

# ChRM3 对胆管癌神经浸润的影响

范帅<sup>1</sup> 赵伟<sup>1</sup> 王国磊<sup>2</sup> 魏宗强<sup>1</sup> 窦蓉蓉<sup>1</sup> 张炳远<sup>1</sup>

(青岛大学附属医院, 山东 青岛 266003 1 肝胆外科; 2 崂山区业务部)

**[摘要]** **目的** 探讨毒蕈碱型乙酰胆碱受体 M3(ChRM3)对胆管癌神经浸润的影响。**方法** 采用免疫组织化学方法检测 60 例胆管癌组织及 30 例正常胆管组织中 ChRM3 的表达水平;建立小鼠背根神经节(DRG)与胆管癌细胞 RBE 体外共培养模型,并加入 ChRM3 激动剂(匹罗卡品)及其拮抗剂(阿托品),通过观察神经纤维的生长和胆管癌 RBE 细胞对 DRG 和周围神经纤维的黏附及浸润,检测 ChRM3 在匹罗卡品和阿托品作用下对胆管癌 RBE 细胞浸润 DRG 及周围神经纤维的影响。**结果** ChRM3 在胆管癌组织中的阳性表达率高于正常胆管组织,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。神经浸润在胆管癌中发生率为 91.7%(55/60)。DRG-RBE 细胞共培养模型中加入匹罗卡品后,RBE 细胞浸润 DRG 及周围神经纤维的细胞数明显增加,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),这种作用在加入阿托品后明显减弱,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。而将阿托品单独作用于胆管癌组织,神经浸润结果与对照组比较无明显差异( $P>0.05$ )。**结论** ChRM3 参与了胆管癌神经浸润过程,可能为抑制胆管癌的神经浸润提供了新治疗靶点。

**[关键词]** 胆管肿瘤;受体,毒蕈碱 M3;肿瘤浸润;神经系统;体外研究

**[中图分类号]** R735.8 **[文献标志码]** A

**EFFECT OF CHRM3 ON THE PERINEURAL INVASION OF CHOLANGIOCARCINOMA** FAN Shuai, ZHAO Wei, WANG Guolei, WEI Zongqiang, DOU Rongrong, ZHANG Bingyuan (Department of Hepatobiliary Surgery, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the effect of muscarinic acetylcholine receptor M3 (ChRM3) on the perineural invasion of cholangiocarcinoma (CLC). **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expression of ChRM3 in 60 CLC tissues and 30 normal bile duct tissues. A co-culture model of mouse dorsal root ganglia (DRG) and human CLC cell line RBE was established. The ChRM3 agonist pilocarpine and the ChRM3 antagonist atropine were added into the co-culture model to observe the growth of nerve fibers and the adhesion and invasion of RBE cells into the DRG and surrounding nerve fibers and to evaluate the effect of ChRM3 on the invasion of RBE cells into the DRG and surrounding nerve fibers. **Results** The positive rate of ChRM3 was significantly higher in the CLC tissues than in the normal bile duct tissues ( $P<0.01$ ). The perineural invasion rate reached 91.7% (55/60) in the CLC tissues. The number of RBE cells invading the DRG and surrounding nerve fibers was significantly increased after pilocarpine was added to the co-culture model ( $P<0.05$ ). This effect was significantly weakened after atropine was added to the co-culture model ( $P<0.05$ ). However, there was no significant change in the perineural invasion when atropine alone was added to the co-culture model ( $P>0.05$ ). **Conclusion** ChRM3 is involved in the perineural invasion of CLC cells, which may provide a new therapeutic target to inhibit the perineural invasion of CLC.

**[KEY WORDS]** Bile duct neoplasms; Receptor, muscarinic M3; Tumor infiltrating; Nervous system; In vitro

胆管癌是一种恶性程度极高,具有高度侵袭性的肿瘤,起病隐匿,早期即可发生周围浸润及远处转移,具有诊断率低,病死率高的特点<sup>[1]</sup>。手术切除是唯一有效的治疗方法,但是手术切除率低,术后复发率高,对放、化疗不敏感,导致其预后较差<sup>[2]</sup>。近年来研究显示,胆管癌术后易复发及预后差与其具有的一种生物学特性—神经浸润密切相关。研究表明胆管系统具有十分丰富的自主神经,胆管恶性肿瘤距腹腔神经丛的距离较近,肿瘤易侵犯周围的神经丛,发生神经浸润<sup>[3]</sup>。许多学者认为,胆管癌周围神经递质的分泌对胆管癌的神经浸润具有积极影响。

我们推测周围神经递质可能是通过激活毒蕈碱型乙酰胆碱受体 M3(ChRM3)来发挥作用,ChRM3 在胆管癌神经浸润过程中起到重要作用,本实验目的是通过建立体外神经浸润模型,观察 ChRM3 在激动剂匹罗卡品及其拮抗剂阿托品作用下对胆管癌神经浸润能力的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

2010 年 1 月—2013 年 12 月,我院肝胆外科手术切除后经石蜡包埋的胆管病理组织标本 90 例,其中 60 例为腺癌组织标本,30 例为正常胆管组织标本。

### 1.2 细胞系和主要试剂

胆管癌 RBE 细胞系购自中国科学院上海细胞

[收稿日期] 2018-04-24; [修订日期] 2018-05-10  
[基金项目] 山东省科技发展计划项目(2011GGB14010)  
[通讯作者] 张炳远, Email: bingyuanzhang@126.com

库,RPIM1640 培养基以及胎牛血清(FBS)由美国 Hyclone 公司提供,匹罗卡品购自美国 Sigma 公司,硫酸阿托品由武汉昌恒生物医药制品研究所提供,昆明种纯系胚胎小鼠由青岛市药检所动物实验中心提供。

### 1.3 细胞培养

RBE 胆管癌细胞系,用含体积分数 0.10 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,于 37℃、含体积分数 0.05 的 CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱内进行培养,定期换液,待细胞 80%~90% 融合后用含有 2.5 g/L EDTA 的胰酶消化,配成细胞悬液,接种于培养瓶,取对数生长期的细胞用含 2.5 g/L EDTA 的胰酶消化备用,每天用倒置显微镜观察细胞生长情况,定期拍照记录。

### 1.4 免疫组化法检测 ChRM3 的表达情况

标本均采用 40 g/L 中性甲醛溶液固定,常规脱水,石蜡包埋,4 μm 厚连续切片,采用免疫组化 PV-6000 二步法对切片进行免疫组化染色。每批实验均设阳性对照,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。免疫组化阳性判断标准为细胞膜及细胞质出现棕褐色颗粒,分级如下:随机选择 8~10 个视野(100 倍)的阳性细胞核的数目来进行半定量评估,分为 4 级:阴性(-),阳性细胞数<5%;弱阳性(+),阳性细胞数占 5%~25%;阳性(++),阳性细胞数占 26%~50%;强阳性(+++),阳性细胞数>50%;所有标本均经 2 名病理科高年资主治医师审核证实。

### 1.5 体外胆管癌神经浸润模型的建立

本实验小鼠 DRG-RBE 细胞共培养模型培养液分共为 4 组,分别为 mock 组(单独加含血清 RPMI 1640 培养基)、PILO 组(含有血清 RPMI 1640 培养基+匹罗卡品 1 mmol/L)、PILO+ATR 组(含血清 RPMI 1640 培养基+匹罗卡品 1 mmol/L+阿托品 0.1 mmol/L)、ART 组(含有血清 RPMI 1640 培养基+阿托品 0.1 mmol/L)。取对数期生长的 RBE 胆管癌细胞用 2.5 g/L 胰酶消化,离心并重悬于含胎牛血清 RPMI 1640 培养液中,细胞计数板计数,调整细胞密度至  $1.0 \times 10^8$  个/L 备用。整个操作在超净工作台上进行,将小鼠脱颈处死,在显微镜下切取并修剪背根神经节(DRG)后置于生理盐水中清洗备用。6 孔板各孔均放入 0℃ 预冷的 1 cm×1 cm 大小的消毒盖玻片,将备用的 DRG 置于盖玻片中央,从冰浴中取 50 μL Matrigel 覆于 DRG 上,然后将 6 孔板置于 37℃ 培养箱中,固化 30 min 后分别加入预先制备好的细胞悬液 2 mL,将 Matrigel 和 DRG 完全覆盖,操作完后将 6 孔板置于 37℃、含体

积分数 0.05 CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,每隔 4 h 倒置显微镜下观察 RBE 细胞与神经纤维的黏附状况,并照相记录。36 h 后经 40 g/L 中性甲醛溶液固定,通过 Nissl 染色、Gomori 染色和神经丝蛋白免疫组化染色(NF IHC)后,置于倒置显微镜下观察,在高倍镜下计数,分别取 5 个高倍镜视野下细胞计数,并取平均值。

## 2 结 果

### 2.1 ChRM3 在两种组织中的表达

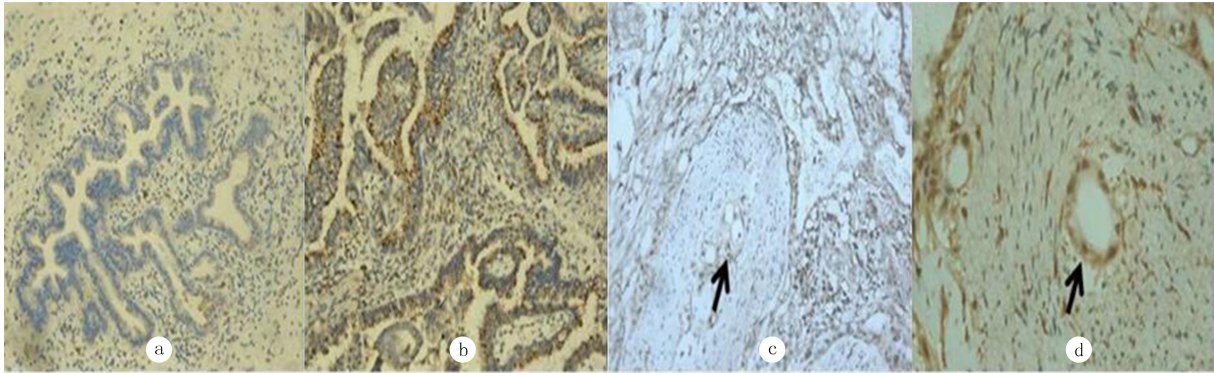
ChRM3 在胆管癌组织和正常胆管组织中的阳性表达率分别为 90.00%(54/60)、3.33%(1/30),差异有统计学意义( $P<0.01$ )。见图 1a、b。并且神经浸润在胆管癌组织中发生率为 91.7%(55/60)。见图 1c、d。

### 2.2 各组 RBE 细胞浸润 DRG 及其周围神经纤维的比较

通过 Nissl 染色发现,体外培养的 DRG 存活良好,其尼氏体呈颗粒状,核周尼氏体颗粒明显,核边缘处较小,而且活力旺盛(图 2a)。Gomori 染色以及 NF IHC 染色见有神经突起自 DRG 周缘长出,多数突起结构有分支,大体呈放射状排列(图 2b、c、d)。在 DRG-RBE 细胞共培养模型培养 36 h 后,可见 RBE 细胞浸润 DRG 及其周围神经纤维(图 3a),浸润细胞数目为  $18.00 \pm 0.71$ ,在 DRG-RBE 细胞共培养模型中加入匹罗卡品后,RBE 细胞浸润 DRG 及其周围神经纤维的数量明显增加(图 3b),浸润细胞数目为  $31.60 \pm 0.93$ ,差异具有统计学意义( $t=11.66, P<0.05$ )。在加入匹罗卡品拮抗剂阿托品后明显减弱,表现为浸润 DRG 的 RBE 细胞的数量减少(图 3c),浸润细胞数目为  $20.00 \pm 0.71$ ,差异具有统计学意义( $t=9.95, P<0.05$ )。而在 DRG-RBE 细胞共培养模型中单独加入阿托品以后,RBE 细胞浸润 DRG 及其周围神经纤维的数量无明显的变化(图 3d),浸润细胞数目为  $20.20 \pm 0.86$ ,与对照组相比差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

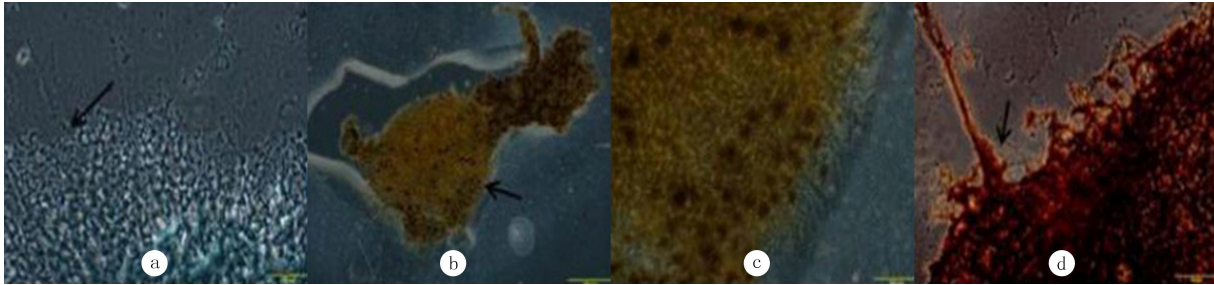
## 3 讨 论

肝胆系恶性肿瘤中,胆管癌是除肝癌之外发病率最高的恶性肿瘤,约占 10%~15%。手术根治性切除是胆管癌唯一有效的治疗方法,但由于胆管癌早期不易被发现,且易发生周围浸润,导致大部分病人诊断时已处于中晚期,R0 切除率降低且术后复发率升高。



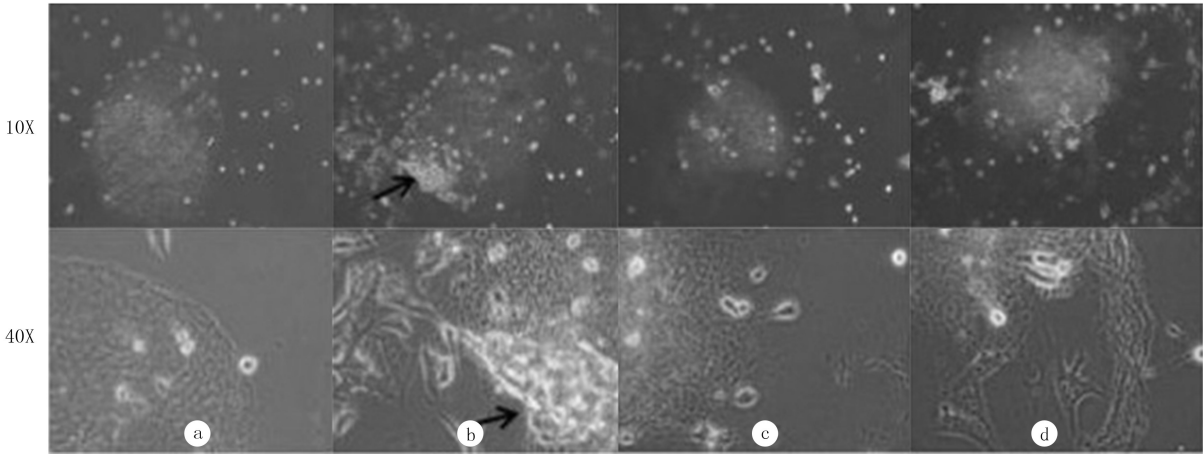
a:ChRM3 在正常胆管组织中的表达,200 倍;b:ChRM3 在胆管癌组织中的表达,200 倍;c,d:胆管癌浸润神经纤维(箭头所指),PV-6000 染色,分别为 200、400 倍。

图 1 ChRM3 在两种组织中的表达情况



a:Nissl 着色后的 DRG(箭头所指),400 倍;b,c:Gomori 着色后的 DRG(箭头所指),分别为 200、400 倍;d:NF IHC 着色后的 DRG(箭头所指),400 倍。

图 2 DRG 体外培养 36 h 后的生长状态、胞体大小及轴突生长状况



a:RBE 细胞浸润 DRG 及其周围神经纤维情况;b:加入匹罗卡品后 RBE 细胞浸润 DRG 及其周围神经纤维情况;c:同时加入匹罗卡品和阿托品后 RBE 细胞浸润 DRG 及其周围神经纤维情况;d:单独加入阿托品后 RBE 细胞浸润 DRG 及其周围神经纤维情况。

图 3 不同因素影响下 RBE 细胞对 DRG 的浸润情况

神经浸润是胆管癌一种独立的转移方式,与淋巴转移无关<sup>[4]</sup>。BHUIYA 等<sup>[5]</sup>的研究显示,70 例胆管癌标本中 81.4% 出现了神经浸润,且 R0 术后 5 年存活率仅为 32%,而无神经浸润病人为 67%。以上研究显示,神经浸润在胆管癌中普遍发生且与术后复发相关。胆管系统是一个由多种神经支配的自主神经器官。许多学者认为肿瘤的神经浸润可能与神经递质有关,尤其是胆管癌这种具有嗜神经浸润性的肿瘤<sup>[6]</sup>。研究显示胆管癌周围的交感神经递质

及其受体在调节胆管癌的生长及转移中的重要作用已经被证实<sup>[7-8]</sup>,但是副交感神经在胆管癌中作用的研究尚少。SHAH 等<sup>[9]</sup>以及 SAID 等<sup>[10]</sup>研究表明,副交感神经也与肿瘤的发生发展关系密切。mAChRs 是副交感神经分泌的主要递质乙酰胆碱(ACh)受体的一种,包括 M1~M5 5 种受体,其中,ChRM3 分布于消化道腺体和血管平滑肌,控制腺体分泌和平滑肌松弛。实验证明,ACh 在多种肿瘤中高表达,包括常见的肺癌及其他恶性肿瘤<sup>[11-12]</sup>。



研究显示 ChRM3 在消化道肿瘤中广泛表达,在肿瘤的增殖、分化、侵袭和转移中起重要作用<sup>[13-14]</sup>。张亮等<sup>[15]</sup>研究显示,ChRM3 活化能够通过 PI3K/Akt 信号通路促进肝癌细胞的侵袭和转移。据报道,胆管癌细胞系 MZ-Cha-1 有 ChRM3 的表达,而在 mAChRs 激动剂作用下,IP<sub>3</sub> 信号被激活,细胞内 Ca<sup>2+</sup> 水平升高,胆管癌细胞的数量增加<sup>[16]</sup>。FENG 等<sup>[17]</sup>研究显示,ChRM3 的表达在胆管癌细胞增殖和转移中起关键作用,并受肿瘤分化程度、远处转移的影响。以上研究证明,ChRM3 广泛参与了肿瘤细胞,包括胆管癌细胞的增殖、分化、侵袭和转移,但是与神经浸润有关的报道很少。本课题组之前的研究已经证实了胆管癌细胞可能存在 ChRM3,并受副交感神经分泌的神经递质的调节,在胆管癌的侵袭和转移中发挥积极作用<sup>[18]</sup>。对本院 90 例标本进行免疫组织化学染色显示,ChRM3 主要在胆管癌细胞膜和细胞质中表达,胆管癌组织中神经浸润的发生率约为 91.7%,并且在胆管癌组织中 ChRM3 的阳性表达率明显高于正常胆管组织。据此推测,ChRM3 可能与胆管癌神经浸润具有相关性。研究显示,肿瘤组织中存在多种神经递质的异常表达,神经递质和受体激动剂可影响肿瘤的增殖、分化和转移,受体拮抗剂可阻断这些作用<sup>[19]</sup>。而本研究结果显示,加入匹罗卡品或阿托品后,ChRM3 激动剂匹罗卡品可明显增强 RBE 细胞对 DRG 及周围神经纤维的浸润能力;而阿托品可明显抵消匹罗卡品所产生的促浸润作用;阿托品能够与匹罗卡品竞争与 ChRM3 结合,对匹罗卡品的作用产生竞争性抑制,而阿托品本身与 ChRM3 结合不发挥作用,所以单独应用阿托品对 RBE 细胞的神经浸润无影响。

综上所述,匹罗卡品可明显增强胆管癌细胞的神经浸润能力,阿托品可明显抵消匹罗卡品所产生的促浸润能力,其机制可能通过改变 ChRM3 的活性而发挥作用。这可能为抑制胆管癌的神经浸润提供新的治疗靶点。

### [参考文献]

- [1] RAZUMILAVA N, GORES G J. Cholangiocarcinoma[J]. Lancet, 2014, 383(9935):2168-2179.
- [2] FRIMAN S. Cholangiocarcinoma—current treatment options[J]. Scand J Surg, 2011, 100(1):30-34.
- [3] 冯玉杰,张炳远,卢云. 胆管癌周围神经浸润的研究进展[J]. 国际外科学杂志, 2010, 37(7):489-483.
- [4] HASSAN M O, MAKSEM J. The prostatic perineural space and its relation to tumor spread: an ultrastructural study[J]. Am J Surg Pathol, 1980, 4(2):143-148.
- [5] BHUIYA M R, NIMURA Y, KAMIYA J, et al. Clinicopathologic studies on perineural invasion of bile duct carcinoma[J]. Ann Surg, 1992, 215(4):344-349.
- [6] 刘磊,黄强,刘臣海,等. 肝外胆管癌神经及脉管浸润转移的危险因素[J]. 肿瘤, 2012, 32(5):376-379.
- [7] KANNO N, LESAGE G, PHINIZY J L, et al. Stimulation of  $\alpha$  2-adrenergic receptor inhibits cholangiocarcinoma growth through modulation of Raf-1 and B-Raf activities[J]. Hepatology, 2002, 35(6):1329-1340.
- [8] 黄竹,刘子沛,夏锋,等.  $\alpha$ 1-肾上腺素受体对胆管癌细胞增殖的影响[J]. 中华消化外科杂志, 2009, 8(3):193-196.
- [9] SHAH N, KHURANA S, CHENG K, et al. Muscarinic receptors and ligands in cancer[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2009, 296(2):C221-232.
- [10] SAID A H, HU S, ABUTALEB A, et al. Interacting post-muscarinic receptor signaling pathways potentiate matrix metalloproteinase-1 expression and invasion of human colon cancer cells[J]. Biochemical Journal, 2017, 474(5):647-665.
- [11] TROMBINO S, CESARIO A, MARGARITORA S, et al.  $\alpha$ 7-Nicotinic acetylcholine receptors affect growth regulation of human mesothelioma cells role of mitogen-activated protein kinase pathway[J]. Cancer Res, 2004, 64(1):135-139.
- [12] SONG P, SEKHON H S, PROSKOCIL B, et al. Synthesis of acetylcholine by lung cancer[J]. Life Sci, 2003, 72(18):2159-2168.
- [13] FRUCHT H, JENSEN R T, DEXTER D, et al. Human colon cancer cell proliferation mediated by the M3 muscarinic cholinergic receptor[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(9):2532-2539.
- [14] WEGENER C, HAMASAKA Y, NASSEL D R. Acetylcholine increases intracellular Ca<sup>2+</sup> via nicotinic receptors in cultured PDF-containing clock neurons of Drosophila[J]. J Neurophysiol, 2004, 91(2):912-922.
- [15] 张亮,宦宏波,温旭东,等. 毒蕈碱型胆碱能受体 M3 调控肝癌细胞侵袭转移的研究[J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(6):509-514.
- [16] ELSING C, HUBNER C, FITSCHER B A, et al. Muscarinic acetylcholine receptor stimulation of biliary epithelial cells and its effect on bile secretion in the isolated perfused liver[J]. Hepatology, 1997, 25(4):804-814.
- [17] FENG Y J, ZHANG B Y, YAO R Y, et al. Muscarinic acetylcholine receptor M3 in proliferation and perineural invasion of cholangiocarcinoma cells[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2012, 11(4):418-423.
- [18] 刘昆鹏,张炳远,卢云,等. Transwell 侵袭实验测定 M 受体对胆管癌细胞侵袭的影响[J]. 国际外科学杂志, 2011, 38(5):298-301.
- [19] RADU A, PICHON C, CAMPARO P, et al. Expression of follicle-stimulating hormone receptor in tumor blood vessels[J]. N Engl J Med, 2010, 186(2):1621-1630.