

·论著·

神经节苷脂对神经母细胞瘤细胞 粘附于胶原蛋白作用的影响

文飞球¹,陈亦欣²,吴本清¹,Tamara Kazarian³,Leonard A. Valentino³

(暨南大学医学院附属二院 1. 儿科; 2. 肿瘤研究所,广东 * 深圳 518020; 3. 美国 RUSH 大学医学院儿童医院,Chicago IL, 60612, USA)

[摘要] 目的 以胶原蛋白(CN)作为底物,探讨内生肿瘤神经节苷脂(GS)对神经母细胞瘤 LA-N5 细胞株粘附功能的影响。方法 用葡萄糖苷神经酰胺合成酶抑制剂(D-PDMP)抑制 LA-N5 细胞株 GS 合成,观察该细胞对包被 CN 粘附作用的变化。结果 暴露于 D-PDMP 6 d 后,细胞 GS 几乎完全清除,但细胞的活力、增殖率及凋亡率较对照组无明显变化;暴露于 D-PDMP 的细胞,其粘附能力仅为对照组的 35%:OD₅₇₀分别为 0.07 ± 0.01 和 0.21 ± 0.03 (P < 0.01)。用培养对照组 LA-N5 细胞收集的条件培养液(其中有细胞脱落的 GS)和纯化的肿瘤 GS GD₂ 预处理已暴露于 D-PDMP 的 LA-N5 细胞,可恢复该细胞的粘附表型,较对照组差异无显著性 (P > 0.05)。结论 内生肿瘤 GS 调节肿瘤细胞对 CN 的粘附作用,提示 GS 在肿瘤细胞的迁移、侵入和转移中可能起重要作用。

[关键词] 神经节苷脂;神经母细胞瘤;粘附

[中图分类号] R73-3;R730.264 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2001)04-0359-04

粘附作用是肿瘤细胞成功转移所必需的功能。肿瘤细胞粘附于细胞外基质 (Extracellular Matrix, ECM) 能力的迅速变化对肿瘤细胞的附着、迁移及侵入起决定性作用。肿瘤细胞粘附过程中,细胞将产生一系列的变化,目前对这些变化的调控因素了解甚少。神经节苷脂 (Gangliosides, GS) 是一种含有唾液酸的鞘糖脂分子,该分子嵌于细胞膜外层,是肿瘤细胞粘附过程中的候选调节分子。我们以往的研究表明:从神经母细胞瘤分离出的 GS 能增加血小板粘附于胶原蛋白^[1]。神经母细胞瘤 LA-N5 细胞株含有高浓度的细胞 GS,该细胞对胶原蛋白 (Collagen, CN) 有亲和粘附作用。为进一步探讨内生细胞 GS 在细胞粘附反应中的作用,本研究采用药理学方法抑制 LA-N5 细胞 GS 合成,观察该肿瘤细胞对固定 CN 粘附作用的变化。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

LA-N5 细胞株由美国西北大学儿童医院 Cohn

博士赠送。I 型大鼠鼠尾胶原蛋白 (Sigma 公司) 作为粘附实验的底物。BCA 蛋白测定试剂盒购于美国 Pierce 公司。CYQUANT 细胞增生测定试剂盒购于 Clontech 公司。葡萄糖苷神经酰胺的合成酶抑制剂 D-threo-1-phenyl-2-decanolamino-3-morpholinol-1-propanol (D-PDMP) 购于 Matreya 公司。

1.2 GS 分离、纯化和生化分析

LA-N5 细胞 GS 分离和纯化参照以前的文献所述^[2]。简述如下:将 10 倍容积的氯仿与甲醇混合液 (1:1) 加入细胞中进行两次总脂提取,将提取液混合,氮气吹干,再用小容量的氯仿、甲醇混合液溶解, -20℃ 储存过夜。再将总脂提取物离心,去除不溶的糖蛋白,上清用氮气吹干。干态总脂提取物加入 disopropyl ether/1-butanol/水混合液^[3] 分配提取 GS, Sephadex G-50 硅胶柱层析除盐和其它低分子污染成分,用高效液相色谱纯化。收集混合 GS, 冷冻干燥,硅胶柱层析进一步除盐。以 nmol 脂结合唾液酸 (Lipid bound sialic acid, LBSA) 表示 GS 含量;并用高效薄层层析分离, Resorcinol 染色确定 GS 的成分^[4]。

[收稿日期] 2001-02-06; [修回日期] 2001-05-15
[作者简介] 文飞球(1963-),男,博士,副主任医师。

1.3 细胞培养和细胞 GS 的清除

LA-N5 细胞用 RPMI 1640 培养液进行培养。该培养液含青霉素 G (50 U/ml), 链霉素 (50 μg/ml), 2 mmol/L 谷氨酸和 10% 胎牛血清 (GIBCO 公司产)。培养物维持在 37℃, 含有 5% CO₂ 的湿化空气中。将培养液中加入 10 μM 的 D - PDMP 清除细胞内生 GS。

1.4 肿瘤细胞粘附实验

将培养的肿瘤细胞短时暴露于细胞消化液 (Sigma 公司), 细胞悬液离心弃上清, 加入含有 0.1% 牛血清白蛋白的 RPMI 混匀。将 100 μl 细胞混悬液 (约细胞 15 000 个) 加至 96 孔平底非细胞培养板 (Falcon # 3915, Becton Dickonson), 此反应板已包被 I 型大鼠尾 CN (每孔 4 μg/100 μl), 过夜然后用 0.1% BSA 封闭。细胞加入反应板后, 用 RPMI 洗涤除去未粘附的细胞, 所粘附的细胞用 BCA 方法测定^[5], 每次实验同时测定细胞对塑料反应板及包被白蛋白的背景粘附。

1.5 细胞凋亡实验

用 DNA - RNA 分离试剂盒 (United States Biochemicals) 分离 DNA。简述如下: 用溶解细胞缓冲液将细胞溶解, 加入醋酸钠和异丙基乙醇 40℃ 沉淀 DNA, 离心收集沉淀物 (12 000 g, 5 min)。凉干沉淀并用 Tris - EDTA 缓冲液溶解, 加入无 DNA ase 的 RNA ase 40℃ 孵浴 1 h。将 5 μg DNA 样本用琼脂糖凝胶电泳分离 (1% 琼脂糖含有 0.5 μg/ml 溴化乙锭, 80~90 V 电泳 1~2 h), 紫外灯下观察电泳结果。

2 结果

2.1 清除细胞 GS 对肿瘤细胞生长、形态及凋亡的影响

Li^[6]证实将 LA-N5 细胞暴露于 D - PDMP 6 d 后, 该细胞的 GS 生物合成完全受到抑制, 细胞 GS 的含量降至暴露前的 10% 以下。我们采用同法清除细胞 GS。将 10 μM D - PDMP 加入 LA-N5 细胞培养 6 d, 与对照组相比, 6 d 后细胞 GS 总含量下降 98%: 即 D - PDMP 组 0.76 nmol/10⁸ 细胞, 对照组 43.69 nmol/10⁸ 细胞。已清除 GS 的细胞 (图 1A) 活力和形态与对照组一致 (图 1B)。D - PDMP 对细胞在培养瓶表面的扩增分布及神经轴突伸展无影响。D - PDMP 组细胞增殖率与对照组相一致 (图 1C)。D - PDMP 组 (图 1D, 列 1) 较对照组 (图 1D, 列 2) 细胞的凋亡并无增加。

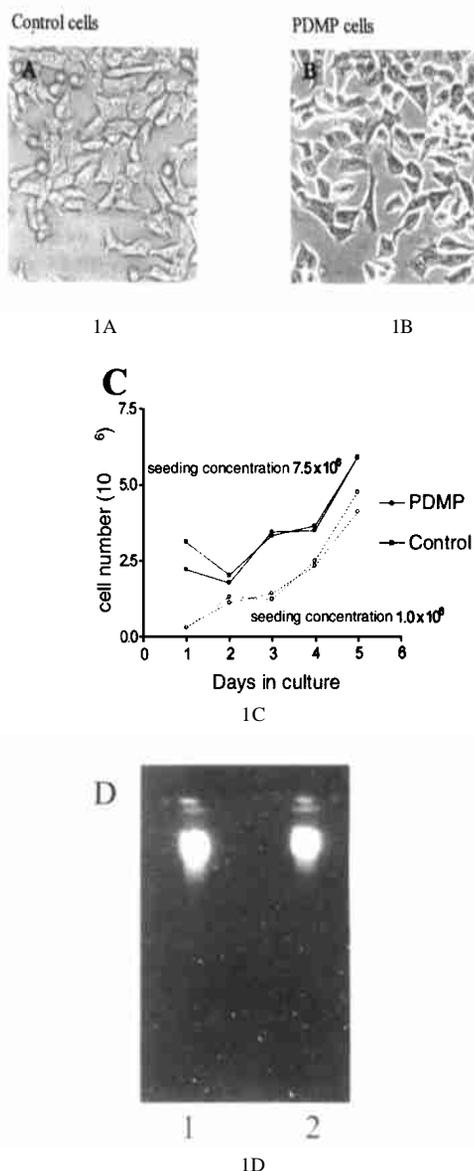


图 1 清除细胞 GS 对 LA-N5 细胞的影响

1A 和 1B 分别为对照 LA-N5 细胞和加入 10 μM D - PDMP 培养 6 d 的 LA-N5 细胞 (200x)。1C 用 CyQuant 方法测定细胞增殖情况: 用 10 μM D - PDMP 培养的细胞或对照组细胞加入反应板后 1~5 d 细胞增殖情况。实线和虚线分别示加入细胞量为 7.5 × 10⁶ cells/75 cm² 和 1.0 × 10⁶ cells/75 cm²

2.2 清除细胞 GS 对 LA-N5 细胞粘附 ECM 蛋白的影响

分别观察 D-PDMP 对 LA-N5 细胞粘附于粘连蛋白 (Fibronectin, FN), Matrigel™ 和 CN 的影响。清除细胞内源 GS 导致细胞对上述 3 种底物的粘附能力降低 (图 2)。用 FN 作为底物, D-PDMP 组粘附的细胞数较对照组下降 26%: OD₅₇₀ 分别为 0.17 ± 0.01 和 0.23 ± 0.01 (P < 0.05)。Matrigel 主要由海带氨酸 (Laminin) 组成, 与对照组相比, D-PDMP 组粘附能力降低 31%: OD₅₇₀ 分别为 0.22 ±

0.01和 0.32 ± 0.01 ($P < 0.05$)。用 CN 作底物也获相似结果, D-PDMP 组下降 37% : OD_{570} 分别为 0.18 ± 0.01 * 和 0.28 ± 0.02 ($P < 0.05$)。肿瘤细胞对塑料平面及白蛋白包被的粘附量很低 (OD_{570} 0.01 ± 0.002)。

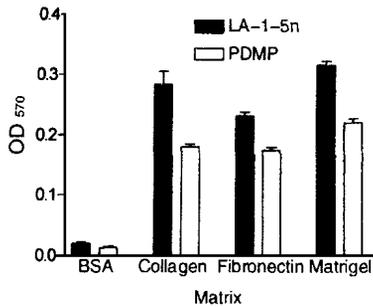


图 2 清除细胞 GS 对 LA-N5 细胞粘附于 ECM 蛋白的影响

2.3 清除细胞膜 GS 降低 LA-N5 细胞对 CN 粘附的表型

CN 是 ECM 中最丰富的蛋白质,因此我们研究内生 GS 对 LA-N5 细胞粘附于 CN 的作用影响。将用 D-PDMP 培养 6 d 的 LA-N5 细胞加入用 CN 包被的 96 孔反应板中,观察不同时限细胞与 CN 粘附反应,各阶段 PDMP 组对 CN 的粘附较对照组均明显降低(图 3)。与 CN 反应 3 min 后, D-PDMP 组较对照组下降 67% : OD_{570} 分别为 0.07 ± 0.01 和 0.21 ± 0.03 ($P < 0.01$),与细胞对白蛋白的背景粘附相接近 (0.06 ± 0.01)。尽管粘附反应在 15 min 后达到平台,但 D-PDMP 组细胞在所有时间点对 CN 的粘附能力均下降(图 3)。

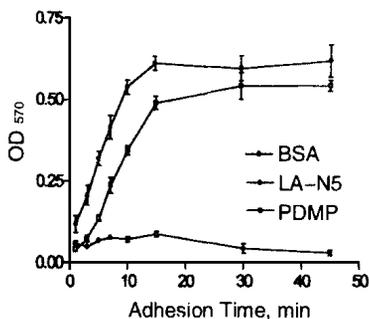


图 3 清除细胞 GS 对 LA-N5 细胞粘附 CN 不同时间的影响

2.4 条件培养液对已清除 GS 肿瘤细胞粘附功能的影响

用 D-PDMP 清除 GS 后,肿瘤细胞对 CN 粘附能力下降。为确定这种功能下降能否逆转,将培养对照组 LA-N5 细胞的条件培养液进行分离,然后将该培养液加至已清除 GS 的 LA-N5 细胞培养瓶中

预处理 2 h,条件培养液能部分恢复已清除 GS 细胞对 CN 粘附能力(图 4)。这一作用在细胞与 CN 接触 10 min 后表现出来 : OD_{570} 分别为 0.31 ± 0.02 , 0.27 ± 0.03 和 0.34 ± 0.02 (OD 值分别为用条件培养液和新鲜培养液预处理已清除 GS 的细胞及对照组 LA-N5 细胞); 30 min 后用条件培养液预处理的 GS 被清除的细胞其粘附能力达对照组的 92% : OD_{570} 分别为 0.45 ± 0.02 和 0.49 ± 0.035 ($P > 0.05$)。

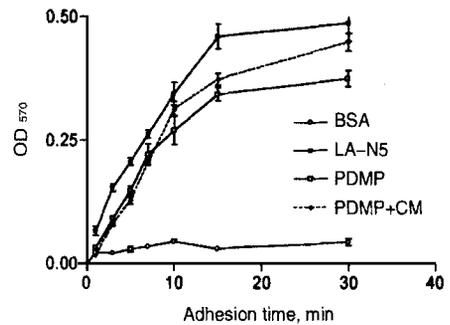


图 4 条件培养液对已清除 GS 细胞 CN 的影响

2.5 外源肿瘤 GS 恢复已清除 GS 的 LA-N5 细胞对 CN 的粘附表型

由于 GS 可从细胞脱落进入培养液,这些脱落的 GS 又可与细胞膜结合,并插入细胞膜中。本研究检测分离的 LA-N5 细胞 GS (外源 GS) 能否恢复已清除 GS 的肿瘤细胞对 CN 粘附能力。将经 D-PDMP 处理的 LA-N5 细胞分离后,加入外源 GS 预处理,观察肿瘤细胞对 CN 的粘附反应。GD₂ 是 LA-N5 细胞 GS 的主要成分,占 LBSA 的 60%。用 $1 \mu\text{M}$ GD₂ 预处理已清除 GS 的细胞 5 min,完全恢复该细胞对 CN 的粘附能力(图 5A)。细胞与 CN 反应 3 min,外源 GS 部分恢复被清除 GS 肿瘤细胞的粘附能力,反应 5 min 后,其粘附能力较对照组差异无显著性 : OD_{570} 分别为 0.17 ± 0.01 和 0.16 ± 0.01 ($P > 0.05$)。GM₃ 在 LA-N5 细胞含量很少 (小于 2% 总 LBSA),用 GM₃ 预处理经 PDMP 培养的 LA-N5 细胞 5 min,仅能部分恢复其粘附功能(为对照组的 72%), OD_{570} 分别为 0.19 ± 0.009 和 0.262 ± 0.015 ,高于未经 GM₃ 处理组 (OD_{570} 0.13 ± 0.006 , $P < 0.01$) (图 5B)。由于经 GM₃ 预处理的细胞不能完全恢复 LA-N5 细胞对 CN 的粘附表型, GD₂ 似乎对该细胞的粘附功能有一定特异性的作用。

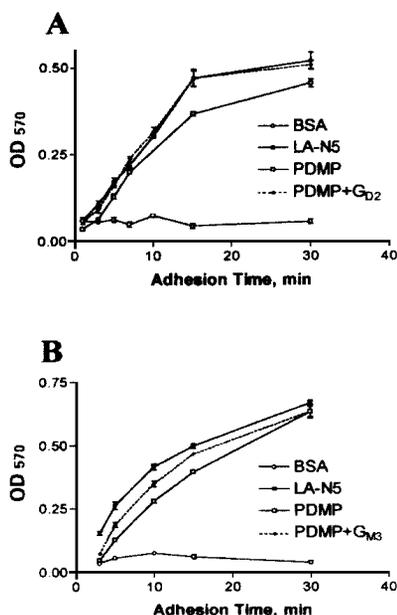


图5 外源性GS恢复PDMP培养细胞对CN的粘附功能

3 讨论

本研究我们假定高浓度的GS是体外培养的LA-N5细胞粘附于CN所必需的分子,清除膜GS可阻断该细胞对CN的粘附作用。我们的研究结果均支持上述假设。尽管暴露于D-PDMP 6 d后,细胞GS几乎完全清除,但细胞的生存力,增殖力及凋亡率较对照组无明显变化,但其粘附能力仅为对照组的1/3,用条件培养液(其中有细胞脱落的GS)和纯化的GD₂预处理无GS细胞可恢复该细胞的粘附表型。总之,我们的研究表明内生肿瘤GS可调节肿瘤细胞对CN的粘附作用,这些结果提示GS在肿瘤转移中可能起重要作用。

在动物实验中,已观察到GS对肿瘤的形成和转移起直接作用的证据,如将肿瘤GS和肿瘤细胞同时注入到裸鼠体内,肿瘤的形成和进展较仅注入肿瘤细胞组明显增加,分别为83%和8%^[7]。神经母细胞瘤是一种交感神经系统的侵袭性肿瘤,其特点之一是大量的GS从细胞表面脱落,一旦进入血液,肿瘤GS与脂蛋白结合(主要为LDL部分)在血液转运^[8]。为探讨脱落GS,主要是循环GD₂,与病人预后的关系,有研究者对74例晚期神经母细胞瘤(期和期)患儿的血清GS进行检测^[9],血清GD₂浓度与病情无进展生存率呈负相关。高浓度血清GD₂组平均病情无进展生存率明显低于低浓度GD₂组(分别为9个月和28个月);长期生存率(2年)也明显低于低浓度GD₂组。但GS加速这些肿瘤发展的潜在机制尚不清楚。

我们以前报道神经母细胞瘤细胞脱落的GS促进血小板的激活和聚集,GS促进肿瘤细胞与血小板的反应及肿瘤细胞栓塞的形成可能是GS加速肿瘤发展的机制之一^[1]。另一机制可能是GS直接作用于肿瘤细胞的粘附。GS影响细胞粘附于细胞外基质^[10],包括特异受到整合素介导的粘附^[11]。Barletta等证实清除细胞GS可降低细胞的粘附能力,这一作用是由于GS改变整合素 $\alpha_5\beta_1$ 受体。有趣的是,恢复细胞GS能恢复整合素的功能活性。以前我们证实肿瘤GS影响血小板整合素 $\alpha_2\beta_1$ 的功能和血小板与胶原的粘附反应,探索GS对神经母细胞瘤细胞整合素的影响的研究正在进行之中。

[参考文献]

- [1] Valentino LA, Ladisch S. Tumor gangliosides enhance alpha2 beta1 integrin - dependent platelet activation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1316(1): 19 - 28.
- [2] Li RX, Ladisch S. Shedding of human neuroblastoma gangliosides [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1083(1): 57 - 64.
- [3] Ladisch S, Gillard B. solvent partition method for microscale ganglioside purification [J]. *Anal Biochem*, 1985, 146(1): 220 - 231.
- [4] Ando S, Chang NC, Yu RK. High - performance thin - layer chromatography and densitometric determination of brain ganglioside compositions of several species [J]. *Anal Biochem*, 1978, 89(2): 437 - 450.
- [5] Tuszyński GP, Murphy A. Spectrophotometric quantitation of anchorage - dependent cell numbers using the biconchonic acid protein assay reagent [J]. *Anal Biochem*, 1990, 184(1): 189 - 191.
- [6] Li R, Ladisch S. Inhibition of endogenous ganglioside synthesis does not block neurite formation by retinoic acid - treated neuroblastoma cells [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(2): 1349 - 1354.
- [7] Ladisch S, Kitada S, Hays EF. Gangliosides shed by tumor cells enhance tumor formation in mice [J]. *J Clin Invest*, 1987, 79(6): 1879 - 1882.
- [8] Valentino LA, Ladisch S. Localization of shed human tumor gangliosides: association with serum lipoproteins [J]. *Cancer Res*, 1992, 52(4): 810 - 814.
- [9] Valentino LA, Moss T, Olson E, et al. Shed tumor gangliosides and progression of human neuroblastoma [J]. *Blood*, 1990, 75(7): 1564 - 1567.
- [10] Merzak A, Koochekpour S, Pilkington G. Adhesion of human glioma cell lines to fibronectin, laminin, vitronectin and collagen I is modulated by gangliosides in vitro [J]. *Cell Adhes Commun*, 1995, 3(1): 27 - 43.
- [11] Cheresh, D A, Harper, J R, Schulz, G, et al. Localization of the gangliosides GD₂ and GD₃ in adhesion plaques and on the surface of human melanoma cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984, 81(18): 5767 - 5771.

(本文编辑:曹励之 英文译文见本期455页)