

# 透明质酸对人结肠癌细胞 SW480 增殖、粘附和侵袭能力的影响

# Effects of Hyaluronan in Proliferation, Adhesion and Invasion Abilities of Human Colon Carcinoma Cell SW480 *in Vitro*

卓文磊<sup>1</sup>/王彦<sup>2</sup>/陈正堂<sup>1,\*</sup>

(1. 第三军医大学新桥医院全军肿瘤中心, 重庆 400037; 2. 第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所, 重庆 400037)

ZHUO Wen-lei<sup>1</sup>, WANG Yan<sup>2</sup>, CHEN Zheng-tang<sup>1,\*</sup>

(1. Cancer Research Center of Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; 2. Institute of Respiratory Disease research, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**【摘要】**背景与目的: 透明质酸广泛存在于结肠癌间质中, 本研究旨在探讨透明质酸 (hyaluronan, HA) 对体外培养的人结肠癌 SW480 细胞增殖、粘附和侵袭能力的影响。材料与方法: 体外培养的 SW480 细胞被随机分为 3 组: 对照组 (无血清培养基培养)、HA<sub>1</sub> (HA 为 10 μg/ml) 和 HA<sub>2</sub> (HA 为 20 μg/ml) 组, 经培养不同时间后, 以 MTT 实验和软琼脂细胞集落形成实验 (soft agar clone formation assay) 比较 SW480 细胞增殖能力, 用平板粘附模型和 Boyden chamber 小室模型比较 SW480 细胞粘附和侵袭能力。结果: HA<sub>1</sub> 和 HA<sub>2</sub> 组与对照组相比, 细胞增殖数量、软琼脂细胞集落、粘附于平板和穿过 Boyden chamber 隔膜的细胞数皆显著增加 ( $P < 0.05$ ), 且呈剂量依赖性。结论: HA 能增强 SW480 细胞体外增殖、粘附和侵袭能力。

**【关键词】**透明质酸; 增殖; 粘附; 侵袭; SW480 细胞

中图分类号: R73

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2007)01-0026-03

**【ABSTRACT】** BACKGROUND & AIM: Hyaluronan (HA), a kind of polysaccharide with high molecular weight, is present extensively in the mesenchyme of colon carcinoma. The objective of this study was to investigate the effects of HA on proliferation, adhesion and invasion abilities of human colon carcinoma cell SW480 *in vitro*. MATERIALS AND METHODS: cultured SW480 cells were divided into three groups: control group (C): cultured with serum-free medium (SFM); HA<sub>1</sub> and HA<sub>2</sub> treatment groups: cultured with SFM containing different concentrations of HA (HA<sub>1</sub>: 10 μg/ml, HA<sub>2</sub>: 20 μg/ml). After some time, proliferation ability was examined by MTT assay and soft agar clone formation assay, while adhesive and invasive abilities were assessed by plate adhesion model and Boyden chamber transwell assay. RESULTS: Compared with that in C group, in HA<sub>1</sub> and HA<sub>2</sub> treatment groups, the number of proliferative cells, soft agar cell clone formation, cell adhesion on plate and septum permeation of Boyden chamber increased significantly in HA<sub>1</sub> and HA<sub>2</sub> treatment groups in a HA dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ). CONCLUSION: HA could enhance the proliferation, adhesion and invasion abilities of human colon carcinoma cell SW480 *in vitro*.

**【KEY WORDS】** hyaluronan; proliferation; adhesion; invasion; SW480 cell line

透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 是一类链状高分子酸性粘多糖。一般认为, 它是细胞内的一种结构性分子, 能保持组织内的水分, 并维持组织细胞的弹性, 同时也作为细胞外基质的一种构成“框架”<sup>[1]</sup>。近年来国内外研究发现它大量存在于某些肿瘤组织中, 可能参

与了某些肿瘤恶性增殖、转移、耐药等机制的形月日成<sup>[2-3]</sup>。本研究观察了透明质酸对结肠癌 SW480 细胞株体外增殖、粘附和侵袭能力的影响, 以探讨透明质酸在结肠癌进展中的作用。

收稿日期: 2005-07-05; 修订日期: 2005-12-29

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30371586), 第三军医大学校管基金 (XG200361)

作者简介: 卓文磊 (1975-), 男, 汉族, 贵州贞丰人, 博士, 研究方向: 肿瘤转移机制研究。Tel 023-66646920, 13251348101

Email: zhuowenlei@163.com, zhuowenlei@hotmail.com.

\* Correspondence to: CHEN Zheng-tang, Tel: 023-68755626

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

透明质酸购于 Sigma 公司, 1640 培养基购于 Hyclone 公司, 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 购于天津 TBD 公司, 噻唑蓝 (Methylthio tetrazole, MTT) 购于北京鼎国生物公司, 被覆 matrigel 的 transwell 购于 BD 公司。其它试剂为国产分析纯。结肠癌 SW480 细胞株由本研究中心保存, 含 10% FBS 的 1640 培养基常规传代培养于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下。

### 1.2 方法

**1.2.1 SW480 细胞的分组** 取对数生长期 (60% ~ 70% 融合状态) 的 SW480 细胞, 经无血清培养基 (Free serum medium, FSM) 同步 24 h 后 根据处理细胞的不同培养液, 分为 3 组。正常对照组: 用 FSM 培养细胞; HA<sub>1</sub> 组: 用含 HA 10 μg/ml 的 FSM 培养细胞; HA<sub>2</sub> 组: 用含 HA 20 μg/ml 的 FSM 培养细胞, 每组 5 个平行样。

**1.2.2 MTT 实验** SW480 细胞以 1.0 × 10<sup>5</sup>/ml 接种于 96 孔细胞培养板, 每孔 0.1 ml。12 h 后完全贴壁 根据以上分组, 分别换不同的培养液常规培养。96 h 后, 按以下过程进行 MTT 比色实验: ①结晶: 每孔加入 20 μl MTT 溶液 (5 mg/ml), 继续培养 4 h 后终止培养, 在光镜下观察, 可见细胞内形成蓝紫色结晶物。②溶解: 弃孔内上清液, 加 150 μl 二甲基亚砷 (DMSO), 振荡 10 min, 使蓝紫色结晶物溶解。③比色: 选择 490 nm 波长, 用酶标仪测定各孔的光吸收值 (A 值)。

**1.2.3 软琼脂细胞集落实验** 用 2 倍浓度的 1640 培养基 (含 FBS 20%) 和 1.2% 浓度的琼脂 (已灭菌), 按 1:1 比例混合, 配制成含 0.6% 琼脂及 10% FBS 的 1640 培养基, 以 1ml/孔灌注 6 孔培养板, 室温下冷却凝固形成培养底板。根据 1.2.1 分组, 分别用上述不同培养液把 SW480 细胞制成悬液 (2 × 10<sup>3</sup>/ml), 再用含 0.6% 琼脂的 1640 培养基按 1:1 比例混合后, 琼脂终浓度为 0.3%, 细胞密度为 1 × 10<sup>3</sup>/ml, 然后以 0.5 ml/孔浇灌于培养底板上, 凝固后培养, 每天观察细胞集落生长。2 周后镜下计数含 50 个细胞以上的克隆数量 (numbers of cell colony, NCC)。

**1.2.4 平板粘附实验** 根据以上分组, 96 孔培养板分别加入不同的培养液 10 μl。涂布均匀, 4 °C 过夜, 超净工作台风干。分别加入 FSM 稀释的 SW480 细胞各 100 μl (0.4 × 10<sup>5</sup>), 继续常规培养 60 min 后, 37 °C PBS 洗去未粘附的细胞, 进行 MTT 比色: 测各孔 490 nm 波长光吸收值 (A 值)。用 A 值大小表示粘附活细胞的相对数。

**1.2.5 Boyden chamber 实验** transwell 上下室之

间为直径 8 μm 的 PET 微孔滤膜 (多聚乙烯四苯二甲酸盐膜) 膜上铺 Matrigel 30 μg。根据以上分组, 间隔下室分别加入不同的培养液, 上室接种 SW480 细胞各 0.4 × 10<sup>5</sup>, 继续常规培养 24 h 后, 取出滤膜, 甲醛固定 30 min, 常规 HE 染色。每个滤膜随机选取 5 个 200 倍视野, 计数穿膜细胞数 (间隔下室侧表面细胞数)。以穿膜细胞的相对数目来表示肿瘤细胞的侵袭能力。

### 1.3 统计学分析

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 以 SPSS 11.0 软件进行单因素方差分析, 以  $\alpha = 0.05$  为检验水准。

## 2 结果

**2.1 增殖能力变化** 如表 1 所示, 对照组、HA<sub>1</sub>、HA<sub>2</sub> 组 3 组相比较, MTT 实验 (增殖实验) 所测 A 值, 以及软琼脂细胞集落实验 (soft agar clone formation assay, SACF) 所观察到的细胞集落数目皆依次增高, 而且各组间的差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示 HA 能呈剂量依赖性增强 SW480 细胞的体外增殖能力。图 1 示 SW480 细胞所形成软琼脂细胞集落。

表 1 HA 对 SW480 细胞增殖能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
Table 1 Proliferation ability of SW480 cell effected by HA ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Group	MTT (A value)	SACF (cell colony)
Control	0.066 ± 0.007	59.8 ± 5.5
HA <sub>1</sub>	0.161 ± 0.01 *	109.0 ± 8.9 *
HA <sub>2</sub>	0.118 ± 0.010 * <sup>Δ</sup>	152.2 ± 9.4 * <sup>Δ</sup>

Compared with control, \*  $P < 0.05$ ; Compared with HA<sub>1</sub>, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ .

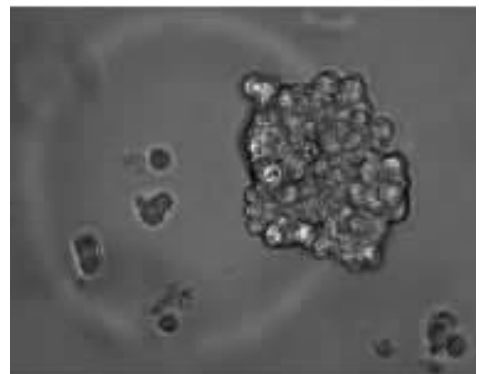


图 1 SW480 细胞形成软琼脂细胞集落 × 400  
Figure 1 Soft agar clone of SW480 cells (× 400)

**2.2 粘附力及侵袭力变化** 如表 2 所示, 对照组、HA<sub>1</sub>、HA<sub>2</sub> 三组相比较, MTT 实验 (粘附实验) 所测 A 值, 以及 Boyden chamber 实验所观察到的穿膜细胞数目皆依次增高, 且各组间的差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示 HA 能增强 SW480 细胞的体外粘附及侵袭能力。图 2a 示 SW480 细胞粘附于培养板底, 图 2b 示 SW480 细胞侵袭穿过 Boyden chamber 的微孔滤膜。

表 2 HA对SW480细胞粘附力及侵袭力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )Table 2 Adhesive and invasive ability of SW480 cells effected by HA ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Group	MTT(A value)	Boyden chamber assay (cell permeating septum)
Control	0.073 ± 0.008	26.8 ± 5.7
HA <sub>1</sub>	0.110 ± 0.012 <sup>*</sup>	43.2 ± 6.1 <sup>*</sup>
HA <sub>2</sub>	0.150 ± 0.010 <sup>* Δ</sup>	66.8 ± 9.2 <sup>Δ*</sup>

Compared with control, <sup>\*</sup>P < 0.05; compared with HA<sub>1</sub>, <sup>Δ</sup>P < 0.05.

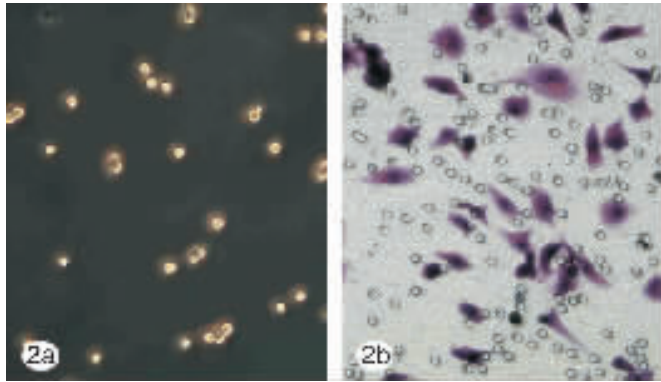


图 2 a: SW480 细胞粘附于细胞培养板 ( $\times 200$ ) b: SW480 细胞侵袭穿过 Boyden chamber 的微孔隔膜 (HE 染色  $\times 200$ )

Figure 2 a: SW480 cells adhered to cell culture plate ( $\times 200$ )  
b: SW480 cells permeating septum of Boyden chamber (HE stain  $\times 200$ )

### 3 讨论

HA 能诱导多种细胞增殖、运动和迁移<sup>[4-7]</sup>。人结肠癌具有增殖快、易于向周围组织浸润及经淋巴道早期转移的特点,这也是结肠癌患者死亡的重要原因,在临床上治疗极为棘手。近来有学者发现,在人结肠癌组织中,存在较多的 HA 堆集<sup>[8]</sup>,但 HA 能否直接诱导结肠癌细胞增殖和侵袭,目前尚未见相关报道。为此,本研究中,我们用不同浓度的 HA 处理结肠癌 SW480 细胞的基础上,设计了 MTT 实验和软琼脂细胞集落实验比较各组 SW480 细胞增殖能力的变化,以及反映细胞在贴壁和悬浮状态下的增殖情况。实验显示,HA 能加强 SW480 细胞的增殖能力。另一方面,我们进行平板粘附实验和 Boyden chamber 实验,结果提示,SW480 细胞和 HA 之间能发生较强的粘附作用,当提高 HA 浓度时,粘附作用亦随之增强,而且 Boyden chamber 实验显示,在 HA 诱导下,趋化穿过两室间隔膜的 SW480 细胞明显增多,提示 HA 能促进 SW480 的体外侵袭能力。

HA 的多种生物学功能是通过其受体的介导完成的<sup>[9]</sup>。在人纤维肉瘤,Hauptschein 发现<sup>[10]</sup>HA 能通过 HA 受体 CD44 影响线粒体内的抗凋亡蛋白及凋亡蛋白的比例而抑制凋亡,从而促进其恶性增殖。在子宫内膜癌,Rein 认为<sup>[11]</sup>HA 能通过 HA 的另一种受体 RHAMM

(Receptor for HA Mediated Motility)影响细胞骨架的重构而促进其侵袭。我们在过去的工作中还发现,除了 CD44 和 RHAMM 外,SW480 细胞株还能表达 layilin 这种新发现的 HA 受体。但是,是否上述受体在 HA 诱导 SW480 细胞增殖和侵袭转移的过程也具有重要地位?HA 具体是通过哪一些分子生物学机制影响 SW480 细胞的增殖和侵袭转移行为?此过程中是否能找到可以干预的治疗靶点,目前尚存在许多未知领域,有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Morra M. Engineering of biomaterials surfaces by hyaluronan [J]. *Biomacromolecules*, 2005,6(3):1205-1223.
- [2] Toole BP, Hascall VC. Hyaluronan and tumor growth[J]. *Am J Pathol*, 2002,161(3):745-757.
- [3] 蔡建良,叶章群,杨为民,等. 透明质酸在膀胱移行细胞癌、乳头状瘤组织中的表达及其意义 [J]. *中华实验外科杂志*, 2004,21(10):1226-1228.
- [4] Kim MS, Park MJ, Moon EJ, et al. Hyaluronic acid induces osteopontin via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to enhance the motility of human glioma cells[J]. *Cancer Res*, 2005,65(3):686-691.
- [5] Maxwell CA, Keats JJ, Belch AR, et al. Receptor for hyaluronan-mediated motility correlates with centrosome abnormalities in multiple myeloma and maintains mitotic integrity[J]. *Cancer Res*, 2005,65(3):850-860.
- [6] 李奇,王海杰,谭玉珍,等. 透明质酸在巨噬细胞的分布以及对细胞黏附和迁移的影响[J]. *解剖学报*, 2004,35(4):152-156.
- [7] 章翔,吴景文,李侠,等. 人骨形成蛋白-2 和透明质酸对脑胶质细胞瘤侵袭性的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2002:82(2):90-93.
- [8] Yamada Y, Itano N, Narimatsu H, et al. Elevated transcript level of hyaluronan synthase1 gene correlates with poor prognosis of human colon cancer[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2004,21(1):57-63.
- [9] 卓文磊,陈正堂. 透明质酸黏素和肿瘤 [J]. *重庆医学*, 2005,34(6):936-939.
- [10] Hauptschein RS, Sloan KE, Torella C, et al. Functional proteomic screen identifies a modulating role for CD44 in death receptor-mediated apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2005,65(5):1887-1896.
- [11] Rein DT, Roehrig K, Schondorf T, et al. Expression of the hyaluronan receptor RHAMM in endometrial carcinomas suggests a role in tumour progression and metastasis[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2003,129(3):161-164.