DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.09.010

外源性层粘素 P11片段对胆管癌细胞浸润能力的影响*

王曙光** 韩本立 段恒春 (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心) 重庆, 400038

提 要 目的:探讨层粘素 P11活性片段对胆管癌细胞浸润过程的影响及可行的抗浸润治疗途径。方法:以层粘素 P11片段处理 QBC_{939}胆管癌细胞,观察胆管癌细胞分泌Ⅳ型胶原酶、尿激酶型纤维蛋白溶酶原激活物的变化,并利用人羊膜浸润培养系统观察胆管癌细胞浸润能力的改变。结果:与层粘素整体分子相反,层粘素 P11片段能够显著抑制胆管癌细胞分泌Ⅳ型胶原酶和体外浸润能力,但对尿激酶型纤维蛋白溶酶原激活物的分泌无明显影响。结论:层粘素可能通过胆管癌细胞膜细胞表面 LN受体刺激Ⅳ型胶原酶分泌,介导胆管癌细胞浸润和转移过程。而浸润和转移过程中另一重要蛋白酶尿激酶型纤维蛋白溶酶原激活物的分泌调节,可能通过其它途径实现。研究阻断层粘素与层粘素受体结合的治疗方法,可能在未来临床防治肿瘤浸润和转移治疗中具有光明前景。

关键词 层粘素;胆管肿瘤;肿瘤浸润
中图法分类号 R73-73; R730.261

肿瘤浸润过程中基底膜成分与肿瘤细胞相互作用对浸润过程有重要影响。基底膜成分层粘素(Laminin, LN)可使肿瘤细胞分泌Ⅳ型胶原酶增加,浸润能力增强[1,2]。而层粘素片段 P11(LN P11)可结合 LN受体,但却具有与 LN相反的生物学效应[3]。本研究通过观察外源性 LN P11片段对胆管癌细胞分泌Ⅳ型胶原酶、尿激酶型纤维蛋白溶酶原激活物(Urokinase type plasminogen activator, u-PA)及浸润能力的影响,探讨 LN参与胆管癌细胞浸润过程的机制及可行的抗浸润治疗途径。

1 材料与方法

1.1 细胞系

胆管癌细胞系 QBC_{939}[4],用含 10%小牛血清的 DMEM培养液进行细胞培养和传代。

1.2 实验分组

1.2.1 空白对照组 将 QBC_{939}细胞制成 1× 10^7/L悬液后,培养 48 h,换液一次,继续培养 24 h后,换成无血清培养液,再培养 24 h,留取上清液,2 500× g离心 5 min,留取上清,-20℃保存,供Ⅳ型胶原酶、u-PA测定。另将相同浓度的细胞悬液接种于人羊膜浸润培养系统,观察胆管癌细胞体外浸润能力。

1.2.2 牛血清白蛋白(BSA)对照组 方法同空白对照组,另加入 BSA(5 mg/L),以排除蛋白质非特异性影响。

1.2.3 LN对照组 方法同空白对照组,另分别加 1、5、10 mg/L三种剂量的 LN(ICN Inc,美国)于无血清培养液中,观察对癌细胞分泌Ⅳ型胶原酶和 u-PA的影响。根据三个剂量的观察结果,选择 5 mg/L剂量的 LN加入羊膜浸润培养系统,观察对浸润能力的影响。

1.2.4 LN片段处理组 方法同空白对照组,另加 10、50、100 mg/L三种剂量的 LN P11-amide(Sigma,美国),观察对胆管癌细胞分泌Ⅳ型胶原酶和 u-PA的影响。同时,在羊膜浸润培养系统加入 100 mg/L的 LN P11-amide,观察对癌细胞浸润能力的影响。

1.2.5 LN片段和 6-氨基已酸(6-ACA)联合处理组 方法同空白对照组,另同时加入 LN P11-amide(50 mg/L)、6-ACA(50 mg/L),观察联合应用对癌细胞Ⅳ型胶原酶分泌量和 u-PA活性的影响。另在羊膜浸润培养系统内加入同剂量的 LN P11-amide和 6-ACA,观察对癌细胞浸润能力的影响。

1.3 测定方法

Ⅳ型胶原酶含量分析用底物捕获免疫分析法[5],u-PA活性测定根据文献[6]方法改良。羊膜浸润培养系统制作按文献[7]方法进行。

1.4 肿瘤细胞浸润能力观察方法

将指数生长期 QBC_{939}细胞制成 1× 10^7/L的细胞悬液,接种于羊膜浸润培养系统的上室内。根据分组加入 LN、LN P11-amide或 LN P11-amide与 6-ACA,37℃,5% CO_2温箱中培养 72 h后,取出上室并清除其中的液体,PBS浸洗一次后 10%福尔马林溶液固定,吉姆萨液染色,在羊膜底面对穿过羊膜的细胞光镜下计数(× 200)。

1.5 统计学处理

研究结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用计算机医用统计程序(MOSP,上海科技出版社)对数据进行方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 LN对 QBC_{939}细胞Ⅳ型胶原酶分泌量、u-PA活性及其浸润能力的影响

不同剂量的外源性 LN均不同程度地刺激Ⅳ型胶原酶分泌,与空白对照及牛血清白蛋白对照(BSA,5 mg/L)差异显著,

* 全军"八五"医药卫生科研基金资助项目
** 王曙光,男,39岁,副主任医师,副教授,博士

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

u-PA活性虽有升高,但无统计学意义。QBC$_{939}$细胞经 LN处理并培养 72 h,结果显示 LN显著增强 QBC$_{939}$细胞的体外浸润能力,见表 1

表 1　LN对 QBC$_{939}$细胞分泌Ⅳ型胶原酶分泌量、u-PA活性及体外浸润能力的影响($\bar{x}\pm s$, n= 8)

Tab 1　Effects of LN on the secretion of type Ⅳ collagenase, activity of u-PA and *in vitro* invasive potential of QBC$_{939}$ ($\bar{x}\pm s$, n= 8)

Group	Type Ⅳ collagenase (A)	u-PA (U/L)	Number of cells passed
Control	0.17± 0.02	2.582± 0.045	14.6± 1.1
BSA	0.16± 0.03	2.579± 0.075	——
LN (1 mg/L)	0.21± 0.01*	2.599± 0.036	——
LN (5 mg/L)	0.39± 0.02**	2.684± 0.086	31.5± 5.5**
LN (10 mg/L)	0.43± 0.03**	2.688± 0.065	——

*: P <0.05,**: P <0.01 *vs* control

2.2　LN P11-amide对 QBC$_{939}$细胞分泌Ⅳ型胶原酶量、u-PA活性及其体外浸润能力的影响

不同剂量的 LN P11-amide均明显抑制 QBC$_{939}$细胞Ⅳ型胶原酶分泌量,且呈现剂量依赖性反应,但该片段对 QBC$_{939}$细胞 u-PA活性无明显影响,见表 2 经 LN P11-amide处理的 QBC$_{93}$细胞,其体外浸润能力明显受到抑制,见表 2

表 2　LN P11-amide对 QBC$_{939}$细胞分泌Ⅳ型胶原酶分泌量、u-PA活性及其体外浸润能力的抑制作用($\bar{x}\pm s$, n= 8)

Tab 2　Inhibitive effects of LN P11-amide on the secretion of type Ⅳ collagenase, activity of u-PA and *in vitro* potential of QBC$_{939}$ ($\bar{x}\pm s$, n= 8)

Group	Type Ⅳ collagenase (A)	u-PA (U/L)	Number of cells passed
Control	0.18± 0.01	2.562± 0.043	12.5± 2.1
BSA	0.19± 0.02	2.555± 0.075	——
LN P11(10 mg/L)	0.15± 0.01*	2.513± 0.078	——
LN P11(50 mg/L)	0.09± 0.01*	2.496± 0.104	——
LN P11(100 mg/L)	0.06± 0.02*	2.528± 0.051	4.4± 0.6*

*: P <0.01 *vs* control

2.3　LN P11-amide和 6-ACA联合应用对 QBC$_{939}$细胞Ⅳ型胶原酶分泌量、u-PA活性及体外浸润能力的影响

联合应用 LN P-amide和 6-ACA能显著抑制 QBC$_{939}$细胞Ⅳ型胶原酶分泌量及 u-PA活性,同时,能明显抑制 QBC$_{939}$细胞穿透羊膜的能力,而且其抑制作用较单独使用 LN P11-amide为强,见表 3

表 3　联合应用 LN P11-amide和 6-ACA对 QBC$_{939}$细胞Ⅳ型胶原酶分泌量、u-PA活性及其体外浸润能力的影响($\bar{x}\pm s$, n= 8)

Tab 3　Effects of combined treatment of LN P11-amide and 6-ACA on the secretion of type Ⅳ collagenase, activity of u-PA and *in vitro* invasive patential of QBC$_{939}$ ($\bar{x}\pm s$, n= 8)

Group	Type Ⅳ collagenase (A)	u-PA (U/L)	Number of cells passed
Control	0.17± 0.01	2.585± 0.045	12.8± 1.1
LN P11	0.06± 0.02*	2.498± 0.061	4.4± 0.6*
LN P11+ ACA	0.03± 0.01*	0.504± 0.065*	2.2± 0.4*

*: P <0.01 *vs* control

3　讨论

我们以往的研究发现,细胞外基质成分 LN刺激胆管癌细胞分泌Ⅳ型胶原酶并增强其浸润能力[2]。本实验利用 LN片段 P11-amide处理胆管癌细胞,结果提示 LN P11片段与 LN整体分子的作用相反,能够抑制胆管癌细胞的浸润能力。肿瘤细胞表面 LN受体可以与 LN分子中的两个决定基因五肽 YIGSR和六肽 LGTIPG相结合[8]。LN P11片段中包含一个五肽 YIGSR基因 与 LN整体分子不同,五肽 YIGSR或 P11片段能够结合 LN受体,但却引发与 LN整体分子相反的生物学效应[3]。有人用带有 YIGSR序列并能与受体结合的 LN片段预先处理肿瘤细胞,静脉注射后实验性转移明显减少[3]。我们的研究结果则进一步表明,胆管癌细胞膜上 LN受体被 LN片段 P11-amide结合后,Ⅳ型胶原酶分泌减少,浸润能力降低,这种抑制作用与 LN P11-amide的剂量呈依赖关系,提示 LN P11与 LN竞争结合 LN受体而发挥相反生物效应,同时也反过来证明 LN是通过胆管癌细胞膜表面 LN受体介导了胆管癌细胞的浸润和转移过程。因此,发展阻断 LN与 LN受体结合的治疗方法,可能在未来临床防治肿瘤浸润和转移治疗中具有光明前景。

另外,本研究结果又显示,LN对 QBC$_{939}$细胞 u-PA分泌量无明显影响,同时,LN P11-amide对胆管癌细胞分泌 u-PA也无抑制作用,而纤维蛋白溶酶的抑制剂 6-ACA则能够抑制胆管癌细胞 u-PA活性和体外浸润能力,提示胆管癌浸润和转移过程中另一重要蛋白水解酶 u-PA[9]的分泌调节可能通过其它途经实现,具体机制有待进一步研究。

参考文献

1　Turpeenniemi-Hujanen T, Thorgeirsson U P, Rao C N, *et al*. Laminin increases the release of type Ⅳ collagenase from malignant cells. J Biol Chem, 1986, 261(4): 1883

2　王曙光,韩本立,陈意生,等.Ⅳ型胶原酶及外源性层粘素对

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

胆管癌细胞浸润能力的影响.中华医学杂志, 1995, 75(11): 660

3 Iwamoto Y, Robey F A, Graf J, *et al*. YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. Science, 1987, 238(20): 1132

4 王曙光,韩本立,陈意生,等.胆管癌浸润、转移及抗浸润的实验研究.第三军医大学学报, 1994, 16(4): 307

5 WaCher M P, Krutzsch H C, Liotta L A, *et al*. Development of a novel substrate capture immunoassay for the detection of a neutral metalloproteinase capable of degrading basement membrane (Type Ⅳ) collagen. J Immunol Methods, 1990, 126(2): 239

6 Yu H, Schultz R M. Relationship between secreted urokinase plasminogen activator activity and metastatic potential in murine B16 cells transfected with human urokinase sense and antisense genes. Cancer Res, 1990, 50(23): 7623

7 Persky B, Ostrowski L E, Pagast P, *et al*. Inhibition of proteolytic enzymes in the in vitro amnion model for basement membrane invason. Cancr Res, 1986, 46(8): 4129

8 Mecham R P, Hinek A, Griffin G L, *et al*. The elastin receptor shows structural and functional similarities to the 67-kDa tumor cell laminin receptor. J Biol Chem, 1989, 264(28): 16652

9 王曙光,韩本立,段恒春,等.层激酶型纤维蛋白溶酶原激活物在胆管癌浸润过程中的作用.中华医学杂志, 1996, 76(8): 594

(收稿: 1998-02-27;修回: 1999-04-29)
(编辑 王 红)

Effects of external laminin segment, P11, on the invasive potential of malignant biliary cells*

Wang Shuguang, Han Benli, Duan Hengchun (Center of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To study the effects of laminin segment, P11 amide, on the invasive potential of malignant biliary cells and look for a possible anti-invasive agent. **Methods**: After QBC_{939} cells of biliary malignancy were cultured with P11 amide, the changes of the secretion of typeⅣ collagenase and urokinase type plasminogen activator were determined. In a human amnion infiltration culture system, the invasive potential of QBC_{939} cells before and after the treatment of P11 amide were observed. **Results**: Laminin segment or P11 amide, contrary to laminin, inhibited significantly the secretion of typeⅣ collagenase, showed no effect on the secretion of urokinase type plasminogen activator and suppressed the invasive potential of the treated QBC_{939} cells. **Conclusion**: Laminin induces the secretion of typeⅣ collagenase in malignant biliary cells and mediates their malignant invasion through its combination with its receptors on the surface of malignant biliary cells. The employment of P11 amide blocks the combination between laminin and its receptors which might serve as an anti-invasive agent for biliary cancer.

Key words laminin; neoplastic invasion; biliary neoplasm

* This project was supported by the "Eight five" obligatory budget of PLA

(上接 641页)

血小板破坏过多而引起的血小板减少,亦可见于消耗性血小板减少症,如血管内溶血、血栓性血小板减少性紫癜、溶血-尿毒症综合征等,由于其机理主要为血小板破坏增多,更新加速,血小板四项参数变化与 ITP相同。因此,仅用血小板四项参数的变化,不能作出血小板减少症的病因诊断,尚需结合其他临床资料,但可以提示血小板减少的机理。

正常人 PLT与 MPV、PLT与 PDW、MPV与 PDW成非线性负相关[4],但在 ITP患者 PLT与 MPV、PLT与 PDW的反比关系消失。MPV与 PDW仍呈非线性反比关系。PLT与 MPV、PLT与 PDW反比关系消失,可能是由于大 MPV群体血小板为主所致。

关键词 特发性血小板减少性紫癜;平均血小板体积;血小板压积;血小板分布宽度

中图法分类号 R331.143; R554.6

参考文献

1 张之南 主编.血液病诊断与疗效标准.天津:天津科学技术出版社, 1991.245~247

2 孙朝晖,朱爱辛,刘海英,等.老年急性感染性疾病血小板四项参数检测的临床意义.实用老年医学杂志, 1997, 11(4): 162

3 丁 丽,强蕴蕴,郭清芳,等.乙型肝炎患者血小板计数及平均血小板体积的检测.西安医科大学学报, 1995, 16(4): 431

4 孙 苇,赵素荣,鲍震霄,等.血小板四项参数的正常参考范围.中华医学检验杂志, 1993, 16(2): 107

(收稿: 1998-05-28;修回: 1999-03-19)
(编辑 汪勤俭)

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