文章编号:0253－3626(2003)01－0046－03

卡介菌多糖核酸对肺癌细胞与脐静脉血管内皮细胞粘附力学特性影响

沈　庆[1]，薛亚梅[2]，吴泽志[3]

(1.重庆市第三人民医院老年科，重庆　400014；2.重庆医科大学第二临床学院呼吸内科，重庆　400010；
3.重庆大学生物工程学院，重庆　400044)

【摘　要】目的：本文从生物力学角度揭示在卡介菌多糖核酸(BCG－PSN)作用下，肺癌细胞与脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)的粘附力学特性。方法：采用微管吸吮技术定量测定低转移人肺腺癌(PAa)细胞和高转移人肺巨细胞癌(PG)细胞与脐静脉血管内皮细胞的粘附力(Fa)及相对粘附应力(S_1)；并观察在卡介菌多糖核酸(BCG－PSN)作用下，Fa 和 S_1 变化。结果：①肺癌细胞与 HUVEC 的粘附力(Fa)PG 细胞大于 PAa 细胞，用 BCG－PSN 后，其在 PAa 细胞呈浓度依赖性及时间依赖性下降，在 PG 表现在 50μg/ml 及以上浓度组粘附力呈明显浓度依赖性下降。②肺癌细胞与脐静脉血管内皮细胞的 S_1 与 Fa 的变化有较好的一致性。结论：实验条件下 PG 细胞与 HUVEC 的粘附力大于 PAa 的细胞，且两种细胞与内皮细胞的粘附力均受 BCG－PSN 的抑制，表明 PG 细胞具有较高的血行转移潜能及 BCG－PSN 抗肿瘤作用。

【关键词】肺肿瘤；细胞；细胞培养；微管吸吮技术；细胞粘附

【中国图书分类法分类号】R734.2　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2002－03－18

The effect of BCG－PSN on the mechanical properties of adhesion between PG cells or PAa cells and HUVEC

SHEN Qing, et al

(*Department of Gerontology, the Third People's Hospital of Chongqing*)

【Abstract】*Objectives*: To investigate the effect of BCG－PSN on the mechanical properties of adhesion between lung cancer cells and human umbilical vein endothelial cells. *Methods*: Micropipette aspiration technique was used to investigate quantitatively the adhesion force (Fa) and the relative adhesion stress (S_1) between high metastatic human lung giant cell carcinoma (PG) cells or low metastatic lung adenocarcinoma (PAa) cells and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Further, we invistgated the effect of bacillus of Calmette and Guerin－polysaccharide nucleic acid (BCG－PSN) on Fa and S_1. *Results*: The adhesion force (Fa) of PG cells to HUVEC were higher than that of PAa cells under the experimental condition. With treatment using BCG－PSN, the values of the adhesion force of PAa cells to HUVEC decreased in a concentration－dependent and time－dependent manner. For PG cells, treatment with a concentration of 50μg/ml or higher resulted in a continuous decrease of the cell adhesion force. And the adhesion force to HUVEC decreased continuously with the duration of treament from 30 minutes to 48 hours, but they increased significantly again in 72 hours after treatment. The relative adhesion stress between lung cancer cells and HUVEC, S_1, changed almost in the same tendency as the adhesion force, Fa. *Conclusion*: The adhesion forces of PG cells to HUVEC were higher than that of PAa cells under the experimental condition. The adhesion forces of both of the lung cancer cells to HUVEC can be inhibited by BCG－PSN. These results might be relative to the high metastatic potential of PG cells through blood circulation, and to the antitumor action of BCG－PSN.

【Key words】Lung neoplasms; Cell; Cell culture; Micropipette aspiration; Cell adhesion

肺癌转移是肺癌患者死亡的主要原因，然而，肺癌转移的确切机制至今尚未阐明。Weiss 认为[1]，癌细胞在血液流运过程中，与内膜发生短暂接触，继而沿血管壁滚动，其中大部分癌细胞被血流冲走，只有少量癌细胞存活，变形，与内膜粘附，穿过内膜形成转移。因此，癌细胞发生血道转移的关键是与内皮细胞粘附。本文采用先进的微管吸吮技术检测了

作者介绍：沈　庆(1969－　)，女，主治医师，硕士，
主要研究方向：肺癌的生物力学。

在卡介菌多糖核酸(BCG－PSN)作用下,低转移人肺腺癌(PAa)细胞和高转移人肺巨细胞癌(PG)细胞与脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)的粘附力(Fa)及相对粘附应力(S_I)。力图从生物力学角度揭示在卡介菌多糖核酸(BCG－PSN)作用下,肺癌细胞与脐静血管内皮细胞的粘附力学特性。

1　材料与方法

1.1　材料

高转移人肺巨细胞癌细胞(PG)及低转移人肺腺癌细胞(PAa)购于北京医科大学病理教研究室。卡介菌多糖核酸(BCG－PSN,又名期奇康注射液。批号 000724－5,000724－2)及其无菌生理氯化钠溶液由湖南九芝堂股份有限公司提供。RPMI－1640、DME/F12 为 Gibo 公司产品,小牛血清为 Hyclono 公司产品。

1.2　方　法

1.2.1　肺癌细胞培养及分组　PG 和 PAa 在含 10% 小牛血清的 RPMI－1640 培养液内常规传代培养后。接种于 12 孔板内,加 BCG－PSN,浓度分别为 25、50、100、200、400μg/ml。对照组以无菌生理氯化钠溶液代替,在 37℃ 5% CO_2 培养箱内培养 48h 后,制成浓度为 1×10^3/ml 的细胞悬液备用。实验组观察时相点在与 BCG－PSN200μg/ml 共孵育后,分别于 30min、12h、24h、48h、72h 后收获细胞,制成浓度为 1×10^3/ml 细胞悬液备用。

1.2.2　原代人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)培养　无菌生理盐水灌洗新生儿脐静脉后,将另端用止血钳钳闭,灌注 0.25% 胰蛋白酶约 10～15ml,37℃ 孵育 10min 后将含有内皮细胞的胰蛋白酶注入 50ml 离心管中,以 0.9% 生理盐水冲洗脐静脉,加入小牛血清 2ml 终止反应,离心收集细胞,以 1×10^5 个/ml 接种于特制的微管吸吮实验的圆形小室(Chamber)中,培养 24h 后,加入待测细胞上机检测。

1.2.3　微管吸吮实验系统及微管吸吮实验过程　采用微管吸吮实验系统[2],将 0.5ml 肺癌细胞悬液注入长满内皮细胞的 Chamber 中静置 0.5h 后,镜下确认待测试的 PG－HUVEC 或 PAa－HUVEC 粘附细胞对后,引导微管尖端靠近 PG 或 PAa 细胞表面,以一定的负压以吸吮 PG 或 PAa 细胞,使 PG 或 PAa 离开与其粘附的 HUVEC,以 1mmH_2O 为步长,逐步增加吸吮负压,直至求得能使 PG 或 PAa 与 HUVEC 粘附分离的临界负压值(Critical Separation Negative Pressure, △P)。同此过程每份标本连续测定 10 个以上细胞。

1.3　粘附力的计算及统计处理

利用显微摄像及图像处理系统,测得 PG 或 PAa 的半径(Rc)及微管尖端半径(Rp)。定义 PG 或 PAa 与 HUVEC 间粘附力(Adhesive Force,Fa)和相对粘附应力(Relative Adhesion Stress,S_I)为:

$$Fa=\triangle P\pi R_P^2$$

$$S_I=\triangle P(R_P/R_C)^2$$

以 Fa 和 S_I 两指标作为评价肺癌细胞与 HUVEC 粘附强度的定量指标。

1.4　统计学分析

采用两样本均数的 t 检验。

2　结　果

2.1　BCG－PSN 对肺癌细胞 Fa 及 S_I 的影响(见图 1、2)

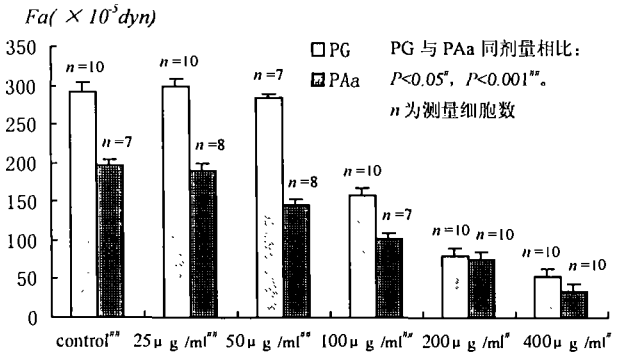


图 1　BCG－PSN 对肺癌细胞与 HUVEC 粘附力(Fa)的影响

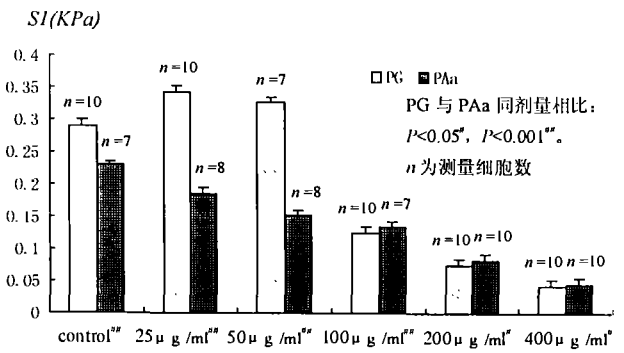


图 2　BCG－PSN 对肺癌细胞与 HUVEC 的 S_I 影响

结果显示,在未用 BCG－PSN 前 PG 与 HUVEC 的粘附力($292.704\times10^{-5}\pm89.957\times10^{-5}$ dyn)高于 PAa 与 HUVEC 的粘附力($196.09\times10^{-5}\pm66.97\times10^{-5}$dyn)($P<0.001$),在 BCG－PSN 作用下,随其浓度的增高,在 PAa 细胞粘附力呈单调浓度依赖性下降($P<0.001$)。PG 细胞粘附力在 25μg/ml 组无明显作用,在 50μg/ml 及以上浓度组

呈明显浓度依赖性下降($P<0.001$)(见图 1)。

从图 2 可见,S_1 与 Fa 变化有较好的一致性,即用 BCG－PSN 以后,在 PAa 细胞相对粘附应力呈单调浓度依赖性及时间依赖性下降($P<0.001$)。在 PG 表现为 25μg/ml 无明显作用,在 50μg/ml 及以上浓度组粘附力呈明显浓度依赖性下降。

2.2　BCG－PSN 处理不同时间对肺癌细胞 Fa 及 S_1 的影响(见图 3、4)

BCG－PSN 200μg/ml 处理后,PG 与 HUVEC 粘附力(Fa)在 12h 开始下降,至 48h 达高峰,72h 出现反弹,与对照组比较($P<0.001$),有显著统计学意义。PAa 与 HUVEC 粘附力(Fa)在 24h 以前无明显差异($P>0.05$)。24h 以后呈逐渐下降趋势,72h 基本稳定,与对照组比较($P<0.001$),有显著统计学意义(见图 3)。

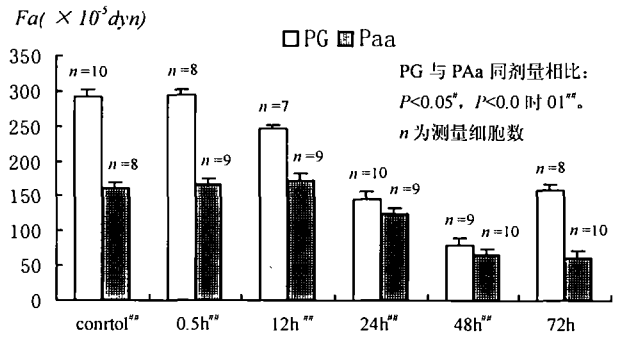


图 3　BCG－PSN 200μg/ml 处理后不同时间肺癌细胞与 HUVEC 的 Fa 变化

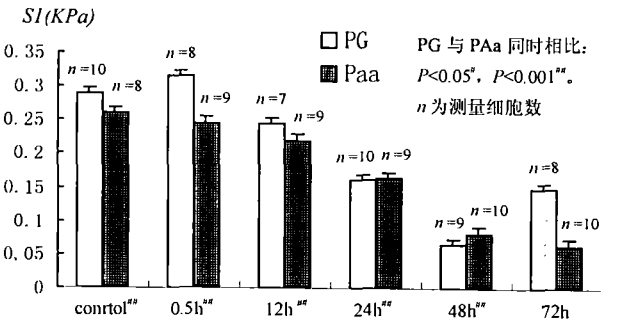


图 4　BCG－PSN 处理 200μg/ml 后不同时间肺癌细胞与 HUVEC 的 S_1 变化

从图 4 可见,S_1 与 Fa 变化有较好的一致性。各时相点表现为在开始时呈时间依赖性下降,至 72h 出现反弹。

3　讨　论

微管吸吮技术能通过测量在一定负压吸吮作用下细胞的变形及其时间历程,来评价单个细胞的粘弹特性及单细胞的粘附力[2,3]。本实验应用该技术,检测了肺癌细胞与 HUVEC 的粘附力。发现 PC 与 HUVEC 的粘附力($292.704\times10^{-5}\pm89.957\times10^{-5}$dyn)显著高于PAa与HUVEC的粘附力($196.09\times10^{-5}\pm66.97\times10^{-5}$dyn)($P<0.001$),PG 细胞较之 PAa 细胞更易与血管内皮细胞粘附,既而穿过内皮细胞,定植在靶器官形成转移灶。表明肿瘤细胞与血管内皮细胞的粘附能力与其血路转移能力是一致的。

BCG－PSN 是一种卡介苗的酚提取物,其主要作用是增强机体内 NK 细胞活性,白细胞介素 2(IL－2)、白细胞介素受体(IL－2R)表达,及干扰素诱生水平的活性[4]。本实验表明,用 BCG－PSN 后,其在 PAa 细胞呈浓度依赖性及时间依赖性下降,在 PG 表现为 25μg/ml 无明显作用,在 50μg/ml 及以上浓度组粘附力呈明显浓度依赖性下降。各时相点表现为在开始时呈时间依赖性下降,至 72h 出现反弹。提示 BCG－PSN 的抗肿瘤作用可能是对肺癌细胞粘附性的抑制。大量研究表明肿瘤细胞与内膜的短暂接触过程可能是肿瘤细胞与内皮细胞粘附强化的启动过程[5],这一过程的完成依赖于肿瘤细胞 CAM(细胞粘附分子)的异常表达,并介导与内皮细胞相互识别和粘附,最终实现肿瘤的转移和扩散[6]。BCG－PSN 是否通过抑制肺癌细胞上 CAM 的表达进而影响肺癌细胞的粘附性,尚有待于我们进一步深入的研究。

实验中,另外还以细胞半径对粘附力(Fa)值进行归一化处理定义出相对粘附应力(S_1),发现 S_1 与 Fa 的变化有较好的一致性。这一结果与文献报道一致[2]。实际上这里定义的相对粘附应力是反应的细胞间的粘附应力强度。而定量研究粘附应力强度的关键是粘附面积的确定。Sung[7]等曾采用荧光标记结合共焦显微镜的方法来确定细胞对间的粘附面积。在实验条件下不能确定细胞对间的粘附面积,而以细胞半径对粘附力值进行归一化处理,反应的实际上是临界负压△P 作用下分布于肺癌细胞最大横切面上的 Lagrange 应力。因此,(下转第 56 页)

ol,1999;198(4):497－505.

[2] De Vries HE, Blom Roosenialen MC, de Bore AG, et al. Effect of endotoxin on permeability of bovine cerebral endothelial cell layers in vitro[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1996; 277(3):1418－1423.

[3] 尹 飞,杨于嘉,虞佩兰,等.百日咳菌液诱发大鼠脑水肿对脑组织中兴奋性氨基酸时相的变化[J].中华儿科杂志,2000,38(1):9－12.

[4] Rosenberg GA. Ischemic brain edema[J]. Prog Cardiovasc Dis,1999;42(3):209－216.

[5] 信照亮,吕 健,段国荣,等.局部应用地塞米松对创伤性脑水肿及血脑屏障通透性的影响[J].中华实验外科杂志,1997;14(6):355－356.

[6] Lothar Schilling, Michael Wahl. Brain edema: Pathogenesis and therapy[J]. Kidney Int,1997;51(59):69－75.

[7] 张育才,张宇鸣,汤定华,等.家兔内毒素性脑水肿降钙素基因相关肽的表达[J].中华儿科杂志,1999;37(10):601－603.

[8] Xaio h, Banks WA, Niehoff ML, et al. Effects of LPS on the permeability of the blood－brain barrier to insulin[J]. Brain Res,2001;896(1－2):36－42.

[9] 邝 芳,王百忍,鞠 躬.静脉注射脂多糖和小剂量肾上腺素后血脑屏障的开放[J].第四军医大学学报,2000;21(1):83－85.

[10] Stanley EF. Presynaptic calcium channels and the depletion of synaptic cleft calcium ions[J]. J Neurophysiol,2000;83(1):477－482.

[11] Starikova AM, Pogorelaya NC, Kostyuk PG. Long－term depolarization changes morphological parameters of PC12 cells[J]. Neuroscience,2000;95(3):923－926.

[12] Hou. L, Wang X. PKC and PKA, but not PKG mediate LPS－induced CGRP release and $[Ca^{2+}](i)$ elevation in DRG neurons of neonatal rats[J]. J Neurosci Res,2001;66(4):592－600.

[13] Siesjo BK, Elmer E, Janelidze S, et al. Role and mechanims of secondary mitochondrial failure[J]. Acta Neurochir Suppl,1999;73(1):7－13.

[14] Morioka M, Hamada JI, Ushio Y, et al. Potential role of calcineurin for brain ischemia and traumatic injury[J]. Prog Neurobiol,1999;58(1):1－30.

[15] Ray SK, Fidan M, Nowak MW, et al. Oxidative stress and Ca^{2+} influx upregulate calpain and induce apoptosis in PC12 cells[J]. Brain Res,2000;852(2):326－334.

[16] Miyazaki H, Tanaka S, Fujii Y, et al. Neuroprotective effects of a dihydropyridine derivative, 1,4－dihydro－2,6－dimethy 1－4－(3－nitrophenyl)－3,5－pyridinedicarboxylic acid methyl 6－(5－phenyl－3－pyrazolyloxy)hexyl ester (CV－159), on rat ischemic brain injury[J]. Life Sci, 1999; 64(10):869－878.

(上接第 48 页)实验中 S_1 与 Fa 的差异可能与细胞粘附面积及细胞半径的差异有关。

参 考 文 献

[1] Weiss L, Dimitrow DS. A fluid mechanical analysis of the velocity, adhesion, and destruction of cancer cells in capillaries during metastasis[J]. Cell Biophysics,1984;6:9－22.

[2] 吴泽志.烧伤大鼠粒细胞与内皮细胞粘附力学特性的研究[J].生物医学工程学杂志,1996;13(3):219－222.

[3] 龙 勉,吴泽志.肝细胞粘弹性实验研究[J].生物物理学报,1996;12(1):169－172.

[4] 袁孔华,郭实土.卡介菌多糖核酸对膀胱癌患者细胞免疫功能的影响[J].中华实验外科杂志,1993;10(3):126－127.

[5] Rees DA, C. W, Loyd, et al. Control of grip and stick in cell adhesion through lateral relationships of membrane glycoproteins[J]. Nature(Lond),1977;267:124－128.

[6] Nicolson GL. Molecular mechanisms of cancer metastasis: tumor and host properties and the role of oncogenes and suppressor genes[J]. Curr Opin Oncol,1991;3:75－92.

[7] Sung PAV, L K－L, kuhlman P, et al. Force contribution of the LFA－1/ICAM－1, complex to T Cell adhesion[J]. J Cell Sci,1992;103:259－266.