

转移力不同的肺癌细胞株 对表皮生长因子和受体的表达

张彬^① 熊敏

(中山医科大学病理教研室, 广州, 510089)

提 要 通过单细胞克隆技术及裸鼠接种从人肺巨细胞癌和腺癌细胞中筛选出高低转移力的克隆株(J₁、J₆、X₁、X₇), 观察并比较其生物学特性, 结果表明, 转移力不同的细胞株形态学特征不同, 且细胞的生长速度和移动能力与体内转移力也不存在必然的联系。观察表皮生长因子(EGF)、抗EGF和抗表皮生长因子受体(EGFR)对肺癌母系细胞及其克隆细胞生长的影响及EGF和EGFR的表达, 结果表明: 外源性EGF对不同类型细胞的生长作用不一致, 抗EGF及抗EGFR的抗体可以抑制某些肿瘤细胞的生长, EGF可以促进EGFR的表达, EGF及EGFR的表达和肿瘤细胞的分化程度有关。

主题词 肺肿瘤; 克隆细胞; 受体; 生长因子; 肿瘤转移

中图分类号 R 734.2

肿瘤本质上是由多克隆异质性细胞组成, 研究高转移和低转移肿瘤细胞的生物学特性将有助于了解肿瘤细胞转移的机制。表皮生长因子(EGF)是近年来发现的在细胞增殖和分化中起重要作用的因子。研究显示, 很多肿瘤细胞表达EGF及其受体(EGFR)^[1], 外源性EGF可促进肿瘤细胞的生长^[2]。EGF及其受体的表达可能和肿瘤细胞的分化程度及转移能力有一定关系^[3]。本文以同源性的具有不同转移能力的克隆细胞株为材料, 研究它们的生物学特性、EGF和EGFR的表达及EGF、抗表皮生长因子(ANTI-EGF)、抗表皮生长因子受体(ANTI-EGFR)对其生长的影响, 以探讨癌细胞发生发展的机理。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

人肺巨细胞癌细胞系(HLAmp, 简称J)及人肺腺癌细胞系(GLC-82, 简称X), 分别

由第一军医大学及暨大医学院病理教研室惠赠。本实验所用裸鼠均为雄性鼠, 为本校实验动物中心提供的Balb/c裸小鼠, 鼠龄为4~7周, 体重在15~25g之间。

1.2 实验方法

1.2.1 单克隆细胞株的制备及筛选 人肺巨细胞癌及肺腺癌细胞系分别在体外传代至第14代及24代时, 采用有限稀释法进行克隆化, 根据其生长特性、细胞形态及排列方式分别筛选出3~4株细胞接种裸鼠, 每株细胞接种3只裸鼠, 观察其移植瘤的生长情况及转移情况, 初步建立4个成瘤及转移能力不同的克隆株, 命名为J₁、J₆及X₁、X₇。

1.2.2 4株细胞裸小鼠接种 将建立的4个克隆细胞株的细胞按 3×10^6 个的量接种于裸小鼠的颈背部皮下及腹腔。每株细胞接种6只裸小鼠。颈背部皮下接种的癌细胞, 从开始出现小结节起每3d测1次肿瘤的长径和宽径, 按 $V=LW/2$ ^[4]计算各组小鼠的肿瘤

^① 第一作者, 1969年出生, 女, 硕士, 助教

平均体积(注:V为体积,L为长径,W为宽径)。

1.2.3 体外生物学特点的观察 各株细胞体外移动实验:采用琼脂糖滴法^[5]。EGF、ANTI-EGF、ANTI-EGFR对细胞生长的影响:将细胞以每孔 2×10^4 个的量接种于24孔培养板,置培养箱内培养,24h后分别换为无血清培养液、含 $20 \mu\text{g/L}$ EGF、含 $10 \mu\text{g/L}$ EGF、含 0.2 mL/L 抗EGF抗体以及含 0.2 mL/L 抗EGFR抗体的无血清培养液,每组取3份。观察培养过程中细胞的形态、排列有无改变。3d后收集细胞并计数。

1.2.4 EGF与EGFR的免疫组化用

LSAB法。组织切片采用胰酶消化。细胞涂片:分别采用细胞涂片机和载玻片培养法。

2 结果

2.1 各克隆株裸鼠接种的情况

2.1.1 肿瘤生长 瘤细胞接种裸小鼠皮下,经5~7d接种部位皮下长出肿瘤,并逐渐增大。当肿瘤长到超过1cm直径时,肿瘤中心往往发生坏死。各株裸小鼠成瘤率不一,具很大差异(见表1)。在裸小鼠皮下成瘤3周后 J_1 移植瘤的体积明显大于 J_6 移植瘤的体积。

2.1.2 肿瘤转移(图1) 裸鼠接种成瘤,处死后经大体与显微镜下检查,结果见表2。

表1 各株细胞的裸鼠成瘤率及裸鼠存活时间($\bar{x} \pm s$)

裸鼠(Balb/c) 皮下接种	接种细胞数 ($\times 10^4$)	肿瘤生长		裸鼠存活 时间(d)
		频率 ¹⁾ (%)	25d后肿瘤体积 (cm^3)	
J_1	3	6/6(100)	3.02 ± 0.44	26 ± 4
J_6	3	3/6(50)	1.70 ± 0.21	35 ± 4
X_1	3	0/6(0)		49 ± 6
X_7	3	6/6(100)	2.51 ± 0.36	28 ± 5

1) J_1 与 J_6 , X_1 与 X_7 之间的成瘤率均有显著性差异,2 \times 2列联表的Fisher精确检验法 $P < 0.01$

表2 各株细胞裸鼠皮下及腹腔接种后转移率

裸鼠皮下 及腹腔接种	接种细胞数 ($\times 10^4$)	转 移	
		频率(%) ¹⁾	部位(例数)
J_1	3×2	5/6(83.3)	腋窝LN(3),纵隔LN(3),肺门LN(1),肝(2)
J_6	3×2	1/3(33.3)	纵隔LN(1)
X_1	3×2	0/0(0)	
X_7	3×2	4/6(66.7)	腋窝LN(3),纵隔LN(2),肝(1)

1) J_1 与 J_6 , X_1 与 X_7 之间的转移率均有显著性差异,2 \times 2列联表的Fisher精确检验法 $P < 0.01$

从表1、2可见, J_1 成瘤率及转移率高于 J_6 ,裸鼠存活时间短于 J_6 ; X_7 成瘤率及转移率高于 X_1 ,裸鼠存活时间短于 X_1 。说明 J_1 及 X_7 为高转移株, J_6 及 X_1 为低转移株。

2.2 细胞学和组织学检查

2.2.1 体外培养细胞的形态 肺巨细胞癌母系细胞(J)呈贴壁生长,在倒置显微镜下,细胞多为圆形或椭圆形,部分呈梭形;HE染色见大部分细胞为圆形,有的呈星芒状或梭形,核大深染,核仁明显,可见核分裂像,偶见多核瘤细胞。

肺腺癌母系细胞(X)在倒置显微镜下多数细胞呈上皮细胞样镶嵌排列,少数细胞散在分

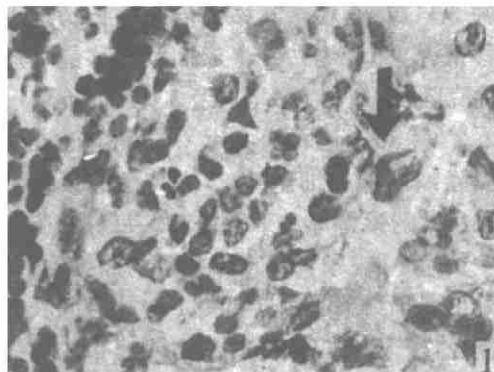


图1 J_1 株淋巴结转移瘤,大部分淋巴结组织已被瘤细胞取代(见箭头所指) $\times 400$

布;HE染色见大部分细胞为圆形,核大深染,核仁明显,核分裂像可见,偶见多核瘤细胞。

体外培养的4株克隆细胞(J_1, J_6, X_1, X_7),在倒置显微镜及光镜下形态上与母系细胞既有相似之处,又有各自的特点。主要表现为: J_1 细胞以呈梭形排列为主,细胞密集时可重叠;核圆形或短梭形。 J_6 细胞多为圆形,小部分呈梭形,核圆形或椭圆形,呈上皮细胞样镶嵌排列。 X_1 细胞呈圆形或多边形,散在分布。 X_7 细胞多为圆形,呈上皮细胞样镶嵌排列。

2.2.2 组织学特点 移植瘤切片观察(图2、3): J_1 细胞排列较致密,异型性大,表现为大小形态差异较大;核仁明显且粗大,数目增多;多核瘤巨细胞常见,核分裂像多见,并见到癌细胞浸润肌肉的现象。 J_6 细胞排列稍松散,细胞大小形态较一致,圆形或短梭形;核仁可见,但多数细小;核分裂像少见。

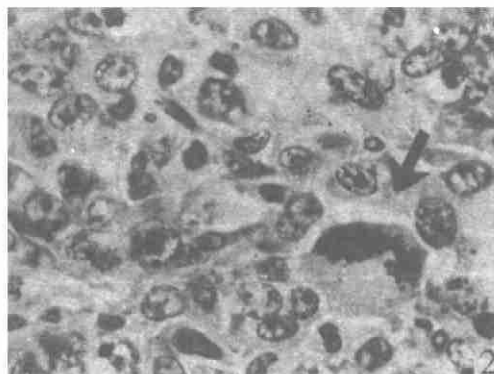


图2 J_1 株裸鼠移植瘤,细胞异型性较大,核分裂像多见(见箭头所指) $\times 400$

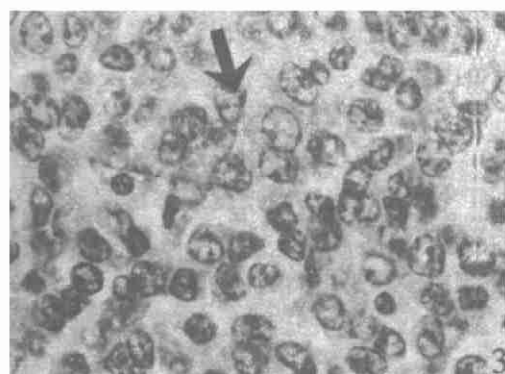


图3 J_6 株裸鼠移植瘤,细胞异型性较小,核分裂像少见(见箭头所指) $\times 400$

X_1 接种后无移植瘤生长。 X_7 细胞弥漫分布,局部细胞排列成腺样或条索状。异型性较大。细胞胞体较大,胞浆丰富,部分细胞胞浆透明;核大小形态不一致,核仁明显,核分裂像常见。并见到癌细胞浸润肌肉、胰腺及骨组织的现象。

2.3 各株细胞体外生物学特性的观察

2.3.1 细胞生长速度及倍增时间 将培养3 d的细胞数对数变换后作方差分析,结果表明: J_6 的生长速度高于 J_1 ,倍增时间低于 J_1 ; X_7 的生长速度高于 X_1 ,倍增时间低于 X_1 。

2.3.2 各株细胞体外移动实验结果 将各株细胞的体外移动距离方差分析,结果表明: J_1 及 J_6 的移动距离没有显著性差异, X_1 的移动距离大于 X_7 。

2.3.3 EGF、ANTI-EGF、ANTI-EGFR对细胞生长的影响 将含不同成分无血清培养液培养3 d的细胞数与无血清培养液比较,以及两种浓度的EGF培养液培养3 d的细胞数做比较,结果见表3。

表3 各株细胞经不同培养液培养后细胞数比较结果

培养成分	J	J_1	J_6	X	X_1	X_7
20 μ g/LEGF	+	+	+	○	○	-
10 μ g/LEGF	+	++	++	○	○	-
抗EGF	-	-	-	-	○	○
抗EGFR	-	-	-	-	○	○

+表示促进,++表示促进作用更大,-表示抑制作用更大,t检验P均 <0.05 ,○表示无作用

此外,发现 X_7 经EGF处理后,除细胞生长速度减慢外,细胞由圆形为主变为形态多样,由紧密镶嵌排列转变为散在分布,且巨核及多核细胞增多。

2.4 免疫组化结果

4株克隆细胞经无血清培养液及含EGF的无血清培养液培养3 d的细胞涂片及移植瘤、转移瘤切片免疫组化结果(表4)表明:经EGF处理后,细胞EGF或EGFR的表达常有增强,表现在不仅阳性细胞数增多,且染色

强度增加(图4)。

表4 细胞涂片及组织切片中 EGF、EGFR 的表达¹⁾

细胞株	无血清培养液		含 EGF 的无血清培养液		组织切片	
	EGF	EGFR	EGF	EGFR	EGF	EGFR
J ₁	+	+	+++	+	++	++
J ₂	-	-	-	+	+	+
X ₁	-	-	+	-		
X ₂	+	++	+	+++	+++	+++

1)选10个有代表性的高倍视野,计数阳性细胞数,规定阳性细胞数>75%为+++,>50%为++,>25%为+,<25%为+

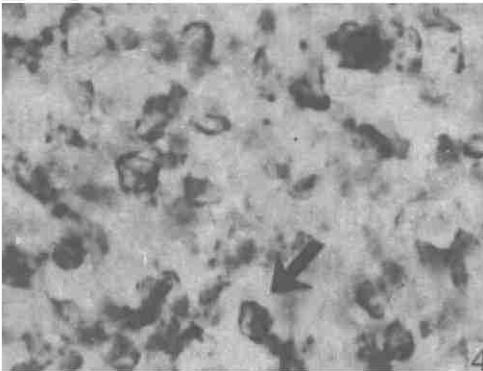


图4 J₁株移植瘤免疫组化反应,部分癌细胞 EGF 阳性(+) (见箭头所指) ×400

3 讨论

3.1 高转移及低转移克隆株细胞 EGF 及 EGFR 的表达

细胞涂片免疫组化显示经 EGF 处理后,细胞 EGF 或 EGFR 的表达常有增强。推测 EGFR 表达增加是由于 EGF 作用于受体,通过受体后信号传递系统使 EGFR 基因-erbB1 表达增加所致。而 EGF 表达增加估计是培养液中的 EGF 被细胞吞入胞浆引起。这说明 EGF 不仅可直接作用于 EGFR 调节细胞的生长,且可以通过促进 EGFR 的表达来完成其作用。

移植瘤组织切片的免疫组化显示:低分化的两株细胞(J₁、X₂)移植瘤均有 EGF 及其

受体的表达,巨细胞瘤高分化株(J₂)移植瘤 EGF 及 EGFR 也为阳性,但阳性细胞数明显少于低分化株。这提示 EGF 及 EGFR 的表达和肿瘤细胞的分化程度及转移能力有关。因此可根据 EGF 和 EGFR 的表达情况了解肿瘤的分化程度和估计预后。

3.2 EGF、抗 EGF 及抗 EGFR 对各克隆株细胞生长的影响

外源性 EGF 可促进 J、J₁、J₂ 的增殖,并且抗 EGF 及抗 EGFR 的抗体均可抑制其增殖,说明 EGF 可促进某些癌细胞株的增殖。

X 及 X₁ 对 EGF 无反应原因可能有:①此细胞系中有足够的自泌生长因子,不再需要外源性 EGF。这种自泌的生长因子作用于自身的细胞膜而调节自身的增殖。②转化生长因子 α(TGFα)取代了 EGF 的作用。TGFα 与 EGF 共用一个受体(EGFR),并且在恶性肿瘤的生长调节中可取代 EGF 而起生长调节的作用。

外源性 EGF 抑制 X₂ 的生长,原因可能有:①X₂ 经 EGF 处理后,细胞由紧密镶嵌排列转变为散在分布,细胞形态由圆形为主变为形态多样,而且巨核及多核细胞增多,提示细胞分裂受抑制,因而生长缓慢。②外源性 EGF 浓度过高。近年来,EGF 的低促高抑效应被很多实验证实。很多学者发现^[6],当 EGF 以 10⁻⁹ 的浓度加入表达高 EGFR 的鳞癌细胞培养液中,会抑制细胞的生长,当以

10^{-12} 的浓度加入,则促进细胞的生长,而且发现,抑制作用随着 EGFR 数目的增加而增加。进一步研究发现,低亲和力受体和生长抑制有关,高亲和力受体和 EGF 对生长的促进有关。③EGFR 质或量的改变或受体后信号传导系统的紊乱在细胞的生长调节中可能起着一定的作用。④其它生长因子或其受体也可能影响 EGF 或 EGFR 的作用。

仅 X 被抗 EGF 和抗 EGFR 的抗体所抑制, X₁ 及 X₇ 则不被抑制。不被抑制的原因可能有:①近来研究发现,有些肿瘤细胞自泌的生长因子不需要分泌到细胞外,就在细胞内某个部位激活细胞生长调节的信号系统而引起细胞的增殖^[7],故抗 EGF 和抗 EGFR 的抗体均不能抑制这种通路。②抗 EGF 及抗 EGFR 浓度太低。

参 考 文 献

- 1 Bolufer P, Lluch A, Molina R, *et al.* Epidermal growth factor in human breast cancer, endometrial carcinoma and lung cancer. Its relationship to epidermal growth factor receptor, estradiol
- 2 Fujiuchi S, Tsuji T, Ohsaki Y, *et al.* The effect of suramin on human lung cancer cell line in vitro. *Gan To Kagaku Ryoho*, 1994, 21(5) : 647
- 3 Yoneda K, Boucher LD. Bronchial epithelial changes associated with small cell carcinoma of the lung. *Human Pathol*, 1993, 24(11) : 1180
- 4 Murayama Y. Growth-inhibitor effects of EGF on human breast cancer and carcinoma of the esophagus transplanted into nude mice. *Annals of Surg*, 1990, 211(3) : 263
- 5 Varani J, Orr W, Ward PA. A comparison of the migration patterns of normal and malignant cells in two assay systems. *Am J Pathol*, 1979, 90 : 159
- 6 Rabiasz GJ, Langdon SP, Bartlett JM, *et al.* Growth control by epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha in human lung squamous carcinoma cells. *Br J Cancer*, 1992, 66(2) : 254
- 7 Browder TM. Private and public autocrine loops in neoplastic cells. *Cancer Cells*, 1989, 1 : 9

(1995-07-21 收稿 1996-04-15 修回)

EXPRESSION OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR AND ITS RECEPTOR IN CLONAL CELL SUBPOPULATIONS WITH DIFFERENT METASTATIC ABILITY FROM HUMAN LUNG CARCINOMA

Zhang Bin Xiong Min

(Department of pathology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

Four sub-lines (strain J₁, J₆, X₁, X₇) with different metastatic ability were isolated from human lung giant cell carcinoma and adenocarcinoma cell lines by the single cell cloning technique and were inoculated into the nude mice. Their biological properties were compared and the following conclusion was obtained: The clonal cells with different metastatic ability

had unsimilar morphological properties, whereas the growth rate and motility of tumor cells in vitro didn't necessarily correspond with the metastatic ability.

The effect of epidermal growth factor(EGF), anti-EGF and anti-EGFR on the growth of lung carcinoma cell lines and their clonal cells, along with the expression of EGF and EGFR, were investigated. The results showed that the exogenous EGF had different effects on different kinds of tumor cells. Anti-EGF and anti-EGFR could inhibit the growth of some kinds of tumor cells. EGF might promote the expression of EGFR, and the level of expression of EGF and EGFR was correlated with the degree of differentiation of tumor cells.

Subject headings lung neoplasms; clone cells; receptor, growth factor; neoplasm metastasis

· 简 讯 ·

我校又一项成果《白内障的防治研究》 被列入卫生部“十年百项计划”

我校眼科中心李绍珍教授等共同完成的科技成果“白内障的防治研究”1996年被列入卫生部“十年百项计划”，这是我校又一项获卫生部“十年百项计划”的第二个项目。

白内障是我国最常见的致盲眼病，而且绝大多数分布在广大农村地区。该项目对白内障摘除联合人工晶体植入术及其并发症进行深入研究，完善和发展了囊外白内障摘除和人工晶体植入技术。创新了前囊切开技术，改良巩膜瓣切口及二期植入技术。简化了操作步骤。开展门诊白内障人工晶体植入手术，更新了白内障手术传统观念，使白内障手术朝着更安全，有效和简单的方向转化。成果已在县级医院普及推广，证实是一种成熟而理想的治疗白内障的手术方法，完全适合在广大农村基层医疗单位开展。

该成果可通过举办学习班，进修班等形式进行推广，为广大白内障盲人造福。

(陈丽芳 黄小珍)