

## 技术与方法

# 利用TNF- $\alpha$ 诱导建立结肠癌细胞 HCT116体外侵袭模型

由振源 陈丹扬 刘楚琪 袁慧敏 王红胜 杜 军\*

(中山大学药学院微生物与生化药理学实验室, 广州 510006)

**摘要** 该研究利用TNF- $\alpha$ 诱导建立肿瘤细胞体外侵袭模型, 为进一步的研究提供基础。利用20 ng/mL TNF- $\alpha$ 刺激结肠癌细胞HCT116 7 d后, 使用流式细胞术检测HCT116细胞的CCR7和CXCR4受体表达量的变化, 并利用Transwell小室检测TNF- $\alpha$ 刺激对CCL21、SDF-1介导的细胞迁移与侵袭能力的影响。实验结果显示, 20 ng/mL TNF- $\alpha$ 刺激7 d后的HCT116细胞的CCR7和CXCR4表达量均显著增加, 侵袭能力也增强, 且使CCL21、SDF-1介导的细胞迁移与侵袭能力显著增强。结果说明了本实验利用TNF- $\alpha$ 诱导HCT116细胞, 成功建立了HCT116的体外侵袭模型, 为接下来的研究提供了细胞模型基础, 也为进一步的药物筛选提供了基础。

**关键词** TNF- $\alpha$ ; CCR7; CXCR4; 侵袭模型

结肠癌在全球女性中是第二大常见癌症, 男性中是第三大常见癌症, 多发于发达国家<sup>[1]</sup>。虽然随着医学的发展, 手术治疗的治愈率有所提高, 但肿瘤的侵袭与转移仍是导致结肠癌患者死亡的最主要原因<sup>[2]</sup>, 因此在细胞水平上模拟建立结肠癌细胞侵袭转移的模型, 对于探究肿瘤侵袭转移能力的机理, 筛选抑制肿瘤细胞侵袭转移能力的抗癌药物具有重要意义。

近年来研究发现, 结肠癌患者自身分泌的TNF- $\alpha$ 增多, 且与结肠癌细胞侵袭转移能力的增强呈正相关<sup>[3]</sup>。此外, 用低剂量的TNF- $\alpha$ 刺激多种肿瘤细胞, 如肾脏上皮癌细胞<sup>[4]</sup>、胰腺癌细胞<sup>[5]</sup>, 均能够明显促进细胞发生侵袭转移。以上研究结果表明, 利用TNF- $\alpha$ 可能诱导建立结肠癌细胞HCT116体外侵袭转移模型。

研究表明, 在结肠癌中趋化因子受体CCR7<sup>[6-7]</sup>和CXCR4<sup>[8]</sup>的过表达与细胞的侵袭和转移能力的增强有密切的关系<sup>[9]</sup>, 可以用作判断结肠癌肿瘤细胞侵袭和转移情况的检测指标<sup>[10]</sup>。而趋化因子受体CCR7与其配体CCL21<sup>[11]</sup>、受体CXCR4与其配体SDF-1<sup>[12]</sup>的结合则是促进结肠癌肿瘤细胞侵袭和转移到特定部位过程中的一个更为重要的因素。趋化

因子受体及其配体的结合, 进一步增强肿瘤细胞的迁移能力<sup>[13]</sup>, 亦可作为一项判断肿瘤细胞侵袭转移能力的重要指标。

本研究采用人结肠癌细胞HCT116为研究对象, 以低剂量的TNF- $\alpha$ 刺激后的细胞形态学变化、趋化因子受体CCR7和CXCR4表达量变化以及CCL21和SDF-1的诱导作用为指标, 判断细胞侵袭能力的变化, 从而探讨利用TNF- $\alpha$ 诱导建立结肠癌细胞HCT116体外侵袭模型的可能性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与主要仪器

HCT116细胞株(购自上海细胞库), RPMI-1640培养基、FBS(购自Gibco公司), 青霉素-链霉素双抗液(购自Beyotime公司), TNF- $\alpha$ (购自Protech公司), Transwell小室(直径6.5 mm, 孔径8  $\mu$ m, 购自Costar公司), 苏木素(购自南京建成科技有限公司), CCR7抗

收稿日期: 2012-07-06 接受日期: 2012-08-03

国家重点基础研究发展计划(973计划)(No.2011CB9358003)、国家大学生创新性实验计划(No.101055836)和国家自然科学基金(No.30873032)资助项目

\*通讯作者。Tel: 020-39943022, Fax: 020-39943022, E-mail: dujun@mail.sysu.edu.cn

体、CXCR4抗体(购自BD公司), 其余试剂均为国产分析纯。Beckman EPICS XL流式细胞仪。

## 1.2 细胞培养

购得HCT116细胞, 由本实验室传代保存。细胞在37 °C、5% CO<sub>2</sub>条件下, 置于含有10%胎牛血清、含青霉素-链霉素双抗液(1:100)的RPMI-1640培养基中培养, 取处于对数生长期, 状态良好的细胞用于实验。

## 1.3 TNF- $\alpha$ 刺激7 d后, 形态变化观察

取处于对数生长期的HCT116细胞, 铺至6孔板(5% FBS), 接种密度为 $2 \times 10^4$ /mL, 第2 d换液并加入20 ng/mL的TNF- $\alpha$ 刺激, 连续作用7 d。

## 1.4 流式细胞术检测CCR7和CXCR4受体变化

用TNF- $\alpha$  20 ng/mL连续刺激HCT116细胞7 d后, 将细胞用0.25%胰酶消化成单细胞悬液于EP管中, 用PBS洗一遍, 1 000 r/min离心4 min, 弃上清, 加入100  $\mu$ L PBS, 打匀, 留一管作对照, 其余加10  $\mu$ L CCR7抗体, 迅速打匀后, 避光静置30 min, 加入500  $\mu$ L PBS, 1 000 r/min离心4 min, 弃上清, 加入500  $\mu$ L PBS, 打匀, 以不加TNF- $\alpha$ 的细胞作为对照, 用流式细胞仪检测细胞CCR7受体的表达量的变化。CXCR4受体的表达量依同样方法测定。

## 1.5 Transwell小室检测HCT116侵袭能力的变化

**1.5.1 CCL21对HCT116侵袭能力的影响** 在Transwell的下室中加入适量培养基, 浸泡过膜, 放入细胞培养箱中过夜活化, 空白组细胞和用TNF- $\alpha$ 刺激7 d组细胞无血清培养24 h后, 制备成密度为 $5 \times 10^5$ /mL的细胞悬液, 并加至Transwell上室(100  $\mu$ L), 下室加入CCL21重组蛋白 70 ng/mL, 含有3% FBS培养基600  $\mu$ L; 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>条件下孵育3 h, 取出Transwell上室, 用4%多聚甲醛固定细胞, 苏木素染色, 于显微镜下随机选取5个视野(200 $\times$ ), 计Transwell膜背面细胞数, 用平均值进行统计, 分析细胞的趋化活性的变化。

**1.5.2 SDF-1对HCT116侵袭能力的影响** 如1.5.1步骤, 空白组细胞和用TNF- $\alpha$ 刺激7 d组细胞无血清培养24 h, 制备成密度为 $5 \times 10^5$ /mL的细胞悬液, 并加至Transwell上室(100  $\mu$ L), 下室加入SDF-1重组蛋白80 ng/mL, 含有3% FBS培养基600  $\mu$ L; 37 °C、5% CO<sub>2</sub>条件下孵育3 h, 取出Transwell上室, 用4%多聚甲醛固定细胞, 苏木素染色, 于显微镜下随机选取5个视野(200 $\times$ ), 计Transwell膜背面细胞数, 用平均

值进行统计, 分析细胞的趋化活性的变化。

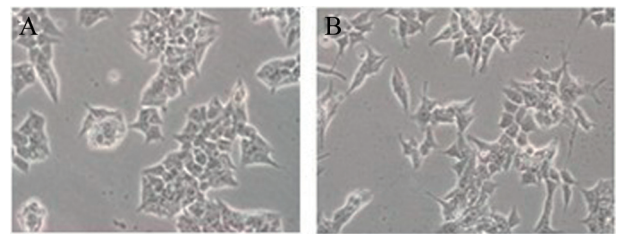
## 1.6 统计学处理

使用SPSS 13.0软件进行数据统计分析, 数据均用mean $\pm$ S.D.表示。样本均数间进行*t*检验。 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。其余数据用Excel 2007软件进行分析。

## 2 结果

### 2.1 TNF- $\alpha$ 刺激后细胞侵袭能力增强

低剂量TNF- $\alpha$ (20 ng/mL)连续刺激HCT116细胞7 d后, 细胞形态间质化明显, 即由不规则多边形转变为长梭形(图1)。



A: HCT116细胞; B: 20 ng/mL TNF- $\alpha$ 刺激7 d后的HCT116细胞。

A: HCT116 cells; B: HCT116 cells stimulated by 20 ng/mL TNF- $\alpha$  for 7 days.

图1 20 ng/mL TNF- $\alpha$ 刺激7 d后HCT116形态的变化

Fig.1 The change of HCT116 morphology after stimulated by 20 ng/mL TNF- $\alpha$  for 7 days

### 2.2 TNF- $\alpha$ 上调HCT116中CCR7和CXCR4受体的表达

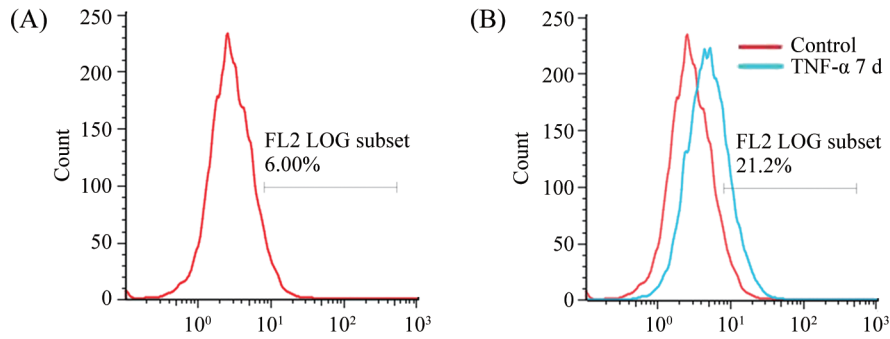
**2.2.1 CCR7受体流式检测** 如图2所示, 在低浓度TNF- $\alpha$ (20 ng/mL)刺激7 d后, HCT116细胞的CCR7受体表达密度较空白组提高了15.2%。

**2.2.2 CXCR4受体流式检测** 如图3所示, 在低浓度TNF- $\alpha$ (20 ng/mL)刺激7 d后, HCT116细胞的CXCR4受体表达密度较空白组提高了20.3%。

### 2.3 TNF- $\alpha$ 促进CCL21、SDF-1介导的HCT116迁移与侵袭的作用

**2.3.1 TNF- $\alpha$ 促进CCL21介导的迁移与侵袭的作用** 为了进一步证实TNF- $\alpha$ 可增强结肠癌细胞HCT116的迁移能力, 采用Transwell小室实验。其结果如图4所示, 20 ng/mL的TNF- $\alpha$ 刺激7 d后, CCL21诱导HCT116细胞迁移及侵袭能力明显增强。

**2.3.2 TNF- $\alpha$ 促进SDF-1介导的迁移与侵袭的作用影响** 如图5所示, Transwell小室的结果显示,

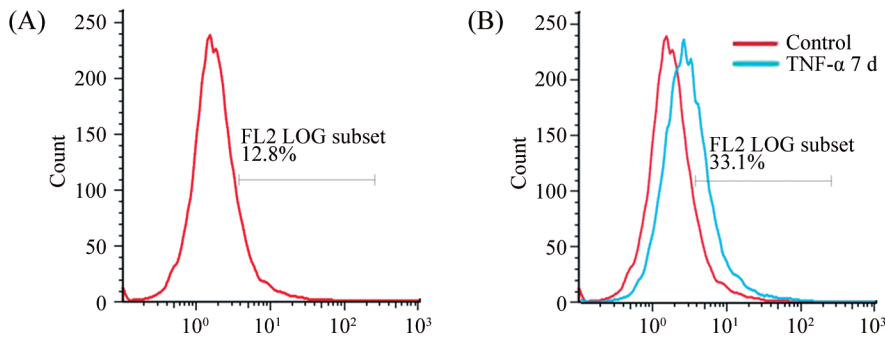


A: 空白对照组; B: 20 ng/mL TNF- $\alpha$  刺激7 d的HCT116细胞与空白对照组的比较。

A: control; B: comparison of HCT116 stimulated by 20 ng/mL TNF- $\alpha$  for 7 days with control.

图2 流式细胞术检测CCR7在TNF- $\alpha$ 刺激7 d后的HCT116细胞的表达

Fig.2 The expression of CCR7 receptors detected by flow cytometry for 7 days

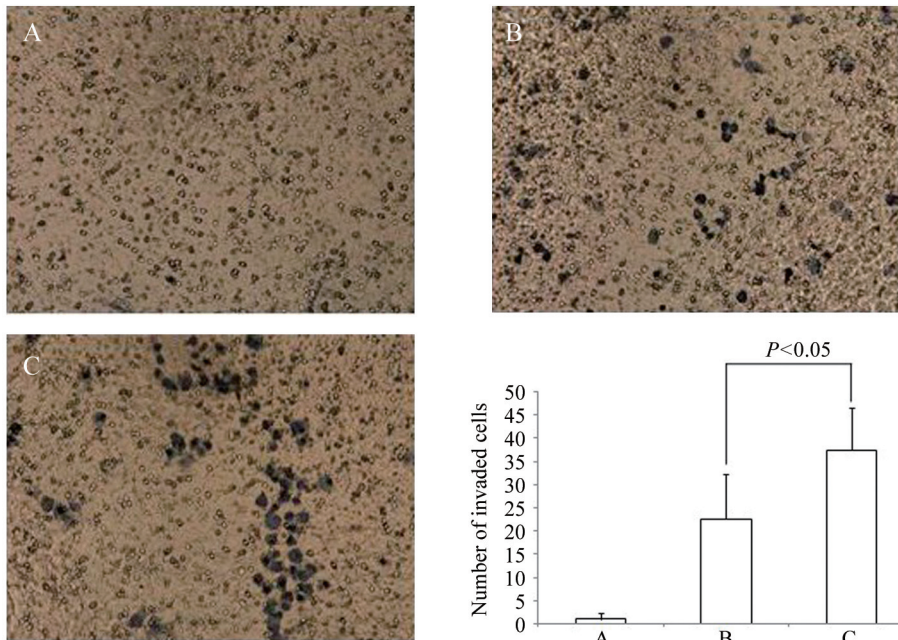


A: 空白对照组; B: 20 ng/mL TNF- $\alpha$  刺激7 d的HCT116细胞与空白对照组的比较。

A: control; B: comparison of HCT116 stimulated by 20 ng/mL TNF- $\alpha$  for 7 days with control.

图3 流式细胞术检测CXCR4在TNF- $\alpha$ 刺激7 d后的HCT116细胞的表达

Fig.3 The expression of CXCR4 receptors detected by flow cytometry for 7 days

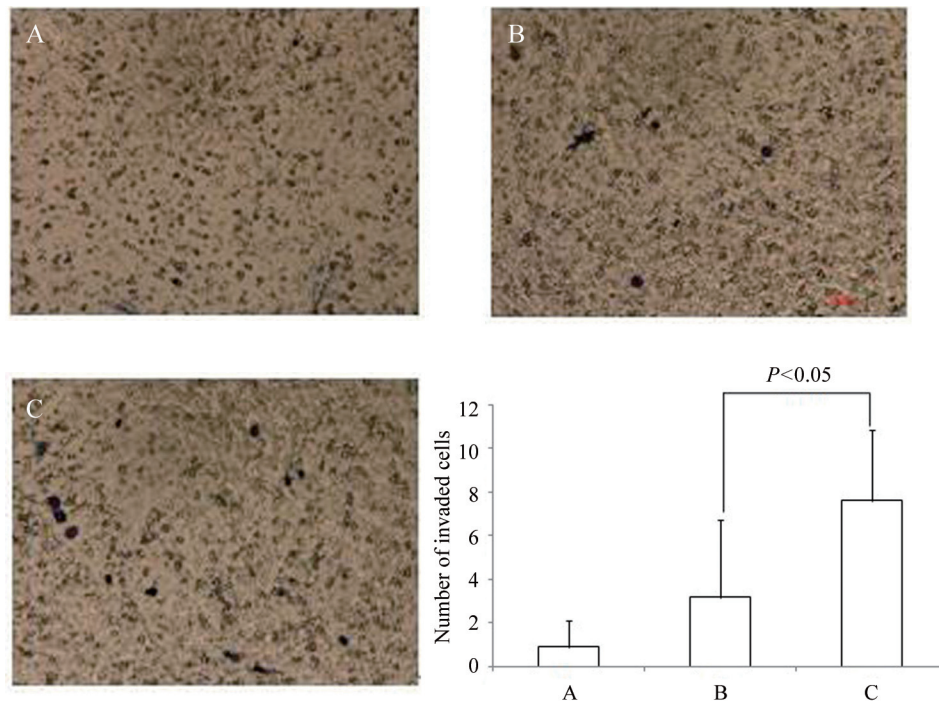


A: 空白细胞, 下室未加趋化因子刺激; B: 空白细胞, 下室加CCL21刺激; C: TNF- $\alpha$ 刺激7 d, 下室加CCL21刺激。

A: HCT116 cells without any stimulation; B: HCT116 cells stimulated by CCL21 in lower chamber; C: HCT116 cells stimulated by TNF- $\alpha$  for 7 days then stimulated by CCL21 in lower chamber.

图4 CCL21增强HCT116细胞迁移能力

Fig.4 CCL21 facilitates the invasiveness and migration of HCT116



A: 空白细胞, 下室未加趋化因子刺激; B: 空白细胞, 下室加SDF-1刺激; C: TNF- $\alpha$ 刺激7 d, 下室加SDF-1刺激。

A: HCT116 cells without any stimulation; B: HCT116 cells stimulated by SDF-1 in lower chamber; C: HCT116 cells stimulated by TNF- $\alpha$  for 7 days then stimulated by SDF-1 in lower chamber.

图5 SDF-1增强HCT116细胞迁移能力

Fig.5 SDF-1 facilitates the invasiveness and migration of HCT116

20 ng/mL的TNF- $\alpha$ 刺激7 d后, SDF-1诱导HCT116细胞迁移及侵袭能力明显增强。

### 3 讨论

TNF- $\alpha$ 是由单核巨噬细胞、内皮细胞产生的一种多功能细胞因子, 在正常情况下, 具有抗肿瘤、抗感染等作用。但如果持续释放或外源过多的加入, 就会产生广泛的病理效应。研究表明, 高浓度TNF- $\alpha$ 能诱导肿瘤细胞凋亡, 具有免疫调节等多种生物学功能, 并对肿瘤细胞有细胞毒作用, 而低浓度TNF- $\alpha$ 可以诱导肿瘤细胞发生侵袭行为<sup>[14]</sup>, 并且近年研究发现TNF- $\alpha$ 在多种恶性肿瘤患者血清中显著升高, 与肿瘤的发生、进展及预后有一定关系<sup>[15-19]</sup>。结肠癌患者的TNF- $\alpha$  mRNA表达量比正常者高, 自身分泌的TNF- $\alpha$ 增多, 刺激细胞内相关分子的活化, 进而促进结肠癌细胞发生侵袭转移<sup>[3]</sup>。在本研究中, 我们利用20 ng/mL TNF- $\alpha$ 连续刺激HCT116细胞7 d, 成功建立了结肠癌细胞体外侵袭模型, 为进一步研究肿瘤细胞转移的机制、筛选抗肿瘤药物奠定了基础。

研究表明, 恶性肿瘤倾向于特异性地转移到某些组织器官, 而趋化因子及其受体的特异性表达是其中一个重要的因素<sup>[20]</sup>。已有研究表明, CCR7与CXCR4的表达与肿瘤细胞的转移有着密切的关系<sup>[8]</sup>。在本研究中, 我们利用流式细胞术可以检测到在TNF- $\alpha$ 的刺激下, 受体CCR7及CXCR4的表达密度明显增加, 但其产生的机制尚不清楚。

CCL21和SDF-1分别是CCR7和CXCR4的配体, Transwell小室实验结果显示了分别在CCL21、SDF-1的介导下, HCT116细胞的穿膜能力明显增强, 且TNF- $\alpha$ 刺激后的细胞在CCL21及SDF-1的作用下穿膜能力进一步增强。此外, 本研究结果也提示了在TNF- $\alpha$ 诱导的肿瘤细胞迁移与侵袭过程中, CCR7/CCL21及CXCR4/SDF-1生物轴可能发挥了重要作用。

本研究结果显示在TNF- $\alpha$ 刺激下, 结肠癌细胞HCT116的CXCR4和CCR7受体的表达量增加, 细胞的侵袭能力增强, 可以由此建立结肠癌细胞HCT116体外侵袭模型。虽然所建的模型存在一定的局限性, 比如TNF- $\alpha$ 作为体外细胞刺激因子诱导的EMT未能完全模拟肿瘤在体内EMT发生的过程, 而且利用其

他细胞因子如TGF- $\beta$ 等也可以诱导肿瘤细胞EMT的发生,然而本研究建立的TNF- $\alpha$ 诱导肿瘤细胞EMT模型具备如下优点:(1)刺激条件较简单,即在细胞正常生长的条件下,用低剂量的TNF- $\alpha$ 刺激;(2)建模时间较短,在TNF- $\alpha$ 诱导7 d就可以明显地观察到变化,效果明显,有较高的可重复性。因此,利用其探讨肿瘤转移的分子机制简单方便,且可以将该肿瘤细胞体外侵袭模型广泛地应用于药物的筛选。

### 参考文献 (References)

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
- Bates RC, Mercurio AM. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression. *Cancer Biol Ther* 2005; 4(4): 365-70.
- Bates RC, Mercurio AM. Tumor necrosis factor-alpha stimulates the epithelial-to-mesenchymal transition of human colonic organoids. *Mol Biol Cell* 2003; 14(5): 1790-800.
- Wu ST, Sun GH, Hsu CY, Huang CS, Wu YH, Wang HH, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha induces epithelial-mesenchymal transition of renal cell carcinoma cells via a nuclear factor kappa B-independent mechanism. *Exp Biol Med* 2011; 236(9): 1022-9.
- Maier HJ, Schmidt-Strassburger U, Huber MA, Wiedemann EM, Beug H, Wirth T. NF-kappaB promotes epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Lett* 2010; 295(2): 214-28.
- Yu S, Duan J, Zhou Z, Pang Q, Wuyang J, Liu T, *et al.* A critical role of CCR7 in invasiveness and metastasis of SW620 colon cancer cell *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Biol Ther* 2008; 7(7): 1037-43.
- Gunther K, Leier J, Henning G, Dimmler A, Weissbach R, Hohenberger W, *et al.* Prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma by expression of chemokine receptor CCR7. *Int J Cancer* 2005; 116(5): 726-33.
- Wang SC, Lin JK, Wang HS, Yang SH, Li AF, Chang SC. Nuclear expression of CXCR4 is associated with advanced colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2010; 25(10): 1185-91.
- Schimanski CC, Schwald S, Simiantonaki N, Jayasinghe C, Gohner U, Wilsberg V, *et al.* Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(5): 1743-50.
- 姜文营, 张建良, 纪志鹏, 傅勤焯, 周勇, 丁印鲁. 趋化因子受体CCR7及CXCR4在结肠癌组织中的表达及意义. *中国现代普通外科进展*(Jiang Wenying, Zhang Jianliang, Ji Zhipeng, Fu Qinye, Zhou Yong, Ding Yinlu. Expression of chemokine receptor CCR7 and CXCR4 in human colorectal carcinoma and its significance. *Chin J Curr Adv Gen Surg*) 2009; 12(7): 561-4.
- Sun RH, Wang GB, Li J, Cui J. Role of CCL21/CCR7 in invasion of colorectal carcinoma cell line SW480. *Ai Zheng* 2009; 28(7): 708-13.
- Wang L, Li CL, Wang L, Yu WB, Yin HP, Zhang GY, *et al.* Influence of CXCR4/SDF-1 axis on E-cadherin/beta-catenin complex expression in HT29 colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 2011; 17(5): 625-32.
- 杨润祥, 马飞, 张灿珍. 趋化因子及其受体在肿瘤转移中的作用. *中国医学文摘·肿瘤学*(Yang Runxiang, Ma Fei, Zhang Chanzhen. *Journal of Chinese Medical Abstracts·Oncology*) 2006; 20(1): 60-3.
- Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR. Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. *Eur J Cancer* 2006; 42(6): 745-50.
- Ariapart P, Bergstedt-Lindqvist S, van Harmelen V, Permert J, Wang F, Lundkvist I. Resection of pancreatic cancer normalizes the preoperative increase of tumor necrosis factor alpha gene expression. *Pancreatology* 2002; 2(5): 491-4.
- Friess H, Guo XZ, Nan BC, Kleeff J, Büchler MW. Growth factors and cytokines in pancreatic carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 880: 110-21.
- 马洪, 宋宇峰, 杨建斌, 冯红超. 肿瘤坏死因子- $\alpha$ 在口腔鳞癌中的表达及临床意义. *实用口腔医学杂志*(Ma Hong, Song Yufeng, Yang Jianbin, Feng Hongchao. *Journal of Practical Stomatology*) 2007; 23(1): 75-7.
- 贾友鹏, 巩鹏, 王忠裕, 单显民. TNF- $\alpha$ 及其受体I在胆管癌和先天性胆总管胰囊性扩张症中的表达及意义. *中国普通外科杂志*(Jia Youpeng, Gong Peng, Wang Zhongyu, Shan Xianmin. *Chinese Journal of General Surgery*) 2007; 16(2): 180-2.
- 曹杰, 陈孝平. 核因子-KappaB与肿瘤坏死因子 $\alpha$  mRNA在肝细胞癌中的表达及意义. *中国普通外科杂志*(Cao Jie, Chen Xiaoping. *Activation of nuclear factor-kB and expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA in hepatocellular carcinoma. Chinese Journal of General Surgery*) 2007; 16(3): 232-5.
- Wang J, Wang J, Sun Y, Song W, Nor JE, Wang CY, *et al.* Diverse signaling pathways through the SDF-1/CXCR4 chemokine axis in prostate cancer cell lines leads to altered patterns of cytokine secretion and angiogenesis. *Cell Signal* 2005; 17(12): 1578-92.

## Establish An *in vitro* HCT116 Human Colon Cancer Cell Invasion Model by TNF- $\alpha$

You Zhenyuan, Chen Danyang, Liu Chuqi, Yuan Huimin, Wang Hongsheng, Du Jun\*

(Department of Microbial and Biochemical Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences,  
Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract** This research focused on establishing an *in vitro* HCT116 cells invasion model for drug screening. In this study, HCT116 human colon cancer cells were treated by 20 ng/mL TNF- $\alpha$  for 7 days, then the expression of CCR7 and CXCR4 receptors were detected by flow cytometry. The cell invasion ability of CCL21 and SDF-1 was further evaluated by transwell chamber. After stimulated by 20 ng/mL TNF- $\alpha$  for 7 days, the expression of CCR7 and CXCR4 increased significantly which facilitated the migration of HCT116. Furthermore, the CCL21 and SDF-1 could enhance the cell invasiveness. The results of this study demonstrate that the invasiveness of HCT116 can be enhanced by TNF- $\alpha$ , so that it can be used to establish an invasion model *in vitro* for drug screening.

**Key words** TNF- $\alpha$ ; CCR7; CXCR4; invasion model

Received: July 6, 2012 Accepted: August 3, 2012

This work is supported by National Basic Research Program of China (973 Program, No.2011CB9358003), the National University Student Innovation Program (No.101055836) and the National Natural Science Foundation of China (No.30873032)

\*Corresponding author. Tel: 86-20-39943022, Fax: 86-20-39943022, E-mail: dujun@mail.sysu.edu.cn

### 勘误声明

2012年34卷第7期704页第4行原文“lncDNA”, 应为“lncRNA”, 特此更正。

2012年34卷第8期800页图8应为:

