

文章编号:1005-6947(2008)04-0350-05

· 基础研究 ·

巨噬细胞移动抑制因子对人结肠癌细胞增殖和血管形成的影响

胡淞, 张才全, 倪春, 李建, 杨海平,

(重庆医科大学附属第一医院 普通外科, 重庆 400016)

摘要:目的 探讨巨噬细胞移动抑制因子(MIF)对人结肠癌细胞增殖和血管形成的影响。方法 检测不同浓度的抗MIF抗体(Anti-MIF)对人HCT-116结肠癌细胞株增殖及对血管内皮细胞生长因子(VEGF)的表达影响。结果 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g/L}$ Anti-MIF处理HCT-116细胞48, 72 h后, 细胞增殖明显受到抑制, 且呈时间-剂量依赖性。100, 200, 400, 800 $\mu\text{g/L}$ Anti-MIF处理HCT-116细胞72 h后, 流式细胞仪细胞周期分析表明 G_0/G_1 期细胞百分率上升, S期和 G_2/M 期细胞百分率下降; 与阴性对照组相比, Anti-MIF作用72 h后VEGF蛋白表达明显减弱, 并呈剂量依赖性($P < 0.05$)。结论 MIF参与调节细胞的生长周期, 并可能通过VEGF影响肿瘤血管形成, 而在结肠癌的发病中发挥重要作用。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(4): 350-354]

关键词: 结肠肿瘤; 巨噬细胞移动抑制因子; 血管内皮生长因子; 免疫组织化学

中图分类号: R 735.3

文献标识码: A

Effect of macrophage migration inhibitory factor on cell proliferation and angiogenesis in human colon carcinoma

HU Song, ZHANG Caiquan, NI Chun, LI Jian, YANG Haiping

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing University Medical Science, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of macrophage migration inhibitory factor(MIF) on cell proliferation and angiogenesis of human colon carcinoma. **Methods** Effect of different concentrations of Anti-human MIF antibody(Anti-MIF) on cell proliferative and expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) of human colon carcinoma cell line HCT-116 cells was examined. **Results** After HCT-116 cells were exposed to Anti-MIF(100, 200, 400, and 800 $\mu\text{g/L}$) for 48 and 72 h, HCT-116 cells growth was strongly inhibited in a dose and time-dependent manner; After exposure of the cells to Anti-MIF(100, 200, 400, and 800 $\mu\text{g/L}$) for 72 h, FCM analysis showed the ratio of G_0/G_1 phase cells increased, and the ration of S and G_2/M phase cells decreased. Comparison with the negative group, the expression of VEGF after the cells exposure to Anti-MIF for 72 h were significantly decreased, and was in dose-dependent manner($P < 0.05$). **Conclusions** MIF participates can modulat the cell growth cycle and can affect tumor neovascularization via VEGF. MIF plays an important role in the pathogenesis of colon carcinoma.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(4): 350-354]

Key words: Colonic Neoplasms; Macrophage Migration Inhibitory Factor; Vascular Endothelial Growth Factor; Immunochemistry

CLC number: R 735.3

Document code: A

收稿日期: 2007-12-04; 修订日期: 2008-03-04。

作者简介: 胡淞, 男, 重庆医科大学附属第一医院住院医师, 主要从事胃肠肿瘤方面的研究。

通讯作者: 胡淞 E-mail: asong0207@163.com

巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)由活化T细胞产生,因其可以抑制离体巨噬细胞迁移和在皮肤迟发性超敏反应中促进巨噬细胞的聚集而得名^[1-2]。目前的研究表明MIF在许多肿瘤中都有较高的表达,并有可能参与肿瘤的血管生成、增殖和迁移。但其具体机制还尚未完全阐明。文献报道血管内皮生长因子(VEGF)的表达与高水平MIF呈正相关^[3]。本实验旨在观察抗人MIF抗体(Anti-MIF)对结肠癌细胞株HCT-116增殖的影响并通过检测VEGF在细胞的表达探讨其在肿瘤发生、发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 RPMI-1640培养基、胎牛血清、胰蛋白酶及噻唑兰(MTT)购自重庆博雅公司;VEGF(兔抗)和Anti-MIF为美国R&D公司产品。

1.1.2 细胞系 人结肠癌细胞(HCT-116)系购自重庆医科大学基础研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 HCT-116细胞株常规培养于含10%胎牛血清和 1×10^5 U/L青霉素及0.1 g/L链霉素的RPMI-1640培养基中,置于37℃,5%CO₂浓度及饱和湿度的CO₂恒温培养箱内培养。用0.25%胰蛋白酶消化传代。取呈对数生长的细胞用于实验。

1.2.2 MTT比色分析法 取细胞以 1×10^4 的浓度接种于96孔板中,每孔180 μL;24 h待细胞贴壁后加入浓度为100,200,400,800 μg/L的Anti-MIF,每孔20 μL。每个浓度设12个复孔,重复3板,分别培养至24,48,72 h;每孔加入5 mg/mL MTT液20 μL,继续孵育4 h后弃其上清液;每孔加入150 μL二甲基亚砷(DMSO),震荡10 min,使其结晶充分溶解;并设不接种细胞的空白组和不加药物的对照组。酶标仪测定490 nm处的吸光度,计算HCT-116细胞抑制率。抑制率 = (1 - 实验组平均值/对照组平均值) × 100%。

1.2.3 免疫组织化学(免疫组化)检测癌细胞株VEGF的表达 将细胞稀释为 1×10^5 /mL,以每孔5 mL接种于6孔板中;每培养孔放置直径12 mm经多聚赖氨酸处理的无菌盖玻片3张,置于37℃,5%CO₂浓度及饱和湿度的CO₂恒温培养箱内培养。培养24 h待细胞贴壁生长后,吸除培养液,分别加入终浓度为100,200,400,800 μg/L含Anti-MIF的RPMI-1640培养基;并设不加药物的阴性对照组,每组平行6个样本。继续培养72 h后取出玻片,以磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,

4%中性甲醛固定,置恒温箱2 h后取出,按VEGF免疫组化试剂盒说明步骤进行染色。VEGF为胞质着色。

1.2.4 细胞周期检测 取细胞接种于100 mL培养瓶中,培养24 h待细胞贴壁后更换新鲜培养液并加入终浓度分别为100,200,400,800 μg/L的Anti-MIF,并设阴性对照(PBS液代替Anti-MIF),每组平行3个样本。培养至72 h,分别制成 1×10^6 /mL细胞悬液。离心弃其上清液加入80%冰乙醇固定,置于4℃保存待检。检测前充分摇匀待检液,PBS洗去乙醇后加入碘化丙啶(PI)染液,避光染色30 min,其余步骤按流式细胞仪标准操作。

1.2.5 免疫印迹(western-blot)检测VEGF蛋白的表达 将细胞悬液稀释为 1×10^5 /mL接种于100 mL培养瓶中,培养24 h待细胞贴壁后弃其上清液并更换含有终浓度为100,200,400,800 μg/L的Anti-MIF培养液,并设阴性对照(PBS液代替Anti-MIF)。继续培养72 h后取出,弃上清液,加入全细胞裂解液及苯甲基磺酰氟(PMSF),置于冰块上充分摇匀消化细胞30 min;冷冻离心机2 500 r/min离心15 min后收集上清液作为细胞总蛋白。加样前于沸水中煮5 min使蛋白变性后进行十二烷基硫酸钠存在下的聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳,然后电转至硝酸纤维素膜上;加入1:800稀释VEGF(兔抗),4℃孵育过夜;加入二抗,室温孵育2 h,DAB显色观察。

1.3 统计学处理

结果以算术均数(arithmetic mean) ± 标准差(standard deviation)表示。数据采用SPSS 13.0统计软件进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。Western-blot结果运用Quantity One图象分析软件进行灰度值分析。

2 结果

2.1 Anti-MIF对人结肠癌HCT-116细胞的抑制作用

Anti-MIF对人结肠癌HCT-116系细胞生长的抑制作用具有明显的剂量-时间依赖性;随着药物浓度的增加和作用时间的延长,结肠癌细胞的生长抑制愈明显,尤以800 μg/L作用72 h组最为显著(表1)。

2.2 HCT-116细胞株VEGF的表达

Anti-MIF对细胞中VEGF的表达有明显抑制作用,其表达随着Anti-MIF剂量的增加而减少(图1-2)。

表1 不同浓度 Anti-MIF 在不同时间对 HCT-116 细胞的抑制作用($n = 12, \bar{x} \pm s$)

| 浓度组($\mu\text{g/L}$) | 24 h | | 48 h | | 72 h | |
|------------------------|---------------------------|--------|---------------------------|--------|---------------------------|--------|
| | A 值 | 抑制率(%) | A 值 | 抑制率(%) | A 值 | 抑制率(%) |
| 0 | 0.975 ± 0.047 | (-) | 1.157 ± 0.054 | (-) | 1.277 ± 0.0453 | (-) |
| 100 | 0.965 ± 0.036 | 1.02 | 1.132 ± 0.046 | 2.16 | $1.212 \pm 0.041^{1),3)}$ | 5.09 |
| 200 | 0.937 ± 0.058 | 3.90 | $1.078 \pm 0.058^{1),2)}$ | 6.83 | $1.112 \pm 0.056^{1),3)}$ | 12.92 |
| 400 | $0.891 \pm 0.067^{1),2)}$ | 8.62 | $0.946 \pm 0.048^{1),3)}$ | 18.24 | $0.844 \pm 0.046^{1),3)}$ | 33.91 |
| 800 | $0.826 \pm 0.054^{1),3)}$ | 15.28 | $0.715 \pm 0.044^{1),3)}$ | 38.20 | $0.593 \pm 0.038^{1),3)}$ | 53.56 |

注:1)与 $0\mu\text{g/L}$ 组比较, $P < 0.05$; 2)与上组比较, $P < 0.05$; 3)与上组比较, $P < 0.01$

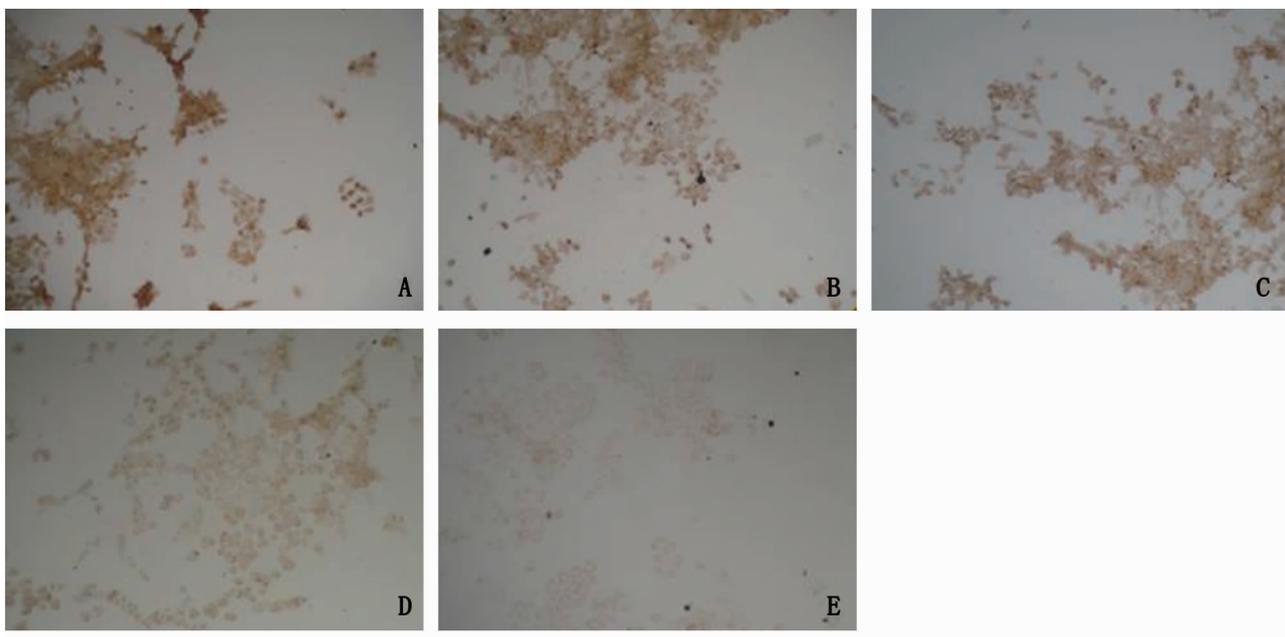


图1 VEGF 的表达($\times 10$) A:阴性组; B:100 $\mu\text{g/L}$ 组; C:200 $\mu\text{g/L}$; D:400 $\mu\text{g/L}$; E:800 $\mu\text{g/L}$

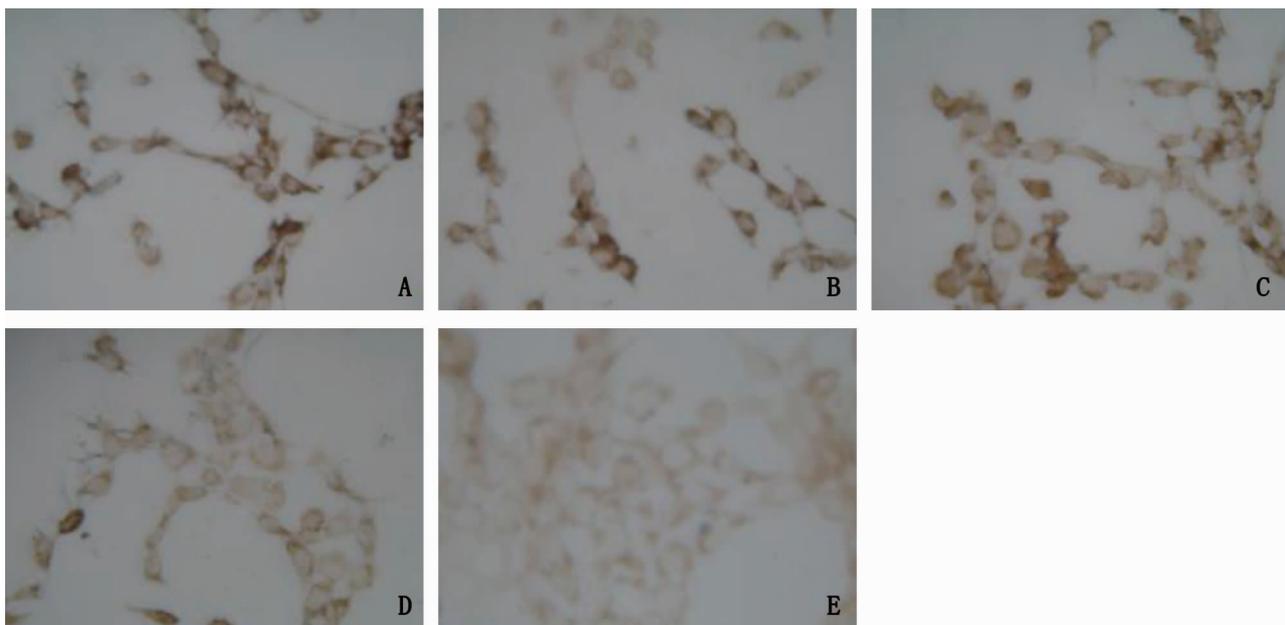


图2 VEGF 的表达($\times 400$) A:阴性组; B:100 $\mu\text{g/L}$ 组; C:200 $\mu\text{g/L}$; D:400 $\mu\text{g/L}$; E:800 $\mu\text{g/L}$

2.3 Anti-MIF 对结肠癌细胞周期的影响

Anti-MIF 作用 72 h 后细胞周期分布呈浓度依赖性改变,表现为 G_0/G_1 期细胞比例增高, S 期和 G_2/M 期细胞比例降低(表 2)。

表 2 Anti-MIF 作用 HCT-116 细胞 72 h 后对细胞周期的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

| 浓度($\mu\text{g/L}$) | G_0/G_1 | S | G_2/M |
|-----------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 0 | 51.09 \pm 3.75 | 45.78 \pm 2.82 | 3.12 \pm 0.95 |
| 100 | 57.65 \pm 1.64 | 39.61 \pm 1.93 | 2.74 \pm 0.46 |
| 200 | 64.52 \pm 2.70 ¹⁾ | 33.01 \pm 2.58 ¹⁾ | 2.48 \pm 0.47 |
| 400 | 67.05 \pm 2.35 ¹⁾ | 30.94 \pm 1.98 ¹⁾ | 2.01 \pm 1.11 |
| 800 | 73.36 \pm 4.91 ¹⁾ | 25.34 \pm 4.38 ¹⁾ | 1.31 \pm 0.54 ¹⁾ |

注:1)为与 0 $\mu\text{g/L}$ 组比较, $P<0.05$

2.4 Anti-MIF 对 VEGF 蛋白表达的影响

经 Quantity One 图象分析软件重复 10 次进行灰度值测定, Anti-MIF 0, 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g/L}$ 组作用 72 h 后,其 VEGF 的蛋白表达分别为 20 567.48 \pm 1 522.19, 17 188.03 \pm 1 011.59, 13 920.21 \pm 1 305.72, 13 256.5 \pm 1 266.09 和 11 845.62 \pm 1 071.20, 分别与 0 $\mu\text{g/L}$ 组比较,均具有统计学意义($P<0.05$)(图 3)。

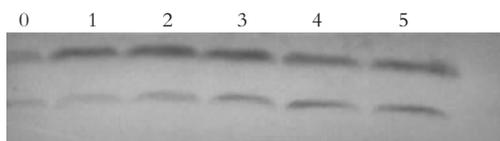


图 3 Anti-MIF 作用于 HCT-116 细胞 72 h 后 VEGF 蛋白的表达 0: mark; 1-5: Anti-MIF 800 $\mu\text{g/L}$, 400 $\mu\text{g/L}$, 200 $\mu\text{g/L}$, 100 $\mu\text{g/L}$, 0 $\mu\text{g/L}$ 组

3 讨论

MIF 为 115 个氨基酸组成的 12.5 kD 的多肽,三维结构为 α/β 结构,以同源三聚体的形式存在,基因定位在 22 号染色体长臂上(22q11.2)。它不仅存在于巨噬细胞、单核细胞、垂体前叶细胞,而且在上皮细胞、内皮细胞等各种类型的细胞中,甚至在肝、脾等组织的实质细胞中也有表达^[4]。近来发现 MIF 不仅是免疫和炎症反应中的必要成分,而且也在肿瘤细胞中表达,并与肿瘤较高的转移危险性和较差的预后密切相关^[5-6]。

Wilson 等^[7]在建立的腺瘤性结肠息肉病小鼠模型中发现,MIF 的表达较病变附近的正常黏膜

明显增加,并且绝大多数存在于上皮细胞中。外源性 MIF 还能抑制细胞的凋亡,促进人结、直肠癌细胞的生长。笔者用 MTT 方法反向证实 Anti-MIF 对人结肠癌 HCT-116 系细胞的生长有抑制作用,该作用具有明显的剂量-时间依赖性。在 $\leq 200 \mu\text{g/L}$ 组,24 h 对结肠癌细胞的生长影响不明显($P>0.05$),48 h 后癌细胞的生长逐渐抑制($P<0.05$);随着浓度的增加和作用时间的延长,大肠癌细胞的生长明显抑制,72 h 最为显著(药物组与对照组 P 值均 <0.05)。文献报道 MIF 影响细胞增殖与 P44/P42 细胞外信号调节激酶(ERK)调节的有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)的激活和磷酸化有关。MIF 缺陷导致细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)的表达下降,依赖细胞周期蛋白激酶 4/6(CDK4/6)活性降低,视网膜母细胞瘤易感基因(Rb)和转录因子 E2F 功能受损,使细胞进入合成期的关键酶和调节因子无法正常转录,最终促进细胞的生长抑制^[8-9]。

本实验用不同浓度 Anti-MIF 作用 72 h 的 HCT-116 结肠癌细胞进行流式细胞仪检测细胞周期的结果表明:随着作用浓度的增加, G_0/G_1 期比例升高,S 期和 G_2/M 期降低。由于不同生物细胞的增殖周期时间不同,主要表现在 G_1 期持续时间的差异,而且 G_1 期的启动是细胞周期的关键。因此 $G_1 \sim S$ 期的调控尤为重要。 G_1 期阻滞使 HCT-116 细胞生长周期延长,细胞的恶性增殖相应减慢。本结果提示, Anti-MIF 能使进入 S 期细胞明显减少,即阻碍细胞进入 DNA 合成期,从而抑制结肠癌细胞生长。此结果也证实 Anti-MIF 可调控细胞周期的推测。

VEGF 是最重要的血管生成刺激因子之一,在肿瘤细胞中和血管内皮细胞中有明显的阳性表达。蒋萍等^[10]发现大肠癌组织中 VEGF 阳性表达显著高于远癌肠黏膜,且与 Dukes 分期有关。吴泽宇等^[11]对中下段直肠癌研究也发现 T3 期中 VEGF 的阳性表达率明显高于 T2 和 T1 者;淋巴结转移阳性者 VEGF 表达率明显高于淋巴结转移阴性者,提示大肠癌的发生发展可能与癌细胞大量表达 VEGF 及 VEGF 促进血管生成关系密切。另一方面,VEGF 的表达又与高水平 MIF 呈正相关。Ren 等^[3]发现 MIF 在食管鳞状细胞癌中过度表达,患者血清 MIF 水平也伴随血清 VEGF 的升高而升高。MIF 在体外还能刺激食管癌细胞分泌白介素-8(IL-8)和 VEGF,提示肿瘤细胞可分泌 MIF,从而上调 IL-8 和 VEGF,在食管癌的发

生、发展中具有重要作用。笔者用细胞免疫组化法检测也发现 Anti-MIF 对细胞中 VEGF 的表达有明显抑制作用, VEGF 表达随着 Anti-MIF 剂量增加而减少;在 800 $\mu\text{g/L}$ 组的细胞中 VEGF 表达明显减弱。蛋白印迹实验中也显示实验组 VEGF 蛋白表达比对照组明显降低,且均具有统计学意义。VEGF 是一种肝素结合因子,能以自分泌和旁分泌形式加速肿瘤细胞的有丝分裂。同时,它能特异性地引起血管内皮细胞分裂增殖和血管构建,促进内皮细胞、单核细胞等迁移,从而促进新生血管形成^[12]。肿瘤血管形成受血管生成因子与抑制因子的调节。当血管生成因子增多时,打破了血管生成因子与抑制因子的平衡状态,丰富的肿瘤新生血管必然会加速肿瘤的生长、浸润及转移^[13]。Chesney^[14]将同源的 B 淋巴细胞注入 syngeneic 小鼠体内,观察在 MIF 多克隆中和抗体即抗 MIF 抗体缺乏及存在的情况下肿瘤的生长情况。结果发现,抗 MIF 抗体在肿瘤生长的初始阶段明显影响肿瘤生的大小。用反义核酸技术抑制肿瘤形成部位 MIF 的形成,结果几乎完全抑制了肿瘤的生长。说明 MIF 是内皮细胞增殖和肿瘤血管生成的必需因子。

虽然目前关于 MIF 对肿瘤的作用机制还未完全明了,但有理由认为 Anti-MIF 能抑制肿瘤的生长,并有可能是通过抑制肿瘤细胞分泌 VEGF 而发挥作用。Katherine 等^[15]应用 MIF 抑制剂透明质酸(HA)和抗 MIF Ab 及反义 MIF 核苷酸作用于人膀胱癌细胞株 HT-1376,其 MIF 的基因表达、蛋白分泌、肿瘤坏死因子- α 和细胞生长均受到抑制,从而认为抗 MIF 有可能作为治疗膀胱癌的新方法。随着研究的深入和全面了解,相信 MIF 将为治疗肿瘤开辟一条新的可行途径。

参考文献:

- [1] David JR. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1966, 56(1): 72 - 77.
- [2] Bloom BR, Bennettm B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity [J]. Science, 1966, 153(731): 80 - 82.
- [3] Ren Y, Law S, Huang X, *et al.* Macrophage migration inhibitory factor stimulates angiogenic factor expression and correlates with differentiation and lymph node status in patients with esophageal squamous cell carcinoma [J]. Ann Surg, 2005, 242(1): 55 - 63.
- [4] Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity [J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(10): 791 - 800.
- [5] Kamimura A, Kamachi M, Nishihira J, *et al.* Intracellular distribution of macrophage migration inhibitory factor predicts the prognosis of patients with adenocarcinoma of the lung [J]. Cancer, 2000, 89(2): 334 - 341.
- [6] del Vecchio MT, Tripodi SA, Arcuri F, *et al.* Macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma: correlation with tumor grading and combination endocrine treatment-related changes [J]. Prostate, 2000, 45(1): 51 - 57.
- [7] Wilson JM, Coletta PL, Cuthbert RJ, *et al.* Macrophage migration inhibitory factor promotes intestinal tumorigenesis [J]. Gastroenterology, 2005, 129(5): 1485 - 1503.
- [8] Liao H, Bucala R, Mitchell RA. Adhesion-dependent signaling by macrophage migration inhibitory factor(MIF) [J]. J Biol Chem, 2003, 278(1): 76 - 81.
- [9] Petrenko O, Moll UM. Macrophage migration inhibitory factor MIF interferes with the Rb-E2F pathway [J]. Mol Cell, 2005, 17(2): 225 - 236.
- [10] 蒋萍, 李景和, 罗庚求, 等. 大肠癌组织中 EphA2, VEGF 和 MMP9 蛋白的表达及其相关性研究 [J]. 中国普通外科杂志, 2007, 7(16): 696 - 699.
- [11] 吴泽宇, 罗中仁, 万进, 等. 中下段直肠癌 E-cadherin, MMP-2 和 VEGF 表达与肿瘤侵袭转移的关系 [J]. 中国普通外科杂志, 2007, 4(16): 387 - 388.
- [12] Ferrara N, Hanzel W. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor for vascular endothelial cells [J]. Biophys Res Commun, 1989, 161(3): 851 - 859.
- [13] Sugano M, Tsuchida K, Makino NI. Nifedipine prevents apoptosis of endothelial cells induced by oxidized low-density lipoproteins [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2002, 40(1): 1462 - 1521.
- [14] Chesney J, Metz C, Bacher M, *et al.* An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma [J]. Mol Med, 1999, 5(3): 181 - 191.
- [15] Katherine LM, Pedro LV, Erica CL. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor decreases proliferation and cytokine expression in bladder cancer cells [J]. BMC Cancer, 2004, 4(1): 34.