

# 纤维粘连蛋白及层粘连蛋白与肿瘤细胞的浸润和转移\*

周 柔 丽

(北京医学院 细胞研究室)

纤维粘连蛋白(fibronectin, FN)及层粘连蛋白(laminin, LN)是近年来受到广泛重视的细胞外基质非胶原糖蛋白。FN 主要由中层来的细胞产生,亦可由上皮细胞及内皮细胞生成;LN 则主要由上皮细胞及内皮细胞合成。FN 以可溶及不溶两种形式分别存在于各种体液及细胞外基质(包括某些基膜);LN 则以不溶的形式存在于各种基膜中。LN 及基质中的 FN 分别与细胞表面相应的受体结合,除介导细胞与基质的粘着,还影响细胞的生长、分化,促进某些细胞的运动,并连接基质中的大分子成分。<sup>[1,2]</sup>

FN 虽早在 1948 年即以血浆冷不溶球蛋白(CIG)的形式被发现,然而在此后四分之一世纪中进展缓慢,直到 1973 年被“再次发现”后才得到迅速的进展。在近十年中发现 FN 与心、肺、肝、肾、皮肤、肌肉、神经、血管及血液的某些疾患以及关节炎、糖尿病、细菌感染及肿瘤等都有一定关系<sup>[3]</sup>。尤其是 FN 在肿瘤发生、发展中的可能作用一直引起人们很大注意。至于 LN,自 1979 年发现至今虽只有五年的历史,分子结构已基本搞清,与疾病特别是与肿瘤的关系也开始受到人们的重视。相信不久的将来会涌现出大量有关的报道。本文拟就 FN 及 LN 与肿瘤细胞浸润、转移有关的研究成果予以综述。肿瘤细胞的浸润、转移是极其复杂的过程,涉及到肿瘤细胞的快速增殖,瘤细胞间粘着的减弱乃至脱落,细胞移动增强,穿透基质和基膜,在远近正常组织中固着和、分裂等一系列过程。不言而喻,这样复杂的过程当然不可能仅仅通过对两种糖蛋白的研究而完全阐明;

然而已有的成果表明,关于 FN 及 LN 的研究对于揭示肿瘤细胞浸润、转移的分子机制具有重要的,甚至关键的意义。尽管当前的实验结果还有一些相互矛盾或难以解释之处,介绍它们正是为了今后有更多的人参与解决这些难题。

## 转化细胞表面 FN 及 LN 的改变

关于 FN 与肿瘤关系的研究早期集中在转化细胞表面 FN 的改变。最初发现在组织培养中无论是经 DNA 或 RNA 病毒或是经化学药剂转化的细胞,其表面 FN 减少或缺如<sup>[1,4]</sup>。外加提纯的基质 FN 可使转化细胞恢复某些正常的表型<sup>[5]</sup>。例如,细胞形态变得比较扁平,细胞骨架变得比较规整,细胞在基质上粘着及铺展增强,细胞表面微绒毛及膜皱襞减少等。美中不足的仅是似乎不能恢复接触抑制。然而随着研究的扩展和深入,矛盾的现象出现了。虽然大量的报道指出转化的肝上皮细胞<sup>[6]</sup>、肾皮质细胞<sup>[7]</sup>、乳腺细胞<sup>[8]</sup>、肌母细胞<sup>[9]</sup>、胶质细胞<sup>[10]</sup>、纤维母细胞<sup>[4]</sup>及其他癌细胞<sup>[11]</sup>表面的 FN 普遍减少;但亦有报道指出来自肝<sup>[12]</sup>、乳腺<sup>[13]</sup>、唾液腺及膀胱<sup>[14]</sup>的培养的转化细胞与相应的培养的正常细胞相比 FN 并无减少。乳腺的正常上皮细胞及癌上皮细胞不但 FN 合成量相近,而且均在细胞表面保持 FN 总量的

\*本文经张昌颖、于树玉、吴秉铨等教授审阅并提出宝贵意见,特此致谢。

\*\*我们实验室有自制的 LN、FN 及其抗血清和标记抗体,需要上述制品的单位,可与我们联系。



鼠腹水型肝癌)及培养的实体瘤细胞(B 16黑色素瘤、S 180肉瘤)进行粘着不同基质特性的研究,发现腹水型瘤细胞对FN或LN铺面的基质都没有亲和力;而培养的实体瘤细胞对这两种基质均具有很高的亲和力,它们不但可在FN或LN基质上很快发生粘着,而且可以很好铺展。并且,这种作用可分别被各自的特异抗体所阻抑。然而,在蛋白质合成抑制剂存在的情况下,它们在IV型胶原基质上则只能粘着;在同样时间内未能很好铺展。实验还表明,培养的S 180肉瘤细胞接种于腹腔后第一代腹水细胞与FN及LN的亲和力即显著降低;第二代腹水细胞则几乎完全丧失亲和力。无论腹水型S 180肉瘤或Ehrlich腹水癌的腹水清液本身对培养的实体型S 180肉瘤细胞粘着于FN或LN均无抑制作用;反而对于其粘着于LN基质有一定促进作用。这可能是由于腹水液中的FN起着协同作用所致。这些事实证明,实体型及腹水型瘤细胞本身的确具有不同的粘着特性:在腹水中悬浮生长的瘤细胞对FN及LN无亲和性;在体外附壁生长,在体内浸润生长的实体型瘤细胞对FN及LN均有很高的亲和性。显然肿瘤细胞的生长方式与其对FN及LN亲和性的这种一致性从另一角度证明FN及LN与浸润、转移的密切关系。再者,用荧光素(FITC)标记的LN与两型瘤细胞悬液作用后,经细胞分光光度计定量测定细胞表面结合LN的量。初步结果表明,实体型培养瘤细胞结合的LN显著多于腹水型者;且LN结合在细胞表面呈一黄绿色亮环。提示,瘤细胞的生长方式及其对FN及LN的亲和性可能是由细胞表面FN及LN受体的表达及外露决定的,而受体的表达及外露可能是由瘤细胞的生长环境左右的。此外,当实体型S 180培养细胞悬液分别与LN或FN在37℃保温60分钟后接种于小鼠,可见LN及FN促进移植瘤的生长,在移植早期尤为明显。初步的实验还表明,在LN基质上粘着的S 180实体型培养瘤细胞群的DNA合成比对照组旺盛。提示LN或FN可

能有助于提高移植肿瘤细胞的存活率;对于转移瘤细胞可能也有同样的作用。(以上均为待发资料。进一步的实验仍在进行中。)

#### LN 具有促进瘤细胞移动的作用

体外实验证明, LN 可促进小鼠 B 16 黑色素瘤<sup>[32]</sup>、人肝癌和 Ewing 肉瘤及 RN 22 F 神经鞘瘤细胞移动。当 LN 浓度存在梯度时, RN 22 F 细胞朝高浓度定向移动; 当 LN 浓度均一时则加速无定向移动。移动的速度依赖于 LN 的剂量<sup>[33]</sup>。鉴于肿瘤细胞在浸润及转移时需靠自身的主动移动穿过基质及基膜, 因而 LN 促进瘤细胞移动的作用对于其与浸润和转移的关系又增添了更多的意义。

#### 带瘤宿主体液中 FN 及 LN 的变化

关于血浆 FN 水平与肿瘤存在及进展程度的关系亦有不少报道。不过至今仍难做出结论。有人报告带有恶性肿瘤的病人及动物血浆中 FN 升高<sup>[34,35]</sup>。但又有人报告肿瘤患者血浆 FN 水平与同龄、同性的对照组相比并无异常或甚至有所降低(已知血浆 FN 水平与年龄及性别有关, 男性及年长者血浆 FN 水平一般较高)。不过, 胰腺癌伴有阻塞性黄疸者血浆 FN 一般升高; 而肝癌, 尤其是广泛肝转移者血浆 FN 降低<sup>[36]</sup>, 这可能是由于血浆 FN 主要来自于肝脏<sup>[1]</sup>的缘故。另外, 还有人报告, 小鼠血浆 FN 的升高与肿瘤的生长相平行, 但同时伴有 FN 生物学活性降低<sup>[36]</sup>。再者, 某些肿瘤患者血中出现较高水平的 FN 片段, 称为 MAD-2 (一种 DNA 结合蛋白质)。而患小细胞肺癌者血中的 MAD-2 低于正常水平。但无论如何, 血中出现大量 MAD-2 可能对于某些类型的肿瘤是有用的临床检验指标<sup>[34]</sup>。总之, 为得到明确的结论尚需做大量的工作。在今后的研究中要注意弄清以下两个问题: (1) 血浆 FN 数量的改变或 FN 特殊片段的出现能否做为确定恶性肿瘤或判断特定肿瘤临床状态的可靠指标? (2) 血浆 FN 水平的变化是否只不过是特异性反应, 如仅仅是急性时相反应物或象其他血

作用。此外,丁酸盐、干扰素、cAMP也可增强FN的合成,或使之附着在转化细胞的表面。

除此之外,有人对正常及转化细胞所产生的FN分子的特性进行研究<sup>[25]</sup>。发现它们在电泳行为、蛋白酶水解肽谱及生物学活性(促进细胞粘着于基质)方面并无差异。然而转化细胞所产生的FN的糖链有较多分枝并含有较多唾液酸;再者,磷酸化修饰的程度亦不同。

关于转化细胞表面LN的变化亦有一些研究。有人报告转化的大鼠肾细胞表面LN及FN均见缺失<sup>[26]</sup>。然而,又有人报告MuLV-及MuSV-(小鼠肉瘤病毒)转化的上皮细胞周围的LN及FN与非转化细胞无异<sup>[22]</sup>。总之,关于转化细胞表面LN含量变化的报道远不及FN多。显然,随着认识的深入人们对于单纯研究细胞表面糖蛋白含量变化的兴趣减少了。

#### 瘤细胞对FN及LN的亲合性

##### 与浸润、转移的关系

近年来关于不同肿瘤细胞对LN及FN的亲合性及其与浸润和转移的关系所进行的研究,尚未取得一致的结论。Vlodavsky<sup>[27]</sup>等根据细胞在合成LN及FN上的分工和肿瘤的组织来源,认为癌细胞亲和LN,不亲和FN;而肉瘤细胞则相反。然而,他们的实验证据是间接的、局限的。Terranova及Martin<sup>[28]</sup>等的实验结果否定了上述观点,认为瘤细胞对LN及FN的亲合性不是与组织来源而是与转移能力相关的。他们发现可转移的细胞,无论是癌还是肉瘤,都选择性地与Ⅳ型胶原(只存在于基膜)粘着,而不转移的肉瘤细胞偏爱Ⅰ型胶原(存在于结缔组织基质)。再者,外源LN能增加可转移的瘤细胞粘着于Ⅳ型胶原, FN则不能。而且,能够利用LN粘着于Ⅳ型胶原的细胞亚群经小鼠尾静脉注入后在肺部形成的转移灶亦比同样条件下未粘着于Ⅳ型胶原的亚群为多。然而,他们只检测了三种瘤细胞:即小鼠BL6黑色素瘤细胞(高转移株)、来自纤维肉瘤肺转移灶的PM2瘤细胞以及一种来自成年小鼠结缔

组织,在培养中可自发转化,接种后可导致有被膜的纤维肉瘤的细胞。此后, Malinoff<sup>[29]</sup>等用转移能力高低不等的纤维肉瘤细胞株证明,高转移的细胞表面具有内源LN,而低转移的细胞没有。二者虽皆可与外源LN结合,但结合能力大不相同,前者的结合量三倍于后者。再者,高转移细胞偏重粘着于Ⅳ型胶原,而低转移者对Ⅳ型及Ⅰ型胶原均不粘着。然而,加入外源LN可使低转移者在一定程度上粘附于Ⅳ型胶原,却对高转移者无作用。这些结果再次证明高转移的细胞株对LN及Ⅳ型胶原的亲合力比低转移者大。而LN及Ⅳ型胶原都是基膜独有的成分,肿瘤细胞在转移过程中必须穿过基膜。因此,与LN及Ⅳ型胶原亲合力高的肿瘤细胞比亲合力低者易于转移是完全合乎逻辑的。此外,从上述结果还可推论,高转移的细胞株所产生的LN及细胞表面LN的受体可能都比较多,而低转移的则相反。最近Liotta<sup>[30]</sup>等报道了有关的证据,从人的浸润性乳腺癌质膜分离出的LN受体比良性硬化性乳腺病者多50倍。如果今后的研究能够证明这是浸润性、转移性瘤细胞的普遍特性,那么肿瘤转移的分子机制将在转移细胞粘着于基质这一环节上得到突破。

此外,最近Kulesh<sup>[31]</sup>等通过改变基质控制细胞形状的体外实验表明,具有接触抑制的正常细胞的有丝分裂指数严格依赖于细胞形状:不铺展的球形细胞的分裂指数不到3%,而铺展开的扁平细胞的分裂指数高达75—90%。然而,失去接触抑制的恶性肿瘤细胞在体外的有丝分裂指数失去对细胞形状的严格依赖关系。不铺展的球形细胞照样具有较高的分裂指数。鉴于细胞的铺展是由细胞外基质决定的<sup>[2]</sup>,因而肿瘤细胞的增殖失去对细胞形状的依赖就意味着失去对一定细胞外基质的依赖。换言之,肿瘤细胞似乎可以摆脱细胞外基质的调节控制作用而无限制的增殖。

作者实验室对接种的腹水型瘤细胞(小鼠Ehrlich腹水癌、腹水型S-180肉瘤、小鼠及大

浆蛋白质一样取决于肿瘤患者的营养和恶病质等。此外,在临床研究中还应注意仔细设置年龄、性别、伴随疾病、转移部位和大小以及营养状况的对照<sup>[3]</sup>。

对于邻近肿瘤的其他液体中可溶性 FN 水平的改变亦曾有一些研究。例如,存在脑肿瘤时脑脊液中 FN 的水平一般降低<sup>[37]</sup>。而患有前列腺肿瘤时尿中 FN 增加<sup>[38]</sup>。尿中 FN 的升高或正常与有无前列腺癌存在于体内非常一致。具有良性泌尿系疾病患者尿中 FN 水平与对照相同。

正常情况下血中 LN 的水平极低,难以测出,但在携带 EHS 瘤(一种大量产生基膜物质的小鼠肿瘤)的小鼠血清中 LN 的浓度成倍增高<sup>[39]</sup>。

综上所述, FN 及 LN 与肿瘤细胞的浸润、转移可能具有十分密切的关系。然而当前的研究成果距完全阐明这样错综复杂过程的分子机制之目标还有相当漫长的路程。细胞表面 FN 或其受体的缺失是否与肿瘤细胞间粘合力降低从而易于脱落有关?细胞表面 LN 及其受体的存在和数量的多寡是否为肿瘤细胞移动、植入、存活及增殖所必需?阐明这两个问题或许是向这一目标前进的通路。机理清楚了,控制肿瘤细胞浸润及转移(肿瘤致命之要害)也就更有根据和指望。

除此之外,还有不少研究表明转化细胞产生胶原及硫酸乙酰肝素减少;甚至生成异常胶原;转化细胞合成复合型糖脂亦有缺陷<sup>[3]</sup>,而合成的细胞表面糖蛋白常具有分枝较复杂的糖链,这些变化都可能直接或间接与肿瘤的浸润、转移有关。总之,细胞外基质仅仅被视为不活跃的支持物的时代早已过去,它在生理及病理过程中日益显现出不可忽视的重要作用,甚至是调控的作用;而细胞表面正日益成为研究肿瘤的焦点之一。

#### 参 考 文 献

[1] Furcht, L. T., 1983, *Modern Cell Biology*, 1:53—117.

- [2] 周柔丽 1985 国外医学参考资料 分子生物学分册 7(1)13—18。
- [3] Akiyama, S. K. and Yamada, K. M., 1983, in *Connective Tissue Disease* p. 55—96 eds. Wagner, B. et al. Williams and Wilkens, Baltimore.
- [4] Hynes, R. O., 1973, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:3170—3174.
- [5] Ali, I. U. et al., 1977, *Cell* 11:115—126.
- [6] Rieber, M. and Rieber, M. S., 1980, *Cancer Res.* 40:2562—2567.
- [7] Hard, G. C. et al., 1980, *Cancer Res.* 40:3728—3734.
- [8] Asch, B. B. et al., 1981, *Cancer Res.* 41:2115—2125.
- [9] Hynes, R. O. et al., 1976, *Dev. Biol.* 48:35—46.
- [10] Vaheri, A. et al., 1976, *J. Exp. Med.* 143:64—72.
- [11] Pearstein, E. et al., 1976, *Cancer Res.* 36:1475—1480.
- [12] Bannikov, G. A. et al., 1980, *Br. J. Cancer* 42:596—609.
- [13] Taylor, Papadimitriou, J. et al., 1981, *Cancer Res.* 41:2491—2500.
- [14] Wigley, C. G. et al., 1979, *Exp. Cell Res.* 118:394—399.
- [15] Chen, L. B. et al., 1979, *J. Supramol. Struct.* 12:139—150.
- [16] Yamada, K. M. et al., 1977, *J. Cell Biol.* 74:649—654.
- [17] Der, C. J. & Stanbridge, E. J., 1980, *Int. J. Cancer* 26:451—459.
- [18] Labat-Robert, J. et al., 1981, *Diagnost. Histopathol.* 4:299—306.
- [19] Neri, A. et al., 1981, *Cancer Res.* 41:5082—5095.
- [20] Fagan, J. B. et al. 1981, *J. Biol. Chem.* 256:520—525.
- [21] Alitalo, K. et al., 1982, *Virology* 119:347.
- [22] Olden, K. and Yamada, K. M. 1977, *Cell* 11:957—959.
- [23] Keski-Oja and Todaro, G. 1980, *Cancer Res.* 40:4722—4727.
- [24] Mosher, D. F. et al. 1977, *J. Supramol. Struct.* 6:551—557.
- [25] Wagner, D. D. et al. 1981, *J. Biol. Chem.* 256:11708—11715.
- [26] Hayman, E. G. et al. 1981, *J. Cell Biol.* 88:352—357.
- [27] Vlodavsky, I. et al. 1981, *Nature* 289:304—306.

- [28] Terranova, V. P. et al., 1982, *Cancer Res.* 44:2265—2269.
- [29] Malinoff, H. et al., 1982, *J. Cell Biol.* 95:126 a.
- [30] Liotta, L. A. et al., 1983, *J. Cell Biol.* 97(2) Part 2:97 a.
- [31] Kulesh, D. A. & Greene, J. J., 1983, *J. Cell Biol.* 97:449 a.
- [32] McCarthy, J. B. & Furcht, L. T., 1984, *J. Cell Biol.* 98:1474.
- [33] Manthorpe, M. et al., 1983, *J. Cell Biol.* 97:1882—1890.
- [34] Todd, H. S. et al., 1980, *J. Natl. Cancer Inst.* 65:901—904.
- [35] Saba, T. M. et al., 1980, *Br. J. Cancer* 41:956—965.
- [36] Stathakis, N. E. et al., 1981, *J. Clin. Pathol.* 34:504—508.
- [37] Kuusela, P. et al., 1978, *J. Lab. Clin. Med.* 92:595—601.
- [38] Webb, K. S. & Lin, G. J., 1980, *Invest. Urol.* 17:401—404.
- [39] Risteli, J. et al., 1980, *Fresenius Z. Anal. Chem. Band* 301:122.

## 根瘤菌共生固氮的遗传学研究(二)

马庆生

广西农学院分子遗传学研究室

2. 在根瘤菌研究中成功地运用了转座子诱变技术。

转座子(Transposon)是一种特殊的DNA短片段,它带有抗药性基因,并具有在DNA复制子之间转座插入的能力,转座的发生并不需要 *recA* 基因产物,一些转座子象 Tn 5 的转座插入位点的分布是相当随机的,但另一些象 Tn 10, 它的转座插入似乎具有“热点”(Hot spot), 转座子插入到一个新位点时,被插入位点原基因的连续性受到阻断,因而该基因的功能一般就完全中断,由于转座子本身带有抗药性基因,所以转座子诱变不但产生突变的表型,而且同时带入了抗药性,这二个性状是紧密连锁的,转座子还具有极性,它中断了插入位点的基因正常功能,同时也影响到处于同一操纵子内而位于该中断基因下(downstream)的那些基因的作用,因而转座子也可以用来研究转录作用的情况。

根瘤菌的二个主要性状(结瘤能力和固氮能力)都是不太容易筛选的表型,需要接种上植株才能观察,而用转座子诱变就十分方便,因为用转座子诱变得到的根瘤菌突变体的结瘤、固氮能力缺陷性状,可以十分容易地用抗药

性标记来监察。为了进行转座子诱变,1978年 Beringer<sup>[16]</sup>提出了一个把转座子 Tn 5 导入革兰氏阴性菌的方法,他把一条 P 1 群的广谱寄主质粒与噬菌体 Mu 以及 Tn 5 连接在一起,当这样一条复合质粒从大肠杆菌导入受体根瘤菌时,因为具有 Mu 序列的质粒不能在根瘤菌中复制,这样就可以直接筛选 Tn 5 的转座事件,这种质粒也由此被称作为“自杀质粒”(Suicide plasmid),用这种办法 Beringer 得到了许多由于转座子 Tn 5 插入而产生的根瘤菌共生固氮能力的突变体,自那以后很多实验室都广泛应用这种“自杀质粒”的办法来获得根瘤菌共生固氮能力缺陷突变体<sup>[12]</sup>,但有时在 Tn 5 转位时会一块带入部分 Mu 的 DNA,这对制作 Tn 5 插入位点周围 DNA 遗传图增加了不少困难。

转座子 Tn 5 也可以直接导入根瘤菌染色体,马庆生等<sup>[17]</sup>把可自身转移的带有共生固氮基因的豌豆根瘤菌质粒 P<sup>RLM</sup> 转移到一个在染色体上带有转座子 Tn 5 的菌株,利用 P<sup>RLM</sup> 自身转移能力成功地筛选到一些不结瘤(Nod<sup>-</sup>)和不固氮(Fix<sup>-</sup>)的突变体,由于转座子 Tn 5 不具有限制性内切酶 EcoR 1 位点,那些邻近转座子 Tn 5 插入位点的根瘤菌 DNA 的 EcoR 1