

# 紫杉醇对 MDA-MB-435 人乳腺癌高转移细胞 粘附、侵袭及迁移能力的影响

周龙恩<sup>1</sup>, 刘红岩<sup>1</sup>, 徐少锋<sup>1</sup>, 付招娣<sup>1</sup>, Kurt S ZAENKER<sup>2</sup>, 韩锐<sup>1,3</sup>

(1. 中国医学科学院 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050; 2. *Institute of Immunology, University Witten/Herdecke, 58448 Witten, Germany*)

**摘要** 观察紫杉醇对人乳腺癌高转移细胞粘附、侵袭和迁移能力的影响。采用重组基底膜侵袭模型, 三维空间胶原小室培养, 时间推移摄像和计算机辅助细胞跟踪系统研究紫杉醇对 MDA-MB-435 人乳腺癌高转移细胞粘附、侵袭和迁移能力的影响。紫杉醇在 0.01 ~ 0.1 mg·L<sup>-1</sup> 范围内可明显抑制 MDA-MB-435 细胞与纤维粘连蛋白或层粘连蛋白的粘附, 抑制率分别为 9.9% ~ 51.2% 和 35.0% ~ 49.8%。紫杉醇 0.01 和 0.03 mg·L<sup>-1</sup> 对 MDA-MB-435 细胞侵袭重组基底膜抑制率为 66.7% 和 74.4%。0.02 和 0.1 mg·L<sup>-1</sup> 时可明显抑制 MDA-MB-435 细胞在三维胶原中的迁移。结果表明紫杉醇具有较强的抑制 MDA-MB-435 细胞粘附、侵袭和迁移的作用, 提示其在控制肿瘤转移方面可能具有应用前景。

**关键词** 紫杉醇; 时间推移摄像; 乳腺肿瘤; 粘附; 肿瘤; 侵袭; 迁移

中图分类号 R979.1

文献标识码 A

文章编号 1000-300X(2001)01-0051-05

侵袭行为是恶性肿瘤的关键特征, 是导致肿瘤转移的内因。大量的临床证据表明, 乳腺癌细胞一旦离开原发部位, 临床治愈率将大大下降, 5 年存活率由淋巴结阴性患者的 70% ~ 75% 降至淋巴结阳性患者的 25% ~ 30%<sup>[1]</sup>, 因此阻止癌细胞的侵袭和转移无疑是乳腺癌及其他恶性肿瘤治疗成败的关键因素。紫杉醇 (taxol) 是从红豆杉树皮中提取的一种二萜类化合物, 其独特的化学结构和作用机理, 以及对多种肿瘤, 尤其对转移性乳腺癌和晚期卵巢癌

有突出疗效, 目前已成为临床常用的一线肿瘤化疗药物之一<sup>[2,3]</sup>。国际上有关紫杉醇与其他化疗药或辅助药联用治疗转移性乳腺癌的临床研究方兴未艾<sup>[4]</sup>, 但对肿瘤细胞侵袭、迁移能力的影响报道相对较少, 因此研究紫杉醇对高转移性人乳腺癌细胞的粘附、侵袭和迁移能力的影响将有助于其临床进一步应用。

## 1 材料和方法

### 1.1 药品、试剂及仪器

紫杉醇由本所植化室方起程教授提供, 纯度为 99% 以上。Matrigel 购自美国 Collaborative Research 公司; 纤连蛋白 (fibronectin) 购自美国 Promega 公司; 层粘连蛋白 (laminin) 购自北京大学医学部细胞室; 优凯特 (eukitt) 胶为日本高桥技研硝子株式会社产品; 牛皮肤胶原 Vitrogen 100 (99.9% 胶原纤维由 95% ~ 98% I 型胶原 2% ~ 5% III 型胶原组成) 为 COHESSION 公司产品; MEM 培养基 (minimal essential medium) 为 Gibco 产品; 噻唑蓝 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT], 胰岛素 (insulin) 和 RPMI 1640 购自 Gibco BRL 公司; 胎牛血清 (fetal calf serum, FCS) 购自杭州四季青生物工程材料有限公司。

Transwell 小室为美国 Costar 公司产品; Polycarbonate 滤膜 (直径 13 mm, 孔径 12 μm) 为美国 Poretics 公司产品; 细胞迁移记录仪及其相关软件由德国 Witten 大学免疫研究所 Zaenker 教授惠赠。

### 1.2 细胞培养

人乳腺癌高转移细胞株 MDA-MB-435 由美国 Ligand Pharmaceuticals 公司 Mais 博士惠赠。MDA-MB-435 细胞在 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 条件下, 培养于含 10% FCS, 10 mg·L<sup>-1</sup> 胰岛素, 100 kU·L<sup>-1</sup> 青霉素, 100 mg·L<sup>-1</sup> 链霉素的 RPMI 1640 中, 每周传代 2 次。

收稿日期 2000-03-02 接受日期 2000-11-20

作者简介 周龙恩 (1966 - ), 男, 安徽省无为县人, 博士, 主要从事肿瘤药理学研究。

3. 联系人

### 1.3 细胞粘附实验<sup>[5]</sup>

将 2.0 μg 纤粘连蛋白和层粘连蛋白分别铺于 96 孔培养板中,室温干燥后,用含 2% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 的 RPMI 1640 培养液 37℃ 封闭 1 h,磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次. 每孔加入 5 × 10<sup>4</sup> 细胞 37℃ 培养 1.5 h 后,用 PBS 洗去未粘附细胞. 弃去残余 PBS,每孔加入 100 μL 0.4 g·L<sup>-1</sup> 的 MTT,于细胞培养箱中继续培养 4 h,弃去上清,加入 200 μL 二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO),于 BIO-RAD 550 酶标仪上测定 A<sub>540 nm</sub> 值. 细胞粘附率以粘附细胞与总细胞 A<sub>540 nm</sub> 的比值来表示.

### 1.4 细胞侵袭试验<sup>[5]</sup>

将 Polycarbonate 滤膜用指甲油贴于 transwell 小室上,于滤膜上面涂 500 mg·L<sup>-1</sup> 纤维粘连蛋白 10 μL,于滤膜下面涂 500 mg·L<sup>-1</sup> matrigel 10 μL,风干后备用. 取对数生长期的 MDA-MB-435 细胞用 0.025% EDTA/PBS 消化并重悬于含 0.1% BSA 的 RPMI 1640 培养基中,调细胞浓度为 2.5 × 10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup> 加 100 μL 细胞悬液于 transwell 小室,37℃ 温育 24 h. 取出 transwell 小室,甲醇固定后,用棉签擦去未侵袭的滤膜表面细胞,HE 染色,用优凯特胶封片,在 400 倍光学显微镜下随机选择 5 个视野,计数每个视野细胞数目,以侵袭细胞的相对数目来表示肿瘤细胞的侵袭能力.

### 1.5 细胞迁移实验

制备三维空间的胶原小室<sup>[6]</sup> 取对数生长期的 MDA-MB-435 细胞用 2 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA/PBS 消化,重悬于含 5% FCS 的 RPMI 1640 培养液中,调细胞浓度为每升 4 × 10<sup>9</sup>. 取 50 μL 细胞悬液加入含 187.5 μL 胶原溶液 (1.67 g·mL<sup>-1</sup>) 和 25 μL MEM (10 ×) 培养基的混合液中,并加入药物或相应的溶媒 (DMSO < 0.05%) 混匀,调 pH 至 7.4. 将此混悬液加入自制的玻璃小室,置于 37℃ 细胞培养温育 30 min. 用融化至 55℃ 左右的石蜡凡士林混合液 (1:1) 密闭玻璃小室,即可.

细胞迁移记录<sup>[7,8]</sup> 选择合适视野,以 320 倍真实时间记录 12 h 细胞迁移. 每次实验随机选择 30 个细胞,应用 Niggemann 博士设计的计算机辅助细胞跟踪系统分析细胞迁移速率和细胞迁移百分率并绘制细胞迁移轨迹.

### 1.6 紫杉醇作用 24 h 对细胞生长的影响

取对数生长期细胞,用 0.25% 胰酶-0.025% EDTA 消化,调细胞浓度为每升 8 × 10<sup>7</sup>,按每孔 100

μL 细胞悬液接种于 96 孔板,37℃ 培养 24 h 后,加不同浓度的药物或等体积溶媒,继续培养 24 h,弃上清,每孔加入 100 μL 0.4 g·L<sup>-1</sup> MTT 于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 温箱中温育 4 h,加 200 μL DMSO,在 BIO-RAD 550 型酶标记仪测定 A<sub>540 nm</sub> 值,计算细胞存活率.

### 1.7 统计学处理

结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异采用 Student *t* 检验.

## 2 结果

### 2.1 紫杉醇对 MDA-MB-435 细胞粘附能力的影响

0.01, 0.03 及 0.1 mg·L<sup>-1</sup> 紫杉醇与 MDA-MB-435 细胞作用 1.5 h,对基质成分纤维粘连蛋白粘蛋白粘附能力分别降低 9.9%, 25.1% 和 51.2%; 对层粘连蛋白粘附能力分别降低 35.0%, 44.8% 和 49.8% (图 1). 显示其抑制细胞粘附作用呈明显的剂量依赖关系.

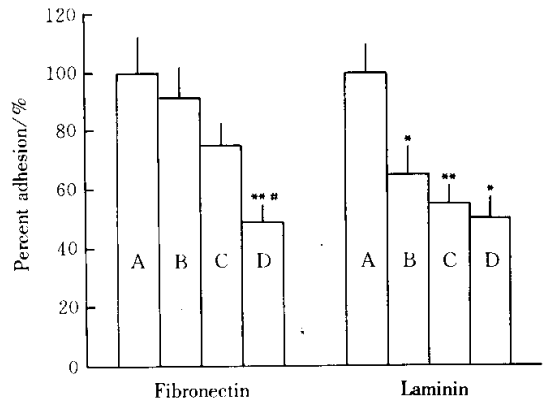


Fig 1. Effect of taxol on the adhesive capability of MDA-MB-435 cells. The cells were resuspended in RPMI 1640 medium containing 0.1% BSA and plated into micro-well precoated with fibronectin or laminin. The relative number of adhesive cells were evaluated by A<sub>540 nm</sub> using MTT method. (A) control, (B, C, D) 0.01, 0.03 and 0.1 mg·L<sup>-1</sup> taxol, respectively.  $\bar{x} \pm s$ , *n* = 3. \* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01, compared with A; # *P* < 0.05, compared with C group.

### 2.2 紫杉醇对 MDA-MB-435 细胞侵袭能力的影响

0.01 和 0.03 mg·L<sup>-1</sup> 紫杉醇与 MDA-MB-435 细胞

胞作用 24 h,对 MDA-MB-435 细胞侵袭重组基底膜能力有明显的抑制作用,抑制率分别为 66.7% 和 74.4% ,与对照组相比均具有显著性差别(表 1)。

**Tab 1. Effect of taxol on invasive capacity of MDA-MB-435 cells**

Taxol/mg·L <sup>-1</sup>	No. of invaded cells	Inhibition rate/%
Control	270 ± 6	
0.01	90 ± 23**	66.7
0.03	69 ± 7**	74.4

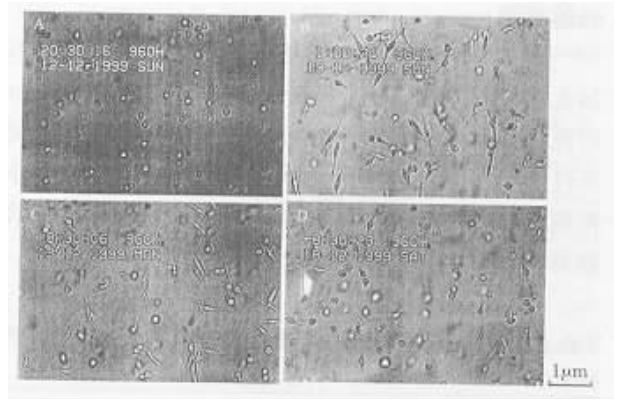
The invasive capacity of the cells was evaluated in transwell chambers. Briefly, polycarbonate filters( 12 μm pore size ) were coated with 5 μg matrigel on the upper side and 5 μg fibronectin on the other side. MDA-MB-435 cells were collected and resuspended in serum-free PRMI 1640 medium containing 0.1% BSA. 2.5 × 10<sup>5</sup> viable cell( 100 μL) were seeded in each chamber and incubated in a CO<sub>2</sub> incubator at 37°C for 24 h.  $\bar{x} \pm s, n = 3. ** P < 0.01$ , compared with control.

**2.3 紫杉醇对 MDA-MB-435 细胞形态的影响**

MDA-MB-435 细胞在三维胶原中呈两种形态:一种为静止不动的圆形细胞,另一种为长梭形伸出伪足的迁移细胞. 对照组细胞开始记录时在三维胶原中呈圆形,12 h 后大部分细胞极化呈长梭形;而 0.02 及 0.1 mg·L<sup>-1</sup>紫杉醇作用 12 h 后,圆形细胞比例明显增多,长梭形细胞比例明显减少(图 2)。

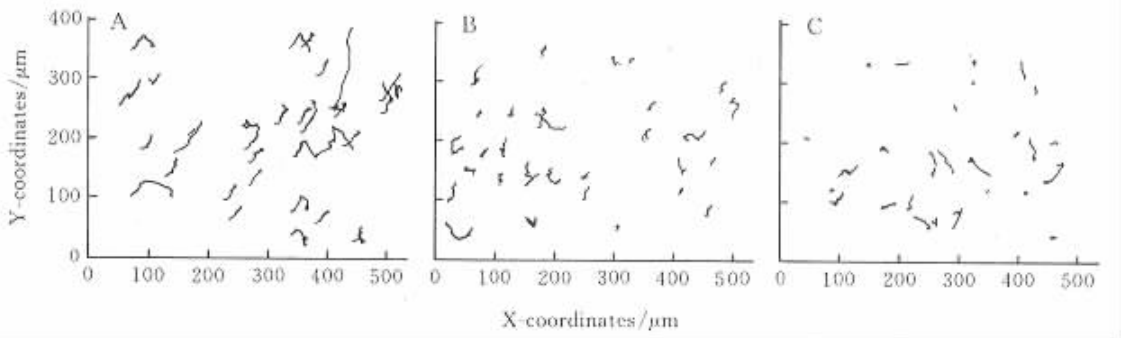
**2.4 紫杉醇对 MDA-MB-435 细胞迁移能力的影响**

对照组 0.02 及 0.1 mg·L<sup>-1</sup>紫杉醇组细胞迁移速率分别为(0.391 ± 0.10)(0.380 ± 0.16)(0.352 ±



**Fig 2. Morphological changes of MDA-MB-435 cells in 3-dimensional collagen lattices after exposure to taxol under phase contrast microscope.** A :untreated cells (initial); B :untreated cells( 12 h later); C and D : cells treated with taxol 0.02 , 0.1 mg·L<sup>-1</sup> for 12 h , respectively.

0.15) μm·min<sup>-1</sup>, 给药后迁移速率虽有所下降,但各组间均无显著性差别(3 次重复实验). 对照组 0.02 及 0.1 mg·L<sup>-1</sup>紫杉醇组细胞的迁移百分率分别为(39 ± 17)% (21 ± 12)% (19 ± 11)%. 表明紫杉醇 0.02 和 0.1 mg·L<sup>-1</sup>明显降低 MDA-MB-435 细胞迁移百分率. 细胞迁移轨迹结果表明,对照组细胞迁移较持续,且迁移距离远,迁移范围大. 而紫杉醇两剂量组细胞迁移持续性较差,且迁移范围小,紫杉醇 0.1 mg·L<sup>-1</sup>组部分细胞仅在原位“晃动”(图 3). 表明紫杉醇可明显抑制 MDA-MB-435 细胞的迁移。



**Fig 3. Effect of taxol on the pathway of migrating MDA-MB-435 cells in three dimensional collagen lattices.** A : untreated cells; B and C : treated with taxol 0.02 and 0.1 mg·L<sup>-1</sup> for 12 h , respectively.

### 2.5 紫杉醇 MDA-MB-435 细胞作用 24 h 对细胞生长的影响

表 2 结果表明紫杉醇与 MDA-MB-435 细胞作用 24 h, 0.01, 0.03 和 0.1 mg·L<sup>-1</sup>组活细胞数分别为对照组的 99.7%, 85.9% 和 84.2%。表明在该浓度条件下紫杉醇对该细胞无明显的毒性作用, 其体外抑制 MDA-MB-435 细胞粘附, 侵袭和迁移能力与细胞毒作用可能无直接关系。

Tab 2. Effect of taxol on viability of MDA-MB-435 cells

Taxol/mg·L <sup>-1</sup>	A <sub>540 nm</sub>	Cell viability/%
Control	0.983 ± 0.084	100
0.01	0.980 ± 0.047	99.7
0.03	0.844 ± 0.045	85.9
0.10	0.827 ± 0.041	84.2

Cell viability was determined by MTT method. Briefly, 100 μL cells (8 × 10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup>) well seeded in each well of 96 well microplate, after incubated in a CO<sub>2</sub> incubator at 37°C for 24 h, the cells were treated with various concentration of taxol for 24 h, then the medium was replaced with 100 μL MTT(0.4 g·L<sup>-1</sup>) for 4 h. After that, 200 μL DMSO was added and A<sub>540 nm</sub> values were measured.  $\bar{x} \pm s, n = 4$ .

### 3 讨论

侵袭行为是恶性肿瘤的关键特征之一, 是导致肿瘤转移的内在因素。如何穿越生物学屏障是肿瘤细胞侵袭和转移动态过程的关键步骤。在此过程中, 癌细胞与基底膜或细胞外基质粘附, 然后释放和激活多种蛋白水解酶降解基底膜和细胞外基质, 在趋化剂、自分泌以及旁分泌生长因子等作用下作定向迁移到达靶组织, 克隆增殖从而形成转移灶<sup>[9]</sup>。阻断肿瘤细胞粘附, 侵袭和迁移过程的各环节均有可能抑制肿瘤的转移。

肿瘤细胞通过膜表面受体粘附于基底膜或细胞外基质。本文的研究结果表明, 在浓度为 0.01 ~ 0.1 mg·L<sup>-1</sup>时, 紫杉醇作用 1.5 h, 即可明显抑制人乳腺癌高转移株 MDA-MB-435 细胞与细胞外基质成分纤维粘连蛋白或层粘连蛋白的粘附, 并呈一定的剂量效应关系。基底膜是癌细胞侵袭, 迁移的天然屏障, IV 型胶原是其主要成分。紫杉醇 0.01 和 0.03 mg·L<sup>-1</sup>作用 24 h, 对 MDA-MB-435 细胞的侵袭人工基底膜有较强的抑制作用。至于这一作用是否与抑制 IV

型胶原酶活性有关, 还有待进一步实验的证明。

有文献报道, 体外肿瘤细胞的迁移能力与其体内的侵袭能力或肿瘤的恶性程度呈正比<sup>[10]</sup>。在二维空间的体外模型中, 研究细胞迁移往往不能真实地反映其在体内的迁移过程。如未刺激的淋巴细胞在二维空间包被的表层中不做迁移, 而在三维空间的基质中发现有一定数量未刺激淋巴细胞做自发迁移<sup>[7, 11]</sup>。本文采用三维空间的胶原小室, 应用时间推移录像及细胞迁移计算机辅助跟踪系统, 可较真实地模拟体内情况并做有效地记录和分析细胞迁移特征包括细胞迁移速率, 迁移百分率, 细胞迁移轨迹以及细胞形态改变等。本文的研究结果表明, 紫杉醇在 0.1 和 0.02 mg·L<sup>-1</sup>条件下作用 12 h, 可明显地降低细胞迁移百分率, 而对细胞迁移速率则影响不大。有文献报道, 前列腺癌伪足伸出与转移潜能有一定相关性<sup>[12]</sup>。从图 2 中可清楚地看出, 紫杉醇 0.1 mg·L<sup>-1</sup>组伪足伸出的细胞数明显少于对照组, 提示紫杉醇可能降低 MDA-MB-435 细胞的转移潜能, 图 3 的细胞迁移轨迹细胞表明, 紫杉醇可明显抑制 MDA-MB-435 细胞的迁移。由于紫杉醇是细胞微管蛋白聚集剂, 并阻止微管蛋白解聚, 推测紫杉醇抑制细胞迁移作用可能与其影响微管蛋白聚集有关。

细胞毒性实验结果表明, 在与粘附, 侵袭和迁移实验使用相同浓度范围内, 紫杉醇与细胞作用 12 h, 未显示出明显细胞毒活性。提示紫杉醇抑制 MDA-MB-435 细胞的粘附, 侵袭和迁移可能与其细胞毒作用无直接关系, 与刘红岩等<sup>[13]</sup>报道相一致。

综上所述, 紫杉醇不仅具有微管蛋白聚集的强的细胞毒作用, 也具有较强的抑制肿瘤细胞粘附, 侵袭和迁移的作用。其抑制肿瘤细胞侵袭和迁移的分子机理还有待于深入研究。

致谢 感谢德国 Witten 大学免疫学研究所 Frank Entschladen 及 Bernd Niggemann 博士的热情帮助和 Ligand Pharmaceuticals 公司 Dale Mais 博士惠赠 MDA-MB-435 人乳腺癌高转移细胞株。

### 4 参考文献:

[1] Veronesi U, Goldhirsch A, Yarnold J. Breast cancer [A]. In: Peckham M, Pinedo H, Veronesi U, eds. *Oxford Textbook of Oncology* [M]. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press, 1995. 1243 - 1255.

[2] Trudeau ME. Phase I - II studies of docetaxel as a single

- agent in the treatment of metastatic breast cancer [ J ]. *Semin Oncol* , 1999 , 26 ( 3 Suppl 8 ) : 21 - 26 .
- [ 3 ] Hortobagyi GN. Recent progress in the clinical development of docetaxel ( taxotere ) [ J ]. *Semin Oncol* , 26 ( 3 Suppl 9 ) : 32 - 36 .
- [ 4 ] Tortoriello A , Facchini G , Caponigro F , Santangelo M , Benassai G , Persico G , et al . Phase I / II study of paclitaxol and vinorelbine in metastatic breast cancer [ J ]. *Breast Cancer Res Treat* , 1998 , 47 ( 1 ) : 91 - 97 .
- [ 5 ] 韩 锐 . 抗癌药物研究与实验技术 [ M ] . 北京 : 北京医科大学 , 中国协和医科大学联合出版社 , 1997 . 355 - 356 .
- [ 6 ] Friedl P , Nobel PB , Zanker KS. Lymphocyte locomotion in three-dimensional collagen gels . Comparison of three quantitative methods for analysing cell trajectories [ J ]. *J Immunol Methods* , 1993 , 165 ( 2 ) : 157 - 165 .
- [ 7 ] Friedl P , Nobel PB , Shields ED , Zanker KS. Locomotor phenotypes of unstimulated CD45RA<sup>high</sup> and CD45RO<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes in three dimensional collagen lattice [ J ]. *Immunology* , 1994 , 82 ( 4 ) : 617 - 624 .
- [ 8 ] Niggemann B , Maaser K , Lu HQ , Kroczeck R , Zanker KS , Friedl P. Locomotory phenotypes of human tumor cell lines and T lymphocytes in a three dimensional collagen lattice [ J ]. *Cancer Lett* , 1997 , 118 ( 2 ) : 173 - 180 .
- [ 9 ] Aznavoorian S , Murphy AN , Stetler-Stevenson WG , Liotta LA. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis [ J ]. *Cancer* , 1993 , 71 ( 41 ) : 1368 - 1383 .
- [ 10 ] Byers HR , Etoh T , Doherty JR , Sober AJ , Mihm MC Jr. Cell migration and actin organization in cultured human primary , recurrent cutaneous and metastatic melanoma . Time-lapse and image analysis [ J ]. *Am J Pathol* , 1991 , 139 ( 2 ) : 423 - 435 .
- [ 11 ] Haston WS , Shields JM , Wilkinson PC. Lymphocytes locomotion and attachment on two-dimensional surfaces and in three dimensional lattices [ J ]. *J Cell Biol* , 1982 , 92 ( 3 ) : 747-752 .
- [ 12 ] Mohler JL , Partin AW , Coffey DS. Prediction of metastatic potential by a new grading system of cell motility : validation in the Dunning R-3327 prostatic adenocarcinoma model [ J ]. *J Urol* , 1987 , 138 ( 1 ) : 168-170 .
- [ 13 ] 刘红岩 , 雷小红 , 韩 锐 . 几种植物来源不同作用机制的抗癌药抗侵袭作用 [ J ]. *药学报* , 1998 , 33 ( 1 ) : 18 - 21 .

## Effect of taxol on adhesion , invasion and migration of MDA-MB-435 highly metastatic human breast cancer cells

ZHOU Long-En<sup>1</sup> , LIU Hong-Yan<sup>1</sup> , XU Shao-Feng<sup>1</sup> ,  
FU Zhao-Di<sup>1</sup> , Kurt S ZAENKER<sup>2</sup> , HAN Rui<sup>1</sup>

( 1. Institute of Materia Medica , Chinese Academy of Medical Sciences , Peking Union Medical College , Beijing 100050 , China ; 2. Institute of Immunology , University Witten / Herdecke , 58448 Witten , Germany )

**Abstract** : To investigate the effect of taxol on adhesion , invasion and migration of MDA-MB-435 highly metastatic human breast cancer cells , invasive capacity of MDA-MB-435 cells was evaluated by using reconstituted basement membrane invasion assay , the locomotion behavior of MDA-MB-435 cells in a three-dimensional collagen lattice was recorded by using time-lapse videomicroscopy and computer-assisted cell tracking system . It was found that taxol ( 0.01 - 0.1 mg · L<sup>-1</sup> ) inhibited MDA-MB-435 cells to adhere to the basement membrane component fibronectin and laminin by 9.9% - 51.2% , 66.8% - 86.9% , respectively . At concentration of 0.01 and 0.03 mg · L<sup>-1</sup> ,

taxol suppressed MDA-MB-435 cells to invade the reconstituted basement membrane by 66.7% - 74.4% . At the concentration of 0.02 and 0.1 mg · L<sup>-1</sup> , taxol significantly decreased the percentage of locomoting MDA-MB-435 cells and changed the pathway of migrating cells . The results indicate that taxol can significantly inhibit the adhesion , invasion and migration of MDA-MB-435 cells .

**Key words** : taxol ; time lapse videomicroscopy ; breast neoplasms ; adhesions ; neoplasms , invasiveness ; migration