

# 纤维连接蛋白和层粘连蛋白对 瘤细胞移动性的影响<sup>①</sup>

郭琳琅<sup>②</sup> 胡瑞德

(中山医科大学病理学教研室; 广州, 510089)

**提 要** 用琼脂糖滴扩散法分别观察在培养基内加入不同浓度的纤维连接蛋白(fibronectin, Fn)和层粘连蛋白(Laminin, Ln)及地塞米松后, 培养的人肺巨细胞癌细胞和肺腺癌细胞体外移动性的改变; 同时用考马斯蓝 R-250 染色显示瘤细胞内微丝结构的变化。结果显示加入外源性 Fn 和 Ln 后, 两株瘤细胞的移动性均增强, 胞浆内近胞膜周围的微丝增多, 地塞米松处理后, 瘤细胞内 Fn 合成增加, 细胞移动性降低, 胞浆内微丝增多, 杂乱弥漫分布。结果表明瘤细胞移动性的变化与细胞内微丝结构的变化有关。实验还观察到内源性 Ln 阳性的肺巨细胞癌细胞的体外移动能力大于 Ln 阴性的肺腺癌细胞。

**主题词** 纤维连接素类; 昆布氨酸; 细胞运动; 微丝; 肺肿瘤; 巨细胞瘤; 腺癌

**中图分类号** R73-37

肿瘤浸润和转移是受多种因素影响的复杂病理过程。近年来, 细胞外基质在肿瘤浸润转移过程中的作用日益受到重视。作者用琼脂糖滴扩散法分别观察在培养基内加入不同浓度的纤维连接蛋白(fibronectin, Fn)和层粘连蛋白(laminin, Ln)及地塞米松后, 培养的肺巨细胞癌细胞和肺腺癌细胞体外移动性的改变; 同时用考马斯蓝 R-250 染色显示瘤细胞内微丝结构的变化, 以探讨内、外源性 Fn 和 Ln 影响瘤细胞移动性的可能机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞系和主要试剂

1.1.1 细胞系 人肺巨细胞癌细胞和肺腺癌细胞分别来自北京 301 医院和中山医肿瘤研究所。

1.1.2 主要试剂 Fn 和 Ln(由北京医科大学细胞室提供)、兔抗人 Fn 抗体(GI-BCO 公司)、兔抗人 Ln 抗体(Dako 公司)、地塞米松(上海第九制药厂)。

### 1.2 免疫组化染色

将培养的瘤细胞用消化液消化脱壁, 接

种到盖玻片上, 培养 48h 后取出, 用 3.7% 福尔马林液固定。以下按常规 ABC 法免疫组化技术操作。DAB 显色, 苏木素复染核, 酒精脱水、二甲苯透明封片。以 PBS 代替一抗, 设阴性对照, 以已知阳性标本作阳性对照。

### 1.3 细胞体外移动性观察

1.3.1 制作琼脂糖培养基 在 0.8% 琼脂糖溶液中, 加入等量 Hanks 液, 使琼脂糖浓度为 0.4%, 再加入不同剂量的 Fn 或 Ln(浓度为 5、10、15、20、25、30 和 50 μg/ml) 或省略 Fn 和 Ln 作对照。然后滴入 96 孔培养板内, 用直径 0.15cm 的中空小管小心插入, 使每孔中央留下一圆形空区。

1.3.2 细胞移动距离测定 取 0.4% 琼脂糖液与瘤细胞悬液(细胞浓度为 10<sup>6</sup> 个/ml) 等量混匀, 用微量加样器吸取 2 μl 滴入上述制成的 96 孔培养板的琼脂糖培养基中的圆形空区内, 再小心加入 RPMI 1640 培养液 0.2ml, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 下培养。分别于培养的第 24、48、72h 和 96h、用目镜装有微尺的倒置显微镜, 以琼脂糖滴边缘为界, 测定细胞移出琼脂糖滴后距糖滴边界的距离, 连续测上、

① 本课题由国家教委基金资助

② 第一作者, 1962 年出生, 男, 硕士, 助教, 现在第一军医大学珠江医院病理科

下、左、右4个边,取平均值。

1.3.3 地塞米松对瘤细胞移动的影响 在培养瓶中生长的细胞,培养24h后,换含浓度为 $10^{-8}$ mol/L地塞米松培养液继续培养48h,吹打脱壁、离心,制成瘤细胞悬液(细胞浓度为 $10^6$ 个/ml)。以下步骤同1.3.2叙述。

#### 1.4 细胞内微丝结构显示(组织化学法)<sup>[1]</sup>

将瘤细胞接种于盖玻片上,培养48h,RP-MI 1640培养液中加入外源性发生Fn或Ln(浓度为5、10、15、20、25、30和50 $\mu$ g/ml)及地塞米松(浓度为 $10^{-8}$ mol/L)。以下按Pena法进行,1%Triton X-100处理细胞15min, M缓冲液洗涤,3%戊二醛固定10min,0.2%考马斯蓝R-250染色1h,吹干、树脂封片。细胞内微丝呈天蓝色。

#### 1.5 统计学处理

采用 $t$ 检验和 $q$ 检验法。

## 2 结果

### 2.1 免疫组化染色检测细胞内Fn或Ln

肺巨细胞癌细胞抗Fn抗体染色呈阴性反应,地塞米松处理后,部分细胞浆内出现棕黄色细颗粒。抗Ln抗体染色显示部分细胞浆内有棕黄色颗粒,地塞米松处理后,细胞内阳性颗粒消失。肺腺癌细胞抗Fn抗体和抗Ln抗体染色均呈阴性反应。

### 2.2 内源性Ln对瘤细胞移动的影响

未加外源性Ln或Fn时,肺巨细胞癌细

胞的移动距离远较肺腺癌细胞明显,两者比较有明显差异( $P < 0.01, t = 3.215$ )。根据免疫组化结果,说明内源性Ln阳性的瘤细胞比Ln阴性的瘤细胞的移动能力强。

### 2.3 外源性Fn和Ln对瘤细胞移动的影响

根据表1、2,见不同浓度的Fn和Ln对瘤细胞移动距离的影响各不相同。当Fn或Ln浓度分别为20 $\mu$ g/ml及25 $\mu$ g/ml时,两株瘤细胞均发生最大距离的移动。表中仅列未加Fn或Ln组与加不同浓度Fn或Ln组间的比较结果,采用 $q$ 检验法,以Fn或Ln浓度为20 $\mu$ g/ml及25 $\mu$ g/ml时, $q$ 值最大。

### 2.4 地塞米松处理前后瘤细胞移动性的比较

地塞米松处理后,瘤细胞移动距离均值为 $93.02 \pm 2.25 \mu\text{m}$ ,对照组为 $18.55 \pm 37.78 \mu\text{m}$ ,两者比较有显著性差异( $P < 0.01, t = 3.275$ )。

### 2.5 外源性Fn或Ln对瘤细胞微丝结构的影响

加入Fn或Ln后,两株瘤细胞内微丝均增多,当Fn和Ln浓度分别为20 $\mu$ m/ml及25 $\mu$ m/ml,瘤细胞内微丝增多最明显,肺巨细胞癌细胞内微丝呈致密的网状结构,主要分布于近胞膜周围。肺腺癌细胞内微丝密集呈束状(图1、2,图3、4)。

表1 外源性Fn对瘤细胞移动的影响

Fn 浓度 ( $\mu$ g/ml)	编 号	移动距离均值( $\mu$ m) <sup>1)</sup>		组 别 <sup>2)</sup>	$q_1$	$q_2$
		肺腺癌细胞	肺巨细胞癌细胞			
未加 Fn	1	87.64 $\pm$ 27.43	181.55 $\pm$ 37.78	1-2	5.42	4.37
5	2	125.24 $\pm$ 37.12	218.52 $\pm$ 45.88	1-3	8.04	6.73
10	3	143.47 $\pm$ 36.10	239.85 $\pm$ 44.33	1-4	10.98	9.18
15	4	164.01 $\pm$ 35.50	261.04 $\pm$ 54.20	1-5	16.04	13.02
20	5	209.13 $\pm$ 46.65	311.25 $\pm$ 62.98	1-6	13.00	9.83
25	6	178.09 $\pm$ 32.13	275.19 $\pm$ 42.95	1-7	11.80	10.32
30	7	169.58 $\pm$ 38.15	270.99 $\pm$ 1.39	1-8	11.21	9.62
50	8	167.45 $\pm$ 35.35	264.82 $\pm$ 37.66			

1)表列移动距离培养72h资料,每次实验均做12个琼脂糖滴;2)组别所示为未加Fn组与加不同浓度Fn组间的比较;3) $q_1$ 值为肺腺癌细胞组的 $q$ 检验结果, $q_2$ 值为肺巨细胞癌细胞组结果

表2 外源性 Ln 对瘤细胞移动的影响

Ln 浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	编 号	移动距离均值( $\mu\text{m}$ ) <sup>1)</sup>		组 别 <sup>2)</sup>	$q_1$	$q_2$
		肺腺癌细胞	肺巨细胞癌细胞			
未加 Ln	1	87.64 $\pm$ 27.43	181.55 $\pm$ 37.78	1-2	6.31	4.38
5	2	151.19 $\pm$ 36.60	223.22 $\pm$ 46.49	1-3	8.85	6.59
10	3	173.04 $\pm$ 49.99	238.39 $\pm$ 40.02	1-4	11.16	8.98
15	4	192.95 $\pm$ 53.83	257.59 $\pm$ 53.47	1-5	13.42	11.53
20	5	212.43 $\pm$ 35.85	277.45 $\pm$ 39.43	1-6	17.94	16.58
25	6	251.35 $\pm$ 38.29	312.08 $\pm$ 65.99	1-7	16.94	15.10
30	7	242.74 $\pm$ 36.57	299.00 $\pm$ 40.27	1-8	15.99	14.41
50	8	234.53 $\pm$ 31.70	288.87 $\pm$ 40.07			

1)表列移动距离为培养 72h 资料,每次实验均做 12 个琼脂糖滴;2)组别所示为未加 Ln 组与加不同浓度 Ln 组间的比较;(3) $q_1$  值为肺腺癌细胞组的  $q$  检验结果, $q_2$  值为肺巨细胞癌细胞组结果

## 2.6 地塞米松处理后瘤细胞内微丝结构变化

地塞米松处理后,肺巨细胞癌细胞内微丝数量增多,呈网状结构,杂乱弥漫于胞浆内。

## 3 讨 论

Fn 和 Ln 是细胞外基质的重要组成部分。有关这两种非胶原糖蛋白与瘤细胞的粘附及运动间关系的研究,已有一些报道。本文系统地研究 Fn 和 Ln 对瘤细胞运动的影响及可能机制。

### 3.1 外源性 Fn 和 Ln 对瘤细胞移动及微丝结构的影响

实验结果显示外源性 Fn 和 Ln 增强瘤细胞移动的同时,细胞内微丝的数量增加及排列方式发生变化,说明外源性 Fn 和 Ln 增强瘤细胞移动与细胞内微丝的变化有关。具体机制尚不清楚。一些学者已证实 Fn 或 Ln 和细胞内微丝之间存在一定的结构关系。Hynes (1987)<sup>[2]</sup>发现细胞膜上存在一种跨膜连接蛋白,起连接细胞外 Fn 和细胞内微丝的作用。Cody(1986)<sup>[3]</sup>用免疫荧光技术发现

外源性 Ln 与细胞表面结合后,可诱导细胞表面特异性结合蛋白呈簇状分布,同时细胞内微丝形成更致密的网状结构。国内萧建军<sup>[4]</sup>等也发现外源性 Ln 可引起癌细胞内肌动蛋白微丝重组,含量增多,同时细胞运动增强。

综合上述结果,我们认为 Fn 和 Ln 增强瘤细胞移动的作用机制相似,推测 Fn 和 Ln 作用于细胞时,首先和细胞表面 Fn 或 Ln 特异性受体结合,然后通过一系列中间过程,其中包括引起细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高和钙调蛋白含量增多<sup>[5]</sup>,刺激细胞内微丝聚合及收缩,引发细胞的运动。

### 3.2 内源性 Fn 对瘤细胞移动性及微丝结构的影响

许多实验发现,用地塞米松处理体外培养的瘤细胞,可增加细胞内 Fn 的合成<sup>[6]</sup>。本实验观察到地塞米松处理瘤细胞 48h 后,免疫组化显示细胞表面 Fn 较对照呈强阳性反应,此时瘤细胞的移动性较处理前明显降低,而细胞内微丝却增多,呈杂乱网状结构。外源性 Fn 可增强细胞的移动,引起微丝数量增加,且排列分布规则。说明细胞内微丝数量的

变化并不能直接反映细胞的运动能力,微丝的分布排列对细胞运动有着重要意义。同时还提示细胞表面成分的变化对细胞运动也有较明显影响,细胞表面 Fn 增加的同时,细胞移动能力降低,有人认为可能是因为 Fn 的增加,使细胞之间及与基质大分子的粘附性增强,从而降低了细胞活动的自由度<sup>[7]</sup>。

### 3.3 内源性 Ln 对瘤细胞移动及微丝结构的影响

实验中我们还观察到,内源性 Ln 阳性的肺巨细胞癌细胞的移动性较 Ln 阴性的肺腺癌细胞强。而两株瘤细胞内微丝数量却无明显差异,地塞米松处理后,肺巨细胞癌细胞内 Ln 消失,Fn 增加,细胞移动能力降低,说明细胞移动能力除与 Fn 有关外,与 Ln 也有关系。我们认为内源性 Ln 增强瘤细胞的移动性机制可能与外源性 Ln 不同。可能的解释有两点:①Ln 的特殊分子结构。Ln 分子具有 3 个短臂和 1 个长臂的不对称十字形结构,与细胞及基质大分子的结合能力较强。因此,Ln 阳性的瘤细胞比 Ln 阴性细胞能较快地与基质粘附。②内源性 Ln 阳性的瘤细胞表面特异性受体的分布可能较多。Terrovar<sup>[8]</sup>等曾报道高转移性的人乳腺癌细胞比低转移性癌细胞表面含有较多的 Ln 受体。

本文结果说明,内源性 Ln 和外源性 Fn、Ln 均可增强瘤细胞的移动能力,而内源性 Fn 增加却可降低瘤细胞的移动性。我们可依其各自不同的可能作用机制,设法阻断或增

强某一环节,以达到降低瘤细胞的移动能力,继而减弱瘤细胞在体内的浸润和转移能力。

(本文图见插页 1)

### 参 考 文 献

- 1 Pena SDJ. A new technique for the visualization of the cytoskeleton in cultured fibroblast with commassie blue R-250. *Cell Biol Inter Reports*, 1980,4: 149
- 2 Hynes RO. Integrine. A family of cell shape receptors. *Cell*,1987,48: 549
- 3 Cody RL, Wicha MS. Clustering of cell surface Ln enhance its associate with the cytoskeleton. *Exp Cell Res*,1986,165: 107
- 4 萧军军,苏雅娴,周柔丽,等. 外源性 Ln 对人肺巨细胞癌细胞骨架运动的影响. *北京医科大学学报*,1989;21(1): 42
- 5 萧军军,孙梅,张勇. 层粘连蛋白对人胃癌细胞内游离钙及钙调蛋白和核 DNA 含量的影响. *北京医科大学学报*,1994;26(2): 118
- 6 Dean DC, Newby RF, Bourges SS, et al. Regulation of Fn biosynthesis by DX, transforming growth factors B, and cAMP in human cell lines. *J Cell Biol*,1988,106(2): 2159
- 7 李玉瑞. 细胞外间质的生物化学及研究方法. 北京:人民卫生出版社,1988. 111
- 8 Terranova VP, Rao CN, Kalebic T, et al. Laminin receptor on human breast carcinoma cells. *Proc Natl Sci USA*,1983,80: 444

(1993-11-27 收稿 1994-10-30 修回)

# ROLE OF FIBRONECTIN AND LAMININ IN THE TUMOUR CELL MIGRATION IN VITRO

Guo Linlang<sup>1)</sup> Huo Ruide

(Department of Pathology, Sun Yat-Sen University  
of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

With agarose explant assay, we demonstrated changes of motility of cultured human lung giant carcinoma cell and adenocarcinoma cell by adding one of exogenous fibronectin (Fn) and laminin (Ln) as well as dexamethasone in the cultured medium, and changes of the cellular microfilament (MF) exhibited by commassie blue stain. The results showed that exogenous Fn and Ln can enhance cell migration and increase in MF peripherally located in cells; Dexamethasone can induce Fn expression on cell surface and decrease in cell motility and increase in cellular MF distributed irregularly in cytoplasm. The results indicated that enhancing motility induced by exogenous Fn and Ln may be related to cellular MF. We also noticed that the Ln- positive lung giant carcinoma cell migrated a greater distance than the Ln-deficient adenocarcinoma cell.

**Subject headings** fibronectin; laminin; cell movement; microfilament; lung neoplasms; glant cell tumors; adenocarcinoma

---

## · 作者须知 ·

请作者注意,自 1995 年起,《中山医科大学学报》来稿要求有所变动,望能按新规定写作,以免延误了你的发表时间:

1. 请附上单位介绍信;
2. 作者单位写:(中山医科大学及其下属单位;广州,具体邮政编码);
3. 关键词项改为主题词,可从最新 MeSH 词表或《中医主题词表》(本校图书馆书目索引室有此书)里可以查到的并且其后没有“see”字样的最符合文章内容的词,该项目名称也用“主题词”或“Subject headings”;
4. 首页地脚请注明该课题有何基金资助,第一作者的年龄改为出生年月,另写上其性别、学位、职称、单位及联系电话;
5. 正文、参考文献及英文提要均需另起页;
6. 凡有第二及其以后作者必须在参考文献后签名;
7. 稿件一式两份,有附图的稿件均应有复印图插在文章内。另外还需备一份供制版用的正式图,每张图的背后写上文题、图序,如为线条图,则用绘图纸或硫酸纸绘制并用白纸垫底。用信封袋装好;
8. 请用计算机打印,打印时要特别注意字母和符号的大小写和上下标;
9. 英文摘要及主题词与中文一致,要用打字机或计算机打印,行距间请留空位;
10. 其它问题请参考本刊最新一期的格式编排。