

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.10.004

uPAR 表达对肝癌细胞株 SMMC-7721 体外及体内侵袭转移能力的影响

刘双海¹, 李德春²

Effect of uPAR Expression on Invasion and Metastasis *in vitro* and *in vivo* of Hepatoma SMMC-7721 Cell Line

Liu Shuanghai¹, Li Dechun²

1. Department of Hepatobiliary Surgery, Jiangyin Hospital Affiliated to Medical School of Southeast University, Jiangyin 214400, China; 2. Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Soochow University

Abstract: Objective To investigate the effect of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) on the invasion and metastasis *in vitro* and *in vivo* of hepatoma SMMC-7721 cell line. **Methods** Fluorescence-activated cell sorter (FACS) was used to sort uPAR positive cells (uPAR+ group) and uPAR negative cells (uPAR- group) from SMMC-7721 cell line, the invasion potential *in vitro* and metastasis potential *in vivo* of two groups were compared by Boyden chamber test and metastasis test in the liver of nude mice respectively. **Results** The purity of uPAR+ group and uPAR- group separated from SMMC-7721 were 90% and 97% respectively, the transmembraned cells of uPAR+ group were much more than that of uPAR- group ($P < 0.05$) in the invasion test *in vitro*, the mice occurred intrahepatic metastasis, bile duct thrombus and portal vein thrombus in uPAR+ group was significantly more than that in uPAR- group ($P < 0.05$) in the metastasis test *in vivo*. **Conclusion** uPAR expression is significantly related with the invasion and metastasis *in vitro* and *in vivo* of SMMC-7721 cell line, uPAR may endow hepatoma SMMC-7721 cell line with powerful potential of invasion and metastasis.

Key words: Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR); Hepatocellular carcinoma; Cell lines; Invasion; Metastasis

摘要:目的 探讨尿激酶型纤溶酶原激活剂受体(uPAR)的表达对肝癌细胞株 SMMC-7721 体外和体内侵袭和转移能力的影响。**方法** 利用流式细胞荧光激活分选(FACS)技术从 SMMC-7721 中分选出 uPAR 阳性(uPAR+)细胞株和 uPAR 阴性(uPAR-)细胞株,再用 Boyden 小室肿瘤细胞体外侵袭实验以及裸鼠体内转移实验,来比较两组肝癌细胞株的体外及体内侵袭和转移能力的差别。**结果** 从 SMMC-7721 分选出的 uPAR+ 组和 uPAR- 组的纯度分别为 90% 和 97%,两组体外侵袭实验显示, uPAR+ 组透过基膜的细胞数较 uPAR- 组明显增多 ($P < 0.05$),两组在裸鼠肝内转移实验显示, uPAR+ 组发生肝内转移、胆管及门脉癌栓较 uPAR- 组明显增加 ($P < 0.05$)。**结论** uPAR 的表达和 SMMC-7721 的体外及体内侵袭转移能力密切相关, uPAR 的表达可能赋予了肝癌细胞株强大的侵袭转移能力。

关键词: 尿激酶型纤溶酶原激活剂受体; 肝细胞癌; 细胞株; 侵袭; 转移

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2012)10-1176-03

0 引言

尿激酶型纤溶酶原激活剂(urokinase-type plasminogen activator, uPA)及其受体(urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR)在很多肿瘤中高表达,其高表达与肿瘤增殖、侵袭、转移有关^[1]。uPAR 在人肝癌中高表达并和肝癌的侵袭转移密切相关^[2]。为进一步证明 uPAR 的表达对肝细胞性肝癌侵袭转移能力的影响,我们利用流式细胞分选技术从肝癌细胞株 SMMC-7721 中分选出 uPAR 阳性(uPAR+)细胞株和 uPAR 阴性(uPAR-)细胞株,再

用 Boyden 小室肿瘤细胞体外侵袭实验以及裸鼠体内成瘤和转移实验,来了解 uPAR 的表达对肝癌细胞体外和体内侵袭和转移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞系

人肝癌细胞系 SMMC-7721 由第二军医大学惠赠,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养,在 37℃ 恒温、5% CO₂ 条件下培养。

1.2 实验动物

本实验采用的 28 只 4~6 周龄雄性裸小鼠购自上海斯莱克实验动物中心。在 SPF 级环境下饲养。

1.3 主要试剂及材料

鼠抗人 uPAR 单克隆抗体(CD87); FITC-鼠抗人 uPAR 单克隆抗体(CD87); FITC-鼠 IgG 均购自美国 Diagnostica 公司; 胎牛血清购自美国 Hyclone 公司;

收稿日期: 2012-02-02; 修回日期: 2012-05-09

基金项目: 无锡市卫生系统科研基金资助项目(ZD0903)

作者单位: 1. 214400 江苏江阴, 东南大学医学院附属江阴医院肝胆外科; 2. 苏州大学附属第一医院普外科

作者简介: 刘双海(1967-), 男, 博士, 主任医师, 主要从事肝胆胰脾外科临床与基础研究

DMEM 购自美国 Gibco 公司; Matrigel 基质胶购自 Invitrogen 公司; DMSO(二甲亚砜)购自 Sigma 公司; 0.5%胰蛋白酶-0.2%EDTA 原液购自 Berlin 公司; 改良 Boyden 小室购自江苏海门麒麟医用仪器厂。

1.4 实验方法

1.4.1 流式细胞检测和分选(FCM) 细胞胰酶消化, 4℃离心后, 100 μl 预冷 PBS 重悬; 加入 10 μl FITC-uPAR 单克隆抗体, 4℃或冰上孵育 30 min, FITC-鼠 IgG 作同型对照; 2 ml PBS 洗 2 次; 500 μl 预冷 PBS 重悬; 流式细胞仪进行检测 uPAR 的表达; 并同时从 SMMC-7721 中 uPAR+ 细胞和 uPAR- 细胞分选出来。

1.4.2 Boyden 小室侵袭实验(体外侵袭实验) Matrigel 基质胶按 1:5 溶于无血清 DMEM; 按每个小室 100 μl Matrigel 溶液铺于上层小室内, 37℃放置 4~5 h, 吸去上层析出液体; 细胞胰酶消化, 计数, 离心; 取 1 × 10⁵ 细胞重悬于 100 μl 无血清 DMEM, 加入每个小室上层, 下层加入含 10% 胎牛血清 DMEM, 5% CO₂、37℃培养 12 h; 棉签轻轻擦去小室上层细胞, PBS 清洗; 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 清洗; 30% 甲醇固定 5 min, PBS 清洗; 结晶紫染色 10 min, PBS 清洗; 37℃烘箱烘干, 摄片。高倍镜下随机取 5 个视野, 计数。

1.4.3 裸鼠体内成瘤及转移模型 细胞消化、计数、离心, 按每 1 × 10⁶ 细胞重悬于 20 μl 无血清 DMEM; 裸鼠用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉; 取左肋缘下切口进腹, 暴露肝左叶; 20 μl 细胞悬液注射于肝左叶包膜下, 消毒棉签压迫止血(其中 14 只接种 SMMC-7721 uPAR+ 细胞, 另 14 只接种 uPAR- 细胞); 间断缝合切口。SPF 洁净环境饲养; 分别于 4 周、8 周处死接种了 SMMC-7721 uPAR+ 细胞及 uPAR- 细胞的裸鼠各 7 只, 观察肿瘤肝内转移情况(除肝左叶外, 其余肝叶有转移灶视为肝内转移); 取肝脏及肿瘤组织作连续冰冻切片, HE 染色镜检。

1.5 统计学方法

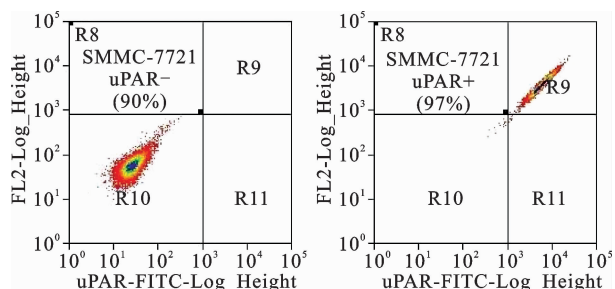
用 SPSS13.0 统计软件进行分析。uPAR+ 组和 uPAR- 组体外侵袭能力统计结果的比较采用 *t* 检验, 两组在裸鼠体内成瘤及肝内转移结果的比较采用 χ^2 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SMMC-7721 中 uPAR+ 组与 uPAR- 组体外侵袭迁移能力的差别

通过流式细胞技术从肝癌细胞株 SMMC-7721 进行 uPAR 蛋白分选, 分选出的 uPAR+ 组和 uPAR- 组的纯度分别为 90% 和 97%, 见图 1。随后两组进行体外 Boyden 小室侵袭实验, 12 h 后的结果显示, uPAR+ 组透过基膜的细胞数较 uPAR- 组明显增多, 两组相比差异有统计学意义(P < 0.01), 见图 2。

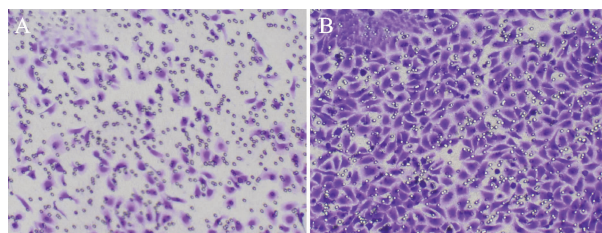
2.2 SMMC-7721 中 uPAR+ 组与 uPAR- 组体内



uPAR: urokinase-type plasminogen activator receptor

图 1 SMMC-7721 经过流式细胞技术分选结果

Figure 1 The purity of uPAR+ group and uPAR- group separated from SMMC-7721 were 90% and 97% respectively



A: SMMC-7721 uPAR-; B: SMMC-7721 uPAR+

图 2 SMMC-7721 uPAR+ 组和 uPAR- 组体外侵袭能力的比较(结晶紫 × 200)

Figure 2 Comparison of invasion ability *in vitro* of SMMC-7721 uPAR+ group and SMMC-7721 uPAR- group(CV × 200)

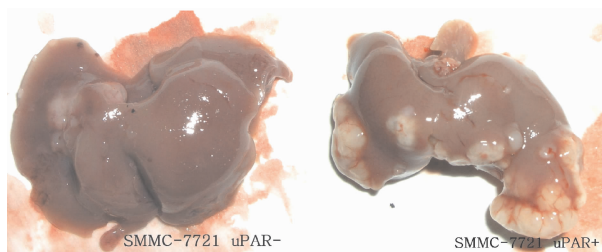


图 3 SMMC-7721 uPAR+ 组和 uPAR- 组体内侵袭转移能力的比较(接种 8 周后)

Figure 3 Comparison of invasion and metastasis ability *in vivo* of SMMC-7721 uPAR+ group and SMMC-7721 uPAR- group(8 weeks after inoculated)

侵袭转移能力的差别

裸鼠肝内成瘤和转移实验显示, 两组在肝内均能成瘤。虽然两组肝癌细胞接种后 4 周时发生肝内转移的差别不大, uPAR+ 组 7 只裸鼠有 1 只发生肝内转移, uPAR- 组 7 只中均未发生肝内转移; 但 8 周后, uPAR+ 组发生肝内转移非常严重, 且 uPAR+ 组发生肝内转移的裸鼠数量较 uPAR- 组多, uPAR+ 组 7 只裸鼠有 6 只发生肝内转移, 转移数目为 5.2 ± 3.4 个, 部分转移癌融合成团, uPAR- 组 7 只中均未发生肝内转移, 两组相比差异有统计学意义(P < 0.05), 见图 3, 表 1。肝脏接种部位形成的肿瘤及转移瘤均通过病理学检查证实为 SMMC-7721 形成的肝癌, 其中 uPAR+ 组有 2 只出现胆管癌栓、4 只出现门脉癌栓, 而 uPAR- 组均无胆管或门脉癌栓, 两组相比差异有统计学意义(P < 0.05), 见表 1。

表 1 uPAR+组和 uPAR-组裸鼠肝内侵袭转移情况比较
Table 1 Comparison of invasion and metastasis in nude mice liver of uPAR+ group and uPAR- group

Group	n	Metastasis	Metastasis	Bile duct thrombus(n)	Portal vein thrombus(n)
		number of the mice	number of the tumor		
uPAR+	7	6*	5.2±3.4*	2*	4*
uPAR-	7	0	0	0	0

Note: * ;there was significant difference between the uPAR + and uPAR- group, $P < 0.05$

3 讨论

肿瘤的侵袭转移机制非常复杂,其中肿瘤通过对细胞外基质的降解,使肿瘤细胞脱离原发生长部位,再经过各种途径的转运,向血液循环输入大量恶性细胞,导致肿瘤不断侵袭生长和转移,uPA 及 uPAR 在这一侵袭转移过程中起了重要作用^[3]。瘤细胞高表达 uPAR 可增强瘤细胞对转移部位微环境的耐受性,有助于肿瘤进展^[4]。

术后复发和转移是一直影响肝细胞癌疗效的主要障碍^[5]。虽然肝癌复发与肿瘤数目、血管侵犯、肿瘤大小、肿瘤分化、AFP、性别、肝硬变程度等多种因素相关^[6],但肝癌的生物学特征才是真正决定肝癌复发和转移的关键因素^[7-8]。而 uPAR 的表达与肝癌的分化程度、包膜侵犯、血管侵犯、肝内与淋巴结转移等恶性生物学行为密切相关^[2,9]。通过 uPAR 表达对肝癌细胞株体外及体内侵袭转移能力影响的研究能更直接了解 uPAR 在肝癌侵袭转移中的作用。

本研究 Boyden 小室侵袭实验采用的 Matrigel 胶是一种可溶性的基底膜基质,与哺乳动物的细胞外基质相似。通过对穿过 Matrigel 胶及滤膜的细胞进行计数来评价肿瘤细胞的侵袭迁移能力,能间接反映肿瘤细胞在体内的侵袭转移能力。

我们先通过流式细胞分选技术从肝癌细胞株 SMMC-7721 中分选出 uPAR+ 组和 uPAR- 组,其纯度分别达 90% 和 97%,说明分选的纯度很高。随后两组进行 Boyden 小室侵袭实验显示,uPAR+ 组较 uPAR- 组表现出更强的体外侵袭迁移能力 ($P < 0.01$),说明 uPAR+ 组较 uPAR- 组在细胞外基质中的水解、穿透基质的能力及迁移扩散能力更强,更易浸润转移。

为了进一步印证 uPAR 的表达对肝癌细胞体内侵袭转移能力的影响,我们将 uPAR+ 肝癌细胞株组和 uPAR- 肝癌细胞株组在裸鼠体内进行成瘤及转移实验,8 周后发现肝癌细胞株 SMMC-7721 中的 uPAR+ 组较 uPAR- 组有着更强的肝内转移能力、并易发生门脉及胆管癌栓 ($P < 0.01$),说明 uPAR 的表达增强了肝癌细胞在体内的侵袭转移能力,这一结果与体外试验是一致的。肝癌细胞株本身分泌的 uPA 和 uPAR 结合发生的作用可能是肝癌细胞株体外侵袭能力增强的重要原因。

上述体外及体内试验直接证明了 uPAR 的表达在肝癌细胞体外及体内侵袭转移能力方面有着重要

作用,uPAR 的表达赋予了肝癌细胞株强大的侵袭转移能力。有研究发现通过 c-Myc 下调上皮细胞株 uPAR 的表达后,其迁移侵袭能力会下降^[10]。

还有研究发现 uPAR 单克隆抗体不但在体外可抑制结肠癌细胞增殖,使迁移癌细胞数量明显减少,而且可抑制结肠癌动物肝脏移植癌的生长^[11]。通过拮抗 uPAR 来治疗肿瘤的复发和转移已是当前肿瘤治疗研究的热点之一^[12-13]。uPAR 的表达对肝癌细胞体外侵袭转移能力的重要影响表明,拮抗 uPAR 可能将成为拮抗肝癌侵袭与转移的重要靶标之一。

参考文献:

- [1] Feng MY, Liao QJ, Su Q. Advance in research on uPAR and tumor[J]. Guo Ji Bing Li Ke Xue Yu Lin Chuang Za Zhi, 2011, 31(1): 49-53. [冯梅燕, 廖前进, 苏琦. uPAR 与肿瘤的研究新进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2011, 31(1): 49-53.]
- [2] Dubuisson L, Monvoisin A, Nielsen BS, et al. Expression and cellular localization of the urokinase-type plasminogen activator and its receptor in human hepatocellular carcinoma[J]. J Pathol, 2000, 190(2): 190-5.
- [3] Fan WK. Fundamentals of modern oncology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 51-161. [范维珂. 现代肿瘤学基础[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 51-161.]
- [4] D'ello V, Singh S, Wu Y, et al. The urokinase plasminogen activator receptor promotes efferocytosis of apoptotic cells[J]. J Biol Chem, 2009, 284(25): 17030-8.
- [5] Fan J, Wang Z. Advancements in the surgical treatment of hepatocellular carcinoma[J]. Shi Yong Yi Yuan Lin Chuang Za Zhi, 2011, 8(1): 16-9. [樊嘉, 王征. 肝癌外科治疗的进展[J]. 实用医院临床杂志, 2011, 8(1): 16-9.]
- [6] Cai RY, Huang ZY, Liang BY, et al. Influencing factors and prognosis of tumor recurrence after radical resection of primary hepatocellular carcinoma[J]. Zhonghua Xiao Hua Wai Ke Za Zhi, 2011, 10(4): 263-6. [蔡荣耀, 黄志勇, 梁宾勇, 等. 原发性肝癌癌根治术后肿瘤复发的影响因素及预后[J]. 中华消化外科杂志, 2011, 10(4): 263-6.]
- [7] Fan J, Shi YH. New perspectives on recurrence and metastasis of liver cancer[J]. Zhonghua Xiao Hua Wai Ke Za Zhi, 2010, 9(1): 10-1. [樊嘉, 史颖弘. 肝癌复发和转移的新理念[J]. 中华消化外科杂志, 2010, 9(1): 10-1.]
- [8] Tang ZY, Ye SL, Liu YK, et al. A decade's studies on metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2004, 130(4): 187-96.
- [9] Liu SH, Li DC. Expression of uPAR in HCC and the relationship between uPAR and the clinical pathological factors of HCC[J]. Zhongguo Xian Dai Yi Xue Za Zhi, 2012, 22(3): 47-50. [刘双海, 李德春. uPAR 在肝癌中的表达及其与肝癌临床病理因素的关系[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(3): 47-50.]
- [10] Alfano D, Votta G, Schulze A, et al. Modulation of cellular migration and survival by c-Myc through the downregulation of urokinase (uPA) and uPA receptor[J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(7): 1838-51.
- [11] Van Buren G, Gray MJ, Dallas NA, et al. Targeting the urokinase plasminogen activator receptor with a monoclonal antibody impairs the growth of human colorectal cancer in the liver[J]. Cancer, 2009, 115(14): 3360-8.
- [12] Hildenbrand R, Allgayer H, Marx A, et al. Modulators of the urokinase-type plasminogen activation system for cancer[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2010, 19(5): 641-52.
- [13] Smith HW, Mashall CJ. Regulation of cell signalling by uPAR[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, 11(1): 23-36.

[编辑: 刘红武; 校对: 邱颖慧]