

细胞电泳率作用。吐温 80 合并温热时这种作用显著增加, 合并作用 41°C60 分左右的效应已达到温热 43°C100 分作用水平, 有明显时间效应。冷却后各组有不同程度恢复, 但合并作用 41°C100 分以上各组恢复较慢。正常细胞对温热和吐温 80 作用的反应明显低于肿瘤细胞。

### 参 考 文 献

- [1] 郑正炯等, 1986, 生物化学与生物物理进展, 6:27—29。  
 [2] 小野山靖人ら, 1985, 医学のあゆめ, 135: 860—864。  
 [3] Inbar M. et al., 1977, *Europ. J. Cancer.*, 13:1231—1235。

- [4] 林克椿等, 1981, 生物化学与生物物理进展, 6:32—35。  
 [5] 梁子钧等, 1979, 生物化学与生物物理进展, 11:199。  
 [6] Haeffner, EH. et al., 1984, *Cancer Res.*, 44:2668—2776。  
 [7] Van Beek, W. P. et al., 1973, *Cancer Research*, 33:2913。  
 [8] Sato, C et al., 1981, *Cancer Res.*, 41: 4107—4112。  
 [9] Storm, FK. et al., 1979, *Cancer Res.*, 39:2254 (partII)。  
 [10] USP XVpp. 558, 1960, USP XX + NF XV pp. 1249, 1980。  
 [11] Tsuge, H et al., 1980, *Biochem. Biophys. Acta.*, 614:274。  
 [12] Yatvin, MB. et al, 1977, *Int. J. Radiat.*, 32:513—521。

## 人肺腺癌细胞 PI-PLC 活性的变化和转移表型的关系

彭愈生 马玉彦 任丽君 史 历

(哈尔滨医科大学肿瘤研究所)

癌细胞的转移是造成患者死亡的主要原因。只有找到转移赖以产生的细胞生物学基础, 才能在阻断转移上开辟新的有效途径。因此, 对转移生物学特性的研究已成为肿瘤细胞生物学领域内的重要课题之一。

转移是转移性癌细胞从原发灶分离、侵袭、破坏宿主屏障, 移向体内另一部位, 建立转移灶的过程。无论是分离还是侵袭均依赖于分解酶的作用。因此, 转移性癌细胞的许多分解酶活性明显高于无/低转移性癌细胞。如组织蛋白酶 B (Cathepsin B) 高转移性癌细胞 (B 16 F 10) 比无/低转移性癌细胞 (B 16 F 1) 高 3—4 倍<sup>[1]</sup>, Bosmann 发现前者  $\beta$ -半乳糖苷酶、乙酰氨基半乳糖苷酶、岩藻糖苷酶活性明显高于无/低转移性癌细胞<sup>[2]</sup>。一些酶分泌至细胞外, 破坏周围基质及其他屏障, 活化宿主与转移有关的某些因子, 促进转移。

磷脂酰肌醇特异的磷脂酶 C (phosphatidylinositol specific phospholipase C, PI-PLC) 是一种分解酶, 具有多种功能, 它不仅可以破坏膜性屏障, 促进膜结合蛋白质(或酶)的释放, 还与癌的发生、发展以及信息传递密切相关<sup>[3,4]</sup>。但至今未见有关转移性癌细胞 PI-PLC 的报道。我们已经证实转移表型不同的肺腺癌细胞存在不同的肌醇磷脂代谢池 (PI-pool), PI-PLC 是其中的关键酶。本文于不同条件下, 测定不同转移表型肺腺癌细胞 PI-PLC 活性, 并对其与转移的关系进行初步探讨。

### 材 料 和 方 法

#### 一、材料

磷脂酰肌醇等为标准品, 苯甲基磺酰氟化物 (PMSF) (Sigma 公司), RPMI 1640 培养液 (GIBCO)、透析袋 (Serva 公司)、<sup>[3H]</sup>肌醇 (New England Nuclear), Hepes 缓冲液 (Sigma 公司), <sup>[32P]</sup>磷酸 (无载

体)(北京原子能研究所)。其他试剂均为国产。高转移性人肺腺癌细胞亚系( $Anip_{973}$ )和无/低转移性肺腺癌细胞系( $AGZY_{83-1}$ )均为本所建系。

## 二、细胞培养、腹水型癌细胞亚系的筛选<sup>[5]</sup>

人肺腺癌细胞系  $AGZY_{83-1}$  培养于 RPMI 1640 溶液内, 附加 20% 小牛血清和抗菌素, 培养箱 37℃, 5%  $CO_2$ 。将  $6 \times 10^6$  个  $AGZY_{83-1}$  细胞注入每只裸小鼠腹腔。俟出现腹水后, 取腹水离心, 取沉淀的中上层癌细胞, 洗两次, 再同样接种于裸小鼠腹腔。如此反复传代获得具有转移能力的癌细胞亚系, 简称  $Anip_{973-7-14-19}$ , (-7, -14, -19 为传代数)。

## 三、 $[^3H]PI$ (或 $[^{32}P]PI$ )的制备

将豚鼠脑切片置于含 100  $\mu ci$   $[^3H]$ 肌醇/每克脑组织/2 毫升或 1  $mci$   $[^{32}P]$ 磷酸/每克脑组织/2 毫升的 RPMI 1640 培养液中, 保温 10 小时, (同位素比放射性:  $[^3H]$ 肌醇 15.6  $ci/mm$ ol,  $[^{32}P]$ 磷酸 12.8  $mci/ml$ )。取出培养瓶, 离心, 弃去上清液, 用冷的等渗磷酸盐缓冲液洗三次。加甲醇/氯仿/水 (0.35:0.7:0.2, v/v/v) 提取磷脂。3500 r/min 离心 10 分钟, 取氯仿层, 氮气吹干。加少许氯仿/甲醇 (5:1) 点样, 标准品于同一薄层板同时点样, 进行薄层分离。展开剂为氯仿/甲醇/氨水 (13.5:6.5:10, v/v/v)。用碘显色后, 将  $[^3H]PI$ (或 $[^{32}P]PI$ ) 色斑刮下, 重新提取、备用。

## 四、PI-PLC 活性测定

将  $[^{32}P]PI$ (或 $[^3H]PI$ ) 的氯仿溶液用氮气吹干, 超声混悬于缓冲液中, 反应混合物含 20 mmol Hepes 缓冲液 (pH 7.4) 0.25 mmol EGTA, 0.25 mg/ml 牛血清白蛋白, 1 mg/ml 脱氧胆酸钠, 100  $\mu mol$  PMSF 适量的  $Anip_{973}$ 、 $AGZY_{83-1}$  匀浆液 (含 PI-PLC)。37℃ 保温 20 分钟。用氯仿: 甲醇 (2:1) 停止反应, 离心, 测放射活性<sup>[6]</sup>。

## 五、蛋白质浓度测定

按 Lowry 法测定, 以牛血清白蛋白为标准。

## 结 果

经转移试验(表 1)证明, 裸小鼠静脉接种  $AGZY_{83-1}$  细胞 ( $6 \times 10^6$ /只) 肺转移结节数为 0。 $Anip_{973-7}$  肺转移结节数最少为 99, 最多者结节可布满全肺。 $Anip_{973-14}$  细胞接种的四只裸小鼠每个肺脏出现结节数范围为 83—141。 $Anip_{973-19}$  细胞接种的四只裸小鼠肺脏结节较

表 1 裸小鼠静脉接种癌细胞后, 肺转移结节数及频率

肿瘤细胞	肺转移结节数/只裸鼠	转移频率(肺转移只数/接种只数)
$AGZY_{83-1}$	0	0/5
$Anip_{973-7}$	163	
	99	
	150	5/5
	189	
$Anip_{973-14}$	结节布满全肺	
	141	
	109	
	116	4/5
$Anip_{973-19}$	83	
	0	
	198	
	201	
	119	5/5
	结节布满全肺	
	1—2	

多, 由 119 至结节布满全肺。

以上静注  $Anip_{973-7-14-19}$  的 15 只裸小鼠中有 12 只皮下、脑、前后腿、背部脊椎两侧均出现癌结节, 并伴随神经症状(偏瘫)等; 腹腔内注射也同样出现转移。以上证实  $Anip_{973-7-14-19}$  细胞均具有较强的转移能力, 但原系  $AGZY_{83-1}$  细胞则无此特性。

将  $Anip_{973-7-14-19}$  及  $AGZY_{83-1}$  细胞系各  $6 \times 10^6$  个细胞/只分别接种于裸小鼠腹腔, 待出现腹水后, 抽取腹水分离癌细胞进行 PI-PLC 活性测定(表 2),  $Anip_{973-7}$  PI-PLC 活性为  $AGZY_{83-1}$  的 2.25 倍。 $Anip_{973-14}$  和  $Anip_{973-19}$  PI-PLC 活性分别是  $AGZY_{83-1}$  PI-PLC 活性的 6.75 和 7.1 倍 (cpm/mg 蛋白质/小时)。 $Anip_{973}$  PI-PLC 活性明显高于  $AGZY_{83-1}$ 。

两种不同特性的细胞分别于体外培养, 并测定第一代、第二代、第三代 PI-PLC 活性, 结果表明(图 1), 第一代  $Anip_{973}$  PI-PLC 活性高于  $AGZY_{83-1}$  PI-PLC,  $Anip_{973}$  PI-PLC 活性:  $AGZY_{83-1}$  PI-PLC 活性 = 1.59。第二代两者活性均降低,  $Anip_{973}$  PI-PLC 活性:  $AGZY_{83-1}$  PI-PLC 活性 = 1.18, 比值也缩小。

表2 裸小鼠腹腔内接种癌细胞后, 腹水癌细胞 PI-PLC 活性的比较

肿瘤细胞	PI-PLC 活性 (cpm/mg 蛋白质/小时)	P 值
AGZY <sub>83-1</sub> Anip <sub>973-7</sub>	366 ± 15 826 ± 15.2	<0.01
AGZY <sub>83-1</sub> Anip <sub>973-14</sub>	540 ± 73 3650 ± 58	<0.01
AGZY <sub>83-1</sub> Anip <sub>973-19</sub>	366 ± 15 2613 ± 174	<0.01

均数 ± 标准误 (n = 6)

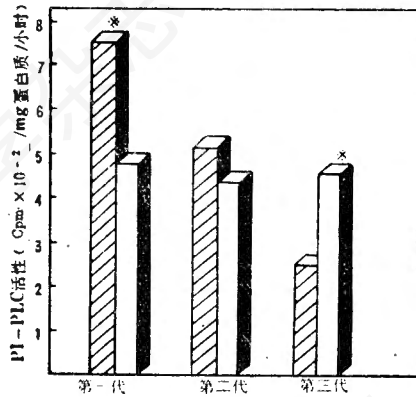


图1 体外培养的肺腺癌细胞 PI-PLC 活性的比较 (\* 代表 P 值 < 0.01, n = 3 或 7, ▨ Anip<sub>973</sub> □ AGZY<sub>83-1</sub>)

第三代 Anip<sub>973</sub> PI-PLC 活性明显下降, AGZY<sub>83-1</sub> PI-PLC 活性反而高于 Anip<sub>973</sub> 两者比值倒置 (AGZY<sub>83-1</sub> PI-PLC 活性 : Anip<sub>973</sub> PI-PLC 活性 = 2.02)。

测定细胞培养液 PI-PLC 活性 (表 3)。两种细胞培养液均显示 PI-PLC 活性。

## 讨 论

癌细胞转移能力的获得, 维持和加强, 取决于癌细胞与微环境中宿主各种因素 (如激素等信息分子及其他物质) 之间的相互作用 [7,8]。

本文实验证明, AGZY<sub>83-1</sub> 系转变为 Anip<sub>973</sub> 亚系的癌细胞获得了转移能力, 两者 PI-PLC 活性有明显差异。Anip<sub>973</sub> PI-PLC 活性明显高于 AGZY<sub>83-1</sub> 可能有以下原因: 第一,

表3 肺腺癌细胞培养液 PI-PLC 活性的比较

肿瘤细胞	培养液 PI-PLC 活性 (cpm, 累积量)	P 值
AGZY <sub>83-1</sub> Anip <sub>973</sub>	292 ± 8.9 1183 ± 14	<0.01

均数 ± 标准误 (n = 6)

自泌运动因子 (AMF) 的作用。Liotta<sup>[9]</sup>证实 AMF 通过双信使途径使癌细胞运动性增强, 这是转移的先决条件。PI-PLC 是双信使途径的关键酶, 此酶的活化和失活直接控制信息流中的两个分叉途径, 即 IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup> 及 DG/C 激酶途径。两者相互协同控制细胞运动 (或其他效应) 的整个程序。当 AMF 作用于转移性癌细胞表面的特殊受体时, 可使受体分子发生构象变化, 使酪氨酸蛋白酶激活, 同时引起 G 蛋白构象变化, 从而使无活性的 G 蛋白变成有活性的 G 蛋白<sup>[10]</sup>, 进一步活化 PI-PLC。此酶分解 PIP<sub>2</sub> 产生 IP<sub>3</sub><sup>[11]</sup>, 相继出现细胞运动性变化。因此, AMF 的作用可能是 PI-PLC 活性增强的原因。

第二、转移性癌细胞的许多分解酶活性的增强和释放, 有利于破坏宿主各种屏障, 促进转移, 例如组织蛋白酶 B (膜结合性酶), 胶原酶、糖苷酶等。现已证实许多膜结合酶 (或蛋白) 是依赖 PI 与膜相连接<sup>[2]</sup>。这些酶或蛋白质的释放, 将依赖 PI-PLC 的作用, 因此, PI-PLC 活性可能伴随分解酶的释放而增大。

不具备转移能力的 AGZY<sub>83-1</sub> 细胞, 其以上所述分解酶 (如组织蛋白酶 B 等) 的活性明显低于转移性癌细胞<sup>[1]</sup>。AGZY<sub>83-1</sub> 细胞膜结构、受体种类、数量、位置和 Anip<sub>973</sub> 可能有明显的差异 (有的已证实<sup>[13]</sup>), 故 PI-PLC 活性增强的可能性小于 Anip<sub>973</sub>, 因此, 前者 PI-PLC 活性低于后者。

体外培养的转移性癌细胞许多分解酶的活性随传代次数的增加而下降, 甚至低于无或低

转移性癌细胞,PI-PLC也不例外。据Sloane<sup>[14]</sup>推测,这可能由于培养介质中缺乏宿主特有的信息分子所致。这些信息分子可能包括与转移有关的层粘连蛋白、激素及其他肿瘤调节因子。另外,两种细胞PI-PLC性质(对Ca<sup>2+</sup>的需求,各种磷脂的影响等)有明显差异(待发表)。因此,在体外相同条件下培养,两种细胞PI-PLC活性变化不同,且体外条件对AGZY<sub>83-1</sub>PI-PLC似乎更有利。再者体外培养的Anip<sub>973</sub>细胞生长速度随传代次数增加而明显减缓,AGZY<sub>83-1</sub>细胞生长速度无明显变化,PI-PLC活性和细胞生长速度密切相关。这些可能就是在体内外不同条件下,两种细胞PI-PLC活性变化有明显差异的原因。

两次传代间细胞培养液PI-PLC活性的测定表明Anip<sub>973</sub>PI-PLC活性大于AGZY<sub>83-1</sub>PI-PLC活性(前者细胞总数的增加小于后者;死亡细胞数均很少)。结果暗示,两种细胞可能均向细胞外分泌PI-PLC<sup>[15]</sup>而且Anip<sub>973</sub>多于AGZY<sub>83-1</sub>。这可能有利于宿主膜性屏障的破坏以及宿主细胞膜结合酶的释放,因而促进转移。

综上所述人肺腺癌细胞PI-PLC活性的变化和转移密切相关。推测PI-PLC可能成为新的转移标记酶。

### 摘 要

我们将高转移性肺腺癌细胞亚系Anip<sub>973</sub>及其母系AGZY<sub>83-1</sub>(无转移性)注入裸小鼠腹腔,待出现腹水后,分离癌细胞,测定其PI-PLC活性(并经转移试验证实Anip<sub>973</sub>仍具有转移能力)。实验结果表明具有不同转移表型的Anip<sub>973</sub>和AGZY<sub>83-1</sub>细胞PI-PLC活性有明显差异,前者为后者的2.25—7.1倍。体外培养两种细胞,测定两者PI-PLC活性,两者比值随传代次数增加逐步缩小,甚至出现倒置。两

种细胞培养液均显示PI-PLC活性,且Anip<sub>973</sub>高于AGZY<sub>83-1</sub>。不同转移表型肺腺癌细胞PI-PLC活性在不同条件下的变化截然不同,此变化可能和肺腺癌细胞的转移功能密切相关。推测PI-PLC可能将成为新的转移标记酶。

### 缩写词

PI——磷脂酰肌醇

PI-PLC——磷脂酰肌醇特异的磷脂酶C

PIP<sub>2</sub>——磷脂酰肌醇4,5-二磷酸

PI<sub>3</sub>——三磷酸肌醇

DG——甘油二脂

### 参 考 文 献

- [1] Sloane, B. F., 1981, *Science*, 212:1151—1153.
- [2] Bosmann, H. B. et al., 1973, *Nature*, 246:487—489.
- [3] Berridge, M. J., 1984, *BIO/TECHNOLOGY*, 541—546.
- [4] Sekar, M. C. et al., 1986, *J. Membrane Biol.*, 89:193—210.
- [5] 王吾如, 1987, *中华肿瘤杂志*, 9:6, 412—414.
- [6] Takenawa, T. 1981, *Journal of Biological Chemistry*, 256:6769—6775.
- [7] Nicolson, G. L., 1987, *Cancer Research*, 47:1473—1487.
- [8] Schirmacher, V., 1980, *Immunobiol.*, 157:89—98.
- [9] Liotta, L. A. et al., 1989, *Cancer and Metastasis Reviews*, 8:128—129.
- [10] 张泽林, 1987, *生理科学进展*, 18:322—327.
- [11] 彭愈生, 1988, *细胞生物学杂志*, 第10卷增刊: 11页.
- [12] Cross, G. A. M., 1987, *Cell*, 48:179—181.
- [13] Nicolson, G. L., 1982, *Biochim. Biophys. Acta.*, 695:113—176.
- [14] Sloane, B. F., 1982, *Cancer Research*, 42:980—986.
- [15] Volwerk, J. J. et al., 1989, *Journal of Cellular Biochemistry*, 39:315—325.