

· 论 著 ·

CXCR4 阳性 Lewis 肺癌细胞具有促发新生血管形成的特征*

攀伟奇¹, 陈芳琳¹, 敖绪军², 陈正堂^{1△}

(1. 第三军医大学新桥医院全军肿瘤研究所, 重庆 400037; 2. 解放军第五三二医院普通外科, 安徽黄山 245041)

摘要:目的 研究 CXCR4 阳性 Lewis 肺癌细胞(LLC)在新生血管形成时的始动作用。方法 激光共聚焦检测 LLC 细胞系中 CXCR4 抗原表达情况, 观察小鼠移植瘤组织内 CXCR4 阳性 LLC 与新生血管的毗邻关系; 以 CXCR4 作为磁珠分选细胞的表面标志, 检测 CXCR4 阳性和阴性 LLC 中 VEGF、MMP9 mRNA 表达情况, 同时免疫组化检测两亚群细胞移植瘤中 VEGF、MMP9 以及 CD31 表达情况。结果 CXCR4 阳性 LLC 多毗邻内皮细胞, 周围形成血管样结构; CXCR4 阳性 LLC 的 VEGF mRNA 表达(0.4398 ± 0.059)明显高于 CXCR4 阴性 LLC (0.2899 ± 0.0031) ($P < 0.01$); CXCR4 阳性 LLC 的 MMP9 mRNA 表达(0.6223 ± 0.0136)明显高于 CXCR4 阴性 LLC (0.5792 ± 0.0174) ($P < 0.05$); CXCR4 阳性 LLC 移植瘤组织 MVD (56.87 ± 4.83)明显高于 CXCR4 阴性 LLC 移植瘤 (43.52 ± 4.91) ($P < 0.01$)。结论 LLC 中的 CXCR4 阳性亚群具有更强上调 VEGF、MMP9 表达的能力, 具有促发新生血管形成的特征。

关键词: Lewis 肺癌细胞; CXCR4; 新生血管形成

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2009)22-2825-02

CXCR4 positive cells from Lewis lung carcinoma cell line have proangiogenic potentials*

NIAN Wei-qi¹, CHEN Fang-lin¹, AO Xu-jun², et al.

(1. Cancer Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China;

2. Department of General Surgery, No. 532 Hospital of PLA, Huangshan, Anhui 245000, China)

Abstract: Objective To study the important role of CXCR4-positive LLC in the primary stage of tumor angiogenesis. **Methods** Location relationship of CXCR4-positive LLC and vascular endothelial cells was observed by laser scanning confocal microscope (LSCM). Isolated by magnetic cell sorting, VEGF and MMP9 mRNA were evaluated by RT-PCR in CXCR4-positive and CXCR4-negative LLC; VEGF, MMP9 and CD31 protein were analyzed by immunohistochemistry in CXCR4-positive and CXCR4-negative subsets growing tumor tissue. **Results** Most of CXCR4-positive LLC were close to vascular endothelial cells, aberrant vasculature around it was forming. The expression of VEGF mRNA in CXCR4-positive LLC (0.4398 ± 0.059) was higher than that in CXCR4-negative LLC (0.2899 ± 0.0031) ($P < 0.01$), the expression of MMP9 mRNA in CXCR4-positive LLC (0.6223 ± 0.0136) was higher than that in CXCR4-negative LLC (0.5792 ± 0.0174) ($P < 0.05$), MVD of CXCR4-positive subsets growing (56.87 ± 4.83) was higher than of CXCR4-negative subsets growing tumor tissue (43.52 ± 4.91) ($P < 0.01$). **Conclusion** CXCR4 positive cells from Lewis lung carcinoma cell line have proangiogenic potentials.

Key words: Lewis lung cancer cells; CXCR4; angiogenesis

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是肺癌最为常见的组织类型(约占 80%), 38% 以上的 NSCLC 患者确诊时就存在着远处转移。肿瘤的生长、侵袭和转移必须依赖于血管生成(angiogenesis), 近来研究发现, 肿瘤干细胞在新生血管形成中发挥着重要作用, CXCR4 是具有侵袭性肿瘤干细胞的重要表面标志^[1-2]。因此, 作者以 CXCR4 作为 Lewis 肺腺癌细胞(Lewis lung carcinoma, LLC)分选标志, 研究 CXCR4 阳性 LLC 在新生血管形成时的始动作用。

1 材料与方

1.1 主要试剂 DMEM 培养基、优等胎牛血清购自美国 Hyclone 公司; 小鼠 Easy Sep 磁珠分选系统购自 Stem Cell 公司; PE 标记大鼠抗小鼠 CXCR4 单克隆抗体, PE 标记的 IgG 同型对照购自 eBioscience 公司, 兔抗小鼠 CXCR4 多克隆抗体、大鼠抗小鼠 Flt-1 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; FITC 标记的山羊抗大鼠 IgG 抗体、TRITC 标记的山羊抗兔 IgG 抗体购自武汉博士德公司; 兔抗小鼠 MMP9 多克隆抗体购自北京博奥

森公司, 兔抗小鼠 VEGF 多克隆抗体、兔抗小鼠 CD31 多克隆抗体、即用型 SABC-AP 试剂盒购自博士德生物工程公司。

1.2 细胞株和动物 小鼠 Lewis 肺癌细胞株由四川大学细胞中心提供; 健康 C57BL/6 小鼠, 4~6 周, 雌性, 由第三军医大学动物所提供; 激光扫描共聚焦显微镜 Leica TCS SP5, 由第三军医大学基础医学部中心实验室提供。

1.3 细胞培养 LLC 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37°C、5% CO₂ 条件下培养。

1.4 细胞株免疫荧光染色 取对数生长期的 LLC 细胞, 将细胞浓度调整为 1×10^6 个/mL, 加入 PE 标记的 CXCR4 抗体 (1:500), 对照组加入 PBS, 室温孵育 30min; 倾去存留的荧光抗体, PBS 漂洗, 5min × 3 次; 适量滴入载玻片, 共聚焦显微镜下观察。

1.5 移植瘤组织免疫荧光双标染色 取对数生长期的 LLC 细胞, 制成单细胞悬液, 将细胞浓度调整为 5×10^5 个/mL, 细胞悬液以 0.2mL/只接种于 C57BL/6 小鼠右腋下, 3 周后,

* 基金项目: 国家高技术研究发展计划“863”项目(2007AA02Z129); 国家自然科学基金项目(30901790); 重庆市自然科学基金项目(2008BB5117)。△ 通讯作者, E-mail: chenzhengtang@mail.tmmu.com.cn。

将皮下肿瘤组织取出,制成冰冻切片;切片用冰丙酮固定 10min,PBS 漂洗,5min×3 次;加入 CXCR4 抗体(1:100)Flt-1(1:100),对照组加入 PBS,37℃ 孵育 1h,4℃ 过夜;第 2 天,加入相应荧光二抗 IgG(1:100),37℃ 孵育 1h,PBS 漂洗,山羊血清封闭 30min;1μg/mL DAPI 复染,室温孵育 10min,5min×3 次;再用蒸馏水洗 1min,除去盐结晶;50%缓冲甘油封片,共聚焦显微镜下观察。

1.6 免疫磁珠分选 将 LLC 细胞制成单细胞悬液,调成 1×10^8 个/mL,悬于 100μL 的 DMEM 培养液中;加入 PE 标记的 CXCR4 抗体 20μL,避光,室温孵育 15min;加入 EasySep PE selection cocktail 混合液 7μL,充分混匀,避光,室温孵育 15min;加入磁珠纳米颗粒 5μL,充分混匀,室温孵育 10min;加入含 2% FBS 和 1mM EDTA 的 PBS 至 2.5mL,混匀细胞后将试管插入磁极中,静置 5min;倒掉上清液部分,保持磁极与试管倒置状态 2~3s,然后使试管口恢复向上的位置;重复漂洗 4 次,用无血清的 DMEM 重悬细胞。

1.7 RT-PCR 检测 VEGF、MMP9 mRNA 的表达 按照 TRIzol 说明书分别提取 CXCR4 阳性和阴性 LLC 总 RNA,按试剂盒操作说明合成第 1 条链。紫外分光光度计测定 RNA 浓度,琼脂糖电泳证实 RNA 的完整性。

VEGF 引物序列为:正义引物 5'-TGG ATG TC TAC CAG CGA AGC-3',反义引物 5'-ACA AGG CTC ACA GTG ATT TT-3'(308bp);MMP9 引物序列为:正义引物 5'-CTC AGA GAT TCT CCG TGT CCT GTA-3',反义引物 5'-GAC TGC CAG GAA GAC ACT TGG TTA-3';GAPDH 引物序列为:正义引物 5'-TGG TAT CGT GGA AGG ACT CAT GAC-3'(241bp),反义引物 5'-ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC-3'(200bp)。PCR 反应条件:94℃ 30s,61℃ 30s,72℃ 30s,29 个循环。每组实验重复 3 次。产物在质量浓度为 1% 的琼脂糖上电泳,以 GAPDH 为内参,做 OD 目的基因/OD GAPDH 的光密度比值测定。

1.8 免疫组化染色 CXCR4 阳性和阴性 LLC 以适量细胞数接种,每组各接种 6 只;3 周后将肿瘤完整切除,常规切片,行免疫组化染色,SP 法检测 VEGF、MMP9、CD31 蛋白表达。VEGF、MMP9 染色以见到肿瘤细胞或间质细胞胞浆黄色至棕色染色为阳性,参照 Rahman 等^[3]方法进行评分;肿瘤 MVD 计数标准:以 CD31 染色标记微血管,CD31 染色以见到血管内皮细胞黄色至棕色染色为阳性,参照 Weidner 等^[4]方法评判计数。

1.9 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用 SPSS13.0 软件进行分析,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

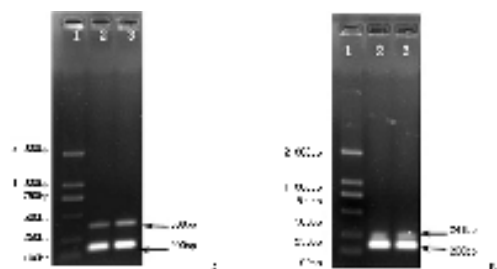
2.1 CXCR4 抗原的表达 共聚焦荧光显微镜显示,在 LLC 细胞系中部分细胞表达 CXCR4 抗原,可见红色荧光分布于胞膜上,CXCR4 阳性细胞在形态、大小方面与 CXCR4 阴性细胞无明显差异,见插图 III 图 1。

2.2 CXCR4、Flt-1 表达检测 共聚焦显微镜显示,胞膜呈红色荧光的 CXCR4 阳性 LLC,呈散在或局灶状分布,但多毗邻胞膜呈绿色荧光的 Flt-1 阳性内皮细胞,并在 CXCR4 阳性 LLC 周围形成血管样结构,见插图 III 图 2。

2.3 VEGF、MMP9 mRNA 表达情况 CXCR4 阳性和阴性 LLC 均有 VEGF、MMP9 mRNA 表达,见图 1;CXCR4 阳性 LLC 的 VEGF mRNA 表达(0.4398 ± 0.059)明显高于 CXCR4 阴性 LLC(0.2899 ± 0.0031),差异具有统计学意义($P < 0.01$);CXCR4 阳性 LLC 的 MMP9 mRNA 表达($0.6223 \pm$

0.0136)明显高于 CXCR4 阴性 LLC(0.5792 ± 0.0174),差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 VEGF、MMP9 表达情况及 MVD 测定 VEGF、MMP9 蛋白表达及 CD31 显色主要位于细胞的胞浆和核膜上,为棕黄色或褐色颗粒;CXCR4 阳性 LLC 移植瘤组织中 VEGF 表达(2.67 ± 0.52),明显高于 CXCR4 阴性 LLC 移植瘤(1.17 ± 0.41),差异具有统计学意义($P < 0.01$);CXCR4 阳性 LLC 移植瘤组织中 MMP9 表达(3.33 ± 0.82),明显高于 CXCR4 阴性 LLC 移植瘤(2.33 ± 0.52),差异具有统计学意义($P < 0.05$);CXCR4 阳性 LLC 移植瘤组织 MVD(56.87 ± 4.83),明显高于 CXCR4 阴性 LLC 移植瘤(43.52 ± 4.91)($P < 0.01$)。



1, DNA Marker DL2000 2, CXCR4 阴性 LLC PCR 产物 3, CXCR4 阳性 LLC PCR 产物。

图 1 VEGF(A)、MMP9(B) mRNA 在 LLC 不同亚群中的表达

3 讨 论

NSCLC 恶性生物学行为与肿瘤血管生成密切相关,多途径抗血管生成已成为重要治疗新策略之一,并经多中心临床试验证实有较为确切疗效。但是,NSCLC 血管生成突出表现的异质性和现有药物难以预知的不良反应制约着这一治疗模式更为广泛的应用^[5]。Sardari 等^[6]通过对 279 例病理标本的分析进一步将 NSCLC 分为可呈新生血管依赖、非新生血管依赖和过渡型 3 种生长模式;Adighibe 等^[7]对非新生血管依赖型肺癌进行三维模拟重建研究,阐明其极有可能是肺癌细胞克隆选择结果。因此,NSCLC 细胞异质性与血管形成密切相关,可能存在着更具血管生成潜能的细胞亚群(pro-angiogenesis population)。

肿瘤发生起始阶段新生血管已经开始形成,脑肿瘤干细胞的相关研究发现,脑肿瘤干细胞样细胞成瘤后,组织内有着更广泛血管生成、坏死和出血,并在缺氧条件下能更显著、持续地分泌 VEGF;它多毗邻于脑肿瘤组织新生血管周围,体外培养时内皮细胞能选择性地与脑肿瘤干细胞相互作用形成血管样结构;这提示肿瘤干细胞周围可能存在着前血管生成微环境^[8-9]。更进一步的研究证实,CXCR4/SDF-1(stromal cell derived factor-1)轴是重要的调控分子,胶质瘤干细胞 CXCR4 受体激活后 Ca^{2+} 通道开放,较非干细胞组分泌更高水平的 IL-8、VEGF^[10]。

CXCR4/SDF-1 轴是调控新生血管形成的重要分子开关,通过 PI3K/Akt 等信号通路促进 VEGF 介导的肿瘤血管生成,同时它也是许多成体干细胞的重要标志物。Kaplan 等^[11]发现 Flt-1 阳性骨髓造血祖细胞更易聚集在 CXCR4 阳性 LLC 周围,并在癌细胞周围形成了异常血管结构。作者先前应用磁珠分选方法分离和培养了 Sca-1 阳性 LLC,证实了其具备肿瘤干细胞的某些特性^[12]。在本研究中,通过激光共聚焦检测,又进一步证实了 LLC 细胞株及移植瘤组织中还存在 CXCR4 阳性亚群,它与内皮细胞有着密切的毗邻关系,能(下转第 2830 页)

- blastoma[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(7): e51.
- [2] Tang Y, Chen YW, Ni B, et al. Up-regulation of the expression of costimulatory molecule CD40 in hepatocytes by hepatitis B virus X antigen[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 384(1): 12.
- [3] Yu J, Zhang L, Chen AL, et al. Identification of the gene transcription and apoptosis mediated by TGF- β -Smad2/3-Smad4 signaling[J]. *J Cell Physiol*, 2008, 215(2): 422.
- [4] Chunming D, Rossa K, Chiu TK. MS analysis of single nucleotide differences in circulating nucleic acids: application to noninvasive prenatal diagnosis[J]. *PNS*, 2004, 29: 10762.
- [5] Talmaci R, Traeger Synodinos E, Kanavakis T, et al. Scanning of β -globin gene for identification of β -thalassaemia mutation in Romanian population [J]. *J Cell Mol Med*, 2004, 18(2): 232.
- [6] 胡华, 李彩霞, 孙古亚, 等. 多重引物延伸的方法检测 β 地中海贫血[J]. *重庆医学*, 2007, 36(21): 2193.
- [7] Christina V, Voanne TS. Rapid screening of multiple β -globin gene mutations by realtime PCR on the lightcycler: application to carrier screening and prenatal diagnosis of thalassaemia syndromes[J]. *Clin Chem*, 2003, 49: 5769.
- [8] 冯东晓, 刘德培. 人 α -珠蛋白基因表达调控研究进展[J]. *国外医学分子生物学分册*, 2004, 22(1): 162.
- [9] Li C, Yane Y, Dai H, et al. Detection of β -thalassaemia by PCR connected with reverse dot blot[J]. *China Pediatr Blood Cancer*, 2007, 2(12): 9.
- [10] Xu XM, Zhou YQ, Luo GX, et al. The prevalence and spectrum of α and β thalassaemia in Guangdong Province: implications for the future health burden and population screening[J]. *J Clin Pathol*, 2004, 57: 517.
- [11] Mathias LA, Fisher TC, Zeng L, et al. Ineffective erythropoiesis in beta-thalassaemia major is due to apoptosis at the polychromatophilic normoblast stage[J]. *Exp Hematol*, 2000, 28: 1343.
- [12] Liao C, Mo QH, Li J, et al. Carrier screening for alpha and beta-thalassaemia in pregnancy: the results of an 112 year prospective program in Guangzhou Maternal and Neonatal Hospital [J]. *Prenat Diagn*, 2005, 25(2): 163.
- [13] Patterson TA, Lobenhofer EK, Fulmer-Smentek SB, et al. Performance comparison of one-color and two-color platforms within the MicroArray Quality Control (MAQC) project[J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 1140.
- [14] Zhang X. De novo induction of platelet-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from CD4⁺CD25⁻ cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. *Blood*, 2009, 113: 2568.

(收稿日期: 2009-09-15)

(上接第 2826 页)

产生更多的 VEGF 和 MMP9, 具有促发新生血管形成的作用。因此, Sca-1/CXCR4 可能是具有高侵袭力的 LLC 干细胞的重要表面标志。作者下一步将建立 Sca-1/CXCR4 双阳性 LLC 分选培养平台, 并更加深入地研究 NSCLC 干细胞参与肿瘤血管生成调控的分子机制。

参考文献:

- [1] Sakariassen P, Prestegarden L, Wang J, et al. Angiogenesis-independent tumor growth mediated by stem-like cancer cells[J]. *PNAS*, 2006, 103(44): 16466.
- [2] Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer [J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(3): 313.
- [3] Rahman A, Dhar DK, Yamaguchi E, et al. Coexpression of inducible nitric oxide synthase and COX-2 in hepatocellular carcinoma and surrounding liver possible involvement of COX-2 in the angiogenesis of hepatitis C virus-positive cases[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(5): 1325.
- [4] Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 1991, 324(1): 1.
- [5] Cho YJ, Murgu SD, Colt HG. Bronchoscopy for bevacizumab-related hemoptysis [J]. *Lung Cancer*, 2007, 56(5): 465.
- [6] Sardari Nia P, Colpaert C, Blyweert B, et al. Prognostic value of nonangiogenic and angiogenic growth patterns in non-small-cell lung cancer[J]. *Br J Cancer*, 2004, 91(7): 1293.
- [7] Adighibe O, Micklem K, Campo L, et al. Is nonangiogenesis a novel pathway for cancer progression? A study using 3-dimensional tumour reconstructions[J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(8): 1176.
- [8] Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, et al. Stem Cell-like Glioma Cells Promote Tumor Angiogenesis Vascular Endothelial Growth Factor [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(16): 7843.
- [9] Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, et al. A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells[J]. *Cancer Cell*, 2007, 11(1): 69.
- [10] 平轶芳, 姚小红, 卞修武, 等. 人胶质瘤干细胞趋化因子受体 CXCR4 活化促进血管生成的作用[J]. *中华病理学杂志*, 2007, 36(3): 179.
- [11] Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche[J]. *Nature*, 2005, 438(7069): 820.
- [12] 敖绪军, 钱莘, 安江宏, 等. Sca-1+Lewis 肺癌细胞成瘤实验的研究[J]. *重庆医学*, 2007, 36(20): 2044.

(收稿日期: 2009-08-29)