

不同的人大肠癌细胞体外侵袭力 及相关生物学特性的比较研究*

孙宝栋 宋今丹

(中国医科大学细胞生物学卫生部重点实验室 沈阳 110001)

侵袭是癌细胞最重要的生物学特性之一。癌细胞与细胞外基质,特别是与基底膜的相互作用是侵袭过程的特征。侵袭过程包括癌细胞附着基底膜、使细胞外基质的蛋白水解,然后通过缺损基质而迁徙^[1]。因此,癌细胞的粘附性、移动性及其分泌蛋白溶解酶降解细胞外基质成分的能力,与其侵袭力的高低是密切相关的。本文利用人羊膜基底膜(HABM)模型对两种高分化人大肠癌细胞 CCL229 和 CX-1 体外侵袭力进行了比较,并结合琼脂糖滴分析及扫描电镜等方法,试图通过对它们的粘附性、移动性及细胞表面形态等差异的比较来探讨人大肠癌细胞的生物学表型与其侵袭力的关系,为进一步研究人大肠癌细胞的侵袭机理从而防治癌细胞的侵袭和转移提供科学依据。

材料与方 法

一、细胞

两种人大肠癌细胞 CCL 229 和 CX-1(美国哈佛大学医学院 Dana-Farber 肿瘤所惠赠)培养于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中,在 100% 湿度、37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。

二、人羊膜的处理^[2]

取足月正常产或剖腹产新鲜胎盘(沈阳市中心医院围产室提供),立即在无菌条件下剥离羊膜,用 pH 7.2 的 PBS-PSF(含青霉素 1000 U/ml,硫酸链霉素 1000 μg/ml,两性霉素 2.5 μg/ml)缓冲液清洗 3 次,然后在室温条件下用 0.25 mol/L NH₄OH 溶液处理 2 小时以溶解表层。在无菌的超净工作台中用橡皮铲将羊膜上残余的上皮细胞轻轻刮去,再用 PBS-PSF 缓冲液清洗 3 次,最后保存于含 PSF 的 DMEM 培养

基中待用(不超过一周)。每次实验所用羊膜应来源于同一胎盘。

三、CCL 229 和 CX-1 细胞表面形态的观察

利用常规方法制备培养细胞扫描电镜标本,并在日立 S-450 型扫描电镜下观察、摄影。

四、侵袭力定量分析

自制 HABM 侵袭模型(如图示):由硬塑制成上下两个圆柱形区室,直径均为 1.5 cm,高均为 1.0 cm,中间由羊膜和孔径为 0.45 μm 的滤膜将上下两室分开,羊膜的基底膜面朝上室,滤膜紧贴羊膜的基质面以截住穿过羊膜的细胞。实验细胞传代 48 小时后,经 0.25% 胰酶-EDTA 消化,加入少量含 5% 小牛血清的 DMEM 培养基并吹打成悬液,接种于模型上室(5×10⁵ 个细胞/上室),下室内充满无血清 DMEM 培养基。37℃、5%CO₂ 条件下培养,分别在 24 小时、48 小时、72 小时、96 小时后,取下羊膜并立即放入 2.5% 戊二醛中固定,进行扫描电镜标本的制备和观察。滤膜取下后经固定、H·E 染色,显微镜下计数穿过羊膜并附着于滤膜上的细胞数。每种细胞做 4 组平行实验。

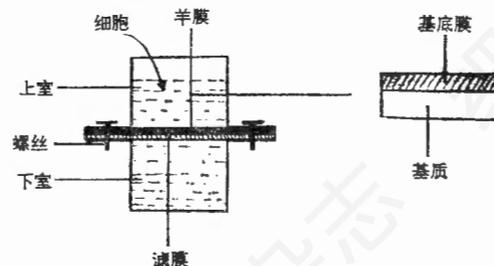


图 HABM 体外侵袭模型

* 国家自然科学基金资助项目。

五、粘附性实验^[3]

实验细胞传代 48 小时后, 用 0.25% 胰酶-EDTA 消化, 加入少量含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基并吹打成悬液, 然后接种于自制模型上室 (1×10^5 个细胞/上室), 在 37°C、5% CO₂ 条件下分别培养 2 小时、4 小时、6 小时后弃去培养基, 用 pH 7.2 PBS 缓冲液漂洗 3 次后, 经 0.25% 胰酶-EDTA 消化, 收集粘附于羊膜基底膜上的细胞, 计数并计算粘附率。每种细胞做 4 组平行实验。

六、移动性分析

利用 Varanl 等^[4] 建立的琼脂糖滴法进行分析。

七、增殖状况分析^[5]

实验细胞以 1×10^5 个细胞/瓶接种于培养瓶中, 37°C、5% CO₂ 条件下培养, 分别在第 2、4、6 天收集细胞, 经台盼蓝染色后计算每瓶中的活细胞数, 每组 3 瓶细胞。

结 果

一、人大肠癌细胞 CCL 229 和 CX-1 细胞表面形态的观察

常规扫描电镜下观察 CCL 229 细胞铺展状况良好, 多为梭形, 呈成纤维样均匀分布生长; 图版图 1 所示为典型的 CCL 229 细胞形态: 细胞两端伸出长的突起, 细胞表面极不光滑, 有许多大小均匀的小泡状突起, 同时细胞向外伸出许多指状和丝状伪足, 这些伪足大小不一, 形态各异。而 CX-1 细胞多为圆形, 呈上皮样集落式生长; 细胞突起较少, 表面凸凹不平, 有大泡状突起; 极少见针状和丝状伪足 (图版图 2)。

二、体外侵袭力的比较

CCL 229 细胞在接种 24 小时后, 只有极个别细胞穿过了羊膜, 随着时间的增长, 穿透羊膜细胞数逐渐增多。而 CX-1 细胞直到 48 小时后才有极少数通过了羊膜。至 96 小时, CX-1 细胞穿透羊膜的细胞数约比 CCL 229 细胞在相应时间内低 4 倍 ($P < 0.01$) (表 1)。

侵袭实验后的人羊膜在扫描电镜下观察结果显示: 在羊膜基底膜面的 CCL 229 细胞由原来的长梭形变为圆形, 细胞表面微细突起减

表 1 人大肠癌细胞 CCL 229 和 CX-1 体外侵袭力比较

	侵袭力: 细胞数/10 个视野 ($\bar{x} \pm s$)			
	24 小时	48 小时	72 小时	96 小时
CCL 229	2±1	21±4	41±5	70±10
CX-1	—	3±1	8±2	14±3

* $p < 0.01$

少, 但伸出许多较长且带有分枝的丝状和片形伪足, 并有部分伪足已向下伸入进基底膜中 (图版图 3)。在羊膜的基质面, 可观察到癌细胞正在穿越羊膜, 癌细胞周围的基质有不同程度的损坏 (图版图 4)。

三、粘附性分析

通过两种癌细胞在相同时间内对基底膜的粘附率的不同来比较它们的粘附性。在细胞分别接种 2 小时、4 小时、6 小时后, CCL 229 对基底膜的粘附率约为 CX-1 细胞的 2 倍 ($P < 0.01$) (表 2)。

表 2 人大肠癌细胞 CCL 229 和 CX-1 粘附性比较

	粘附率 ($\bar{x} \pm s$)		
	2 小时	4 小时	6 小时
CCL 229	21.0±3.3	40.8±7.1	68.9±8.6
CX-1	9.6±2.1	21.4±3.2	37.7±5.9

* $P < 0.01$

四、移动性分析

CCL 229 细胞在 24 小时后平均有超过 10 个细胞移动出琼脂糖滴, 细胞移动前沿与琼脂糖滴边缘的距离约为 30 μm , 而此时没有观察到 CX-1 细胞移动出来。随着时间的增长, CCL 229 细胞移动出琼脂糖滴的细胞数及移动的最远距离都明显高于 CX-1 细胞 ($P < 0.01$)。至 72 小时, CCL 229 细胞移动出来的细胞数超过 50 个, 约为 CX-1 细胞的 5 倍, 移动的最远距离超过 85 μm , 约为 CX-1 细胞的 6 倍 (表 3)。

表3 人大肠癌细胞 CCL 229 和 CX-1 移动性分析

	细胞数($\bar{x} \pm s$)		移动最远距离(μm)($\bar{x} \pm s$)	
	CCL 229	CX-1	CCL 229	CX-1
24 小时	11 \pm 2	—	30.0 \pm 4.3	—
48 小时	20 \pm 3	6 \pm 1	53.5 \pm 8.5	9.5 \pm 1.6
72 小时	54 \pm 9	10 \pm 2	85.3 \pm 12.9	15.4 \pm 3.2

* $P < 0.01$.

五、增殖状况比较

从表4可知 CCL 229 和 CX-1 细胞在接种后第2、4、6天时,它们的增殖情况均没有显著性差异($P > 0.05$),细胞增殖速度极为相近。

表4 人大肠癌细胞 CCL 229 和 CX-1 增殖状况分析

	细胞数 $\times 10^5$ ($\bar{x} \pm s$)		
	2 天	4 天	6 天
CCL 229	3.1 \pm 1.0	10.2 \pm 1.8	22.5 \pm 4.4
CX-1	2.6 \pm 1.0	8.9 \pm 1.4	19.3 \pm 3.7

* $P > 0.05$.

讨 论

本文选择的两种实验细胞均为高分化人大肠腺癌细胞,其中 CCL 229 细胞是由远端淋巴结转移癌建立的一个单克隆细胞系,因此具有高侵袭特性^[6]; CX-1 细胞体外培养呈集落式生长,对细胞外基质成分粘附性较差^[7],分析其侵袭能力可能较弱。对上述两种癌细胞的细胞表面形态、体外侵袭力、粘附性、移动性及细胞增殖状况进行系统比较研究,使单纯从侵袭的角度来分析人大肠癌细胞生物学表型与侵袭力的关系,并进一步探讨癌细胞的侵袭机理成为可能。

以羊膜作为侵袭屏障对两种癌细胞的侵袭力进行的定量分析结果显示, CCL 229 细胞的体外侵袭力明显高于 CX-1 细胞,但即使是高侵袭力的 CCL 229 细胞穿过羊膜的细胞数所占接种细胞总数的比例也是非常小的(约为

0.04%),提示癌细胞在体内发生侵袭时,可能只有极少数细胞能够穿越上皮基底膜进入到邻近组织,然后再通过不断增殖形成继发瘤,同时也说明了人大肠癌细胞存在明显的转移异质性。

癌细胞对基底膜的粘附性也是影响其侵袭能力的一个重要因素。癌细胞侵袭基底膜屏障的第一个步骤是癌细胞粘附于基底膜上,进而才释放蛋白溶解酶破坏基底膜^[8]。这种粘附作用是通过癌细胞表面的某些可以识别基底膜中特殊成分的受体来介导的,大多数细胞表面均存在有层粘连蛋白(Laminin, LN)的受体,细胞可通过其表面的 LN 受体特异性地与基底膜中的主要成分 LN 结合而粘附于基底膜上,通常良性细胞的 LN 受体主要集中在细胞基部。有研究表明,在侵袭性人乳腺癌和结肠癌细胞表面具有比相应良性细胞更多的 LN 受体,并且该受体分布于整个细胞表面,因而表现出比良性细胞更强的粘附基底膜的能力^[9,10]。本研究结果提示,高侵袭力的 CCL 229 细胞表面可能比 CX-1 细胞含有更多的 LN 受体,从而造成它们对基底膜粘附能力的差异。

影响癌细胞侵袭能力的另一个重要因素是癌细胞的移动性。高侵袭力的癌细胞常较良性细胞具有更大的移动性,本研究的结果也证明了这一点。侵袭性癌细胞移动性增高的原因可能与其细胞内骨架结构的变化有关。

CCL 229 和 CX-1 细胞的增殖状况比较结果显示两者没有显著性差异,提示细胞增殖不是造成癌细胞侵袭力、粘附性和移动性差异的原因。

总之,本文研究结果表明人大肠癌细胞的侵袭力与其粘附性、移动性是一致的,提示粘附性和移动性是侵袭性癌细胞的重要特征。此外,人大肠癌细胞的侵袭力与细胞的形态也是密切相关的,具体表现为高侵袭力大肠癌细胞具有铺展能力强、细胞间相互粘连性差、细胞表面突起多,尤其是指状伪足和针状突起较多等特点,这对我们从形态学角度来判断人大肠癌细胞的恶性程度会有一定帮助。

摘 要

本文对两种高分化人大肠癌细胞的体外侵袭力及相关生物学特性进行了比较研究。利用人羊膜基底膜模型分析结果显示:CCL 229 细胞对人羊膜基膜的侵袭力及粘附能力均明显高于CX-1 细胞。常规扫描电镜观察到 CCL 229 细胞具有铺展能力强、细胞间相互粘着性差、细胞表面有许多长短不一、形态各异的指状伪足和针状突起等特征。琼脂糖滴分析结果表明,CCL 229 细胞体外移动性亦明显高于CX-1 细胞。两者的增殖情况未见有显著性差异。

关键词: 人大肠癌细胞 侵袭力 粘附性 移动性

参 考 文 献

- [1] Stetler-Stevenson, W. G. et al., 1993, *Annu. Rev. Cell Biol.*, 9: 541—573.
- [2] Liotta, L. A. et al., 1980, *Cancer Lett.*, 11: 141—152.
- [3] Murray, J. C. et al., 1980, *Cancer Res.*, 40: 347—351.
- [4] Varanl, J. et al., 1978, *Am. J. Pathol.*, 90: 159—171.
- [5] 鄂 征. 1988, 细胞生物学检测, 组织培养技术(第二版), 鄂征主编., pp 153, 人民卫生出版社.
- [6] Aznavoorian, S. et al., 1990, *JNCI.*, 82 (18): 1485—1492.
- [7] Daneker, G. W. et al., 1989, *Cancer Res.*, 49: 681—686.
- [8] Liotta, L. A., 1992, *Scientific American.*, 2: 34—41.
- [9] Liotta, L. A., 1983, *J. Cell Biol.*, 97 A: 97.
- [10] Horan Hand, P. et al., 1985, *Cancer Res.*, 45: 2713—2719.

IN VITRO COMPARATIVE STUDY ON THE INVASIVE ABILITY AND THE RELATED BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE DIFFERENT COLORECTAL CARCINOMA CELLS

SUN Bao Dong, SONG Jin Dan

(Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health of China, China, Medical University, Shenyang 110001, China.)

ABSTRACT

Comparative studies on some biological properties such as cell surface morphology, in vitro invasiveness, adhesiveness, migration and proliferation of two well differentiated cell lines were performed. The results of human amniotic basement membrane (HABM) model analysis showed that the invasiveness and adhesiveness to the basement membrane of CCL 229 cells were markedly higher than those of CX-1 cells. And the particular morphological feature of CCL 229 cells was characterized by strong anchorage, poor cellular adhesion and junction, and a large number of filopodia and microspike as observed by SEM. The result of agrose drop explant method revealed that the migration of CCL 229 cells were also much faster than that of CX-1 cells. However, proliferative analysis didn't show any significant difference between CCL 229 and CX-1 cells. The above results indicated that the morphological feature of cells, the adhesiveness to basement membrane and in vitro migration were interrelated with the invasiveness of cancer cells.

Key words: Human colorectal carcinoma cells in vitro invasiveness Adhesiveness Cell migration