DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.13.019
第26卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 13
1178 2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)13-1178-03

卡介菌多糖核酸对肺癌细胞粘附及骨架结构的影响

蒋幼凡[1],沈 庆[2],薛亚梅[1] ([1]重庆医科大学第二临床学院呼吸内科,重庆 400010;[2]重庆市第三人民医院老年科,重庆 400012)

提 要:目的 研究卡介苗多糖核酸(BCG-PSN)对肺癌细胞上粘附分子配体(sle^x)表达及肺癌细胞质内骨架的表现特征的影响。方法 采用流式细胞仪及透射电镜观察BCG-PSN对高转移人肺巨细胞癌(PG)细胞和低转移人肺腺癌(PAa)细胞上sle^x表达的影响及胞质内骨架结构的变化。结果 ①流式细胞仪分析提示PAa细胞sle^x表达高(66.8%),PG细胞表达低(5.72%)。经BCG-PSN处理后,PAa细胞sle^x表达呈浓度依赖下降。②超微结构观察:PAa细胞微丝稀疏,PG细胞微管微丝减缺。BCG-PSN处理后,PG细胞微丝较前丰富、完整,树样分布,PAa细胞仅见少量的微丝。结论 细胞内微管、微丝等细胞骨架成分的改变与癌细胞运动迁徙能力有关,BCG-PSN对肺癌细胞粘附性的抑制环节不是细胞骨架介导的粘附强化,可能是粘附分子表达下降所致的粘附强化启动过程。

关键词:卡介菌多糖核酸;肺癌细胞;粘附分子配体
中图法分类号:R730.2;R734.2;R979.5 文献标识码:A

Effects of BCG-PSN on the cell adhesion and cytoskeleton structure of lung cancer cells

JIANG You-fan[1], SHEN Qing[2], XUE Ya-mei[1] ([1]Department of Respiratory Diseases, Second Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010; [2]Department of Geriatrics, No. 3 People's Hospital, Chongqing 400012, China)

Abstract: Objective To study the effects of BCG-PSN on the expression of the receptor of selectins——one of the important cell adhesion molecules, and the characteristics of cytoskeleton structure in lung cancer cells. Methods The effects of BCG-PSN on the expression of sialyl Lewis X (sle^x) and the cytoskeleton structure of highly metastatic human pulmonary giant cell carcinoma (PG) cells and lowly metastatic human pulmonary adenocarcinoma (PAa) cells were observed by flow cytometry and transmission electron microscopy. Results Flow cytometric results showed that the expression of sle^x on the surface of PAa cells (66.8%) was higher than that on PG cells (5.72%). After treatment with BCG-PSN, the expression of sle^x on PAa cells decreased in a dose-dependent manner. Transmission electron microscopy showed that the microtubules and microfilaments were sparse in the PAa cells and diminished in PG cells. After treatment with BCG-PSN, the microfilaments were more abundant than before in PG cells and showed a branch-like appearance, but still remained sparse in PAa cells. Conclusion Changes in the components of the cytoskeleton structure are associated with the ability of the migration and movement of the tumor cells. The inhibitory effect of BCG-PSN on the adhesiveness of lung cancer cells may not be the cytoskeleton-mediated enhancement of adhesion, but the start-up process resulted from the down-regulation of cell adhesion molecules on the surface of lung cancer cells.

Key words: BCG-PSN; lung neoplasm cell; adhesion molecule receptor

肺癌是目前临床上常见的恶性肿瘤之一,国内外统计资料表明肺癌死亡率高于其它恶性肿瘤而居首位。然而,肺癌转移的确切机制至今尚未阐明。目前研究显示恶性肿瘤的浸润、转移是一个多环节的复杂的病理过程。细胞骨架结构的改变与细胞间粘附是其中的一个重要环节[1]。卡介菌多糖核酸(bacillus of calmette and guerin-polysaccharide nucleic acid, BCG-PSN)是一种卡介苗的酚提取物,研究表明BCG-PSN有抗肿瘤活性。本研究通过流式细胞仪分析及超微结构观察,探讨在BCG-PSN作用下,肺癌细胞上粘附分子配体(sle^x)表达及肺癌细胞胞质内骨架结构变化,以进一步阐明肺癌转移及BCG-PSN的抗肿瘤机制。

作者简介:蒋幼凡(1963-),女,重庆市人,硕士,副教授,主要从事肺癌方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68725251

收稿日期:2003-05-23;修回日期:2003-09-07

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料和方法

1.1　材料

高转移人肺巨细胞癌细胞(highly metastatic human pulmonary giant cell carcinoma, PG)及低转移人肺腺癌细胞(lowly metastatic human pulmonary adenocarcinoma, PAa)购于北京医科大学病理学教研室。卡介菌多糖核酸(BCG-PSN, 又名斯奇康注射液, 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。FITC-sle^X(CD15S)单抗及 FITC-IgM 购于法国 Immunotech 公司。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 RPMI1640 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、400 μg/ml。对照组以无菌氯化钠溶液代替, 在 37 ℃ 5% CO_2 培养箱内培养 48 h 后, 制成浓度为 1× 10^5/ml 的细胞悬液备用。

1.2.2　肺癌细胞上 sle^x(CD15s)的表达　　将 BCG-PSN 各浓度组的肺癌细胞经胰酶消化后, 制成 1× 10^5/ml 细胞悬液。1 000 r/min, 离心 10 min, 在 4 ℃条件下, 用 FITC-sle^x 标记 30 min, 阴性对照以 FITC-IgM 标记 30 min, PBS 洗涤两次。FACS-420 型流式细胞仪(FACS Calibar, 美国)分析, 样品中阳性细胞率由 lysis Ⅱ软件处理, 减去阴性对照的非特异性阳性细胞率, 得出肺癌细胞上 sle^x 表达的阳性百分率。

1.2.3　肺癌细胞胞质内骨架结构观察　　经胰酶消化分离的肺癌细胞, 1 000 r/min, 离心 10 min 后, 用 4% 戊二醛原位固定 40 min, 1% OsO_4 固定 1 h, 乙醇和丙酮梯度脱水, 环氧树脂 618 包埋, 超薄切片, 透射电镜下观察。

1.3　统计学分析

两样本率的比较采用 χ^2 分析。

2　结果

2.1　BCG-PSN 对肺癌细胞上 sle^X 表达的影响

流式细胞仪研究显示, 用 BCG-PSN 处理前, PAa 细胞表达 sle^X 的百分率为 66.8%, 明显高于 PG 细胞(5.72%), 有统计学意义($P<0.001$)。经 BCG-PSN 处理后, PAa 细胞 sle^X 表达呈浓度依赖性下降, 100 μg/L 浓度时为 32.5%, 200 μg/ml 浓度组下降最为明显 5.2%($P<0.001$ 与处理前对照组比较)。在 PG 细胞, sle^X 表达无显著差异, 100 μg/L 浓度为 3.5%, 200 μg/ml 浓度组为 3.51%($P>0.05$ 与处理前对照组比较)。

2.2　BCG-PSN 对人肺癌细胞骨架的影响

在透射电镜下, 肺癌细胞核畸形, 核仁肥大并可见双核或多核。PAa 细胞可见少量微管、微丝, PG 细胞微管、微丝明显减少, 细胞膜绒毛较多。经 BCG-PSN (200 μg/ml)处理后, PG 细胞微丝较前丰富、完整, 树枝样分布; 胞浆内线粒体、粗面内质网较为丰富。PAa 细胞核呈不规则状, 线粒体、高尔基体不发达, 仅见少量微丝, 见图 1~4。

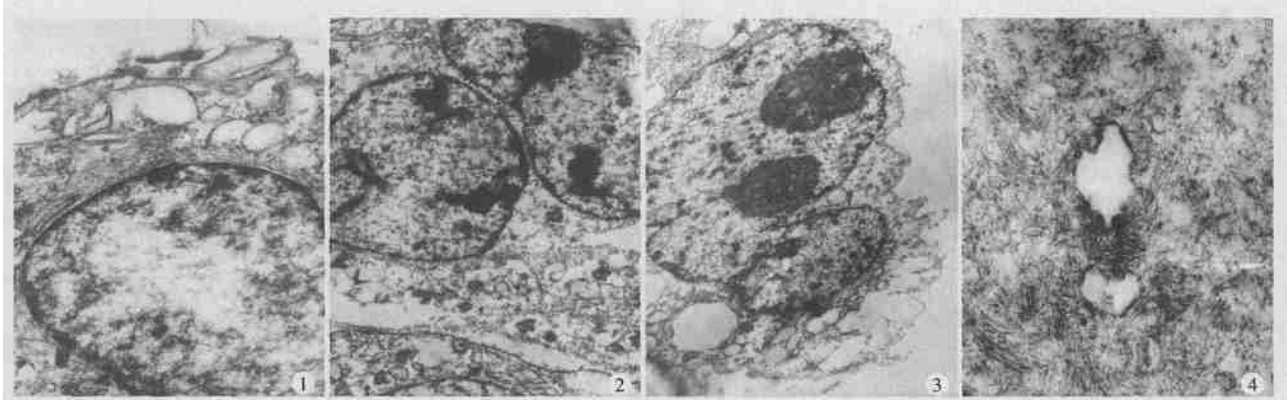


图 1　未经 BCG-PSN 处理的 PAa 细胞核畸形, 核旁少量微丝　(TEM× 17 000)

Fig 1　PAa cell not treated with BCG-PSN is aberration and little microfilament nearby　(TEM× 17 000)

图 2　经 BCG-PSN 200 μg/ml 处理后的 PAa 细胞核大, 核畸形, 核周仅见少量微丝　(TEM× 8 000)

Fig 2　The PAa cell nucleus is aberration but bigger after treatment with BCG-PSN (200 μg/ml)　(TEM× 8 000)

图 3　未经 BCG-PSN 处理的 PG 细胞大, 多核仁, 胞质内微丝减缺　(TEM× 8 000)

Fig 3　The PG cell without treatment with BCG-PSN is big with many nuclei and microfilament diminishes in it　(TEM× 8 000)

图 4　经 BCG-PSN 200 μg/ml 处理后的 PG 细胞胞质内微丝丰富, 交织成网状　(TEM× 40 000)

Fig 4　Upon treatment with BCG-PSN (200 μg/ml), the microfilament is more abundant than before in PG cell and shows a net-like appearance　(TEM× 40 000)

3　讨论

经血道转移是肿瘤细胞转移的主要途径之一。肿瘤细胞在血管内膜上缓慢运动, 继而变形, 与内膜粘附, 迁移到血管外组织形成转移。因此, 肿瘤细胞与内皮细胞的粘附是肿瘤转移的重要环节[2]。肿瘤细胞与

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

内皮细胞粘附是由选择素介导的。包括E-选择素(分布于内皮细胞上)、P-选择素(分布于血小板及内皮细胞上)、L-选择素(分布于淋巴细胞上)[3]。唾液酸化的sle^X、sle^a是选择素配体,与肿瘤细胞的粘附有关。Takada等[4]研究18例表达sle^X或sle^a的癌细胞系,发现肿瘤细胞与内皮细胞的粘附与sle^X、sle^a表达程度有关,这种粘附能被抗sle^X、sle^a及E-选择素单克隆抗体阻断。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,并通过诱导细胞因子如白细胞介素-8、α-肿瘤坏死因子的表达,促进效应细胞与肿瘤细胞相互作用[5]。本实验研究显示,PAa细胞sle^X表达阳性率为66.6%,经BCG-PSN干预后,PAa细胞表达sle^X率呈浓度依赖性下降($P<0.001$)。提示BCG-PSN有阻断PAa细胞膜上sle^X表达的作用。有研究发现sle^X的生物合成过程首先需要唾液酸转移酶将唾液酸加至N-乙酰葡萄糖胺基上,再由岩藻糖转移酶FucT将岩藻糖加至唾液酸-N-乙酰葡萄糖胺基。sle^X染色程度与FUC-T Ⅶ基因扩增频率相关,原因可能在于FUC-T Ⅶ能通过α-2、3-唾液酸葡萄糖胺有效地催化sle^X形成[6]。BCG-PSN可能是通过抑制FUc-T活性下调sle^X的表达,进一步机制有待深入研究。实验中PG细胞sle^X表达阳性率仅5.72%,呈低水平。经BCG-PSN干预后,PG上sle^X表达无明显变化。其原因可能PG细胞上存在其他能介导与血管内皮细胞上E-选择素结合的抗原。这与Kunzendorf等[7]报道的黑色素瘤细胞系HK-14不表达sle^X,但能与E-选择素结合有相似之处。陈继化等[8]发现肺癌组织中除了sle^X抗原外,还存在有LewisX(Le^X)及唾液酸化的双岩藻糖LewisX($SDLe^X$)。其中,$SDLe^X$与肿瘤转移的关系要比sle^X及Le^X更密切。因此,推测PG细胞上可能存在有类似于$SDLe^X$的抗原,虽然肿瘤细胞与内皮细胞的粘附与肿瘤细胞上粘附分子配体的表达有关,但除了sle^X以外,癌细胞上还存在其他能介导与内皮细胞粘附的配体,导致PG细胞sle^X低表达。

细胞内骨架结构的变化也与肿瘤的转移及肿瘤细胞的粘附性有关。微管微丝是真核细胞的骨架成分,和细胞膜的大分子有着直接或间接的关系,并参与多种与膜有关的功能调节,如保持细胞形态、细胞的伸展和粘附、接触抑制等。其中微丝重排是细胞运动的主要动力及细胞粘着的重要物质,效靶细胞内微丝数量减少,细胞运动及与血管内皮的粘附能力减弱,效靶细胞粘着及结合减少。不同组织类型的肺癌细胞由于微环境的变化,可形成多能分化和异质性,因而具有不同的细胞骨架结构[9]。本研究中PG和PAa细胞超微结构的差异也证明了这一点。低转移的PAa细胞微丝微管明显减少,呈稀疏型,高转移的PG细胞微丝微管呈减缺型。其原因与肿瘤细胞中钙调蛋白含量增高,钙调蛋白促使微管解聚有关。此外,肿瘤细胞的微管组织中心在装配胞质微管复合体的过程中,可受到多种调节因子作用而功能异常,导致胞质微管复合体组装减少[10]。经BCG-PSN 200 μg/ml处理后,PAa细胞微丝微管与用药前比较无明显改变,而PG细胞用药后微丝微管明显增多丰富。即实验条件下,PG细胞的微管微丝能重新发育,可能提示BCG-PSN对肺癌细胞粘附性的抑制可能与肺癌细胞上粘附分子的表达减少有关,但这种抑制作用将被肺癌细胞骨架结构的重新发育所打破,肿瘤细胞骨架的变化,将对肿瘤细胞浸润迁移能力产生影响。今后,进一步深入研究BCG-PSN作用下肺癌细胞粘附力和粘附应力的变化,将有助于探明BCG-PSN的抗肿瘤机制及肿瘤细胞转移的机制。

参考文献:

[1] 曾益新. 粘附分子与肿瘤转移[A]. 肿瘤学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001. 185-187.

[2] Alexiou D, Karayiannakis A J, Syrigos K N, *et al*. Serum levels of E-selection, ICAM-1 and VCAM-1 in colorectal cancer patients: correlations with clinicopathological features, patient survival and tumour surgery[J]. Eur J Cancer, 2001, 37(18): 2392-2397.

[3] Hallahan D E, Virudachalam S. Ionizing radiation mediates expression of cell adhesion molecules in distinct histoloigcal patterns within the lung[J]. Cancer Res, 1997, 57(11): 2096-2099.

[4] Takada A, Ohmori K, Yoneda T, *et al*. Contribution of carbohydrate antigens sialyl lewi A and sialyl lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium[J]. Cancer Res, 1993, 53(2): 354-361.

[5] 周永生, 刘建新, 朱 兵, 等. 卡介菌多糖核酸与环磷酰胺对肿瘤免疫的影响[J]. 中国老年学杂志, 2001, 21(2): 149-151.

[6] Sasaki K, Kurata K, Funayama, *et al*. Expression cloning of a noval alpha 1, 3-fucosyltransferase that is involved in biosynthesis of the sialyl lewis X carbohydrate determinants in leukocytes[J]. J Biol Chem, 1994, 269(20): 14730-14737.

[7] Kunzendorf U, Kruger-Krasagakes S, Notter M, *et al*. A Sialyl-Le(x)-negative melanoma cell line binds to E-selectin but not P-selectin[J]. Cancer Res, 1994, 54(4): 1109-1112.

[8] 陈继华, 刘 飞, 陈惠黎. 肺癌组织中岩藻糖化链结构免疫组化研究[J]. 实验生物学报, 1999, 32(1): 7-12.

[9] 丁彦青, 张进华, 李春德, 等. 体外LAK细胞杀伤人直肠腺癌细胞时的细胞骨架变化[J]. 临床与实验病理学杂志, 1994, 10(1): 4-6.

[10] 王瑞瑜, 张红玉, 吴 洪, 等. 体外培养不同转移能力肿瘤细胞与正常肺细胞骨架系统的比较分析[J]. 解剖学报, 1993, 24(2): 153-157.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net