

酸性微环境对大肠癌细胞自噬及侵袭能力的影响

占义军 许东强 李 明 谭诗云

摘 要 **目的** 本研究探讨酸性环境对大肠癌 LoVo 细胞侵袭能力及自噬水平的影响。**方法** 选择大肠癌 LoVo 细胞作为研究对象,用调节后 pH 值 6.8 或 pH 值 7.4 的全培养基体外培养大肠癌 LoVo 细胞,Transwell 小室法检测细胞侵袭能力的改变;免疫荧光检测细胞膜 E-cadherin 表达变化情况;蛋白质印迹检测细胞 EMT 标志物抗体(E-cadherin、Vimentin、Fibronectin)、自噬相关基因 Atg5、LC3-II 和 Beclin1 蛋白、MMP-9 表达变化情况。**结果** Transwell 侵袭实验结果显示,酸性环境下穿过 Transwell 小室基膜的大肠癌细胞数为 491.4 ± 19.5 个,多于中性环境(pH 值 7.4)的 353.8 ± 24.6 个,差异有统计学意义($t = 7.59, P = 0.002$);酸性微环境可使 LoVo 细胞 EMT 标志物蛋白 E-cadherin 表达降低,且 Vimentin、Fibronectin 蛋白表达上调,同时 MMP-9 蛋白表达上调;且自噬相关基因 Atg5、LC3-II 和 Beclin1 蛋白表达上调。**结论** 酸性环境可使细胞侵袭能力增加,其机制可能通过诱导 LoVo 细胞自噬和 EMT。

关键词 酸性微环境 大肠癌 自噬 上皮间质转化 侵袭

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.09.026

Effects of Acidic Microenvironment on the Invasiveness and Autophagy in Colorectal Cancer Cells. Zhan Yijun, Xu Dongqiang, Li Ming, et al. Xiangyang Central Hospital, Affiliated Hospital of Hubei College of Arts and Science, Hubei 441021, China

Abstract **Objective** Explore the effects of acidic microenvironment on the metastasis and autophagy in colorectal cancer cell line LoVo cells. **Methods** The colorectal cancer cell line LoVo cells were cultured in vitro. And LoVo cells were treated in complete medium, adjusted pH to 6.8 or 7.4. The invasion of LoVo cells was tested by transwell assay. The expression of E-cadherin was analyzed by immunofluorescence staining. Western blot were used for E-cadherin, Vimentin, Fibronectin, MMP-9, Atg5, LC3-II and Beclin1 protein analysis. **Results** Transwell experiments revealed that the number of LoVo cells under acidic microenvironment passing through the basement membrane was greater than that of the control group ($P < 0.05$), suggesting that acidic microenvironment could enhance the capacity of cell invasion. Acidic microenvironment could promoted the expressions of Vimentin, Fibronectin, MMP-9, Atg5, LC3-II and Beclin1 protein, and suppressed the expression of E-cadherin. **Conclusion** Acidic microenvironment could enhance the capacity of cell invasion, which may be associated with promotion of autophagy and epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell line LoVo cells.

Key words Acidic microenvironment; Colorectal cancer; Autophagy; EMT; Invasiveness

大肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见消化道恶性肿瘤,其发病率高居全球恶性肿瘤的第3位。尽管近年来大肠癌诊疗水平显著提高,但其病死率仍高居肿瘤相关死亡的第2位^[1,2]。侵袭转移是导致大肠癌患者临床治疗失败和死亡的主因。研究发现,肿瘤的侵袭转移与肿瘤细胞所处的肿瘤微环境有着密切关系^[3-5]。酸性微环境(acidic microenvironment)是肿瘤的普遍特征,其与肿瘤低糖条件下的生存、侵袭转移等均有关系,在肿瘤的发生和发展过程中均扮演

重要角色^[6,7]。自噬可使细胞能够适应缺氧、饥饿等恶劣环境并应对其他各种包括化疗或放疗造成的损伤刺激等,有助于细胞的存活。本研究拟在细胞培养基中加入乳酸,调节 pH 值为 6.8,模拟酸性环境,来探讨酸性环境下对大肠癌 LoVo 细胞侵袭能力及自噬水平的影响。

材料与方法

1. 材料:大肠癌细胞系 LoVo 细胞购自中科院上海细胞库。胎牛血清购自美国 Gibco 公司;DMEM/F-12 培养基购自美国 Invitrogen 公司;Transwell 小室、细胞培养瓶、细胞培养皿及 6 孔培养板均购自美国 Corning 公司;Matrigel 胶购自美国 BD 公司;EMT 标志物抗体(E-cadherin、Vimentin、Fibronectin)、自噬相关基因 Atg5、LC3-II 和 Beclin1 蛋白、MMP-9

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2042017kf0092)

作者单位:441021 襄阳市中心医院、湖北文理学院附属医院(占义军、许东强);430060 武汉大学人民医院(李明、谭诗云)

通讯作者:许东强,电子信箱: yjwhxk@163.com

及内参 β -actin 抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。蛋白浓度测定试剂盒、HRP-羊抗兔、HRP-羊抗鼠及 FITC-山羊抗兔荧光二抗均购自中国杭州碧云天生物技术研究。

2. 方法: (1) 细胞培养: 大肠癌 LoVo 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基培养, 37℃、5% CO₂ 条件下培养。实验细胞选用处于对数生长期的细胞。(2) Transwell 实验: 该实验分为对照组 (pH 值 7.4) 和乳酸组 (20mmol/L, pH 值 6.8) 两组。选取 Transwell 小室, 将对数生长期的上述 2 组细胞用不含血清的培养基重悬计数, 接种 200 μ l 于 24 孔板 Transwell 小室上室 (细胞密度为 2×10^5 /ml), 每组设 3 个复孔; 将 600 μ l 含 10% 血清的培养基加入 24 孔板 Transwell 小室下室, 37℃、5% CO₂ 条件下培养 24h; 小心取出小室, 吸干小室内培养基, PBS 洗涤 3 次, 用 PBS 湿润的棉签轻拭小室内的细胞, 倒置晾干, 4% 多聚甲醛室温下放置固定 30min, 倒置晾干, 0.1% 结晶紫染液室温下染色 15min, 显微镜下取 5 个随机视野计数, 统计结果, 实验重复 3 次。(3) 蛋白质印迹: 接种对数生长期细胞 (细胞浓度为 2×10^5 /ml) 至 6 孔板内, 每孔 2ml, 放置培养箱中孵育至细胞贴壁后, 加入含乳酸的完全培养基分别处理细胞 0、12、24h 后, 从培养箱中取出培养板, 消化收集细胞, 并用预冷的 PBS 洗涤后加入蛋白裂解液 (含蛋白酶抑制剂) 冰上裂解反应 30min, 用细胞刮刮下细胞, 置于 EP 管中, 冰上静置 5min, 离心 (离心机预冷 4℃) 12000r/min 离心 10min ($r = 8$ cm), 取上清, 采用 BCA 法测定蛋白浓度, 每个样品以相同的蛋白量 (40 μ g) 加入 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 湿转法将 10% 聚丙烯酰胺凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜, 经 5% 脱脂奶粉室温条件下封闭 1h, 4℃ 条件下过夜孵育一抗, 次日 TBST 洗膜后, 室温调价小孵育二抗 2h, TBST 洗涤后 ECL 化学发光试剂显影, 定影, 对胶片进行拍照分析, 实验重复 3 次。

3. 统计学方法: 采用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计分析, 所有计量数值进行正态性检验, 均为正态分布, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两样本间均数差异比较采用 t 检验, 所有统计检验均为双侧检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 酸性环境对大肠癌 LoVo 细胞侵袭能力的影响: 如图 1 所示, Transwell 实验结果显示, 酸性条件 (pH 值 6.8) 下处理 24h 后, 穿过 Transwell 小室基膜

的大肠癌细胞系 LoVo 细胞数为 491.4 ± 19.5 个, 显著多于中性条件 (pH 值 7.4) 的 353.8 ± 24.6 个, 差异有统计学意义 ($t = 7.59$, $P = 0.002$)。

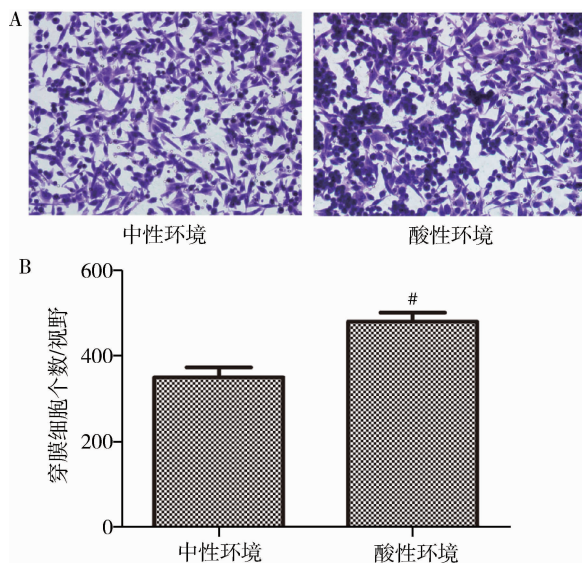


图 1 酸性环境对大肠癌 LoVo 细胞侵袭能力的影响 ($^{\#}P < 0.05$)

A. Transwell 小室检测中性环境 (pH 值 7.4) 和酸性环境 (pH 值 6.8) 对 LoVo 细胞侵袭能力的影响 (结晶紫, $\times 100$); B. 与中性环境 (pH 值 7.4) 穿过 Transwell 小室细胞数 (353.8 ± 24.6) 比较, 酸性环境 (pH 值 6.8) 下穿过 Transwell 小室人工基膜的 LoVo 细胞数 (491.4 ± 19.5) 增加 ($t = 7.59$, $P = 0.002$)

2. 酸性环境对大肠癌 LoVo 细胞 MMP-9 表达的影响: 如图 2 所示, 酸性条件分别处理 LoVo 细胞 0、12、24h 后, 蛋白质印迹检测结果显示随着作用时间的延长, MMP-9 表达逐渐增加。

3. 酸性环境对大肠癌 LoVo 细胞 EMT 标志物蛋白表达的影响: 本实验进一步探讨了酸性条件下对大肠癌 LoVo 细胞 EMT 标志物表达的影响, 如图 3 所示, 随着作用时间的延长, 上皮标志物 E-钙黏素 (E-cadherin) 表达逐渐下调, 且间叶标志物波形蛋白 (Vimentin) 和纤维连接蛋白 (Fibronectin) 表达逐渐上调。

4. 酸性环境对大肠癌 LoVo 细胞自噬相关基因 Atg5、LC3-II 和 Beclin1 蛋白表达的影响: 如图 4 所示, 酸性条件分别处理 LoVo 细胞 0、12、24h 后, 蛋白质印迹检测结果显示随着作用时间的延长, 自噬相关基因 Atg5、LC3-II 和 Beclin1 蛋白表达逐渐上调。

讨 论

普遍认为肿瘤酸性微环境产生的机制主要包括以下因素: 细胞转化和生长失控导致的缺氧和代谢异常; 肿瘤存在独特的代谢型——瓦伯格效应, 即肿瘤

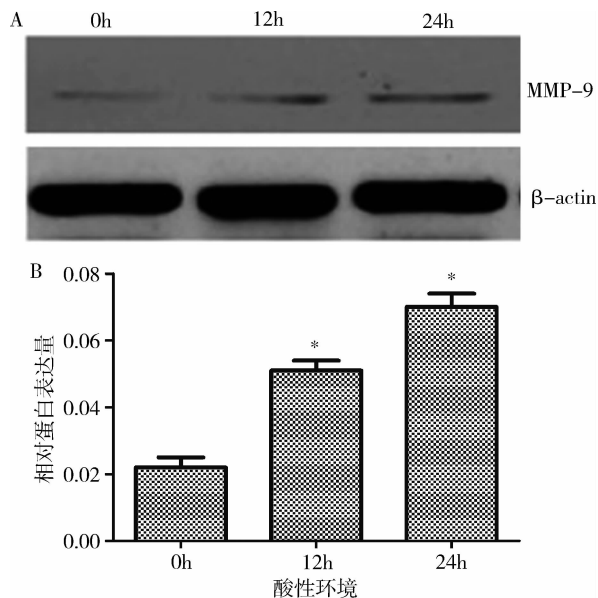


图2 酸性环境对大肠癌 LoVo 细胞 MMP-9 蛋白表达的影响

A. 免疫印迹图; B. MMP-9 灰度值分析; 与 0h 比较, * $P < 0.05$

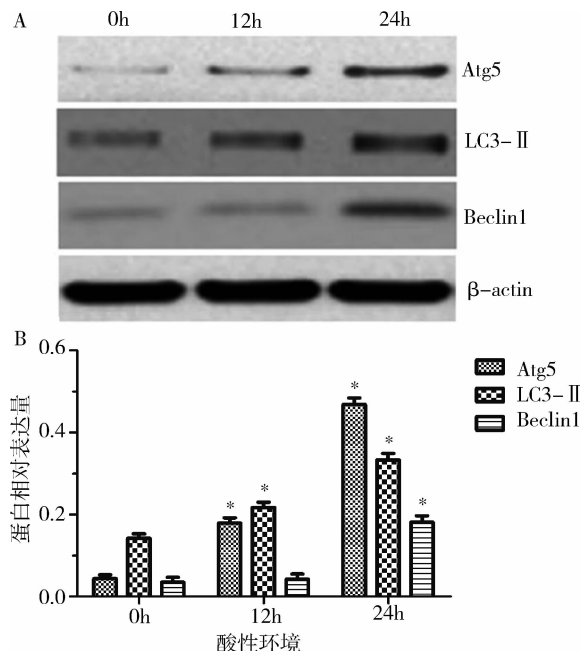


图4 酸性环境对 LoVo 细胞自噬相关基因 Atg5、LC3-II 和 Beclin1 蛋白表达的影响

A. 免疫印迹图; B. 自噬相关基因 Atg5、LC3-II 和 Beclin1 标志物灰度值分析; 与对应蛋白 0h 比较, * $P < 0.05$

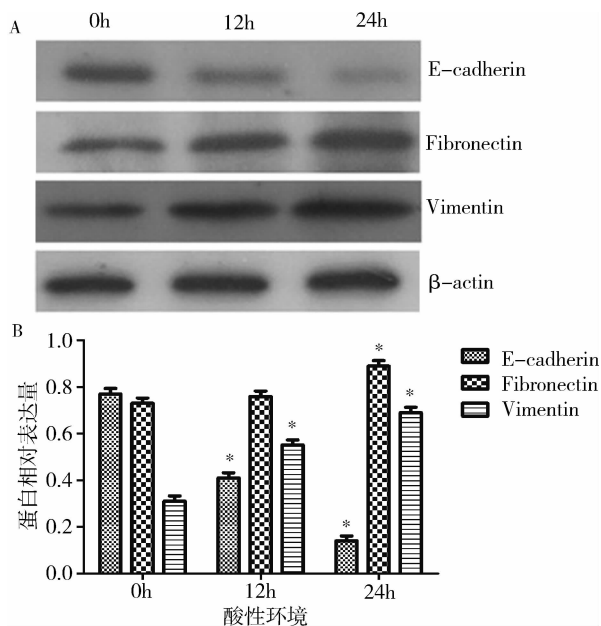


图3 酸性环境对 EMT 标志物表达的影响

A. 免疫印迹图; B. EMT 标志物灰度值分析; 与对应蛋白 0h 比较, * $P < 0.05$

性条件下比较,酸性条件下,大肠癌 LoVo 细胞侵袭能力更强,且基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 表达上调,后者可降解细胞外基质并破坏基膜,促进肿瘤细胞从原发灶向周围组织及远处转移。

上皮细胞间叶样表型转化 (epithelial to mesenchymal transition, EMT), EMT 是肿瘤原发性浸润和继发性转移的重要机制,EMT 是在胞外因素刺激下由上皮细胞表型转化为具有间质细胞表型的过程^[10-12]。在 EMT 过程中,细胞极性、细胞间紧密连接和黏附连接逐渐丧失,肌动蛋白细胞骨架发生重组,细胞-细胞间连接蛋白如 E-cadherin、 γ -catenin 等表达减少,而间叶标志物如 N-cadherin、Vimentin、Fibronectin 等表达明显增加。同时,基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteins, MMPs) 如 MMP-2、MMP-3 及 MMP-9 等活性显著增加。特别地,研究表明,EMT 的激活能使非肿瘤干细胞具有肿瘤干细胞的特性如自我更新及肿瘤启动能力^[13,14]。因此,EMT 过程被认为是绝大多数肿瘤细胞发生侵袭、转移的前提。本研究结果显示,酸性条件处理后可使结肠癌细胞系 LoVo 细胞的侵袭能力增加,且肿瘤细胞上皮标志物 E-cadherin 表达降低,且间叶标志物 Vi-

细胞无论在有氧还是低氧环境下均进行糖酵解,产生乳酸并排出细胞外,而肿瘤中紊乱的血管不能有效清除组织环境中的乳酸;特别地,在提高肿瘤组织的氧分压和血流量情况下,肿瘤依然产生并维持着酸性微环境^[8]。这种酸性环境可促进肿瘤细胞侵袭、化疗耐药、细胞免疫逃逸等^[8,9]。本研究结果显示,与中

mentin、Fibronctin 表达上调,提示酸性条件下可促进 LoVo 细胞 EMT。

肿瘤细胞应对酸性应激的机制仍不明确。自噬是广泛存在于真核细胞内利用溶酶体降解自身受损的细胞器和高分子物质的过程,是细胞应对恶劣环境的生存机制,其在肿瘤发生、进展中发挥着复杂的作用^[15~18]。在肿瘤形成前,机体可通过自噬维持细胞内稳态阻止细胞恶变。但当肿瘤形成后,自噬可帮助肿瘤细胞度过不利的微环境,对肿瘤细胞起到一定的保护作用,并促进细胞侵袭^[19]。但即使肿瘤形成后,也有研究显示自噬对肿瘤细胞可产生抑制作用^[20]。自噬的这种双重调节作用已经在临床研究中不断被证实^[21,22]。酸性微环境是肿瘤的普遍特征,研究发现酸性条件下,人类乳腺癌细胞内 Atg5 和 Bnip3 表达水平升高,提示细胞暴露在低 pH 值可能利用自噬作为一种生存机制^[23,24]。本研究也发现酸性条件下,LoVo 细胞自噬相关基因 Atg5、LC3 - II 和 Beclin1 蛋白表达上调,提示 LoVo 细胞自噬水平升高。推测肿瘤细胞可能通过调节自噬来耐受酸性微环境来继续生存。

综上所述,酸性条件下 LoVo 细胞侵袭能力显著增加,肿瘤细胞上皮标志物 E - cadherin 表达降低,且间叶标志物 Vimentin、Fibronctin 表达上调。同时,酸性条件下也可诱导 LoVo 细胞发生自噬。提示肿瘤酸性微环境对肿瘤细胞自噬状态及间质化特征有着重要作用,且提示细胞自噬与细胞上皮间质转化之间存在相互影响的关系,下一步将深入探讨酸性环境诱导的自噬在大肠癌侵袭、转移中的作用及机制,并阐明酸性微环境诱导自噬的机制,为寻找新的抑制大肠癌侵袭、转移治疗方案提供理论基础。

参考文献

- 1 Torre LA, Bray F, Siegel RL, *et al.* Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2):87 - 108
- 2 Xue L, Williamson A, Gaines S, *et al.* An Update on colorectal cancer [J]. Curr Probl Surg, 2018, 55(3):76 - 116
- 3 Hansen JM, Coleman RL, Sood AK. Targeting the tumour microenvironment in ovarian cancer [J]. Eur J Cancer, 2016, 56:131 - 143
- 4 Belli C, Trapani D, Viale G, *et al.* Targeting the microenvironment in solid tumors [J]. Cancer Treat Rev, 2018, 65:22 - 32
- 5 Garner EF, Beierle EA. Cancer stem cells and their interaction with the tumor microenvironment in neuroblastoma [J]. Cancers; Basel, 2015, 8(1): E5
- 6 Pearce OM, Läubli H. Sialic acids in cancer biology and immunity [J]. Glycobiology, 2016, 26(2): 111 - 128

- 7 Matsumoto A, Stephenson - Brown AJ, Khan T, *et al.* Heterocyclic boronic acids display sialic acid selective binding in a hypoxic tumor relevant acidic environment [J]. Chem Sci, 2017, 8(9):6165 - 6170
- 8 龙常春,唐思伟,程忠平. 肿瘤细胞能量代谢的特点及调控机制 [J]. 医学综述,2017,3:479 - 483
- 9 Calorini L, Peppicelli S, Bianchini F. Extracellular acidity as favouring factor of tumor progression and metastatic dissemination [J]. Exp Oncol, 2012, 34(2):79 - 84
- 10 Pasquier J, Abu - Kaoud N, Al Thani H, *et al.* Epithelial to mesenchymal transition in a clinical perspective [J]. J Oncol, 2015, 2015: 792182
- 11 Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, *et al.* I EMT in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2018, 18(2):128 - 134
- 12 Rout - Pitt N, Farrow N, Parsons D, *et al.* Epithelial mesenchymal transition (EMT): a universal process in lung diseases with implications for cystic fibrosis pathophysiology [J]. Respir Res, 2018, 19(1):136
- 13 Chaffer CL, Brueckmann I, Scheel C, *et al.* Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem - like state [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(19): 7950 - 7955
- 14 Kong D, Li Y, Wang Z, *et al.* Cancer stem cells and epithelial - to - Mesenchymal transition (EMT) - phenotypic cells: are they cousins or twins? [J]. Cancers; Basel, 2011, 3(1): 716 - 729
- 15 Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism [J]. Science, 2010, 330(6009): 1344 - 1348
- 16 林怡婷,丁聆昱,初明,等. 自噬及其调控机制的研究进展 [J]. 生物学通报,2018,2:1 - 5
- 17 Mowers EE, Sharifi MN, Macleod KF. Functions of autophagy in the tumor microenvironment and cancer metastasis [J]. FEBS J, 2018, 285(10):1751 - 1766
- 18 Wirawan E, Lippens S, Vanden Berghe T, *et al.* Beclin1: a role in membrane dynamics and beyond [J]. Autophagy, 2012, 8(1):6 - 17
- 19 Püez - Ribes M, Allen E, Hudock J, *et al.* Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis [J]. Cancer Cell, 2009, 15(3):220 - 231
- 20 Choi KS. Autophagy and cancer [J]. Exp Mol Med, 2012, 44(2): 109 - 120
- 21 Chen N, Debnath J. Autophagy and tumorigenesis [J]. FEBS Lett, 2010, 584(7):1427 - 1435
- 22 Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease [J]. N Engl J Med, 2013, 368(19):1845 - 1846
- 23 Wojtkowiak JW, Rothberg JM, Kumar V, *et al.* Chronic autophagy is a cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironments [J]. Cancer Res, 2012, 72(16): 3938 - 3947
- 24 Pellegrini P, Dyczynski M, Sbrana FV, *et al.* Tumor acidosis enhances cytotoxic effects and autophagy inhibition by salinomycin on cancer cell lines and cancer stem cells [J]. Oncotarget, 2016, 7(24):35703 - 35723

(收稿日期:2018 - 07 - 26)

(修回日期:2018 - 12 - 20)