

小胶质细胞培养上清液对鼻咽癌细胞迁移和侵袭能力的影响

陈朋¹, 刘睿¹, 骆翔¹, 喻志源¹, 王伟¹, 陈雪²

摘要 目的:研究未活化和活化态人小胶质细胞系 CHME-5 培养上清液对鼻咽癌细胞 CNE-2 迁移、侵袭能力的影响。**方法**:采用 1 μg/mL LPS 活化人小胶质细胞系 CHME-5,收集未活化和 LPS 活化的 CHME-5 培养上清液。分为对照组(无血清培养基)、45%上清组、90%上清组、LPS 组(LPS 干预的小胶质细胞上清)、45% LPS 上清组、90%LPS 上清组。使用划痕实验和 Transwell 小室建立鼻咽癌细胞 CNE-2 的迁移模型,观察不同浓度的未活化/活化小胶质细胞培养上清液对鼻咽癌细胞迁移能力的影响;使用 Transwell 小室建立鼻咽癌细胞 CNE-2 的侵袭模型,用结晶紫染色观察不同浓度的未活化/活化小胶质细胞培养上清液对鼻咽癌细胞侵袭能力的影响。**结果**:低浓度(45%)和高浓度(90%)未活化/活化的小胶质细胞培养上清液均促进鼻咽癌细胞迁移和侵袭。**结论**:无论小胶质细胞是否活化,其培养上清液均促进鼻咽癌细胞的迁移和侵袭。

关键词 人小胶质细胞;鼻咽癌细胞;迁移;侵袭

中图分类号 R741;R766 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2020.03.001

陈朋, 刘睿, 骆翔, 等. 小胶质细胞培养上清液对鼻咽癌细胞迁移和侵袭能力的影响[J]. 神经损伤与功能重建, 2020, 15(3): 125-128.

Effect of Microglia Cell Supernatant on Migration and Invasion of Nasopharyngeal Carcinoma Cells CHEN Peng¹, LIU Rui¹, LUO Xiang¹, YU Zhi-yuan¹, WANG Wei¹, CHEN Xue². 1. Department of Neurology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China. 2. Department of Neurology, Wuhan Children's Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430000, China

Abstract Objective: To study the effect of unactivated/activated human microglia cell line CHME-5 on the migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2. **Methods:** Human microglia cell line CHME-5 was cultured, and 1 μg/mL LPS was used to activate cells. Unactivated/activated cell supernatant was collected. For the experiment, we established 6 groups: control group, 45% supernatant group, 90% supernatant group, LPS group (LPS activated microglia supernatant), 45% LPS supernatant group, and 90% LPS supernatant group. The wound healing assay and Transwell inserts were used to establish the nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2 migration model, and the effect of unactivated/activated microglia supernatant on the migration of the cell was observed. Transwell inserts were used to establish the nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2 invasion model, and crystal violet staining was used to observe the effect of microglia supernatant on the migration of the cell. **Results:** Low (45%) and high (90%) concentrations of unactivated/activated microglia supernatant promoted the migration and invasion of nasopharyngeal cancer cells. **Conclusion:** Both unactivated and activated microglia supernatant promote the migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells.

Key words microglia; nasopharyngeal carcinoma; migration; invasion

研究发现,10%~25%的颅外恶性肿瘤容易发生脑转移,最常发生脑转移的肿瘤是肺癌、乳腺癌和黑色素瘤^[1-4]。鼻咽癌是最常见的头颈部肿瘤,在世界上的分布具有种族和地域性。在东南亚地区、中国的南部、地中海地区以及中东地区比较流行^[5,6]。鼻咽癌虽然位于鼻咽部,临近大脑,但是很少通过血行发生脑转移。笔者认为,有某种机制介导这两种类型的肿瘤脑转移发生的区别,明确这种机制对于肿瘤脑转移的预防和治疗起到很重要的作用。

研究表明,巨噬细胞同肺癌细胞共培

养,可以增加肺癌细胞的侵袭能力。小胶质细胞是中枢神经系统最重要的免疫细胞,被认为是中枢神经系统的巨噬细胞,并且具有很多单核细胞的特点,包括免疫系统经典信号通路的活化^[7,8]。实验发现,小胶质细胞可通过主动转运或形成通路,主动参与乳腺癌细胞在大脑的侵袭和种植。免疫细胞如周围系统巨噬细胞、中枢神经系统小胶质细胞在肿瘤发展过程中起双刃剑的作用:它们主要起破坏恶性细胞的作用,然而也可释放一系列促进肿瘤生长的因子^[9,10]。小胶质细胞在肿瘤脑转移的作用尚不清楚。本实验利用

作者单位

1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科

武汉 430030

2. 华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院神经内科

武汉 430016

基金项目

国家自然科学基金(No.81771341);湖北省自然科学基金(No.2017CFB705)

收稿日期

2019-12-28

通讯作者

陈雪

1436729061@qq.com

肿瘤细胞体外迁移和侵袭模型,观察未活化/活化的小胶质细胞上清对鼻咽癌细胞迁移和侵袭的影响,为进一步研究肿瘤脑转移的机制提供铺垫。

1 材料与方法

1.1 材料

人小胶质细胞 CHME-5 细胞系、鼻咽癌细胞 CNE-2 细胞系均购自中国典型培养物保藏中心。DMEM/高糖培养基、PBS 缓冲液、胰蛋白酶购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清购自美国 GIBCO 公司;LPS、DMSO、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)、BSA 甘油和多聚赖氨酸购自美国 Sigma 公司;兔抗 Iba1 购自美国 Wako 公司;Cy3 标记的羊抗兔 IgG 购自美国 Jackson 公司。Triton X-100 购自武汉谷歌生物科技有限公司;8 μm Transwell 小室、2 mL 细胞冻存管、细胞培养瓶和无菌离心管购自美国 Corning 公司;10 cm 细胞培养皿购自美国 ThermoFisher 公司;Matrigel 购自美国 BD 公司;结晶紫购自碧云天生物科技有限公司;人肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) ELISA 试剂盒购自北京达科为生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞的传代培养及小胶质细胞 CHME-5 细胞上清液的提取 CHME-5 细胞和 CNE-2 细胞用含 20%胎牛血清的 DMEM/高糖培养基培养,当细胞达到 95%融合时用 0.25%的胰酶消化细胞,进行细胞传代。1:3~1:5 比例传至新的培养瓶中。CHME-5 细胞上清液的提取:①将 CHME-5 细胞接种于 10 cm 细胞培养皿中培养至细胞融合 95%;②弃掉原培养基,PBS 液清洗 2 遍,加入 3 mL 无血清培养基或 3 mL 含 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 的无血清培养基;③继续培养 1 h、3 h、6 h、12 h,收集细胞上清,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心,1 200 rpm,5 min;④分装上清,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存;使用时,加入无血清培养基分别稀释至 45%和 90%浓度,进行干预实验。

1.2.2 CHME-5 细胞的免疫组化鉴定 调整 CHME-5 细胞悬液中细胞密度为 $3.5 \times 10^5/\text{mL}$,接种于多聚赖氨酸(0.1 mg/mL)包被过的 12 孔板中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱进行培养,24 h 后将 12 孔板中的细胞爬片取出用 PBS 漂洗两次,然后 100%甲醇室温下固定 15 min;PBS 漂洗两次,洗去固定液;将爬片浸于 0.2%Triton-PBS 液中破膜 15 min;封闭液(10%BSA-PBS)封闭 1 h;兔抗 Iba1 (1:200)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;Cy3 标记的羊抗兔 IgG (1:500)室温下孵育 1 h,用 DAPI 标记细胞核。

1.2.3 ELISA 法测定小胶质细胞上清液中 TNF- α 含量 ELISA 法测定 TNF- α 严格按照试剂盒说明书进行。终止反应 10 min 内用 620 nm 参考波长、450 nm 检测波长检测各孔吸光度值。绘制标准曲线,通过标准曲线得到相应的 TNF- α 浓度。

1.2.4 肿瘤细胞迁移实验 提前 24 h 给 CNE-2 细胞换液,换为无血清培养基;0.25%胰酶消化,完全培养基终止消化,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 200 rpm 离心 5 min;无血清培养基重悬沉淀,计数,细胞数为 $2.5 \times 10^5/\text{mL}$;接种到 24 孔板 Transwell 小室上室中,每组加入细胞悬液 20 μL ,同时根据分组加入不同的培养基:对照组给予 180 μL 无血清培养基,45%上清组给予 90 μL 无血清培养基+90 μL 小胶质细胞上清,90%上清组给予 180 μL 小胶质细胞上清,LPS 组给予 180 μL LPS 活化的小胶质细胞上清,45%LPS 上清组给予 90 μL 无血清培养基+90 μL LPS 活化的小胶质细胞上清,90%LPS 上清组给予 180 μL LPS 活化的小胶质细胞上清;24 孔板 Transwell 小室下室中加入完全培养基 500 μL ;14~18 h 后,弃掉培养基,加入 4%多聚甲醛室温固定 30 min;PBS 清洗 2 遍,加入结晶紫染液,染色 30 min;PBS 清洗 2 遍,用棉签擦掉上室细胞,倒置相差显微镜下观察拍照,Image Pro Plus 软件技术分析结果。

1.2.5 肿瘤细胞侵袭实验 提前 24 h 给 CNE-2 细胞换液,换为无血清培养基;24 孔板 Transwell 小室上室加入 60 μL 稀释过的 Matrigel(使用时按 1:8 比例用无血清培养基稀释),37 $^{\circ}\text{C}$,放置 30 min;细胞的接种分组处理同肿瘤细胞迁移实验;24 孔板 Transwell 小室下室中加入完全培养基 500 μL ;24 h 后,弃掉培养基,加入 4%多聚甲醛室温固定 30 min;PBS 清洗 2 遍,加入结晶紫染液,染色 30 min;PBS 清洗 2 遍,用棉签擦掉上室细胞,倒置相差显微镜下观察拍照,Image Pro Plus 软件计数分析。

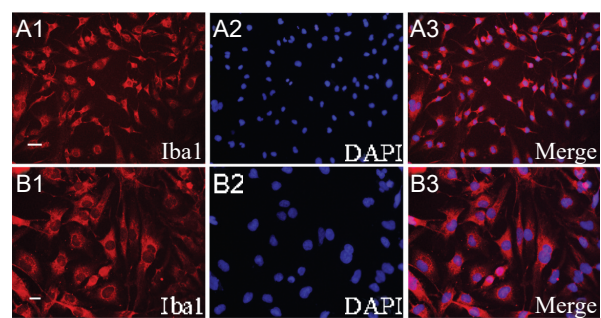
1.3 统计学处理

应用 SPSS 16.0 软件包分析数据,计量资料以(均值 $\pm$ 标准差)表示,单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人小胶质细胞系 CHME-5 免疫组化鉴定

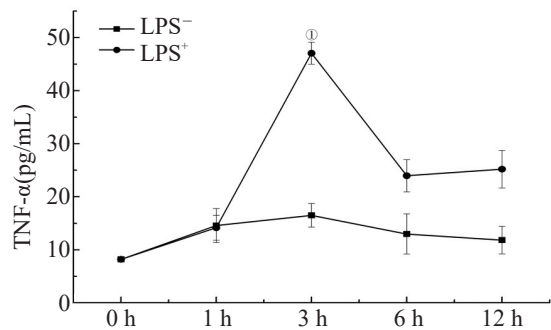
CHME-5 在传代培养 24 h 后,细胞完全贴壁,贴壁细胞的突起随着培养时间增加明显增多延长。将 CHME-5 细胞进行 Iba1 免疫荧光染色,发现传代培养的 CHME-5 细胞表达小胶质细胞特异性抗原 Iba1 (图 1)。



注:CHME-5 细胞 100%表达小胶质细胞特异性抗原 Iba1。
A1、B1:红色为 Iba1 阳性,A2、B2:蓝色为 DAPI 染色的细胞核,
A3、B3:Iba1 和 DAPI 双标的结果
图1 培养的CHME-5细胞的免疫组化鉴定(Iba1 免疫荧光染色,标尺=20 μm)

2.2 ELISA 检测小胶质细胞CHME-5上清液中TNF-α的含量

小胶质细胞CHME-5上清液的ELISA检测结果显示,在LPS诱导3 h时,与对照组相比,上清液中TNF-α的量显著增加($P<0.01$)。3 h无LPS和LPS刺激的上清组中TNF-α分别为(16.50 ± 2.23)pg/mL 和(47.06 ± 2.07)pg/mL。因此,笔者在接下来的实验中使用LPS诱导3 h后的小胶质细胞CHME-5上清液来干预鼻咽癌细胞(图2)。



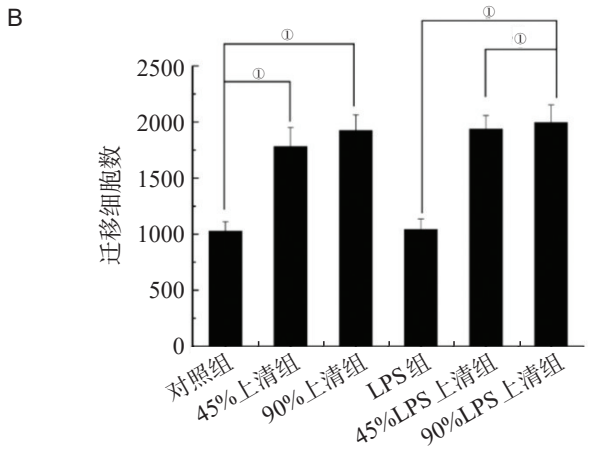
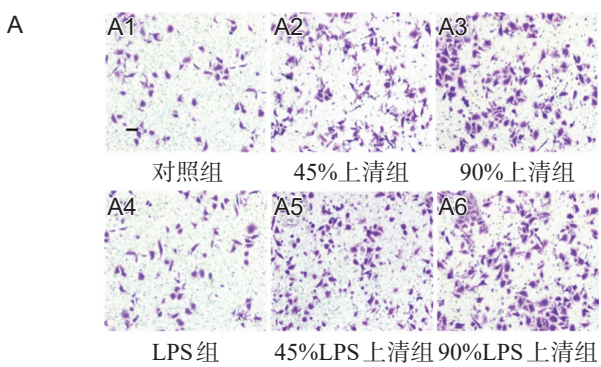
注:① $P<0.01$
图2 ELISA 检测不同时间点各组小胶质细胞CHME-5上清液中TNF-α的含量

2.3 小胶质细胞CHME-5培养上清液对鼻咽癌细胞CNE-2迁移的影响

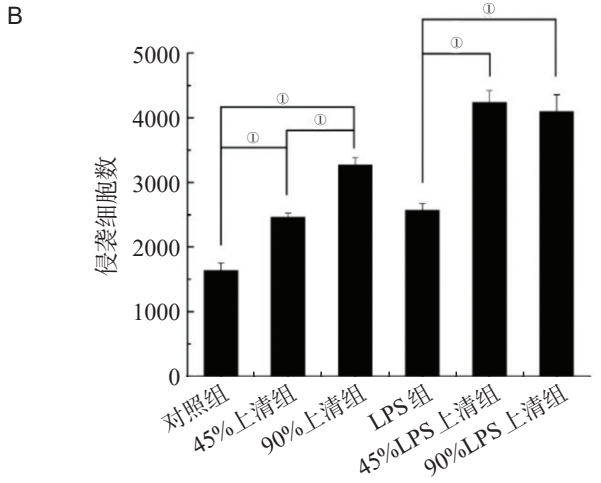
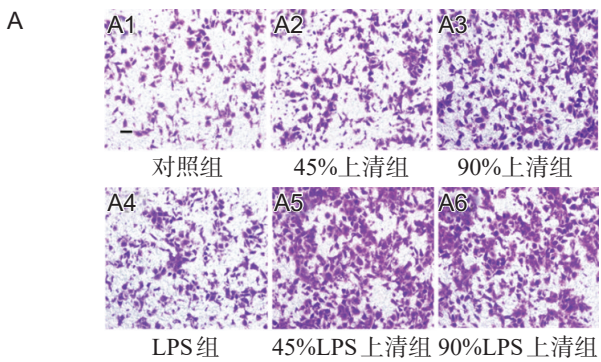
与对照组相比,1 μg/mL 的LPS对鼻咽癌细胞CNE-2的迁移作用无影响;LPS活化的小胶质细胞CHME-5上清和未活化的小胶质细胞CHME-5上清都显著促进鼻咽癌细胞CNE-2的迁移($P<0.01$,图3)。

2.4 小胶质细胞CHME-5培养上清液对鼻咽癌细胞CNE-2侵袭的影响

与对照组相比,LPS活化的小胶质细胞上清和未活化的小胶质细胞上清都显著促进鼻咽癌细胞的侵袭能力,LPS活化的小胶质细胞上清促进鼻咽癌细胞侵袭的作用更明显($P<0.01$,图4)。



注:A:各组迁移细胞结晶紫染色($\times200$,标尺=50 μm);B:各组迁移细胞数目统计,① $P<0.01$ ($n=5$)
图3 小胶质细胞培养上清对鼻咽癌细胞CNE-2迁移能力的影响



注:A:各组代表性侵袭细胞结晶紫染色图片($\times200$,标尺=50 μm);B:各组侵袭细胞数目统计,① $P<0.01$ ($n=5$)
图4 小胶质细胞培养上清对鼻咽癌细胞CNE-2侵袭能力的影响

3 讨论

鼻咽癌易发生淋巴转移,且有发生血行播散的高度倾向,由于其位于鼻咽部,所以易直接侵袭颅骨^[1],但是很少有鼻咽癌通过血行转移到大脑实质的报道。这表明在鼻咽癌细胞通过血行发生脑转移过程中肯定有某种抑制机制。由于有血脑屏障的存在,大脑中的微环境不同于外界器官。小胶质细胞是大脑最重要的免疫细胞,参与宿主针对外来生物的免疫反应。基于此,本研究探讨小胶质细胞对鼻咽癌细胞在发生远处播散的前提条件:侵袭和迁移能力的影响。

肿瘤细胞和巨噬细胞共培养,可明显增加肿瘤细胞的侵袭能力^[12,13]。研究表明小胶质细胞对于肿瘤的作用很有争议,他们既可以破坏恶性细胞;还可以释放肿瘤生长的必须因子促进肿瘤进展。小胶质细胞的不同作用可能是由于其各种分泌因子的相对量不同引起的。体外研究表明不同浓度的LPS活化的小胶质细胞上清对肺癌细胞有不同的作用,低浓度(10%)甚至可以起到营养作用,高浓度导致肺癌细胞凋亡^[10]。本研究设置两个不同的小胶质细胞上清的浓度:45%和90%,观察不同浓度、不同活化状态的小胶质细胞上清对于鼻咽癌细胞侵袭和迁移能力的影响。

LPS是已确定的小胶质细胞活化因子,广泛应用于小胶质细胞的活化和炎症相关研究。本研究利用LPS干预小胶质细胞,发现干预后3 h时小胶质细胞分泌的TNF- α 水平显著增高。用未活化或LPS诱导活化的小胶质细胞上清干预鼻咽癌细胞,初步发现无论是未活化还是LPS活化的小胶质细胞上清都促进鼻咽癌细胞的迁移和侵袭,表明小胶质细胞对鼻咽癌细胞有促转移作用。相较于Transwell迁移实验,侵袭实验是在其基础上在小室膜上多铺了一层基质胶。基质胶的主要成分是层粘连蛋白、IV型胶原、硫酸乙酰肝素蛋白多糖等^[14,15]。细胞通过Transwell小孔之前,必须分泌能分解基质胶的物质,比如基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)家族。MMP家族是锌依赖蛋白酶参与组织损伤和修复,分解细胞外基质的多种成分,包括层粘连蛋白、纤连蛋白和IV型胶原,这些都是基底膜的成分,参与血脑屏障的组成^[16,17]。本研究结果中,LPS活化的小胶质细胞上清对肿瘤的侵袭作用强

于未活化的小胶质细胞上清,有可能是小胶质细胞上清液中的高浓度TNF- α 诱导鼻咽癌细胞对MMP的分泌增加,从而影响鼻咽癌细胞穿透基质胶的能力,但其机制仍有待深入探讨。

本研究结果显示小胶质细胞上清对鼻咽癌细胞有促转移作用。所以,可能存在其它的鼻咽癌细胞脑转移抑制机制,如小胶质细胞对鼻咽癌细胞的毒性作用、鼻咽癌细胞在通过血脑屏障中被阻断,脑内的微环境不适合鼻咽癌细胞的转移生长等,需进一步研究。

参考文献

- [1] Lorgier M. Tumor microenvironment in the brain[J]. Cancers (Basel), 2012, 4: 218-243.
- [2] Al-Shamy G, Sawaya R. Management of brain metastases: the indispensable role of surgery[J]. J Neurooncol, 2009, 92: 275-282.
- [3] Gavrilovic IT, Posner JB. Brain metastases: epidemiology and pathophysiology[J]. J Neurooncol, 2005, 75: 5-14.
- [4] Doglioni G, Parik S, Fendt SM. Interactions in the (Pre)metastatic Niche Support Metastasis Formation[J]. Front Oncol, 2019, 9: 219.
- [5] Lo KW, To KF, Huang DP. Focus on nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Cell. 2004, 5: 423-428.
- [6] Mahdavi N, Towhidi F, Makhsofi BR, et al. Incidence and Mortality of Nasopharynx Cancer and Its Relationship With Human Development Index in the World in 2012[J]. World J Oncol, 2016, 7: 109-118.
- [7] Cowan M, Petri WA Jr. Microglia: Immune Regulators of Neurodevelopment[J]. Front Immunol, 2018, 9: 2576.
- [8] Graeber MB, Streit WJ. Microglia: biology and pathology[J]. Acta Neuropathol, 2010, 119: 89-105.
- [9] Raza M, Prasad P, Gupta P, et al. Perspectives on the role of brain cellular players in cancer-associated brain metastasis: translational approach to understand molecular mechanism of tumor progression[J]. Cancer Metastasis Rev, 2018, 37: 791-804.
- [10] He BP, Wang JJ, Zhang X, et al. Differential reactions of microglia to brain metastasis of lung cancer[J]. Mol Med, 2006, 12: 161-170.
- [11] Shen C, Ying H, Lu X, et al. Nasopharyngeal carcinoma with central nervous system metastases: Two case reports and a review of the literature [J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96: e9175.
- [12] Chen JJ, Lin YC, Yao PL, et al. Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression[J]. J Clin Oncol, 2005, 23: 953-964.
- [13] Quail DF, Joyce JA. The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors[J]. Cancer Cell, 2017, 31: 326-341.
- [14] Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, et al. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma[J]. Biochemistry, 1982, 21: 6188-6193.
- [15] Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, et al. Basement membrane complexes with biological activity[J]. Biochemistry, 1986, 25: 312-318.
- [16] Moretti RM, Montagnani MM, Mai S, et al. Gonadotropin-releasing hormone agonists suppress melanoma cell motility and invasiveness through the inhibition of $\alpha 3$ integrin and MMP-2 expression and activity[J]. Int J Oncol, 2008, 33: 405-413.
- [17] Rivera S. Metalloproteinases in nervous system function and pathology: introduction[J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76: 3051-3053.

(本文编辑:王晶)