

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

口腔腺樣囊性瘤細胞侵襲與轉移特性之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC89 - 2314 - B - 040 - 029 -

執行期間：89 年 08 月 01 日至 90 年 07 月 31 日

計畫主持人：周明勇

共同主持人：

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：中山醫學大學牙醫學系

中 華 民 國 90 年 09 月 15 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

國科會專題研究計畫成果報告撰寫格式說明

Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC 89-2314-B-040-029

執行期限：89年08月01日至90年07月31日

主持人：周明勇 中山醫學大學牙醫學系

計畫參與人員：楊世煌, 陳秀鈴 中山醫學大學口腔醫學研究所

一、中文摘要

腺樣囊性癌(Adenoid cystic carcinoma, ACC)多發於口腔額面部。腫瘤的局部侵入,復發及遠處轉移是影響治療效果及預後的主要問題。腫瘤的侵入及轉移乃十分複雜的過程,其機轉仍不甚明確。已知細胞轉移能力之增加與對基底膜之破壞在此一過程中扮演極重要的角色。據目前研究顯示,上皮細胞骨架成份 keratin 中的 K8、K18、K19 在某些腫瘤細胞中會有表現, K19 與腫瘤細胞的侵入有密切關係。用 K8、K18、K19 之基因轉植於口腔鱗狀細胞癌細胞,可致細胞侵入能力改變。細胞間質賴金屬蛋白酵素(matrix metalloproteinase, MMPs)及其組織抑制因子(tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMPs)間之失衡與失調亦是腫瘤侵入之重要因素 TIMPs 對 MMPs 之抑制作用可明顯改善腫瘤細胞的腫瘤侵入作用。

本計畫利用腺樣囊性瘤細胞株如 SACC-83、A2 及其所衍生之 SACC-LM、A2M 細胞株 SACC-LM 與 A2M 具高潛能肺轉移細胞株之特性。本計畫採細胞生物學、分子生物學等相關技術對 K19 之 mRNA 與蛋白質表現、體外侵入能力、外源性生長因子對細胞侵入能力之影響 MMPs 與 TIMPs 在 ACC 細胞侵入作用中所扮演之角色等等重要課題進行研究,以探討 K19 於 ACC 診斷及預後評估上應用之可行性,研究成果將有助於對此一疾病之認識及臨床診斷與治療。

關鍵詞：口腔腺樣囊性癌、侵入、轉移

Abstract

Adenoid cystic carcinoma (ACC) is one of the most frequent malignant tumor in oral and maxillofacial region. Invasion and metastasis are the primary causes of poor clinical outcome. Understanding how ACC invade and metastasize is therefore critical improving survival statistics. The precise mechanism of how the invasion and metastasis occur is still unknown. Recent studies have shown that altered keratin expression affects metastatic potential in many types of tumors. Dysregulated keratin expression has been correlated with increased invasiveness in some of cancer cell lines. K19 expression is down regulated in invasive oral squamous cells significant evidence has accumulated to directly implicate members of the gene family of matrix metalloproteinase (MMPs) in tumor invasion and metastasis formation. Expression of invasion and metastasis phenotype is probably caused by an imbalance and deregulation of matrix metalloproteinase (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs). Exogenous addition of TIMPs has been shown to successfully inhibit in vitro tumor invasion of extracellular matrix.

Keywords: oral cancer, invasion, Metastasis

二、緣由與目的

本計劃擬以來自口腔腺樣囊性癌 (adenoid cystic carcinoma, ACC) 之細胞株 SAA-83、A2 及篩選自此二細胞株並具有高度肺轉移潛能的細胞株 SACC-LM、A2M 進行腫瘤細胞侵入能力及轉移特性之研究。探討 (1) 與細胞侵入及轉移相關之 Keratin19 基因及蛋白於此四個細胞中之表現, (2) 此等因素對細胞體外侵入能力之影響, (3) 對與腫瘤轉移密切相關之細胞間質賴金屬蛋白酵素 (matrix metalloproteinase, MMPs) 及其組織抑制因子 (Tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMPs.) 於 ACC 細胞中之表現。我們擬以此研究揭示 ACC 轉移潛能之相關機轉。

腫瘤之局部侵入、復發及轉移乃影響腫瘤治療效果及預後之主要因素。腫瘤之侵入機轉目前仍不甚明確。於腫瘤轉移、侵入特性及機轉之研究仍是當前研究之重要領域。腫瘤侵入與轉移乃一複雜之過程。首先, 腫瘤細胞脫離瘤體進入血液循環, 當找到合適之微環境後即停留於該處。如能繼續增殖即完成侵入形成轉移病灶。於此複雜過程中, 多個基因參與調控此一程序如蛋白酵素, 蛋白酵素抑制物, 粘附因子等等。腫瘤之轉移完全為一種主動行為, 其包括瘤細胞和宿主二方面之因素。循環中之瘤細胞首先得穿越血管壁或/和淋巴管壁這道生理屏障。組成管壁主要成份之細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 乃阻止細胞相互交通之機械屏障, 唯腫瘤細胞對其之特殊親合力及破壞基底膜之能力乃造成侵入與轉移之最可能因素。

細胞轉移能力增加亦為轉移之重要一環, 細胞轉移與細胞骨架結構有關。最近的研究顯示 Keratin 對細胞轉移之調控與侵入有關。Keratin 為上皮來源細胞之骨架成份目前發現至少有二十餘種亞型, 分子量約 40-70 kDa。於細胞中 Keratin filament 自細胞核到細胞質排列成網狀, 其與細胞外基質 (ECM) 之信號傳遞有關。Keratin 表現的改變可能致產生異常訊息, 引起細胞表型之變化。對於 Keratin 架構以及基因突變所引起之人類疾病已有較多研究 (Fuchs, 1994), 各 Keratin 之亞

型於正常上皮細胞、腫瘤細胞及培養細胞之分化中依據其不同之分化功能而有不同的表現。於正常人類乳腺上皮細胞產生之 Keratin 產物包括單層上皮產生之 K7、複層上皮產生 K5 和 K14、異常增生上皮產生 K6 與 K17。Douglass 等 (1990) 對腫瘤細胞株之研究指出正常乳腺上皮細胞可產生 K5、K6、K7、K14 及 K17, 腫瘤細胞則產生 K8、K18 及 K19。K5 被視為腫瘤生成過程中之重要標誌用於區別正常細胞與腫瘤細胞。用 K8 及 K18 之基因轉植於口腔鱗狀細胞癌細胞後可提高細胞之遷移與侵入能力 (Chu, 1993)。K19 富含於口腔複層鱗狀上皮之基底層, 唯具侵入性狀之鱗狀上皮癌 K19 的表現較低。低蛋白含量的程度與細胞侵入能力相關, 這種能力可以被外源性生長因子增強。將 K19 之基因轉植到口腔鱗狀細胞癌之癌細胞可以改變細胞的形態及細胞間的粘附性減低細胞穿越基底膜的能力 (Crowe, 1999)。此可能與改變胞橋小體 (desmosome) 與細胞間粘附性有關。胞橋小體之粘附性亦與侵入形態有關。Keratin filament 為胞橋小體之基本結構成份 (Koaalis, Stappeler, 1994), keratin 降低所引起之胞橋小體附著異常可能致細胞間粘附性喪失、增加細胞間之轉移。細胞骨架與細胞外基質 (ECM) 如何調控細胞之轉移仍為有待探討之課題。進一步研究顯示 K19 蛋白質低含量現象與 K19 mRNA 之不完全表現有關, 3' 末端的缺失可引起 K19 蛋白之表現降低 (Yutaka, 1999)。

K19 被認為乃上皮腫瘤最合適之標誌物而用於診斷乳腺及前列腺腫瘤轉移 (Moill 1982; Bartek 1985; Datta 1994)。惡性之表現非單一基因或蛋白質引起。相反的, 其乃正常生理條件下多個基因參與之刺激與抑制、失衡失調的結果。在侵入的過程中, 腫瘤細胞對生理屏障-基底膜之破壞也是非常重要的步驟。細胞間質賴金屬蛋白酵素家族成員 (MMPs) 在腫瘤侵入與轉移作用中具扮演極重要之角色。其中第 1V 型膠原蛋白酵素 (type IV collagenase), MMP-2 及 MMP-9 係以其具有能夠降解螺旋結構的 IV 型膠原能力而命名, 此二個膠原蛋白酵素分別由不同的基因轉錄, 分別與特定的賴金屬蛋白

酵素組織抑制因子 TIMP-1 及 TIMP-2 結合。TIMPs 是否還與其它蛋白酵素結合尚不清楚，唯其一旦激活即可抑制所有的賴金屬蛋白酵素。MMPs 蛋白於乳癌、腸癌、卵巢癌、胃癌與腺性等組織中皆呈陽性表現(Monteagud 1990; Lery 1991; Yang 1997)。正常組織 MMPs 蛋白之低表現或不表現乃肇因 TIMPs 之抑制作用，TIMPs 之片段與多鏈皆可抑制 MMPs 活性致改變腫瘤細胞之侵入表現。由於 TIMPs 對 MMPs 之抑制作用可明顯改善細胞之侵入表現，臨床上已嘗試應用 TIMPs 作為治療腫瘤之工具(Elise 1995)。

許多研究顯示某些人體腫瘤之轉移特性至少與細胞的二種變化有非常密切的關係(1)細胞骨架結構變化致細胞轉移能力增加，(2)MMPs 與 TIMPs 間之失衡與失調致細胞侵入能力提高。於口腔鱗狀細胞癌與腫瘤(鱗狀細胞癌和腺癌)中，在惡性細胞中可產生 K8、K18 及 K19。但在具有侵入特性之細胞中 K19 蛋白表現降低，而 K19 蛋白質之表現程度與 K19 mRNA 的不完全表現有關。Keratin 調控異常所引起之侵入表現只是機轉的一部分，其不能完全改變細胞之侵入特性，細胞外基質之改變為另一重要因素。此主要與 MMPs(MMP-1、MMP-2、MMP-3 及 MMP-9)與 TIMPs(TIM-1 及 TIMP-2)間之調控具密切相關。此一侵入模式是否亦適用於腺樣囊性癌 ACC 細胞株 SACC-83 A2 以及自此二個細胞株篩選出來之高轉移細胞株 SACC-LM、AM?是否可為我們探討 ACC 轉移機轉提供理想的模式?ACC 之臨床病程甚為特殊其雖易局部侵入、復發，唯卻又可帶瘤生存多年，其侵入與轉移機制是否與其它器官腫瘤相同皆為本計畫擬探討之課題。

ACC 細胞株 SACC-83 A2 具低度肺轉移率約為 20%左右(BALB/C 裸小鼠靜脈注射)。SACC-LM、AM 為上述二細胞株經裸鼠尾靜脈注射形成之肺轉移病灶、經體外細胞培養後再回注到裸鼠體內經數次篩選所建立之細胞株肺轉移率約為 75-90%。對此二細胞之初步研究顯示其具高度肺轉移能力、血小板粘附能力及其第 IV 型膠原蛋白與第 1V 型膠原蛋白酵素的表現都有增加。

然亦發現 ACC 細胞之體內局部侵入能力與局部組織之微環境有非常密切的關係(楊海東, 1998)。為了對 ACC 轉移及侵入特性進行深入了解，本計畫擬採用細胞生物學方法、分子生物學等相關技術，自 K19 的表現 ACC 體外侵入能力及外源性生長因子對細胞體外侵入能力之影響 MMPs 與 TIMPs 於 ACC 侵入特性中之作用等方面進行探討。研究結果可望對 ACC 此一較特殊之口腔常見腫瘤特性能有更深入之了解，探討 K19 於 ACC 診斷、預後評估中應用之可能性。據此研究結果可繼續深入進行臨床之回顧性研究及病人之追蹤觀察，將對臨床診斷、治療提供有意義的幫助。