

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.32.008

缺氧-复氧促进结肠癌 LOVO 细胞转移及其机制的研究*

周程继^{1,2},王 攀^{1,2△},喻 晶^{1,2},魏寿江¹,王崇树¹

(1. 川北医学院附属医院胃肠外科,四川南充 637000;2. 医学影像四川省重点实验室,四川南充 637000)

[摘要] 目的 探讨缺氧-复氧(H-R)微环境对结肠癌 LOVO 细胞转移的影响及其机制的研究。方法 H-R 培养处理人结肠癌 LOVO 细胞,荧光探针二氯荧光黄双乙酸盐(DCF-DA)检测细胞内活性氧(ROS)水平,伤口愈合实验及 Transwell 细胞侵袭实验分别检测肿瘤细胞的迁移及侵袭能力,Western blot 检测基质金属蛋白酶(MMP)-2 及 MMP-9 蛋白表达水平。结果 与常氧培养组(N)比较,H-R 处理后 LOVO 细胞内的 ROS 明显提高($P<0.05$),细胞的迁移及侵袭能力均明显增强($P<0.05$),MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平明显提高($P<0.05$),但上述效应可被 ROS 的抑制剂明显减低($P<0.05$)。结论 H-R 可通过提高细胞内 ROS 水平促进结肠癌细胞的迁移及侵袭能力,ROS/MMPs 信号通路可在 H-R 微环境中对结肠癌的转移发挥重要作用。

[关键词] 缺氧-复氧;结肠肿瘤;肿瘤转移
[中图法分类号] R735.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)32-4115-04

Study on hypoxia-reoxygenation promoting metastasis of colon cancer LOVO cells and its mechanism*

ZHOU Chengji^{1,2},WANG Pan^{1,2△},YU Jing^{1,2},WEI Shoujiang¹,WANG Chongshu¹

(1. Department of Gastrointestinal Surgery,the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College,Nanchong,Sichuan 637000,China;2. Sichuan Key Laboratory of Medical Imaging , Nanchong,Sichuan 637000,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of hypoxia-reoxygenation (H-R) microenvironment on the metastasis of colon cancer LOVO cells and its mechanism. **Methods** Human colon cancer LOVO cells were cultured by H-R. Intracellular active oxygen (ROS) level was detected by fluorescent probe DCF-DA; the migration and invasion of tumor cells were detected by wound healing test and Transwell cell invasion test;the protein expressions of MMP-2 and MMP-9 were examined by Western blot. **Results** Compared with the normoxia group (N),the level of ROS in the group after H-R treatment significantly increased ($P<0.05$),the abilities of migration and invasion significantly increased ($P<0.05$),the levels of MMP-2 and MMP-9 protein significantly increased ($P<0.05$),while these effects could be decreased by the inhibitors of ROS ($P<0.05$). **Conclusion** H-R microenvironment can elevate the migration and invasion of colon cancer cells by promoting the intracellular ROS expression. The ROS/MMPs signaling pathway plays an important role in the metastasis of colon cancer under H-R microenvironment.

[Key words] hypoxia-reoxygenation;colonic neoplasms;neoplasm metastasis

大肠癌是世界上最常见的恶性消化道肿瘤之一,是导致癌症患者死亡的第四大原因,肿瘤转移是导致患者死亡的重要原因^[1-2]。已有研究表明,肿瘤缺氧微环境可促进肿瘤的进展及转移。而目前对于缺氧-复氧(H-R)肿瘤微环境在肿瘤转移方面的研究较少。有研究发现,癌细胞由于不规则的微血管网和血流模式,肿瘤细胞亦处于 H-R 肿瘤微环境中^[3-4]。作者旨在探讨 H-R 条件下能否促进结肠癌的转移,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

(1)细胞培养和细胞株:人结肠癌 LOVO

株由陆军军医大学西南医院普外科实验室冻存保留,复苏后培养于含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司),于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。(2)主要试剂和抗体:二亚苯基碘鎓(DPI)为美国 Sigma 公司产品,一抗鼠抗人基质金属蛋白酶(MMP)-2 单克隆抗体和鼠抗人 MMP-9 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,N-乙酰半胱氨酸(NAC)、Western 及 IP 细胞裂解液、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒及预染蛋白质分子量标准购自中国碧云天生物技术研究,Transwell 小室

* 基金项目:中央财政支持地方高校课题(SCKBMI-13-004);四川省卫生厅课题(130334)。 作者简介:周程继(1992-),住院医师,硕士研究生,主要从事消化道肿瘤的基础与临床研究。 △ 通信作者,E-mail:ncwangpan@163.com。

为美国 Corning 公司产品, BD Matrigel 为美国 BD-Bio 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 H-R 养条件的建立 常氧培养组(N 组): 细胞培养在 95% 空气、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 24 h 作为对照。H-R 培养条件参照文献[5]进行: LOVO 细胞在 37 °C, 5% CO₂ 和 95% N₂ 的混合气体的三气培养箱中培养 4 h; 再将细胞放入 95% 空气、5% CO₂ 的培养箱中复氧培养 20 h, 即完成 H-R 培养(H-R 组)。

1.2.2 活性氧(ROS)的检测 LOVO 细胞胰酶消化后, 均匀接种培养于 96 孔板(25×10³ 细胞/孔), 每组设 3 个重复孔。细胞 H-R 前分别给予嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶抑制剂 DPI 15 μmol/L (H-R+DPI 组)和抗氧化剂 NAC 30 mmol/L (H-R+NAC 组)预处理 1 h。ROS 的检测采用荧光探针二氯荧光黄双乙酸盐(DCF-DA): H-R 培养后用不含 FBS 的 DMEM 培养基稀释 DCF-DA 至终浓度 10 μmol/L, 与细胞 37 °C 共同孵育 20 min 后, 用无 FBS 的 DMEM 培养液洗涤细胞 3 次, 自动荧光酶标仪(激发波长 488 nm; 发射波长 525 nm)检测细胞内 ROS 水平。所有测量均在 37 °C 进行。

1.2.3 伤口愈合实验 LOVO 细胞 6 孔板内培养至 80%~90% 近单层融合状态, 用灭菌的 200 μL 枪头分别作 3 条划痕(间距约 1 cm), 悬浮细胞用 PBS 洗净。H-R 组伤口愈合实验: DPI 15 μmol/L、NAC 30 mmol/L 分别预处理细胞 1 h, 再行 H-R 培养。N 组作对照。划痕处分别在 0、24 h 拍照, ImageProPlus 软件计算划痕愈合面积。

1.2.4 细胞侵袭实验 Boyden 小室(每组 3 小室)检测细胞侵袭数目: 冷的过滤蒸馏水稀释基质胶后, 均匀加入到 8 μm 孔径小室上室。对数期生长的 LOVO 细胞胰酶消化后计数, 无血清培养基调节密度至 3×10⁵ 个/mL, 取 300 μL 细胞悬液加入 Boyden 小室上部。下室用 10% FBS 作为趋化物。各实验组细胞分别给予 DPI 15 μmol/L 和 NAC 30 mmol/L 预处理 1 h, H-R 培养后多聚甲醛固定侵袭细胞 30 min 后, 结晶紫染色。N 组常规进行。光学显微镜下(×400)随机选择 3 个区域细胞计数, 取平均值, 并计算相对于

N 组的百分比(%)。

1.2.5 Western blot 分析 用 EP 管收集细胞悬液后, 13 000 r/min 离心 20 s 弃上清液, 加入 600 μL 蛋白裂解液冰上裂解 30 min, 2 500 r/min 离心 5 min, 上清液移入新的 EP 管中, BCA 法测定蛋白浓度, 40 μg 总蛋白于 10% SDS-PAGE 分离蛋白, 电转移至硝酸纤维素膜, 用含 3% BSA 封闭液室温下摇动封闭 1 h, 4 °C 适当稀释浓度的一抗 MMP-2、MMP-9 及 GAPDH 孵育过夜, 目的蛋白分子量大小采用预染蛋白质分子量标准判断, 化学发光法(ECL)显影免疫反应带进行检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

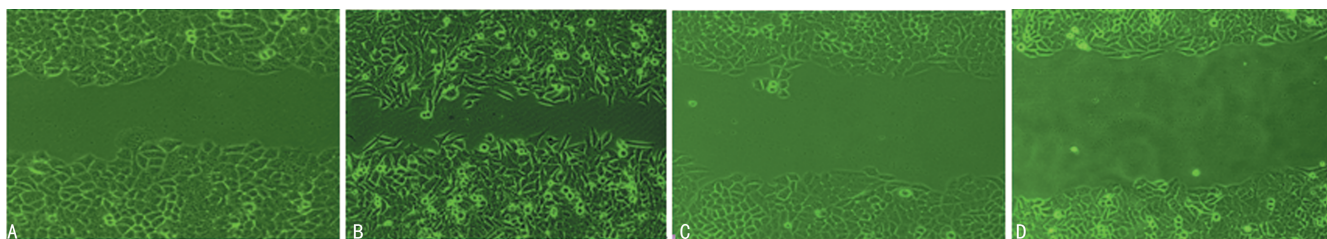
2 结 果

2.1 各组 LOVO 细胞 ROS 水平比较 相对于 N 组(99.90 ± 9.79)%, H-R 组细胞内 ROS 水平[(270.51 ± 20.32)%]明显升高(*P* < 0.01); H-R + DPI、H-R + NAC 组细胞内 ROS 水平分别为(67.17 ± 7.46)%、(56.53 ± 3.78)%, 与 H-R 组比较均明显降低(*P* < 0.05)。

2.2 各组细胞划痕愈合面积比较 N 组、H-R 组细胞划痕愈合面积分别为(68.73 ± 2.56)%、(83.30 ± 2.67)%, H-R 组 LOVO 细胞的迁移能力明显强于 N 组(*P* < 0.05); H-R + DPI、H-R + NAC 组细胞划痕愈合面积分别为(47.37 ± 4.13)%、(30.91 ± 1.15)%, 与 H-R 组比较均明显降低(*P* < 0.05), 见图 1。

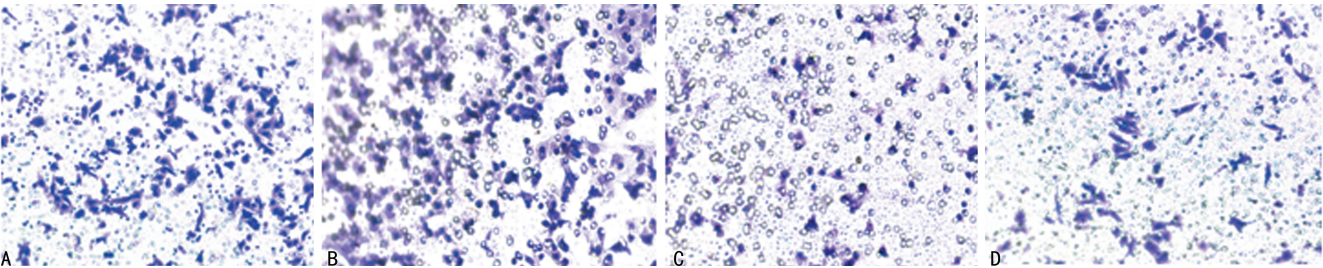
2.3 各组细胞体外相对细胞侵袭数比较 相对于 N 组(99.67 ± 4.04)%, H-R 组细胞侵袭能力[(168.33 ± 8.08)%]明显增强(*P* < 0.05); H-R + DPI、H-R + NAC 组相对细胞侵袭数分别为(48.12 ± 2.65)%、(37.33 ± 4.16)%, 与 H-R 组比较差异均有统计学意义(*P* < 0.05), 见图 2。

2.4 各组 LOVO 细胞的 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平比较 与 N 组比较, H-R 组 LOVO 细胞的 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平明显升高(*P* < 0.05); 与 H-R 组比较, H-R + DPI、H-R + NAC 组 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达明显下调(*P* < 0.05), 见图 3。



A: N 组; B: H-R 组; C: H-R + DPI 组; D: H-R + NAC 组

图 1 各组 LOVO 细胞划痕愈合面积(×100)



A: N 组; B: H-R 组; C: H-R + DPI 组; D: H-R + NAC 组

图 2 各组结肠癌 LOVO 细胞侵袭能力(×400)

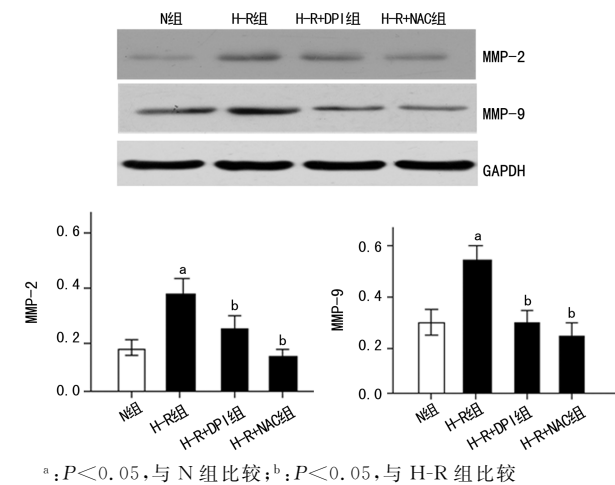


图 3 各组 LOVO 细胞的 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达

3 讨 论

有研究表明,局部缺氧是实体肿瘤微环境的一种重要的共同特征,肿瘤细胞暴露于缺氧条件下的可导致肿瘤恶性表型的转化,从而促进肿瘤的转移^[6]。LEE 等^[7]研究发现,实体肿瘤微血管网和血流模式与正常组织间存在较大的差异,这导致肿瘤细胞亦处于 H-R 的微环境中。

在生理情况下,正常细胞在 H-R 的微环境中可产生大量的 ROS,但产生的 ROS 可不断被机体的抗氧化系统清除,不致对机体产生严重的组织损伤,从而维持体内氧化还原状态的平衡,其依赖于细胞稳定的氧化还原系统^[8]。但肿瘤细胞由于氧化还原系统的缺陷,对 ROS 的清除能力明显降低,从而导致细胞内 ROS 的持续升高^[9]。而 ROS 可作为第二信使参与肿瘤的发生、发展,包括肿瘤细胞的增殖、分化、迁移和侵袭等多种生物学过程^[10]。本研究结果发现,H-R 条件下 LOVO 细胞中的 ROS 水平明显升高($P < 0.05$),在 H-R 的条件下给予 LOVO 细胞 DPI 或 NAC 处理后 ROS 的产生明显减少($P < 0.05$)。以上研究表明,结肠癌细胞在 H-R 微环境中 ROS 的表达明显增高,本课题前期研究也得出了类似的结论^[5]。同时还发现肿瘤细胞在转移过程中,必须进行细胞形态和体积的变化,以使其通过狭窄外间隙而发生转移^[11]。ROS 的上调可能导致细胞形态的改变和增强细胞的运动能力^[12]。此外,ROS 所介导的信号通路,如 ROS/ERK 信号通路在肿瘤细胞迁移中起着

重要作用^[13]。因此,本课题通过划痕实验研究 H-R 条件下抑制 ROS 的产生对结肠癌细胞迁移的影响。伤口愈合和侵袭实验进一步观察结果显示,H-R 处理后结肠癌细胞的转移潜能明显增强,但是这种作用可被 DPI 或 NAC 消除,与 H-R 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。以上结果表明结肠癌细胞在 H-R 微环境中可促进肿瘤的迁移能力,这种促进作用可能是通过提高细胞内 ROS 的产生而实现。

MMPs 几乎能降解细胞外基质(ECM)中的各种蛋白成分,破坏肿瘤细胞侵袭的组织学屏障,在癌细胞的侵袭和转移中发挥着重要的作用,从而在肿瘤浸润转移中的作用日益受到重视,被认为是该过程中主要的蛋白水解酶^[14]。MMP-2 和 MMP-9 是 MMPs 家族的非常重要的两个成员,二者是导致大肠癌患者肿瘤转移中的重要因素^[15]。本研究发现,在 H-R 条件下 LOVO 细胞 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达明显上调,结肠癌细胞的侵袭能力明显增强,从而表明 MMP-2 和 MMP-9 蛋白可能参与了结肠癌细胞在 H-R 微环境中的侵袭、转移过程。进一步实验发现,采用 ROS 的抑制剂 DPI 和 NAC 分别处理 H-R 组细胞后,结肠癌 LOVO 细胞的 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平均明显降低($P < 0.05$)。因此,本研究认为,MMP-2 和 MMP-9 可作为 ROS 的下游信号分子参与结肠癌细胞的侵袭、转移过程,可通过抑制 ROS 的产生来阻止结肠癌的转移过程。

综上所述,H-R 肿瘤微环境在结肠癌的转移中发挥着重要的作用,其作用可能是通过提高细胞内 ROS 的产生而实现,ROS/MMPs 信号通路在 H-R 微环境中可能对结肠癌的转移发挥着重要的促进作用,而其深入的机制还有待进一步的研究。

参考文献

[1] FAVORITI P,CARBONE G,GRECO M,et al. World-wide burden of colorectal cancer: a review [J]. Updates Surg,2016,68(1):7-11.

[2] INOUE Y,IMAI Y,OSUMI W,et al. What is the optimal timing for liver surgery of resectable synchronous liver metastases from colorectal cancer? [J]. Am Surg,2017,83(1):45-53.

[3] BENSaad K,FAVARO E,LEWIS CA,et al. Fatty acid

- uptake and lipid storage induced by HIF-1 α contribute to cell growth and survival after hypoxia-reoxygenation[J]. *Cell Rep*, 2014, 9(1): 349-365.
- [4] LEE J W, RYU Y K, JI Y H, et al. Hypoxia/reoxygenation-experienced cancer cell migration and metastasis are regulated by Rap1-and Rac1-GTPase activation via the expression of thymosin beta-4 [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(12): 9820-9833.
 - [5] WANG P, ZENG Y, LIU T, et al. Chloride intracellular channel 1 regulates colon cancer cell migration and invasion through ROS/ERK pathway[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(8): 2071-2078.
 - [6] FORSTER J C, HARRISS-PHILLIPS W M, DOUGLASS M J, et al. A review of the development of tumor vasculature and its effects on the tumor microenvironment[J]. *Hypoxia(Auckl)*, 2017(5): 21-32.
 - [7] LEE S L, RYU H, SON A R, et al. TGF- β and Hypoxia/reoxygenation promote radioresistance of A549 lung cancer cells through activation of Nrf2 and EGFR[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016(6): 6823471.
 - [8] LI L, ZHOU Y, LI Y, et al. Aqueous extract of cortex dictamnii protects H9c2 cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress and apoptosis by PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017(89): 233-244.
 - [9] CHOWDHURY S R, RAY U, CHATTERJEE B P, et al. Targeted apoptosis in ovarian cancer cells through mitochondrial dysfunction in response to Sambucus nigra agglutinin[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(5): e2762.
 - [10] GÁO X, SCHÖTTKER B. Reduction-oxidation pathways involved in cancer development; a systematic review of literature reviews [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(31): 51888-51906.
 - [11] WANG P, ZHANG C, YU P, et al. Regulation of colon cancer cell migration and invasion by CLIC1-mediated RVD[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 365(1/2): 313-321.
 - [12] SUBASH-BABU P, ALSHAMMARI G M, IGNACIMUTHU S, et al. Epoxy clerodane diterpene inhibits MCF-7 human breast cancer cell growth by regulating the expression of the functional apoptotic genes Cdkn2A, Rb1, mdm2 and p53[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017(87): 388-396.
 - [13] CAO L, LIU J, ZHANG L, et al. Curcumin inhibits H₂O₂-induced invasion and migration of human pancreatic cancer via suppression of the ERK/NF- κ B pathway [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(4): 2245-2251.
 - [14] XU Q, CAO X, PAN J, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) remodels the extracellular matrix through enhancing matrix metalloproteinases (MMPs) and inhibiting tissue inhibitors of MMPs expression in HPV-positive cervical cancer cells [J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2015, 36(5): 539-545.
 - [15] MA Y S, HSIAO Y P, LIN J H, et al. Crude extract of *Rheum palmatum* L inhibits migration and invasion of LS1034 human colon cancer cells acts through the inhibition of matrix metalloproteinase-2/-9 by MAPK signaling [J]. *Environ Toxicol*, 2015, 30(7): 852-863.
- (收稿日期: 2018-02-26 修回日期: 2018-06-26)
-
- (上接第 4114 页)
- 16q13[J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1998, 81(1): 10-11.
 - [7] FAURE S, MEYER L, COSTAGLIOLA D, et al. Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1[J]. *Science*, 2000, 287(5461): 2274-2277.
 - [8] KERFOOT S M, LORD S E, BELL R B. Human fractalkine mediates leukocyte adhesion but not capture under physiological shear conditions; a mechanism for selective monocyte recruitment[J]. *Eur J Immunol*, 2003, 33(3): 729-739.
 - [9] LANGER F, SCHRAMM R, BAUER M, et al. Cytokine response to pulmonary thromboendarterectomy[J]. *Chest*, 2004, 126(1): 135-141.
 - [10] GREEN S R, HAN K H, CHEN Y, et al. The CC chemokine MCP-1 stimulates surface expression of CX3CR1 and enhances the adhesion of monocytes to fractalkine/CX3CL1 via p38 MAPK[J]. *J Immunol*, 2006, 176(12): 7412-7420.
 - [11] ZHANG Y, ZHENG J, ZHOU Z, et al. Fractalkine promotes chemotaxis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells towards ischemic brain lesions through Jak2 signaling and cytoskeletal reorganization [J]. *FEBS J*, 2015, 282(5): 891-903.
 - [12] MCDERMOTT D H, HALCOX J P, SCHENKE W H, et al. Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2001, 89(5): 401-407.
 - [13] GU X, XU J, YANG X P, et al. Fractalkine neutralization improves cardiac function after myocardial infarction[J]. *Exp Physiol*, 2015, 100(7): 805-817.
 - [14] RUCHAYA P J, ANTUNES V R, PATON J, et al. The cardiovascular actions of fractalkine/CX3CL1 in the hypothalamic paraventricular nucleus are attenuated in rats with heart failure[J]. *Exp Physiol*, 2014, 99(1): 111-122.
 - [15] XUAN W, LIAO Y, CHEN B, et al. Detrimental effect of fractalkine on myocardial ischaemia and heart failure[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 92(3): 385-393.
- (收稿日期: 2018-04-01 修回日期: 2018-06-26)