DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.06.002
第22卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 6
512 2000年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)06-0512-04

# 卵巢癌细胞体外粘附腹膜模型的建立及CD44表达对粘附能力影响的研究

程 湘,程天民 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究卵巢癌细胞表达CD44与其粘附腹膜能力的关系。方法 建立卵巢癌细胞体外粘附腹膜模型,比较3AO细胞和M951细胞的粘附性差异,并用抗CD44单抗和透明质酸酶进行阻断实验。结果 腹膜上的透明质酸和卵巢癌细胞上的CD44分子与癌细胞的粘附能力密切相关。结论 卵巢癌细胞上的CD44分子参与了其粘附腹膜的过程。

关键词:卵巢癌;粘附;CD44
中图法分类号:R392.11;R737.31 文献标识码:A

# Model of ovarian cancer cells adhesion to peritoneal mesothelium *in vitro* and effect of CD44 on the adhesion

CHENG Xiang, CHENG Tian-min (Department of Radiation Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: Objective To study the expression of CD44 in ovarian cancer cells and its effect on the adhesion of the cancer cells to the peritoneal mesothelium. Methods Ovarian cancer cell line 3AO and its subline M951 were employed to establish the model of ovarian cancer cells adhesion to peritoneal mesothelium in Wistar rats and their adhesive rates were measured and compared with microculture tetrazolium test. Effects of monoclonal antibodies against CD44 and the hyaluronic acid enzyme (HAE) to block the adhesion of the cancer cells to peritoneal mesothelium were observed. Results Hyaluronic acid on the peritoneum and the adhesion molecule CD44 of the ovarian cells were significantly related with the adhesion of ovarian cancer cells. Conclusion CD44 of ovarian cells takes part in the process of ovarian cancer cells adhering to peritoneal mesothelium.

**Key words**: ovarian cancer; adhesion; CD44

近年来的研究发现,粘附分子CD44与多种肿瘤的生长和转移有关。本研究拟建立卵巢癌细胞粘附腹膜模型,初步研究癌细胞CD44分子表达与粘附腹膜能力的相关性,为进一步研究卵巢癌腹腔播散机制、分析影响播散和转移能力的因素,提供研究模型和线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 细胞系 3AO细胞系,为人卵巢上皮性癌。M951细胞系,为本室从3AO细胞系中建立的亚系。

1.1.2 腹膜组织 来自大鼠,为连同腹壁组织在内的完整壁层腹膜组织。

1.1.3 主要试剂 抗CD44抗体F10-44-2(宝灵曼公司);噻唑蓝(华美公司);胰蛋白酶(上海生化试剂所)。

### 1.2 卵巢癌细胞粘附腹膜模型的方法

1.2.1 制备大鼠腹膜 Wistar大鼠颈脱臼处死,75%酒精消毒腹部皮肤,开腹后剪下腹壁组织,直径约3.5 cm,置1640液中备用。

1.2.2 粘附管制备 将腹壁组织间皮面向上,丝线固定于直径3 cm的塑料管上,置于培养皿底,内加1 ml的1640液浸于腹膜面上。

1.2.3 肿瘤细胞悬液制备与粘附 胰酶消化后用1640液调肿瘤细胞脓度,加入培养皿上的塑料管中,常温下孵育1.5 h。

1.2.4 MTT法(Microculture tetrazolium test, MTT)测细胞粘附率

1.2.4.1 加细胞悬液 于0、30、60和90 min各时相点,每管

作者简介:程 湘(1963—),女,重庆市人,博士,主治医师,讲师,主要从事卵巢癌的病因与治疗方面的研究,发表论文15篇。电话:(023)68755000-74612

收稿日期:1999-10-08;修回日期:2000-03-24

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

中取 0.6 ml 细胞悬液, 分别加入 96 孔板的 3 个孔内, 每孔 0.2 ml。每个实验均重复 3 次。

1.2.4.2　加噻唑蓝(Tetrazolium)液　　每孔加 20 μl 噻唑蓝液(5 mg/ml), 37°C, $CO_2$ 孵箱内培养 4~5 h。

1.2.4.3　加 DMSO 液　　小心吸去上清液, 每孔加 DMSO 液 0.2 ml, 10~20 min。

1.2.4.4　$D_\lambda$ 值测定　　于 3550 型自动酶标仪上测 $D_\lambda$ 值, 波长 595 nm。根据公式计算粘附率。

粘附率=(1—各时相点 $D_{595}$ 值/0 点 $D_{595}$ 值)×100%

1.2.5　扫描电镜观察　　在肿瘤细胞粘附腹膜 90 min 后, 取大鼠腹膜组织小块, 置于 2.5%戊二醛内固定, 常规方法制备扫描电镜标本。

### 1.3　3AO 细胞和 M951 细胞的粘附特性

1.3.1　CD44 含量测定　　用抗 CD44 单抗, 以间接荧光法染色后在 FACS-400 型流式细胞仪上测定阳性细胞百分比。

1.3.2　粘附腹膜和透明质酸特性　　癌细胞对腹膜的粘附率: 癌细胞粘附腹膜模型同前。加入 4 ml 共 $1\times10^5$ 个癌细胞后, 于 0、30、60 和 90 min 取细胞悬液测 $D_\lambda$ 值, 计算粘附率。

1.3.3　癌细胞对透明质酸的粘附率　　于 12 孔板内每孔加透明质酸液 0.5 ml(5 mg/ml)制备透明质酸板, 对照孔内每孔加 PBS 液 0.5 ml, 37°C, $CO_2$ 孵箱内过夜, PBS 洗 3 遍后备用。加入癌细胞后, 于 0、30、60 和 90 min 各时相点取细胞悬液测 $D_\lambda$ 值, 计算粘附率。

### 1.4　抗 CD44 单抗和透明质酸酶对癌细胞粘附特性的影响

1.4.1　抗 CD44 单抗对癌细胞粘附特性的影响　　制备细胞悬液后调细胞浓度为 $10^5$/ml, 每种癌细胞各取 2 ml 细胞悬液, 离心去上清, 加入抗 CD44 单抗 200 μl(1∶50), 室温下作用 30~60 min。将含抗体的细胞悬液分别加入有透明质酸的 12 孔板内或腹膜粘附模型的粘附管内, 测定粘附率。

1.4.2　透明质酸酶对癌细胞粘附特性的影响　　腹膜模型制备好后, 于粘附管内加入透明质酸酶(Sigma 公司)液 2 ml(5 mg/ml), 作用 1 h 后倒掉, 生理盐水洗 3 遍。加入癌细胞悬液 2 ml($10^5$/ml), 测定粘附率。

### 1.5　统计学处理

采用回归分析和 $t$ 检验。

## 2　结果

### 2.1　卵巢癌细胞粘附腹膜模型的建立

在细胞悬液量相同, 加入粘附管内的癌细胞浓度分别为 20、10、2 和 1(单位均为$\times10^3$/ml)时, 癌细胞的粘附率依次为 39.1%、33.5%、21.8%和 14.7%与加入的细胞浓度呈正相关($r$=0.9421, $P<0.05$)。在细胞浓度相同, 加入粘附管内的癌细胞悬液量分别为 1.5 ml、2.5 ml 和 3.5 ml 时, 癌细胞的粘附率依次为 35%、50%和 35%, 与加入的细胞悬液量相关不显著($r$=0, $P$=1)。扫描电镜下观察, 大鼠腹膜间皮细胞呈鹅卵石样紧密排列。癌细胞紧密附着于间皮细胞, 并伸出较多的突起, 少数细长的突起与间皮细胞表面的糖外衣相连, 见图 1、2。

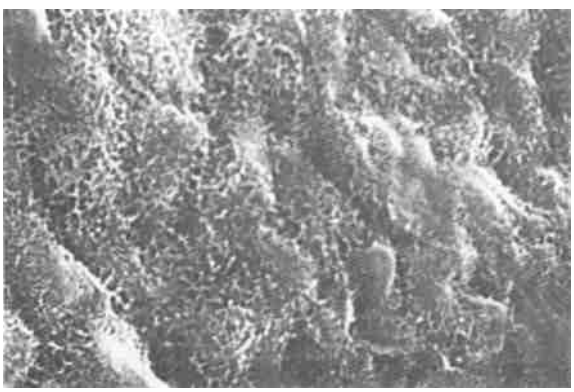


图 1　大鼠膜腹间皮细胞, 呈鹅卵石样排列　(SEM× 1 500)

**Fig 1　Mesothelium cells of rat peritoneum with cobble stone arrangement**　(SEM× 1 500)

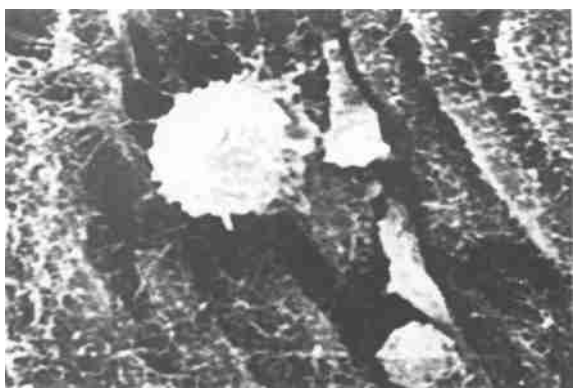


图 2　卵巢癌细胞粘附大鼠腹膜间皮细胞　(SEM× 3 000)

**Fig 2　Adhesion of ovarian carcinoma cells to the peritoneal mesothelium**　(SEM× 3 000)

### 2.2　M951 细胞和 3AO 细胞的粘附特性及抗 CD44 单抗和透明质酸酶的影响

流式细胞仪检测结果, M951 细胞的 CD44 含量为 58.66%, 高于 3AO 细胞的 18.3%。当在培养板上加透明质酸作为粘附基质时, M951 细胞和 3AO 细胞的粘附率均高于无粘附基质时, 但在上述两种条件下, M951 细胞的粘附率均高于 3AO 细胞。应用腹膜粘附模型, 可见到 M951 细胞的粘附率高于 3AO 细胞, 且 2 种细胞对腹膜的粘附率均高于对透明质酸板和培养板的粘附率。加入抗 CD44 单抗后, M951 细胞对透明质酸和腹膜的粘附率均降至接近 3AO 细胞水平, 作用 90 min 时抗体抑制率分别为 32.11%和 48.21%。用透明质酸酶预先处理腹膜后, M951 细胞的粘附率下降至接近 3AO 细胞水平, 作用 90 min 时抗体抑制率为 32.52%。抗 CD44 单抗和透明质酸酶对 3AO 细胞的粘附率无明显影响, 见表 1。

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

表1 卵巢癌细胞的粘附率比较及抗 CD44 单抗和透明质酸酶的影响(%)

Tab 1 Comparison of the adhesive rate of 3AO and M951 cells, and the effects of monoclonal antibodies to CD44(CD44 MAb) and hyaluronic acid enzyme(HAE)(%)

| Cell Lines | Adhesive substrates | Treatment agents | t/min | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 30 | 60 | 90 |
| 3AO | PBS | NO | 3.06 | 9.26 | 16.30 |
| | Hyaluronic acid # | NO | 9.93 | 21.18 | 24.76 |
| | Hyaluronic acid | CD44 MAb | 6.38 | 27.72 | 27.72 |
| | Peritoneum ## | NO | 41.87 | 45.12 | 48.78 |
| | Peritoneum | CD44 MAb | 31.10 | 35.57 | 35.57 |
| | Peritoneum | HAE | 37.63 | 45.88 | 43.13 |
| M951 | PBS * | NO | 13.58 | 18.52 | 25.11 |
| | Hyaluronic acid *# | NO | 8.54 | 32.52 | 38.61 |
| | Hyaluronic acid | CD44 MAb | 7.29 | 26.21 | 26.21 |
| | Peritoneum *## | NO | 46.13 | 45.36 | 65.56 |
| | Peritoneum | CD44 MAb | 34.99 | 33.75 | 33.95 |
| | Peritoneum | HAE | 30.69 | 50.42 | 44.24 |

*: $P<0.05$ *vs* 3AO cell; #: $P<0.05$ *vs* PBS, ##: $P<0.05$ *vs* PBS and Hyaluronic acid, respectively

## 3 讨论

### 3.1 关于卵巢癌细胞体外粘附腹膜模型的建立

进行卵巢癌细胞粘附腹膜的机制研究需合适的体外模型,以往的文献报道极少。有作者采用卵巢癌细胞与体外培养的间皮细胞的粘附模型,他们所培养的间皮细胞是来源于卵巢癌患者的癌性腹水中的游离间皮细胞,已失去了间皮细胞紧密排列在基底膜上的正常结构[1]。另有作者报告将小鼠腹膜覆盖于96孔板上,一定时间后取下腹膜,计算癌细胞的粘附率[2]。这种模型较好地模拟了癌细胞在体内的粘附过程,但无法进行时效关系和影响因素的研究,即不能观察到不同时间和不同的干预因素对癌细胞粘附率的影响。

我们采用的体外粘附腹膜(接近在体条件)的模型,具有如下优点:①作为粘附底物的腹膜具有正常结构,较好地模拟了癌细胞在体内的粘附过程;②粘附体系是开放的,可进行时效关系和影响因素的直接观察研究;③采用MTT法进行细胞计数,避免了人工计数的主观性,提高了准确度。我们采用此模型进行卵巢癌细胞表达CD44分子与其粘附腹膜能力的研究,获得较好的结果。因此卵巢癌细胞粘附腹膜模型的建立,为进一步研究卵巢癌腹腔播散过程的粘附机制奠定了良好的基础。

### 3.2 卵巢癌细胞表达CD44分子与其粘附腹膜能力的相关性

对癌转移机制的深入研究,发现细胞表面的粘附分子受体在转移过程中发挥着非常重要的作用。CD44是由单基因编码的糖蛋白家族,有CD44s和CD44v两大类。已知CD44s参与多种生物学功能,包括介导同型和异型细胞间的粘附,研究资料表明CD44还参与肿瘤发生发展过程[3~9],并与肿瘤的转移密切相关[10]。

卵巢癌腹腔播散过程中,最关键的环节是卵巢癌细胞粘附腹腔间皮细胞。推测有粘附分子参与这一过程,但对卵巢癌中粘附分子的表达和功能研究报道很少。1993年Cannistra等[1]开始了这方面的工作,他们采用卵巢癌细胞粘附体外培养的间皮细胞的模型,用多种粘附分子的单抗进行阻断试验,发现仅抗CD44单抗可部分降低卵巢癌细胞对间皮细胞的粘附率,认为CD44分子部分介导卵巢癌细胞粘附间皮细胞。我们采用腹膜粘附模型,观察到卵巢癌M951亚系细胞CD44含量高,对透明质酸和腹膜的粘附率均高于3AO母系,用抗CD44单抗和透明质酸酶作用后,可使M951细胞的粘附率降低至接近3AO细胞的水平。而3AO细胞的CD44含量低,粘附率亦低,抗CD44单抗对其粘附率无明显影响。上述结果说明了CD44分子在卵巢癌细胞中的表达与其粘附性密切相关,并证实CD44分子参与了卵巢癌细胞粘附腹膜和腹腔播散的过程。

参考文献:

[1] Cannistra S A, Kansas G S, Nilloff J, *et al*. Binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium *in vitro* is partly mediated by CD44H[J]. Cancer Res, 1993, 53(16): 3 830—3 838.

[2] Asao T, Nagamachi Y, Morinagn N, *et al*. Fucosyltransferases of the peritoneum contributed to the adhesion of cancer cells to the

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

mesothelium[J]. Cancer, 1995, 75(6): 1 539—1 544.
[3] Tsurita S, Oishi K, Sato N, *et al*. ERM family members as molecular linkerts between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons[J]. J Cell Biol, 1994, 126(2): 391—401.
[4] Alho A M, Underhill C B. The hyaluronate receptor is preferentially expressed on proliferating epithelial cells[J]. J Cell Biol, 1989, 108(6): 1 557—1 566.
[5] Haynes B F, Liao H X, Patton K L. The transmembrane hyaluronate receptor (CD44): multiple function, multiple forms[J]. Cancer Cells, 1991, 3(2): 347—352.
[6] Lee T H, Wisniewske H G, Vilcek J. A novel secretory tumor necrosis factor-inducible proteins, closely related to the adhesion receptor CD44[J]. J Cell Biol, 1992, 116(3): 545—552.
[7] Lesley J, Hyman R, Kincade P W. CD44 and its interaction with the extra-cellular matrix[J]. Adv Immunol, 1993, 54(1): 271—279.
[8] Picker L J, Nakache M, Butcher E C. Monoclonal antibodies to human lymphocyte homing receptors define a novel class of adhesion molecules on diverse cell types[J]. J Cell Biol, 1989, 109(4): 927—939.
[9] Lu D, Tawfik O, Pantazis C, *et al*. Altered expression of CD44 and variant isoforms in human adenocarcinoma of the endocervix during progression[J]. Gynecol Oncol, 1999, 75(1): 84—90.
[10] Koukoulis G K, Patriarca C, Gould V E. Adhesion molecules and tumor metastasis[J]. Hum Pathol, 1998, 29(9): 889—892.

（编辑 王 红）

文章编号: 1000-5404(2000)06-0515-01

经验与短篇

# 烧冲复合伤早期肺微血管内皮细胞与 PMN 粘附的变化

# The early adhesive changes between pulmonary microvascular endothelial cells and polymorphonuclear neutrophils after burn-blast combined injury

金榕兵, 朱佩芳, 王正国, 石 林 （第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第四研究室, 重庆 400042）

烧冲复合伤早期肺微血管通透性损伤与肺内白细胞尤其是多形核白细胞(PMN)的聚集有关, 而此时肺 ICAM-1、外周血 PMN 的 CD11b 表达明显上调并与 PMN 在肺内聚集有关[1]。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物分组及致伤、处理

Wistar 大鼠 20 只, 分为正常对照及烧冲复合伤组, 各 10 只, 每组各 5 只用于分离培养肺微血管内皮细胞(MVEC), 另一半用于分离外周血 PMN。烧冲复合伤为 25% 体表面积 III度烫伤复合中度冲击伤, 于伤后 12 h 取标本。

### 1.2 肺 MVEC 的分离及培养

参照文献[2]方法稍加改进, 培养的 MVEC 的鉴定以 vWF 单抗进行免疫组化染色。

### 1.3 培养 MVEC 的 ICAM-1 测定及其与 PMN 粘附率的测定

ICAM-1 测定参照刘勇等[3]的方法以 ELISA 法进行;

分离大鼠 PMN 用 DMEM 悬浮, 将细胞数调整至 $(0.5\sim1)\times10^5$/ml。分别进行: ①PMN 悬液中加 CD11b 抗体于 37°C 孵育 30 min 后加入 MVEC 培养孔。②取在 96 孔培养板已融合为单层的 MVEC, 加入 ICAM-1 单抗后 37°C 孵育 30 min, 用 PBS 洗净未结合抗体后加入 PMN 悬液 50 μl, 37°C 孵育 30 min, 用 PBS 液小心洗出未结合的 PMN。加入 50 μl 含 0.5%HTAB 的 0.05 M-PB 至培养板, 室温放置 30 min 以溶解粘附的 PMN。

取 PMN 悬液 50 μl 加入 Eppendorf 管, 离心弃上清后加入 50 μl 含 0.5%HTAB 的 0.05 M-PB, 室温放置 30 min 以裂解 PMN, 将其加至培养板无 MVEC 的空白孔(反映总活性)。

以上样品准备妥当, 均加入 37°C 预热的反应液(含 0.0167% 邻联茴香胺及 0.0005% 过氧化氢的 0.05 M-PB), 250 μl/孔, 孵育 2 min, 立即在酶标仪上测定 $D_{460}$ 光密度值, 计算出 MPO 活性。

MPO 活性 $=\triangle D_{460}/\min\div(11.3\times$ 所加标本量 $\times$ 反应液量)

用结合 PMN 的 MPO 活性占总活性的百分比来表示 PMN 与 MVEC 的相对粘附率(%)。

## 2 结果

### 2.1 培养肺 MVEC 的 ICAM-1 表达

致伤组肺 MVEC 的 ICAM-1 表达显著高于正常组值($P<0.01$); 对照组 MVEC 经 TNFα 刺激后, 表达 ICAM-1 显著增加, 且高浓度 TNFα 处理 MVEC 导致的 ICAM-1 增加较低浓度 TNFα 处理更明显($P<0.05$), 而伤鼠 MVEC 经同样处理变化不明显。

（下转 522 页）

作者简介: 金榕兵(1964—), 男, 云南省昆明市人, 博士, 主治医师, 主要从事肿瘤的核素诊断方面的研究, 发表论文 12 篇。电话: (023)68757462

收稿日期: 1999-02-15; 修回日期: 1999-09-30

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