

胶原三维立体培养模型中胚肺成纤维细胞与肺癌GLC-82细胞的相互作用**

闫江涛^{1,2}, 朱运奎², 李继东², 马国成², 王舒², 王晓芹²

Interaction between lung fibroblast and lung cancer GLC-82 cells in a three-dimensional collagen culture model

Yan Jiang-tao^{1,2}, Zhu Yun-Kui², Li Ji-Dong², Ma Guo-cheng², Wang Shu², Wang Xiao-Qin²

Abstract

BACKGROUND: The histocyte and inflammatory cells played an important role in the invasion and metastasis of lung cancer cells. However, cell interaction influenced matrix metalloproteinase.

OBJECTIVE: To observe the influence of interaction between fetal lung fibroblasts (HFL) and lung cancer cells on matrix metalloproteinase-1, 2, and 9 (MMP-1, 2, 9) expression in three-dimensional co-culture.

METHODS: Human lung cancer cells (GLC-82) and HFL were co-cultivated in three-dimensional collagen gels, which were mixed with collagen, 4 time volume DMEM and sterilizing water, as well as 1 time volume DMEM. The final concentration of collagen was 0.75 g/mL. GLC-82 and HFL were cultured individually, and GLC-82 and HFL were then co-cultured according to the ratio of 5:1. After 48 hours, the supernatant was harvested following adding 1 time volume DMEM. MMP-1 expression was detected by Western blot and MMP-2 and 9 expressions were detected by gelatin zymography.

RESULTS AND CONCLUSION: In three-dimensional co-culture of GLC-82 with HFL, the expressions of MMP-1, MMP-2 and MMP-9 were much higher than that in GLC-82 or in HFL alone ($P < 0.05$). This suggested that the interaction between HFL and lung cancer cells enhanced the invasion and metastasis of lung cancer through up-regulating the secretion and activation of MMP-1, MMP-2, and MMP-9.

Yan JT, Zhu YK, Li JD, Ma GC, Wang S, Wang XQ. Interaction between lung fibroblast and lung cancer GLC-82 cells in a three-dimensional collagen culture model. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(15): 2769-2772. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 组织细胞、炎细胞可能在肿瘤细胞的侵袭、转移中发挥着重要作用, 而细胞间的相互作用对基质金属蛋白酶有影响。

目的: 观察胚肺成纤维细胞与肺癌 GLC-82 细胞在胶原三维立体培养条件下, 相互作用对基质金属蛋白酶 1, 2, 9 表达的影响。

方法: 采用三维胶原立体培养模型, 按比例混合胶原, 4 倍 DMEM 和灭菌水, 1 倍 DMEM 的液体胶原, 其中胶原终浓度为 0.75 g/mL。将 GLC-82 细胞、胚肺成纤维细胞分别单独培养及 GLC-82 细胞和胚肺成纤维细胞按 5:1 混合培养, 待胶原固化后加入 1 倍 DMEM 培养基, 48 h 后收集上清液。Western blot 法检测基质金属蛋白酶 1 表达水平, 明胶酶谱法测定基质金属蛋白酶 2, 9 的表达。

结果与结论: 胚肺成纤维细胞与肺癌 GLC-82 细胞混合培养组基质金属蛋白酶 1 及基质金属蛋白酶 2, 9 分泌量大于单独培养组($P < 0.05$)。结果提示, 三维立体培养条件下, 胚肺成纤维细胞与肺癌 GLC-82 细胞相互作用能通过上调基质金属蛋白酶 1, 2, 9 的表达和活化, 促进肺癌侵袭和转移。

关键词: 肺癌 GLC-82 细胞; 胚肺成纤维细胞; 三维胶原立体培养; 基质金属蛋白酶; 心肺组织工程

doi: 10.3969/j.issn.1673-8225.2010.15.026

闫江涛, 朱运奎, 李继东, 马国成, 王舒, 王晓芹. 胶原三维立体培养模型中胚肺成纤维细胞与肺癌 GLC-82 细胞的相互作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(15):2769-2772. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

侵袭与转移是恶性肿瘤致死的主要原因^[1], 而基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)在肿瘤侵袭转中起着非常重要的作用^[2], 它能降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的几乎所有成分^[3], 包括基底膜胶原、间质胶原、纤维结合素及多种蛋白多糖^[4], 并参与肿瘤血管生成, 从而促进肿瘤的侵袭转移。而细胞间的相互作用对MMPs的影响, 特别是对MMP-1, 2, 9表达的影响, 在肿瘤的转移中发挥着重要作用。

MMP-1, 即间质胶原酶1, 主要降解 I、II、III型胶原, 其中对III型胶原有着特别的亲和力, 它还能降解细胞基质的非胶原成分, 如基底膜蛋白多糖等, 在肿瘤侵袭过程中, 它能够通过结合 $\alpha 2 \beta 1$ 整合素及 I 型胶原, 促进肿瘤细胞的转移^[5]。MMP-2、MMP-9通过降解基底膜主要成分IV型胶原, 促进恶性肿瘤细胞的侵袭转移, 还能促进肿瘤血管生成, 加速肿瘤的生长和转移。MMP-2在靠近肿瘤边缘和侵袭活跃处表达较多, 组织细胞通过可溶性介质促进MMP-2的表达影响肿瘤的侵袭和转移^[6], 且主要涉及经淋巴系统途径侵袭转移。在肿瘤侵袭转移过程中, 多种基因相关的癌细胞高侵袭性,

¹Second Clinical Medical College, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China; ²Department of Respiratory Medicine, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Area Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Yan Jiang-tao★, Studying for master's degree, Physician, Second Clinical Medical College, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China; Department of Respiratory Medicine, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Area Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China yanji07@lzu.cn

Correspondence to: Zhu Yun-kui, Master, Chief physician, Department of Respiratory Medicine, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Area Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China yunkuizhu@yahoo.com.cn

Supported by: the Natural Science Foundation of Gansu Province, No. SZS051-A25-088*

Received: 2009-09-16
Accepted: 2009-11-20

¹ 兰州大学第二临床医学院, 甘肃省兰州市 730000; ² 解放军兰州军区兰州总医院呼吸内科, 甘肃省兰州市 730050

闫江涛★, 男, 1978 年生, 河南省郑州市人, 汉族, 兰州大学第二临床医学院在读硕士, 医师, 主要从事肺癌的基础及临床研究。
yanjit07@lzu.cn

通讯作者: 朱运奎, 硕士, 主任医师, 解放军兰州军区兰州总医院呼吸内科, 甘肃省兰州市 730050
yunkuizhu@yahoo.com.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)15-02769-04

收稿日期: 2009-09-16
修回日期: 2009-11-20 (20090916008/W · H)

都在不同程度涉及 MMPs 家族成员, 特别是 MMP-1、MMP-2、MMP-9 的改变, 如 MAG2 基因能通过上调 MMP-2、CD44 及细胞内游离钙的浓度, 提高恶性肿瘤的侵袭能力^[7]; NDRG2 (N-myc downstream-regulated gene 2) 能通过抑制核转录因子 NF-kappaB (nuclear factor kappa B), 抑制 MMP-2、9 的表达, 从而降低肿瘤的转移能力^[8]; MMP-2 亦是 P53 作用的靶点, 它易受 P53 上调^[9]; 另外, 基因的多态性亦能影响 MMPs 家族的活性, 如 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 及 MMP-12 基因中单核苷酸多态性 (SNPs) 能影响其分泌及活化, 是非小细胞肺癌病存活的潜在指标等^[10]。

作者应用胶原三维立体培养模型, 模拟人体生理环境, 探讨成纤维细胞在肺癌侵袭转移中的相互促进作用。

1 材料和方法

设计: 单一样本观察。

时间及地点: 实验于 2008-09/2009-08 在解放军兰州军区总院呼吸内科实验室博士后流动站完成。

材料:

细胞、试剂及仪器	来源
非小细胞肺癌 GLC-82 细胞株	上海麦莎生物科技有限公司
人胚肺成纤维细胞 (human fetal lung fibroblast cell line, HFL)	解放军兰州军区总医院呼吸内科实验室博士后流动站自胎肺原代培养
蛋白质 Marker、兔抗人 MMP-1 一抗	美国 MBI 公司
辣根过氧化物标记羊抗兔二抗、定影显影试剂盒	武汉博士德公司
ECL 超敏发光液	普利莱基因技术有限公司
明胶、Tris 及 TritonX-100	美国 Sigma 公司
电泳、转膜系统	美国 Bio-Rad 公司

实验方法:

细胞培养: 非小细胞肺癌 GLC-82 细胞株、胎胚肺成纤维细胞原代培养至第 5 代, 用含体积分数为 5% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 加入 100 mg/L 的青霉素和 100 mg/L 的链霉素, 置于 37 °C, 含体积分数为 5% CO₂, 相对湿度 95% 的培养箱中常规培养, 用 2.5 g/L 胰酶消化传代, 用锥虫蓝试验证实细胞活性 >90%。

胶原三维立体培养: 按比例混合胶原, 4 倍 DMEM 和灭菌水, 使其成为等离子, 等渗, 1 倍

DMEM 的液体胶原, 其中胶原终浓度为 0.75 g/mL。通过细胞计数分别将 GLC-82 细胞 ($5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$)、胚肺成纤维细胞 ($5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$), 以及 GLC-82 细胞 ($5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$) 与胚肺成纤维细胞 ($1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$) 的混合胶原溶液, 均按 0.5 mL/孔移入 24 孔培养板内, 待胶原固化后加入 1 倍 DMEM 培养基 1 mL/孔, 48 h 后收集上清液, 分装, -20 °C 保存, 备用。

明胶制备及 MMP-2 的测定: 取上清 15 μL, 按 1:1 加 2 倍上样缓冲液, 每孔加样 25 μL, 1% 明胶的聚丙烯酰胺电泳, 2.5% TritonX-100 常温浸泡 2 h, 后浸入每 200 mL 蒸馏水中加入 Tris 1.12 g, pH 7.50, CaCl₂ 1.12 g 和 ZnCl₂ (1:1 000) 9.2 μL 制成酶激活液, 37 °C, 振荡 15~18 h。考马斯亮蓝染色, 褪色至条带清晰。

Western blot 法检测 MMP-1: 取上清 500 μL, 加入预冷的无水乙醇 (1:1), 10 000 r/min, 离心 5 min, 弃上清, 后 PBS 100 μL 稀释。取 15 μL, 加上样缓冲液 (1:1), 加热变性, 每孔加样 25 μL, 聚丙烯酰胺电泳、转膜, 加兔抗人的 MMP-1 一抗 (1:1 000), 4 °C 孵育过夜, 辣根过氧化物标记的羊抗兔二抗常温孵育 1 h, ECL 荧光显影, 定影。

凝胶成像系统分析: 应用 IPP 测量软件, 对蛋白条带进行半定量统计分析, 累积吸光度 (IA) = 平均灰度值 × 面积, Western blot 检测到的蛋白条带, 采用目的蛋白条带的 IA 值/对应的 β-actin IA 值, 相对精确比较目的蛋白含量; 明胶酶谱法检测到的蛋白, 无 β-actin 内参, 只采用 IA 值进行比较。

主要观察指标: 各组细胞在三维胶原培养基中的生长情况、各组中 MMP-1, 2, 9 的表达情况。

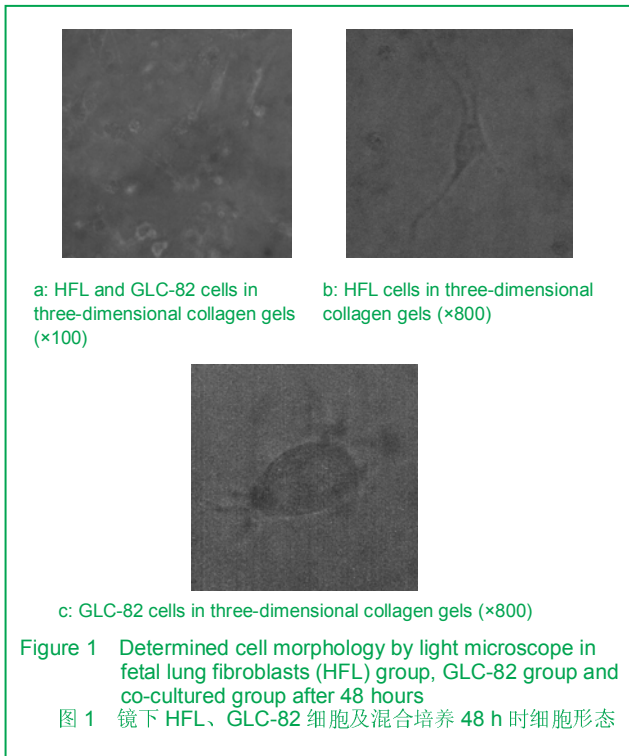
设计、实施、评估者: 实验设计与实施由第一、二作者完成; 评估为通讯作者, 均受过专业培训。

统计学分析: 所有实验各组均设 3 个平行立体胶原培养, 每个实验至少重复 3 次, 检测数据为随机 1 次试验的数据结果。由第一作者应用 SPSS 13.0 软件处理, 两组间比较采用 t 检验, 组间比较采用单因素方差分析。

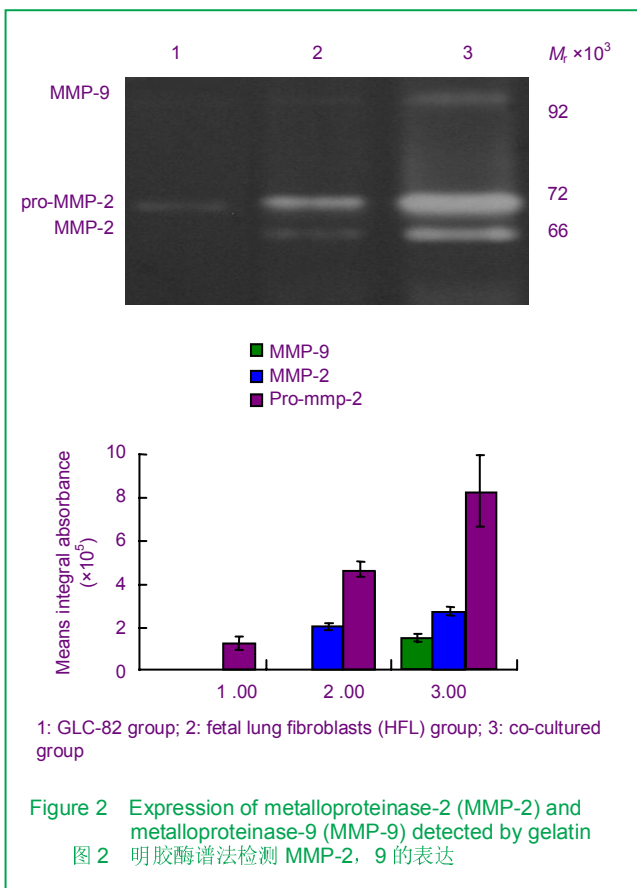
2 结果

2.1 细胞生长情况观察 三维胶原立体培养中, HFL 细胞和 GLC-82 细胞均悬浮生长于胶原中 (图 1a), 细胞在胶原内几乎不分裂, 呈单

细胞生长。如：HFL细胞在胶原内呈长条状生长(图1b)，GLC-82细胞呈毛刺样浸润生长(图1c)。

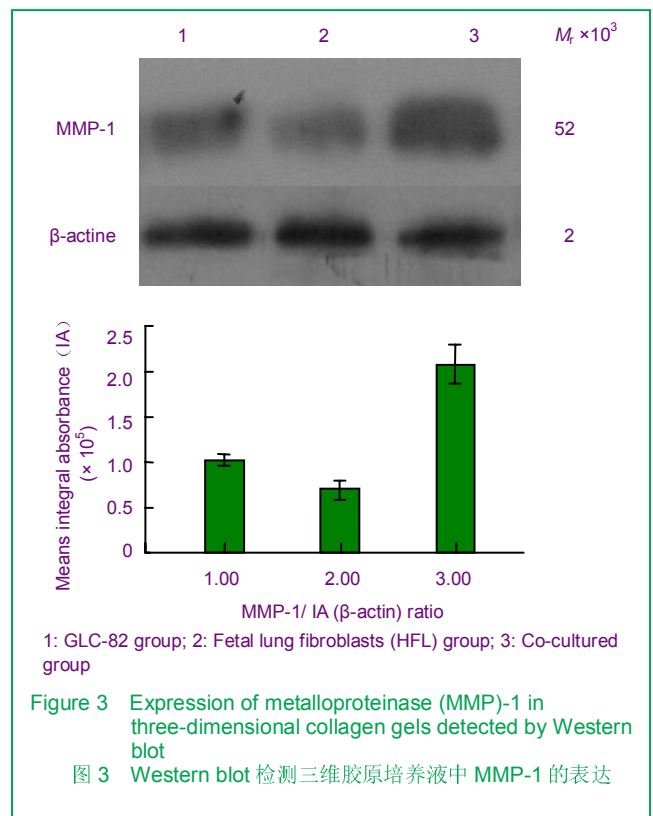


2.2 明胶酶谱法检测MMP-2、9的表达 应用蛋白IA半定量检测MMP-2、9的表达情况，见图2。



GLC-82细胞培养组及HFL细胞培养组不表达或表达极少量MMP-9，混合培养组MMP-9表达明显增高；混合培养组proMMP-2表达较GLC-82细胞组($P = 0.000 < 0.05$)、HFL细胞组($P = 0.001 < 0.05$)表达明显增高，HFL细胞组 proMMP-2 达较高于GLC-82细胞组($P = 0.000 < 0.05$)；GLC-82细胞培养组不表达(或少量)MMP-2，但混合培养组MMP-2表达明显高于GLC-82细胞组($P = 0.000 < 0.05$)及HFL细胞组($P = 0.000 < 0.05$)。

2.3 Western blot检测MMP-1的表达 见图3。



采用MMP-1蛋白条带的IA值/对应的β-actin IA值，半定量比较各组MMP-1的表达。混合培养组MMP-1表达较GLC-82细胞培养组($P = 0.000 < 0.05$)及HFL细胞培养组($P = 0.000 < 0.05$)表达明显增高；GLC-82细胞组MMP-1表达高于HFL细胞组($P = 0.027 > 0.05$)。

3 讨论

成纤维细胞是实体瘤间质的重要组成部分，它与肿瘤细胞相互促进，表达多种细胞因子、蛋白酶、黏附分子等，明显增加了肿瘤细胞的浸润和转移。如成纤维细胞合成的细胞因子TGF、双调蛋白等能通过细胞外信号激酶提高细胞周期蛋白D1和E蛋白质的合成水平，可能对肺腺癌细胞增殖有促进作用^[11]。VEGF可提高血管的通透性，启动血管生成，在肺癌细胞与间质成纤维细胞表达明显相关^[12]。bFGF是很强的血管生成因子^[13]，

炎细胞因子如白细胞介素8可能通过血管生成间接促进肿瘤生长^[14]; 白细胞介素1, 肿瘤坏死因子 α 能通过激活核转录因子NF-kappaB通道促进MMPs家族某些成员表达^[8, 15]。在本试验中, 胚肺成纤维细胞与肺癌GLC-82细胞三维胶原混合培养模型中, MMP-1、MMP-9蛋白酶分泌及MMP-2蛋白的酶原及活化酶的分泌均显著增加($P < 0.05$)。Ishikawa 等^[16]研究发现间质成纤维细胞中MMP-2的表达与肺癌的预后关系非常密切, 从而推测肺癌细胞借助成纤维细胞分泌的MMP-2进行侵袭。试验表明在三维培养模型中, 成纤维细胞与肿瘤细胞相互作用可明显上调MMPs家族多种成员分泌水平(MMP-1、MMP-2、MMP-9等), 从而促进肿瘤细胞的转移。

在三维胶原立体培养中, GLC-82、HFL细胞在胶原内不分裂, 呈单细胞生长, 通过不同放大倍数的显微镜可清晰观察细胞生长形态, 通过对胶原内细胞的观察, 可了解细胞在人体内生长情况, 如肿瘤细胞在胶原内呈毛刺状浸润生长, 这是平面培养所不能观察到的。另外, 立体培养条件下MMPs的表达、活化均优于同等条件下平面培养^[8], 由此推断立体培养更有利于研肿瘤的侵袭转移过程。

最近有研究证实肺癌细胞与单个核细胞混合立体培养时, 能够促进MMP-2、MMP-9的分泌与活化^[17]; 肺癌细胞与肺成纤维细胞混和立体培养时, 可促进MMP-2的分泌与活化^[18]。总之组织细胞、炎细胞与癌细胞之间相互作用能显著促进肺癌的侵袭与转移。

4 参考文献

- [1] Spiro SG, Silvestri GA. One Hundred Years of Lung Cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172(5):523-529.
- [2] Cai, M Onoda K, Takao M, et al. Degradation of Tenascin-C and activity of Matrix Metalloproteinase-2 Are Associated with Tumor Recurrence in Early Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research.* 2002;(8):1552-1556.
- [3] Juncker-Jensen A, Rømer J, Pennington CJ, et al. Spontaneous metastasis in matrix metalloproteinase 3-deficient mice. *Molecular carcinogenesis.* 2009;48(7):618-625.
- [4] Oikonomidi S, Kostikas K, Tsilioni I, et al. Matrix metalloproteinases in respiratory diseases: From pathogenesis to potential clinical implications. *Current Medicinal Chemistry.* 2009;16(10):1214-1228.
- [5] Vincent Lemaitre, Jeanine D'Armiento. Matrix Metalloproteinases in Development and Disease. *Birth Defects Research (Part C).* 2006;78:1-10.
- [6] Wu SQ, Zhao W. Zhongliu Jichu yu Linchuang. 2007; 20(1): 12-14. 吴随群, 赵伟. 肺癌MMP2和MMP9、VEGF在非小细胞肺癌中的表达和意义[J]. *肿瘤基础与临床.* 2007, 20(1): 12-14.
- [7] Zhang J, Liu G, Meng Y, et al. MAG-2 promotes invasion, mobility and adherence capability of lung cancer cells by MMP-2, CD44 and intracellular calcium in vitro. *Oncology Reports.* 2009;21(3): 697-706.
- [8] Kim A, Kim MJ, Yang Y, et al. Suppression of NF-kappaB activity by NDRG2 expression attenuates the invasive potential of highly malignant tumor cells. *Carcinogenesis* 2009;30(6):927-936.
- [9] Miyashita T, Harigai M, Hanada M, et al Identification of p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res.* 1994; 54:3131- 3135.
- [10] Jin G, Miao R, Hu Z, et al. Putative functional polymorphisms of MMP9 predict survival of NSCLC in a Chinese population. *Int J Cancer.* 2009;124(9):2172-2178.
- [11] Hashimoto K, Morishige K, Sawada K, et al. Alendronate Inhibits Intraperitoneal Dissemination in In vivo Ovarian Cancer Model. *Cancer Res* 2005;65(2):15.
- [12] Li Su, Wei Zhou, Sohee Park, et al. Matrix Metalloproteinase-1 Promoter Polymorphism and Lung Cancer Risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* 2005;14:567-570.
- [13] Wang WS, Chen PM, Wang HS, et al. Matrix metalloproteinase-7 increases resistance to Fas-mediated apoptosis and is a poor prognostic factor of patients with colorectal carcinoma. *Carcinogenesis.* 2006;27(5):1113-1120.
- [14] Rhonda F. Souza and Stuart J. Spechler. Concepts in the Prevention of Adenocarcinoma of the Distal Esophagus and Proximal Stomach. *CA Cancer J Clin* 2005;55:334-351.
- [15] Zhang J, Xu YJ, Xiong WN, et al. Inhibition of NF-kappaB through IkappaBalpha transfection affects invasion of human lung cancer cell line A549. *Ai Zheng.* 2008;27(7):710-715.
- [16] Ishikawa S, Takenaka K, Yanagihara K, et al. Matrix metalloproteinase-2 status in stromal fibroblasts, not in tumor cells, is a significant prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *Cin cancer Res.* 2004;10(19): 6579-6585.
- [17] Li JD, Wu CG, Zhu HK, et al. Disi Junyi Daxue Xuebao. 2007; 28(21): 1944-1945. 李继东, 吴昌归, 朱运奎, 等. H460细胞与单个核细胞三维立体混合培养中MMP-2和MMP-9的表达[J]. *第四军医大学学报.* 2007, 28(21): 1944-1945.
- [18] Zhu HK, Zhao BB, Li JD, et al. Disi Junyi Daxue Xuebao. 2009; 30(5): 452-455. 朱运奎, 赵斌斌, 李继东, 等. 肺癌H460细胞与胚肺成纤维细胞相互作用对基质金属蛋白酶-2的表达影响[J]. *第四军医大学学报.* 2009, 30(5):452-455.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 课题受甘肃省自然科学基金 (SZS051-A25-088)资助。

利益冲突: 无其他利益冲突。