

[文章编号] 1007-385X(2004)01-0031-05

罗勒多糖对肿瘤转移行为的影响

曲迅¹, 杨美香¹, 郑广娟², 郭文菁¹, 周文¹, 刘德山¹, 张丹², 张静², 赵丽霞¹, 夏丽英²(1. 山东大学齐鲁医院临床基础研究所, 济南 250012; 2. 山东省中医药大学, 济南 250013)

[摘要] 目的: 观察罗勒多糖对肿瘤细胞不同途径转移行为的影响, 并从细胞间通讯功能的恢复以及体内 NK 细胞活性的变化两方面探讨其抗肿瘤转移的可能作用机制。方法: Metrigel 穿膜法体外观察罗勒多糖对肿瘤细胞移动活性的影响; 建立不同途径的肿瘤转移模型, 体内观察罗勒多糖对肿瘤转移行为的影响。SLDT 技术检测罗勒多糖对细胞通讯功能的影响; ⁵¹Cr 释放法检测罗勒多糖对 NK 细胞活性的影响。结果: 罗勒多糖在体内外均具有显著的抗肿瘤转移作用; 与对照组相比细胞间通讯功能有一定程度的恢复; NK 细胞的活性明显提高。结论: 罗勒多糖具有明显的抗肿瘤转移作用, 可能是一种具有潜在开发价值的新的抗肿瘤转移药物, 其抗肿瘤转移作用是通过多个药效靶点综合作用的结果。

[关键词] 罗勒多糖; 肿瘤转移; 细胞间通讯; NK 细胞

[中图分类号] R282; R730.52 [文献标识码] A

The Effects of Basil Polysaccharide on the Behavior of Tumor Metastasis

QU Xun¹, YANG Mei-xiang¹, ZHENG Guang-juan², GUO Wen-jing¹, ZHOU Wen¹, LIU De-shan¹, ZHANG Dan², ZHANG Jing², ZHAO Li-xia¹, XIA Li-ying²(1. Basic Research Institute of Clinic Medicine, Qilu hospital, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Shandong University of traditional Chinese medicine, Jinan 250013, China)

[Abstract] Objective: To study the effect of basil polysaccharide (BP) on tumor cell metastasis and its mechanism through assays of intercellular communication and NK cytotoxicity. Methods: Metastasis of tumor cell ability was assayed by metrigel *in vitro* and the rate of pulmonary metastasis nodel was caluated. Using SLDT technique to test the effect of BP on recovering the function of cell Gap junction mediated intercellular communication (GJIC). NK cytotoxicity was measured by a standard 4 h ⁵¹Cr-release assay. Results: Invasion and migration of tumor cells decreased significantly after treated with BP *in vitro* and *in vivo*. PG cells treated with BP for 8 h could recover the function of GJIC compared with the control. NK activity of mice bearing tumor treated with BP rose significantly. Conclusions: The results suggested that BP could inhibit tumor metastasis and might be a new candidate for antitumor metastasis agent.

[Key words] basil polysaccharide, tumor metastases, GJIC, NK

* 近年来, 传统的中草药在抗肿瘤以及减轻放化疗不良反应等方面的疗效均受到了人们的重视^[1]。我室也一直在致力于这方面的研究, 并且从香料族全草植物罗勒中提取得了药物的有效成分, 即罗勒多糖, 在本研究通过体外穿膜实验以及体内荷瘤鼠模型研究了罗勒多糖对肿瘤细胞不同途径转移行为的影响, 并且从细胞间通讯功能的恢复以及体内 NK 细胞活性的变化两方面对其抗肿瘤转移的机制进行了初步的探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物

C57 BL/6 小鼠 18~22 g, 由中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院肿瘤研究所提供, 清洁级, 动物到达经适应性培养后 1 周。

1.2 罗勒多糖

[基金项目] 本课题由山东省卫生厅(课题编号 2001CA1CDA1) 以及山东省中药管理局(课题编号 99-46) 资助

[作者简介] 曲迅(1958-), 女, 山东济南人, 教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤免疫学研究

[通讯作者] 曲迅, E-mail: ymxwj@163.com

系本室从中国传统化痰名方中的一味具有抗血小板作用的药物全草植物罗勒中经分离、提取及初步精致得到的药物有效成分。

1.3 细胞系

PG 细胞为人高转移肺癌, NIH3T3 为小鼠成纤维细胞, Lewis 肺癌细胞、H22 肝癌细胞均为本室常规保存; B16-F10 黑色素瘤细胞株, 由第二军医大学免疫室曹雪涛教授惠赠。

1.4 体外检测罗勒多糖对肿瘤细胞侵袭与运动行为的影响(Matrigel 穿膜法)

采用生长良好的 NIH3T3 细胞, 用无血清 DMEM 洗涤 2 次, 在无血清 DMEM 培养液中继续培养 24 h, 收获培养上清, 过滤除菌。取此上清液加入侵袭小室的下室, 在上下室之间用直径 13 mm 的聚碳酸酯微孔膜(微孔直径为 8 μm), 光面朝上, 粗糙面朝下放置, 在两室之间的聚碳酸酯微孔膜上铺用无血清 DMEM 稀释的 matrigel 50 μl (120 μg), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min, 然后取不同浓度罗勒多糖(100 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L)

作用 48 h 的 PG 细胞($1 \times 10^3/\text{L}$) 200 μl , 加入上室中, 置 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 环境中常规孵育 6 h 后, 取出聚碳酸酯微孔膜, 用棉签擦去膜上未穿膜细胞以及 Matrigel 后将膜于甲醇中固定 30 min, Gimsa 染色后用透明液透明于光镜下计数穿膜细胞数。

1.5 体内检测罗勒多糖对肿瘤细胞侵袭与运动行为的影响

1.5.1 罗勒多糖对肿瘤细胞人工肺转移行为的影响

40 只小鼠随机分成 4 组, 每只小鼠尾静脉注射 B16-F10 瘤细胞悬液, 0.2 ml/只, 细胞数为 $10^3/\text{L}$, 接种后第 2 天开始给药, 分组及给药剂量如(表 1)所示, A 组给予生理盐水作为对照组, B, C, D 组分别给予不同剂量的罗勒多糖(B 大剂量治疗组 C 中剂量治疗组 D 小剂量治疗组)。给药后第 15 天颈椎脱臼处死小鼠, 取双肺, 用 Bouin 氏液固定 24 h 后, 解剖镜下计数肺转移瘤灶, 按下列公式计算肺转移率:

$$\text{肺转移率}(\%) = \frac{\text{有转移小鼠数}}{\text{小鼠总数}} \times 100\%$$

表 1 荷瘤鼠分组及给药方式
Tab. 1 Mice groups divide and administered

Groups	Mice number	Dosages(mg \cdot kg $^{-1}$ \cdot d $^{-1}$)	Way of administration
A	10	0.4 ml	P. O.
B	10	5	P. O.
C	10	2.5	P. O.
D	10	1.25	P. O.

1.5.2 罗勒多糖对肿瘤自发肺转移行为的影响

40 只小鼠随机分成 4 组, 每只小鼠右腋下接种 Lewis 肺癌细胞 0.2 ml, 浓度为 ($2 \times 10^4/\text{L}$), 接种后第 2 天开始给药, 分组及给药剂量如(表 1)所示。给药后第 15 天, 处死小鼠, 取双肺, 用 Bouin 固定液浸泡 24 h, 在解剖显微镜下计数肺转移结节, 按上述公式计算肺转移率。

1.5.3 罗勒多糖对肿瘤淋巴道转移行为的影响

取对数生长期 H22 肝癌细胞, 用 1640 培养液洗涤 2 次, 配成 $2 \times 10^5/\text{L}$ 细胞悬液, 40 只小鼠随机分成 4 组, 每只小鼠右足跖接种瘤细胞悬液 0.05 ml (5×10^6 个细胞/只)。接种瘤细胞 24 h 后, 分别给予不同的治疗方式。动物分组及给药剂量如(表 1)所示。给药 15 d 后处死小鼠, 取双肺, 用 Bouin 固定液浸泡 24 h, 在解剖显微镜下分别计数肺转移结节, 按照上述公式计算肺转移率。

1.5.4 罗勒多糖对小鼠 H22 肝癌细胞血道转移行为

的影响

取对数生长期 H22 肝癌细胞, 用 1640 培养液洗涤 2 次, 配成 $2 \times 10^5/\text{L}$ 细胞悬液, 40 只小鼠随机分成 4 组, 每只小鼠尾静脉接种瘤细胞悬液 0.2 ml (2×10^7 个细胞/只)。接种瘤细胞 24 h 后, 分别给予不同的治疗方式。小鼠分组以及给药剂量如表 1 所示, 给药 15 d 后处死小鼠, 取双肺, 用 Bouin 固定液浸泡 24 h, 在解剖显微镜下分别计数肺转移结节, 计算肺转移率, 公式同上。

1.6 SLDT 技术检测罗勒多糖对细胞通讯功能的影响^[4]

接种 PG 细胞于直径 35 mm 的培养皿中, 接种密度约 4×10^6 , 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 常规培养过夜, 形成饱和单层细胞后, 加入不同浓度的罗勒多糖(100 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L, 3 ml/L) 孵育 8 h 后, 弃去培养液, PBS 洗 3 次, 加入 0.05% LY 标记液 2 ml, 用锐刀在细胞表面划痕数条, 作用 3 ~ 5 min 后洗去荧光染料, 在

Olympus BX40 荧光显微镜下观察纪录结果。

1.7 NK 活性检测

于用药后第 15 天, 无菌取小鼠脾脏制成 $5 \times 10^3/L$ 细胞悬液 (E), 与 $Na_2^{51}CrO_4$ 标记的 YAC-1 细胞 (T) 按 E:T = 100:1 置 $37^\circ C$, 5% CO_2 环境中反应 5 h, 取上清测定 cpm 值, 按下列公式计算 NK 细胞杀伤活性:

NK 细胞杀伤活性 (%) =

$$\frac{\text{实验组 cpm} - \text{自然释放组 cpm}}{\text{最大释放组 cpm} - \text{自然释放组 cpm}} \times 100\%$$

1.8 统计学处理

利用 SPSS10.0 统计软件对所得的数据进行两两分析, 均数之间的比较采用 One-Sample T test, 率之间的比较采用 Crosstabs。

2 结果

2.1 罗勒多糖体外抗肿瘤转移能力检测

用 Metrigel 穿膜法检测了罗勒多糖对 PG 细胞侵袭与运动性的影响, 结果如 (图 1) 所示, 与对照组相比, 体外经不同浓度罗勒多糖 (100 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L) 处理 48 h 后, 有侵袭与运动力并能穿过人工基底膜的 PG 细胞数呈显著下降趋势 ($P < 0.05$)。

2.2 罗勒多糖体内抗肿瘤转移能力检测

2.2.1 罗勒多糖对肿瘤人工性肺转移行为的影响

C57BL/6 小鼠尾静脉注射 B16-F10 瘤细胞悬液后, 给予不同的剂量的 BP 治疗, 给药后 15 d 处死, 观察肿瘤肺转移的程度, 结果如 (表 2) 所示, 与 A (对照) 比较,

罗勒多糖各剂量治疗组肿瘤转移率显著降低 ($P < 0.05$), 转移结节数显著减少 ($P < 0.01$)。此结果证明罗勒多糖对黑色素瘤 B16-F10 人工肺转移行为具有明显的对抗作用。

图 1 罗勒多糖对 PG 细胞侵袭力及运动能力的影响

Fig. 1 Influence of BP on invasion and migration of PG cells

A: Control; B: Treated with BP (100 mg/L); C: Treated with BP (50 mg/L); D: Treated with BP (25 mg/L)

表 2 罗勒多糖对黑色素瘤 B16-F10 肿瘤人工肺转移行为的影响
Tab. 2 The efficiency of BP on the B16-F10 pulmonary metastasis

Groups	Mice number	Pulmonary nodes ($\bar{x} \pm s$)	Inhibitory rate (%)
A	10	10.21 ± 6.17	100
B	10	6.27 ± 3.11 [▲]	45 [■]
C	10	4.89 ± 4.28 [▲]	47 [■]
D	10	4.78 ± 3.91 [▲]	50 [■]

Compared with the controls ▲ $P < 0.05$; ■ $P < 0.01$

2.2.2 罗勒多糖对肿瘤自发肺转移行为的观察

C57BL/6 小鼠右腋皮下接种 Lewis 肺癌细胞后, 给予不同的治疗后, 处死小鼠, 取双肺, 用 Bouin 固定液浸泡 24 h, 在解剖显微镜下计数肺转移结节。由 (表 3) 可见, 与生理盐水对照组相比, 罗勒多糖高、中剂量治疗组肿瘤转移率显著降低 ($P < 0.05$), 转移结节数显著减少 ($P < 0.01$)。此结果表明, 罗勒多糖能对抗肿瘤的自发性肺转移。

2.2.3 罗勒多糖对小鼠肿瘤淋巴结转移行为的影响

荷瘤鼠给予不同的治疗, 20 d 后处死, 取双肺观察肿瘤的转移情况。结果发现, 与生理盐水对照组相比较, 罗勒多糖大剂量以及中剂量治疗组肿瘤转移率下降, 转移结节数显著减少 ($P < 0.05$, 表 4)。

2.2.4 罗勒多糖对小鼠肿瘤血道转移行为的影响

荷瘤鼠给予不同的治疗 20 d 后处死, 取双肺观察肿瘤血道转移情况。结果发现, 与生理盐水对照组相

比较,罗勒多糖大剂量以及中剂量治疗组肿瘤转移率 下降,转移结节数显著减少($P < 0.05$,表5)。

表3 罗勒多糖对肿瘤自发性肺转移行为的影响

Tab. 3 The efficiency of BP on the pulmonary metastasis spontaneous

Groups	Mice number	Pulmonary nodes($\bar{x} \pm s$)	Inhibitory rate(%)
A	10	38.62 ± 11.61	100
B	10	4.30 ± 2.51 [▲]	40 [■]
C	10	12.44 ± 9.07 [▲]	50 [■]
D	10	39.10 ± 10.77	90

Compare with the control ▲ $P < 0.01$; ■ $P < 0.05$

表4 罗勒多糖对 H22 荷瘤模型鼠淋巴道转移行为的影响

Tab. 4 The efficiency of BP on the pulmonary metastasis through lymphatic system

Groups	Mice number	Pulmonary nodes($\bar{x} \pm s$)	Inhibitory rate(%)
A	10	18.31 ± 20.01	85
B	10	4.603 ± 2.264 [▲]	43 [■]
C	10	8.125 ± 2.940 [▲]	50 [■]
D	10	19.30 ± 2.36	90

▲, ■ Compare with the control $P < 0.05$

表5 罗勒多糖对 H22 荷瘤鼠血道转移行为的影响

Tab. 5 The efficiency of BP on the pulmonary metastasis through blood system

Groups	Mice number	Pulmonary nodes($\bar{x} \pm s$)	Inhibit rate(%)
A	10	2.11 ± 1.08	95
B	10	0.61 ± 0.031 [▲]	35 [■]
C	10	1.04 ± 0.817 [▲]	50 [■]
D	10	2.30 ± 2.07	90

▲, ■ Compare with the control $P < 0.05$

2.3 罗勒多糖对细胞通讯功能的影响

由(图2,表5)所示,PG 细胞为细胞通讯功能缺陷细胞系,LY 荧光只停留在标记细胞层。体外经罗勒多糖(100 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L)处理 8 h,细胞通讯功能有一定程度的恢复。

2.4 罗勒多糖对荷瘤小鼠 NK 活性的影响

由图3可见,与生理盐水对照组比较,罗勒多糖高剂量与中剂量治疗组小鼠 NK 活性由明显的升高(均 $P < 0.05$)。此结果表明,罗勒多糖具有提高机体免疫监视机制作用。

3 讨论

恶性肿瘤是目前严重威胁人类健康的疾病之一,而肿瘤的侵袭、转移是肿瘤复发以及导致患者死亡的

图2 罗勒多糖对细胞通讯功能的影响

Fig. 2 The influence of BP on cell Gap junction mediated intercellular communication

A: Control; B: Treated with BP (50 mg/L)

表6 罗勒多糖对肿瘤细胞间隙通讯传导的影响

Tab. 6 The influence of BP on GJIC

Groups	Cells	Dosage(mg /L)	Inhibitory rate(%)
PBS (control)	-	9.00 ± 1.50	
Fluorescence control	-	10 ± 1.62	
B	100	20 ± 1.75	122.2
C	50	16 ± 1.53	77.8
D	25	13 ± 1.46	44.4

图3 罗勒多糖对小鼠NK活性的影响

Fig. 3 The influence of BP on NK activity

A: Control; B: Treated with BP (100 mg /L);

C: Treated with BP (50 mg/L); D: Treated with BP (25 mg/L)

重要原因,因此防治肿瘤的侵袭、转移是降低肿瘤死亡率的重要途径之一。

大量的实验研究表明肿瘤的转移与肿瘤的血液黏滞度有关。在肺癌、乳腺癌、消化道癌、恶性淋巴瘤、白血病、多发性骨髓瘤等多种具有转移能力的恶性肿瘤中,患者的全血黏度、血浆黏度、全血还原黏度、红细胞聚集指数、纤维蛋白原等均明显升高^[2,3]。由此可见癌症病人血液的浓稠性、黏滞性、聚集性、凝固性都有不同程度的增高。因此具有调节血液流变学性能的天然抗肿瘤药物可能会成为肿瘤治疗的有效辅助手段。近年来一些具有抗血小板凝集及免疫刺激活性的传统中药在肿瘤防治中的作用引起了人们更多的关注。罗勒多糖是我室从香料族植物罗勒中经分离、提取及初步精致得到的药物有效成分,为了进一步研究罗勒多糖对肿瘤转移行为的影响及其可能的作用机制,在本实验中首先选用 Matrigel 穿膜实验体外观察了罗勒多糖对具有高转移性能的人肺癌细胞侵袭转移行为的影响。该实验过程涉及肿瘤细胞侵袭的全过程:降解、黏附和移动^[4]。实验结果表明,罗勒多糖作用后抑制了

瘤细胞的侵袭能力,PG 细胞的穿膜移动能力也受到了抑制($P < 0.05$),说明罗勒多糖在体外具有明显的抑制肿瘤侵袭以及转移作用。

关于罗勒多糖抗肿瘤转移的可能机制,我们从细胞通讯的改变以及 NK 细胞活性两方面进行了探讨。细胞间隙连接介导的细胞间的通讯,在正常细胞增殖分化调控中起重要作用^[5]。细胞恶变后,通讯功能减弱,这是癌变细胞增殖失控的重要原因之一^[6]。因此恢复肿瘤细胞之间的通讯功能,是控制肿瘤增殖,抑制肿瘤转移的重要环节。本研究表明罗勒多糖可能通过调节能够促进荷瘤鼠 NK 活性免疫功能,增强其抑制肿瘤转移的作用。

综合上述实验结果表明,罗勒多糖具有明显的抗肿瘤侵袭以及转移作用,其抗肿瘤转移作用可能是通过多种途径完成的,如恢复细胞间通讯,调节机体的免疫功能等。由此推测罗勒多糖可能成为一种新的抗肿瘤转移的候选药物。

[参 考 文 献]

- [1] Lee-KH. Novel antitumor agents from higher plants [J]. *Med Res Rev*, 1999, 19(6): 569-596.
- [2] 李彬先, 侯柏春. 血液流变学检测在恶性肿瘤诊断治疗与预后判断中的价值[J]. *中国血液流变学杂志*, 2002, 12(4): 342-343.
- [3] Djavanmard MP, Michl I, Korpan M, *et al*. Impaired hemorheology in patients with postmastectomy lymphedema [J]. *Breast Cancer Res Treat*. 1996; 38(3): 283-288.
- [4] Albin A, Melchiori A, Santi L, *et al*. Tumor cell invasion inhibited by TIMP-2 [J]. *J Nati Can Inst*, 1991, 83: 775-779.
- [5] Ubeda A, Trillo MA, House DE, *et al*. A 50 Hz magnetic field blocks melatonin-induced enhancement of junctional transfer in normal C3H/10T1/2 cells [J]. *Carcinogenesis*. 1995; 16(12): 2945-2949.
- [6] Saez CG, Velasquez L, Montoya M, *et al*. Increased gap junctional intercellular communication is directly related to the anti-tumor effect of all-trans-retinoic acid plus tamoxifen in a human mammary cancer cell line [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 89(3): 450-461.

[收稿日期] 2003 - 08 - 20

[修回日期] 2003 - 09 - 27