

文章编号:1000-582X(2002)06-0098-04

整合素在肝癌细胞侵袭和转移中的作用^{*}

傅遍红^{1,2}, 吴泽志¹

(1. 重庆大学生物工程学院及国家教育部生物力学与组织工程重点实验室, 重庆 400044;

2. 重庆大学资源及环境科学学院, 重庆 400044)

摘要:癌细胞与细胞外基质(ECM)的粘附是恶性肿瘤侵袭首要步骤。肿瘤细胞与细胞外基质的粘附是通过细胞膜表面的特异受体介导的,其中整合素家族为重要的粘附分子。对整合素表达相关的细胞外基质的介绍及肝癌细胞侵袭与转移中整合素研究的综述,可了解相关的整合素所介导肝癌细胞与细胞外基质、肝癌细胞之间的相互作用。文中提及肝癌细胞趋化运动中相关的整合素,有助于进一步了解整合素在肝癌侵袭与转移中的作用。整合素参与了整个肝癌细胞的侵袭转移过程。寻找出干扰整合素与配体相互作用、特异性增加或减少整合素在肿瘤中的表达的物质,从而阻断肿瘤的侵袭与转移,对抗癌药物的研究有着深远的影响。

关键词:肝细胞癌细胞; 侵袭; 转移; 整合素; 粘附; 趋化

中图分类号:R73-37

文献标识码:A

癌细胞侵袭和转移是一个机理较为复杂的过程。细胞与细胞外基质(ECM)的粘附是恶性肿瘤侵袭首要步骤。肿瘤细胞与ECM的粘附是通过细胞膜表面的特异受体介导的。其中最为重要的粘附分子为整合素家族^[1]。

恶性肿瘤在向远处转移时首先必定侵袭ECM,整合素^[2-3]是通过传递特定的信号或诱导基因的表达来控制肿瘤细胞的存在或凋亡。整合素为粘附分子中由 α 亚单位和 β 亚单位以非共价键连接而成的异二聚体的跨膜糖蛋白,其中 α 亚单位分子量介于120 ku和180 ku之间; β 亚单位介于90 ku至110 ku。 α 亚单位胞内区域较短,而胞外区域较长,含钙离子结合区;而 β 亚单位胞内域较长,胞外区域含有胱氨酸重复序列,可通过与纽带蛋白等结合完成细胞内外双向信号的传递^[2]。目前所知道有16种 α 亚单位,9种 β 亚单位。整合素可分为两类,一类是可以介导细胞与细胞外基质粘附,另一类可以介导细胞与细胞粘附^[4-5]。主要有 $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$,其主要为胶原蛋白和层粘连蛋白受体; $\alpha_3\beta_1$ 为胶原蛋白、层粘连蛋白和纤粘连蛋白的受体;整合素 $\alpha_4\beta_1$ 和 $\alpha_5\beta_1$ 为纤粘连蛋白受体; $\alpha_6\beta_1$ 和 $\alpha_6\beta_4$ 为层粘连蛋白受体^[4]。

有通过侵袭ECM所形成的通道,肿瘤细胞才能进

入血液和淋巴管发生转移。侵袭可认为是在ECM中粘附与去粘附交互协调进行的细胞运动过程。肿瘤细胞与细胞外基质的相互作用是肿瘤发生侵袭、转移的重要前提。

1 整合素表达相关的细胞外基质

恶性肿瘤在转移中,首先与ECM发生粘附,侵袭ECM。细胞外基质是由胶原纤维、弹性纤维等纤维成分包埋于由蛋白多糖和糖蛋白组成的三维网架结构。ECM参与组织的细胞连接所形成的构型,介导细胞粘附、影响细胞分化和增殖,同时可作为大分子物质在组织内扩散的分子筛。人体内ECM主要有以下几种:1) 基底膜,主要包括IV型胶原、V型胶原、层粘连蛋白(LN),纤粘连蛋白(FN)等。分布于表皮下、血管内皮下、体腔间皮下、肌细胞及神经周围。2) 结缔组织间质,将血管或淋巴管与器官实质分开,包括I型、III型、V型胶原及其它胶原、弹性蛋白纤维、FN和一些蛋白多糖等。3) 骨和软骨基质,主要成分为I、II型胶原、弹性蛋白纤维、蛋白多糖等,是人体内容量最大的ECM。

恶性肿瘤细胞与细胞外基质的相互作用是肿瘤发生侵袭与转移的重要前提。20世纪80年代初,美国

* 收稿日期:2002-02-19

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970198)及高等学校重点实验室访问学者基金资助项目(校科字[2002]4号)

作者简介:傅遍红(1968-),女,重庆市人,重庆大学助理研究员,博士研究生,从事肝癌细胞侵袭与转移过程趋化及粘附相关的生物学机理研究。

国立研究所 Lance A. Liotta 提出了恶性肿瘤侵袭的三步学说^[6],即第一步细胞与 ECM 发生粘附和附着。第二步是肿瘤细胞本身或诱导宿主细胞分泌蛋白水解酶降解基质。最后一步即趋化或趋触介导的细胞运动。对于第一步细胞与 ECM 的粘附和附着,肿瘤细胞在侵袭与转移过程中首先必须围绕血管发生粘附继而穿过基底膜侵入血管中^[5],此步骤由细胞膜表面特异受体与相应配体(如:FN、LN 和 IV 型胶原等)通过非共价键结合介导。IV 型胶原蛋白与层粘连蛋白为主要基底膜成分,其表达的增强可促进肿瘤细胞运动,刺激血管生成因子,促进肿瘤血管生成。当 IV 型胶原溶解时,层粘连蛋白随之瓦解。HCC 转移时,组织中 LN 明显降低而血清中 LN 显著增加^[7]。纤粘连蛋白是细胞表面的糖蛋白,通过细胞膜受体整合素参与细胞的粘附、形态维持、细胞分化、生长及信息传递等。所以目前人们对细胞外基质主要集中在 IV 型胶原蛋白、层粘连蛋白和纤粘连蛋白上。

整合素 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_{10}\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_1$ 识别配体上特定氨基酸序列精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸三肽结构,其中,精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸三肽结构为肿瘤细胞表面配体与特异受体相结合时最常见的识别序列。整合素 $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_4$ 还识别 LRE、YIGSR、PDSGR 序列。整合素 $\alpha_1\beta_4$ 还识别 LDV、CSI、REDV 序列^[7-9]。因此,整合素通过识别 ECM (ColIV、FN、LN 等)及细胞膜上免疫蛋白超家族粘附分子、细胞间粘附分子(ICAM)等介导细胞-基质及细胞间粘附反应,并接受、传导信号以调节细胞生存、运动、增殖、凋亡等,对肿瘤侵袭与转移起着重要作用。Sheu et al^[10]利用免疫荧光发现三黄素(一种富含胱氨酸的多肽)通过其 RGD 序列与肝癌细胞表面的整合素受体 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 结合,从而阻断了肝癌细胞与细胞外基质的粘附。

2 肝癌细胞侵袭与转移中整合素的表达

整合素作为信号传递分子,目前认为整合素信号传递主要有以下途径:1)通过局灶粘附斑激酶(PPI25FAK)和其他酪氨酸激酶诱导的蛋白酪氨酸残基磷酸化作用;2)通过胞内 Ca^{2+} 、 H^+ 升高及钙激活蛋白酶的作用,促进细胞粘附细胞间通讯;3)通过 G 蛋白调节作用模型,即影响 cAMP 的水平及刺激磷脂酰肌醇二磷酸(PIP2)的合成;4)通过影响白介素的产物^[11-14]。整合素不同可能采取不同的方式传导信号,而传递信号途径的多样性可能是不同整合素特异性的体现。

从 Patriarca et al^[15]对肝癌细胞病理学研究表明 β_1 链免疫反应呈阳性。对癌周肝硬化组织中肝细胞进行 polarized pattern 染色技术和 30 例肝肿瘤细胞采用

polarized 和 non-polarized pattern 染色技术可知: β_1 免疫反应被限制在癌周肝硬化组织中的窦状隙内皮细胞和肝癌中类似于窦状隙结构中的内皮细胞。另外从 Couvelard et al^[16]也发现在正常肝和肝硬化肝中窦状隙内皮细胞中整合素 β_1 链的表达。因此,作者认为:肝细胞癌中整合素 β_1 链亚单位具有明显表达。现已知 β_1 亚族作为基质及细胞间的粘附受体,介导细胞与细胞外基质成分的结合,及与激活的血管内皮细胞的粘附反应。

肝癌侵袭和转移以及手术后复发是治疗失败和病人死亡的主要原因之一。肝癌侵袭是一个十分复杂的过程,涉及癌细胞的粘附、基质的降解、细胞的迁移等许多环节。细胞的粘附是其中的重要步骤。上海医科大学附属中山医院肝癌研究所采用免疫组化、印迹杂交及核酸杂交技术、酶链反应技术对肝癌中整合素 α_5 亚基表达分析^[17]。其结果表明:对于 FN,整合素蛋白 α_5 亚基在肿瘤组织中的表达阳性率低于非肿瘤组织,尤其在恶性的肝细胞癌中 α_5 亚基表达减少更多;高转移性肝细胞癌(LCID20)中 α_5 mRNA 表达呈阴性,而在低转移性肝细胞癌(LCID35)中 α_5 mRNA 表达明显呈阳性^[18];Anti- α_5 可阻断肝癌细胞上整合素 α_5 亚单位的表达,从而抑制肝癌细胞与 FN 的粘附;癌周组织表达率明显高于肝癌;分化较高的肝癌 α_5 亚基阳性率高于分化低的肝癌; α_5 表达呈阳性的肿瘤直径小于阴性肝癌直径(肝癌直径 ≤ 5 cm 的 α_5 阳性表达率高于直径 ≥ 10 cm 的肝肿瘤)。目前已有的研究证实:整合素 α_5 亚基通过改变细胞粘附能力而对肝癌细胞生长、分化、侵袭和转移等具有负调节, α_5 亚基的低表达对肝癌细胞生长、低分化、包膜侵犯、癌细胞在肝内转移的发生及临床病期相关,其原因可能是由于整合素蛋白 α_5 亚基表达下降,肝癌与 ECM 中的 FN 粘附能力下降,导致癌细胞易向周围移动扩散,侵犯包膜和血管,形成门静脉癌栓和肝内播散。所以, α_5 亚基可能是肝癌的负调节因子,与肝癌的侵袭与转移密切相关。

肝癌侵袭与转移过程中,肝癌细胞首先必须粘附,并穿过基底膜才能实现侵袭与转移的关键步骤。Takuji Torimura et al^[19]对 KIM-1, KYN-1,2 肝癌细胞免疫荧光和流式细胞仪分析表明:整合素 α_1 、 α_2 、 α_3 、 α_6 和 β_1 亚单位在肝细胞边缘表达呈阳性,而 β_4 表达呈阴性。所有 α 、 β 异二聚体整合素和未偶合 α 、 β 亚单位不能出现在细胞表面,即肝癌细胞 $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 和 $\alpha_6\beta_1$ 在肝癌细胞边缘表达。肝癌细胞边缘可粘附到层粘连蛋白上, LN 在肝癌细胞的转移中起着重要作用,随着层粘连蛋白的沉积,整合素 $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$ 在肝癌细胞中的表达发生变化,其中, $\alpha_6\beta_1$ 变化起主导作

用^[20]; Anti- $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$, 和 β_4 不能阻断 KIM-1, KYN-1, 2 肝癌细胞与层粘连蛋白的粘附作用; 而 Anti- α_6 和 β_1 明显地阻断了肝癌细胞与层粘连蛋白的粘附。实验从而证实了整合素 α_6 和 β_1 亚单位表达增加与肝癌侵袭和转移密切相关。另外, 动物体外实验表明癌细胞与层粘连蛋白的粘附, 可以刺激癌细胞中 IV 型胶原酶的释放, 从而促进癌细胞的侵袭转移^[21]。北京医科大学的路艳艳^[22-23]等采用 dominant negative 方法, 以无功能的 $\alpha_6\beta_1$ -TR 代替细胞表面 $\alpha_6\beta_1$ 受体, 从而消除人肝癌细胞 Bel7402 $\alpha_6\beta_1$ 受体的功能。结果显示: 消除了 $\alpha_6\beta_1$ 受体功能的人肝癌细胞迁移能力明显降低; 侵袭并穿过人工基底膜的细胞系数降低了 46.7%; 细胞基质金属蛋白酶 MMP-9 的分泌几乎完全被控制, 活化型的 MMP-2 降低 43.9%。因此, 得出结论: 人肝癌细胞在 LN 基质上的迁移、侵袭及 MMPs 的分泌和活化主要由 $\alpha_6\beta_1$ 受体介导。肝癌组织中层粘连蛋白和整合素 $\alpha_6\beta_1$ 的高表达, 对肝癌的发展可能起重要作用。

不同的配体蛋白, 其整合素受体也有区别。Carloni et al^[24]证实: HCC 细胞主要存在整合素 $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$ 表达, $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 主要介导 HepG2 肝癌细胞与 Col I 粘附; $\alpha_6\beta_1$ 主要介导 HepG2 肝癌细胞与 LN 的粘附; $\alpha_6\beta_1$ 介导 HepG2 肝癌细胞的侵袭、转移及细胞的增殖, 并在肝癌细胞与层粘连蛋白粘附中起主导作用。虽然整合素 $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 为胶原蛋白和层粘连蛋白受体, $\alpha_3\beta_1$ 为胶原蛋白、层粘连蛋白和纤粘连蛋白的受体, 但这几种整合素在对肝癌细胞与层粘连蛋白粘附中并无直接关系, 它们很可能只是介导了细胞与胶原蛋白和纤粘连蛋白粘附^[4]。

癌细胞粘附于血管内皮是肿瘤血行转移的重要步骤, 从人肝癌细胞系 HepG2 的研究发现: 肿瘤细胞通过 E-选择素附着于血管内皮细胞, 其后癌细胞接受细胞因子的刺激(如: 肝细胞生长因子 HGF 的刺激), 可导致整合素 $\alpha_2\beta_1$ 表达, 进一步加强了肝癌细胞对血管壁外 ECM 的粘附, 从而加速了 HCC 细胞向血管外转移^[25]。

肝癌能否治愈主要依靠其转移性。癌细胞侵袭受细胞外基质成分的改变和整合素表达的调节。Giannelli G et al^[26]研究发现: HCC 转移除受粘附在 LN 上的金属蛋白酶 MMP-2 和 MT1-MMP(主要促进 ECM 降解, 从而加速肿瘤细胞的侵袭和转移)等因素影响外, 还受整合素 $\alpha_3\beta_1$ 影响。因为有整合素 $\alpha_3\beta_1$ 表达的肝癌细胞可分泌胶原酶, 通过重建基底膜, 从而使 HCC 细胞在 LN 上迁移。迁移过程中 Anti- $\alpha_3\beta_1$ 可阻断胶原酶的活性, 从而影响癌细胞的运动迁移。因此, 著者认为: 肝癌的侵袭和迁移与胶原酶和整合素 $\alpha_3\beta_1$

有关。

癌细胞侵袭行为的重要生物学特性癌细胞伪足形成及趋化运动, 它不同于细胞的被动变形, 它是由趋化剂与细胞膜趋化受体结合后介导的主动耗能的过程。ECM 是引起癌细胞趋化效应的重要趋化剂, 其中尤以基底膜成分 IV 型胶原、LN 及 FN 引起有关研究者的重视, 前二者为基底膜的主要成分, 后者也广泛分布于结缔组织间质。应用细胞生物学及分子生物学研究方法, 人们对一些癌细胞, 如恶性黑色素细胞瘤细胞, 对胞外基质趋化的受体及信号机制, Aznavooria, S 等人^[27]已有相当的研究, 但还远未达到对趋化过程及机理的详细了解, 对肝癌细胞的研究更加薄弱。我们的工作将利用流式细胞仪、微管等现代分子生物学和生物流变学技术在细胞层次上对肝癌细胞趋化运动相关的整合素受体、趋化剂分子中与趋化相关的整合素受体识别序列等问题进行探讨。这一工作无疑对清楚地了解肝癌细胞侵袭与转移过程肿瘤细胞运动以及整合素在肝癌细胞运动中的表达意义重大。

3 结语

肝癌细胞侵袭与转移过程中, 与整合素 $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_1$ 等相关。

肝癌细胞的侵袭与转移中整合素除介导 HCC 细胞与 HCC 细胞、HCC 细胞与细胞外基质的粘附外, 整合素还参与了细胞外基质的降解以及肿瘤细胞的运动(趋触与趋化)、细胞的增殖和凋亡等活动, 即整合素参与了整个肝癌细胞的侵袭转移过程。寻找出干扰整合素与配体相互作用、特异性增加或减少整合素在肿瘤中的表达的物质, 从而阻断肿瘤的侵袭与转移, 对抗癌药物的研究必定有着深远的影响。

参考文献:

- [1] EDELMAN J M, DIMILLA P A, AS M. PRINCIPLES of CELL ADHESION [M]. Boca Raton, Ann Arbor, London: Richardson, P D, Steiner, M, eds, CRC Press, 1995.163-186.
- [2] CHERESH D. Integrins: structure, function, and biological properties [J]. Adv Mol Cell Biol, 1993,6:225-228.
- [3] ALBELDA S M, BUCK C A. Integrins and other cell adhesion molecules[J]. FASEB J, 1990,4:2 868-2 880.
- [4] HYNES R O. Integrins: versatility, modulation and spreading in cell adhesion[J]. Cell, 1992,69:11-25.
- [5] ALBELAD S M. Biology of disease: role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis[J]. Lab Invest, 1993,68:4-17.
- [6] LIOTTA L A, RAO C N. Tumor invasion and the extracellular matrix[J]. Lab Invest, 1983,49(6):636-649.
- [7] 郑世曦, 陈汉琴, 杨军, 等. 层粘连蛋白在人原发性肝癌细胞转移中的意义[J]. 华人消化杂志, 1998,6:507-509.

- [8] YAMADA K M. Adhesive recognition sequences[J]. *J Biol Chem*, 1991,266:12 809 - 12 812.
- [9] HYNES R O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion[J]. *Cell*, 1992,69:11 - 25.
- [10] SHEU J R, LIN C H. Triflavin, an Arg - Gly - Asp - containing peptide, inhibits the adhesion of tumour cells to matrix proteins via binding to multiple integrin receptors expressed on human hepatoma cells[J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1996,213:71 - 79.
- [11] BATES R C. Apoptosis induced by inhibition of intracellular contact[J]. *J Cell Biol*, 1994,125:403 - 415.
- [12] FALK M H, HULTNER L, MILNER A, et al. Irradiated fibroblasts protect Burkitt lymphoma cells from apoptosis by a mechanism independent of bcl - 2[J]. *Int J Cancer*, 1993,30 (55): 485 - 491.
- [13] ROSALES C, O' BRIEN V K L, JULIANO R. Signal transduction by cell adhesion receptors[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995,28 (1242):77 - 98.
- [14] 孙大业,郭艳林,马力耕. 细胞信号转导[M].第2版.北京:科学出版社,2000.
- [15] PATRIARCA C, RONCALLI M. Patterns of integrin common chain β_1 and collagen IV immunoreactivity in hepatocellular carcinoma. Correlation with tumour growth rate, grade, and size[J]. *J Pathol*, 1993,171:5 - 11.
- [16] COUVELARD A, SCOAZEC J Y, FELDMANN G. Expression of cell - cell and cell - matrix adhesion proteins by sinusoidal endothelial cells in normal and cirrhotic human liver[J]. *Am J Pathol*, 1993, 143:738 - 752.
- [17] YAO MIN, ZHOU XINDA. Expression of the integrin α_5 subunit in hepatocellular carcinoma[J]. *Natl Med J China*, 1997,77(5):382 - 384.
- [18] YAO M, ZHOU X D. Expression of the integrin α_5 subunit and its mediated cell adhesion in hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1997,123:435 - 440.
- [19] TORIMURA T, UENO T. Integrin $\alpha_6\beta_1$ plays a significant role in the attachment of hepatoma cells to laminin[J]. *J Hepatol*, 1999,31:734 - 740.
- [20] TORIMURA T, UENO T. Coordinated expression of integrin $\alpha_6\beta_1$ and laminin in hepatocellular carcinoma[J]. *Hum Pathol*, 1997,28:1 131 - 1 138.
- [21] TURPEENNIEMI - HUIJANEN T, THORGEIRSSON V P. Laminin increases the release of type IV collagenase from malignant cells[J]. *J Biol Chem*, 1986,(261):1 881 - 1 889.
- [22] 路艳艳,周柔丽. 整合素 $\alpha_6\beta_1$ 增强人肝癌细胞侵袭性机制的探讨[J]. *中华肿瘤杂志*, 2000,7(22):287 - 289.
- [23] 路艳艳,周柔丽. 以“dominant negative”策略消除人肝癌细胞表面层粘连蛋白受体 $\alpha_6\beta_1$ 的功能[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000,16(1):133 - 137.
- [24] CARLONI V, ROMANELLI R G. Knockout of $\alpha_6\beta_1$ - integrin expression reverses the transformed phenotype of hepatocellular cells[J]. *Gastroenterology*, 1998, 115:433 - 442.
- [25] KAWAKAMI - KIMURA N, NARITA T. Involvement of hepatocyte growth factor in increased integrin expression on HepG2 cells triggered by adhesion to endothelial cells[J]. *Br J Cancer*, 1997,75:47 - 53.
- [26] GIANNELLI G, BERGAMINI C. Human Hepatocellular Carcinoma (HCC) Cells Require Both $\alpha_3\beta_1$ Integrin and Matrix Metalloproteinases Activity for Migration and Invasion[J]. *Lab Invest*, 2001,81(4):613 - 627.
- [27] AZNAVOORIA S, MARY L. Signal Transduction for Chemotaxis and Haptotaxis by Matrix Molecules in Tumor Cells[J]. *J Cell Biol*, 1979,110:1 427 - 1 438.

Relationship of Integrins and Hepatocellular Carcinoma(HCC) Cells during Invasion and Metastasis

FU Bian - hong^{1,2}, WU Ze - zhi¹

(1. College of Bioengineering, Key Laboratory for Biomechanics and Tissue Engineering under the State Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400044, China;

2. College of Resource and Environment Science, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: This is the first key step of carcinoma cells attachment to the extracellular matrix (ECM), which is mediated by the special receptors of cell's exterior. Integrins belong to the most important attachment molecular. A brief review on hepatocellular carcinoma (HCC) cells' integrins & ECM pertinent during invasion and metastasis is given. The recognition of integrins mediating HCC cell - cell adhesion & HCC cells attachment to ECM and integrins' expression during chemotaxis helps us to understand the significant role of integrins during the whole process. The integrins relate to the process of HCC' invasion and metastasis. People are looking forward to anti - integrins so as to interdict or weaken the reciprocity between integrins & ligands, which must bring aspiring effect to the research on anti - cancer medicine.

Key words: hepatocellular carcinoma cells; invasion; metastasis; integrin; adhesion; chemotaxis

(责任编辑 李胜春)