

VEGF促进肝癌SMMC-7721细胞侵袭性的自分泌机制

顾宇, 陆枫林

■背景资料

目前, 对肝癌的侵袭转移机制研究虽取得了一定的进展, 但具体分子机制仍不十分清楚, 对其潜在分子机制的阐明可以为肝癌侵袭转移分子靶向治疗奠定基础. 以往的研究认为肿瘤的转移为旁分泌机制, 本研究拟探讨肝癌细胞侵袭的自分泌机制.

顾宇, 陆枫林, 东南大学附属中大医院消化科 江苏省南京市 210009

顾宇, 主治医师, 主要从事消化系疾病研究.

通讯作者: 陆枫林, 副教授, 主任医师, 210009, 江苏省南京市, 东南大学附属中大医院消化科. guyu123456789@126.com

收稿日期: 2009-07-18 修回日期: 2009-09-12

接受日期: 2009-09-15 在线出版日期: 2009-11-18

Vascular endothelial growth factor promotes the invasion of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells via an autocrine mechanism

Yu Gu, Feng-Lin Lu

Yu Gu, Feng-Lin Lu, Department of Gastroenterology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Feng-Lin Lu, Department of Gastroenterology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China. guyu123456789@126.com

Received: 2009-07-18 Revised: 2009-09-12

Accepted: 2009-09-15 Published online: 2009-11-18

Abstract

AIM: To evaluate the effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) on cell invasion and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721.

METHODS: SMMC-7721 cells were incubated with different concentrations of VEGF. The invasive capacity of cells was determined using cell invasion assay. The expression of MMP-9 mRNA and protein was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively.

RESULTS: Compared with normal control cells, cells treated with VEGF had significantly increased invasive capacity ($P < 0.01$). The expression levels of MMP-9 mRNA and protein in VEGF-treated cells were significantly higher than those in normal control cells (0.479 ± 0.025 , 0.665 ± 0.024 vs 0.315 ± 0.022 ; 0.521 ± 0.026 , 0.662 ± 0.026 vs 0.366 ± 0.025 , both $P < 0.01$). The ex-

pression levels of MMP-9 mRNA and protein in cells incubated with high-concentration VEGF ($30 \mu\text{g/L}$) were significantly higher than those in cells incubated with low-concentration VEGF ($10 \mu\text{g/L}$) ($P < 0.01$).

CONCLUSION: VEGF can upregulate MMP-9 expression and promote cell invasion in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells via an autocrine mechanism.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Vascular endothelial growth factor; Matrix metalloproteinase-9; Invasion

Gu Y, Lu FL. Vascular endothelial growth factor promotes the invasion of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells via an autocrine mechanism. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(32): 3292-3295

摘要

目的: 探讨促血管内皮生长因子(VEGF)对肝癌细胞SMMC-7721侵袭力以及对该细胞中基质金属蛋白酶9(MMP-9)的影响, 初步研究VEGF对肿瘤侵袭和转移的影响及可能的作用机制.

方法: 使用VEGF体外培养人肝癌SMMC-7721细胞, 通过细胞体外侵袭实验检测细胞侵袭能力的改变, 再分别使用 $30 \mu\text{g/L}$ 、 $10 \mu\text{g/L}$ VEGF培养人肝癌SMMC-7721细胞, 以正常培养人肝癌SMMC-7721细胞为空白对照组. 使用半定量RT-PCR和Western blot法对3组细胞中MMP-9的mRNA和蛋白表达水平进行分析.

结果: 细胞体外侵袭实验显示, 外加VEGF培养后, 细胞侵袭力明显增强($P < 0.01$); MMP-9 mRNA和蛋白的表达在外加VEGF组中要明显高于空白对照组(0.479 ± 0.025 , 0.665 ± 0.024 vs 0.315 ± 0.022 ; 0.521 ± 0.026 , 0.662 ± 0.026 vs 0.366 ± 0.025 , 均 $P < 0.01$), 且高浓度和低浓度组之间也有明显差别.

结论: 肝癌SMMC-7721细胞系中存在有自分泌机制, VEGF可通过自分泌机制上调肝癌细胞的MMP-9表达, 进而促进肿瘤的浸润转移.

■同行评议者

于颖彦, 教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院器官移植中心病理室

关键词: 肝癌; 血管内皮生长因子; 基质金属蛋白酶-9; 侵袭

顾宇, 陆枫林. VEGF促进肝癌SMMC-7721细胞侵袭性的自分泌机制. 世界华人消化杂志 2009; 17(32): 3292-3295
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3292.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界上常见的恶性肿瘤之一, HCC有高致死率, 特别是肝硬化基础上发展为肝癌的患者^[1], 容易发生早期肝内外转移, 预后较差. 因此, 对于肝癌的侵袭转移机制的研究是一个重要课题. 目前, 对肝癌的侵袭转移机制研究虽取得了一定的进展, 但具体分子机制仍不十分清楚, 对其潜在分子机制的阐明可以为肝癌侵袭转移分子靶向治疗奠定基础. 以往的研究认为肿瘤的转移为旁分泌机制, 本研究拟探讨肝癌细胞侵袭的自分泌机制.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株SMMC-7721由本校分子生物中心实验室提供; DMEM高糖细胞培养基购自美国Gibco公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物公司; 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)购自美国-9 Santa Cruz公司; 单克隆抗人基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinases 9, MMP-9)抗体购自美国Santa Cruz生物公司; 免疫组织化学试剂盒购自北京奥伯森生物公司; TRIzol裂解液购自美国Invitrogen公司; RT-PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司; Matrigel胶购自美国Becton-dickinson公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人肝癌细胞株SMMC-7721用含100 mL/L胎牛血清的DMEM高糖培养基, 在37℃、50 mL/L CO₂培养箱里常规培养, 细胞长至80%培养皿面积时, 以2.5 g/L胰酶37℃消化1 min, 倒去胰酶, 加入新鲜培养基, 吹打至单细胞悬液, 分装传代.

1.2.2 侵袭性实验: 加Matrigel胶至24孔板上的Transwell小室上室, 每孔100 μL, 37℃放置4-5 h; 使用无血清培养基轻柔的清洗凝胶后的Matrigel, 吸出培养板上多余液体; 下室放置600 μL含有5 mg/L fibronectin、200 μg/L的VEGF培养基, 作为黏附底物; 对照组下室加不含VEGF的无血清培养基; 2组上室均加入含有10⁵个细胞

的悬液, 37℃、50 mL/L CO₂培养箱孵育24 h. 取出上室; 棉签擦去Matrigel胶以及膜上层细胞, 无水酒精固定膜下层细胞, 苏木素染色; 显微镜下随机选取10个高倍视野计数.

1.2.3 RT-PCR分析: 分3组进行细胞培养: 空白对照组、VEGF 10 μg/L组、VEGF 30 μg/L浓度组. 细胞培养至细胞融合达90%以上时, 按TRIzol试剂盒说明提取空白对照组、VEGF 10 μg/L组、30 μg/L组的细胞总RNA, 琼脂糖凝胶电泳初步评价RNA的质量, 分光光度仪测定总RNA纯度. 根据RNA纯度将每组的RNA调至每个反应体系中含1 μg. MMP-9引物上游序列为5'-CAC TGT CCA CCC CTC AGA GC-3', 下游序列为5'-GCC ACT TGT CGG CGA TAA GG-3', 扩增产物为263 bp; 内参GAPDH引物上游序列为5'-CAT CTT CCA GGA GCG AGA-3', 下游序列为5'-TGT TCT CAT ACT TCT CAT-3', 扩增产物为203 bp. 对RT-PCR产物进行琼脂糖电泳, 数字成像系统进行拍照分析.

1.2.4 Western blot检测MMP-9蛋白的表达: 将融合达90%以上的3组细胞用细胞裂解液裂解, 分别提取各自的细胞总蛋白, 在11%聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 将蛋白电转膜至硝酸纤维素膜上, 50 g/L脱脂奶粉封闭后分别与抗MMP-9单克隆抗体杂交, 再与相应的酶标记二抗反应, 阳性条带用化学发光法检测, 放置Kodak活体成像仪直接数码显色.

统计学处理 实验的定量检测结果以mean±SD表示, 2组均数间比较使用 t 检验; 多组均数间比较采用单因素方差分析, 两两组间比较采用 q 检验. 采用SAS11.5软件进行统计分析, $P \leq 0.05$ 表示有统计学意义.

2 结果

2.1 外加VEGF后, 人肝癌细胞株SMMC-7721侵袭力明显增强 通过显微镜下高倍视野计数, 与空白对照组相比, 外加VEGF的人肝癌细胞株SMMC-7721细胞的侵袭力明显增加(侵袭细胞数量: 441.7 ± 29.8256 vs 151.0 ± 29.18904 , $P < 0.01$, 图1).

2.2 MMP-9 mRNA的表达 与空白对照组相比, 外加VEGF组的MMP-9 mRNA表达明显增高, 并且和浓度之间存在量的关系(表1, 图2).

2.3 MMP-9蛋白的表达 本实验检测人肝癌SMMC-7721细胞在加入VEGF不同浓度后MMP-9蛋白水平的表达. 结果显示, 外加VEGF

■ 研发前沿
肿瘤细胞是否存在促进侵袭的自分泌机制还不明了.

■相关报道

Kamel *et al* 在比较肝癌、肝纤维化患者治疗前与健康者血清VEGF水平时发现, 有门静脉侵犯和转移的肝癌患者其血清VEGF和MMP-9水平较无门静脉侵犯和转移的明显升高, 并且发现血清VEGF水平在肿瘤>5 cm和<5 cm的患者之间存在明显差异, 显示了VEGF可以导致肿瘤侵袭和转移能力增加。

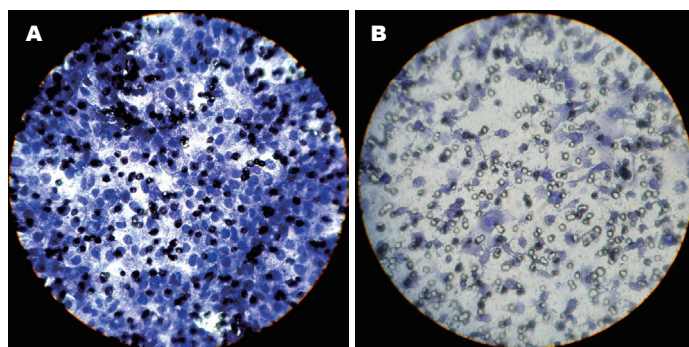


图1 人肝癌细胞株SMMC-7721细胞体外侵袭图. A: VEGF 200 µg/L组; B: 空白对照组.

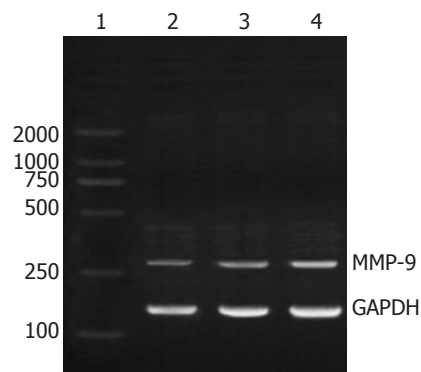


图2 人肝癌SMMC-7721细胞中MMP-9 mRNA的表达. 1: DNA Marker; 2: 空白对照组; 3: VEGF 10 µg/L组; 4: VEGF 30 µg/L组.

后, MMP-9蛋白的表达水平与空白对照组相比明显增高, 并且和浓度之间存在量的关系(表1, 图3).

3 讨论

肿瘤的侵袭、转移级联反应涉及到多个步骤, 包括肿瘤在局部生长到一定大小后, 肿瘤细胞从原发灶脱落, 降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和基底膜, 进入血液循环系统后逃逸宿主的免疫监控而存活下来, 到达远处组织器官后黏附并形成微小转移灶, 继而新生血管形成, 最后继发形成肿瘤. VEGF和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)在此过程中起着非常重要的作用.

MMPs是一族Zn²⁺依赖的蛋白水解酶, 主要负责组织重塑与ECM的降解, 现已至少发现该家族的26个成员^[2], 他们大多于人体或其他哺乳动物中表达. MMPs对肿瘤作用为^[3]: (1)刺激肿瘤进展; (2)诱导血管生成; (3)促进肿瘤侵袭; (4)促进肿瘤细胞从原发位置逃逸; (4)促使肿瘤细胞在继发转移位点定居等.

MMPs在恶性肿瘤发生和进展中的作用主要是降解ECM、促进肿瘤生长、浸润和转移. ECM是宿主细胞赖以生存的微环境, 细胞发生

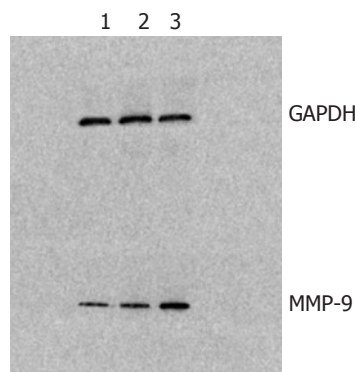


图3 Western blot检测MMP-9蛋白的表达. 1: 空白对照组; 2: VEGF 10 µg/L组; 3: VEGF 30 µg/L组.

表1 人肝癌SMMC-7721细胞中MMP-9蛋白及mRNA的表达

	蛋白	mRNA
空白对照组	0.366 ± 0.025	0.315 ± 0.022
VEGF 10 µg/L组	0.521 ± 0.026 ^b	0.479 ± 0.025 ^b
VEGF 30 µg/L组	0.662 ± 0.026 ^b	0.665 ± 0.024 ^b

^bP<0.01 vs 空白对照组.

恶性转化后, 必须降解细胞外的基质为自己的生长提供空间, 并将其改建为适合自己生长的微环境. MMP-9是MMPs家族中相对分子质量最大的酶, 他可以降解所有ECM. MMP-9是水解ECM的重要蛋白水解酶, 在肿瘤的侵袭、转移过程中发挥重要作用. 主要降解基底膜的主要成分IV型胶原、VII型、X型胶原和明胶.

VEGF是1989年由Ferrara *et al*发现的, 是最重要的血管生成调节因子. VEGF对肿瘤的影响机制可能有^[4]: (1)促进肿瘤血管形成, 这与VEGF能增加血管通透性、促进血管内皮细胞增殖、促进血管支持物生长有关; (2)促进肿瘤淋巴管生长; (3)对肿瘤细胞的细胞动力影响; (4)增强肿瘤细胞对放疗的耐受性及影响免疫功能. VEGF在许多肿瘤组织中均有较高水平的表达, 如在脑肿瘤、卵巢肿瘤、黑色素瘤、肺癌、大肠癌中与肿瘤生长密切相关. Kamel *et al*^[5]在比较肝癌、肝纤维化患者治疗前与健康者血清VEGF

水平时发现,有门静脉侵犯和转移的肝癌患者其血清VEGF和MMP-9水平较无门静脉侵犯和转移的明显升高,并且发现血清VEGF水平在肿瘤>5 cm和<5 cm的患者之间存在明显差异,显示了VEGF可以导致肿瘤侵袭和转移能力增加。

MMPs的表达和活性受酶原合成、活化和抑制剂抑制3个水平调控。在正常生理条件下,MMP-9的表达受到严格的调控目前已明确的上调因素有IL-1、TNF- α 、EGF、VEGF等。Hiratsuka *et al*就报道了可以通过肺内皮细胞的VEGFR-1产生MMP-9从而促进在肿瘤在肺的转移^[6]。

目前大多数研究显示VEGF作用于肿瘤细胞周围的间质细胞,促进MMP-9分泌,为旁分泌机制,肿瘤细胞是否存在促进侵袭的自分泌机制还不明了,因此探讨肿瘤细胞的侵袭的自分泌机制有助于了解肿瘤细胞特性,丰富肿瘤转移的理论基础。

本实验通过对使用VEGF培养的肝癌细胞和正常培养的肝癌细胞侵袭力的比较,得出VEGF可以促进人肝癌SMMC-7721细胞株侵袭力增加,证明了VEGF可以促进肿瘤细胞的侵袭,和以往的研究一致。MMP-9是肿瘤侵袭转移中最重要的酶分子之一,因此我们假设VEGF促进肿瘤细胞侵袭力增加可能为上调了MMP-9的表达所致,在随后的实验中通过检测各组人肝癌SMMC-7721细胞中MMP-9的表达,证实了该假设,因此可以说VEGF上调肿瘤细胞的MMP-9表达是增加肿瘤细胞的侵袭力的作用机制之一。

通过本实验,证实了肿瘤细胞亦可在外在的细胞因子作用下自分泌降解基质的酶分子,从而促进肿瘤细胞的侵袭,促进肿瘤细胞的恶性化。

总之,VEGF在促进肿瘤转移中,除了旁分泌机制调节新生血管形成外,还经自分泌机制直接作用于肿瘤细胞,其中包括上调肿瘤细胞的MMP-9的表达来增加肿瘤细胞的侵袭性。目前,运用分子生物学的手段在基因或蛋白水平上对一些癌基因或促肿瘤生长的因素进行干预已成为新的治疗肿瘤的方向。本研究为肝癌的基因治疗提供了一定的实验依据。

4 参考文献

- 1 Benzoni E, Lorenzin D, Favero A, Adani G, Baccarani U, Molaro R, Zompicchiatti A, Saccomano E, Avellini C, Bresadola F, Uzzau A. Liver resection for hepatocellular carcinoma: a multivariate analysis of factors associated with improved prognosis. The role of clinical, pathological and surgical related factors. *Tumori* 2007; 93: 264-268
- 2 Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem* 2007; 15: 2223-2268
- 3 Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25: 9-34
- 4 陈孝,王孟薇,吴本俨. 血管内皮生长因子对肿瘤的影响及临床应用. *四川医学* 2005; 26: 1032-1034
- 5 Kamel L, Nessim I, Abd-el-Hady A, Ghali A, Ismail A. Assessment of the clinical significance of serum vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 in patients with hepatocellular carcinoma. *J Egypt Soc Parasitol* 2005; 35: 875-890
- 6 Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, Shibuya M. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2002; 2: 289-300

编辑 李军亮 电编 何基才

■同行评价

本实验设计合理,选择方法得当,学术价值较好。

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志投稿方式

本刊讯 本刊只接受在线投稿,不接受其他方式的投稿,如E-mail,印刷版。在线投稿网址: <http://wcjd.wjgnet.com>/在线提交未成功,请通过submission@wjgnet.com,电话:010-8538 1892,传真:010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>>审稿过程平均时间需要14 d。来稿均经2-3位同行专家严格评审,2位或以上通过为录用,否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费,文章发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬)。(科学编辑:李军亮 2009-11-18)