维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)06－0742－03

MUC1 与人乳腺癌细胞粘附能力关系的体外研究

鲁 蓁，邓华瑜，郑维萍，段 红

(重庆医科大学基础医学院病理生理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究粘蛋白 1(MUC1)与人乳腺癌细胞粘附能力的关系。方法:用苯甲基－α－N－乙酰半乳糖胺处理人乳腺癌 MDA－MB－231 高转移细胞株,免疫细胞化学法检测 MUC1 在处理前后的表达,以噻唑蓝比色法(MTT)法研究 MUC1 与肿瘤细胞的粘附能力的关系。结果:苯甲基－α－N－乙酰半乳糖胺能显著抑制肿瘤细胞 MUC1 表达而影响肿瘤细胞对 Matrigel 的粘附($P<0.01$)。结论:MUC1 与肿瘤细胞的粘附能力密切相关,MUC1 表达降低削弱肿瘤细胞的粘附能力。

【关键词】粘蛋白 1;糖基化;苯甲基－α－N－乙酰半乳糖胺;乳腺癌细胞株;粘附

【中国图书分类法分类号】R73－37 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－02－23

Study of relationship between MUC1 and adhesion of breast cancer cells

LU Li, et al

(*Department of Pathophysiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of benzyl－α－GalNAc on MUC1 expression and the adhesion of breast cancer cell line (MDA－MB－231) so as to understand the relationship between MUC1 and invasiveness of human breast cancer cells. *Methods*: The activity and expression of MUC1 in breast cancer cells were detected with immunohistochemistry. The adhesive ability of those cells to various basement membrane components were measured by MTT assay. *Results*: Benzyl－α－GalNAc significantly suppressed the expression of MUC 1 and the adhesion of the tumor cell to basement membrane($P<0.01$). *Conclusion*: There is a close relationship between MUC1 and adherence of breast cancer cells, and the MUC1 inhibitor significantly suppresses the adhesion capacity of MDA－MB－231 cell line in vitro.

【Key words】MUC1; Glycosylation; Benzyl－α－GalNAc; Breast cancer cell line; Adhesion

近来研究认为,肿瘤的侵袭转移与肿瘤细胞膜上粘液型糖蛋白的大量形成有密切关系。粘蛋白 1 (mucins－1,MUC1)是一种在恶性上皮性肿瘤高度和异常表达的膜糖蛋白,与肿瘤的粘附、侵袭、转移、预后及易感性等密切相关[1]。应用糖基化抑制剂苯甲基－α－N－乙酰半乳糖胺抑制人乳腺癌细胞株 MDA－MB－231 的 MUC1 表达,研究其对粘附能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞株 MDA－MB－231(美国 ATCC)由重庆医科大学临床学院外科教研室惠赠。苯甲基－α－N－乙酰半乳糖胺购自 Sigma 公司;Matrigel 购自 B. D 公司;RPMI 1640 培养基购自 Hyclone 公司;新生小牛血清(NCS)购自杭州四季青生物工程材料有限公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)购自上海华舜生物工程有限公司;二甲基亚砜(DMSO)为化学纯,重庆东方试剂厂;单克隆抗体抗 MUC1 蛋白和 SP 试剂盒为北京中山公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人乳腺癌细胞株 MDA－MB－231 培养于含有 10%新生牛血清、青霉素(100U/ml)、链霉素(100μg/ml)的 RPMI 1640 培养基中,于 37℃,5%CO_2 培养箱内,常规传代培养,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 实验分组 ①对照组:不加苯甲基－α－N－乙酰半乳糖胺,每天换 1640 培养液。②实验组:细胞进入对数生长期后开始加苯甲基－α－N－乙酰半乳糖胺(2mmol/L)[6],培养细胞 24h,每天换液以维持药物浓度恒定,每组均设五个平行孔。

1.2.3 免疫细胞化学染色 6 孔培养板中放置 22mm×22mm 的盖玻片,制备细胞爬片;加药组加入 2mmol/L 苯甲基－α－N－乙酰半乳糖胺;72h 后取出采用 SP 法染色,一抗

作者介绍:鲁 蓁(1977－),女,硕士生,
主要研究方向:肿瘤侵袭转移。

基金项目:重庆市医学科技计划项目(编号:99－2031)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

为抗 MUC1 蛋白单克隆抗体(1∶100),DAB 显色,Mayer's 苏木素复染,中性树胶封片。

SP 法免疫细胞化学检测 MUC1 阳性表达以细胞浆有明显黄棕色颗粒状染色为准。SP 染色判读分 3 级,染色阴性(-):阳性细胞<5%;染色阳性(+):5%~50%细胞阳性染色;染色强阳性(++):阳性细胞>50%。MUC1 高表达的乳腺癌细胞为阳性对照,以 PBS 代替一抗作为空白对照。所有结果均经 χ^2 检验。

1.2.4 粘附实验[2]:

将苯甲基-α-N-乙酰半乳糖胺加入 RPMI-1640 培养液中成 2mmol/L 浓度,与 MDA-MB-231 细胞在 37℃,5%CO_2 条件下共同孵育 48h,经 0.1%胰蛋白酶消化细胞,PBS 洗涤后,以 0.1%BSA-RPMI 1640 调细胞为 8×10^5/ml,100μl/孔加入经 Matrigel 5μg 包被、2%BSA 封板处理的 96 孔培养板内;CO_2 培养箱孵育 30min、60min、90min、120min 后,于各时间点弃去相应各组孔内培养液,PBS 冲洗去除未粘附的肿瘤细胞;弃 PBS 后每孔加 MTT 溶液 20μl、无血清 RPMI 1640200μl,CO_2 箱孵育 3h;吸弃 MTT-1640 培养上清液,加入 DMSO 200μl 溶解 formazan,酶联免疫检测仪 570nm 测各孔 OD 值,计算细胞粘附率。

细胞粘附率=(实验组 OD 值/对照组 OD 值)×100%

1.3 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件处理。

2 结 果

2.1 免疫细胞化学染色

MUC1 粘蛋白的表达主要在细胞浆内,在对照组呈阳性表达,加药组的表达水平明显降低。经 χ^2 检验,MUC1 在用苯甲基-α-N-乙酰半乳糖胺处理后的 MDA-MB-231 乳癌细胞中阳性率明显低于其未处理组的阳性率($P<0.01$)。

加药前后 MUC1 的表达情况见图 1、2,表达阳性率结果见表 1。

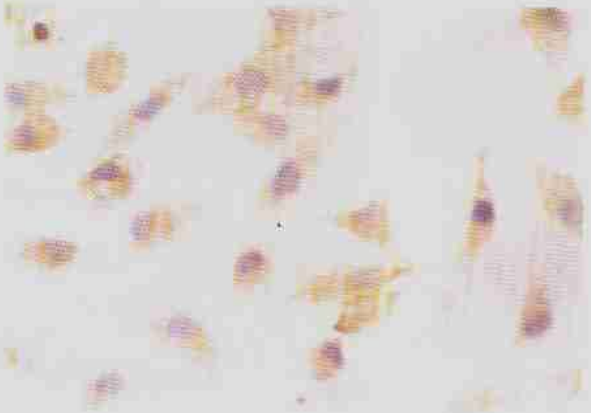


图 1 MDA-MB-231 细胞未加药组 MUC1 的表达阳性(IHC,ABC-DAB ×400)

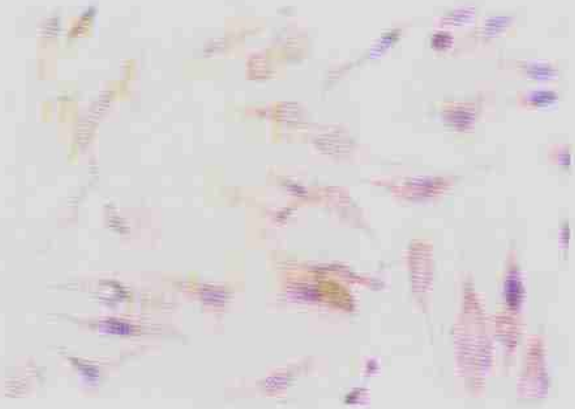


图 2 加苯甲基-α-N-乙酰半乳糖组 MUC1 的表达明显减弱(IHC,ABC-DAB ×400)

表 1 Benzyl-α-GalNAc 对 MDA-MB-231 细胞 MUC1 表达阳性率的影响

标本例数	阳性例数			阳性率%
	+	++		
加药组	18	11	3	4	38.9
未加药组	15	4	6	5	73.3*

*与加苯甲基-α-N-乙酰半乳糖胺组比较,$P<0.01$

表 2 Benzyl-α-GalNAc 对 MDA-MB-231 细胞粘附率的影响

	30min	60min	90min	120min
加药组	0.331±0.004	0.547±0.031	0.726±0.036	0.856±0.001
未加药组*	0.529±0.025	0.687±0.040	0.898±0.006	0.961±0.023

*与加苯甲基-α-N-乙酰半乳糖胺组比较,$P<0.001$

2.2 细胞的粘附能力

MTT 法测得 MDA-MB-231 细胞粘贴率的变化情况,随着时间的延长,细胞的粘贴能力增加;未加药组细胞比相应的加药组细胞粘贴率有更明显的增加。见表 2。

3 讨 论

粘附是肿瘤侵袭和转移的始动因素,在肿瘤侵袭三个相互协调的基本过程中,肿瘤细胞首先通过膜表面受体(MUC1、Integrins、Cadherins 等)粘附于基底膜及细胞外基质的成分 Matrigel、纤维粘连蛋

维普资讯 http://www.cqvip.com

白(Fibronectin,FN)、层粘连蛋白(Laminin,LN)和Ⅳ型胶原(Type Ⅳ Collagen)上[4]。MUC1 是一种Ⅰ型跨膜糖蛋白,主要分布在乳腺、卵巢等器官的腺上皮细胞的管腔或腺腔面,呈顶端表达,极性分布[5]。肿瘤细胞膜上的 MUC1 通过表达增多而干预整合素、钙粘连素的表达,影响Ⅳ型胶原酶的分泌,MUC1 亦可通过在细胞表面的过度表达减少细胞—细胞、细胞—细胞外基质的粘附使肿瘤细胞易于从原发位脱离[6],从而更利于肿瘤细胞的转移。

苯甲基-α-N-乙酰半乳糖胺是抗细胞跨膜糖蛋白 MUC1 糖基化的药物,一种糖基化抑制剂[7]。免疫细胞化学结果证明苯甲基-α-N-乙酰半乳糖胺降低 MDA-MB-231 细胞表面蛋白 MUC1 的表达。本实验选择 Matrigel 作为粘附基质,粘附实验结果表明,苯甲基-α-N-乙酰半乳糖胺对高转移的细胞株 MDA-MB-231 表现了明显的粘附抑制作用,从而可以使肿瘤细胞与继发灶的细胞外基质的粘附能力降低,而瘤细胞的粘附性与转移过程密切相关。苯甲基-α-N-乙酰半乳糖胺可使乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的粘附性降低,其作用机制与抑制 MUC1 蛋白的表达相关。苯甲基-α-N-乙酰半乳糖胺可能通过降低 MUC1 的表达水平,调节肿瘤细胞与基质细胞及血管内皮细胞之间的相互作用,从而抑制肿瘤细胞的粘附侵袭转移过程。

综上所述,苯甲基-α-N-乙酰半乳糖胺可能通过抑制 MUC1 表达影响转移级联反应的粘附和侵袭转移过程,证实糖基化程度与肿瘤侵袭转移能力密切相关,这为肿瘤转移机制的研究提供了思路。

参 考 文 献

[1] 李乔海,郭亚军.肿瘤分子生物学研究进展[M].北京:军事医学科学出版社,1996:117-1280.

[2] Pereda MP, Hopfner U, Pagotto U, et al. Retinoic acid stimulates meningioma cell adhesion to the extracellular matrix and inhibits invasion[J]. Br J Cancer, 1999;81(3):381-386.

[3] Aznavoorian S, Syetler-Stevenson WG, Liotta LA. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis[J]. Cancer, 1993;71:1368.

[4] Schroeder JA, Thompson MC, Gardner MM, et al. Transgenic MUC1 interacts with Epidermal Growth Factor Receptor and correlates with Mitogen-activated Protein Kinase activation in the mouse mammary gland[J]. Biol Chem, 2001;276(16):13057-13064.

[5] 张立新,李春海.MUC1 粘蛋白的免疫生物学作用及其在肿瘤生物治疗中的应用[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2000;7(3):165-170.

[6] Schwqrtz B, Robert S. The role of mucin in colon-cancer metastasis[J]. Cancer, 1992;52(1):60-65.

(上接第 733 页)

[6] M. G Cosoc piqueras. Disease of the airways in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Eur Respir J, 2001;18(supply 34):41s-49s.

[7] Coker ML, Zellner JL, Crumbley AJ, et al. Defects in matrix metalloproteinase inhibitory stoichiometry and selective MMP induction in patients with nonisehemic or ischemic dilated cardiomyopathy[J]. Ann N Y Acad Sci, 1999;878:559-562.

[8] Raulo SM, Sorsa TA, Kiili MT, et al. Evaluation of collagenase activity, matrix metalloproteinase-8, and matrix metalloproteinase-13 in horses with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Vet Res, 2001;62(7):1142-1148.

[9] Lourdes S, Annie P, Miguel G, et al. Upregulation of Gelatinases A and B, Collagenases 1 and 2, and Increased Parenchymal Cell Death in COPD[J]. Chest, 2000;117:684-694.

[10] Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions[J]. Eur J Cell Biol, 1997;74(1):111-122.

[11] 车东媛,黄侠君.慢性阻塞性肺疾病与肺构形重建[J].中华结核和呼吸杂志,1999;22(8):472-474.

[12] Hayakawa. T. K, Yamashita. K, Tanazawa. E, et al. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinase 1(TIMP-1) for a wide range of cells[J]. FEBS Lett, 1992;298:29-32.