文章编号:1000-5404(2005)23-2311-03

论著

KAI1基因对MHCC97-H肝癌细胞粘附力的影响

彭志红[1],唐 波[2],杨建民[1],司遂海[1],陈文生[1],房殿春[1],罗元辉[1] (第三军医大学西南医院:[1]全军消化内科中心,[2]普通外科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨KAI1基因对MHCC97-H肝癌细胞粘附力的影响,从而推测KAI1基因影响MHCC97-H肝癌细胞侵袭转移的机制。**方法** 采用微管吸吮技术研究我们前已转染人类KAI1全长正、反义结构基因的人肝癌MHCC97-H细胞粘附力。**结果** 在纤维连接蛋白(fibronectin, FN)裱衬表面,利用微管吸吮系统测得的各组肝癌细胞的粘附力分别为MHCC97-H-S组(678.4±101.8),MHCC97-H-AS组(1 083.6±113.8),MHCC97-H-pCI组(853.0±105.4)及MHCC97-H亲本细胞组(834.6±130.5)(单位为10^{-10}N,细胞数为25)。与MHCC97-H亲本细胞组比较,MHCC97-H-S组细胞对FN的粘附力显著下降($P<0.01$),MHCC97-H-AS组细胞对FN的粘附力显著增加($P<0.01$),而MHCC97-H-pCI组细胞对FN的粘附力无明显变化($P>0.05$)。**结论** KAI1基因可能降低肝癌细胞对细胞外基质FN的粘附力,从而抑制转移的初始步骤,进而抑制MHCC97-H肝癌细胞的侵袭和转移。

关键词:肝癌细胞;侵袭转移;粘附力
中图法分类号:R394.2;R73-37;R753.7 **文献标识码**:A

Effects of metastasis suppressor gene KAI1 on adhesion forces of MHCC97-H hepatocellular carcinoma cells with high metastatic potential

PENG Zhi-hong[1], TANG Bo[2], YANG Jian-min[1], SI Sui-hai[1], CHEN Wen-sheng[1], FANG Dian-chun[1], LUO Yuan-hui[1] ([1]Gastroenterology Research Center, [2]Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effects of metastasis suppressor gene KAI1 on adhesion forces of MHCC97-H hepatocellular carcinoma cells with high metastatic potential, so as to find the possible mechanism. **Methods** The adhesion forces of MHCC97-H cells with high metastatic potential transfected with sense or antisense KAI1 expression plasmid were measured by means of micropipette aspiration technique. **Results** On FN coated surfaces, the cell adhesion forces were quantitatively described by means of micropipette aspiration technique. The forces of the MHCC97-H cells were significantly higher after transfected with antisense KAI1 expression plasmid [$(1\ 083.6\pm113.8)\ 10^{-10}$ N] ($P<0.01$), lower after transfected with sense KAI1 expression plasmid [$(678.4\pm101.8)\ 10^{-10}$ N] ($P<0.01$), and of no significant difference after transfected with its control vector pCI-neo without KAI1 gene [$(853.0\pm105.4)\ 10^{-10}$ N] ($P>0.05$), as compared with their paternal MHCC97-H cells [$(834.6\pm130.5)\ 10^{-10}$ N]. **Conclusion** The metastasis suppressor gene KAI1 may decrease the cell adhesion forces to extracellular matrix to inhibit metastasis from first step, furthermore inhibit the invasion and metastasis of MHCC97-H cells.

Key words: hepatocellular carcinoma cells; invasion and metastasis; adhesion forces

肝癌是常见的恶性肿瘤之一,严重威胁人类健康,其侵袭转移和复发是患者死亡的主要原因,因此,探索肝癌侵袭、转移的发生机制,寻求有效的抗转移治疗措施,对改善肝癌患者的预后具有重要意义[1]。肿瘤的侵袭和转移是具有复杂细胞流变学机制的病理过程,其浸润性生长和穿透内皮细胞的过程是以癌细胞的运动和变形为基础的,而癌细胞与细胞外基质的粘附力是定量研究二者之间相互作用的物理量,对于进一步在分子水平上探讨肝癌细胞的粘附力学行为与肝癌浸润性生长、侵袭转移过程的关系有重要意义。我们从此角度入手,试图通过探讨肿瘤转移抑制基因KAI1对高转移潜能肝癌细胞MHCC97-H与细胞外基质纤维连接蛋白(fibronectin, FN)粘附力的影响,进而揭示肝癌细胞侵袭、转移的可能分子生物力学机制。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070348)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070348)
作者简介:彭志红(1975-),女,四川省郫县人,硕士,医师,主要从事肝癌侵袭转移机制方面的研究。电话:(023)68754678
收稿日期:2005-06-21;**修回日期**:2005-07-27

1 材料与方法

1.1 细胞

MHCC97-H 肝癌细胞系为上海复旦大学医学院附属中山医院肝癌研究所建立[2]的高转移潜能细胞，属贴壁生长型。我们目前已利用亚克隆技术构建了人类 KAI1 全长正、反义结构基因哺乳动物真核表达质粒，通过 DOTAP 脂质体介导的转染系统分别将其转入该肝癌细胞中，并进行了基因整合和表达的鉴定，说明基因转染成功，可获得预期 KAI1 蛋白表达[3,4]。转染有 KAI1 正义基因的肝癌细胞重新为 MHCC97-H-S，转染有 KAI1 反义基因的肝癌细胞命名为 MHCC97-H-AS，转染有 pCI-neo 空载体的肝癌细胞命名为 MHCC97-H-pCI。细胞培养条件为：高糖 DMEM 加 100 ml/L 胎牛血清和两种抗生素（青霉素 100 mg/L，链霉素 100 mg/L），37 ℃，50 ml/L CO_2，饱和湿度培养。在细胞处于对数生长期时均经 2.5 g/L 酶 +0.4 g/L EDTA 消化后悬浮于 DMEM 培养液中，浓度约为 5×10^9/L。微管吸吮实验中细胞分为 4 组，分别为 MHCC97-H-S 组、MHCC97-H-AS 组、MHCC97-H-pCI 组及 MHCC97-H 亲本细胞对照组，每组各观察测量 25 个细胞，整个微管吸吮实验在 2.5 h 内完成。

1.2 方法

1.2.1 系统组成　微管吸吮实验系统由倒置显微镜、显微微操作器、图像处理仪、压力控制和记录系统及微管等部分组成（图 1）。将细胞悬液 0.5 ml 注入一特定的圆形小室内，一同置于倒置显微镜（Axiovert 35，Zeiss Co. 德国）载物台上。微管采用普通玻璃毛细管由微管拉制器（P-87. Sμtter Ins. Co.，美国）拉制而成，微管与显微微操作器（MR5170，eppendorf Co.，德国）相连并通过它连接于压力控制和记录系统。利用显微微操作器控制微管尖部靠近细胞表面，并用重庆大学研制的自动压力控制和记录系统通过微管给细胞施以阶跃负压，使细胞的一小部分吸入微管，细胞在微管内的变形时间过程由图像处理仪（Vidas21，德国）记录，并通过回放所记录的图像测量细胞在微管内的变形值。所有实验均在室温（约 15 ℃）下进行，整个系统在图像监视器上的放大倍数为 3 500 倍，并用 40 μm 的光栅尺进行标定。

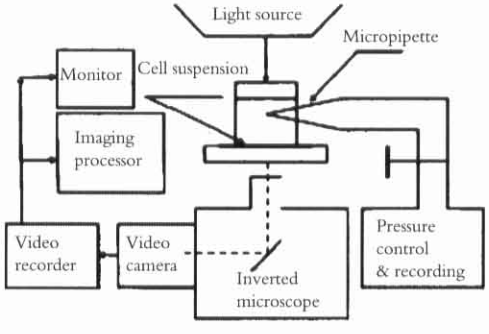


图 1 微管吸吮实验系统

Fig 1 Schematic block of micropipette aspiration system

1.2.2 基质 FN 的裱衬　定量描述各组细胞在 FN 裱衬表面的粘附特性，探讨细胞粘附力的变化。采用分步裱衬的方法制作有关裱衬表面[5]，依次在玻璃表面裱衬多聚赖氨酸和 FN，最后以牛血清白蛋白阻断非特异性粘附。即取一以玻璃为底表面的特制圆形小室，在约 0.5 cm^2 的圆形区域内依次裱衬如下成分：2 μg/ml 的多聚赖氨酸（PDL）200 μl，37 ℃裱衬 40 min；FN 按 2 μg/ml 浓度 200 μl，37 ℃裱衬 40 min；0.5% 牛血清白蛋白 200 μl，37 ℃作用 15 min。各步裱衬结束后均以 PBS 轻轻洗涤 1～2 次，以去除未被玻璃表面吸附裱衬的游离成分。制备好的裱衬小室在 37℃细胞培养箱内保存，24 h 内完成实验。

1.2.3 细胞粘附力的计算[6]　单个细胞粘附力的定量描述应以作用在单位粘附面积上的粘附力表示，其中粘附面积是细胞与基质表面的实际接触面积，而粘附力则指作用在该粘附面积上的水平作用力。由于细胞与基质表面的粘附面积只能用激光共聚焦显微镜等手段得到，而本研究中在光学显微镜下所得到的是细胞在基质表面的投影面积，故定义：当 $Ra > Rc$（Ra，Rc 分别是指贴壁细胞的投影半径和悬浮细胞的投影半径）时，以贴壁细胞的投影面积为粘附面积；当 $Ra < Rc$ 时，则以悬浮细胞投影面积为粘附面积。由于细胞在基质表面随时间展开（本研究中 $Ra \geqslant Rc$ 的情形占 94.7%），故上述定义是可行的。同时在不考虑细胞作为粘弹性体而带来的粘性耗散的条件下，作用于该粘附面积的粘附力应是临界负压力（$\Delta P \times \pi \times Rp^2$）的水平分量。如图 2 示，可以得到：

粘附力：$Fa = \Delta P \times \cos\theta \times \pi \times Rp^2$　（1）

相对粘附应力：$Sa = \Delta P \times \cos\theta \times (Rp/Ra)^2$　（2）

其中，ΔP 为临界负压值，θ 为 ΔP 与水平面的夹角，Rp 为微管的半径。由公式（1）、（2）根据测量所得的结果进行数据处理，观察各组肝癌细胞与基质 FN 粘附产生的临界值。

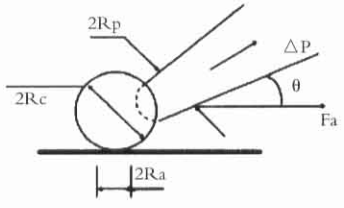


图 2 粘附模型示意图

Fig 2 Geometry of adhesive model

1.2.4 粘附力的测定　收集处于对数生长期的各组细胞经消化后制成单细胞悬液，浓度约 5×10^4/ml。取 0.5 ml 细胞悬液放入已裱衬的小室中，于 37 ℃孵箱内湿热静置 30 min 后开始实验。将样本小室置于倒置显微镜载物台上，于显微镜下确定待实验的粘附细胞（未粘附的细胞于轻微的机械扰动即悬浮）后利用显微操作器引导微管尖端靠近细胞表面，通过压力控制系统产生一阶跃负压以吸吮细胞，使细胞的小部分被吸入微管内并密封管口，以显微操作器轻轻侧向牵引细胞离开其粘附的裱衬表面，逐步加大吸吮负压（步长 5～10 mmH_2O）直至求得能使细胞与相应裱衬表面间粘附分离的临界负压值。在实验中，以电视摄像磁带记录的方式记录实验过程，经电视回放输入图像处理仪进行有关测量。整个微管吸吮实验在 2.5 h 内完成。

1.3 统计学处理

实验所测各组细胞粘附力值以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 软件进行两样本均值的 t 检验。

2 结果

在上述 FN 裱衬表面，利用微管吸吮系统测得的各组肝癌细胞的粘附力分别为 MHCC97-H-S 组 678.4 ± 101.8，MHCC97-

H-AS 组 1 083.6 ± 113.8，MHCC97-H-pCI 组 853.0 ± 105.4 及 MHCC97-H 亲本细胞组 834.6 ± 130.5（单位为 10^{-10} N，细胞数为 25）。与 MHCC97-H 亲本细胞组比较，MHCC97-H-S 组细胞对 FN 的粘附力有所下降，差异具有显著性（$P < 0.01$），MHCC97-H-AS 组细胞对 FN 的粘附力显著增加（$P < 0.01$），而 MHCC97-H-pCI 组细胞对 FN 的粘附力无明显变化（$P > 0.05$）。各组对 FN 的粘附力变化见图 3。

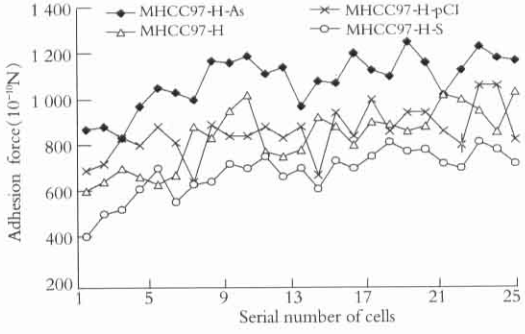


图 3　各组细胞对 FN 粘附力的影响

Fig 3　Adhesion forces of the cells in each group to FN

3　讨论

KAI1 基因是前列腺癌的转移抑制基因[7]。该基因编码产物在结构上属跨膜 4 超家族（transmembrane 4 superfamily，TM4SF）成员。TM4SF 自 1990 年发现以来，已发展到包括 ME491/CD63、MRP1/CD9、TAPA1/CD48、CD37 和 CD53 等近 20 多个成员。它们在细胞膜上的定位和广泛的糖基化在肿瘤的侵袭和转移中具有十分重要的意义[8]。目前研究表明，KAI1 基因在成人常见的实体上皮肿瘤如肺、前列腺、乳腺、食道、胃、胰腺等中表达减少，另卵巢上皮癌、胃癌、膀胱癌的进展也与 KAI1 基因表达下调有明显关系，且表达下调发生较早。KAI1 基因表达的减少或缺失在晚期恶性肿瘤中可能与肿瘤的进展和转移有关，可能是一种预后的标志[9]。KAI1 基因在多种恶性肿瘤中表达下调，分子基础不明，可能原因有：基因突变，杂和性缺失和复制错误，启动子区的 CpG 岛过度甲基化，基因转录调控异常，如 p53，NF-κb[10]。目前有关 KAI1 基因对肝癌侵袭转移影响的报道较少，且大多从组织病理学和分子病理学的角度进行。

本研究利用细胞外基质的重要成分 FN 裱衬玻璃表面，研究已转染正、反义 KAI1 基因的肝癌细胞对其的粘附特性。定量研究癌细胞与 FN 的粘附力学特性，对于进一步在分子水平上探讨肝癌细胞的粘附力学行为与肝癌浸润性生长、侵袭转移过程的关系有重要意义。本结果显示，与 MHCC97-H 亲本细胞组比较，MHCC97-H-S 组细胞对 FN 的粘附力有所下降，差异具有显著性（$P < 0.01$），MHCC97-H-AS 组细胞对 FN 的粘附力显著增加（$P < 0.01$），而 MHCC97-H-pCI 组细胞对 FN 的粘附力无明显变化（$P > 0.05$）。细胞的粘附是肿瘤细胞与胞外基质作用的重要始动步骤，它介导一系列化学的和物理的信号转导道路进而影响到肿瘤细胞的生长、侵袭和转移等生物学行为。反义组细胞与基质的粘附力大，推测其在浸润转移的始动环节即肿瘤细胞与基质的粘附过程中越易与基质粘附，从而从原发灶脱落，呈浸润性生长，进而发生转移。这与我们在前期实验即体外 Boyden Chamber 侵袭实验的结果一致[11]。

由上可知，肿瘤转移抑制基因 KAI1 可能降低肝癌细胞对细胞外基质 FN 的粘附力，从而抑制转移的初始步骤，进而抑制 MHCC97-H 肝癌细胞的侵袭和转移。这为肿瘤侵袭和转移机制的研究提供了重要线索. 但肿瘤的发生、发展与宿主的微环境是密不可分的，与肿瘤细胞之间的相互作用也是相关联的，在今后的工作中我们拟采用动物模型的办法，研究体内肝癌侵袭、转移过程中 KAI1 基因的变化及其分子机制，进一步为肝癌转移的防治提供理论和实验依据。

（致谢：感谢重庆大学生物工程学院及国家教育部生物力学与组织工程重点实验室秦建和宋关斌老师的帮助！）

参考文献：

[1] Yang J M, Chen W S, Liu Z P, *et al.* Effects of insulin-like growth factors-IR and -IIR antisense gene transfection on the biological behaviors of SMMC-7721 human hepatoma cells[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2003, 18(3): 296 - 301.

[2] 李　雁，汤钊猷，叶胜龙，等. 体内连续筛选法建立自发性肺转移人肝癌细胞系[J]. 中华医学杂志，2002，82(9)：601 - 605.

[3] 司遂海，杨建民，罗元辉，等. KAI1 正反义基因对 MHCC97-H 肝癌细胞 KAI1 蛋白表达的影响[J]. 世界华人消化杂志，2003，11(9)：1341 - 1344.

[4] 司遂海，杨建民，彭志红，等. KAI1 基因转染肝癌 MHCC97-H 细胞及鉴定[J]. 第三军医大学学报，2004，26(17)：1600，1604.

[5] 吴泽志，邵开峰，宋关斌，等. 肝癌细胞在Ⅳ型胶原裱衬表面的粘附特性[J]. 中华医学杂志，1999，79(5)：369 - 372.

[6] 王宪航，龙　勉，王晓军，等. 肝癌细胞与胶原蛋白Ⅰ裱衬表面粘附特性[J]. 生物物理学报，1996，12(4)：686 - 690.

[7] Dong J T, Lamb P W, Rinker Schaeffer C W, *et al.* KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2 [J]. Science, 1995, 268(5212): 884 - 886.

[8] Hashida H, Takabayashi A, Tokuhara T, *et al.* Clinical significance of transmembrane 4 superfamily in colon cancer[J]. Br J Cancer, 2003, 89(1): 158 - 167.

[9] Jackson P, Marreiros A, Russell P J. KAI1 tetraspanin and metastasis suppressor[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(3): 530 - 534.

[10] Marreiros A, Dudgeon K, Dao V, *et al.* KAI1 promoter activity is dependent on p53, junB and AP2: evidence for a possible mechanism underlying loss of KAI1 expression in cancer cells[J]. Oncogene, 2005, 24(4): 637 - 649.

[11] Si S H, Yang J M, Peng Z H, *et al.* Effects of KAI1 gene on growth and invasion of human hepatocellular carcinoma MHCC97-H cells [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(14): 2019 - 2023.

（编辑　汪勤俭）