

研究工作

层粘连蛋白与顺铂对腹水肝癌细胞内微丝的共同作用关系¹⁾

罗世荣 陶家平* 何其华* 李 华* 杨 芳 苏雅娟

(北京医科大学细胞生物学教研室; *分析测试中心细胞分析室, 北京 100083)

提 要

本文探讨在外源性层粘连蛋白与抗癌药物顺铂的共同作用下, 癌细胞内微丝组装的变化。结果发现外源性层粘连蛋白与小鼠腹水型肝癌细胞膜受体结合后, 促进肌动蛋白微丝组装, 使其含量增加; 而多靶性抗癌药物顺铂与肌动蛋白微丝的结合, 抑制微丝组装过程, 造成微丝含量减少; 两种试剂共同作用于癌细胞时, 肌动蛋白微丝的含量与对照组相比非常接近。本研究为上述两种物质对癌细胞内微丝组装的拮抗性作用提出直接证据。

关键词 肌动蛋白微丝, 顺铂, 层粘连蛋白, 小鼠腹水肝癌细胞。

肿瘤细胞与转化细胞周围的层粘连蛋白(Laminin)减少时^[1], 如补加外源性层粘连蛋白, 则产生两种现象: 一是使癌细胞间的粘着性增加, 对防止癌细胞脱落与转移有益。另一是促使癌细胞质膜下的肌动蛋白微丝聚合, 则增强癌细胞的运动能力^[2-4], 多靶性抗癌药物顺铂(cis-platin)能使细胞质膜下肌动蛋白微丝解聚^[5], 从而可减弱癌细胞的运动能力, 有抑制癌细胞侵袭和转移的作用。推测层粘连蛋白与顺铂的联合运用, 可能提高癌细胞之间的粘着性而又不使其运动能力增强。

过去分别作了层粘连蛋白与顺铂对癌细胞的作用, 关于上述两种物质共同作用下对癌细胞内肌动蛋白微丝含量与组装的影响, 文献中未见报导, 本文为两种试剂对微丝组装的拮抗性作用, 提出直接重要的证据。

材 料 与 方 法

材料:

层粘连蛋白(laminin)(LN)取自北京医科大学细胞生物学教研室生物化学教研组。

顺铂(cis-platin)取自北京医科大学无机生物教研室实验室。

昆明种小鼠购自北京医科大学实验动物中心。

小鼠腹水肝癌细胞株 H₂₂ 来自北京医科大学生物化学教研室, 由我实验室接种传代。

罗丹明-鬼笔环肽(Rhodamine-phalloidin)购自美国 Molecular probe 公司。

考马斯亮蓝(R-250)购自上海试剂采购站, 为进口分装。

透明质酸酶(hyaluronidase)购自上海东风试剂厂和美国 Sigma 公司。

流式细胞仪(flow cytometer) Becton Dickinson 公司。FACS440 型。

方法:

1) 国家自然科学基金资助项目。

1. 腹水肝癌细胞内肌动蛋白组装与分布的测定^[3-4]

取昆明种小鼠腹水型肝癌细胞(接种后一周) 2ml, 用 pH7.4 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS) 稀释至 2×10^6 个/ml, 将癌细胞悬液分装于 4 支刻度管, 与试剂分别作用:

(1) 取 2×10^6 /ml 的癌细胞 1ml, 加浓度为 100 μ g/ml 的层粘连蛋白 0.2 ml, 再加 PBS 缓冲液 0.2ml, 在 37℃ 下作用 1h.

(2) 取 2×10^6 /ml 的癌细胞 1 ml, 加浓度为 50 μ g/ml 的顺铂 0.2ml, 再加 PBS 缓冲液 0.2ml, 在 37℃ 下作用 1h.

(3) 取 2×10^6 /ml 的癌细胞 1ml, 加浓度为 100 μ g/ml 的层粘连蛋白 0.2ml, 在 37℃ 下作用 1h 后, 再加浓度为 50 μ g/ml 的顺铂 0.2 ml, 在 37℃ 下又作用 1h.

(4) 取 2×10^6 /ml 的癌细胞 1ml, 作为对照组, 加 PBS 缓冲液 0.4ml, 在 37℃ 下作用 1h.

作用完毕后, 用上述 PBS 缓冲液各 1ml 分别洗去游离的试剂, 室温下离心 (500r/min) 2 次, 取各沉淀下的腹水肝癌细胞分别悬于 1ml PBS 缓冲液中, 分别加入 1% 透明质酸酶 0.2 ml, 将粘连的癌细胞分开, (但层粘连蛋白仍与每个细胞膜上受体结合着), 室温下离心 (500r/min) 1min, 弃上清液, 分别加入 0.2ml 浓度为 10 μ g/ml 的罗丹明鬼笔环肽 (rhodamine-phalloidin), 标记活细胞内肌动蛋白微丝 30min, 用 PBS 各 1ml 离心洗 2 次除去游离的罗丹明鬼笔环肽, 分别将癌细胞悬于 0.5ml PBS 缓冲液中, 立即用流式细胞仪 (flow cytometer) 测定各组癌细胞内肌动蛋白微丝组装和分布变化.

FACS 440 具备氩离子激光器, 蓝光激发波长为 488nm; 光电倍增管电压为 600V, 绿光发射; 光电倍增管 90 度散射 (SSC), 电压为 350 V. 罗丹明的激发波长 540nm, 发射波长 560 nm.

2. 荧光法对腹水肝癌细胞内微丝的观察^[5]

取癌细胞, 分别与层粘连蛋白及顺铂作用, 实验步骤与上同, 然后将作用后的各组癌细胞

液分别滴在载玻片上, 自然凉干半小时, 癌细胞内微丝不变, 用 40% 多聚甲醛固定 20min, 双蒸水洗 3 次; 滴丙酮 2 滴去脂, 2min 后用双蒸水洗 3 次, 用罗丹明鬼笔环肽标记丝状肌动蛋白 30min, 双蒸水洗 3 次, 荧光显微镜下观察和照相. 罗丹明的激发与发射波长与上同.

3. 腹水肝癌细胞内肌动蛋白微丝的显影

取癌细胞, 分别与层粘连蛋白和顺铂作用, 步骤与上述相同. 分别取作用后的癌细胞各 0.2ml, 滴在载玻片上用下述方法分别染各组癌细胞内肌动蛋白微丝^[6].

(1) 固定液与染色液配制: 取 0.1 mol/L 磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 14ml, 0.1mol/L 磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 36ml, 去离子水 50ml, 将上述各液混合调 pH 至 7.2 为磷酸缓冲液, 再加 16ml 的 25% 戊二醛液, 即为固定液.

取甲醇 46.5ml, 冰醋酸 7ml, 双蒸水 46.5 ml, 配成甲醇冰醋酸混合液, 再将考马斯亮蓝 (coomassie bright blue) R250 0.2gm, 溶于甲醇冰醋酸混合液中, 即成 0.2% 的考马斯亮蓝染色液.

(2) 染色步骤: 将上述作用后的癌细胞分别滴在载玻片上, 自然凉干后, 在室温下用上述固定液固定 15min, 自来水冲洗, 过双蒸水 3 次. 再将载玻片移入考马斯亮蓝染液中染色 1 h, 自来水冲洗后用双蒸水洗 3 次. 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片后光学显微镜下观察与照相.

结 果

1. 层粘连蛋白与顺铂作用于癌细胞膜引起肌动蛋白组装的变化

图 1 显示各实验组与对照组肌动蛋白微丝荧光强度的差别及其与细胞数关系的分布图. 以指数曲线表示, 代表了肌动蛋白微丝组装的变化. 从曲线所在的通道数可知层粘连蛋白作用下肌动蛋白微丝的荧光强度比对照组肌动蛋白微丝的荧光强度要大; 顺铂组癌细胞内肌动蛋白微丝的荧光强度比对照组的微丝荧光强度

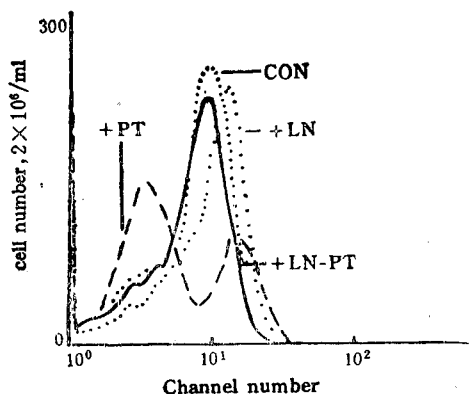


图1 用流式细胞计所测得的罗丹明-鬼笔环肽标记的肝癌细胞内肌动蛋白微丝的分布与变化
Fig 1 Showing the variation and distribution of fluorescent intensity of rhodamine-phalloidin labeled actin microfilaments of liver cancer cells measured by flow cytometer

不同的峰高各自代表对照组与三个实验组荧光强度的值,实验组与对照组相比,加层粘连蛋白组荧光强度增

加,加顺铂组荧光强度减弱,加层粘连蛋白又加顺铂组荧光强度无大变化,与对照组接近

The different maxima represent the values of fluorescence intensity of control and three experimental groups respectively. Compared with control, the value of +LN group was enhanced; that of +PT reduced, and that of +LNPT group remained unchanged

小;层粘连蛋白与顺铂联合作用组肌动蛋白微丝荧光强度与对照组的微丝荧光强度比较,两者相近。

2. 癌细胞内肌动蛋白微丝的观察

图2a(图版I)为对照组癌细胞内肌动蛋白微丝的分布,在细胞膜下和细胞中部均充满多少不等的肌动蛋白微丝,荧光镜下发生红色荧光。

图2b(图版I)示层粘连蛋白作用后癌细胞内肌动蛋白微丝增加,发出红色强光。

图2c(图版I)显示顺铂作用后癌细胞内肌动蛋白微丝的分布,在细胞膜下有肌动蛋白微丝细胞中央微丝不浓。

图2d(图版I)为层粘连蛋白与顺铂联合作用组癌细胞内微丝分布,荧光强度介于2b和2c之间,与对照组接近。

3. 腹水肝癌细胞内肌动蛋白微丝的比较

图3a(图版II)为对照组腹水肝癌细胞内肌动蛋白微丝的分布,呈杂乱的网状结构。

图3b(图版II)为层粘连蛋白作用组癌细胞内肌动蛋白微丝的含量情况,微丝束变粗呈密集的网状结构。

图3c(图版II)为顺铂作用组癌细胞内肌动蛋白微丝含量变化情况,微丝比对照组的还少。

图3d(图版II)为层粘连蛋白和顺铂联合作用组癌细胞内肌动蛋白微丝的分布,呈网状微丝。其含量介于层粘连蛋白和顺铂作用的两组之间。

用考马斯亮蓝染肌动蛋白微丝所得各实验组的结果与用荧光标记的肌动蛋白微丝的含量变化是相对应的。

讨 论

1. 流式细胞计所测得的对照组与各实验组癌细胞内肌动蛋白微丝的含量及其增减以荧光强度的强弱来表示。它的数值是通过图1的横坐标上的通道数来表达。曲线上峰位的右移或左移分别与通道数的增减一致。图1的纵坐标表明细胞数,曲线上的各点代表荧光强度与细胞数的分布关系,即某一荧光强度(某一微丝含量)下所占据的细胞数,曲线右移或左移分别表示癌细胞内微丝含量相应的增减。

2. 一般显示细胞骨架是用免疫荧光和免疫组织化学方法^[7],自从Pena^[6]用考马斯亮蓝色来显示细胞质内肌动蛋白微丝以来,许多人做这方面的工作,但所用细胞多数为成纤维和上皮细胞的贴壁细胞,鲜见用悬浮的癌细胞报道。由于癌细胞内微丝不发达更增加了显示的

难度。本文中实验用考马斯蓝染色对悬浮的小鼠腹水肝癌细胞染其肌动蛋白微丝得到了较清晰的丝状结构,与流式细胞计所测的微丝增减结果大体一致。

3.外源性层粘连蛋白与分散的腹水型肝癌细胞膜上受体结合,使游离的癌细胞相互粘连,这可能减少癌细胞的脱落,就可以防止癌细胞的转移,但从上述和过去实验结果证明层粘连蛋白能促进癌细胞内肌动蛋白微丝的组装而含量增加,过去实验证明微丝的增加引起癌细胞运动能力加强,这又增加了癌转移的危险^[4]。

4.顺铂是一种有效的多靶性抗癌药物,过去工作证明顺铂能使微丝解聚。有降低癌细胞的运动能力^[5],因此给外源性层粘连蛋白后再加用顺铂可使癌细胞内增加的微丝再解聚,顺铂抵消了层粘连蛋白对微丝的作用。可看成两者的拮抗作用。

5.本实验首次使用层粘连蛋白和顺铂联合共同作用于小鼠腹水型肝癌细胞,从本文实验的结果发现,上述两种试剂联合处理使癌细胞内肌动蛋白微丝的组装和分布以及其含量与对照组癌细胞内存在的微丝分布及含量极相近,这可能因层粘连蛋白先使癌细胞内肌动蛋白微丝增加了;顺铂又使微丝解聚的结果。

参 考 文 献

- 1 Timpl R *et al.* *J Biol Chem*, 1979; 254: 9933
- 2 周柔丽. 国外医学分子生物学分册, 1985; 7(1): 13
- 3 肖军军等. 北京医科大学学报, 1989; 21(1): 42
- 4 苏雅娴等. 生物物理学报, 1989; 5(2): 160
- 5 高亚梅等. 北京医科大学学报, 1988; 20(5): 375
- 6 Pena SDJ. *Cell Biol Intern Rep*, 1980; 4: 149
- 7 Lazarides E. *Methods in cell Biology*, Academic Press, Inc, 1982: 313—321

[本文于1990年4月28日收到, 10月9日修回]

THE EFFECT OF LAMININ AND CIS-PLATIN ON F-ACTIN ASSEMBLY IN ASCITIC LIVER CANCER CELLS

Luo Shirong, Tao Jiaping*, He Qihua*, Li Hua*, Yang Fang, Su Yaxian.

(Department of Cell Biology, Beijing Medical University, *The Center of Analysis and Measurement, Beijing Medical University, 100083)

ABSTRACT

In this paper, we have studied the changes of F-actin assembly in ascitic liver cancer cells of mouse under the action of extrinsic laminin and *cis*-platin. The results shows that after the extrinsic laminin combined with its receptors they can promote the assembly of F-actin, resulting in the increase of the amount of the F-actin, that *cis*-platin, one of the multiple-targeted anti-tumor drugs, inhibits the assembly of F-actin after linking with F-actin and that under the action of laminin and *Cis*-platin, the assembly tends to stability and the amount of the F-actin remains unchanged.

This study gives a direct evidence for the opposite action of extrinsic laminin and *cis*-platin on the assembly of F-actin in ascitic liver cancer cells of mouse.

Key words F-actin, *cis*-platin, Laminin

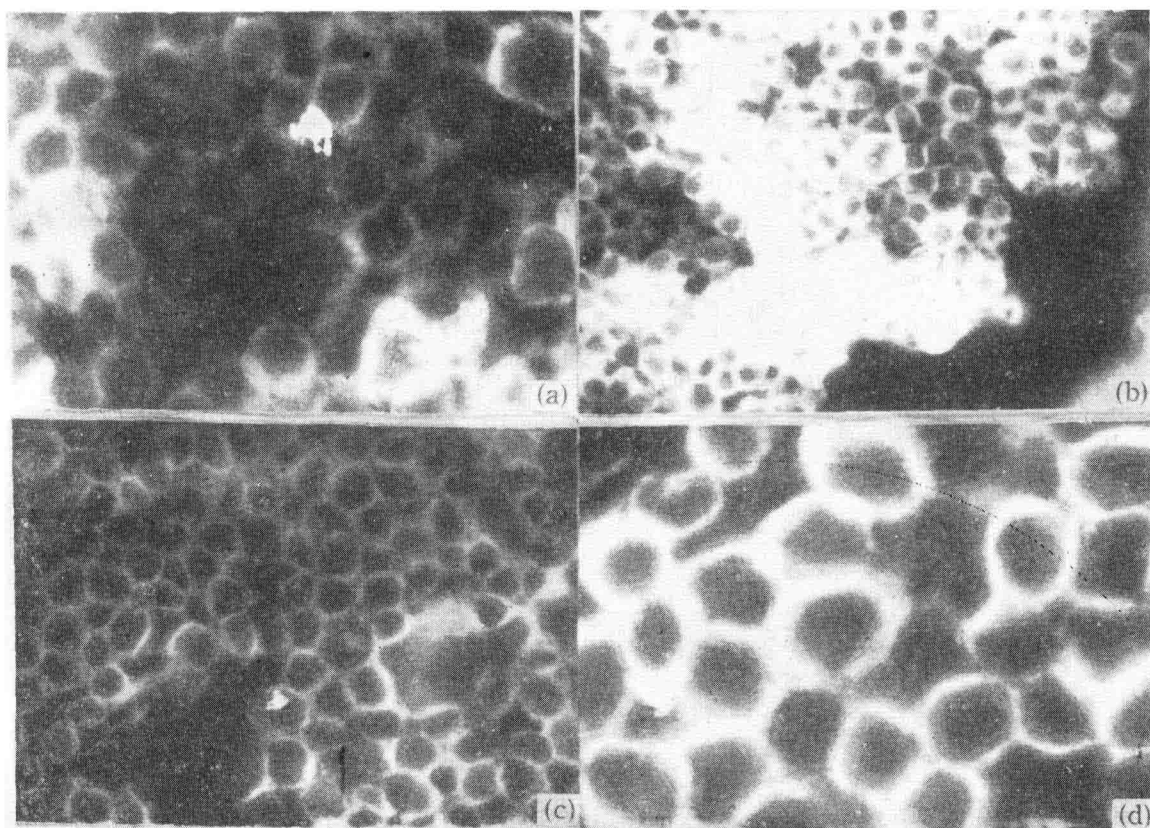


图 2(a) 对照组癌细胞内肌动蛋白微丝的分布 膜下和细胞中部均有不等的微丝存在，
荧光镜下发出红色的荧光 放大 300×

Fig 2(a) Control: Showing the distribution of F-actin in liver Cancer cells The F-actin distributed under the membrane and in the middle of cancer cells. The red bright fluorescence was emitted by fluorescence microscope 300×

图 2(b) 层粘连蛋白实验组 癌细胞内微丝由层粘连蛋白诱导其含量增加，荧光增强 200×

Fig 2(b) Showing the effect of laminin on the experimental group the content of F-actin was enhanced in liver cancer cells resulting from induction of laminin thus increasing the fluorescence intensity 200×

图 2(c) 顺铂作用组 癌细胞内微丝由顺铂抑制了微丝的组装，使其含量减少故其荧光减弱 200×

Fig 2(c) Showing the effect of Cis-pt on the experimental group The content of F-actin was decreased in liver cancer cells resulting from the inhibition effect of Cis-pt on the F-actin assembly, thus leading to the fluorescence intensity weaker 200×

图 2(d) 层粘连蛋白和顺铂联合作用实验组 癌细胞内微丝含量介于单片层粘连蛋白和单纯顺铂作用的两组之间 400×

Fig 2(d) Showing the combination effect of laminin and Cis-pt on the experimental group The content of F-actin in the liver cancer cells was between that of two experimental groups affected by laminin and Cis-pt respectively 400×

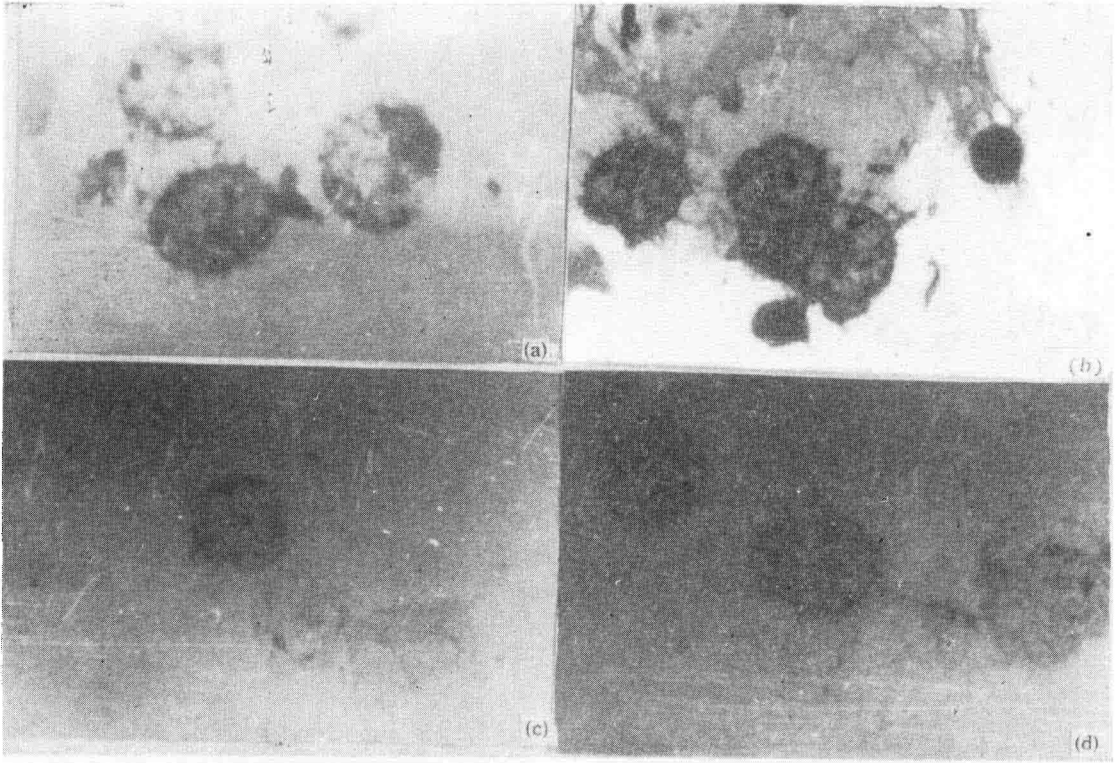


图 3(a) 对照组腹水肝癌细胞内肌动蛋白微丝分布 呈网状结构 400×

Fig 3(a) Control: Showing the distribution of F-actin in liver cancer cells The bundles of F-actin display a net-like structure 400×

图 3(b) 层粘连蛋白与癌细胞膜结合后癌细胞内肌动蛋白微丝的分布 微丝含量明显增加 400×

Fig 3(b) Showing the distribution of F-actin in liver cancer cells after combination of the laminin with membrane of cancer cells thus resulting in increase of the content of F-actin obviously 400×

图 3(c) 顺铂与癌细胞内肌动蛋白微丝作用后微丝的分布 微丝含量明显减少 400×

Fig 3(c) Showing the distribution of F-actin in the liver cancer cells after reaction of cis-pt with the actin filament, thus resulting in the decrease of F-actin content significantly 400×

图 3(d) 层粘连蛋白和顺铂联合作用组癌细胞内肌动蛋白微丝的分布 微丝含量与对照组接近 400×

Fig 3(d) Showing the distribution of F-actin in liver cancer cells after using laminin and cis-pt at the same time The content of F-actin was near that of control 400×