

[文章编号] 1000-1182(2006)02-0101-03

• 基础研究 •

口腔癌相关成纤维细胞对 舌癌细胞株侵袭特性的影响

林靖雯¹, 周红梅², 李胜富³, 胡涛¹, 陈谦明²

(1. 口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学; 2. 四川大学华西口腔医院 黏膜科;
3. 四川大学华西医院 卫生部移植工程和移植免疫重点实验室, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 采用重建基底膜细胞侵袭实验, 研究直接分离自舌癌组织旁的癌相关成纤维细胞(CAFs)对舌癌细胞株侵袭特性的影响, 探讨CAF在口腔鳞癌发展中的作用。方法 以Matrigel模拟重建基底膜, 采用Transwell小室建立口腔CAF与舌癌细胞株Tca8113的交互作用模型, 观测CAF对Tca8113侵袭特性的影响。结果 与正常成纤维细胞(NFs)相比, CAFs能促使更多的Tca8113细胞穿透Matrigel ($P<0.05$)。结论 口腔CAFs能促进舌癌细胞株Tca8113的侵袭, 在口腔鳞癌发展中起重要作用。

[关键词] 癌相关成纤维细胞; 口腔; 癌细胞株; 侵袭

[中图分类号] R780.2 **[文献标识码]** A

The Effect of Oral Carcinoma-associated Fibroblasts on the Invasion of Carcinoma Cell Line LIN Jing-wen¹, ZHOU Hong-mei², LI Sheng-fu³, HU Tao¹, CHEN Qian-ming². (1. Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Oral Medicine, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Laboratory of Transplantation Engineering and Transplantation Immunity, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of oral carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) on the invasion of a lingual carcinoma cell line, and to elucidate the role of CAFs in oral squamous cell carcinoma (OSCC) progression. **Methods** Matrigel was used to remodel the basement membrane, and the interaction model between primary oral CAFs and lingual carcinoma cell line Tca8113 was established by Transwell chamber to observe the effect of CAFs on the invasion of Tca8113. **Results** Compared with normal fibroblasts (NFs), CAFs promoted more Tca8113 cells to penetrate Matrigel ($P<0.05$). **Conclusion** Oral CAFs can promote the invasion of lingual carcinoma cell line Tca8113, and play a key role in OSCC progression.

[Key words] carcinoma-associated fibroblasts; oral; carcinoma cell line; invasion

近年来, 研究发现肿瘤间质在癌症的发生发展中起重要作用。癌相关成纤维细胞 (carcinoma-associated fibroblasts, CAFs) 或称肌成纤维细胞是肿瘤间质中最重要的细胞成分。对前列腺癌、乳腺癌和结直肠癌等肿瘤的研究发现, CAFs对癌细胞的增殖、侵袭均有影响^[1]。但有关CAF在口腔鳞状细胞癌中的作用的研究才刚起步。本课题组在前期研究中成功分离培养口腔CAF, 并初步观察了它对癌细胞增殖活性的影响。本研究采用重建基底膜细胞侵袭实验来进一步观察口腔CAF对癌细胞侵袭特性

的影响, 以便更全面地了解CAF在口腔鳞癌中的作用, 并为利用CAF调控肿瘤发生发展奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

DMEM培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、0.25%胰蛋白酶 (Gibco公司, 美国), 鼠抗人细胞角蛋白 (cytokeratin, CK) 多抗、鼠抗人波形蛋白 (vimentin, Vim) 单抗、鼠抗人 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 单抗 (Dako公司, 美国), Matrigel (Sigma公司, 美国), Transwell小室 (Costar公司, 美国)。

1.2 实验细胞株

口腔CAF和口腔黏膜正常成纤维细胞 (normal

[收稿日期] 2005-10-08; [修回日期] 2006-02-16

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30572035); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (20030610051)

[作者简介] 林靖雯 (1978-), 女, 云南人, 博士研究生

[通讯作者] 陈谦明, Tel: 028-85503480

fibroblasts, NFs)的分离及免疫组化鉴定参照前期研究^[4]。采用第3代细胞进行研究。舌癌细胞株Tca8113购自中国科学院细胞研究所。

1.3 CAFs对舌癌细胞株Tca8113侵袭能力的影响

采用孔径8 μm , 直径24 mm的Transwell小室构建细胞交互作用模型, 上室底部滤膜预先铺盖Matrigel以模拟基底膜和细胞外基质。具体步骤为Matrigel 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜解冻, 经预冷的DMEM培养基1:1稀释后, 迅速加入上室, 每孔200 μL 。此过程在冰上完成, 所用器具均需预冷, 以免Matrigel过快凝固。将铺盖了Matrigel的小室放于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱保温30 min, 使其充分凝胶, 再用温热的DMEM培养基清洗凝胶。将处于对数生长期的舌癌细胞株Tca8113以浓度为每毫升 1.5×10^5 个等量接种于凝胶上。下室分3组, 分别加入等体积(浓度为每毫升 5×10^4 个)的CAF、NFs以及含10%FBS的DMEM培养基, 每组2孔。24 h后装配上下室, 改用无血清培养基继续培养24 h。用湿棉签拭去滤膜上表面的凝胶与细胞。粘附于滤膜下表面的细胞用4%多聚甲醛固定20 min, Giemsa染液1:9稀释后染色15 min, 漂洗, 风干后显微镜下观察。每张滤膜随机选取5个200倍视野计算到达滤膜下表面的细胞数, 计算总数。

1.4 统计学分析

采用SPSS10.0软件包对所得数据进行统计分析, 选用成组设计的单因素方差分析与 q' 检验。

2 结果

装配上下室用无血清培养基继续培养24 h后, DMEM组中Tca8113侵袭能力不强, 仅有少量细胞穿透Matrigel, 到达滤膜下方的细胞数为 (5.00 ± 2.83) 个, 到达滤膜下表面经固定染色后, 在显微镜下可见其蓝紫色细胞核(图1)。

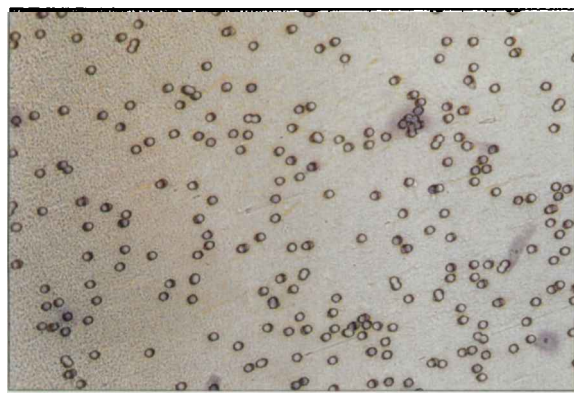


图1 DMEM培养基中Tca8113侵袭能力不强, 仅有少量细胞穿透Matrigel Giemsa $\times 200$

Fig 1 Invasion ability of Tca8113 in serum-free media was low. Only a few cells penetrated Matrigel Giemsa $\times 200$

NFs作用下Tca8113侵袭能力有所增强, 有一定数量的细胞穿透Matrigel, 到达滤膜下方的细胞数为 (10.00 ± 0.00) 个(图2)。

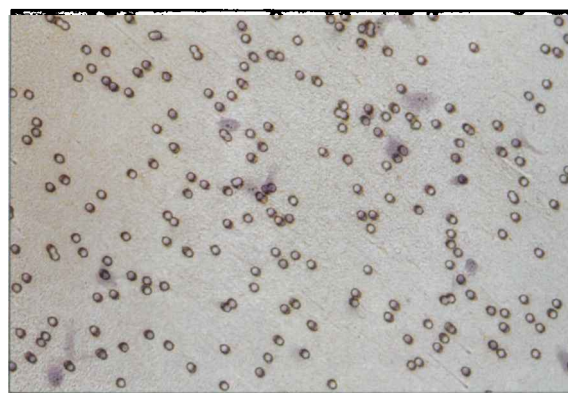


图2 NFs作用下Tca8113侵袭能力有所增强, 有一定数量的细胞穿透Matrigel Giemsa $\times 200$

Fig 2 Invasion ability of Tca8113 influenced by NFs was increased. Quite a few cells penetrated Matrigel Giemsa $\times 200$

CAFs作用下Tca8113侵袭能力明显增强, 大量细胞穿透Matrigel, 到达滤膜下方的细胞数为 (27.50 ± 0.71) 个(图3)。CAFs组细胞侵袭能力与其他两组相比差别均有统计学意义($P < 0.05$)。

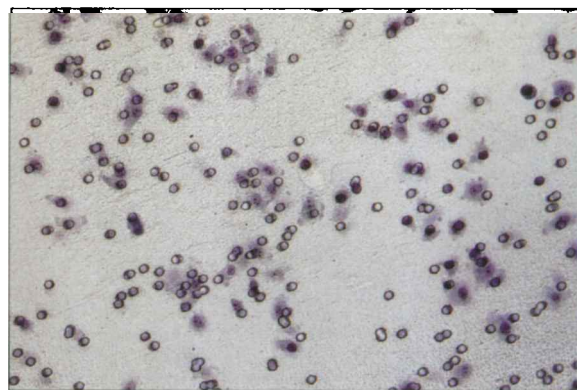


图3 CAFs作用下Tca8113侵袭能力明显增强, 大量细胞穿透Matrigel Giemsa $\times 200$

Fig 3 Invasion ability of Tca8113 influenced by CAFs was increased markedly. Many cells penetrated Matrigel Giemsa $\times 200$

3 讨论

侵袭是肿瘤的一大生物学特性, 它不仅与肿瘤细胞自身特性有关, 也受到邻近肿瘤宿主成分的影响。CAFs是癌周宿主间质中最主要的细胞成分, 它具有不同于NFs的形态学和生物学特性, 不仅能促进癌细胞增殖, 也对其侵袭能力有重要影响。早前学者们已发现, 大鼠结肠癌细胞PROb在体外单独培养侵袭力较弱, 但当它与CAFs共同培养时, 侵袭力明显提高; 若将PROb皮下注射至同源大鼠也可形成具有侵袭性的癌肿, 而在癌肿周围可见大量CAFs^[5]。最近一项对83例侵袭性结直肠癌的免疫组

化研究也显示, CAFs的数量与肿瘤细胞对淋巴管的侵袭及淋巴结转移呈正相关^[4]。尽管多项研究已证实, CAFs对多种肿瘤细胞侵袭性有影响, 但关于CAFs对口腔鳞癌细胞侵袭性的影响却报道较少, 仅Lewis等^[5]采用TGF- β 1成功诱导了口腔NFs向肌成纤维细胞转化, 并证实得到的肌成纤维细胞可促进口腔鳞癌细胞侵袭。但由癌周直接分离所得的CAFs对口腔鳞癌细胞的侵袭性有何影响尚未见报道。本课题组已于前期成功分离鉴定了口腔CAFs^[2], 在此基础上本研究通过建立CAFs与口腔鳞癌细胞株Tca8113相互作用模型, 采用Matrigel模拟基底膜, 并以相同实验条件下的NFs为对照, 进一步观察CAFs对肿瘤细胞侵袭特性的影响。

Matrigel是一种来源于EHS鼠肉瘤的可溶性基底膜制剂, 主要含有层粘连蛋白、IV型胶原和硫酸肝素等成分, 若温度超过22℃时迅速变为凝胶, 形成类似于基底膜和细胞外基质的结构。肿瘤细胞可降解Matrigel, 再通过Transwell小室滤膜上的微孔(孔径大于细胞直径)到达并粘附于滤膜下方, 通过染色计数, 便可间接了解肿瘤细胞的侵袭能力。本研究中, CAFs或NFs被加入下室以观察它们对Tca8113侵袭能力的影响, 另设有下室中仅含DMEM培养基的空白对照组。这种模型能够观察两种细胞通过可溶性信号分子产生的相互作用, 避免了建立细胞直接混合培养模型时标记、分离细胞的繁琐步骤, 不足之处在于不能观察细胞直接接触引发的相互作用。

研究结果显示CAFs作用组穿过滤膜的Tca8113细胞数明显增多, 是空白对照组的5倍, 是NFs作用组的2.5倍。检测是在两种细胞相互作用24 h时进行的, 这时CAFs对Tca8113增殖的影响尚不明显, 所以可忽略细胞增殖对结果判读的干扰。因此, 可认为CAFs有促进Tca8113侵袭的作用。

有关CAFs对癌细胞侵袭特性产生影响的机制尚不明确。Lewis等^[5]发现HGF可能在其中扮演重要角色。Qian等^[6]对胰腺癌的研究也证实, CAFs可表达大量HGF, 后者作用于癌细胞表面的c-Met, 使其侵袭能力增强。除细胞因子外, CAFs还通过表达多种蛋白酶促进肿瘤细胞侵袭。乳腺癌CAFs可大量表达uPA, 特异性地表达MMP-11, 同时MMP-2、MMP-9的表达也上调^[7-9]。近来, 学者们发现一种特异位于CAFs表面的丝氨酸蛋白酶——成纤维细胞活化蛋白(fibroblast activation protein, FAP), 它具有二肽

酶和胶原酶活性, 在促进肿瘤生长侵袭中起着十分重要的作用^[10]。

本研究采用重建基底膜细胞侵袭实验, 首次证实了直接分离自舌癌组织旁的CAFs具有促进舌癌细胞株侵袭能力的作用, 但本研究所构建的细胞交互作用模型与体内真实状态仍存在一定差距, 故还需构建细胞共同培养的三维模型及动物模型以验证实验结果。

[参考文献]

- [1] Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression[J]. Nature, 2004, 432(7015): 332-337.
- [2] 周红梅, 刘英, 胡涛, 等. 口腔癌相关成纤维细胞的分离培养及初步鉴定[J]. 中华口腔医学杂志, 2004, 39(2): 122-125. (ZHOU Hong-mei, LIU Ying, HU Tao, et al. Human oral carcinoma-associated fibroblasts: Its cultivation, purification and identification[J]. Chin J Stomatol, 2004, 39(2): 122-125.)
- [3] Dimanche-Boitrel MT, Vakaet L Jr, Pujuguet P, et al. *In vivo* and *in vitro* invasiveness of a rat colon-cancer cell line maintaining E-cadherin expression: An enhancing role of tumor-associated myofibroblasts[J]. Int J Cancer, 1994, 56(4): 512-521.
- [4] Liang P, Hong JW, Ubukata H, et al. Myofibroblasts correlate with lymphatic microvessel density and lymph node metastasis in early-stage invasive colorectal carcinoma[J]. Anticancer Res, 2005, 25(4): 2705-2712.
- [5] Lewis MP, Lygoe KA, Nystrom ML, et al. Tumour-derived TGF- β 1 modulates myofibroblast differentiation and promotes HGF/SF-dependent invasion of squamous carcinoma cells[J]. Br J Cancer, 2004, 90(4): 822-832.
- [6] Qian LW, Mizumoto K, Maehara N, et al. Co-cultivation of pancreatic cancer cells with orthotopic tumor-derived fibroblasts: Fibroblasts stimulate tumor cell invasion via HGF secretion whereas cancer cells exert a minor regulative effect on fibroblasts HGF production[J]. Cancer Lett, 2003, 190(1): 105-112.
- [7] Dublin E, Hanby A, Patel NK, et al. Immunohistochemical expression of uPA, uPAR, and PAI-1 in breast carcinoma. Fibroblastic expression has strong associations with tumor pathology[J]. Am J Pathol, 2000, 157(4): 1219-1227.
- [8] Bisson C, Blacher S, Polette M, et al. Restricted expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase by myofibroblasts adjacent to human breast cancer cells[J]. Int J Cancer, 2003, 105(1): 7-13.
- [9] Cheng JD, Dunbrack RL Jr, Valianou M, et al. Promotion of tumor growth by murine fibroblast activation protein, a serine protease, in an animal model[J]. Cancer Res, 2002, 62(16): 4767-4772.

(本文编辑 王 晴)