1.1.3 主要设备与试剂 TC2323 型二氧化碳孵箱,为美国 Shel－Lab 公司产品; IX70 型倒置显微镜、BX40 型生物显微镜为日本 Olympus 公司产品。Transwell Insert(无胶型和铺胶型),为美国 Becton & Dickinson 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人子宫内膜癌细胞 RL95－2 常规培养于含 10%灭活的小牛血清的 RPMI1640 完全培养液中。用 0.25%胰酶和 0.02%EDTA 消化细胞,调整细胞浓度为 1×10^5cells/ml,按 1ml/孔接种于 6 孔培养板中。至细胞完全贴壁,用 0.1 mol/LPBS(pH7.4)漂洗 3 次后,换为含 10%FBS 的 DMEM/F12(1:1)培养液待共培养实验。

1.2.2 小鼠囊胚的获得与共培养 取孕 d_4 鼠,脱颈处死,75%酒精常规消毒,开腹后剪取双侧子宫角,吸取 DMEM/F12 培养基冲洗子宫。在倒置显微镜下挑选发育至中晚期且质量良好的囊胚,移入到共培养细胞铺底的 6 孔培养板中,每孔 30 枚胚胎,于 37℃、5% CO_2、相对湿度为 95%～100%的孵箱中共培养,每 24h 添换培养液。共培养 72h～96h 后,待 RL95－2 细胞融合至 80%～90%时,终止共培养。以单独培养 RL95－2 细胞作为对照组,每次实验 2 孔/组,各组实验重复 3 次。

1.2.3 体外细胞侵袭实验 Transwell 小室为一杯状结构,杯孔直径 6.5mm;杯底由 8.0μm 孔径的聚碳酸脂微孔滤膜封闭。滤膜上均匀涂 1:5RPMI1640 稀释的人工基质 Matrigel 约 50μg/小室,用紫外线照射过夜,使用前加入少量无血清的培养基水化。将细胞消化、计数。因共培养体系中肿瘤细胞与囊胚细胞的数量相差悬殊(>10^2 级别),故可认为消化下的细胞为纯肿瘤细胞(以下实验同此)。取 2×10^5 个细胞接种于 Transwell 小室的上层小室内,小室下室加入 0.8ml 无血清培养 24h 的 NIH3T3 细胞上清液作为趋化因子。培养 48h 后,取出滤膜,用棉签轻轻擦去 matrigel 胶。甲醛固定,常规苏木素—伊红(H.E.)染色。低倍光镜下,每个滤膜分别取上、下、左、右、中心 5 个视野,高倍镜下计数穿过聚碳酸脂滤膜的细胞数。计算每个视野的平均数表示肿瘤细胞的迁移能力。

1.2.4 MTT 法细胞黏附实验 用 0.1%胰酶消化 RL95－2 细胞,台盼蓝拒染法计算活细胞数,调整细胞为 2×10^5cell/ml,直接接种于 96 孔培养板中,每孔加 200μl。另一孔加 RPMI1640 200μl 作为空白对照。37℃分别孵育 30min、60min 和 24h 取出培养板,弃未粘着细胞,加 200μl/孔 RPMI1640 培养液及 40μl/孔 MTT 液,37℃孵育 4h。吸除各孔上清液,加 200μl/孔 DMSO,在自动酶标读数仪上以 570μm 波长测定各孔 OD 值。每组实验设平行孔 5 孔,另设一组只加 RPMI1640200μl 作为空白对照。以 30min、60minOD 值比 24h OD 值计算得各时间组的细胞粘附率,进行统计检验。

1.2.5 趋化性运动能力测定 Transwell 小室(同前),直接将 RL95－2 细胞接种在小室内的聚碳酸脂微孔滤膜上,培养 24h 后取出滤膜,其余实验步骤和细胞记数方法同细胞侵袭实验。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两样本间均数比较行独立样本 t 检验,由 SPSS10.0 统计软件包处理完成。

2 结 果

2.1 小鼠囊胚与人子宫内膜癌细胞 RL95－2 共培养的生物学行为观察

小鼠囊胚与 RL95－2 细胞共培养 24h 后,即可观察到小鼠囊胚开始脱带,贴附于 RL95－2 细胞上,贴壁的小鼠囊胚周围的 RL95－2 细胞有生长方向的改变。随着共培养时间的延长,小鼠囊胚滋养层巨细胞继续向外扩展生长,周围的 RL95－2 细胞则被向后"推开",环绕在新生滋养层细胞周围。在小鼠囊胚滋养层细胞与 RL95－2 细胞交接处形成清晰的界限(图 1)。

2.2 小鼠囊胚对 RL95－2 细胞体外侵袭能力的影响

体外侵袭试验显示,共培养前后的 RL95－2 细胞均能够穿过铺有 Matrigel 胶的滤膜;共培养前、后两组穿过滤膜的细胞数目分别为 38.08±1.34 和 14±0.57 个,小鼠囊胚能够显著降低 RL95－2 细胞的体外侵袭能力($P<0.01$)。

2.3 小鼠囊胚对 RL95－2 细胞粘附能力的影响

MTT 法测定结果显示,与共培养前比较,共培养后人子宫内膜癌细胞 RL95－2 体外粘附率降低($P<0.01$)(表 1)。

2.4 小鼠囊胚对 RL95－2 细胞体外细胞趋化性运动能力的影响

体外趋化性运动实验显示,共培养前后的 RL95－2 细胞均能够穿过 8.0μm 孔径的聚碳酸脂

维普资讯 http://www.cqvip.com

微孔滤膜；共培养前，后两组穿过微孔的细胞数目分别为 59.19±2.39 和 24.69±1.57 个，小鼠囊胚能够显著降低 RL95－2 细胞的体外迁移能力($P<0.01$)。

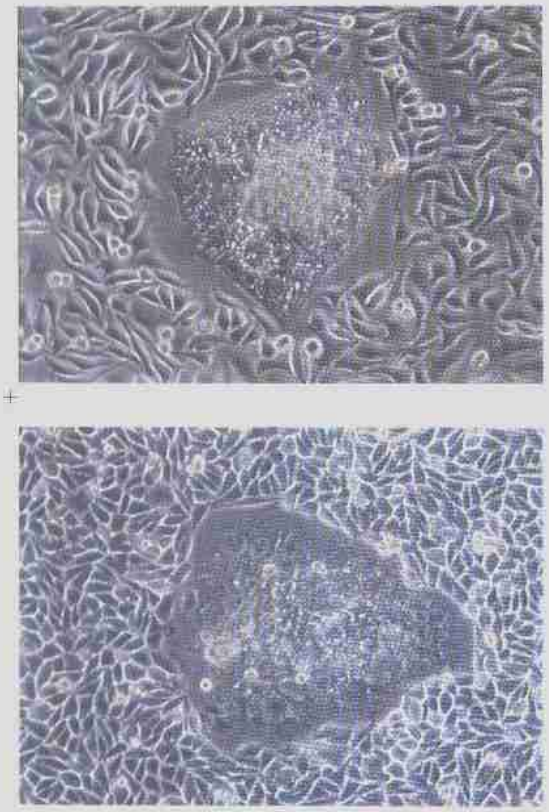


图 1　小鼠囊胚与人子宫内膜癌细胞 RL95－2 共培养 72h (A)和 96h(B)(100×)

表 1　体外与小鼠囊胚共培养对 RL95－2 细胞异质粘附率的影响

	肿瘤细胞粘附率(%)($\bar{x}\pm s$)		t	P
	对照组	共培养组		
30min	34.89±0.032	30.41±0.041	$t=3.878$	$P<0.01$
60min	70.09±4.33	54.83±3.67	$t=12.02$	$P<0.01$

3　讨　论

1829 年法国生物学家 Lobstein 和 Recamier 就提出了肿瘤的胚胎性起源的概念，他们认为肿瘤细胞是由持续存在于成体内的胚胎细胞发育形成。近年随着细胞生物学、分子肿瘤学、实验胚胎学、实验肿瘤学以及免疫胚胎学的发展，对肿瘤形成与胚胎发育对比研究不断深入，大量的实验研究发现在肿瘤形成与胚胎发育之间存在着诸多的相似之处，特别是滋养层细胞侵入子宫内膜的过程与肿瘤细胞的侵袭过程及相关机制有许多相似之处[1-3]。提示两者有内在的本质联系。

肿瘤侵袭转移是一个多阶段的、复杂的、具有高度选择性的过程[4]。根据肿瘤的侵袭假说，将其侵袭过程分为二步：首先细胞附着于基底膜，接着通过产生蛋白溶解酶，降解并消化基底膜中的基质成份，最终细胞穿过基底膜[5]。在侵袭转移过程中，具有侵袭转移能力的肿瘤细胞其细胞粘附性和运动性等均在与宿主组织的相互作用中起重要作用。肿瘤细胞的运动性和黏附能力是肿瘤发生侵袭转移过程的首要条件。本实验结果显示，小鼠囊胚与人子宫内膜癌细胞 RL95－2 体外共培养体系中，在小鼠囊胚滋养层细胞与 RL95－2 细胞交接处形成清晰的界限，RL95－2 细胞不能突破该界限，侵袭滋养层细胞或在其表面上生长。共培养后，RL95－2 细胞体外侵袭能力、异质性黏附及迁移性均显著降低，说明小鼠囊胚体外发育可以影响肿瘤细胞的生物学特性，降低肿瘤细胞的侵袭能力。这可能是由于在两种细胞的交接面上，滋养层细胞通过膜受体等，与肿瘤细胞进行信息交流，而使肿瘤细胞处于抑制状态；以及分泌、释放某些活性因子进入培养液中，而这些活性因子通过某种机制诱导 RL95－2 细胞性状发生改变。

实验结果说明，小鼠囊胚体外发育可以降低肿瘤细胞体外侵袭能力，这为从胚胎中寻找抗肿瘤细胞侵袭转移的机制和方法提供了一定的实验基础。胚胎与肿瘤同源性研究，具有广阔的、潜在的、深远的理论和实践意义。已有学者提出将胚胎植入作为抗组织侵袭的模型[6-7]。

参　考　文　献

[1] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmark of cancer[J]. Cell, 2000; 100(1): 57－70.

[2] Kohn EC, Liotta LA. Metastasis and angiogenesis: molecular dissection and noval applications. In Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, et al. eds. The molecular basis of cancer. 2nd ed. Philadephia: WB saunders company, 2001; 163－172.

[3] Murray MJ, Lessey BA. Embryo implantation and tumor metastasis: common pathways of invasion and angiogenesis[J]. Semin Reprod Endocrinol, 1999; 17(3): 275－290.

[4] William G. Stetler－Stevenson: Type IV Collagenase in tumor invasion and metastasis[J]. Cancer and Metastasis Reviews, 1990; 9: 289－303.

(下转第 19 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

不同的其它抗肿瘤药物也产生交叉耐药性。MDR的特点:①多出现于天然来源的抗肿瘤药物,这些药物通常为分子量较大的亲脂性化合物,如 CLC、VCR、VLB、ADM、DNR、ACTD、VP-16、VM-26、TAX 等。较少为抗代谢类和烷化剂类;②MDR 细胞中药物积累量减少;③MDR 细胞膜上出现一种特殊的蛋白,名为 P-糖蛋白(P-glycoprotein、P-gp),P-糖蛋白是目前公认的 MDR 生物学基础。

本实验以鼻咽癌细胞株 HNE-1 为研究对象,采用高能 X 射线照射细胞,得到 HNE-1(200)细胞,MTT 法检测提示,高浓度长春新碱对 HNE-1(200)的抑制率比对 HNE-1 细胞的抑制率降低了近 50%,P 值小于 0.01,有显著差异用免疫组化检测该细胞 P-糖蛋白表达,结果为 HNE-1 阴性,HNE-1(200)阳性,表明放射可以诱导细胞产生多药耐药,使细胞对化疗药物敏感性降低,与文献报道一致[1]。

研究肿瘤多药耐药的最终目的是逆转耐药,提高治疗敏感性。氧化苦参碱是从中药中提取的一种苦参型生物碱,已被证实有一定的抑瘤作用[6]和诱导癌细胞凋亡的作用[7]。本研究发现,氧化苦参碱对鼻咽癌 HNE-1 及 HNE-1(200)细胞生长均有抑制作用,呈浓度依赖关系,随着浓度的增加抑制作用也增加,提示氧化苦参碱对是否产生耐药的肿瘤细胞均有生长抑制作用,与文献报道一致[6]。进一步研究发现,低毒性浓度的氧化苦参碱(0.5mg/ml)可以使 HNE-1(200)细胞 P-糖蛋白表达减低,提示氧化苦参碱可能部分逆转肿瘤耐药,增加放疗后肿瘤细胞对化学治疗的敏感性。

维拉帕米是临床常用的钙通道阻止剂,是公认的第一代 P-糖蛋白抑制剂,但由于其心脏毒、副作用较大而限制了其在耐药逆转方面的应用[8]。在蛋白质水平上,维拉帕米逆转肿瘤耐药的机制是(1)竞争性抑制药物与 P-gp 或药物外排泵的结合。P-gp 是细胞对药物的共同外排泵,其特异性不高,维拉帕米能与药物竞争这一共同通道的结合而达到抑制药物的外排作用,(2)使 P-gp 磷酸化,抑制药物外排泵功能,结果细胞内抗肿瘤药物浓度增高。(3)最近又发现维拉帕米可诱导 P-gp 跨膜区蛋白的构象改变来抑制 P-gp 的作用。本研究表明,氧化苦参碱与维拉帕米作用相似,均能使抑制两种细胞增殖且使 HNE-1(200)细胞 P-糖蛋白表达下降,故推测氧化苦参碱可能具有与维拉帕米一致的耐药逆转作用,氧化苦参碱能否进一步逆转肿瘤细胞多药耐药,有待在今后的实验中作进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Hill BT, Deuchars K, Hosking LK, et al. Overexpression of P-glycoprotein in mammalian tumor cell lines after fractionated X-irradiation in vitro[J]. J Natl Cancer Inst, 1990; 82: 607-612.

[2] 朱宁希,罗文纪,虞荣喜. 苦参碱诱导白血病细胞株 HL-60 分化的实验研究[J]. 中国医药学报,2001;16(5):21-24.

[3] 许相儒,蒋纪恺. 苦参及其生物碱抗肿瘤活性研究进展[J]. 中西医结合杂志,1998;18(5):314-316.

[4] 陈鸿雁,王 驰,朱 旦,等. 抗肿瘤药物及苦参碱对 KBV200 细胞 P-糖蛋白表达的影响[J]. 临床检验杂志,2003;21:10.

[5] Dempke WCM, Hosking LK, Hill BT. Expression of collateral sensitivity to cisplatin, methotrexate, and fluorouracil in a human ovarian carcinoma cell line following exposure to fractionated X-irradiation in vitro (supplement)[J]. Semin Oncol, 1992; 19: 66-72.

[6] Yuan C, Lu SQ, Yao X. Effects of oxymatrine on the antitumor activity and toxicity of cyclophosphamide in mice[J]. Yao Xue Xue Bao, 1987; 22(4): 245-249.

[7] Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli[J]. Cell Prolif, 1991; 24(2): 203-214.

[8] 余润泉. 异博停逆转长春碱抗药性的实验及临床观察[J]. 中华血液学杂志,1988;9:340.

(上接第 11 页)

[5] Liotta LA. Tumor invasion and metastasis L Role of the basement membrane[J]. American J of Pathology. 1984; 117: 339-348.

[6] Arck PC, Hertwig K, Hagen E. Pregnancy as a model of controlled invasion might be attributed to the ratio of CD3/CD8 to CD56[J]. Am J Reprod Immunol. 2000; 44(1): 1-8.