

肿瘤发病机制与治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000038

不同迁移潜能食管癌 Ec-109 细胞株的建立及生物学特性比较

郭金宝, 汪 斌

(重庆医科大学附属第一医院胸心外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:建立高、低迁移能力食管癌 Ec-109 细胞亚型,并研究其生物学特性差异及其可能机制。**方法:**改良 Transwell 小室迁移实验筛选出高、低 2 种迁移潜能食管癌 Ec-109 细胞亚群。通过生长曲线、倍增时间检测 2 种细胞的生长差异;采用 Transwell 小室检测迁移能力和侵袭的差异;RT-PCR 及 Western blot 检测 RhoC 及基质金属蛋白酶-9(matrix metal proteinase-9, MMP-9)表达的差异。**结果:**改良迁移实验成功筛选出高、低 2 种迁移潜能食管癌细胞亚群(Ec-109H 和 Ec-109L), Ec-109H 和 Ec-109L 食管癌细胞体外生长速度、倍增时间差异无统计学意义($P=0.105$);迁移细胞数分别为(124.9 ± 6.8)和(43.9 ± 6.3)($P=0.000$);侵袭细胞数分别为(50.0 ± 9.7)和(15.2 ± 5.1)($P=0.000$);RT-PCR 和 Western blot 均显示 Ec-109H 食管癌细胞在基因水平和蛋白水平的 RhoC 表达均显著高于 Ec-109L 食管癌细胞($P=0.000$), MMP-9 表达差异无统计学意义($P=0.523$ 和 $P=0.655$)。**结论:**RhoC 在食管癌的迁移转移中发挥重要作用,而 MMP-9 在食管癌的迁移转移中发挥的作用不明显。

【关键词】食管癌;细胞迁移;侵袭;RhoC;基质金属蛋白酶-9

【中图分类号】R655.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-09-07

Establishment of esophageal Ec-109 cell lines with different migration abilities and comparison on their biological characteristics

Guo Jinbao, Wang Bin

(Department of Cardiothoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To establish esophageal Ec-109 cell subtypes with high and low migration abilities and to explore the possible mechanisms of their different biological properties. **Methods:** Ec-109 cell subtypes with high and low migration abilities were selected out by modified Transwell chamber migration experiment. Growth differences of the two cell types were detected by growth curve and doubling time. Migration and invasion abilities of the two cells were observed by Transwell chamber. Expression of RhoC and matrix metal proteinase-9(MMP-9) in the two cells was detected by RT-PCR and Western blot. **Results:** Ec-109 cell subtypes with high and low migration abilities(Ec-109H and Ec-109L) were successfully selected out by modified Transwell chamber migration experiment. No statistical difference was observed between Ec-109H and Ec-109L in growth rate in vitro or doubling time($P=0.105$). Numbers of migrated cells were 124.9 ± 6.8 and 43.9 ± 6.3 respectively($P=0.000$). Numbers of invaded cells were 50.0 ± 9.7 and 15.2 ± 5.1 respectively($P=0.000$). Expression of RhoC was higher in Ec-109H than in Ec-109L demonstrated by RT-PCR and Western blot($P=0.000$), but there was no statistical difference in expression of MMP-9 between the two cell types($P=0.523$ and $P=0.655$). **Conclusion:** RhoC plays an important role in migration and metastasis of esophageal cancer, while MMP-9 does not.

【Key words】 esophageal cancer; cell migration; invasion; RhoC; matrix metal proteinase-9

肿瘤细胞转移涉及变形迁移与细胞间黏附减少的间质转型^[1],肿瘤细胞的迁移在肿瘤转移中起到决定作用^[2]。Transwell 小室法是经典的检测细胞迁移模型,迁移潜能强的细胞更容易穿过 Transwell 小室^[3-4]。食管癌易发生转移,迁移在食管癌转移中起什么作用及相关机制报道甚少。本实验运用

Transwell 小室筛选高低迁移潜能的食管癌 Ec-109 细胞,比较它们生物学特性差异,并探讨其可能的机制,为进一步研究食管癌迁移转移机制提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

RPMI1640(Gibco, USA);小牛血清(杭州四季青公司);Transwell 小室,孔径 8 μm (Millipore, USA);Matrigel 胶(大鼠

作者介绍:郭金宝, Email: guojinbao@126.com,

研究方向:食管肿瘤病学。

通信作者:汪 斌, Email: wangbin999666@yahoo.com.cn。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000038.html>

ESH肉瘤细胞外基质提取物, BD 公司); Ec-109 为人食管癌细胞系 (中国科学院上海细胞库); 小鼠抗人 β -actin 抗体 (Santa Cruz 公司), 兔抗人 RHOC 抗体 (Proteintech 公司), 鼠抗人基质金属蛋白酶-9 (matrix metal proteinase-9, MMP-9) 抗体 (Santa Cruz 公司)。

1.2 方法

1.2.1 食管癌细胞系 Ec-109 的培养 Ec-109 细胞在含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中培养, 孵育箱条件为 5% CO₂, 37 °C。每 3~4 d 传代 1 次。

1.2.2 高低迁移潜能的食管癌 Ec-109 细胞亚型的建立及鉴定 细胞迁移小室 Transwell 放入 24 孔培养板中, 小室内加入 0.4 ml Ec-109 细胞悬液, 细胞总数 2×10^5 个。24 孔培养板中加入 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液 0.6 ml。15 h 后迁移至 24 孔培养板上的细胞为高迁移潜能的细胞, 命名为 Ec-109H, 以后每 2 日将 Transwell 小室移到同样培养液的新孔中, 更换小室内的培养液。第 15 天用胰酶消化并收集小室内的细胞, 此为低迁移潜能的细胞, 命名为 Ec-109L。建立 Ec-109H 和 Ec-109L 亚型细胞株。检测细胞迁移能力: Transwell 小室内分别加入 Ec-109H 和 Ec-109L 食管癌细胞, 每孔 0.4 ml 细胞悬液, 共 2×10^5 个, 3 个复孔。培养 20 h 后取出 Transwell 小室, 擦去 Transwell 小室内的细胞, 多聚甲醛固定。瑞氏染液染色, 取 5 个随机高倍视野计数细胞。检测细胞侵袭能力: Matrigel 胶按 1:5 稀释后, 40 μ l 加入 Transwell 小室内, 其余同迁移实验, 30 h 后, 固定、染色、计数。

1.2.3 MTT 法检测细胞的生长曲线、倍增时间 生长曲线: 调整 Ec-109H 和 Ec-109L 食管癌细胞密度为 1×10^4 个/ml, 200 μ l/孔加入 8 块 96 孔板中, 设 8 个复孔。当日取 1 块 96 孔板加入浓度为 5 mg/ml MTT 溶液 (20 μ l/孔) 4 h 后加二甲亚砜 (200 μ l/孔), 全自动酶标仪检测 A_{570nm}。以后每日于相同时间取出 1 块 96 孔板检测 A_{570nm}。以天数为横轴, A_{570nm} 的吸光值为纵轴, 绘制生长曲线。倍增时间: 调整 Ec-109H 和 Ec-109L 食管癌细胞密度为 1×10^4 个/ml, 200 μ l/孔分别加入 96 孔板中, 每种细胞设 8 个复孔。培养 7 d 后计数每孔细胞数。根据公式: $7 \times \lg 2 \times (\lg x - \lg y)^{-1} \times 24$ h (其中 x 为 7 d 后计数出的细胞数目, y 为起始细胞数目) 计算出倍增时间 (h)。

1.2.4 RT-PCR 检测 RhoC、MMP-9 基因的表达 分别收集 Ec-109H 和 Ec-109L 食管癌细胞并提取总 RNA, 取 2 μ l 总 RNA 为模板逆转录为 cDNA 再进行 PCR 扩增。RhoC 上游引物序列 5'-CTCCTCATCGTCTTCAGCAAG-3'; 下游引物 5'-GTCCTTCTTATTCCTCCACCAG-3', 扩增片段长 300 bp。MMP-9 上游引物序列 5'-GCACCACCACAACATCACCTAT-3'; 下游引物序列 5'-CAGGGACCACAACCTCGTCATC-3', 扩增片段长 289 bp。以 GAPDH 作内参照, 上游引物序列 5'-GAGCCAAAAGGGTCATCATCTC-3'; 下游引物 5'-AAAGG-TGGAGTGGGTGTC-3', 扩增片段长 542 bp。PCR 循环条件为: 94 °C 变性 30 s; 57 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 1 min (循环 34 个周期)。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果通过凝胶成像系统进行分析。以吸光度值比做统计分析。

1.2.5 Western blot 检测 RhoC 蛋白及 MMP-9 蛋白的表达 分别收集 Ec-109H 和 Ec-109L 食管癌细胞, 加入细胞裂解液提取细胞总蛋白, 取 40 μ g 总蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳

(15% 浓缩胶, 10% 分离胶), 然后转移至聚偏二氟乙烯膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液封闭 2 h, 分别加入 1:300 稀释的兔抗人 RHOC 多克隆抗体、1:300 稀释的兔抗人 MMP-9 多克隆抗体和 1:2 500 的 β -actin 一抗过夜后, 室温孵育 2 h。TBST 洗膜后加入 1:2 500 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗, 温育 2 h, 再经 ECL 化学发光, 显影, 定影后分析。以吸光度值比做统计分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 均数间比较采用两独立样本 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 人高、低迁移潜能食管癌 Ec-109 细胞亚系的建立及鉴定

Transwell 小室肿瘤细胞迁移实验成功筛选得到了高、低迁移潜能的食管癌细胞亚系 (Ec-109H 和 Ec-109L 食管癌细胞)。光镜下两者形态无明显差异。为了鉴定细胞亚系建立是否成功, 本实验通过 Transwell 迁移及侵袭实验证实, 20 h 后, Ec-109H 食管癌细胞与 Ec-109L 食管癌细胞迁移出小室膜的细胞数量分别为 (124.9 ± 6.8) 个/视野, (43.9 ± 6.3) 个/视野 ($t=26.056, P=0.000$), 差异具有统计学意义。30 h 后, Ec-109H 食管癌细胞与 Ec-109L 食管癌细胞侵袭穿透人工基底膜的细胞数量分别为 (50.0 ± 9.7) 个/视野, (15.2 ± 5.1) 个/视野 ($t=9.497, P=0.000$) 差异具有统计学意义。证实了 Ec-109H 食管癌细胞迁移、侵袭能力强于 Ec-109L 食管癌细胞。见图 1~4。

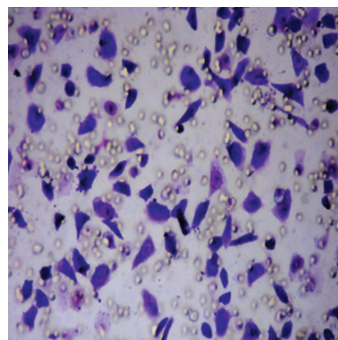


图 1 Ec-109H 食管癌细胞迁移细胞数 (200 $\times$)

Fig.1 Numbers of migrating Ec-109H cells (200 $\times$)

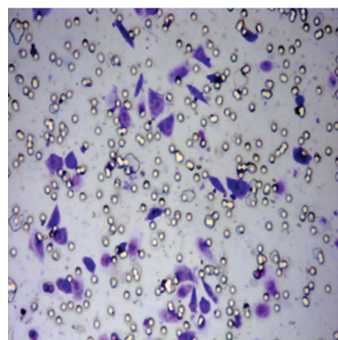


图 2 Ec-109L 食管癌细胞迁移细胞数 (200 $\times$)

Fig.2 Numbers of migrating Ec-109L cells (200 $\times$)

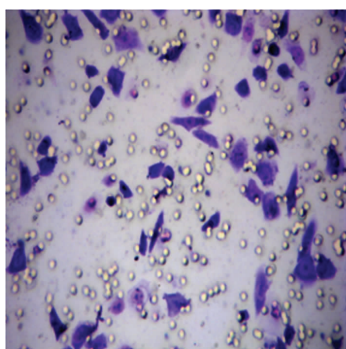


图 3 Ec-109H 食管癌细胞侵袭细胞数 (200 ×)

Fig.3 Numbers of invading Ec-109H cells (200 ×)

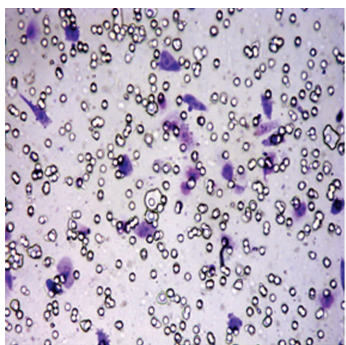


图 4 Ec-109L 食管癌细胞侵袭细胞数 (200 ×)

Fig.4 Numbers of invading Ec-109L cells (200 ×)

2.2 MTT 法检测 Ec-109H 和 Ec-109L 食管癌细胞的生长曲线和倍增时间

生长曲线见图 5;倍增时间:Ec-109H 食管癌细胞: (21.24 ± 0.5) h, Ec-109L 食管癌细胞倍增时间: (22.41 ± 0.6) h ($t=1.731$, $P=0.105$), 差异无统计学意义。

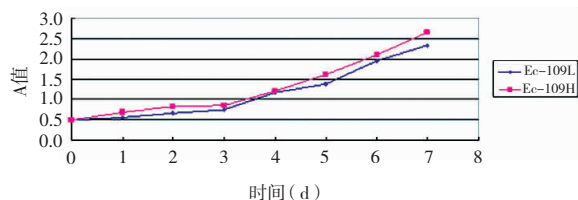


图 5 Ec-109H 组和 Ec-109L 组食管癌细胞生长曲线

Fig.5 Growth curves of Ec-109H cells and Ec-109L cells

2.3 RT-PCR 检测 RhoC、MMP-9 基因的表达

RT-PCR 结果显示,灰度扫描显示 RhoC 在 2 组条带平均吸光度值与内参平均吸光度值的比值分别为 (0.914 ± 0.023) 和 (0.572 ± 0.017) ($t=37.854$, $P=0.000$), 差异有统计学意义,在 mRNA 水平 RhoC 在 Ec-109H 食管癌细胞中表达明显高于 Ec-109L 食管癌细胞。MMP-9 在 2 组条带平均吸光度值与内参平均吸光度值的比值分别为 (0.433 ± 0.013) 和 (0.429 ± 0.014) ($t=0.652$, $P=0.523$), MMP-9 在 Ec-109H 和 Ec-109L 食管癌细胞中的表达差别无统计学意义。见图 6。

2.4 Western blot 检测 RhoC 及 MMP-9 蛋白的表达

图像分析系统结果显示,RhoC 蛋白在 Ec-109H 和 Ec-

109L 食管癌细胞中表达的平均吸光度值与内参平均吸光度值的比值分别为 (0.636 ± 0.014) 和 (0.255 ± 0.014) ($t=61.313$, $P=0.000$), 差异有统计学意义,蛋白水平 RhoC 在 Ec-109H 食管癌细胞中表达明显高于 Ec-109L 食管癌细胞;而 MMP-9 分别为 (0.135 ± 0.004) 和 (0.136 ± 0.003) ($t=0.455$, $P=0.655$), MMP-9 蛋白在 Ec-109H 和 Ec-109L 食管癌细胞中的表达差别无统计学意义。见图 7。

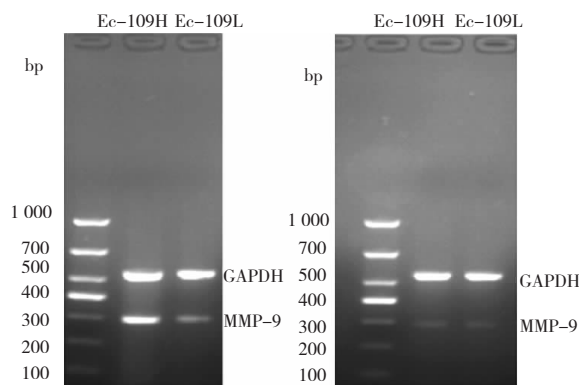


图 6 RT-PCR 检测 RhoC、MMP-9 基因在 Ec-109H 与 Ec-109L 食管癌细胞中表达

Fig.6 Expression of RhoC and MMP-9 in Ec-109H cells and Ec-109L cells detected by RT-PCR

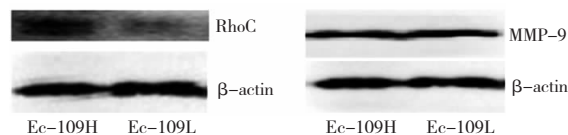


图 7 Western blot 检测 RhoC、MMP-9 蛋白在 Ec-109H 与 Ec-109L 食管癌细胞中表达

Fig.7 Expression of RhoC and MMP-9 in Ec-109H cells and Ec-109L cells detected by Western blot

3 讨论

食管癌是常见的消化道恶性肿瘤之一,在世界高发肿瘤中居第 8 位,世界食管癌死亡率居恶性肿瘤死亡率的第 6 位^[5]。目前,在我国其临床疗效很不理想,食管癌容易向远处转移的恶性生物学行为是造成患者死亡的主要原因^[6]。细胞迁移运动是一种复杂的细胞学行为,在很多生理和病理过程中(胚胎发育、创伤愈合、免疫应答、血管生成和肿瘤转移^[7]等)起着重要作用。在人类癌症中参与细胞运动的基因往往是异常的^[8],已发现许多蛋白质基因如黏着斑激酶、整合素、Rho 家族蛋白、ROCK1 基因、Liprin- $\alpha 1$ 、Stathmin-1 等,它们通过调节细胞迁移在肿瘤转移方面发挥作用。在一般情况下,高表达迁

移的蛋白质,可增加转移;抑制迁移的蛋白质,会抑制转移。近期研究发现,细胞迁移时可以改变其形状挤入细胞外基质空隙,这种变形迁移不需要细胞外基质的降解,见于淋巴细胞和中性粒细胞炎性浸润、淋巴瘤和小细胞肺癌的转移^[9-11];蛋白酶抑制剂也难以抑制肿瘤细胞的迁移转移,所以降低或抑制肿瘤细胞的变形迁移将成为抑制肿瘤转移的关键^[12-13]。

肿瘤的异质性是指在原发肿瘤细胞中存在着不同的肿瘤细胞亚群,这些亚群具有形态学、生物化学、分子方面的不同和染色体组型的特征。它主要表现在肿瘤进展过程中,肿瘤细胞受遗传和体内外环境等因素影响,逐渐形成在增殖、迁移和侵袭能力等各方面不同的细胞亚群^[14]。因此建立具有稳定迁移表型的肿瘤细胞亚系,是研究肿瘤细胞迁移转移机制的先决条件^[15]。本实验依据肿瘤的异质性,运用改良 Transwell 小室对食管癌 Ec-109 细胞系进行筛选,从而得到迁移潜能不同的食管癌细胞亚型 (Ec-109H 与 Ec-109L),为后续的实验打下基础。

RhoC 是 Rho 家族的一个成员,分子量约为 21 kD 的信号蛋白,由 RhoC 基因编码,RhoC 蛋白可以促进肌动蛋白细胞骨架的重组和调节细胞形状和运动^[16],从而可以促进肿瘤的迁移转移^[17-18]。MMP-9 是 MMPs 中细胞外基质重要的蛋白水解酶,破坏细胞与间质屏障,有利于肿瘤细胞向周围侵袭及调节细胞黏附,在肿瘤侵袭转移中起重要作用^[19]。

本实验通过体外迁移实验成功筛选出 Ec-109H 与 Ec-109L 食管癌细胞亚型,并通过 Transwell 小室迁移、侵袭实验对其进行验证,进一步发现高 Ec-109H 食管癌细胞迁移能力增高与 RhoC 表达的增高有关。而对 2 组细胞的各种生物学特性研究发现生长曲线、倍增时间、MMP-9 表达水平两者均无明显差异。提示了 RhoC 可能是食管癌的迁移转移过程中的关键因子,而 MMP-9 在食管癌的迁移转移过程中的作用并不重要。进一步证明了肿瘤转移过程中肿瘤细胞的迁移起到关键作用,而不是细胞外的基质的降解^[20]。

参 考 文 献

- [1] Betapudi V, Licate LS, Egelhoff TT. Distinct roles of nonmuscle myosin II isoforms in the regulation of MDA-MB-231 breast cancer cell spreading and migration[J]. Cancer Res, 2006, 66(9): 4725-4733.
- [2] Alan W. Cell motility in cancer invasion and metastasis[M]. Germany: Springer Press, 2006: 8-351.
- [3] Marshall J. Transwell (®) invasion assays[J]. Methods Mol Biol, 2011, 769: 97-110.
- [4] Primiceri E, Chiriaco MS, Dioguardi F, et al. Automatic transwell assay by an EIS cell chip to monitor cell migration[J]. Lab Chip, 2011, 11(23): 4081-4086.
- [5] Jemal A, Center MM, DeSantis C, et al. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010, 19(8): 1893-1907.
- [6] Tew WP, Kelsen DP, Ilson DH. Targeted therapies for esophageal cancer[J]. Oncologist, 2005, 10(8): 590-601.
- [7] Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J. Cell migration in tumors[J]. Curr Opin Cell Biol, 2005, 17(5): 559-564.
- [8] Eccles SA. Targeting key steps in metastatic tumor progression[J]. Curr Opin Genet Dev, 2005, 15(1): 77-86.
- [9] Friedl P, Borgmann S, Bocker EB. Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement[J]. J Leukoc Biol, 2001, 70(4): 491-509.
- [10] Francis K, Palsson B, Donahue J, et al. Murine Sca-1(+) / Lin(-) cells and human KG1a cells exhibit multiple pseudopod morphologies during migration[J]. Exp Hematol, 2002, 30(5): 460-463.
- [11] Wang W, Wyckoff JB, Frohlich VC, et al. Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling[J]. Cancer Res, 2002, 62(21): 6278-6288.
- [12] Wolf K, Mazo I, Leung H, et al. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis[J]. J Cell Biol, 2003, 160(2): 267-277.
- [13] Sahai E, Marshall CJ. Differing modes of tumor cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signaling and extracellular proteolysis[J]. Nat Cell Biol, 2003, 5(8): 711-719.
- [14] Fidler IJ. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis[J]. Cancer Res, 1978, 38(9): 2651-2660.
- [15] 周清华, 王艳萍, 车国卫, 等. 人大细胞肺癌细胞系 NL9980 和 L9981 的建立及其生物学特性研究[J]. 中国肺癌杂志, 2003, 6(6): 464-468.
- [16] Karlsson R, Pedersen ED, Wang Z, et al. Rho GTPase function in tumorigenesis[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1796(2): 91-98.
- [17] Wang W, Wu F, Fang F, et al. Inhibition of invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells via targeting RhoC in vitro and in vivo[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(21): 6804-6812.
- [18] Kleer CG, Teknos TN, Islam M, et al. RhoC GTPase expression as a potential marker of lymph node metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(15): 4485-4490.
- [19] Kenig S, Alonso MB, Mueller MM, et al. Glioblastoma and endothelial cells cross-talk, mediated by SDF-1, enhances tumor invasion and endothelial proliferation by increasing expression of cathepsins B, S, and MMP-9[J]. Cancer Lett, 2010, 289(1): 53-61.
- [20] Sabeh F, Shimizu-Hirota R, Weiss SJ. Protease-dependent versus-independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited[J]. J Cell Biol, 2009, 185(1): 11-19.

(责任编辑: 关蕴良)