

“cell-in-cell”对胃癌细胞生物学行为的影响*

孙静 闵婕 单宇鹏 雷鸽 张峰

(空军军医大学第二附属医院肿瘤内科, 陕西 西安 710000)

【摘要】 目的 探究胃癌肿瘤细胞与免疫细胞 cell-in-cell 的形成对胃癌细胞生物学行为的影响。方法 胃癌细胞与单核淋巴细胞(PBMC)的共培养体系分为对照组、1:1组和 5:1组。PBMC 和 BGC823 细胞分别以 1:1和 5:1的接种到 24 孔板中(共 5×10^4 个)。通过吉姆萨染色检测“cell-in-cell”构建情况。分别检测各组细胞增殖、凋亡和侵袭能力。结果 1:1组的“cell-in-cell”构建率为 $(8.65 \pm 1.06)\%$ 。5:1组的“cell-in-cell”构建率为 $(12.92 \pm 1.32)\%$, 显著高于 1:1组 ($P < 0.05$)。3 组细胞的生物学行为水平比较差异显著 ($P < 0.05$)。1:1组的增殖和侵袭能力显著高于对照组, 而凋亡率显著低于对照组 ($P < 0.05$)。5:1组的增殖和侵袭能力显著高于 1:1组和对照组, 而凋亡率显著低于 1:1组和对照组 ($P < 0.05$)。结论 胃癌细胞与免疫细胞形成的“cell-in-cell”结构会促进胃癌细胞的增殖和侵袭并抑制凋亡。

【关键词】 胃癌; 免疫细胞; cell-in-cell; 增殖; 侵袭; 凋亡

【中图分类号】 R735.2 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2022.09.005

Effect of "cell in cell" on biological behavior of gastric cancer cells

SUN Jing, MIN Jie, SHAN Yupeng, LEI Ge, ZHANG Feng

(Department of Oncology, The Second Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xian 710000, China)

【Abstract】 Objective To explore the influence of the formation of gastric cancer tumor cells and immune cells cell-in-cell on the biological behavior of tumor cells. **Methods** The co-culture system of gastric cancer cells and mononuclear lymphocytes (PBMC) were divided into control group, 1:1 group and 5:1 group. PBMC and BGC823 cells were seeded into 24-well plates at 1:1 and 5:1, respectively (5×10^4 cells in total). The construction of "cell-in-cell" was detected by Giemsa staining. Cell proliferation, apoptosis and invasion ability of each group were tested. **Results** The construction rate of "cell-in-cell" for the 1:1 group was $(8.65 \pm 1.06)\%$. The "cell-in-cell" construction rate of the 5:1 group was $(12.92 \pm 1.32)\%$, which was significantly higher than that of the 1:1 group ($P < 0.05$). The biological behavior levels of the three groups of cells were significantly different ($P < 0.05$). The proliferation and invasion abilities of the 1:1 group were significantly higher than those of the control group, while the apoptosis rate was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$). The proliferation and invasion abilities of the 5:1 group were significantly higher than those of the 1:1 group and the control group, while the apoptosis rate was significantly lower than that of the 1:1 group and the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The "cell-in-cell" structure formed by gastric cancer cells and immune cells will promote the proliferation and invasion of gastric cancer cells and inhibit apoptosis.

【Key words】 Gastric cancer; Immune cells; Cell-in-cell; Proliferation; Invasion; Apoptosis

统计显示,每年新发胃癌和死于胃癌的患者分别约为 100 万例和 80 万例,占有恶性肿瘤的 5.7%和 8.2%,发病率和死亡率均分别排名第六和第二^[1]。但目前,胃癌发生和发展的机制则仍不清楚。在肿瘤

细胞培养过程中,会发现一些带有内部空泡和多个细胞核的大细胞,即一个细胞在另一个细胞内的情况,被称为“cell-in-cell”结构^[2-3]。免疫细胞与肿瘤细胞的“cell-in-cell”结构会提高肿瘤的恶性程度^[4-5],一项临床研究显示“cell-in-cell”结构与口腔舌癌的侵袭性特征和癌症相关死亡率有关^[6]。然而,关于“cell-in-cell”结构对胃癌的影响则仍不清楚,至今也鲜有研究报道。为此,本文就胃癌肿瘤细胞与免疫细胞“cell-in-cell”对肿瘤细胞生物学行为的影响进行研究,以期

基金项目:陕西省自然科学基金研究项目(2016JM8101)

通信作者:张峰, E-mail: zhangf83@qq.com

引用本文:孙静,闵婕,单宇鹏,等.“cell-in-cell”对胃癌细胞生物学行为的影响[J].西部医学,2022,34(9):1272-1275. DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2022.09.005

胃癌的诊断和治疗提供新的思路和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人胃癌细胞 BGC823(ATCC, 美国); 96 孔、24 孔组织培养板(康宁公司, 美国); RPMI 1640 培养基(Gibco 公司, 美国); BALB/c 小鼠[SPF 级, 雄性, 6~8 周龄(20 ± 2) g, 浙江医院实验动物中心, SYXK(浙)2021-0017]; 免疫磁珠(Invitrogen 公司, 美国); 吉姆萨试剂(碧云天公司, 中国); 凋亡试剂盒(Annexin V-FITC 和 PI)(耶森公司, 中国); 流式细胞仪(Becton 公司, 美国); 基质胶和 Transwell 装置(Corning 公司, 美国)。本次动物实验符合 3R 原则, 并且实验方案经过空军军医大学第二附属医院动物伦理委员会的批准。

1.2 小鼠免疫细胞的分离 小鼠颈脱臼处死, 在无菌的环境下收集得到脾脏中细胞悬液, 通过密度梯度离心法分离单核淋巴细胞(PBMC), 使用免疫磁珠传话 PBMC。PBMC 培养在 RPMI 1640 培养基中, 培养基含有 10% 的胎牛血清, 将细胞在 5% CO₂ 培养箱中于 37°C 和 95% 湿度下培养。

1.3 胃癌细胞培养和“cell-in-cell”模型的建立 人胃癌细胞 BGC823 培养在 DMEM 完全基中, 培养基含有 10% 的胎牛血清、0.1 mg / mL 的链霉素和 100 U / mL 的青霉素。将细胞在 5% CO₂ 培养箱中于 37°C 和 95% 湿度下培养。根据参考文献^[7] 构建肿瘤细胞与免疫细胞的“cell-in-cell”模型。按照靶效比 1:1 和 5:1 加入已标记的胃癌细胞分别为 1:1 组和 5:1 组, 分别接种到 24 孔板中, 每孔细胞总数为 5×10^4 个。在上述条件下孵育 6 h。然后 BGC823 细胞单独培养作为对照。

1.4 检测方法

1.4.1 “cell-in-cell”构建率 培养后细胞加入 2.5% 的戊二醛在 4°C 固定 20 min, 然后加入 10% 的吉姆萨试剂 1 在室温下染色 1 min; 洗涤后加入 10% 的吉姆萨试剂 2 室温下染色 10 min。显微镜下观察, 随机选择 5 个高倍视野, “cell-in-cell”构建率 = (“cell-in-cell”细胞数 / 总细胞数) × 100%。

1.4.2 CCK-8 检测细胞增殖活力 将 100 μL 的细胞悬浮液添加到 96 孔板的孔中, 孵育 24 h、48 h 和 72 h 后, 将体积为 10 μL 的 CCK-8 溶液添加到每个孔中并孵育 2 h。在 450 nm 波长下, 用酶标仪检测每个孔的光密度(OD)值。

1.4.3 流式细胞术检测细胞凋亡 将细胞用 1 × PBS 洗涤并悬浮在 100 μL 结合缓冲液中。加入 5 μL 的 Annexin V-FITC 和 10 μL 的 PI(中国上海耶森), 在室温下于黑暗中孵育 10~15 min。最后, 将 400 μL 的

结合缓冲液添加到样品中, 并在 1 h 内通过流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.4.4 Transwell 检测侵袭 将基质胶(1:8 稀释)加入 Transwell 装置的上室并在 37°C 下孵育 30 min。将 600 μL 完全培养基填充到 24 孔板-Transwell 装置的下室。将细胞在无血清培养基中于 37°C 培养 24 h 进行饥饿处理。消化后, 向水合的 Transwell 上室中加入 100 μL 细胞溶液(5×10^5 个细胞/mL)。24 h 后, 洗去未侵入的细胞。渗入下室的细胞用 95% 乙醇固定, 0.1% 结晶紫室温染色 20 min。在 ×400 倍视野中的 5 个随机视野中计数细胞数。

1.5 统计学分析 设立 3 个平行实验。采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 单因素方差分析(ANOVA)以评估组间差异, 两两比较使用 SNK-q 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌细胞与免疫细胞“cell-in-cell”形成情况 深紫红色为细胞核, 浅紫色为细胞质, 黄色箭头为形成的“cell-in-cell”结构, 见图 1。1:1 组的“cell-in-cell”构建率为 (8.65 ± 1.06)%, 5:1 组的“cell-in-cell”构建率为 (12.92 ± 1.32)%, 显著高于 1:1 组(P < 0.05)。

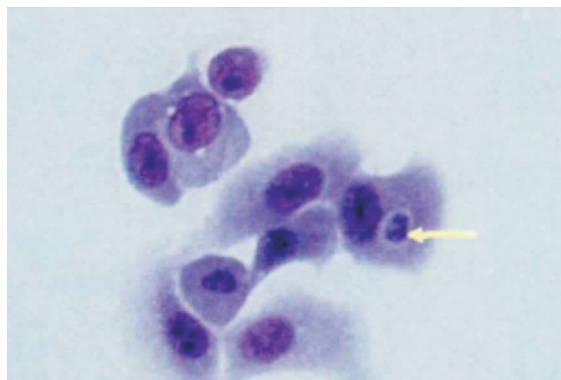


图 1 胃癌细胞与免疫细胞“cell-in-cell”形成情况(400×)

Figure 1 Gastric cancer cell and immune cell “cell-in-cell” formation

2.2 “cell-in-cell”形成对胃癌细胞增殖能力的影响 3 组细胞的增殖能力比较差异显著(P < 0.05)。1:1 组的增殖能力显著高于对照组(P < 0.05), 5:1 组的增殖能力显著高于 1:1 组和对照组(P < 0.05)。见表 1。

表 1 “cell-in-cell”形成对胃癌细胞增殖能力的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The effect of “cell-in-cell” formation on the proliferation of gastric cancer cells

组别	24 h	48 h
对照组	0.53 ± 0.05	0.92 ± 0.08
1:1 组	0.65 ± 0.06 ^①	1.19 ± 0.11 ^①
5:1 组	0.75 ± 0.07 ^②	1.32 ± 0.13 ^②

注: 与对照组比较, ①P < 0.05; 与 1:1 组比较, ②P < 0.05

2.3 “cell-in-cell”形成对胃癌细胞凋亡的影响 3 组细胞的凋亡率比较差异显著 ($P < 0.05$)。1:1 组的凋亡率 (4.06 ± 0.45)% 显著低于对照组 (6.27 ± 0.58)%

($P < 0.05$), 5:1 组的凋亡率 (2.95 ± 0.34)% 显著低于 1:1 组和对照组 ($P < 0.05$)。见图 2。

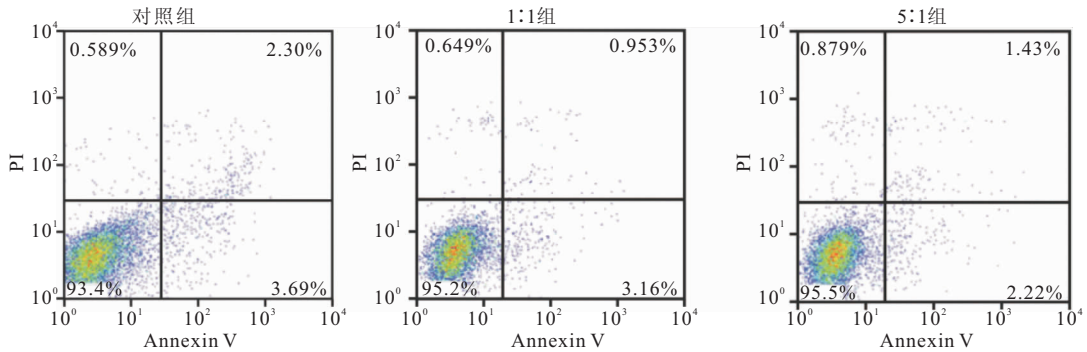


图 2 流式细胞术检测“cell-in-cell”形成对胃癌细胞凋亡的影响

Figure 2 Flow cytometry detects the influence of "cell-in-cell" formation on the apoptosis of gastric cancer cells

2.4 “cell-in-cell”形成对胃癌细胞侵袭的影响 3 组细胞的侵袭能力比较差异显著 ($P < 0.05$)。1:1 组的

侵袭能力显著高于对照组 ($P < 0.05$), 5:1 组的侵袭能力显著高于 1:1 组和对照组 ($P < 0.05$)。图 3、表 2。

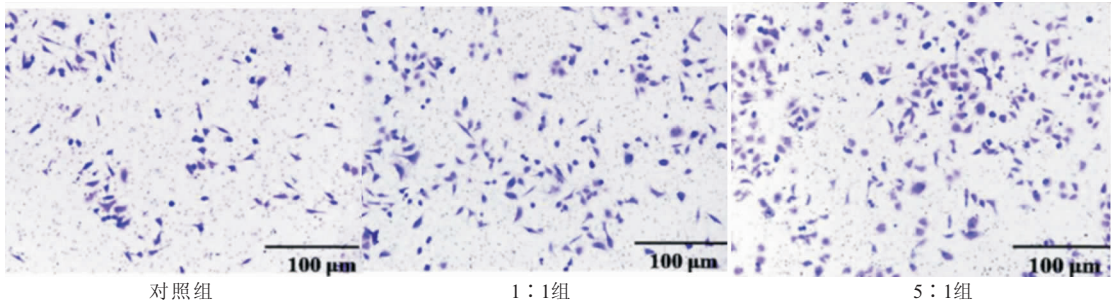


图 3 Transwell 检测“cell-in-cell”形成对胃癌细胞侵袭的影响

Figure 3 Transwell detects the influence of "cell-in-cell" formation on gastric cancer cell invasion

表 2 “cell-in-cell”形成对胃癌细胞侵袭的影响 (个, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 The influence of "cell-in-cell" formation on the invasion of gastric cancer cells

组别	侵袭细胞数目
对照组	65.82 ± 3.62
1:1组	117.54 ± 5.06 ^①
5:1组	160.13 ± 4.85 ^②

注:与对照组比较,① $P < 0.05$;与 1:1 组比较,② $P < 0.05$

3 讨论

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,大部分患者在确诊时已处于中晚期,这使得死亡率大幅升高^[8-10]。胃癌的复发和转移是导致治疗失败的主要原因^[11-13],寻找胃癌细胞增殖和侵袭的机制具有重要的临床意义。

研究显示免疫抑制在肿瘤的发生和进展中起着重要的作用,一方面,肿瘤细胞表面会产生包括 PD-L1 等免疫抑制的蛋白,并直接与免疫细胞表面的受体结合导致免疫细胞的功能抑制或者凋亡^[14-17];另一方面,肿瘤细胞也会分泌免疫抑制因子,从而来降低机体的识别和清除肿瘤细胞的能力^[18-20]。免疫细胞与

肿瘤细胞的“cell-in-cell”结构是近年来发现的一种新的细胞现象,即一个活细胞侵入另一个活细胞^[21-22]。近年来研究显示,免疫细胞与肿瘤细胞也可形成“cell-in-cell”结构,并且与肿瘤免疫相关,如 Wang 等^[23]的研究显示结肠癌细胞可以内化淋巴细胞,并且这种免疫细胞与结肠癌细胞形成的“cell-in-cell”结构有助于逃避宿主免疫防御。也有研究显示在乳腺癌组织中发现了“cell-in-cell”结构,并且临床研究结果显示“cell-in-cell”结构的增多与乳腺癌患者不良预后有关^[24]。为分析胃癌细胞与免疫细胞是否可以形成“cell-in-cell”结构,本研究从小鼠脾脏中收集了 PBMC,并分别按照 PBMC:胃癌细胞比例为 1:1 和 5:1 的比例混合接种,通过显微镜观察,可清晰的观察到细胞的内化结果,其中 5:1 组的“cell-in-cell”构建率显著高于 1:1 组。本次研究成功的构建了胃癌细胞与免疫细胞的“cell-in-cell”模型。

为在细胞水平上分析“cell-in-cell”对胃癌细胞生物学行为的影响,本研究分别检测了各组细胞的增殖、凋亡和侵袭情况。结果显示“cell-in-cell”的形成能

够显著的促进胃癌细胞的增殖和侵袭能力,并且抑制凋亡。此外,随着“cell-in-cell”比例的升高,细胞的增殖和侵袭能力被进一步促进,且凋亡率也被进一步抑制。研究显示“cell-in-cell”的形成能够促进头颈部鳞状细胞癌细胞的增殖并抑制凋亡^[25]。Miyatake 等^[26]的研究也显示“cell-in-cell”的形成会促进胰腺导管腺癌细胞的侵袭能力。结合过往文献报道和本次研究结果,提示免疫细胞与胃癌细胞形成的“cell-in-cell”会促进胃癌细胞的恶性生物学行为,促进胃癌细胞的增殖和侵袭,并抑制凋亡。

然而,本研究也存在不足之处,首先,关于“cell-in-cell”结构对胃癌细胞的生物学行为的而影响和对机体免疫的影响仍需要体内研究证实。“cell-in-cell”结构在胃癌组织中的形成情况、与临床病理数据的关系和与患者预后的关系则仍需要进一步的临床研究。此外,“cell-in-cell”形成的分子机制和调控胃癌细胞生物学行为的分子机制也值得深入研究。

4 结论

胃癌细胞与免疫细胞形成的“cell-in-cell”结构不但会提高胃癌细胞的增殖和侵袭能力,还会显著抑制细胞凋亡。此外,PBMC 的比例升高会提高“cell-in-cell”的形成率,并更显著地促进胃癌细胞的增殖和侵袭。本研究揭示了一种胃癌进展的新机制,提示 cell-in-cell”可能成为诊断和治疗胃癌的新方向。

【参考文献】

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.

[2] MACKAY H L, MULLER P A J. Biological relevance of cell-in-cell in cancers [J]. *Biochem Soc Trans*, 2019, 47(2): 725-732.

[3] FAIS S, OVERHOLTZER M. Cell-in-cell phenomena in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(12): 758-766.

[4] RUAN B, NIU Z, JIANG X, *et al.* High Frequency of Cell-in-Cell Formation in Heterogeneous Human Breast Cancer Tissue in a Patient With Poor Prognosis: A Case Report and Literature Review[J]. *Front Oncol*, 2019, 9(1): 1444-1448.

[5] WANG X, LI Y, LI J, *et al.* Cell-in-Cell Phenomenon and Its Relationship With Tumor Microenvironment and Tumor Progression: A Review[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7(1): 311-316.

[6] ALMANGUSH A, MÄKITIE A A, HAGSTRÖM J, *et al.* Cell-in-cell phenomenon associates with aggressive characteristics and cancer-related mortality in early oral tongue cancer[J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 843-847.

[7] LIANG J, FAN J, WANG M, *et al.* CDKN2A inhibits formation of homotypic cell-in-cell structures[J]. *Oncogenesis*, 2018, 7(6): 50-55.

[8] GAO K, WU J. National trend of gastric cancer mortality in

China (2003-2015): a population-based study[J]. *Cancer Commun*, 2019, 39(1): 24-29.

[9] 江桃,贾贵清,赵高平,等. 预先小切口辅助腹腔镜远端胃癌根治术临床疗效观察[J]. *西部医学*, 2019, 31(2): 295-298, 303.

[10] 彭鹏,吴春晓,龚杨明,等. 2003—2012 年上海市胃癌发病特征分析 [J]. *肿瘤*, 2018, 38(7): 697-703.

[11] MIWA T, KANDA M, UMEDA S, *et al.* Homeobox C10 Influences on the Malignant Phenotype of Gastric Cancer Cell Lines and its Elevated Expression Positively Correlates with Recurrence and Poor Survival[J]. *Ann Surg Oncol*, 2019, 26(5): 1535-1543.

[12] 麦麦提艾力·图尔荪,张文斌. 胃癌肺转移患者 118 例预后影响因素分析[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2019, 26(15):55-58.

[13] 王童博,毛启坤,张晓杰,等. 新辅助治疗行胃癌根治术患者术后并发症及其对预后的影响因素分析[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2021, 24(2): 160-166.

[14] WANG Y, SUN Q, MU N, *et al.* The deubiquitinase USP22 regulates PD-L1 degradation in human cancer cells [J]. *Cell Commun Signal*, 2020, 18(1):112-117.

[15] 马瑶,赵云,刘朝奇. 靶向 PD-L1 微泡对宫颈癌移植瘤抑制作用及靶向显影的实验研究[J]. *中国超声医学杂志*, 2019, 34(7):91-94.

[16] 吴宏振,栾龙威,李德升,等. 程序性细胞死亡蛋白 1 及其配体抑制剂治疗肿瘤的研究进展[J]. *中华生物医学工程杂志*, 2020, 26(5):475-480.

[17] 喜娜,李广秋,何萍,等. 非小细胞肺癌中 PD-L1 表达及其与肺癌相关驱动基因的关系[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2019, 9(7): 124-128.

[18] WCULEK S K, CUETO F J, MUJAL A M, *et al.* Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy[J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(1): 7-24.

[19] WANG X, DONG M. Malignancy After Lung Transplantation: How to Manage Immunosuppression [J]. *Transplant Proc*, 2020, 52(1): 315-320.

[20] MANZIA T M, ANGELICO R, GAZIA C, *et al.* De novo malignancies after liver transplantation: The effect of immunosuppression-personal data and review of literature[J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(35): 5356-5375.

[21] BAUER M F, HADER M, HECHT M, *et al.* Cell-in-cell phenomenon: leukocyte engulfment by non-tumorigenic cells and cancer cell lines[J]. *BMC Mol Cell Biol*, 2021, 22(1):39-44.

[22] YUE W, ZHU M, ZUO L, *et al.* Early Pattern of Epstein-Barr Virus Infection in Gastric Epithelial Cells by "Cell-in-cell"[J]. *Virology*, 2019, 34(3): 253-261.

[23] WANG S, LI L, ZHOU Y, *et al.* Heterotypic cell-in-cell structures in colon cancer can be regulated by IL-6 and lead to tumor immune escape[J]. *Exp Cell Res*, 2019, 382(1):111447-11152.

[24] ZHANG X, NIU Z, QIN H, *et al.* Subtype-Based Prognostic Analysis of Cell-in-Cell Structures in Early Breast Cancer[J]. *Front Oncol*, 2019, 9(2): 895-898.

[25] SCHENKER H, BÜTTNER-HEROLD M, FIETKAU R, *et al.* Cell-in-cell structures are more potent predictors of outcome than senescence or apoptosis in head and neck squamous cell carcinomas[J]. *Radiat Oncol*, 2017, 12(1): 21-24.

[26] MIYATAKE Y, KURIBAYASHI-SHIGETOMI K, OHTA Y, *et al.* Visualising the dynamics of live pancreatic microtumours self-organised through cell-in-cell invasion[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14054-14057.