

麻醉深度并将病人的学流动学和气道压波动维持在稳定范围,同时也能合理术中全麻药物的使用,减少不必要麻醉药的使用,改善病人的预后^[9]。

综上所述,深度肌松对机器人辅助下腹腔镜前列腺癌根治术能够降低术中和术后的风险,促进病人早期康复。

参考文献

- [1] KIM MS, BAI SJ, LEE JR, et al. Increase in intracranial pressure during carbon dioxide pneumoperitoneum with steep trendelenburg positioning proven by ultrasonographic measurement of optic nerve sheath diameter[J]. J Endourol, 2014, 28(7): 801-806.
- [2] 潘孝华, 颜士杰, 李绪清, 等. “达芬奇”机器人手术系统行妇科手术11例临床观察[J]. 安徽医药, 2015, 19(11): 2139-2141.
- [3] BRUINJES MH, VAN HELDEN EV, BRAAT AE, et al. Deep neuromuscular block to optimize surgical space conditions during laparoscopic surgery: a systematic review and meta-analysis[J].

Br J Anaesth, 2017, 118(6): 834-842.

- [4] 陈苑, 严敏, 孙建良, 等. 深度肌松和轻度肌松对短小妇科腹腔镜手术条件的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2017, 37(1): 77-80.
- [5] KING M, SUJIRATTANAWIMOL N, DANIELSON DR, et al. Requirements for muscle relaxants during radical retropubic prostatectomy[J]. Anesthesiology, 2000, 93(6): 1392-1397.
- [6] MADSEN MV, STAEHR-RYE AK, CLAUDIUS C, et al. Is deep neuromuscular blockade beneficial in laparoscopic surgery? Yes probably[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2016, 60(6): 710-716.
- [7] KOPMAN AF, NAGUIB M. Laparoscopic surgery and muscle relaxants: is deep block helpful?[J]. Anesth Analg, 2015, 120(1): 51-58.
- [8] KILIC OF, BÖRGERS A, KÖHNE W, et al. Effects of steep Trendelenburg position for robotic-assisted prostatectomies on intra- and extrathoracic airways in patients with or without chronic obstructive pulmonary disease[J]. Br J Anaesth, 2015, 114(1): 70-76.
- [9] 郝利娜, 陈珂, 鲁显福, 等. 脑电双频指数联合肌松监测在机器人辅助腹腔镜前列腺癌根治术老年患者中的应用[J]. 临床麻醉学杂志, 2017, 33(3): 248-251.

(收稿日期: 2018-08-05, 修回日期: 2018-10-13)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.09.017

◇临床医学◇

不同区域氧浓度在结肠癌细胞上皮间质转换-间质上皮转换过程中的作用

雷星¹, 陈熹², 赵琳³, 单涛²

作者单位:¹延安大学附属医院普外科, 陕西 延安 716000; ²西安交通大学第二附属医院普外科, 陕西 西安 710004; ³第四军医大学西京医院心脏外科, 陕西 西安 710032

通信作者: 单涛, 男, 副主任医师, 硕士生导师, 研究方向为消化道肿瘤诊治, E-mail: chenxijiaoda 163.com

基金项目: 陕西省教育厅基金资助项目(15JK1818)

摘要:目的 探讨原发灶(低氧)及归巢部位(常氧或轻度高氧)氧浓度差异在上皮间质转换(EMT)-间质上皮转换(MET)过程的作用。方法 首先用差异氧浓度培养肿瘤细胞, 以光镜、激光共聚焦显微镜观察肿瘤细胞形态变化。Transwell小室和划痕实验分别检测结肠癌细胞侵袭能力及迁移能力。RT-PCR检测钙黏附蛋白E(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)表达量情况。结果 低氧环境下结COLO 205细胞较常氧及轻度高氧组明显发生EMT转换, 降低E-cadherin表达, 增强Vimentin表达; 并相应伴随迁移、侵袭能力升高。结论 原发灶(低氧)及归巢部位(常氧或轻度高氧)的氧浓度差异是介导EMT-MET过程的重要因素。

关键词: 上皮间质转换; 间质上皮转换; 细胞低氧; 结肠癌; 钙黏附蛋白E; 波形蛋白

Epithelial to mesenchymal transition – mesenchymal to epithelial transition in colon cancer cells mediated by oxygen concentration in different regions

LEI Xing¹, CHEN Xi², ZHAO Lin³, SHAN Tao²

Author Affiliations: ¹Department of General Surgery, Yan'an University Affiliated Hospital, Yan'an, Shaanxi 716000, China; ²Department of General Surgery, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710004, China; ³Department of Cardiology, Xijing Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China

Abstract: Objective The mechanisms of differences in oxygen concentrations of primary sites (hypoxic) and homing sites (normoxic or hyperoxic) by which primary sites (hypoxic) and homing sites (normoxic or hyperoxic) participate in epithelial to mesenchymal transition (EMT) and mesenchymal to epithelial transition (MET) conversion were evaluated. **Methods** Colon cancer cells were grown under different oxygen conditions, and cell morphology were examined by laser confocal microscopy and light microscopy. Transwell chambers were used to examine tumor invasiveness, and scratch assays were performed to examine cell migration. Reverse transcription-PCR was used to quantitate mRNA expression of E-cadherin, vimentin. **Results** Under hypoxic conditions, COLO 205 cells showed increased partial EMT, reduced E-cadherin expression, and increased vimentin expression, increased migration and invasiveness. **Conclusion** Differences in oxygen concentrations of primary sites (hypoxic) and homing sites (normoxic or hyperoxic) are important in the EMT-MET process.

Key words: Epithelial to mesenchymal transition; Mesenchymal to epithelial transition; Cell hypoxia; Colon cancer; E-cadherin; Vimentin

结肠癌是世界范围内常见的恶性肿瘤,它的发病率呈现逐年上升趋势,重要特征是明显的转移倾向,转移机制的研究能够为其提供治疗新思路^[1]。肿瘤的转移是指肿瘤细胞从原发灶迁移到远处并形成新病灶的过程。其主要步骤分为^[2]:局部浸润、血管内渗、循环转运、血管外渗、定植灶形成。这其中可逆的转变过程上皮间质转换(EMT)扮演了重要角色^[3]。发生EMT的肿瘤细胞在形成转移灶后,又表现出与原来病灶肿瘤类似的结构^[4]。据此Thiery^[3]提出肿瘤转移二阶理论,该理论认为肿瘤的浸润和循环播散需要EMT过程,而循环肿瘤细胞要经过其逆过程间质上皮转换(MET)来形成转移灶。可惜的目前EMT-MET时空调控具体机制不明确,无法为肿瘤的治疗提供新思路^[5]。

生物学实验中标准的细胞培养条件下,培养细胞所用的氧分压与空气氧分压相同,为160 mmHg,而生物体内的氧分压却远远低于大气中氧分压,例如脑中为24 mmHg,肺中为110 mmHg,肝中为24 mmHg,心脏中为25 mmHg,脾中为66 mmHg,肾中为25 mmHg,微环境缺氧更是实体肿瘤显著特征^[6-7]。高氧或低氧是指细胞可利用氧的增多或减少,或环境氧分压高于或低于临界值的状态。现有的研究说明缺氧通过HIF-1 α 信号通路介导肿瘤细胞发生EMT并促进转移;而高压氧可直接抑制乳腺癌和神经胶质瘤的生长,这提示习惯于低氧环境的肿瘤细胞,肿瘤短时间内无法适应高氧环境,导致其生物学的变化^[8]。Apostolou等^[9]研究显示,高压氧可改变乳腺癌细胞的可塑性,使其由EMT向MET转变进而降低肿瘤侵袭性。提示氧环境可赋予肿瘤细胞间质上皮可塑性,而这一作用是否可用来解释肿瘤二次转移复原机制还未见报道。为此本研究自2016年1月至2017年1月在体外模拟原发灶低氧环境,归巢部位常氧或适度高氧环境,运用激光共聚焦、荧光定量逆转录-聚合酶链反应(qRT-

PCR)等方法,观察不同氧浓度下肿瘤细胞EMT、MET形态变化,探索结肠癌发生转移机制,为治疗研究提供新依据。

1 材料与方法

1.1 材料 RIPA裂解溶液盒购于碧云天集团。二甲基亚砜(DMSO)购置于美国Sigma集团。DMEM培养溶液和牛胎血清购于美国HyClone集团。Transwell小室购于美国Millipore集团。基质凝胶和One-StepRT-PCR试剂盒购自美国BD集团。钙黏附蛋白E(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)和肌动蛋白(β -actin)抗体购于SantaCruz生物科技集团。

1.2 细胞培养及处理 人结肠癌细胞COLO205购于美国ATCC细胞库。细胞培养于含100 ml/L胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素的DMEM培养基。细胞培养到80%融合时给予干预,分为低氧组(氧浓度5%);常氧组(氧浓度21%);轻度高氧组(氧浓度30%)。常氧组置于普通CO₂培养箱中培养,低氧及高氧组则置于自制培养器皿中(10 cm $\times$ 15 cm $\times$ 25 cm),通入含有5%、30%O₂或5%CO₂的混合气体。培养2 d后培养基更换为3 mL无血清基础培养基,置于普通CO₂培养箱培养1 d后收集细胞,进行下一步试验。

1.3 免疫荧光 细胞培养后常规铺片,滴加0.01 mol/L, pH7.4的PBS,浸润已知抗原标本片10 min弃去。滴加适当稀释的抗体标本,覆盖已知抗原标本玻片,置于有盖搪瓷盒内,37 $^{\circ}$ C保温30 min。玻片用0.01 mol/L, pH7.4的PBS冲洗1~2次,然后按顺序过0.01 mol/L, pH7.4的PBS三缸浸泡,每缸5 min,同时给予充分振荡。用滤纸吸去水分,滴加适当稀释的荧光标记的抗人球蛋白抗体,盖搪瓷盒内37 $^{\circ}$ C保温保持30 min。覆盖盖玻片,荧光显微镜下观察。

1.4 细胞迁移实验 使用划痕实验检测中细胞的迁移能力。24孔板内接种1 $\times$ 10⁵细胞,细胞长至90%时,用无菌枪头于单层细胞上划出“—”字划

痕, PBS 冲洗 3 遍, 培养 24 h, ImageProPlus5.0 观察及照相。实验重复 3 次。

1.5 细胞侵袭实验 使用 Transwell 小室检测肿瘤细胞的侵袭能力。小室聚碳酸酯膜上铺 100 μ L 1:10 稀释并 4 $^{\circ}$ C 预冷的基质胶(用 DMEM 稀释至 5 mg/mL), 把铺好胶的小室放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 4 h 使基质胶凝固并在聚碳酸酯膜上形成一层连续的薄膜。正常培养的结肠癌细胞并混匀于含 0.1% 胎牛血清白蛋白。混匀的细胞均匀种于小室中的上室, 500 μ L 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基加入小室中的下室做趋化因子。37 $^{\circ}$ C 下培养 24 h, 聚碳酸酯膜取出, 用棉签轻擦去基质胶及上室的细胞, 下室的细胞 4% 多聚甲醛固定后结晶紫染色。100 倍显微镜下计数 5 个随机视野内的细胞总数, 实验重复 3 次。

1.6 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR) 用 TRIzol 试剂提取 COLO205 细胞总 RNA。2 μ g RNA 用 RevertAidkit 合成第一条 cDNA 链。PCR 引物设计: E-cadherin 上游引物: 5'-CAATGGTGTCCATGTGAA-CA-3', 下游引物: 5'-CCTCCTACCCTCTGTTCG-3'; vimentin 上游引物: 5'-CGCTTCGCCAACTACAT-3', 下游引物: 5'-AGGGCATCCACTTCACAG-3'; β -actin 上游引物: 5'-ATCGTGCGTGACATTAAGGAGA-AG-3', 下游引物: 5'-AGGAAGGAAGGCTG-GAAGAGTG-3'。PCR 反应条件: 首先 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min, 再进行 35 个以下循环: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 35 s。最终 72 $^{\circ}$ C 5 min。管家基因 β -actin 用作内参照。PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后于紫外光下观察。

1.7 统计学方法 每个实验重复 3 次以上。SPSS13.0 进行统计学分析, 采用 one-way ANOVA 方差分析法分析数据, 首先利用 Levene 方法进行方差齐性检验, 确定方差齐性且整体比较组间差异有统计学意义后进一步作多重比较, 多重比较采用 LSD 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同氧浓度下结肠癌 EMT、MET 变化 为了检测低氧是否对肿瘤细胞发生 EMT 具有促进作用, 我们利用光镜观察癌细胞形态显示: 低氧干预后结肠癌细胞形态明显由圆形变成纺锤形或长梭形, 排列方式较杂乱、无方向性, 放射状外观(图 1)。激光共聚焦检测实验评估 COLO205 细胞荧光强度。结果显示: 低氧组结肠癌细胞 Vimentin 荧光强度高于常氧组和高氧组, 而 E-cadherin 荧光强度低于常氧/高氧组(图 1)。提示低氧能够增强结肠癌

细胞 EMT 变化, 而常氧/高氧可反转 EMT 向 MET 转化。

2.2 氧浓度对结肠癌细胞的迁移能力影响 为了明确低氧是否通过诱导结肠癌细胞发生 EMT 转变来增强结肠癌细胞的迁移, 我们使用划痕实验检测低氧对结肠癌细胞迁移能力的影响。细胞处理 48 h 后, 常氧/高氧诱导的 COLO205 细胞较低氧组显示出减弱的迁移能力(图 2)。这说明低氧诱导结肠癌细胞发生 EMT 转变后, 可以相应地增强肿瘤细胞迁移能力, 而常氧/高氧反转 EMT 后相应地降低其迁移能力。

2.3 氧浓度对结肠癌细胞的侵袭能力影响 我们利用 transwell 实验检测来研究低氧诱导结肠癌细胞发生 EMT 转变后是否对结肠癌细胞的侵袭的能力有影响。其结果显示, 低氧组细胞穿过薄膜的数目较常氧/高氧组明显增多(图 3)。提示低氧诱导结肠癌细胞发生 EMT 可以相应增强肿瘤细胞侵袭能力, 而常氧/高氧反转 EMT 相应降低其侵袭能力。

3 讨论

EMT 在肿瘤转移中提高细胞迁移及侵袭能力, 助其突破基膜, 并促进血管内渗帮助其进入循环, 形成 CTCs^[10-11]。肿瘤细胞发生 EMT, 不但促进 CTCs 产生, 还可帮助 CTCs 存活, 为 CTCs 通过 MET 形成肿瘤转移灶打下基础^[12]。目前 EMT-MET 时空调控的确切机制尚不明确。在此研究中我们证实肿瘤原发处低氧微环境可调控细胞 EMT 发生, 上调 Vimentin 表达, 下调 E-cadherin 表达, 并且增强侵袭能力, 而常氧/高氧环境下则发生相反的现象。此结果证实我们的假说, 即已习惯乏营养环境下生存的肿瘤细胞进入归巢富氧微环境后, 失去低氧诱导, 迫使肿瘤细胞发生 EMT-MET 转换, 形成新的转移灶, 一旦肿瘤在空间上生长到一定体积后, 又建立新的乏氧微环境, 再次形成新的恶性循环, 以此方式不停的促进肿瘤进展。

实体肿瘤局部微环境最显著的特点是缺氧。已经证实结肠癌中存在明显的缺氧状态, 其缺氧程度甚至比其他实体肿瘤更严重。这种缺氧环境与肿瘤侵袭特征密切相关^[13]。低氧的肿瘤微环境下肿瘤细胞的生物学行为更趋向恶性, 更具侵袭性, 并治疗的表现强抵抗性。在缺氧可以影响肿瘤细胞的上皮间质可塑性, 诱导 EMT 发生^[14]。Cano 等^[15]通过体内外实验证实缺氧通过 HIF-1 α 上调 Slug 的表达, 诱导 EMT 从而增强肿瘤细胞侵袭转移能力。我们的研究结果和上述结果一致, 也再次证

实了此结论。在此基础上本次试验继续在富氧环境下观察到MET现象,这是本研究闪光点。提示氧浓度的差异在肿瘤转移的不同阶段,EMT和MET之间转换具有重要作用。这种原发灶低氧环境和归巢部位富氧环境的差异有可能是EMT-MET转换的新视角。更深入的机制研究仍需进一步验证。

在肿瘤转移播散的过程中,EMT可赋予肿瘤细胞新特性,这主要包括增加细胞迁移和侵袭能力,使其突破基膜,并通过促进血管内渗帮助肿瘤细胞播散进入循环,形成CTCs。Thiery^[16]等发生EMT的细胞与未发生EMT的细胞均可以形成肿瘤,但只有前者侵入相邻组织和血管,提示癌细胞发生EMT是产生CTCs的必要条件。播散到远处CTCs适应周围基质环境后,还会再经历一个MET转换,重新获得增殖特性,进而形成肿瘤转移灶^[17]。目前研究这种可逆并且瞬时的EMT-MET转换将是一个重要科研方向。作为一个新的研究领域,无疑有大量未知问题亟待解决。显然,深入研究CTCs-EMT产生和转化的机制及其生物学意义必将有助于揭开肿瘤发生、发展和转移之谜,并且可为制定新的肿瘤靶向治疗策略提供依据。

总之,上皮肿瘤细胞需要经过一个动态EMT/MET过程才能形成微转移,这其中微环境氧浓度的差异发挥作用,针对EMT逆转过程可能成为阻止肿瘤细胞复发的新途径。在不久的将来,加强我们对于肿瘤转移过程中EMT/MET动态过程分子调控的理解可以为我们提供更有效的手段去根除肿瘤转移。

(本文图1~3见插图9-2)

参考文献

- [1] FEO L, SCHAFFZIN D. Colonic stents: the modern treatment of colonic obstruction[J]. *Advances in Therapy*, 2011, 28(2): 73-86.
- [2] LI S, XIE L, DU M, et al. Association study of genetic variants in estrogen metabolic pathway genes and colorectal cancer risk and survival[J]. *Arch Toxicol*, 2018, 92(6): 1991-1999.
- [3] TSAI JH, YANG J. Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis[J]. *Genes & Development*, 2018, 27(20): 2192-206.
- [4] THIERY JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2017, 2(6): 442-454.
- [5] CHUI MH. Insights into cancer metastasis from a clinicopathologic perspective: epithelial-mesenchymal transition is not a necessary step[J]. *International Journal of Cancer*, 2013, 132(7): 1487-1495.
- [6] KLIMOVA TA, BELL EL, SHROFF EH, et al. Hyperoxia-induced premature senescence requires p53 and p Rb, but not mitochondrial matrix ROS[J]. *FASEB J*, 2016, 23(3): 783-794.
- [7] MANISCALCO WM, WATKINS RH, ROPER JM, et al. Hyperoxic ventilated premature baboons have increased p53, oxidant DNA damage and decreased VEGF expression[J]. *Pediatr Res*, 2015, 58(3): 549-556.
- [8] 李文斌, 常立文, 容志惠, 等. 维甲酸对高氧暴露下原代培养的胎鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞和成纤维细胞增殖与凋亡的影响[J]. *细胞生物学杂志*, 2007, 29(1): 115-121.
- [9] APOSTOLOU P, TOLOUDI M, CHATZIOANNOU M, et al. Cancer stem cells stemness transcription factors expression correlates with breast cancer disease stage[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2012, 7(6): 415-419.
- [10] KALLERGI G, PAPADAKI MA, POLITAKI E, et al. Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients[J]. *Breast Cancer Research: BCR*, 2011, 13(3): R59.
- [11] OTA I, LI XY, HU Y, et al. Induction of a MT1-MMP and MT2-MMP-dependent basement membrane transmigration program in cancer cells by snail1[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(48): 20318-20323.
- [12] LABELLE M, BEGUM S, HYNES RO. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2011, 20(5): 576-590.
- [13] YU M, BARDIA A, WITTNER BS, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition[J]. *Science*, 2013, 339(6119): 580-584.
- [14] YAO-BRENGASSER A, MONZAVI-KARBASSI B, HEDGES RA, et al. Adipocyte hypoxia promotes epithelial-mesenchymal transition-related gene expression and estrogen receptor-negative phenotype in breast cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(6): 2689-2694.
- [15] CANO A, PEREZ-MORENO MA, RODRIGO I, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression[J]. *Nature Cell Biology*, 2015, 2(2): 76-83.
- [16] THIERY JP, ACLOQUE H, HUANG RY, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. *Cell*, 2009, 139(5): 871-890.
- [17] WANG X, LIU J, WANG Z, et al. Periostin contributes to the acquisition of multipotent stem cell-like properties in human mammary epithelial cells and breast cancer cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72962. DOI: 10.1371/journal.pone.0072962.

(收稿日期: 2017-04-25, 修回日期: 2017-06-08)