DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.05.006

层粘素在胆管癌细胞浸润过程中的作用*

王曙光 韩本立 陈意生** 段恒春 彭志明 (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心)重庆,630038

提 要 通过观察外源性层粘素(LN)对一株新近建立的胆管癌细胞系QBC_{939}分泌Ⅳ型胶原酶及体外浸润能力的影响,旨在探讨胆管癌细胞浸润过程中的生物学机理,特别是LN及Ⅳ型胶原酶在浸润中的作用和意义。结果表明,不同剂量的LN均明显刺激QBC_{939}细胞分泌Ⅳ型胶原酶,且5 μg/ml剂量的LN即能显著增强QBC_{939}细胞的体外浸润能力。与LN同时加入LN抗体,显示不同剂量的LN抗体能不同程度地抑制LN对QBC_{939}细胞Ⅳ型胶原酶分泌的刺激效应,并抑制LN增加QBC_{939}细胞体外浸润能力的作用。研究结果显示,LN通过刺激癌细胞分泌Ⅳ型胶原酶,增强癌细胞浸润能力,在介导肿瘤细胞的浸润过程中发挥重要作用。Ⅳ型胶原酶在胆管癌浸润过程中起重要作用,其活性高低与癌细胞浸润能力相关,是分解细胞外基质的主要蛋白水解酶之一。研究结果不仅有助于癌浸润和转移机制的研究,同时也提示在未来抗肿瘤治疗中,干扰LN介导过程或抑制Ⅳ型胶原酶活性,有可能获得显著效果。

关键词 层粘素;胶原酶;肿瘤浸润
中图法分类号 R735.8

胆管癌术后复发率高[1,2],其原因与癌细胞沿胆管壁、周围血管、淋巴管和神经周围间隙浸润和转移有关。研究胆管癌浸润和转移的生物学机制并在此基础上发展有效治疗手段,将从根本上提高胆管癌的治疗效果。

肿瘤细胞必须突破基底膜屏障方能实现浸润和转移,故涉及到一系列相互联系的蛋白酶和基底膜成份的相互作用[3,4]。研究表明,基底膜成份层粘素(Laminin,LN)对肿瘤细胞的浸润能力有重要影响[5],而许多恶性肿瘤有Ⅳ型胶原酶(Type Ⅳ collagenase)表达,且其程度与肿瘤浸润能力呈正相关[3,6]。本实验旨在通过观察外源性LN对胆管癌细胞分泌Ⅳ型胶原酶及体外浸润能力的作用、及LN被LN抗体阻断后对胆管癌细胞浸润能力的影响,探讨胆管癌细胞浸润过程的生物学机制,特别是LN及Ⅳ型胶原酶在浸润中的作用和意义。

1 材料与方法

1.1 细胞系

QBC_{939}胆管癌细胞系由本中心建立[7],以含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

对照组:QBC_{939}细胞悬液接种于培养瓶中,准确计数细胞浓度并以含10%小牛血清的DMEM培养液培养48 h,换液并继续培养24 h后换成无血清培养液,再培养24 h,留取上清液,26000×g离心5 min,留取上清,-20℃保存,供Ⅳ型胶原酶测定。另将同一浓度的细胞悬液接种于人羊膜浸润培养系统,观察癌细胞体外浸润能力。

LN组:培养方法同对照组,另在无血清培养液中分别加入1 μg/ml,6 μg/ml,10 μg/ml三个不同剂量的外源性LN(ICN Inc,美国),观察对癌细胞分泌Ⅳ型胶原酶的影响。另选择5 μg/ml剂量外源性LN加入人羊膜浸润培养系统,观察对浸润能力的影响。

LN+LN抗体组:培养方法同对照组,选择5 μg/ml的LN加入无血清培养液中的同时,分别加入1∶1000,1∶200,1∶100三个不同剂量的LN抗体(Sigma,美国),观察对癌细胞分泌Ⅳ型胶原酶的影响。同时,在人羊膜浸润培养系统内加入LN(5 μg/ml)及LN抗体(1∶100),观察对癌细胞浸润能力的影响。

Ⅳ型胶原酶含量分析用底物捕获免疫方析法[8]。人羊膜浸润培养系统的制作按文献方法[9]。

浸润能力观察方法:指数生长期QBC_{939}细胞制成1×10^8/L细胞悬液,接种于羊膜浸润培养系统的上室内。根据分组不同,加入LN、LN抗体。37℃,5% CO_2温箱中培养72 h后,取出上室,PBS浸洗后用10%福尔马林溶液固定,吉姆萨染色,在羊膜底面对穿过羊膜的细胞光镜下计数每100倍视野。

统计学处理:结果以均数±标准误($\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$)表示。采用计算机医用统计程序(MOSP,上海科技出版社,版本2.0)对数据

* 全军"八五"青年科研基金资助项目
** 基础部病理学教研室 重庆,630038

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

进行方差分析和 t 检验，$P<0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 QBC_{939}细胞Ⅳ型胶原酶分泌量及体外浸润能力

1×10^7、5×10^7 及 1×10^8/L 指数生长期 QBC_{939}细胞Ⅳ型胶原酶分泌量及穿过羊膜的细胞数的增加与细胞密度增加呈平行关系(图1,2)，表明 QBC_{939}细胞能够分泌Ⅳ型胶原酶并且具有体外浸润羊膜的能力。

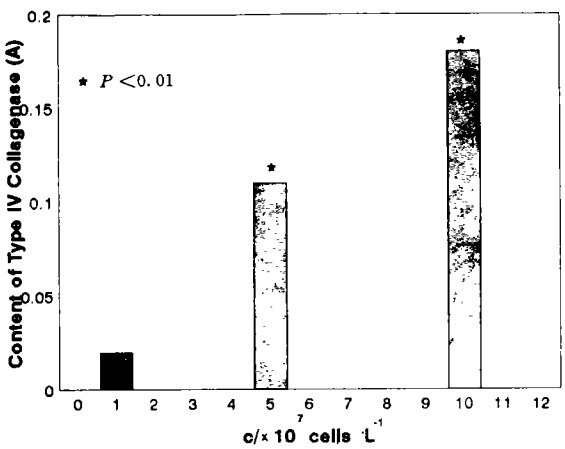


图1 不同浓度的 QBC_{939}细胞Ⅳ型胶原酶分泌量

Fig 1 Ⅳ collagenase secreted by QBC_{939} cell line at different cell concentrations

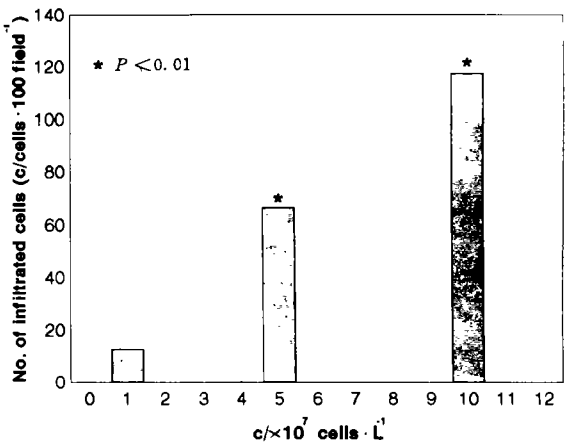


图2 不同浓度的 QBC_{939}细胞穿过羊膜的细胞数

Fig 2 Invasive ability of QBC_{939} cell line at different cell concentrations

2.2 LN 对 QBC_{939}细胞Ⅳ-型胶原酶分泌量和浸润能力的影响

1μg/ml、5 μg/ml 及 10 μg/ml 的外源性 LN 均不同程度地刺激 QBC_{939}细胞分泌Ⅳ型胶原酶，与对照组及牛血清白蛋白对照(BSA，5 μg/ml)差异显著(图3)。1×10^8/L QBC_{939}细胞悬液 5 ml 接种于人羊膜浸润培养系统上室内并加入 LN(5 μg/ml)，培养 72 h，结果显示该剂量的层粘素显著增强 QBC_{939}细胞的体外浸润能力(图4)。

2.3 LN 抗体对 LN 增强 QBC_{939}细胞Ⅳ-型胶原酶分泌量和浸润能力的抑制作用

10 μl(1∶1000)，50 μl(1∶200)，100 μl(1∶100)LN 抗体与外源性 LN(5 μg/ml)一同加入 QBC_{939}细胞中共同培养 24 h 后，结果表明，不同剂量的 LN 抗体均能显著地抑制 LN 刺激 QBC_{939}细胞分泌Ⅳ型胶原酶的作用(图5)。1×10^8/ml 的 QBC_{939}细胞悬液 5 ml 接种于人羊膜浸润培养系统上室内并加入 LN(5 μg/ml)、LN 抗体 50 μl，培养 72 h，结果该剂量的 LN 抗体能明显抑制LN增加QBC_{939}细胞体外浸润能力的作用(图4)。

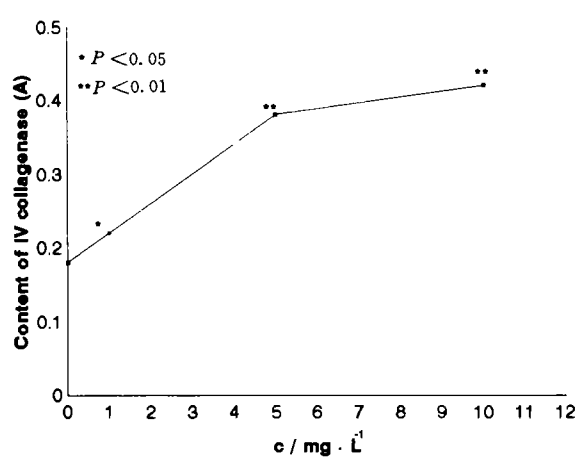


图3 LN 对 QBC_{939}细胞Ⅳ型胶原酶分泌量的影响

Fig 3 Effects of LN on secretion of Ⅳ collagenase by QBC_{939} cell line

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

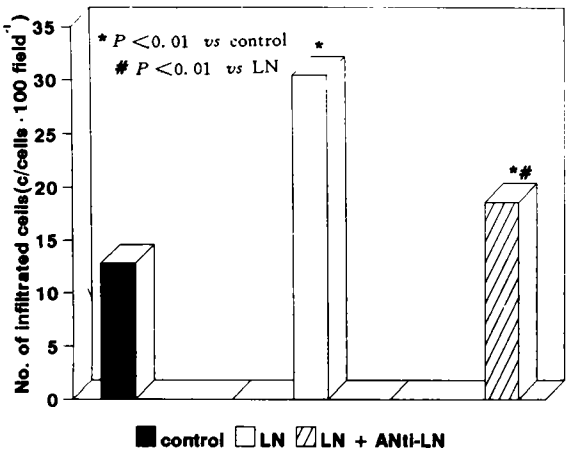


图 4　LN、LN 抗体对 QBC_{939} 细胞浸润能力的影响

Fig 4　Effect of LN and Anti-LN on the invasive potential of QBC_{939} cell line

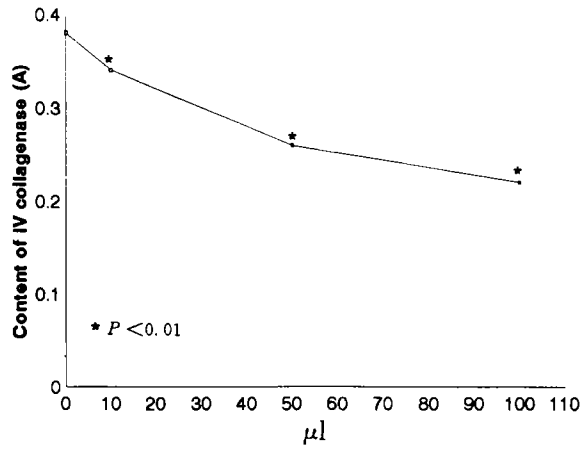


图 5　LN 抗体对 LN 刺激 QBC_{939} 细胞分泌Ⅳ型胶原酶的抑制作用

Fig 5　Effects of ANti-LN on Ⅳ collagenase secretion of QBC_{939} cell stimulated by LN

3　讨论

在基底膜成份的酶促降解过程中，存在着许多对蛋白酶水解反应的调节。肿瘤细胞蛋白水解酶在降解基底膜成份Ⅳ型胶原时，既受肿瘤细胞本身的因素影响，也受宿主方面的因素作用。这些因素包括蛋白酶抑制剂、细胞外基质成份、激素及生长因子等[4]。由于 LN 是细胞外基质的主要成份且在肿瘤细胞附着于基底膜过程中发挥重要的作用，我们在本实验中探讨了 LN 对 QBC_{939} 细胞系分泌Ⅳ型胶原酶及其浸润能力是否有影响。研究结果表明，LN 能显著增加 QBC_{939} 细胞Ⅳ型胶原酶分泌，同时，浸润能力也明显增强。这与 Turpeenniemi-Hujanen 等人的报告是一致的[5]。

LN 是基底膜中主要的非胶原成份，其主要功能是作为内皮细胞和上皮细胞附着的 结构。LN 具有与间质胶原或Ⅳ型胶原、硫酸肝素以及一种或多种细胞表面受体相结合的特殊结合位点[10]。因此，LN 通过结合细胞外基质成份并调节其结细胞的吸附而参与细胞外基质的分子构成，并影响细胞的形态、分化、分裂以及细胞运动等[10]。LN 参与肿瘤浸润转移过程在一些实验研究中已得到证实[5]。研究者们已提出肿瘤细胞浸润基底膜过程大致有三个步骤[11]，即首先肿瘤细胞附着于基底膜，然后分泌蛋白水解酶，最后在降解的基质中移动。本实验的目的正是要了解这三步之间是否存在一定的关系。我们发现，当 LN 与 QBC_{939} 细胞共同培养时，LN 能够刺激细胞分泌Ⅳ型胶原酶，并显著提高了 QBC_{939} 细胞的体外浸润能力，而且随着 LN 剂量的加大，这种反应更强烈。为进一步证实层粘素的作用，我们利用 LN 抗体与 LN 一同加入培养液中，结果 LN 的作用大部分被阻断。这些结果有力说明 LN 介导了胆管癌细胞的浸润过程。

本研究结果显示，胆管癌细胞系 QBC_{939} 具有分泌Ⅳ型胶原酶的能力，而且分泌Ⅳ型胶原酶的水平与穿透羊膜基底膜的细胞数呈平行关系，提示Ⅳ型胶原酶参与胆管癌细胞的浸润和转移过程。Ⅳ型胶原酶是基质金属蛋白酶家族中的成员之一，除分解Ⅳ型胶原的螺旋部分外，Ⅳ型胶原酶还有很强的明胶水解活性，能分解Ⅴ、Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ型胶原和纤维连接蛋白及弹性蛋白。不少实验结果显示，Ⅳ型胶原酶与恶性肿瘤细胞的浸润和转移能力有关。有人将转移性肿瘤细胞与非转移性肿瘤细胞融合，产生的子代细胞有明显的转移性，同时也具有较强的分泌Ⅳ型胶原酶的能力[6]。相反，如将转移性肿瘤细胞与正常细胞融合则显著抑制转移倾向和Ⅳ型胶原酶表达[8]。另外，用 ras 癌基因导入的恶性肿瘤细胞表型显示Ⅳ型胶原酶活性表达增强[12]，提示Ⅳ型胶原酶的表达与细胞的恶性生物学特性相关。在本实验中，当 LN 增强 QBC_{939} 细胞浸润能力的作用被 LN 抗体抑制时，Ⅳ型胶原酶的分泌量也无明显增加，故以往的研究及本实验结果均说明在胆管癌浸润过程中，Ⅳ型胶原酶是参与降解细胞外基质的重要蛋白水解酶之一。同时也提示，在未来肿瘤浸润和转移防治中通过抑制Ⅳ型胶原酶，有可能由此途径获得进展。

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

总之，本实验结果证明，LN能够刺激QBC_{939}细胞分泌Ⅳ型胶原酶并提高其浸润能力，而利用LN抗体结合LN可抑制LN的作用，提示LN在介导肿瘤细胞的浸润过程中发挥重要作用。Ⅳ型胶原酶是参与胆管癌细胞浸润和转移过程的重要蛋白水解酶之一，其活性高低可能与癌细胞的浸润和转移能力有关。本实验结果不但有助于了解胆管癌浸润、转移机制，同时提示阻断LN的介导作用或抑制Ⅳ型胶原酶在未来肿瘤临床治疗中可能具有光明的前景。

参考文献

1 中华医学会外科学会胆道外科学组. 肝外胆道癌全国调查1098例分析. 中华外科杂志，1990；28(9)：516

2 NakajimaT, Kondo Y, Miyazaki M et al. A histopathologic study of 102 cases of intrahepatic cholangiocarcinoma: histologic classification and modes of spreading. Human Pathology，1988；19(10)：1228

3 Liotta LA, Kohn E. Cancer invason and metastases. JAMA，1990；263(8)：1123

4 Mignatti P, Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. Physiol Rev，1993；73(1)：161

5 Turpeenniemi-Hujanen T, Thorgeirsson UP, Rao CN et al. Laminin increases the release of type Ⅳ collagenase of from malignant cells. J Biol Chem，1986；261(4)：1883

6 Turpeenniemi-Hujanen T, Thorgeirsson UP, Hart IR et al. Expression of collagenaase Ⅳ (basement membrane collagenase) activity in murine tumor cell hybrids that differ in metastic potential. J Natl Cancer Inst，1985；75：99

7 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

8 Wacher MP, Krutzsch HC, Liotta LA et al. Development of a novel sustrate capture immunoassay for the detection of a neutral metalloproteinase capable of degrading basememt membrane (Type Ⅳ) collagen. J Immunol Methods，1990；126：239

9 Persky B, Ostrowski LE, Pagast P et al. Inhibition of proteolytic enzymes in the in vitro amnion model for basement membrane invason. Cancer Res，1986；46：4129

10 McDoland J. Extracellular matrix assembly. Annu Rev Cell Biol，1988；4：183

11 Liotta LA. Tumor invasion and metastases: Role of the basement membrane. Am J Pathol，1984；117：339

12 Garbisa S, Pozzatti R, Muschel R et al. Secretion of type Ⅳ collagenolytic protease and metastatic phenotype: induction by transfection with c-Ha-ras but not c-Ha-ras plus Ad2-E1a. Cancer Res，1987；47：1523

(收稿：1994-12-31；修回：1995-09-18)

Significance of laminin in tumor cell invasion in cholangiocarcinoma

Wang Shuguang, Han Benli, Chen Yisheng, Duan Hengchun, Peng Zhiming (Clinical Center of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The effects of laminin on the secretion of type Ⅳ collagenase and the invasive potentials of tumor cells of a newly established cell line QBC_{939} of cholangiocarcinoma were observed in vitro to study the biological mechanism of tumor invasion especially the role played by laminin and type Ⅳ collagenase in the invasive process. It was found that different dosages of laminin stimulated the release of type Ⅳ collagenase and increased the invasive potentials of the tumor cells in different degrees, which could be antagonized with anti-laminin antibodies. These facts reveal that laminin plays an important role to mediate tumor invasion and type Ⅳ collagenase is one of the important enzymes involved in tumor invasion and it is suggested that the blocking of laminin effects on tumor cells or inhibition of type Ⅳ collagenase will be a prospective therapy for tumor.

Key words laminin; collagenase; tumor invasion

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