DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.06.007

不同转移特性人肺癌裸鼠移植瘤整合蛋白表达及其对移植瘤转移的影响*

魏 泓** 吴丰春 牛 荣 周建华 史景泉*** 陈意生*** (第三军医大学基础医学部实验动物学教研室)
重庆,400038

提 要 目的:观察人肺癌裸鼠移植瘤整合蛋白表达与其转移的相关性。方法:以 ABC 免疫组化染色,对转移力由低到高依次为 PLA-801C、Anip973、PLA-801D、PLA-801DL 四株人肺癌裸鼠移植瘤作整合蛋白亚单位表达的观察,并在裸鼠体内观察整合蛋白 β_1 抗体及其配体 RGD 多肽对移植瘤生长及转移的影响。结果:四株移植瘤均呈 α_2、α_5、α_6B 阴性,β_1 的表达除 Anip973 呈强阳性、PLA-801DL 呈弱阳性外,也均呈阴性。但四株移植瘤除 PLA-801C 外,其余 3 株均呈 α_6A 强阳性。β_1 抗体及 RGD 多肽对 PLA-801DL 移植瘤的转移不见明显影响。结论:4 株人肺癌移植瘤总体上呈 β_1 亚族整合蛋白低表达,表达水平与其转移无显著相关。

关键词 整合蛋白;肺肿瘤;肿瘤转移;裸鼠
中图法分类号 R73-37

整合蛋白是已知的一类与肿瘤转移有关的细胞表面粘附分子,它是由 α、β 亚单位组成的异型二聚体蛋白。整合蛋白可分成多个亚族,同一亚族具有相同的 β 亚基。介导整合蛋白与细胞外基质的粘附反应主要是通过整合蛋白识别配体分子中 RGD 序列(Arg-Gly-Asp,精-甘-天冬氨酸)而进行的[1]。由于肿瘤细胞对细胞外基质的粘附和解粘附是肿瘤转移过程中重要的一环,为评价肺癌细胞 β_1 亚族整合蛋白表达在对细胞外基质的粘附或解粘附及其肺癌转移中的作用和意义,本课题以 β_1 亚族的 α_3、α_5、α_6 亚基及 β_1 亚基抗体,对不同转移特性的 4 株人肺癌裸鼠移植瘤进行免疫组化染色观察,并在裸鼠体内观察 β_1 抗体及 RGD 多肽对高转移人肺癌裸鼠移植瘤株 PLA-801DL 生长及转移的影响。

1 材料与方法

1.1 瘤源

共采用 4 株人肺癌裸鼠皮下移植瘤。即人巨细胞肺癌裸鼠移植瘤 PLA-801C、PLA-801D、PLA-801DL,人肺腺癌裸鼠移植瘤 Anip973 四株裸鼠移植瘤生物学特性稳定,移植后 4 周的淋巴结及肺转移率由低到高依次为 PLA-801C(0%,0%)、Anip973(8.6%,4.3%)、PLA-801D(100%,31.6%)、PLA-801DL(100%,52.6%),括号内分别为淋巴结及肺转移率[2-6]。

1.2 抗体

用于免疫组化染色的抗体及其通过预染色确定的抗体工作浓度,见表 1

表 1 用于免疫组化染色的整合蛋白抗体

Tab 1 Integrin antibodies used for immunohistochemistry

Type	Source of antibodies	Titre	Donor	Ligand of integrin identified by the antibody
α_2	mouse to human	1∶50	Drs Bankert/chen (Roswell Park Cancer Institute, USA)	CL, LN
α_2	mouse to human	1∶50	Medical Center, University of California, USA	CL, LN
α_5	mouse to human	1∶50	Dr. Figdorc C(University Hospital Nijmegen, Netherlands)	FN
α_6A	Rabbit to synthetic peptide α_6A	1∶200	Dr. Quaranta V(Scripps Research Institute, USA)	LN
α_6	Rabbit to synthetic peptide α_6B	1∶50	Dr. Quaranta V	LN
β_1	mouse to hamster	1∶50	Dr. Juliano RL(The University of North Carolina, USA)	CL, LN, FN
β_1	mouse to chicken	1∶50	Sigma (Product No. I-8638)	CL, LN, FN

CL: Collagen; LN: Laminin; FN: Fibronectin

* 重庆市中青年科技专家基金资助项目
** 魏 泓,男,34岁,副教授,博士
*** 基础医学部病理学教研室

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

1.3 染色及观察

将置于液氮中冻存的移植瘤组织解冻后,于恒冷式冰冻切片机制备 10μm切片。根据抗体分别为小鼠单克隆抗体及兔多克隆抗体,分别采用两类 ABC试剂盒 (Vetastain ABC kit: Mouse IgG, PK4002; Rabbit IgG, PK4001),按试剂盒冰冻切片染色程序说明进行染色。免疫组化结果判定按常规进行。

1.4 β_1抗体及 RGD多肽对 PLA-801DL裸鼠移植瘤生长及转移影响的观察

采取第 15代 PLA-801DL裸鼠移植瘤,按 1∶3比例加入 RPMI-1640细胞培养液制备瘤细胞悬液,取瘤细胞悬液 0.1 ml,分别置于 30个 1 ml小离心管中,其中 10个离心管分别加入内含 112.8μl β_1单抗的 0.2 ml PBS(鼠抗地鼠 β_1抗体由 Dr. JulianoRL惠赠),另 10个离心管分别加入内含 500μg Arg-Gly-Asp肽段(Sigma, product No. A8052)的 PBS 0.2ml,最后 10个小离心管仅加入 0.2ml PBS作为对照。将 30只 6~8周龄裸鼠随机分成 3组,其中 10只分别腋部注射 β1单抗处理的瘤细胞悬液、10只分别注射 RGD多肽处理的瘤细胞悬液、10只注射对照组的 PBS瘤细胞悬液。接种后 4周,处死裸鼠,以病理形态学常规方法检查肿瘤转移情况。

2 结果

2.1 四株人肺癌裸鼠移植瘤整合蛋白的表达

4株移植瘤均呈 α_2、α_5、α_6B阴性。两种 β_1(地鼠整合蛋白 β_1及鸡整合蛋白 β_1),除 Anip973呈强阳性、PLA-801DL呈弱阳性外,也均呈阴性。但四株移植瘤除 PLA-801C外,其余 3株均呈 α_6A强阳性。见表 2及图 1、2。

表 2 四株人肺癌裸鼠移植瘤整合蛋白的表达

Tab 2 Integrin expression in four strains of human lung carcinoma xenograft in nude mice

Strain	α_2*	α_2**	α_5	α_6A	α_6B	β_1 (hamster)	β_1 (chicken)
PLA-801C	-	-	-	-	-	-	-
PLA-801D	-	-	-	++	-	-	-
PLA-801DL	-	-	-	++	-	+	+
Anip973	-	-	-	++	-	++	++

* Provided by Drs Bankert/Chen, ** Provided by University of California

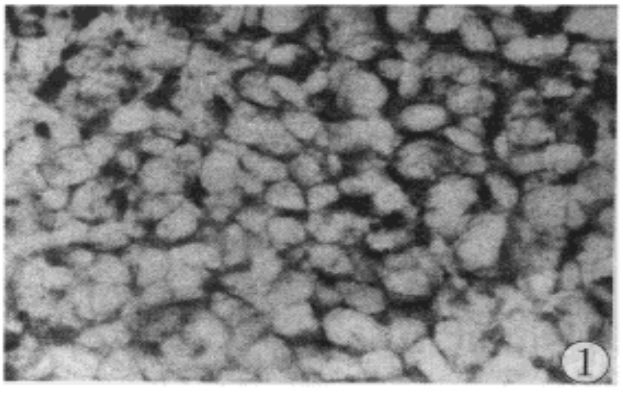


图 1 **PLA-801D**裸鼠皮下瘤整合蛋白 α_6**A**染色,示瘤细胞胞膜阳性 (ABC×200)

Fig 1 Positive reaction of tumor cell membrane of integrin α_6A in PLA-801D growing sc in nude mice (ABC×200)

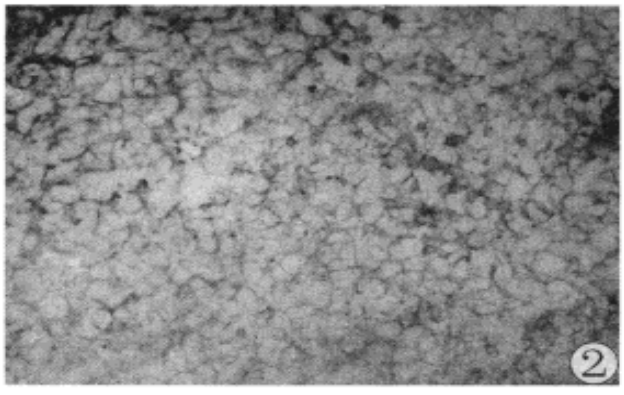


图 2 **PLA-801DL**裸鼠移植瘤整合蛋白 α_6**A**免疫组化染色,示瘤细胞胞膜阳性 (ABC×100)

Fig 2 Positive reaction of tumor cell membrane of integrin α_6A in PLA-801DL growing sc in nude mice (ABC×100)

2.2 β_1抗体及 RGD多肽对 PLA-801DL移植瘤生长及转移的影响

β_1抗体处理的瘤细胞悬液移植后 4周,瘤体积平均约 1.3 cm×1.2 cm×0.7 cm,RGD多肽处理的瘤细胞悬液移植后 4周瘤体积平均约 2.5 cm×1.0 cm×0.5 cm,对照组瘤体积平均约 1.2 cm×0.6 cm×0.4 cm,比上述二组实验组的瘤体积小,但三组裸鼠的淋巴结转移仍均为 10/10(100%)、肺转移率分别为 5/10(50%)、6/10(60%)、5/10(50%),且转移程度基本相同,未见显著差异。

3 讨论

4株人肺癌裸鼠移植瘤整合蛋白亚单位 α_2、α_5、α_6、β_1免疫组化染色表明,其移植瘤总体上呈 β_1亚族整合蛋白低表达,但不同亚单位的表达不尽相同,以 α_6A阳性突出,其次为地鼠整合蛋白 β_1或鸡整合蛋白 β_1。不同瘤株的表达也不尽相同,以 Anip973阳性突出,其次为 PLA-801DL、PLA-801D,而 PLA-801C则均呈阴性。同时,整合蛋白 β_1亚单位抗体及其配体 RGD多肽对

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

PLA-801DL移植瘤影响的裸鼠试验也表明,对其转移不见明显影响,这与 PLA-801DL移植瘤呈整合蛋白低表达的结果相符。至于β1单抗及 RGD多肽处理的移植瘤体积增长较快,其原因可能与瘤细胞处理后瘤细胞与瘤体内间质的粘附性增强,移植瘤离散性减弱而导致瘤体增大相关。

本实验的结果显示,地鼠β1、鸡β1在人肺癌细胞中表达,表明人与动物整合蛋白具有同源性,可利用其抗体的交叉反应进行免疫组化染色。但是不同动物种属及人整合蛋白的氨基酸序列是否具有差异及其差异的比较尚缺乏研究。利用人及动物相应的同一种整合蛋白抗体进行人正常或肿瘤细胞整合蛋白表达的研究结果是否完全相同也有待研制更多的抗体而进行深入比较研究。

目前有关整合蛋白在肿瘤中作用的研究结果难以统一,其整合蛋白表达可与肿瘤转移呈负相关,其表达类型减少、水平降低引起肿瘤转移增强。本实验结果与此相符。但整合蛋白表达也可与肿瘤转移呈正相关。同时,同一整合蛋白在不同的肿瘤及其不同的发展阶段可呈不同的表达,不同的肿瘤甚至同一种肿瘤的不同发展阶段可表达不同类型或不同水平的整合蛋白。再者,涉及肿瘤转移的细胞表面粘附分子目前已知的有整合蛋白、免疫球蛋白超家族、钙粘蛋白和选择素四类。且整合蛋白已被证实的就有20种以上,何种或哪些整合蛋白在肿瘤转移中发挥关键作用及其在各类表面粘附分子中的相对地位尚不清楚[1]。可能正是由于这种复杂性,致使本实验的β1抗体及 RGD多肽处理的 PLA-801DL瘤细胞悬液移植裸鼠后,其淋巴结及肺转移不受明显影响。

参考文献

1 魏 泓.整合蛋白与肿瘤转移.癌症, 1996, 15(5): 392
2 魏 泓,史景泉,陈意生.人肺癌转移动物模型建立及其生物学特性的研究.第三军医大学学报, 1996, 18(4): 355
3 魏 泓,牛 荣,吴丰春等.不同转移特性人肺癌裸鼠移植瘤模型的建立及复制.第三军医大学学报, 1996, 18(6): 484
4 魏 泓.人类肿瘤免疫缺陷动物体内转移模型研究进展.中国实验动物学学报, 1994, 2(2): 121
5 魏 泓.人体肿瘤免疫缺陷动物体内移植模型.见张胜本,张连阳主编. 肿瘤化学治疗敏感性与抗药性. 成都: 四川科学技术出版社, 1995. 18~42
6 魏 泓,周建华,吴丰春等.不同转移特性人肺癌裸鼠移植瘤及临床标本Ⅳ型胶原酶的表达.第三军医大学学报, 1997, 19(2): 122

(收稿: 1997-04-13;修回: 1997-10-02)
(编辑 冯崇英)

Expression of integrin of transplanted human lung carcinoma with various metastatic potentials and its effects on metastasis of xenograft in nude mice

Wei Hong, Wu Fengchun, Niu Rong, Zhou Jianhua, Shi Jingquan, Chen Yisheng (Department of Laboratory Animal Science, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To investigate the relationship between the expression of integrin of transplanted human lung carcinoma and its metastasis in nude mice. **Methods**: The expression of integrin subunits were observed with ABC immunohistochemistry in four strains of xenografts of human lung carcinoma. The metastatic potential of the four xenografts was from low to high among PLA-801C, Anip973, PLA-801D and PLA-801DL in nude mice. The effects of β_1 antibody and RGD peptide on the PLA-801DL were also studied. **Results**: α_2, α_5 and α_6 B were all negatively expressed. The expression of integrin subunit β_1 was only strongly positive in Anip973 and weakly positive in PLA-801DL. But high expression of α_6 B was found in PLA-801D, PLA-801DL and Anip973 except PLA-801C. β_1 subunit antibody and RGD peptide exerted no marked effects on metastasis of PLA-801DL xenograft. **Conclusion**: Low expression of integrin β_1 subfamily exists in four strains of xenografts of human lung carcinoma but is not correlated to their metastatic capacity.

Key words integrin, human lung carcinoma; metastasis; nude mouse

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