

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

口腔鱗狀細胞癌與口腔纖維母細胞分泌之轉移刺激因子探討

Study on the migration stimulating factor produced by oral squamous carcinous cells and oral fibroblasts on invasion in collagen gel

計畫編號：NSC 88-2314-B-040-036

執行期間：87 年 08 月 01 日至 88 年 07 月 31 日

主持人：周 明勇 私立中山醫學院 牙醫學系

一、中文摘要

腫瘤細胞可降解細胞外間質(extracellular matrix, ECM)成分以侵入其週遭組織。已知不正常的腫瘤細胞可分泌不同的 ECM 降解酵素包括賴金屬蛋白質酵素(matrix metalloproteinase, MMP)、serine 分解酵素及 cathepsins。精確控制此等 MMP 之表現為許多正常過程所需。於 MMP 家族中膠原蛋白酵素 A (gelatinase A)的調節方式與其他成分不同，因此建議其於細胞與間質間之相互作用中可能扮演獨特的角色，包括細胞侵入。為了探討於口腔癌細胞中 MMP2 對細胞附著性所扮演之角色，我們測定了細胞分泌於培養液中之 MMP-2 活性。結果顯示於 72 kDa 之膠原蛋白酵素原及 64kDa 活化型酵素活性可能為細胞癌化及附著能力之因子。

關鍵詞：口腔癌、附著性、細胞間質賴金屬蛋白質酵素-2

Abstrate

Tumor cells degrade extracellular matrix (ECM) components to invade surrounding tissue. Malignant tumor cells are known to produce various ECM-degrading enzymes including matrix metalloproteinases (MMPs), also called matrixins, serine proteinases and cathepsins. These Zn²⁺ and Ca²⁺-dependent MMPs precise regulation of their expression is crucial in many normal processes. One member of the matrixin family, gelatinase A, is regulated differently from other MMPs, suggesting that it may play a unique role in cell-matrix interactions, including cell invasion. To study the role of MMP2 in adhesion of human oral cacinoma, we examined MMP

-2 activity in medium. The data suggest that the enzyme activity of 72 kDa progelatinase A and active 64 kDa species may be a key event in the processing of cacinoma and acquisition of adhesion potential.

Keyword: Oral cancer, Adhesion, Matrix metalloproteinase-2, MMP-2

二、緣由與目的

腫瘤細胞可降解細胞外間質(extracellular matrix, ECM)成分以侵入其週遭組織。已知不正常的腫瘤細胞可分泌不同的 ECM 降解酵素包括賴金屬蛋白質酵素(matrix metalloproteinase, MMP)、serine 分解酵素及 cathepsins。精確控制此等 MMP 之表現為許多正常過程所需。癌細胞之轉移分佈一直為癌症治療的最大障礙。癌細胞附著於特定之細胞間質(extracellular matrix, ECM)巨大分子為轉移作用之啟始步驟(1)。已知許多種類的細胞間質降解酵素於細胞侵入及轉移作用中扮演極重要角色。其中，賴金屬蛋白質酵素(matrix metalloproteinases, MMPs)為許多研究之焦點所在(2)。於 MMP 家族中膠原蛋白酵素 A (gelatinase A)的調節方式與其他成分不同，因此建議其於細胞-間質間之相互作用中可能扮演獨特的角色，包括細胞侵入(3)。72 kDa gelatinase(MMP2)是以不活化之酵素原(zymogen)形式分泌且於其後與細胞附著及轉移有關之致活作用中去除氨基端(NH₂-terminus)。MMP2 以 64 kDa 活化形式表現為細胞侵入之外在特徵(4)。本研究之目的乃在探討口腔癌細胞中 MMP-2 對細胞附著性所扮演之角色。

三、材料與方法

細胞培養：細胞以 10%CDMEM 單層培養(monolayer cell culture)至七分滿時更換培養液為 2%CDMEM，於培養 48 小時後收集培養液離心後收存於-80 待分析用。或細胞以 10%CDMEM 單層培養(monolayer cell culture)至七分滿時經拆解後置於含膠原蛋白凝膠(collagen gel)之 96 孔培養盤於 2%CDMEM，37 下培養一小時，收集培養液離心後收存於-80 待分析用。

含受質電泳：樣品以含 0.1%的 7.0% SDS-PAGE 電泳分析如 Monique LF(1996) (5)所述。簡述如下，電泳凝膠片以 2.5% TritonX-100 浸潤數次以去除電泳凝膠中之 SDS，其後電泳凝膠置含 50 mM Tris-HCl pH 7.5，5 mM CaCl₂ 及 0.02% NaN₃ 之緩衝溶液中於 37 下培養 24 小時 電泳凝膠經 0.5% Coomassie blue R250 染色，含膠原蛋白酵素之區域於身藍色背景中呈現透明帶。各透明帶之酵素活性分析則以數位相機攝取電泳凝膠之影像後以 NIH image 1.56 半自動影像分析軟體分析各透明帶之吸光值(6,-9)。

細胞附著試驗：製備膠原蛋白凝膠(collagen gel)於 96 孔培養盤,添加 1% BSA 後於 37 培養 4 小時以阻斷非特異性結合。置 2*10⁴ 細胞於此等培養盤中，分別添加不同濃度之 EDTA 及 APMA(amino-phenylmercuric acetate)作用一小時，去除未附著之細胞後以 70%酒精固定 15 分鐘，0.1%結晶紫(crystal violet)染色。將染劑溶解(0.5 M dimethyl formamide/ 20% SDS)後於波長 550 nm 測定吸光值。

四、結果與討論

以 SDS-PAGE 電泳分析細胞培養液顯示正常牙齦纖維母細胞(gingival fibroblast, GF)於 64 kDa 之蛋白質含量顯著高於口腔癌細胞(oral cancer, OC)。反之，於 72 kDa 之蛋白質含量則小於 OC 細胞(圖 1 左)。以含受質電泳法(zymography)分析發現 OC 細胞分泌於培養液中分子量 72 kDa 與 64 kDa 之酵素活性遠大於正常之 GF 細胞(圖 1 右)。於含受質電泳法分析中添加

mM EDTA 則此二酵素之活性完全受抑制(圖 2)，據此推測其可能為細胞外間質賴金屬酵素(matrix metalloproteinase, MMP)之一種。於含受質電泳法分析中以市售純化之 MMP 2 酵素為對照組(無圖示) (Oncogene Science Inc., Cambridge, MA)，結果顯示分子量 72 kDa 之酵素應為 MMP 2 之隱性前驅酵素原(latent form)，分子量 64 kDa 則為 72 kDa 之活化型(active form)。GF 之 64 kDa 之蛋白質含量高於 OC，然而其酵素活性卻低於 OC 之結果顯示 GF 於此酵素之單位活性顯著小於 OC。無論是 GF 或 OC 其大致含有相同種類，數目及型式之蛋白質，於 64 kDa 酵素個別活性上之表現或活化型(64 kDa)與隱性前驅酵素原(72 kDa)間之酵素活性比值可能為細胞癌化關鍵之處。

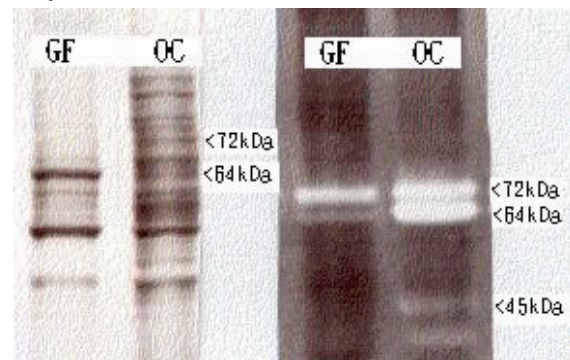


圖 1. 細胞培養液以 12.5% SDS-PAGE 電泳分析(左圖)及以含受質電泳(Zymography, 0.1% gelatin /7.5 % SDS-PAGE)分析(右圖)之結果。細胞培養液於收集後以 1,000 rpm 離心後收存於-80 備用。樣品之蛋白質含量以 Bradford 法定量。電泳結果顯示 GF 細胞於分子量為 64 kDa 之蛋白質含量高於 OC 細胞。反之，OC 細胞則於分子量為 72 kDa 之蛋白質含量高於 GF 細胞。以含受質電泳分析顯示 OC 細胞不論於 72 kDa 或 64 kDa 之蛋白質酵素活性皆顯著高於 GF 細胞。

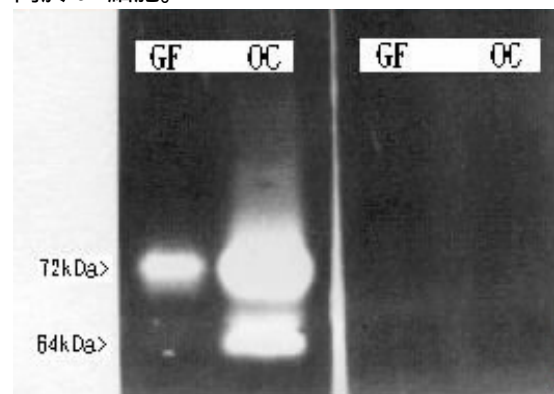


圖 2. 細胞培養液以含受質電泳(Zymography, 0.1 %

gelatin /7.5 % SDS-PAGE)分析。同一樣品重複 loading 於同一電泳膠片兩側，其一於 37 酵素作用 24 小時之緩衝液中添加 1 mM EDTA(右圖)，另一則不添加 EDTA(左圖)。其結果顯示不論分子量為 72 kDa 或 64 kDa 之酵素活性皆受到完全抑制，推測此二酵素可能為細胞外間質中賴金屬蛋白酶 (matrix metallo-proteinase, MMP)之一種。經以市售純化之 MMP 2 酵素為對照(無圖示) (Onco gene Science Inc., Cambridge, MA)，結果顯示分子量為 72 kDa 之酵素應為 MMP 2 的隱性前驅酵素原(latent form)。

於 OC 細胞附著性分析顯示,添加 APMA 0.01 mM 時細胞附著性顯著增加,其後伴隨 APMA 濃度增加而漸次減低其細胞附著性(圖 3)。APMA 添加至 1mM 時則呈細胞附著性顯著降低之結果。膠原蛋白酶之活性可藉由 APMA 之處理而予以致活。以含受質電泳法分析,結果顯示添加 0.01 mM APMA 者其培養液中之分子量 64kDa 之酵素活性最高,其後漸次恢復至對照組之活性程度(圖 4)。於先期實驗之結果顯示添加 10 mM 以上之 APMA 可致細胞成片狀剝離培養盤、終致細胞死亡。因較高劑量之 APMA 可能傷害細胞甚至導致細胞死亡。故此,以含受質電泳法分析其 MMP-2 活性未見增加且細胞附著性於較高 APMA 劑量亦未見增加之預期結果。由本實驗之結果顯示 64 kDa 之 MMP-2 酵素活性可能於細胞附著性上扮演一極重要之角色。

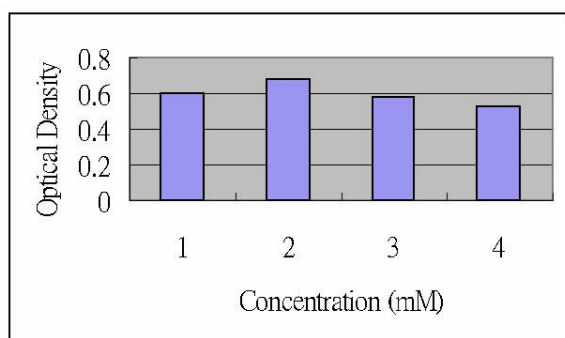


圖 3. APMA 對細胞附著性分析之結果。將口腔癌細胞種植於膠原蛋白凝膠(collagen gel)時分別於培養液中添加不同濃度之 APMA (1:0 mM, 2:0.01mM, 3:0.1mM, 4:1mM), 細胞於 37 培養 1 小時後經清洗、固定及 0.1%結晶紫染色, 於波長 550nm 判讀吸光值。結果顯示於 0.01mM 時細胞附著性顯著增加, 其後伴隨 APMA 濃度增加而漸次減低其細胞附著性。APMA 添加至 1mM 時則呈顯著降低之結果。

五、成果自評

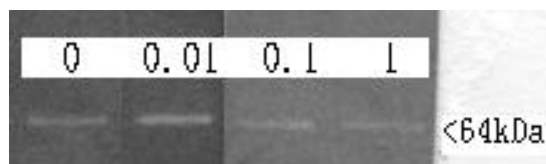


圖 4. APMA 對 MMP-2 活性分析之結果。細胞培養液以含受質電泳(Zymography, 0.1 % gelatin /7.5 % SDS-PAGE)分析。結果顯示低劑量(0.01 mM)之 APMA 可致活細胞培養液之 MMP-2 酵素活性, 較高劑量者未見此一結果。推測較高劑量之 APMA 可能傷害細胞甚至導致細胞死亡。故此, 以含受質電泳法分析其 MMP-2 活性未見增加之預期結果。

本實驗之設計、方法與原計劃略有差異此乃肇因於我們在先期實驗中不期的發現, OSF 與口腔癌細胞於 64 kDa 之酵素活性遠大於正常牙齦纖維母細胞, 所以我們對於實驗之方向做了修正, 擬探討 MMP- 2 於細胞癌化及細胞附著之作用。本實驗之結果已達我們初步預定之目標, 唯 MMP 對細胞癌化之作用機轉仍有待進一步釐清、另者於 TIMP 方面亦待進一步探討。對此我們亦將持續進一步探討以使成果更臻完備。

六、參考文獻

1. Chamber AF and Matrisian LM. Changing view of the role of matrix metalloproteinase in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997. 89:1260-1270.
2. DeClerck YA and Laug WE. Cooperation between matrix metalloproteinases and the plasminogen activator-plasmin system in tumor progression. *Enzyme Protein*. 1996.49:72-84.
3. Yu AE, Hewitt RE, Kleiner DE and Stetler-Stevenson WG. Molecular regulation of cellular invasion – role of gelatinase A and TIMP-2. *Biochem Cell Biol*.1996.74:823-831
4. Brooks PC, Stromblad, Sanders LC, von Schalscha TL, Alines RT and Stetler-Stevenson WG. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with intergrin β .1996.*Cell* 85:683-693
5. Monique LF, Johnnie LU, Daniel AR and Zena W. Basement membrane and repair of

- injury to peripheral nerve: defining a potential role for macrophages, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1. 1996. *J Exp Med* 184:2311-2326.
6. Jason PM and Allen JB. Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. 1998. *J Clin Invest* 101:1596-1603.
 7. Pin MY et al. Expression of matrix metalloproteinase gelatinases A and B by cultured epithelial cells from human bronchial explants. 1996. *J Biol Chem* 271:15580-15589.
 8. Jouko L, Jorma KO. Calcium ionophores decrease pericellular gelatinolytic activity via inhibition of 92 kDa gelatinase expression and decrease of 72 kDa gelatinase activation. 1995. *JBC* 270:17602-17609.
 9. Juan CI, David K, Ralph BLG, Marc N, Paul C and Linda CG. Human endometrial matrix metalloproteinase-2, a putative menstrual proteinase. 1996. *J Clin Invest* 97:438-447.