

文章编号:1000-582x(2000)03-0009-03

③ 9-11, 16 细胞骨架对肝癌细胞粘附性的影响

邵开峰, 吴泽志, 王伯初, 龙勉, 蔡绍哲

(重庆大学 生物工程学院, 重庆 400044)

R735.7

摘要: 利用微管吸吮技术, 定量研究了肝癌细胞在IV型胶原/层粘素复合裱衬表面上的粘附特性, 在此基础上, 利用两种细胞骨架干扰剂进一步探讨了细胞骨架系统对肿瘤细胞粘附力的影响。结果: 以正常肝细胞对照, 用细胞松弛素D(0.25~5 μg/mL)处理后, 两种细胞粘附力大大降低约70%~90%, 而癌细胞降低幅度更大。用秋水仙素(1~60 μg/mL)处理后, 癌细胞的粘附力降低或趋于降低, 而正常肝细胞则升高140%~500%, 两种细胞呈不同的效应方式。结论: 细胞骨架系统与细胞的粘附性直接相关, 癌细胞细胞骨架的异常可能是其粘附性异常的结构基础。

关键词: 癌; 细胞松弛素D; 秋水仙素 / 肝细胞; 粘附性
中图分类号: Q 279; Q 66

文献标识码: A

细胞骨架

肝癌细胞

癌细胞的侵袭是一个主动过程, 常经历粘附、侵袭和转移三个步骤, 实际上, 转移可认为是一个动态的粘附运动过程, 它包含了癌细胞与胞外基质之间十分复杂而又精细的生理和生化作用。所以, 细致地了解癌细胞的粘附特性已成为细胞水平上研究癌侵袭和转移的关键。吴泽志^[1]等曾以细胞力学的方法研究了基质大分子VI型胶原(Coll VI)和层粘素(Laminin)与肝癌细胞的粘附性作用关系。为了在更深层次上研究癌细胞的粘附行为与细胞骨架的相关性, 笔者以秋水仙素(colchicine)和细胞松弛素D(cytochalasin D)对细胞骨架进行干扰处理, 利用微管吸吮技术, 进一步研究微丝和微管两种细胞骨架结构在肝癌细胞与IV型胶原/层粘素粘附过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞系

肝癌细胞(hepatocellular carcinoma, HCC), 株名SMMC-7721, 购自第二军医大学; 正常原代肝细胞(hepatocyte)在本室分离纯化。肝组织取自外伤致死的病人, 经0.05%胶原酶消化后梯度离心而制得^[2], 常规台盼蓝检测细胞活度在95%以上。两种细胞均在本实验室培养, 基础培养基RPMI-1640, 购自美国Gibco

公司。完全培养基含10%小牛血清, 0.03%的谷胺酰胺, 10单位/mL的青霉素和10 μg/mL的链霉素。

1.2 细胞骨架干扰剂

秋水仙素购自Sigma公司, 用RPMI1640细胞培养液配成浓度为1 μg/mL, 15 μg/mL, 30 μg/mL, 60 μg/mL的溶液备用; 细胞松弛素D购自Sigma公司, 用RPMI1640细胞培养液配成浓度为0.025 μg/mL, 0.05 μg/mL, 2.5 μg/mL, 5 μg/mL的溶液备用。

1.3 裱衬试剂的准备

IV型胶原购自Sigma公司, 用0.1 mol/L的醋酸(pH 3.5)溶解后, 用PBS液稀释成400 μg/mL的储备液; 层粘素(人胎盘来源)购自美国Sigma公司, 储备液浓度为500 μg/mL, 进一步用三蒸水配为含IV型胶原2 μg/mL和含层粘素为1.25 μg/mL的复合裱衬液; 多聚赖氨酸(poly-D-lysine, PDL)购自Sigma公司, 稀释成2 μg/mL后分装备用; 牛血清白蛋白(BSA)购自华美公司, 以PBS(pH 7.4)配成浓度为0.5%的储备液备用。

1.4 裱衬表面的制作

在一个圆形小室(Chamber)的底面标出约0.5 cm²的圆域, 在圆内逐步裱衬: ①200 μg的PDL(2 μg/mL), 37℃孵育30 min, 轻轻从圆外吸去余液, PBS液清洗1~2次; ②把含浓度为2 μg/mL的IV型胶原和1.25 μg/

收稿日期: 1999-09-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39500037)

作者简介: 邵开峰(1973-), 男, 陕西西安人, 重庆大学博士生, 从事生物工程研究。

mL的层粘素复合裱衬液 200 μ L 铺在记号圆内, 孵育 40 min 后, 吸去余液, 用 PBS 清洗 1~2 次; ③用 0.5% 的 BAS 200 mL, 在 37 $^{\circ}$ C 下注入圆内 15 min 后, 吸去余液, 清洗 1~2 次, 裱衬完毕(附加 0.5% 的 BSA 裱衬消除非特异性粘附的影响^[3])。

1.5 微管吸吮实验

微管吸吮实验系统的结构已另文报道^[4]。该系统由倒置显微镜(Axiovert 35, Zeiss Co)、显微操作器(MR5170, Eppendorf Co)、压力控制与记录系统(本院自制)、电视摄像和磁带录象机(NV-HD100MC, Panasonic Co)以及图象处理仪(Vidas 21, Kontron Co)等部分组成。其中, 微管由普通国产毛细玻管在微管控制器(P87, Sutter Instrument Co)上控制而成, 内径约 6 μ m, 整个实验系统在监视器上的放大倍数约 3 500 倍, 并以 40 μ m 的光栅尺进行标定。

实验系统连结完毕后, 取细胞密度大约为 5×10^5 mL 的细胞悬液约 0.5 mL 放入经方法 4 裱衬的特制的园形小室, 于 37 $^{\circ}$ C 孵箱内湿热静置 30 min 后开始实验。将样本小室置于倒置显微镜载物台上, 于显微镜下确定待实验的粘附细胞(未粘附的细胞于轻微的机械扰动即悬浮)后利用显微操作器引导微管尖端靠近细胞表面, 通过压力控制系统产生一阶跃负压, 以吸吮细胞, 使细胞的小部分被吸入微管内并密封管口, 以显微操作器轻轻侧向牵引细胞离开其粘附的裱衬表面。逐步加大吸吮负压(步长 $5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^3$ Pa)直至求得能使细胞与相应裱衬表面间粘附分离的临界负压值(critical separation negative pressure)。在实验中, 以电视摄像磁带记录的方式记录实验过程, 经电视回放输入

图象处理仪进行有关测量。整个微管吸吮实验在 2.5 h 内完成。

1.6 计算与统计分析

设微管内半径为 R_p , 细胞与相应裱衬表面粘附分离的临界负压为 Δp , 采用如下公式计算细胞在裱衬表面的粘附力(F):

$$F = \Delta p \times \pi \times (R_p)^2$$

实验结果的表述中, 以粘附力($x \pm s$)作为细胞粘附性的定量指标, 并采用两样本均数的 t 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 细胞松弛素 D 对癌细胞粘附性的影响

在 IV 型胶原/层粘素裱衬表面上, HCC 细胞比 hepatocytes 细胞粘附力高出一倍(显著性检验系数 $P < 0.001$), 用松弛素 D (0.25 ~ 5 μ g/mL) 处理后, 与对照组(Control)相比, 两种细胞的粘附力大大降低约 70% ~ 90%, 而癌细胞降低幅度更大。形态观察显示, 用松弛素 D 作用后, 癌细胞定向铺展性明显降低, 粘附斑减少或消失, 而肝细胞作用后铺展性无明显变化。上述结论和现象提示, 微丝系统与癌细胞的粘附性直接相关(结果见表 1)。

2.2 秋水仙素对癌细胞粘附性的影响

与对照组(0)相比, 秋水仙素的作用引起癌细胞粘附力的降低, 而肝细胞的相应值都增高或趋于增高, 两种细胞呈不同的效应方式, 从形态观察显示, 秋水仙素作用后, 两种细胞在裱衬面的非定向铺展性增大(结果见表 2)。

表 1 细胞松弛素 D 对癌细胞在 IV 型胶原/层粘素复合裱衬表面上粘附性的影响 (10^{10} N)

| 浓度 $c/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 0 | 0.25 | 0.5 | 2.5 | 5 |
|---------------------------------------|--|---|---|--|---|
| 肝细胞 | 432 \pm 202 ($n=67$) | 133 \pm 65 ^{**} ($n=63$) | 39 \pm 14 ^{***} ($n=70$) | 120 \pm 81 ^{**} ($n=63$) | 51 \pm 23 ^{***} ($n=63$) |
| 肝癌细胞 | 959 \pm 362 ^{***} ($n=80$) | 111 \pm 67 ^{***} ($n=83$) | 148 \pm 74 ^{***} ($n=73$) | 93 \pm 47 ^{***} ($n=91$) | 158 \pm 62 ^{***} ($n=81$) |

n : 各次测量的样本量

两种细胞用干扰剂处理前后的显著性差异: + + + $P < 0.001$, + + $P < 0.01$;

两种细胞的显著性差异: * * * $P < 0.001$, * * $P < 0.001$ 。

表 2 秋水仙素对癌细胞在 IV 型胶原/层粘素复合裱衬表面上粘附性的影响 (10^{10} N)

| 浓度 $c/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 0 | 1 | 15 | 30 | 60 |
|---------------------------------------|--|--|--|--|--|
| 肝细胞 | 432 \pm 203 ($n=67$) | 968 \pm 327 ^{***} ($n=66$) | 224 \pm 923 ^{***} ($n=59$) | 615 \pm 298 ^{***} ($n=56$) | 1651 \pm 652 ^{**} ($n=62$) |
| 肝癌细胞 | 959 \pm 362 ^{***} ($n=80$) | 407 \pm 109 ^{***} ($n=74$) | 979 \pm 474 ^{***} ($n=63$) | 534 \pm 308 ^{***} ($n=72$) | 428 \pm 185 ^{***} ($n=76$) |

n : 各次测量的样本量

两种细胞用干扰剂处理前后的显著性差异: + + + $P < 0.001$, + + $P < 0.01$;

两种细胞的显著性差异: * * * $P < 0.001$, * * $P < 0.001$ 。

3 讨论

本文中主要研究细胞骨架干扰剂如何影响肝癌细胞在 IV 型胶原/层粘连素复合裱衬表面的粘附特性。

用细胞骨架干扰剂来研究细胞骨架的生物学功能已有许多报道。对于中性粒细胞、成纤维细胞以及黑色素瘤细胞的工作表明,秋水仙素可抑制中性粒细胞、成纤维细胞的迁移运动^[5];Liotta 进一步使用微管干扰剂 tubolozole 的顺、反异构物 Cis-tubolozole(可抑制微管合成)和 trans-tubolozole(不能抑制微管合成)发现微管干扰剂的确是通过破坏微管而产生了抑制细胞迁移作用,而非药物本身的直接作用^[3]。同样的,细胞松弛素 B 和 D 被发现可通过抑制肌动蛋白聚合来抑制成纤维细胞、中性粒细胞和神经胶质瘤细胞的迁移或粘附⁶,所以采用细胞骨架干扰剂研究细胞骨架在细胞粘附中的作用是可行的。

本实验采用秋水仙素和细胞松弛素 D 分别作为微管和微丝的干扰剂,结果显示当秋水仙素作用后,肝癌细胞的粘附力下降了,而肝细胞在剂量范围内上升了;当细胞松弛素 D 作用后,肝癌细胞与肝细胞粘附力大大下降(约 70%~90%)。上述结果表明在 IV 型胶原/层粘连素复合裱衬表面上,癌细胞具有不同于正常细胞的异常粘附行为,细胞骨架系统与细胞粘附直接相关。

对中性粒细胞和成纤维细胞的实验^[7]表明细胞骨架,尤其是微丝系统,是集中粘附斑(focal contact)形成的必要条件。集中粘附斑把细胞膜和胞外基质的粘附与细胞骨架连结起来,进行更有利于功能发挥的细胞骨架重组,更直接的实验发现^[8]:将微量移液管连到活细胞表面的粘接受体上并往外拉,这样细胞骨架随即按拉力的方面重新调整。这与本实验中,细胞用细胞松弛素 D 处理后,粘附斑减少或消失,肝癌细胞与肝细胞粘附力大大下降(约 70%~90%)的结果是一致的。这些实验现象和结果都提示:微丝可能对细胞粘附性起决定作用。

同时,与正常细胞对照,癌细胞具有特异的粘附性,如本文中结果显示:肝癌细胞在 IV 型胶原/层粘连素裱衬面粘附力远远大于对照组肝细胞,而且后者在复合裱衬面上铺展性好,在外力(suction force)作用下易形成膜系带^[9](membrane tether),解除外力后,回复

性好。而肝细胞和用秋水仙素和细胞松弛素处理后的癌细胞则无此现象,既然细胞的粘附性与细胞骨架密切相关,那么,癌细胞异常的粘附行为是否具有相应的细胞骨架基础?多个实验室^[10]报道,癌细胞的微管数量远低于正常组,正常组的微丝系统在癌细胞大量缺失,同时癌细胞又增加表达一些新的骨架蛋白。对 SMMC-7721 肝癌细胞和肝细胞的免疫组化实验结果也反映癌细胞具有异常的细胞骨架系统。这提示,相对于正常细胞,癌细胞细胞骨架的改变可能是其粘附性异常的结构基础。

参 考 文 献

- [1] 吴泽志,邵开峰,蔡绍哲,等. 肝癌细胞在胶原蛋白 IV 裱衬表面的粘附性研究[J]. 中华医学杂志, 1997, 79(5): 369 ~ 372.
- [2] BRAET F, ZANGER R D, SASAKI M, et al. Assessment of method of isolation, purification and cultivation of rat liver endothelial cells[J]. Lab Invest, 1994, 70: 954 ~ 957
- [3] MARY L, SOROUSH M, LIOTTA L A, et al. Cytoskeletal egeints inhibit motility and adherence of human tumor cells[J]. Kidney International, 1993, 43: 151 ~ 157.
- [4] 吴泽志,李志清,龙勉,等. 烧伤大鼠粒细胞与内皮细胞粘附力学特性的研究[J]. 生物医学工程学杂志, 1996, 13(3): 219 ~ 222.
- [5] VASILIEV J M, GELFAND I M, DOMNINA L A, et al. Effect of colchimid on the locomotory behavior of fibroblasts[J]. J Embryol Exp Morph, 1970, 24: 625 ~ 640.
- [6] CARTER S B. Effects of cytochalasins on mammalian cells[J]. Nature, 1967, 213: 261 ~ 264.
- [7] RINNERHALER C, GEIGER B, SMALL J V. Contact formation during fibroblast locomotion: Involvement of membrane ruffles and microtubules[J]. J Cell Biol, 1988, 106: 747 ~ 760.
- [8] WANG NING, JAMES P, INCBER D E. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton[J]. Science, 1993, 260: 1124 ~ 1127.
- [9] SHAO JIN-YU, HOCHMUTH R M. Micropipette Suction for Measuring Piconewton Forces of Adesion and Tether Formation for Neutrophil Membranes[J]. Biophysical Journal, 1996, 71: 2892 ~ 2901.
- [10] BEN-ZEE A. The cytoskeleton in cancer cells[J]. Biochem Biophys Acta, 1985, 780: 197 ~ 212.

(下转 16 页)

Experimental Research on Pressure Elastic Waves Propagating in the Artificial Bile Duct System Model

LIU Fang¹, YAN Rui-fang¹, XU Si-rong¹, WU Yun-peng¹, XIE Wei-dong²

(1. College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China;

2. College of Mechanical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

ABSTRACT: In this Study, according to the principle of similitude, the model of bile duct system (that is BSM) has been simulated by transparent rubber and has been verified. A specific oscillator DZ-5 for the biliary system produced the pressure elastic waves with different wave shapes, frequency and amplitudes. A microcomputer system are used to study the principle of the pressure elastic waves propagating in BSM and the function of Oddis sphincter, and then the experiment of removing gallstones on the experimental installation of BSM is carried out. A mechanism for moving gallstones that based on the theoretical analysis is verified by this study, and then to be perfected. It is suggested to put the one-way valve in T-type tube for patients whose sphincters lose effectiveness. The optimum parameters of pressure elastic waves and the effect of pulse frequency on the removing gallstones have to be further discussed.

KEYWORDS: gallstones; bile ducts; pressure elastic waves

(责任编辑 李胜春)

* * * * *

(上接 11 页)

Relevance of the Cytoskeleton System to the Adhesion Properties of the HCC Cells

SHAO Kai-feng, WU Ze-zhi, WANG Bo-chu, LONG Mian, CAI Shao-xi

(College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

ABSTRACT: The adhesion properties of both hepatocytes and hepatocellular carcinoma cells(HCCs) onto the Coll IV/laminin coated surface were measured by means of micropipette aspiration technique. Furthe, relevance of microfilament and microtubule systems to the adhesion properties of the HCCs on coll IV/laminin coated dishes were investigated by using cytoskeletal agents colchicine and cytochalasin D. The results showed: cytochalasin D, which inhibits microfilament polymerization, had great inhibitory effect on adherence of both kinds cell to Coll IV/Laminin substratum (about 70%90%). Colchichine, which inhibits microtubular polymerization, had different effects on both cells; Compared with untreated groups, the adhesion forces of HCC cells decreased and those of hepatocytes increased. These data suggested that, in these tumor cells, microfilaments are crucial for adherence, and abnormal cytoskeletons of tumor cells may be basis of their abnormal adhesion properties.

KEYWORDS: carcinoma; cytochalasin D; colchicine / hepatocellular; adhesion

(责任编辑 李胜春)