DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.11.008

论著

文章编号:1000-5404(2003)11-0952-04

裸鼠高转移性胃癌细胞亚系的筛选及其肝细胞生长因子受体表达

秦 荣[1],张巧玉[2],陈 伟[3],何振平[4] (第三军医大学:[1]附属新桥医院普通外科,重庆 400037;附属西南医院:[2]妇产科;[3]放射科;[4]全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038)

提 要:目的 筛选具有较高转移能力的胃癌细胞亚系并从该细胞亚系肝脏重要生长因子受体表达变化这一角度初步探讨肝转移能力与肝脏微环境之间的关系。方法 通过复制裸鼠胃移植瘤模型及对该模型所产生的肝转移灶进行原代培养,获取具有较高转移潜能的胃癌细胞亚系,并应用免疫组化方法对母系与亚系细胞中重要肝细胞生长因子受体(bFGFR,TGFβR1,c-Met)表达的情况进行检测。结果 通过两轮筛选,从母系SGC-7901中筛选到高转移潜能胃癌细胞亚系SGC-7901LM_2。该亚系中c-Met表达同母系相比有显著增高。结论 高转移胃癌细胞亚系的筛选有利于胃癌肝转移的进一步研究,c-Met表达可能有助于SGC-7901LM_2肝转移能力的增强。

关键词:胃癌;转移;肝细胞生长因子受体
中图法分类号:R392.13;R73—35;R735.2 文献标识码:A

Screening of gastric carcinoma subcell line with higher metastatic potential and c-Met expression

QIN Rong, ZHANG Qiao-yu, CHEN Wei, HE Zhen-ping (Department of General Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To screen a gastric carcinoma subcell line with higher metastatic potential and to explore the relationship between the liver metastatic potential and liver microenvironment with the screened subcell line. **Methods** A gastric carcinoma subcell line was screened via procedures of orthotopic transplantation of subcutaneous tumor of its parent cell line SGC-7901 in nude mice and primary tissue culture of its liver metastatic focus. Expressions of bFGFR, TGFβR1 and c-Met(hepatocyte growth factor receptor) in both the subcell line and its parent cell line were determined by immunohistochemistry. **Results** A gastric carcinoma cell subcell line (named SGC-7901LM_2) was established from its parent cell line SGC-7901 with higher metastatic potential, and the expression of c-Met increased significantly in the screened subcell line. **Conclusion** The screened gastric carcinoma subcell line with higher metastatic potential is helpful for the further studies of liver metastasis of gastric carcinoma. The elevated expression of c-Met may be helpful to the liver metastatic potential of SGC-7901LM_2.

Key words: gastric carcinoma; metastasis; c-Met

胃癌是消化道常见恶性肿瘤,肝转移是晚期胃癌患者死亡的重要原因之一。目前对肿瘤及肿瘤转移的认识表明,肿瘤细胞具有异质性[1],肿瘤转移具有器官特异性[2],肿瘤转移的器官特异性又与肿瘤细胞与靶器官局部环境间的相互作用有关[3]。胃癌肝转移机制尚不清楚,筛选具有高转移能力的胃癌细胞亚系是胃癌肝转移研究的重要手段,本研究通过将胃癌裸鼠皮下移植瘤重新移植于裸鼠胃,对其自然产生的肝转移灶通过原代培养方法建立胃癌肝转移细胞亚系,并对该细胞亚系肝脏中主要细胞生长因子bFGFR(碱性成纤维细胞生长因子)、TGFβ(转化生长因子β)、HGF(肝细胞生长因子)等生长因子的受体(bFGFR,TGFβR_1,c-Met)表达变化进行初步研究,希望从该细胞亚系肝脏重要生长因子受体表达变化这一角度初步探讨肝转移能力与肝脏微环境之间的关系,借此深入了解胃癌肝转移行为。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞系 SGC-7901,购自上海细胞生物所。

1.1.2 实验动物 裸鼠20只,本校实验动物中心提供,SPF

作者简介:秦 荣(1969—),男,河北省兴隆县人,博士,主治医师,讲师,主要从事进展期胃癌转移和治疗方面的研究。电话:(023)68774605

收稿日期:2002-06-28;修回日期:2002-08-26

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

环境下饲养。bFGFR 单抗, TGFβR_1, c-Met 多抗均购自博士德公司。

1.2　高转移性胃癌细胞亚系的筛选方法

1.2.1　SGC7901 母细胞系的培养　　细胞复苏后接种于培养瓶内, 加含有 10% 小牛血清的 1640 培养基液, 置 37 ℃, 5%CO_2 孵箱内培养, 每周更换培养液 2 次, 细胞达 90% 融合时以 0.25% 的胰酶消化传代。

1.2.2　裸鼠胃癌皮下瘤的制备　　对数生长期肿瘤细胞消化后计数, 用 Hanks 液调细胞浓度为 1×10^5/ml。接种于裸鼠背部进行体内培养生长。

1.2.3　胃癌原位移植模型的建立　　参照文献[4]进行。无菌切下皮下瘤, 剔除坏死瘤组织, 在生理盐水中将其剪成 5~7 mm 大小, 用 2% 戊巴比妥麻醉裸鼠, 做左上腹直切口, 小心提出胃, 将上述准备好的瘤组织块缝合在以手术刀片轻轻划破的胃大弯中部浆膜层, 关腹。

1.2.4　裸鼠生长及频死处理　　裸鼠于 SPF 环境下生长, 每周观察 2 次。直至出现腹部巨大包块, 估计濒死时麻醉后处死裸鼠。取材标本, 或对已死裸鼠解剖寻找肝转移灶。若发现转移灶, 注意无菌及无瘤技术取材标本。

1.2.5　组织块法原代培养肝转移灶标本获取高转移性胃癌细胞亚系　　具体方法参照文献[5]进行。将肝转移灶标本无菌取材后, 修剪成约 1 mm× 1 mm× 1 mm 的小块, 以眼科镊送入培养瓶, 并用牙科探针将其整齐铺与瓶底, 缓缓加入少许培养液使瓶底湿润, 24 h 后补加培养液, 以后步骤同细胞培养。对已获取的细胞亚系重复进行上述步骤, 进行下一轮筛选。

1.3　免疫组化方法检测 bFGFR、TGFβR_1、c-Met 表达

采用 4% 多聚甲醛固定的细胞爬片进行免疫组化染色。细胞爬片免疫组化染色基本过程: 0.01 mol/L PBS 浸泡, 0.5% H_2O_2— 甲醇消除内源性过氧化氢酶, 复合消化液, 血清封闭, 消除非特异性染色, 依次加入一抗、二抗、三抗, DAB 染色, 中间步骤 PBS 漂洗, 具体步骤参照试剂盒进行。

1.4　统计学处理

染色结果以细胞图像分析仪进行分析, 以 SPSS10 进行 t 检验。

2　结果

2.1　高肝转移潜能细胞亚系的建立

8 只应用母系皮下瘤原位移植的裸鼠中共产生 2 例肝转移, 对其中最早出现的肝转移灶进行了组织块原代培养, 经过 40 余天的培养, 铺满培养瓶, 传代后生长稳定, 命名为 SGC-7901LM_1 细胞亚系, 并应用 SGC-7901LM_1 亚系细胞的裸鼠皮下瘤进行下一轮裸鼠胃癌原位移植。10 只裸鼠经过 2 个月共先后出现 5 例肝转移, 并且肿瘤出现其他部位转移明显减少。取其中最早发现的肝转移灶进行组织块原代培养, 稳定传代后, 命名为 SGC-7901LM_2 细胞亚系。病理组织学上, 同其母系 SGC-7901 相比, SGC-7901LM_2 细胞亚系的细胞形态趋向于单一, 以多边形细胞为主, 但仍含有一定比例的巨细胞。细胞核明显, 位于细胞中心, 核浆比例大, 含有 2~4 个核仁, 胞浆中含有少许颗粒性物质, 但同母系相比, 无明显区别。裸鼠皮下瘤中, 母系细胞生长密集, 而亚系细胞则倾向于有腺腔样结构, 见图 1, 2。

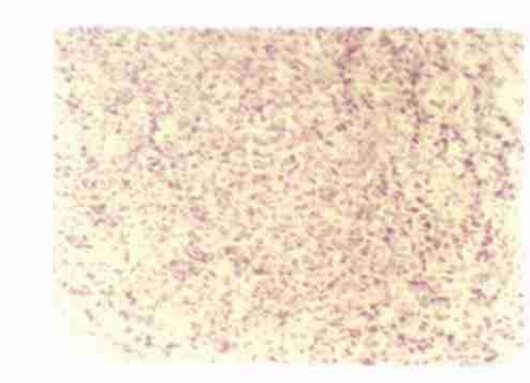


图 1　SGC-7901 的裸鼠皮下瘤　(HE× 200)

Fig 1　Subcutaneous tumor of SGC-7901 in nude mice　(HE× 200)

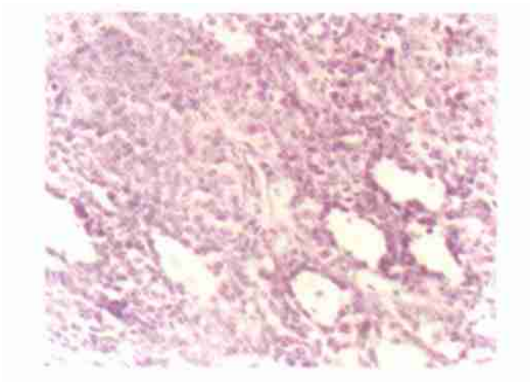


图 2　SGC-7901 LM_2 的裸鼠皮下瘤　(HE× 200)

Fig 2　Subcutaneous tumor of SGC-7901 LM_2 in nude mice　(HE× 200)

2.2　免疫组化水平相关指标的检测

bFGFR: 母系 SGC-7901 及 SGC-7901LM_2 细胞亚系中均为阴性表达。TGFβR_1: 阳性细胞为明显的包膜着色, 同时有胞浆着色。在母系 SGC-7901 及 SGC-7901LM_2 亚系细胞中均为阳性表达, 图像分析结果见表 1。c-Met: 阳性细胞为包膜着色为主, 伴有胞浆着色, 在母系 SGC-7901 细胞中为不均一性阳性表达, 但染色强度均较弱, 在 SGC-7901LM_2 亚系细胞中均为阳性表达, 同时同母系相比, 染色强度增强明显, 见图 3、4。图像分析结果见表 1。

表 1　胃癌细胞系中 c-Met、TGFβR_1 免疫组化染色 (平均光密度)($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Immunohistochemical staining of c-Met, TGFβR_1 in gastric carcinoma cell lines (Average optical densit)($\bar{x}\pm s$)

	SGC-7901	SGC-7901LM_2
c-Met	0.192 3±0.021 1 *	0.480 6±0.052 49
TGFβR_1	0.312 7±0.095 3	0.308 1±0.049 2

*: $P<0.05$ *vs* SGC-7901 LM_2

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

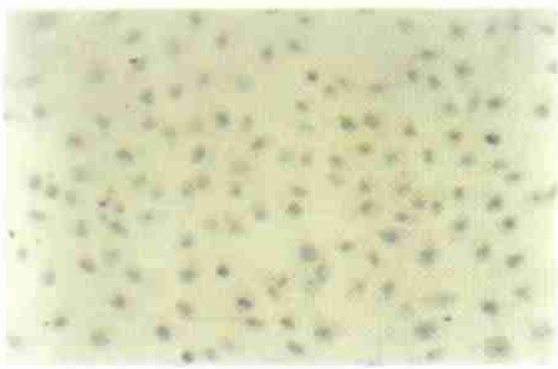


图3 SGC-7901 细胞中 c-Met 表达 (S-P× 200)

Fig 3 c-Met immnuohistochemistry stain in SGC-7901 cells (S-P× 200)

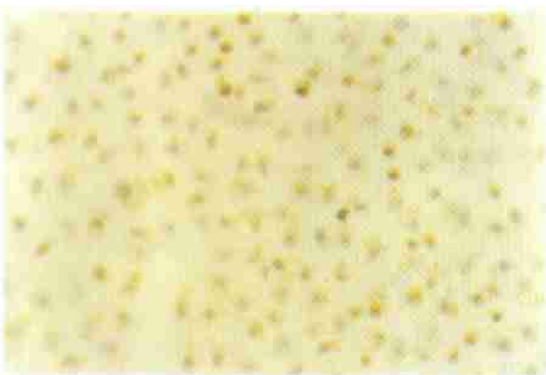


图 4 SGC-7901 LM_2 细胞中 c-Met 表达 (S-P× 200)

Fig 4 c-Met immunohistochemistry stain in SGC-7901 LM_2 cells (S-P× 200)

3 讨论

临床上晚期胃癌肝转移的治疗遵循晚期肿瘤的治疗原则,采用包括手术切除、新辅助化疗、辅助化疗、间质治疗等多种方法在内的综合治疗。虽然胃癌肝转移的治疗效果没有结肠癌肝转移的治疗效果好,但是通过上述治疗手段,确实可以使个别胃癌肝转移患者获得很长的存活期[6],但临床治疗进展不能仅寄希望于个别个案报道的积累,而更应基于对胃癌肝转移机理深入认识所提供的理论基础。应用高肝转移潜能细胞制备裸鼠肝转移模型是肿瘤肝转移研究的常用方法之一[7],其中高肝转移潜能肿瘤细胞则多通过将细胞直接注入脾脏后对其产生的肝转移细胞进行细胞培养,循环进行上述过程反复筛选而得。尽管这样的筛选方法耗时相对少,但仍存在一定不足,即:缺少肿瘤细胞自原发部位生长入血的过程,而肿瘤原发部位的局部环境对肿瘤细胞转移行为存在明显影响,所以如此筛选不能完全反映肝转移的全过程。

人胃癌的裸鼠原位移植模型表明其生长及进展与临床胃癌的自然病程十分相似。其在自然生长状态下产生的肝转移灶进行组织块培养,再对培养的细胞如上法进行下一轮操作,这样的过程由于比较全面的模拟了临床上胃癌肝转移的全过程,故所筛选出的细胞更能反映胃癌肝转移细胞的特性,适合胃癌肝转移的深入研究。本实验所介绍的方法筛选胃癌肝转移细胞的方法尚未见报道。通过上述筛选,同母系相比,亚系胃癌肝转移的发生率有明显提高(50% *vs* 25%),表明其应用有利于胃癌肝转移的深入研究。

肿瘤转移具有器官特异性,器官特异性转移的形成与肿瘤细胞同靶器官微环境间的相互作用有关。有研究提示:肝脏中存在的生长因子可能对肿瘤肝转移的形成起重要作用。bFGF、TGFβ 、HGF 是肝脏中存在的重要生长因子,这样上述生长因子受体在胃癌细胞中的表达则可能会对其肝转移能力产生明显影响。应用免疫组化方法对上述三种生长因子受体 bFGFR、$TGF\beta R_1$、c-Met 的表达进行了初步检测,我们观察到 $TGF\beta R_1$ 在母系及 SGC-7901LM_2 亚系细胞中均为明显的强阳性着色,其具体意义有待于进一步探讨;肝细胞生长因子受体 c-Met 表达在亚系中表达较母系明显增强,由于在肝脏中存在丰富的 HGF,故 c-Met 表达的增强可能在 SGC-7901LM_2 胃癌亚系细胞肝转移过程中起相对重要的作用。

成熟的 c-Met 为 190×10^3,是由 $140\times10^3\alpha$ 和 $45\times10^3\beta$ 亚单位通过二硫键而结合的异二聚体蛋白。其 α 亚单位的氨基末端位于细胞外,有其配体肝细胞生长因子的结合位点,羧基末端位于胞浆内,其 1 249,1 256 位酪氨酸残基为重要的磷酸化位点,这些酪氨酸磷酸化后可引起一系列的反应,如:增加移动、促进或抑制增殖、通过激活 uPA 而增加浸润、抑制凋亡、促进新生血管生成等[8],最近有研究[9]表明:在黑色素瘤肝转移细胞中 c-Met 表达起重要作用,HGF 对 c-Met 增殖抑制作用可以特异地被来自于肝脏的生长因子所逆转,而不影响 c-Met 的其他功能,这可能表明 c-Met 与肝转移之间存在着一定的特异性的联系。在胃癌及胃癌肝转移灶中,有 c-Met 的表达[10],这提示我们,有必要应用所筛选出的细胞亚系就 c-Met 表达对胃癌肝转移的影响行进一步研究。

参考文献:

[1] Poste G, Fidlerd I J. The pathogenesis of cancer metastasis[J]. Nature, 1980, 283(5743): 139—146.

[2] Pass H I, Temeck B A. Biology of metastatic disease[J]. Chest Surg Clin NAM, 1998, 8(1): 1—11.

[3] Nicolson G L. Paracrine and autocrine growth mechanism in tumor metastasis to specific sites with particular emphasis on brain and lung metastasis

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[J]. Cancer Metastasis Rev, 1993, 12(3—4): 325—343.
[4] 罗明华, 唐慰萍, 黄培根, 等. 人胃癌裸鼠原位移植模型的生物学行为研究[J]. 华人消化杂志, 1998, 6(10): 887—890.
[5] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司西安公司, 1999. 69—71.
[6] Morise Z, Yamafuji K, Takahashi T, *et al*. Successful treatment of recurrent liver metastases from gastric cancer by repeated hepatic resections: report of a case[J]. Surg Today, 2000, 30(11): 1041—1045.
[7] Kimura Y, Kobari M, Yusa T, *et al*. Establishment of an experimental liver metastasis model by intraportal injection of a newly derived human pancreatic cancer cell line(KLM-1)[J]. Int J Pancreatol, 1996, 20(1): 43—50.
[8] Ferracini R, Longati P, Naldini L, *et al*. Identification of the major autophosphorylation site of the Met/hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase[J]. J Biol Chem, 1991, 266(29), 19558—19564.
[9] Rusciano D, Lin S, Lorenzoni P, *et al*. Influence of hepatocyte growth factor/scatter factor on the metastatic phenotype of B16 melanoma cells[J]. Tumour Biol, 1998, 19(5): 335—345.
[10] 秦　荣, 何振平, 赵景宏, 等. 人胃癌细胞 c-Met 表达及其在胃癌转移中的意义[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(6): 707—709.

(编辑　薛国文)

(上接 951 页)

除气管导管。术后均恢复良好, 健康出院。

表 **1**　患者术中 **ABP** 变化(**mmHg**)

	术前	诱导后	开胸后	阻断上腔静脉后	开放上腔静脉后	术毕
例 1	113/76	110/72	95/59	87/54 *	88/52	104/72
例 2	129/84	127/70	104/68	95/60 *	87/48	113/75
例 3	103/54	108/61	99/67	75/46 *	78/50	121/78

*: $P<0.05$ 与开胸后比较

表 **2**　患者上腔静脉、下腔静脉压力变化(**cmH_2O**)

	阻断上腔静脉前		阻断上腔静脉后		开放上腔静脉后	
	上腔静脉	下腔静脉	上腔静脉	下腔静脉	上腔静脉	下腔静脉
例 1	18	6	25	5	6	5
例 2	23	7	27	6	7	5
例 3	16	5	22	4	6	6

2　讨论

3 例患者的肿瘤已侵及上腔静脉, 导致面颈部血液回流不畅, 颜面浮肿影响生活质量, 应积极手术治疗。手术切除中需阻断并置换上腔静脉, 常规应在体外循环下完成。但由于上腔静脉长期回流受阻, 患者对淤血耐受较强, 且形成侧支循环, 具有一定代偿能力, 故我们采用非体外循环的麻醉方法, 较短时间阻断上腔静脉并未对患者身体造成不可逆的损伤, 我们认为应注意如下事项。

同时监测上腔静脉及下腔静脉的压力。由于上腔静脉回流受阻, 其压力明显高于中心静脉压, 所以下腔静脉的压力反映中心静脉压力更准确, 并且术中对比上腔静脉及下腔静脉的压力变化有重要的意义。在阻断上腔静脉期间对比上腔静脉及下腔静脉的压力, 结合上腔静脉压力在阻断后升高的幅度, 可大致了解阻断期间的淤血严重程度; 开放上腔静脉后对比上腔静脉及下腔静脉的压力, 结合上腔静脉压力在开放后下降的幅度, 可判断移植后是否通畅。

该手术出血较多, 术前应建立有创动脉血压监测, 开放股静脉备快速输血输液用, 术中注意维持循环稳定, 备好血源和血管活性药物, 应用抑肽酶进行血液麻醉, 可改善出血较多时的凝血功能, 预防 DIC 发生[1,2]; 由于手术创伤及大量输血和输液, 容易发生电解质紊乱, 应予以及时纠正; 阻断上腔静脉期间因淤血产生局部循环不畅, 供氧不足导致乳酸生成增加且不能及时排除, 可产生代谢性酸中毒, 根据我们的血气分析结果 3 例患者均需要输入碳酸氢钠纠正。

由于大脑静脉血液回流受阻, 脑细胞水肿, 所以应重视对大脑的保护。麻醉诱导选用硫喷妥钠可减少大脑细胞的耗氧; 术中维持麻醉选用异丙酚也以降低脑氧耗, 防止乳酸的进行性升高[3]; 低温对脑保护的优良作用, 可采用冰帽进行降温; 早期大剂量甲基强的松龙可升高脑内保护性生化因子水平, 有助于缺血后早期神经元保护[4]; 另外开放上腔静脉前应控制全身血液循环量, 开放后静滴甘露醇减轻脑水肿。

术毕继续给予镇静药物使患者处于睡眠状态, 并给肌松药用呼吸机控制呼吸过夜, 术毕立即让患者清醒并拔出气管导管导致血压升高, 可能引起上腔静脉吻合口出血, 并且清醒后患者大脑耗氧量增加, 不利于大脑淤血引起的脑细胞水肿损伤的早期恢复。回病房后应密切观察患者的瞳孔变化, 继续给予大脑细胞保护及营养药物。

采取一定的保护措施非体外循环的麻醉方法完成该手术可行的, 且与常规体外循环完成该手术比较能简化手术操作步骤, 有利于术后患者恢复, 减少患者费用。但术中应注意阻断后上腔静脉压力升高的幅度及密切观察颜面部尤其是球结膜的水肿程度来判断大脑的淤血严重程度。上腔静脉长时间阻断可能对大脑造成不可逆损伤, 所以对术中需较长时间阻断的患者, 或试阻断后不能耐受的患者, 应在血液转流下完成该手术。

关键词: 麻醉; 胸腺瘤; 移植
中图法分类号: R614　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Landis R C, Hascard D O, Taylor K M. New antiinflammatory and platelet-preserving effects of aprotinin[J]. Ann Thorac Surg, 2001, 72(5): 1808—1813.
[2] Stewart A, Newman L, Sneddon K, *et al*. Aprotinin reduces blood loss and the need for transfusion in orthognathic surgery[J]. Br J Oral Maxillofac Surg, 2001, 39(5): 365—370.
[3] 魏　蔚, 王泉云. 异丙酚对体外循环中脑氧代谢的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2000, 16(2): 70—73.
[4] 富　壮, 赵继宗. 大剂量甲基强的松龙治疗重型颅脑损伤[J]. 中华神经外科杂志, 1999, 15(1): 23—25.

(编辑　栾　嘉)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net