

文章编号:1005-6947(2007)09-0855-04

· 基础研究 ·

Tiam 1 与胃癌细胞侵袭转移及与裸鼠移植瘤形成的关系

朱金明, 余佩武, 赵永亮

(第三军医大学附属西南医院 普通外科, 重庆 400038)

摘要:目的 检测胃癌细胞中 T 淋巴瘤侵袭转移诱导因子 1 (Tiam 1) 的表达, 并分析其与胃癌细胞离体、在体侵袭转移能力的关系。方法 采用层粘连蛋白黏附法, 由胃癌 MKN-45 细胞株 (M_0) 中筛选获得高 (M_H)、低 (M_L) 黏附亚株。应用 RT-PCR 和定量细胞 ELISA 技术分别检测 Tiam 1 mRNA 与蛋白在 M_0 , M_L , M_H 细胞中的表达; 应用 Boyden 小室法测定 M_0 , M_L , M_H 细胞的离体侵袭移行能力, 并分析其与 Tiam 1 表达的关系。应用裸鼠接种法观察 M_0 , M_L , M_H 细胞的在体成瘤及转移能力。**结果** M_H 细胞中 Tiam 1 mRNA ($RV = 0.855 \pm 0.051$) 与蛋白的表达 ($RD = 1.262 \pm 0.165$) 以及其离体侵袭转移能力 ($24.33 \pm 8.02, 52.00 \pm 14.53$)、在体裸鼠肺转移率 ($4/5 = 80\%$) 均较 M_0 细胞 ($RV = 0.759 \pm 0.047, RD = 0.911 \pm 0.104, 11.67 \pm 3.79, 26.00 \pm 9.54, 2/5 = 40\%$), M_L 细胞 ($RV = 0.743 \pm 0.039, RD = 0.892 \pm 0.101, 9.67 \pm 3.06, 23.67 \pm 8.50, 1/5 = 20\%$) 为强, 统计学差异显著 ($P < 0.05$), 但在 M_0, M_L 细胞间无统计学差异 ($P > 0.05$); Tiam 1 表达水平与胃癌细胞的侵袭转移能力呈完全及高度正相关 ($P < 0.05$)。**结论** Tiam 1 表达水平升高有可能促进胃癌细胞侵袭转移能力的增强。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(9): 855-858]

关键词: 胃肿瘤; T 淋巴瘤侵袭转移诱导因子 1; 侵袭; 转移

中图分类号: R 735.2

文献标识码: A

Correlation of Tiam 1 to invasion and metastasis of gastric cancer cells and to development of tumor xenografts in nude mice

ZHU Jin-ming, YU Pei-wu, ZHAO Yong-liang

(Department of General Surgery, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of T lymphoma invasion and metastasis inducing factor 1 (Tiam 1) in gastric cancer cells and analyse the correlation between Tiam 1 and the invasive and migratory potential of gastric cancer cells in vitro and in vivo. **Methods** Two subpopulations lesser (M_L) and higher (M_H) adhesive subgroup were separated from human gastric cancer cell line MKN-45 (M_0) by laminin adhesion method in vitro. RT-PCR and ELISA were applied to detect the expression of Tiam 1 mRNA and protein in M_0 , M_L and M_H cells. The invasive and migratory potential of M_0 , M_L and M_H cells in vitro and in vivo were observed by Boyden chamber and by inoculation into nude mice and, simultaneously, correlation between the expression of Tiam 1 and the invasive and migratory potential of gastric cancer cells was analysed. **Results** The invasive and migratory potential of M_H cells in vitro ($24.33 \pm 8.02, 52.00 \pm 14.53$) and the lung metastatic rate of M_H cells in nude-mice ($4/5 = 80\%$) was much higher than that of M_0 cells ($11.67 \pm 3.79, 26.00 \pm 9.54, 2/5 = 40\%$, $RV = 0.759 \pm 0.047, RD = 0.911 \pm 0.104$) and M_L cells ($9.67 \pm 3.06, 23.67 \pm 8.50, 1/5 = 20\%$, $RV = 0.743 \pm 0.039, RD = 0.892 \pm 0.101$) ($P < 0.05$), as well as the expression of Tiam 1 mRNA ($RV = 0.855 \pm 0.051$) and protein ($RD = 1.262 \pm 0.165$) in M_H cells were much higher than those in M_0 and M_L cells ($P < 0.05$),

收稿日期: 2007-06-26; 修订日期: 2007-09-05。

作者简介: 朱金明, 男, 河北邢台人, 第三军医大学西南医院博士研究生 (现为济南军区总医院主治医师), 主要从事胃肠道肿瘤外科治疗与侵袭转移机制方面的研究。

通讯作者: 朱金明 E-mail: qingfengyunhe@sina.com

but there was no obvious difference between M_0 and M_L cells ($P > 0.05$). Positive correlation existed between the expression of Tiam 1 and the invasive and migratory potential of gastric cancer cells ($P < 0.05$).

Conclusions Increasing expression of Tiam 1 may promote the invasive and migratory potential of gastric cancer cells.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16 (9) : 855 - 858]

Key words: Stomach Neoplasms; Tiam1AM 1; Invasion; Metastasis

CLC number: R 735.2

Document code: A

本课题的前期工作显示, T淋巴瘤侵袭转移诱导因子 1 (Tiam 1) 在人胃癌组织中呈高表达, 且与其临床病理分期的严重程度呈正相关^[1]。本实验拟通过检测具有不同 Tiam 1 表达强度的胃癌细胞及其在体和离体侵袭转移能力的差异, 从细胞水平进一步探讨 Tiam 1 表达与胃癌细胞恶性生物学行为的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及仪器 层粘连蛋白(美国 Sigma 公司), Boyden 小室(美国 Millipore 公司), Matrigel 人工基质(美国 BD 公司), TriPure 试剂(德国 Boehringer Mannheim 公司), 第一链 cDNA 合成试剂(上海 Sangon 公司), DNA 聚合酶(大连 Takara 公司), 兔抗人/鼠 Tiam 1 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司), HRP 标记的羊抗兔二抗(武汉 Boster 公司), TMB 显色剂(美国 KPL 公司), PTC-100TM 型聚合酶链反应(PCR)合成仪(美国 MJ 公司), 3350 型全自动连续波长酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.1.2 实验细胞及动物 胃癌 MKN-45 细胞株 (M_0) 购自上海仁济医院上海市消化疾病研究所。BALB/c-nu/nu 裸小鼠, 均为雌性, 鼠龄 4~6 周, 体重 15~20g, 购自四川大学实验动物中心(动物合格证号:045), 无特殊病原体环境饲养。

1.2 实验方法

1.2.1 胃癌细胞高、低黏附亚株的筛选 胃癌细胞 M_0 的高 (M_H)、低 (M_L) 黏附亚株系经“层粘连蛋白黏附法”筛选分离获得^[2]。胃癌细胞常规置于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 在 37℃ 饱和湿度、5% CO_2 条件下孵育。取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 胃癌细胞中 Tiam 1 表达的检测

1.2.2.1 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR) 用 TriPure 试剂提取总 RNA, 取 1 μ g 总 RNA 逆转录合成 cDNA; 取 2 μ L cDNA 进行 PCR 扩增。反应条

件为: 94℃ 变性 3min, 94℃ 45s, 54℃ 1min, 72℃ 1.5min, ; 30 个循环, 72℃ 延伸 5min。Tiam 1 引物: 5'-TTC TCA CCA GTC TGT TCA GC -3', 5'-CCA GAC TTG GAA TCC TCA GA-3', 扩增产物为 818bp。3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物: 5'-AGG TCC ACC ACT GAC ACG TT-3', 5'-GCC TCA AGA TCA TCA GCA AT-3', 扩增产物为 310bp。采用 MIG2000 图象分析系统测定目标条带 V 值, $V = \text{平均吸光度值} \times \text{条带面积}$ 。Tiam 1 mRNA 表达强度 $R_v = V_{\text{Tiam 1}} / V_{\text{GAPDH}}$ 。

1.2.2.2 定量细胞免疫酶联吸附实验(ELISA)^[3] 参照文献方法并作适当调整。兔抗人 Tiam 1 抗体(1:100, 50 μ L/孔) 37℃ 2h, HRP 标记的羊抗兔二抗(1:5000, 50 μ L/孔) 37℃ 1h, TMB 显色剂 A, B 液等量混匀(100 μ L/孔), 避光显色 10min, 酶标仪 450nm、550nm 波长下检测。Tiam 1 蛋白表达强度 $RD = D_{450} / D_{550}$ 。

1.2.3 胃癌细胞离体侵袭及移行能力检测 采用 Boyden 小室法, 将对数生长期 M_0 , M_L , M_H 制成 2.5×10^5 个/ M_L 的细胞悬液备用。(1) 体外移行实验: 将无 Matrigel 包被的 Boyden 小室置于 24 孔培养板内, 在每一 Boyden 小室的下室中加入含趋化因子的条件培养液 0.6 M_L , 上室加细胞悬液 0.4 M_L , 常规培养 12h。(2) 体外侵袭实验: 将包被有 Matrigel 的 Boyden 小室置于 24 孔培养板内, 在每一 Boyden 小室的下室中加入含趋化因子的条件培养液 0.6 M_L , 上室加细胞悬液 0.4 M_L , 常规培养 72h。上述实验结束后, 取出小室并拭去滤膜上表面的未迁移细胞, HE 染色后高倍镜下计数穿透滤膜并黏附于下表面的细胞数。

1.2.4 胃癌细胞裸鼠在体成瘤及转移能力检测 将对数生长期 M_0 , M_L , M_H 制成 1×10^7 个/ M_L 的细胞悬液备用。(1) 体内成瘤能力实验: 取 9 只裸鼠, 随机分为 3 组, 每组 3 只。按组分别于裸鼠左、右背侧皮下接种 0.1 M_L 上述胃癌细胞悬液, 饲养 4 周后拉颈处死并解剖, 观察瘤块大体形态及胸、腹腔脏器情况。(2) 体内转移能力实验: 取

15 只裸鼠,随机分为 3 组,每组 5 只。按组分别经裸鼠尾静脉注射 0.1 M_L 上述胃癌细胞悬液,饲养 4 周后拉颈处死并解剖,观察胸、腹腔脏器转移情况。以上样本均送常规病理组织学检查。

1.3 统计学处理

应用 SPSS10.0 统计软件处理数据,计量资料采用单因素方差分析-均数间差别多重比较的 LSD 检验。相关分析采用双变量间的 Pearson 检验。计数与等级资料采用 2 检验或秩和检验。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 Tiam 1 在胃癌细胞中的表达

RT-PCR 及定量细胞 ELISA 结果显示,Tiam 1 mRNA 和蛋白在 M_H 细胞中的表达 ($RV = 0.855 \pm 0.051$, $RD = 1.262 \pm 0.165$) 皆强于其在 M₀ 细胞中的表达 ($RV = 0.759 \pm 0.047$, $RD = 0.911 \pm 0.104$) 和 M_L 细胞中的表达 ($RV = 0.743 \pm 0.039$, $RD = 0.892 \pm 0.101$),有统计学差异 ($P < 0.05$);但 M₀ 和 M_L 细胞间无统计学差异 ($P > 0.05$) (图 1)。

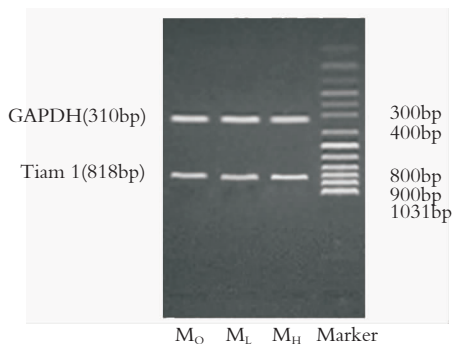


图 1 胃癌细胞中 Tiam 1 mRNA RT-PCR 扩增产物电泳结果

2.2 胃癌细胞离体侵袭、移行能力比较及与 Tiam 1 表达间的相关性

M_H 亚株的离体侵袭、移行能力均强于 M₀ 及其 M_L 亚株,有统计学差异 ($P < 0.05$);但在 M₀ 和 M_L 细胞间无统计学差异 ($P > 0.05$) (表 1)。Tiam 1 mRNA 和蛋白表达水平与 M₀, M_L, M_H 细胞的体外侵袭、移行能力呈完全和高度正相关 ($r = 1.000$ 和 0.998 ; $r = 0.997$ 和 1.000),均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 胃癌细胞体外侵袭移行能力比较 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	移行穿膜细胞数(个)	侵袭穿膜细胞数(个)
M ₀	26.00 ± 9.54 [†]	11.67 ± 3.79 [†]
M _L	23.67 ± 8.50 [†]	9.67 ± 3.06 [†]
M _H	52.00 ± 14.53	24.33 ± 8.02

注:† 与 M_H 组比较, $P < 0.05$

2.3 胃癌细胞裸鼠在体成瘤及转移能力比较

2.3.1 在体成瘤能力比较 各组胃癌细胞在裸鼠皮下接种成瘤率为 100%。饲养 4 周后所有动物存活。将裸鼠处死后解剖,在胸、腹腔脏器中未发现任何自发转移灶。M_H 组皮下移植瘤的体积 [$(1.063 \pm 0.440) \text{ cm}^3$] 与重量 [$(0.583 \pm 0.243) \text{ g}$] 与 M₀ 组 [$(0.728 \pm 0.283) \text{ cm}^3$], [$(0.420 \pm 0.202) \text{ g}$] 和 M_L 组 [$(0.664 \pm 0.257) \text{ cm}^3$, $(0.351 \pm 0.149) \text{ g}$] 相比,三者间无统计学差异 ($P > 0.05$),但 M_H 组有增大的趋势。镜下可见:各组胃癌细胞皮下移植瘤均由密集排列的癌细胞构成,核染色深,核浆比大,局部形成大小不等的腺腔样结构,间质成分少。M_H 组与 M₀ 和 M_L 组相比,细胞形态无异,但排列较紊乱,形成的腺腔较少而小,异型性大,且癌细胞有向包膜外浸润的趋势(图 2)。

2.3.2 在体转移能力比较 经尾静脉注射胃癌细胞,饲养 4 周后所有动物存活。将裸鼠处死进行解剖,M₀, M_L, M_H 组分别有 2 只、1 只、4 只裸鼠肺部出现转移灶,其他脏器中均未发现可疑病灶。将裸鼠肺脏取出,在解剖显微镜下观察并记录肺转移灶数目和大小,并按以下标准分级:(+)级,直径(d) $< 0.5 \text{ mm}$; (++)级, $d = 0.5 \sim 1.0 \text{ mm}$; (+++)级, $d = 1.1 \sim 2.0 \text{ mm}$; (+++++)级, $d > 2.0 \text{ mm}$ 。经统计学分析, M_H 组肺转移率 ($4/5 = 80\%$) 高于 M₀ 组 ($2/5 = 40\%$) 和 M_L 组 ($1/5 = 20\%$) ($P < 0.05$),但后两者间无明显差异 ($P > 0.05$)。镜下可见:裸鼠肺转移灶由大量密集排列的癌细胞构成,其组织形态与皮下移植瘤灶类似,在肺部小血管内可见有瘤栓存在(表 2)(图 3)。

表 2 胃癌细胞裸鼠肺部转移情况

组别	注射动物数(n)	产生肺转移动物数(n)	肺部转移灶分级和计数				合计
			+	++	+++	++++	
M ₀	5	2	45	34	5	1	86 [†]
M _L	5	1	8	17	3	0	28 [†]
M _H	5	4	97	52	20	3	172

注:† 与 M_H 组比较, $P < 0.05$

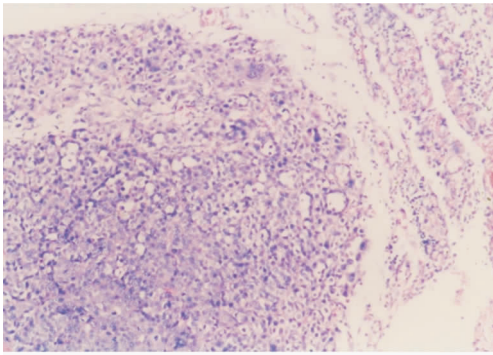


图2 胃癌 M_H 细胞裸鼠皮下移植瘤组织切片(HE $\times 100$)

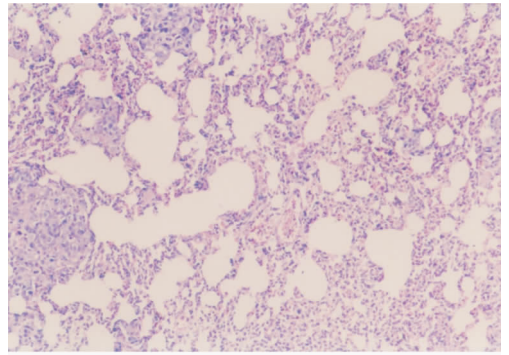


图3 胃癌 M_H 细胞裸鼠肺转移瘤组织切片(HE $\times 100$)

3 讨论

本实验发现 Tiam 1 高表达细胞株 (M_H) 的离体侵袭转移能力强于低表达的细胞株 (M_H 和 M_L) ($P > 0.05$), 且 Tiam 1 表达水平与其离体侵袭移行能力呈完全或高度正相关 ($P < 0.05$)。在体实验中笔者还观察到, 虽然 M_H 组肿瘤体积及重量与 M_0 , M_L 组相比差异无明显性 ($P > 0.05$), 但有增大的趋势。尽管无自发转移产生, 但将胃癌细胞经尾静脉直接注入, 在裸鼠肺部却出现实验性转移, 且 M_H 组肺转移率高于 M_0 和 M_L 组 ($P < 0.05$)。究其原因可能与皮下移植瘤表面易形成纤维包膜, 可干扰瘤体血管分布, 或组织局部微环境不适, 阻碍其转移有关^[4]。而由尾静脉进入血循环的癌细胞, 则可首先到达肺内毛细血管床并机械性滞留在该处, 且局部微环境也可能更适于癌细胞的黏附与定植^[5]。在排除同等条件下肺部解剖因素的影响之外, 各组胃癌细胞肺转移率的差异可能还是缘于其在黏附、侵袭及移行能力方面的不同。

本实验结果提示, Tiam 1 表达升高可能与胃癌细胞恶性生物学行为的增强相关, 并从细胞水平印证了本课题前期的临床研究结果^[1]。文献显示, Tiam 1 在调节细胞骨架结构重组的同时, 能通过 c-Jun 氨基末端激酶信号途径, 激活 NF- κ B, 促进肿瘤细胞分裂与增殖^[6], 还可通过与黏附分子整合素 $\alpha 6 \beta 1$ 及 CD44V3 单体发生作用, 介导肿瘤细胞与基质成分的异质型黏附, 促进其侵袭转移^[7-9]。至于“Tiam 1/细胞骨架/黏附分子”间

调节机制的生物力学基础, 以及反向下调 Tiam 1 表达能否确切抑制胃癌实体瘤生长、转移及其相关分子生物学机制, 尚有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 朱金明, 余佩武, 赵永亮. Tiam 1 和 Rac 1 表达与胃癌病理生物学行为的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(3):168-172.
- [2] 陈向荣, 任卫平, 童菊芳, 等. 黏附法筛选胃癌细胞亚株[J]. 胃肠病学, 2000, 5(2):116-118.
- [3] 张绪清, 张瑞, 顾长海, 等. 定量细胞 ELISA 检测培养细胞 ICAM-1 表达水平[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(1):117-118.
- [4] Lu XG, Zhan LB, Feng BA, *et al.* Inhibition of growth and metastasis of human gastric cancer implanted in nude mice by d-limonene[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(14):2140-2144.
- [5] Illert B, Otto C, Thiede A, *et al.* Detection of disseminated tumor cells in nude mice with human gastric cancer[J]. Clin Exp Metastasis, 2003, 20(6):549-554.
- [6] Pervaiz S, Cao J, Chao OS, *et al.* Activation of the RacGTPase inhibits apoptosis in human tumor cells[J]. Oncogene, 2001, 20(43):6263-6268.
- [7] Yu W, Datta A, Leroy P, *et al.* Beta1-integrin orients epithelial polarity via Rac1 and laminin. Mol Biol Cell, 2005, 16(2):433-445.
- [8] Bourguignon LY, Zhu H, Shao L, *et al.* CD44 interaction with tiam1 promotes Rac1 signaling and hyaluronic acid-mediated breast tumor cell migration[J]. J Biol Chem, 2000, 275(3):1829-1838.
- [9] Minard ME, Ellis LM, Gallick GE. Tiam1 regulates cell adhesion, migration and apoptosis in colon tumor cells[J]. Clin Exp Metastasis, 2006, 23(5-6):301-313.