

人淋巴管内皮细胞对人肝癌 HepG-2 细胞增殖及侵袭的影响

Effect of Human Lymphatic Endothelial Cells on Proliferation and Invasion in Human Hepatoma HepG-2 Cells

FU Hai-yan, GAO Shan, CHEN Xiu-ying, et al.

付海燕,高山,陈秀英,田莉莉,崔晓楠
(大连医科大学附属第一医院,辽宁 大连 116011)

摘要: [目的] 探讨人淋巴管内皮细胞(HLEC)对人肝癌 HepG-2 细胞增殖、异质黏附和侵袭能力的影响。[方法] 采用 Transwell 小室建立 HepG-2 细胞与 HLEC 共培养系统;台盼蓝拒染法检测 HLEC 对 HepG-2 细胞增殖的影响;噻唑蓝染色法(MTT)检测 HLEC 对 HepG-2 细胞异质黏附力的影响;Transwell 侵袭小室观察 HLEC 对 HepG-2 细胞侵袭力的影响。[结果] 共培养系统中的 HepG-2 细胞数 147 ± 6 /视野,显著高于单独培养的 HepG-2 细胞数 120 ± 3 /视野 ($P < 0.05$),表明 HLEC 可以促进 HepG-2 细胞的增殖。共培养系统中的 HepG-2 细胞黏附率(0.98 ± 0.01)显著高于单独培养的 HepG-2 细胞黏附率(0.87 ± 0.04) ($P < 0.05$),表明 HLEC 可以促进 HepG-2 细胞异质黏附。共培养系统中的 HepG-2 细胞穿膜数量 106 ± 6 /视野,显著多于单独培养的 HepG-2 细胞穿膜数量 89 ± 2 /视野 ($P < 0.05$),表明 HLEC 可以促进 HepG-2 细胞侵袭,呈剂量依赖性。[结论] HLEC 通过促进 HepG-2 细胞的增殖、黏附及侵袭能力参与了肿瘤淋巴道转移。

关键词: HLEC; HepG-2 细胞;增殖;黏附;侵袭

中图分类号: R73-34 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2013)01-0067-04

人淋巴管内皮细胞(human lymphatic endothelial cell, HLEC)衬覆于淋巴管道的管腔面,是构成人淋巴管壁的主要结构之一,与肿瘤扩散、炎症等病理过程密切相关^[1]。研究表明,肿瘤细胞与淋巴管内皮细胞互动产生的生物学效应是肿瘤淋巴道转移至关重要的环节。在肿瘤细胞与淋巴管内皮细胞互动过程中,肿瘤细胞表达淋巴管生成因子作用于淋巴管内皮细胞,诱导了肿瘤淋巴管生成^[2,3]。本实验通过构建 HLEC 与人肝癌 HepG-2 细胞共培养系统,探讨 HLEC 对 HepG-2 细胞增殖、异质黏附和侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料来源

HepG-2 细胞购于中国科学院上海细胞研究所;

收稿日期:2012-08-13;修回日期:2012-10-24
基金项目:国家自然科学基金资助项目(81173615)
通讯作者:崔晓楠, E-mail: cxn23@sina.com
付海燕,高山为共同第一作者

HLEC 购于 American Type Culture Collection (ATCC)细胞库;二甲基亚砜(DMSO)购于 Amersco 公司;台盼蓝购自迈晨科技有限公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)购于 Biosharp 公司;Matrigel 基质胶购于美国 Sigma 公司;Transwell 板购于美国 Corning 公司。

1.2 细胞培养

将悬浮状态的 HepG-2 细胞和 HLEC 分别接种于含 10%胎牛血清的 IMDM 培养基中,于 5%CO₂、37℃饱和湿度的孵箱中培养,每 2d 换 1 次液(PBS 冲洗后放入新培养液),2~3d 后在倒置显微镜下观察,当细胞铺满整个瓶壁底部约 90%时用 0.25%胰蛋白酶消化,待细胞变圆吹打混匀并传代。

1.3 建立 HLEC 与 HepG-2 细胞共培养系统

选择不同孔径的 insert(上室)和培养板(下室)建立 Transwell 共培养系统。培养板预先用自制的鼠尾胶包被。首先,取生长活力最旺盛且纯化好的第 3 代处于对数生长期的 HLEC 消化制成细胞悬液,接种于下室内,于 5%CO₂、37℃、饱和湿度的孵箱中培养。12h 后,取处于对数生长期的人肝癌 HepG-2 细胞

胞消化制成细胞悬液,接种于上室,然后放于孵箱中培养。成功构建 HLEC 与 HepG-2 细胞 Transwell 共培养系统,其中 HLEC 位于下室,HepG-2 细胞位于上室。

1.4 细胞增殖实验

将 HLEC 用 0.25%胰酶消化,终止消化后离心弃去培养液,用 PBS 洗 1~2 遍,调整细胞密度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$,吹打混匀吸取 900 μl 置于 Transwell 板 (0.4 μm 孔径,6 孔培养板) 下室,37 $^{\circ}\text{C}$ 饱和湿度的孵箱中培养 8~12h,待细胞贴壁。HepG-2 细胞重悬,调整密度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 并吸取 300 μl 置于上室。将 Transwell 板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 饱和湿度的孵箱中培养,每组设立 3 个复孔。同时将重悬的 HepG-2 细胞调整密度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 并以 300 μl /孔种于与 Transwell 小室套板相同的 6 孔培养板内,每组设立 3 个复孔。24h 后行台盼蓝拒染实验,观察并分析单独培养及共培养系统中 HepG-2 细胞增殖情况,实验重复 3 次。

1.5 细胞黏附实验

培养 HLEC,待铺满瓶壁 80%后弃培养液,加入无血清培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24h 后收集此培养基,称为 HLEC 条件培养基。取 96 孔板,每孔加入过夜融化后的 Matrigel 人工基质胶与无血清培养基 1:8 稀释液 100 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4h,凝聚成胶,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日,吸出残余液体,加入无血清培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱水化 30min。取 2 瓶 HepG-2 细胞,1 瓶加入 HLEC 条件培养基,1 瓶加入无血清 IMDM 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24h 后制成单细胞悬液。以密度 $1 \times 10^5/\text{ml}$,100 μl /孔的细胞悬液接种 96 孔板中,每组设 5 个复孔,实验重复 3 次。

检测黏附细胞吸光值:铺板 1h 后,吸出未黏附细胞,每孔添加培养基及 MTT 溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4h。弃板内上清液,加入 DMSO,摇床 10min,570nm 波长检测各孔吸光度 OD 值。总细胞 OD 值为细胞植入 24h 后,按相同条件重复上述实验 3 次。分别计算 IMDM 培养基及 HLEC 条件培养基中 HepG-2 细胞黏附率。

细胞黏附率 (%) = 黏附细胞平均 OD 值 / 总细胞平均 OD 值 $\times 100\%$

1.6 细胞侵袭实验

取过夜融化后的 Matrigel 人工基质胶与无血清培养基 1:8 稀释液 50 μl 铺于 Transwell 侵袭小室

(8 μm 孔径,24 孔培养板)上表面,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4h,待其凝聚成胶,放于 24 孔板中,紫外线照射过夜。吸出残余液体,每孔加入 25 μl 无血清培养基,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱水化 30min。将 HepG-2 细胞撤血清饥饿 24h,制成密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 单细胞悬液,设 3 个复孔。

实验分两组,一组 Transwell 上室加入单细胞悬液 200 μl ,下室加入 600 μl HLEC 的胎牛血清培养液。另一组上室条件相同,下室加入 600 μl 胎牛血清培养液。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱培养 24h。取出 24 孔板,弃去小室及板内液体,在上、下室移入同体积 PBS,洗膜 3 次;上、下室移入同体积 4%多聚甲醛,固定细胞 15min;弃去固定液,倒置 Transwell 小室,自然风干后上室移入 600 μl 的结晶紫溶液,室温染色 10min;PBS 洗 3 遍,擦去上室未穿膜细胞。置于倒置显微镜下观察,随机取 5 个视野计数染色细胞,以穿过 Matrigel 人工基质胶覆盖的聚碳酸酯微孔膜,并贴壁于膜下表面的细胞数量,反映 HepG-2 细胞的侵袭能力。实验重复 3 次。

2 结果

2.1 HLEC 对 HepG-2 细胞增殖的影响

单独培养的 HepG-2 细胞数 $120 \pm 3/\text{视野}$,显著性低于共培养系统中的 $147 \pm 6/\text{视野}$,两者差异有统计学意义 ($P=0.047$)。与 HLEC 共培养系统中的 HepG-2 细胞增殖能力高于单独培养的 HepG-2 细胞,表明 HLEC 能够促进 HepG-2 细胞的增殖 (Figure 1)。

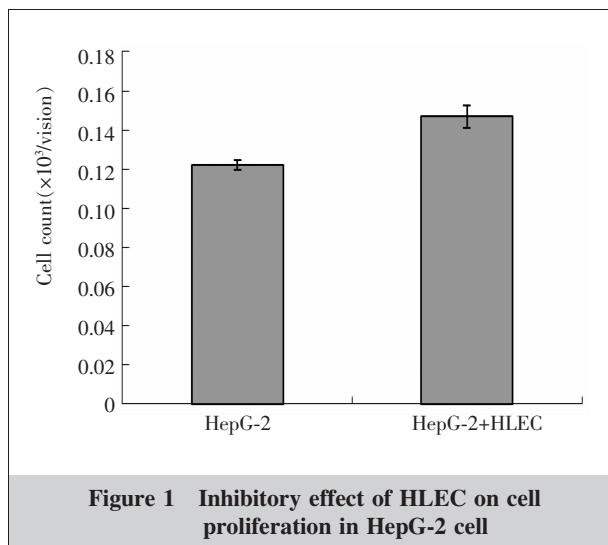


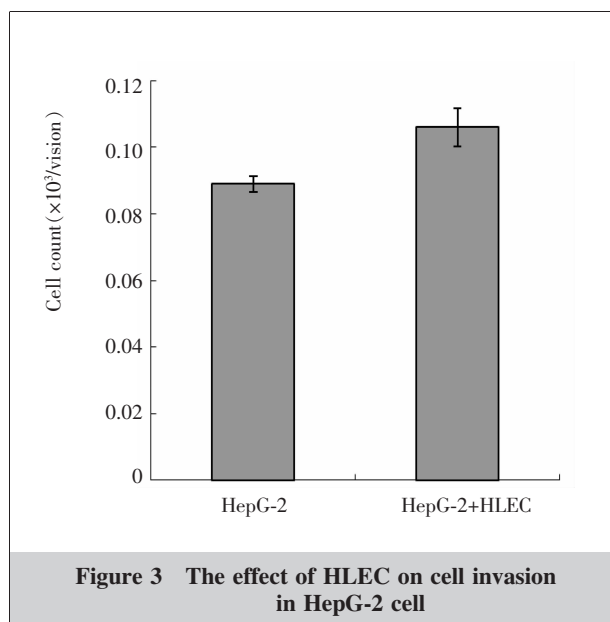
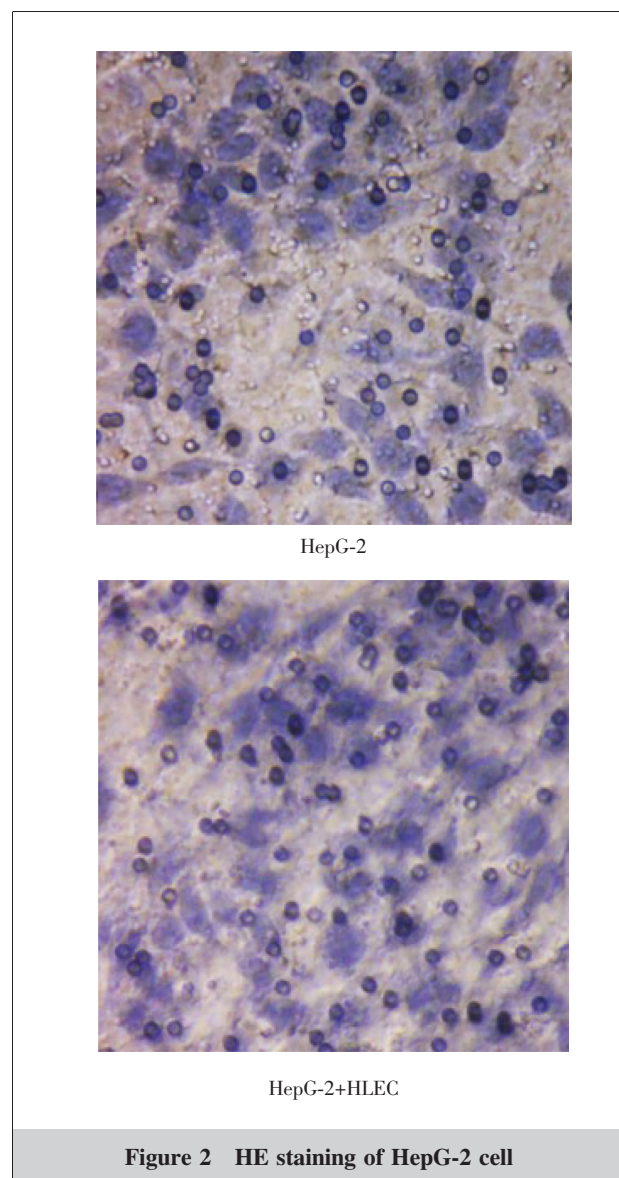
Figure 1 Inhibitory effect of HLEC on cell proliferation in HepG-2 cell

2.2 HLEC 对 HepG-2 细胞黏附能力的影响

HLEC 条件培养基中 HepG-2 细胞对 Matrigel 人工基质胶的黏附率(0.98 ± 0.01)高于 IMDM 培养基中的 HepG-2 细胞黏附率(0.87 ± 0.04),两者差异有统计学意义($P=0.041$),表明 HLEC 可以促进 HepG-2 细胞的黏附能力。

2.3 HLEC 对 HepG-2 细胞侵袭力的影响

与 HLEC 共培养体系中的 HepG-2 细胞穿膜数量 106 ± 6 /视野,多于单独培养的 HepG-2 细胞穿膜数量 89 ± 2 /视野,两者差异有统计学意义 ($P=0.036$),表明 HLEC 可增强 HepG-2 细胞的侵袭能力(Figure 2,3)。



3 讨 论

由于缺乏特异性淋巴道转移标志物,长期以来肿瘤淋巴道转移相关研究处于滞后状态^[3]。研究表明肿瘤细胞淋巴道转移并非随机过程,是肿瘤细胞与淋巴内皮细胞互动的结果,在这个过程中肿瘤细胞表达诸多淋巴管生成因子,如 VEGF-C、VEGF-D、PDGF-BB 等,作用于淋巴内皮细胞的相关受体,诱导淋巴管内皮细胞增殖、迁移、出芽,促进肿瘤淋巴管生成,而此过程中有关淋巴管内皮细胞对肿瘤细胞恶性形为的影响,我们了解不多。

本实验采用 Transwell 小室建立 HLEC 与 HepG-2 细胞非接触共培养体系,通过共培养体系,可以在相对接近体内环境下观察细胞与细胞之间的相互作用,分析下层 HLEC 分泌或代谢产物对上室内 HepG-2 细胞增殖、黏附、迁移的影响^[4]。细胞共培养技术在肿瘤的侵袭^[5-7]、转移、中心坏死^[8,9]、血管生成、营养供给^[10,11]、体内基因表达模拟、实验性治疗等方面具有重要意义^[12-14]。

研究结果表明,与 HLEC 共培养的 HepG-2 细胞增殖、黏附和侵袭能力显著高于单独培养的 HepG-2 细胞,提示 HLEC 能够促进 HepG-2 细胞的增殖、黏附及侵袭力。在肿瘤细胞与淋巴管内皮细胞互动过程中,淋巴管内皮细胞可反作用于肿瘤细胞,相关研究表明淋巴管内皮细胞可通过 VEGFR-3 与

肿瘤细胞的 VEGF-C 相互作用^[15],刘虹麟等^[16]在乳腺癌的研究中也发现淋巴管内皮细胞能够促进肿瘤细胞的增殖和转移,提示淋巴管内皮细胞能够促进肿瘤细胞的恶性生物学行为,在肿瘤淋巴道转移过程中起重要作用。

参考文献:

- [1] Chi XY, Yu JX, Tan YZ, et al. Lymphatic endothelial cells cultured in vitro and identification[J]. *Anatomy Research*, 2006, 28(1):33-37.[迟晓艳, 于建宪, 谭玉珍, 等. 淋巴管内皮细胞的体外培养与鉴定 [J]. 解剖学研究, 2006, 28(1):33-37.]
- [2] Zhang Z, Helman JJ, Li LJ. Lymphangiogenesis, lymphatic endothelial cells and lymphatic metastasis in head and neck cancer — a review of mechanisms[J]. *Int J Oral Sci*, 2010, 2(1): 5-14.
- [3] Zhang D, Li B, Shi J, et al. Suppression of tumor growth and metastasis by simultaneously blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and VEGF-C with a receptor-immunoglobulin fusion protein[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(6):2495-2503.
- [4] Lincoln DW 2nd, Phillips PG, Bove K. Estrogen-induced Ets-1 promotes capillary formation in an in vitro tumor angiogenesis model[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2003, 78(2):167-178.
- [5] Xie J, Haslam SZ. Extracellular matrix regulates ovarian hormone dependent proliferation of mouse mammary epithelial cells[J]. *Endocrinology*, 1997, 138(6):2466-2473.
- [6] Woodward TL, Xie J, Fendrick JL, et al. Proliferation of mouse mammary epithelial cells in vitro; interactions among epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, ovarian hormones, and extracellular matrix proteins[J]. *Endocrinology*, 2000, 141(10):3578-3586.
- [7] Thiery JP, Chopin D. Epithelial cell plasticity in development and tumor progression[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 1999, 18(1):31-42.
- [8] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(6):442-454.
- [9] Arias AM. Epithelial mesenchymal interactions in cancer and development[J]. *Cell*, 2001, 105(4):425-431.
- [10] Takayama G, Taniguchi A, Okano T. Identification of differentially expressed genes in hepatocyte/endothelial cell co-culture system[J]. *Tissue Eng*, 2007, 13(1):159-166.
- [11] Wallace CS, Champion JC, Truskey GA. Adhesion and function of human endothelial cells co-cultured on smooth muscle cells[J]. *Ann Biomed Eng*, 2007, 35(3):375-386.
- [12] Kamolz LP, Kolbus A, Wick N, et al. Cultured human epithelium; human umbilical cord blood stem cells differentiate into keratinocytes under in vitro conditions[J]. *Burns*, 2006, 32(1):16-19.
- [13] Ubels JL, Hoffman HM, Srikanth S, et al. Gene expression in rat lacrimal gland duct cells collected using laser capture microdissection; evidence for K+ secretion by duct cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(5):1876-1885.
- [14] Seam N, Gonzales DA, Kern SJ, et al. Quality control of serum albumin depletion for proteomic analysis [J]. *Clin Chem*, 2007, 53(11):1915-1920.
- [15] Chen ZH, Li YH, Zhao YY, et al. The impact of VEGF-C on lymphatic endothelial cell biology function[J]. *Shandong Pharmacological*, 2012, 52(23):39-41.[陈志宏, 李雅红, 赵媛媛, 等. VEGF-C 对淋巴管内皮细胞生物学功能的影响 [J]. 山东医药, 2012, 52(23):39-41.]
- [16] Liu HL, Wu LQ, Ye LY, et al. The effect of co-inoculating human lymphatic endothelial cells on growth and metastasis of breast cancer cell and of osteosarcoma cell in nude mice[J]. *Basic and Clinical Medicine*, 2012, 30(5):525-529.[刘虹麟, 吴练秋, 叶丽亚, 等. 共接种淋巴管内皮细胞对乳腺癌细胞和骨肉瘤细胞在裸鼠体内生长和转移的影响 [J]. 基础医学与临床, 2010, 30(5):525-529.]