

文章编号:1005-6947(2008)10-0988-05

· 基础研究 ·

TGFβ对胃癌细胞浸润、转移的影响及其作用机制研究

王宽松, 文继舫, 李景和, 周建华, 肖德胜, 胡忠良, 刘英

(中南大学基础医学院 病理学系, 湖南长沙 410013)

摘要:目的 探讨 TGFβ 与胃癌浸润、转移之间的关系及其作用机制。方法 以胃癌细胞株 SGC7901 和 BGC823 为对象,应用 transwell 迁移浸润、matrigel fibronectin 基质黏附、内皮细胞黏附、明胶酶谱及裸鼠成瘤等实验分别检测 0 ng/mL 或 10 ng/mL TGFβ1 处理前后胃癌细胞株生物学行为的变化。结果 经 TGFβ1 处理成瘤裸鼠 4 周后肝转移数量远高于未处理组 ($P < 0.05$); SGC7901 和 BGC823 细胞经 TGFβ1 处理后,瘤细胞浸润基质胶的能力增强;瘤细胞的迁移、黏附能力亦明显增加。结论 TGFβ1 促进胃癌浸润、转移,其机制可能与其促进瘤细胞运动、黏附以及基质金属蛋白酶分泌有关。

[中国普通外科杂志,2008,17(10):988-992]

关键词: 胃肿瘤/病理学; 转化生长因子 β; 肿瘤转移; 肿瘤浸润; 黏附; 迁移

中图分类号: R 735.2

文献标识码: A

The effect of transforming growth factor-β1 on the metastatic and in vitro invasive capacity of gastric cancer cells and its mechanism

WANG Kuansong, WEN Jifang, LI Jinghe, ZHOU Jianhua, XIAO Desheng, HU Zhongliang, LIU Ying

(Department of Pathology, Basic School of Medicine, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of transforming growth factor-β1 on metastasis and invasion of gastric cancer and its mechanism. **Methods** The changes of biological behavior of gastric cancer SGC7901 and BGC823 cell line were tested after pretreatment by TGFβ1 at 0 or 10 ng/mL, and liver metastasis was measured 4 weeks after inoculation in Balb/c nude mice. **Results** SGC7901 and BGC823 cells treated with TGF-β1 had more hepatic metastases and the effect of penetrated reconstituted basement-membrane barriers increased significantly than that untreated control cells did. Likewise, there was an apparent increase in tumor cell migration and adhesion capacity after treating with TGFβ1. **Conclusions** These results suggest that TGF-β1 may modulate metastatic potential of gastric cancer cells by promoting their ability to break down and penetrate basement membrane barriers and by their adhesive and motile activities. TGF-β1 acts on SGC7901 and BGC823 cells as a progression-enhancing factor.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(10): 988-992]

Key words: Stomach Neoplasms/pathol; Transforming Growth Factor β; Neoplasm Metastasis; Neoplasm Invasiveness; Adhesion; Migration

CLC number: R 735.2

Document code: A

收稿日期:2008-04-26; 修订日期:2008-08-20。

作者简介:王宽松,男,中南大学基础医学院讲师,主要从事胃肠道肿瘤病理方面的研究。

通讯作者:文继舫 E-mail: jifangwen@hotmail.com

在我国,胃癌的病死率居恶性肿瘤之首^[1],主要死因是肿瘤病灶的浸润和转移。对胃癌的研究表明转化生长因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)的表达水平比正常胃黏膜高,且与胃癌的浸润深度和淋巴结转移、复发呈正相关,患者血清中TGF $\beta 1$ 水平的升高与预后呈负相关^[2-5]。TGF β 是一多功能细胞因子,在许多细胞中具有广泛但可能相互矛盾的作用。在肿瘤发生早期它是一种抑制因子;在肿瘤晚期,其作用却因瘤细胞株及物种的不同而发挥不同的作用^[6-9]。为此本实验以胃癌细胞株SGC7901和BGC823为对象,探讨TGF $\beta 1$ 对胃癌细胞浸润、转移的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 主要试剂和器材 人工重构基底膜材料基质胶(Matrigel,主要成分为层黏蛋白和IV型胶原)购自美国BD公司;纤维连接蛋白(Fn),购自美国Sigma公司;小牛血清白蛋白(BSA)购自华美生物工程公司,噻唑蓝(MTT)购自美国Sigma公司;96孔培养板购自美国Orange公司;Transwell小室(配聚碳酸酯微孔膜,孔径8 μm)购自美国Costar公司。

1.1.2 动物 BALB/c 裸鼠购自北京中科院动物所 5 周龄,雌性,16~18 g,无特定病原体环境下饲养。

1.1.3 细胞株及其培养 SGC7901 细胞和 BGC823 细胞购自中科院上海细胞库;胎儿脐静脉内皮细胞系(huvec)由本校药学院罗丹博士惠赠。细胞在10%小牛血清的RPMI 1640培养液(美国Gibco公司)中37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 及饱和湿度条件下培养。

1.2 方 法

1.2.1 TGF $\beta 1$ 的处理过程 各癌细胞株经传代后,待长至80%融合度时换液,以无血清培养基培养24 h后再换液。处理组加入10 ng/mL的TGF $\beta 1$,继续培养12 h,0.25%胰酶消化,以备下一步实验。

1.2.2 人工裸鼠转移模型制备及分组 参照Nishimura 等的方法^[10-12],略有改动,主要步骤如下:裸鼠20只,随机分成4组,每组各5只。各细胞系经TGF $\beta 1$ 处理、消化后,离心(1 000 r/min \times 5 min),生理盐水重悬,调整细胞密度至 1×10^7 个/mL。每只裸鼠腹腔注射经TGF $\beta 1$ 处理或未处理SGC7901或BGC823细胞悬液500 μL ,约 $5 \times$

10^6 个细胞;继续喂养30 d,监测裸鼠体重等生理指标的变化。待裸鼠极度消瘦时全部处死,观察各脏器有无肿瘤转移灶,计数肝表面肿瘤结节数。

1.2.3 离体实验

(1)细胞浸润实验 参照Hamada等^[13]的方法进行。最后在倒置显微镜400倍下计数移至微孔膜下层每视野的细胞。每组重复4个样本,每个样本计数10个视野。

(2)瘤细胞与细胞外基质黏附的测定 参照Wu JZ等^[14]的方法进行,最后以对照基底膜BSA组贴壁细胞吸光值A为参照,分别按公式计算Matrigel和Fn组中两株细胞黏附率。黏附率(%) = [(实验组细胞A值/BSA组细胞A值) - 1] \times 100

(3)瘤细胞黏附内皮细胞的测定 参照司徒镇强等^[15]的方法并加以改进,主要步骤:接种内皮细胞于96孔板培养至长成单层,接种TGF $\beta 1$ 处理及未处理的瘤细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min,去除未黏附的肿瘤细胞,4%多聚甲醛固定10 min,后按常规免疫细胞化学方法用低分子角蛋白标记肿瘤细胞,400倍显微镜下计数每视野的肿瘤细胞。每样本计数10个视野。

(4)肿瘤细胞迁移实验 参照Hamada等^[13]的方法进行,每实验组重复4个样本;细胞计数时用HE染色;每样本计数10个视野。

(5)酶谱分析 参照王璐等^[16-17]的方法,凝胶结果在灰阶模式下扫描反转打印,利用凝胶定量图像分析软件imagerool 2.0,对酶谱分析结果进行灰度扫描,读取条带面积和灰度。条带酶解量 = 条带面积 \times (条带灰度 - 背景灰度),以未处理SGC7901细胞基质金属蛋白酶9(MMP9)的酶解量为参照,计算各条带的相对酶解量,对各组细胞条件培养基的酶活性进行定量比较。实验重复3次。

1.3 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有结果用SPSS11.5软件包 t 检验统计,统计水准以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 成瘤裸鼠的瘤细胞转移能力

接种经10 ng/mL TGF $\beta 1$ 处理的SGC7901及BGC823细胞株的裸鼠,分别于7d及10d开始体重降低,而未处理组则分别于13d及15d才开始体重降低。处理组腹腔播散病灶与未处理组无显著性差异,但肝转移灶明显多于未处理组

[SGC7901 细胞为 (53.3 ± 3.3) vs. (11.0 ± 3.0) ,
BGC823 细胞为 (29 ± 2.8) vs. (6.3 ± 2.5) ;

$(P < 0.05)$], 其中 SGC7901 未处理组有 1 只裸鼠
未见肝转移(图 1)。肺脏均未见转移灶。

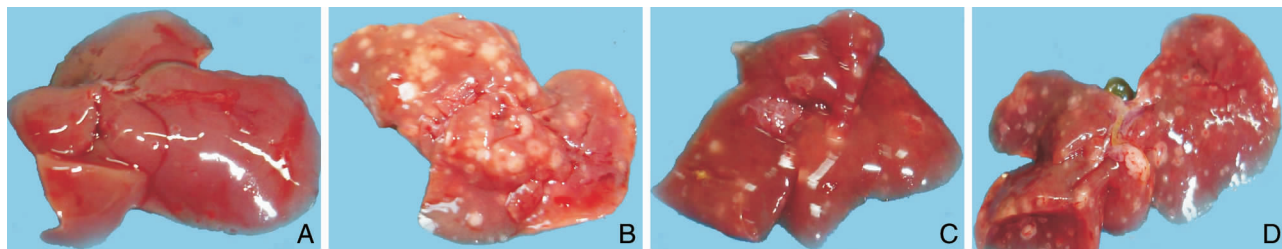


图 1 TGFβ1 对 SGC7901 和 BGC823 细胞肝转移的影响 A:0 ng/mL TGFβ1 处理 SGC7901 细胞组; B:10 ng/mL TGFβ1 处理 SGC7901 细胞组; C:0 ng/mL TGFβ1 处理 BGC823 细胞组; D:10 ng/mL TGFβ1 处理 BGC823 细胞组

2.2 外源性 TGFβ1 对瘤细胞浸润能力的影响

在侵袭实验中,处理组 SGC7901 和 BGC823 侵袭细胞数在放大 400 倍镜下计数分别为 (106 ± 10) 个和 (88 ± 11) 个,而对照组侵袭细胞数分别为 (83 ± 6) 个和 (58 ± 8) 个; TGFβ1 使肿瘤细胞的体外侵袭能力明显增加 $(P < 0.05)$ (图 2)。

2.3 外源性 TGFβ1 对瘤细胞黏附基质能力的影响

SGC7901 和 BGC823 细胞经 10 ng/mL TGFβ1 处理后,黏附包被 Matrigel 或 Fn 基质表面的能力较未处理细胞明显增强 $(P < 0.05)$ (表 1)。

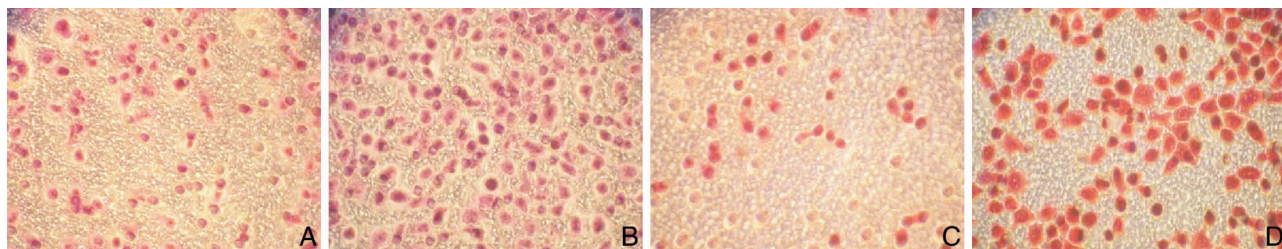


图 2 TGFβ1 对 SGC7901 和 BGC823 细胞浸润能力的影响 A:0 ng/mL TGFβ1 处理 SGC7901 细胞组; B:10ng/mL TGFβ1 处理 SGC7901 细胞组; C:0ng/mL TGFβ1 处理 BGC823 细胞组; D:10ng/mL TGFβ1 处理 BGC823 细胞组

表 1 TGFβ1 对 SGC7901 和 BGC823 细胞黏附基质能力的影响 (%)

基质	SGC7901		BGC823	
	0 ng/mL TGFβ1 (%)	10 ng/mL TGFβ1 (%)	0 ng/mL TGFβ1 (%)	10 ng/mL TGFβ1 (%)
纤维连接蛋白	12.3	46.5 ¹⁾	11.2	53.9 ¹⁾
基质胶	33.8	77.8 ¹⁾	29.4	68.7 ¹⁾

注:1)与 0 ng/mL 浓度比较, $P < 0.05$

2.4 外源性 TGFβ1 对瘤细胞黏附内皮细胞能力的影响

SGC7901 和 BGC823 细胞经 10 ng/mL TGFβ1 处理后,每高倍视野黏附的瘤细胞数分别为 (15.97 ± 1.38) 及 (19.07 ± 2.01) 个,而对照组分别为 (6.57 ± 1.14) 个及 (11.12 ± 1.75) 个;瘤细胞经 TGFβ1 处理后黏附内皮细胞能力明显增强 $(P < 0.05)$ 。

2.5 外源性 TGFβ1 对瘤细胞迁移能力的影响

SGC7901 和 BGC823 细胞经 10 ng/mL TGFβ1

处理后,每高倍视野黏附的瘤细胞数分别为 (78 ± 8) 个及 (85 ± 9) 个,而对照组分别为 (35 ± 6) 及 (40 ± 7) 个;瘤细胞经 TGFβ1 处理后迁移能力明显增加 $(P < 0.05)$ (图 3)。

2.6 外源性 TGFβ1 对瘤细胞分泌 MMP2 和 MMP9 的影响

未经处理的 SGC7901 和 BGC823 细胞均有稳定的活性 MMP9 和 MMP2 的表达,但经 TGFβ1 处理后的两种细胞的表达水平均有明显增高 $(P < 0.05)$ (表 2) (图 4)。

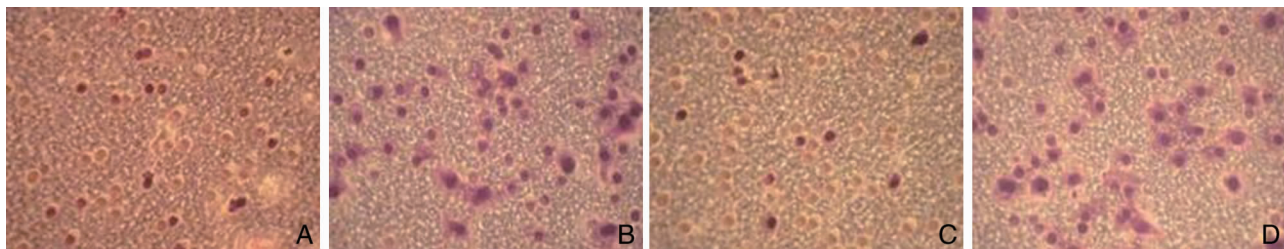


图3 TGF β 1对SGC7901和BGC823细胞迁移能力的影响 A:0 ng/mL TGF β 1处理SGC7901细胞组; B:10 ng/mL TGF β 1处理SGC7901细胞组; C:0 ng/mL TGF β 1处理BGC823细胞组; D:10 ng/mL TGF β 1处理BGC823细胞组

表2 TGF β 1对SGC7901和BGC823分泌MMP2和MMP9的影响($\bar{x} \pm s$)

细胞	MMP9		MMP2	
	0 ng/mL TGF β 1 (%)	10 ng/mL TGF β 1 (%)	0 ng/mL TGF β 1 (%)	10 ng/mL TGF β 1 (%)
SGC7901	1.00 \pm 0.00	1.36 \pm 0.05 ¹⁾	2.50 \pm 0.23	3.09 \pm 0.09 ¹⁾
BGC823	0.96 \pm 0.02	1.46 \pm 0.18 ¹⁾	1.76 \pm 0.08	2.78 \pm 0.23 ¹⁾

注:1)与0 ng/mL TGF β 1浓度比较, $P < 0.05$

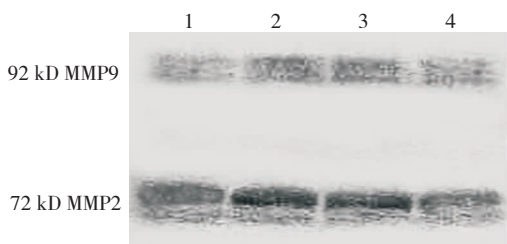


图4 TGF β 1对癌细胞分泌MMP2和MMP9的影响 1: 0ng/mL TGF β 1 SGC7901组; 2: 10ng/mL TGF β 1 SGC7901组; 3: 10ng/mL TGF β 1 BGC823组; 4: 0ng/mL TGF β 1 BGC823组

3 讨论

肿瘤的浸润和转移是成功治疗肿瘤的最大障碍。研究表明, TGF β 可能通过调节细胞穿透基底膜和细胞外基质的能力参与多种恶性肿瘤的浸润和转移^[18]。Nakata等^[10]证实TGF β 可明显促进乳腺癌的浸润、转移。然而Otani等^[7, 19]的体外研究发现, TGF β 1可抑制肾癌细胞株SM KTR1, KTR2等的浸润, 且能抑制SRCC-1M细胞分泌的IV型胶原酶活性。Holting等^[6]发现TGF β 1在体外可抑制原发性甲状腺癌细胞生长、迁移和浸润; Pavelic等^[20]认为TGF β 可减低胶原酶的活性, 刺激特异性的金属蛋白酶抑制剂(TIMP), 从而抑制人纤维肉瘤的侵袭和转移。由此可见, 对不同的肿瘤TGF β 可能发挥不同甚至相反的生物学

效应。那么在胃癌的进展过程中TGF β 究竟有何作用? 胃癌患者血清及胃癌组织中高水平的TGF β 是否仅仅是胃癌浸润、转移的一种伴随现象, 还是机体对胃癌的一种免疫反应? 抑或是胃癌浸润、转移的一种促进剂?

本研究发现经TGF β 1处理的SGC7901和BGC823细胞其肝转移能力明显高于未处理组, 提示TGF β 1可促进胃癌细胞的转移。此结果与Nakata等^[10]在乳腺癌中的实验结果一致。那么TGF β 1究竟系通过哪些途径影响胃癌浸润、转移呢?

肿瘤的浸润、转移是一复杂过程。一般认为肿瘤细胞对细胞外基质的侵袭可分成3个步骤^[21-22]: (1) 瘤细胞通过其表面受体特异性地黏附到基质; (2) 肿瘤细胞分泌的溶解酶对贴近肿瘤细胞表面区域基质的局限性降解; (3) 肿瘤细胞移入被蛋白酶水解后的基质区, 其移动方向可被趋化因子影响。同时肿瘤细胞与脉管内皮细胞间的黏附与其在脉管壁的着床、穿出脉管形成转移灶有关。由此可见, 影响瘤细胞浸润、转移的因素主要有瘤细胞黏附、水解基质的能力、迁移能力以及黏附内皮的能力。为探讨TGF β 1促胃癌细胞转移的机制, 本实验分别检测了经TGF β 1处理后胃癌细胞黏附基质(内皮细胞)、趋化迁移、浸润基质胶的能力以及瘤源性基质金属蛋白酶MMP2和MMP9的活性。

本实验结果发现, TGF β 1可显著提高胃癌细胞株SGC7901和BGC823黏附细胞外基质的能力、瘤细胞源性基质金属蛋白酶MMP2和MMP9

的活性及趋化迁移能力,最终使瘤细胞浸润基质的能力增强,从而促进瘤细胞扩散。瘤细胞到达脉管后随体液的流动到达机体各部位,部分瘤细胞在内皮细胞表面着床,随后通过阿米巴样运动穿过内皮,在内皮下形成转移灶。

综上所述,笔者认为高水平的 TGF β 1 可通过加速胃癌细胞的运动,增加其对基质及内皮细胞的黏附以及 MMPs 的分泌等途径促进胃癌细胞的浸润、转移; TGF β 是一重要的促胃癌浸润转移的细胞因子。以 TGF β 及 TGF β 通路为靶向的基因治疗,在胃癌尤其是 TGF β 高表达的胃癌治疗中将产生重要意义。

参考文献:

- [1] 孙秀娣,牧人,周有尚,等. 中国 1990 ~ 1992 年胃癌死亡调查分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2002, 24(1): 4 - 8.
- [2] Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression [J]. Nat Genet, 2001, 29(2): 117 - 129.
- [3] Maehara Y, Kakeji Y, Kabashima A, et al. Role of transforming growth factor - beta 1 in invasion and metastasis in gastric carcinoma [J]. J Clin Oncol, 1999, 17(2): 607 - 614.
- [4] Aito H, Tsujitani S, Oka S, et al. An elevated serum level of transforming growth factor - beta 1 (TGF-beta 1) significantly correlated with lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric carcinoma [J]. Anticancer Res, 2000, 20(6B): 4489 - 4493.
- [5] 许洪卫,王元和,谭龙益. 组织和血清 TGF β - 1 水平升高与胃癌侵袭性增强的相互关系 [J]. 癌症, 1999, 18(2): 156 - 158.
- [6] Holting T, Zielke A, Siperstein AE, et al. Transforming growth factor - beta 1 is a negative regulator for differentiated thyroid cancer: studies of growth, migration, invasion, and adhesion of cultured follicular and papillary thyroid cancer cell lines [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1994, 79(3): 806 - 813.
- [7] 陈学敏,李厚祥. TGF- β 1, TGF- β II 和 CDK4 在原发性肝细胞肝癌中的表达及其意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(2): 146 - 148.
- [8] 朱卫东,汤恢焕,欧阳迪平,等. Smad4 蛋白和 TGF- β 1 及 T β RII 在胆管癌中表达的研究 [J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(7): 502 - 505.
- [9] Shariat SF, Kattan MW, Traxel E, et al. Association of pre- and postoperative plasma levels of transforming growth factor beta (1) and interleukin 6 and its soluble receptor with prostate cancer progression [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(6): 1992 - 1999.
- [10] Nakata D, Hamada J, Ba Y, et al. Enhancement of tumorigenic, metastatic and in vitro invasive capacity of rat mammary tumor cells by transforming growth factor - β [J]. Cancer Lett, 2002, 175(1): 95 - 106.
- [11] Nakashio T, Narita T, Akiyama S, et al. Adhesion molecules and TGF-beta1 are involved in the peritoneal dissemination of NUGC - 4 human gastric cancer cells [J]. Int J Cancer, 1997, 70(5): 612 - 618.
- [12] Nishimura S, Chung YS, Yashiro M, et al. CD44H plays an important role in peritoneal dissemination of scirrhous gastric cancer cells [J]. Jpn J Cancer Res, 1996, 87(12): 1235 - 1244.
- [13] Hamada J, Nagayasu H, Takayama M, et al. Enhanced effect of epidermal growth factor on pulmonary metastasis and in vitro invasion of rat mammary carcinoma cells [J]. Cancer Lett, 1995, 89(2): 161 - 167.
- [14] Wu JZ, Situ ZQ, Liu ZB, et al. Selection and characterization of a highly metastatic cell clone from mucoepidermoid carcinoma cell line derived from human salivary gland [J]. Chin J Dental Res, 1998, 1(1): 71 - 77.
- [15] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养 [M]. 西安:世界图书出版西安公司, 1997. 158 - 162.
- [16] YW Chu, PC Yang, SC Yang, et al. Selection of Invasive and Metastatic Subpopulations from a Human Lung Adenocarcinoma Cell Line [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997, 17(3): 353 - 360.
- [17] 王璐,张丽红,李玉林,等. 基质金属蛋白酶 - 9 及其 mRNA 在胃癌中的表达与血管新生的关系 [J]. 中华医学杂志, 2003, 83(9): 782 - 786.
- [18] Kretzschmar M, Massague J. SMADs: Mediators and regulators of TGF-beta signaling [J]. Curr Opin Genet Dev, 1998, 8(1): 103 - 111.
- [19] Otani N, Tsukamoto T, Masumori N, et al. Influence of growth factors on in vitro invasiveness and type IV collagenolysis of human renal cell carcinoma cells [J]. J Urol, 1994, 151(1): 223 - 226.
- [20] Pavelic K, Despot N, Levanat S, et al. Protective role of transforming growth factor beta (TGF beta) in tumor - induced degradation of basement membranes [J]. Biol Chem Hoppe Seyler, 1990, 371(8): 687 - 692.
- [21] Liotta LA. Tumor invasion and metastases role of the extracellular matrix; rhoads memorial award lecture [J]. Cancer Res, 1986, 46(1): 1 - 7.
- [22] 蒋新农,周柔丽. 肿瘤细胞粘附、迁移与转移的相关性 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25(5): 404 - 407.