CD147分子在胆管癌浸润及转移中作用及机制的研究

贺伟旗[1],王曙光[2],顾建文[1],匡永勤[1],程敬民[1],邢学民[1],杨文涛[1],张俊海[1] (1.成都军区总医院神经外科,四川 成都 610083;2.第三军医大学西南医院,全军肝胆外科研究所,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 了解CD147与胆管癌侵袭转移的关系。**方法** 通过RT-PCR和免疫荧光法了解CD147在胆管癌细胞株QBC939中的表达,然后构建反义CD147分子基因片断的重组腺病毒抑制胆管癌细胞株CD147分子的表达,观察其基质金属酶MMPs改变及生长情况。**结果** CD147分子在胆管癌细胞株QBC939中表达,表明反义CD147通过抑制肿瘤细胞的CD147分子的表达,主要减少了肿瘤组织中基质金属酶MMP-2,而不是MMP-9的表达,导致肿瘤的生长抑制。**结论** CD147分子的高表达能够促进胆管癌的肿瘤生长,并且CD147促进肿瘤生长的能力可能与MMP-2的高表达密切相关。

[关键词] 胆管癌;CD147;肿瘤转移;MMP-2;MMP-9

[中图分类号] R735.8 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2010)04-0263-03

Mechanism of CD147 and its effect on the invasion and metastasis of bile duct carcinoma

HE Wei-qi, WANG Shu-guang, GU Jian-wen, KUANG Yong-qin, CHENG Jing-min, XING Xue-min, YANG Wen-tao, ZHANG Jun-hai (Department of Neurosurgery, Chengdu General Army Hospital, Chengdu Sichuan 610083, China)

Abstract: Objective To explore whether CD147 had involved in the metastasis and invasion of bile duct cancer or not. **Methods** The expression of CD147 in bile duct cancer cell strain QBC939 was surveyed by RT-PCR and indirect immunofluorescence. Then a recombinant adenoviral vector containing CD147 cDNA in an antisense orientation was constructed and transfected to QBC939. The matrix metalloproteinase (MMPs) and the growth of QBC939 with antisensed CD147 cDNA were tested. **Results** In this study, the expression of CD147 in human bile duct cancer cell strain QBC939 was confirmed by RT-PCR and indirect immunofluorescence. The results showed that the antisensed CD147 can inhibit the invasion and metastasis of bile duct cancer cells by decreasing the expression level of MMP-2, not MMP-9. **Conclusion** This study indicates that blocking the molecule expression of CD147 may be an effective way to inhibit the development of the tumor.

Keywords: bile duct cancer; CD147; metastasis

胆管癌可通过多种途径转移[1]。CD147是一种广泛分布于多种细胞的属于免疫球蛋白超家族(immunoglobulin superfamily,IgSF)的跨膜糖蛋白。在多种肿瘤中发现有CD147表达的增高,并与肿瘤的浸润和转移相关。有学者从人肺癌LX-1细胞膜上分离出来CD147-MMP-1复合物,说明CD147不仅能刺激纤维母细胞产生MMP-1,还能结合MMP-1于肿瘤细胞表面,从而促进肿瘤的浸润[2]。有研究表明,MMPs在胆管癌的浸润及转移中也起了很重要的作用[3-4]。而CD147是否参与调节胆管癌的浸润及转移过程,CD147刺激MMPs产生的作用及两者的关系尚未见文献报道。本研究设想对于MMP上游的CD147分子进行干预将会对胆管癌的生物学行为产生影响,从而对胆管癌的浸润及转移起到抑制或阻断的作用。以胆管癌细胞株QBC939细胞为研究对象,首先了解CD147分子在其中的表达,并通过构建携带反义CD147分子的腺病毒载体,将其转染胆管癌细胞株QBC939细胞,以观察减少CD147分子信号通路对胆管癌体外及体内生物学行为的影响,探讨CD147的表达与MMPs之间的关系及在胆管癌浸润及转移中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

实验细胞株:人胆管癌细胞株QBC939由全军肝胆外科研究所建立。实验动物:健康纯种SPF级BALB/C 6周龄雌性裸鼠15只,体重(24±3)g,购自上海药物研究所实验技术中心。实验试剂:各种限制性内切酶,T4 DNA聚合酶、Taq DNA聚合酶、RT-PCR试剂盒购自Roche公司。PCR产物试剂盒、小量质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、DNA快速连接试剂盒购自宝生物公司。脂质体转染试剂盒Lipofectin Reagent购自Invitrogen公司,AdEasy XL Adenoviral Vector System试剂盒购自Stratagene公司。FITC标记和HRP标记的羊抗兔IgG、兔抗人CD147抗体、兔抗人MMP-2抗体和兔抗人MMP-2抗体购自武汉博士德公司。

[作者简介] 贺伟旗(1969-),男,湖南省双峰县人,主治医生,博士,主要从事神经外科临床方面的研究。电话:(028)86571091

[通迅作者] 王曙光,第三军医大学西南医院,全军肝胆外科研究所教授,电话:(023)68754619

[收稿日期] 2010-04-15 [修回日期] 2010-06-16

1.2 方法

1.2.1 QBC939 细胞中 CD147 mRNA 表达检测(RT-PCR) 登录 Genebank 根据人 CD147 的基因序列,运用 Primer5 软件设计得到目的基因引物:5'-GAAGGAAGTGTATGATGGGAAT-3' 和 5'-GCGGTTGGAGGTTGTAGG-3'。提取培养 72h 的 QBC939 细胞总 RNA,按 RT-PCR 试剂盒说明书行 cDNA 链的合成和 PCR 扩增,所得到的 PCR 产物通过凝胶电泳进行鉴定。

1.2.2 免疫荧光法检测 QBC939 细胞中 CD147 蛋白表达 QBC939 细胞培养 72 h 后,PBS 洗涤 3 次,用 4% 的多聚甲醛固定。滴加未标记的兔抗人 CD147 抗体(1∶200),37 ℃孵育 30 min 后,PBS 洗涤 3 次。加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG 抗体(1∶100),37 ℃孵育 30 min 后,PBS 洗涤 3 次,并置于荧光显微镜下观察。

1.2.3 反义 CD147 腺病毒载体的构建及扩增 通过 PCR 方法扩增人全长 CD147 cDNA 片断,扩增的 cDNA 连接到 pGEM T-Easy 质粒中进行大量扩增。得到的 CD147 cDNA 片断与 pShuttle-CMV 质粒反向连接,连接后得到 pShuttle-CMV-as-CD147,同时转 DH5α 感受态菌株进行扩增、酶切和电泳鉴定。pShuttle-CMV-asCD147 穿梭质粒在 BJ5183 菌株中与 pADEasy 质粒进行同源重组,将目的基因重组到腺病毒基因组质粒中得到 pADEasy-CMV-asCD147 质粒,同时进行克隆扩增和酶切鉴定。pADEasy-CMV-asCD147 质粒转染 QBC939 细胞,4 ~ 7 d 后观察细胞病变效应;收集病变的 QBC939 细胞和培养上清液反复冻融、离心后进行脱水浓缩得到重组腺病毒。

1.2.4 Western-blotting 检测反义 CD147 转染后 QBC939 细胞中 CD147、MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达 将 QBC939 细胞分为 Ad-asCD147 转染组、Ad-LacZ 转染组和空白对照组。将各组细胞裂解蛋白进行 SDS PAGE 电泳后,半干法(1 mA/cm^2,60 min)电转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭,加入兔抗人 CD147 抗体、MMP-2 及 MMP-9(1∶200),4 ℃过夜,1‰TBST 洗膜,加入 HRP 标记羊抗兔 IgG(1∶5 000),37 ℃孵育 1 h,1‰TBST 洗膜,化学发光试剂检测。

1.2.5 裸鼠荷瘤实验 将 6 周龄雌性 BALB/C 裸鼠 15 只,随机分为 3 组:PBS 对照组、Ad-LacZ 组和 Ad-asCD147 组,每组 5 只。分别取对数期生长的 PBS 对照组、Ad-LacZ 转染组和 Ad-asCD147 转染组 QBC939 细胞悬液,调整到细胞数 5×10^7/mL 后,每只裸鼠皮下接种 0.2 mL 细胞悬液。接种 1 周后用游标卡尺测量肿瘤的长径(L)和短径(S2),计算肿瘤的体积(V),计算公式为 $V = L \times S2 \times 0.4$。

1.3 统计学处理

SPSS 11.0 对数据进行统计及检验,结果用均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组间分别进行独立样本 t 检验,检测均值有无显著性差异,$P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 QBC939 细胞中 CD147 mRNA 的表达

RT-PCR 扩增可见 QBC939 细胞中 CD147 mRNA 有表达。扩增基因片段大小为 986 bp,与预期的大小相等(图 1)。

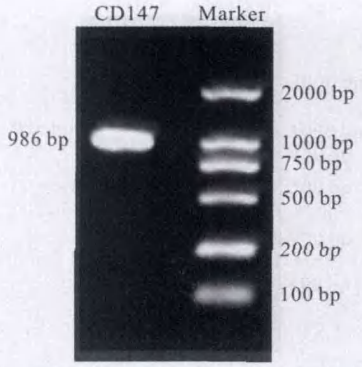


图 1 QBC939 细胞中 CD147 mRNA 表达

2.2 QBC939 细胞中 CD147 蛋白表达

免疫荧光结果显示,CD147 是一种膜蛋白,主要表达在 QBC939 细胞的胞膜上,在胞浆中也有少量的表达(图 2)。

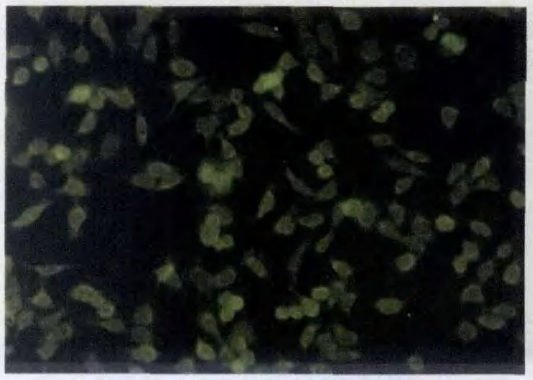
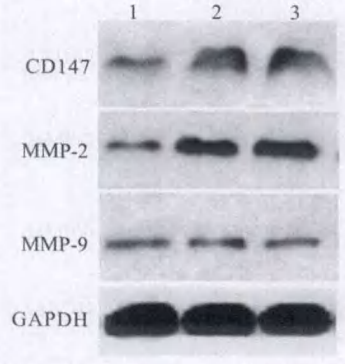


图 2 CD147 在 QBC939 细胞中的表达(×200)

2.3 反义 CD147 转染 QBC939 细胞后 CD147、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达

运用 Western-bloting 检测反义 CD147 转染 QBC939 细胞后 CD147、MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达变化见图 3。运用 Mias 软件分析各条带的积分光密度值,发现经反义 CD147 转染后,QBC939 细胞中 CD147 蛋白表达与对照组及 LacZ 组相比较明显下调($P < 0.01$);反义 CD147 组 MMP-2 蛋白表达与在对照组及 LacZ 组相比明显下调($P < 0.01$);而 MMP-9 无明显变化($P > 0.05$)。所有对照组与 LacZ 组相比,CD147、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达均无明显变化($P > 0.05$)。



1:对照组;2:LacZ 组;3:反义 CD147 组

图 3 各组 CD147、MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达检测

2.4 反义 CD147 对肿瘤体积增长的影响

15只裸鼠接种肿瘤细胞,种植1周后计算肿瘤的体积,结果表明,三组肿瘤体积均有增长,从第2周开始,反义 CD147 组对比 LacZ 组、PBS 组,肿瘤增幅明显减少($P<0.01$);而 LacZ 组与对照组比较,肿瘤增幅无明显差异($P>0.05$),说明反义 CD147 组的肿瘤生长受到明显的抑制(图4)。

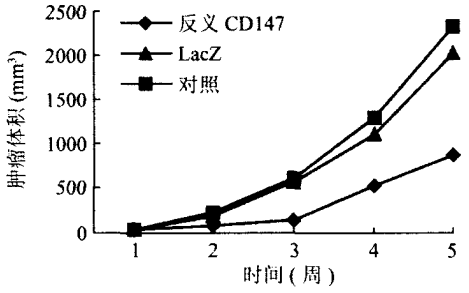


图4 肿瘤生长体积变化

3 讨论

CD147 参与多种不同的生理过程并具有多种不同的生理功能[5-6]。有研究发现,癌周间质细胞与癌细胞的相互作用可显著上调 MMPs 在癌变组织中的分泌水平,而表达在肿瘤细胞表面的 CD147 分子可以对肿瘤及瘤周的 MMPs 有调节的作用[7],CD147 分子是肿瘤的浸润和转移的一个不可忽视的因子。

在多种肿瘤中均发现有 CD147 表达的增高,在部分肿瘤中随着肿瘤恶性程度的增高,CD147 的表达也增高。有研究表明 CD147 分子在转移的肿瘤中表达更高,推测在肿瘤细胞中高表达的 CD147 通过刺激肿瘤周及瘤内的成纤维细胞表达 MMPs 来促进肿瘤细胞的浸润及转移[8]。Zucker 等将 EMMPRIN(CD147)转染人类乳腺癌细胞株 MDA-MB-436 后种植裸鼠,转染的细胞株与未转染者相比表现出更强的致瘤性及浸润性,同时发现它可以促进肿瘤中胶原酶 MMP-2 及 MMP-9 的表达增加,据此推测,CD147 在肿瘤浸润及生长中通过促进 MMPs 的表达而起重要作用[9]。MMPs 在肿瘤侵袭和转移发挥重要作用,其中最重要的是 MMP-2 和 MMP-9[10]。MMPs 主要通过以下几种机制促进肿瘤的侵袭性生长:①MMPs 作用使肿瘤细胞周围的物理屏障破坏;②MMPs 可重塑细胞间粘附力,以便肿瘤细胞向周围生长;③MMPs 通过对细胞外基质的改建,促进肿瘤新血管的形成[11]。同时,活化的 MMPs 可使其他 MMPs 活化,其具有相互激活的能力[12]。

本实验中发现胆管癌细胞表达 CD147 分子,同时进一步通过反义 CD147 分子转染人胆管癌细胞株下调肿瘤细胞的 CD147 分子后,发现肿瘤细胞中 MMP-2 的表达量也随之明显下调,而 MMP-9 却没有变化。这表明 CD147 分子的表达与胆管癌细胞中 MMP-2 的表达密切相关,CD147 分子表达的下调可使 MMP-2 的表达明显下降。而 CD147 调节 MMP-2 的信号通路及机制有待进一步的研究。通过裸鼠荷瘤实验发现下调了 CD147 分子的胆管癌细胞在动物体内的生长速度明显减缓,表明 CD147 分子的高表达能够促进胆管癌的肿瘤生长,并且 CD147 促进肿瘤生长的能力可能与 MMP-2 的高表达密切相关。

[参考文献]

[1] 王曙光,韩本立,陈意生,等. 胆管癌转移途径的研究[J]. 中华外科杂志,1996,34(6):352-354.

[2] Guo H, Li R, Zucker S, et al. EMMPRIN (CD147), an inducer of matrix metalloproteinase synthesis, also binds interstitial collagenase to the tumor cell surface[J]. Cancer Res, 2000,60(4):888-891.

[3] 王耀东,施作霖,邱福南,等. MMP-9,IV 型胶原和 CD44v6 在肝门部胆管癌中的表达及与预后关系的探讨[J]. 中华肝胆外科杂志,2001,7(2):115.

[4] 杨福全,戴显伟,赵海鹰,等. 肝门胆管癌基质金属蛋白酶 MMP-2 及其组织抑制因子 TIMP-2 表达及意义的研究[J]. 中国现代普通外科进展,2002,5(2):80-84.

[5] Yurchenko V, O'Connor M, Dai WW, et al. CD147 is a signaling receptor for cyclophilin B[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001,288(4):786-788.

[6] Pushkarsky T, Zybarth G, Dubrovsky L, et al. CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001,98(11):6360-6365.

[7] Misra S, Ghatak S, Zoltan Jones A, et al. Regulation of multidrug resistance in cancer cells by hyaluronan[J]. J Biol Chem, 2003,278(28):25285-25288.

[8] Kanekura T, Chen X, Kanzaki T. Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts[J]. Int J Cancer, 2002,99(4):520-528.

[9] Zucker S, Hymowitz M, Rollo EE, et al. Tumorigenic potential of extracellular matrix metalloproteinase inducer[J]. Am J Pathol, 2001,158(6):1921-1928.

[10] Turpeenniemi Hujanen T. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers[J]. Biochimie, 2005, 87(3-4): 287-297.

[11] Kleiner D, Stetler Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis[J]. Cancer Chemother Pharmaclo, 1999,43(Suppl):S42-S51.

[12] Sang QX, Birkeda Hansen H, van Wart HE. Proteolytic and non-proteolytic activation of human neutrophil progelatinase B[J]. Biochim Biophys Acta, 1995,1251(2):99-108.

(编辑:杨爱军)