

复方藤梨根制剂对裸鼠荷人肺巨细胞癌细胞 E-钙黏附素影响的研究

郭勇,戴伟春,姚庆华,杨维泓(浙江中医药大学附属第一医院肿瘤内科,杭州 310006)

摘要:目的 研究复方藤梨根制剂对荷人肺巨细胞癌(PG)裸鼠移植瘤的抗癌效应,并初步探讨其对瘤体细胞 E-钙黏附素(E-cad)表达水平的影响。方法 建立 PG裸鼠移植瘤模型;复方藤梨根制剂灌胃 21 d,称瘤重;采用免疫组化 ABC法检测 E-cad 的表达。结果 复方藤梨根制剂三个剂量组与对照组对比,均能明显抑制肿瘤生长,并提高 E-cad 表达。结论 复方藤梨根制剂对 PG裸鼠移植瘤具有的抑瘤效果,明显上调 PG细胞 E-cad 的表达。

关键词:复方藤梨根制剂;肺癌细胞;抑瘤;E-钙黏附素

中图分类号:R289;R979.1

文献标识码:A

文章编号:1007-7693(2008)01-0004-04

基金项目:浙江省中医药管理局课题(2000C78)

作者简介:作者简介:郭勇,男,教授,主任医师,博士生导师

E-mail:gyk@mail.hz.zj.cn

The Study on Effects of FuFangTengLiGen Preparation Regulating the Expression of E-cad of Transplantation Tumor of PG Cell

GUO Yong, DAI Wei-chun, YAO Qing-hua, YANG Wei-hong (The First Affiliated Hospital of Zhejiang T. C. M. University, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the anticancer effect of Chinese Compound Recipe FuFangTengLiGen (FFTLG) against Transplantation Tumor of PG Cell and preliminarily explore the connection with E-cad. **METHODS** Model rats of transplantation tumor of human large cell cancer PG were established. The low, medium and high dose groups of FFTLG, the blank control group were set up. After 21 days administration of FFTLG through gastrogavage, the antitumor effect of each group was compared. The gene express of E-cad in each group were quantitatively detected and compared by the application of immunohistochemistry technique. **RESULTS** The FFTLG could significantly inhibit the growth of transplantation tumor, FFTLG can obviously up-regulate the express of E-cad, which in the low/medium and high dose groups was separately higher than that in the blank group. **CONCLUSION** FFTLG has definite antitumor effect against human large cell cancer and can obviously up-regulate the express of E-cad.

KEY WORDS: FFTLG; lung cancer cell; anticancer; E-cad

间隙连接 (gap junction, GJ) 是细胞间信息交换的重要通道, 它所介导的细胞间隙连接通讯 (gap junction intercellular communication, GJIC) 对细胞的增殖和分化调控及维持组织器官内细胞间的协调稳定等方面起重要作用。E 钙黏附素 (Epithelial cadherin) 属依赖细胞外 Ca^{2+} 的经典 CD 亚族成员, 介导同种亲和性的细胞-细胞间黏附, 并参与建立和维持细胞间隙连接。研究证实^[1-2] 许多肿瘤中存在 E 钙黏附素表达下降或缺失, 细胞间连接通讯功能中断, 因此, 上调 E 钙黏附素的药物, 有可能抑制肿瘤生长、分化、转移, 但复方中药上调 E 钙黏附素的研究少见报道。本实验观察复方藤梨根制剂对高转移性人肺癌细胞生长及其对 E 钙黏附素表达的影响, 并进一步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与药物

RPMI-1640 细胞培养基、PBS $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.2 ~ 7.4 磷酸盐缓冲液、0.25% 的胰蛋白酶, 购于美国 SIGMA 公司产品; 10% 灭活小牛血清为上海华美生物工程公司产品; E 钙黏附素单抗和 ABC 试剂盒为美国 Zymed 公司产品。

复方藤梨根制剂 (FFTLG) 由党参、茯苓、白术、藤梨根、水杨梅根等纯中药材组成, 浙江中医药大学制剂室提供, 每毫升含生药 1 g。

1.2 细胞来源及培养

高转移性人肺癌细胞株 (PG 细胞) 由浙江省肿瘤研究所提供, 用含 10% 灭活小牛血清的 RPMI-1640 培养液内培养并传代。

1.3 实验动物

6 周龄健康雄性 BALB/C-nu/nu 裸小鼠 28 只, 体重 (20 ± 2) g, 由中国科学院上海实验动物中心提供, 在 SPF 条件下饲养。

1.4 瘤株复苏及传代

复苏: 从细胞库中取出 PG 冷冻细胞, 37°C 下溶解, 将细胞悬液加入 5 mL RPMI-1640 培养基内, $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心,

7 min 后弃上清液, 将细胞置于 RPMI-1640 培养基中, 接种于 T-25 培养瓶。在 5% 二氧化碳培养箱内进行培养并传代。待细胞长满瓶后, 弃培养基, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 当细胞变圆, 间距变大时, 用含小牛血清的培养基终止消化, 离心洗涤, 按 1 传 2~3 瓶比例接种备用。

1.5 PG 裸鼠模型的建立

参照文献^[3], 台盼蓝染色, 经细胞计数器计数及计算活细胞比率后, 收集浓度为 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 细胞悬液 6 mL。每只裸鼠右前肢腋背部皮下注射 0.2 mL 细胞悬液。SPF 条件下饲养, 所有饮用水、饲料及笼具均经无菌消毒处理。

1.6 实验分组及给药

将造模后裸鼠编号后按随机数字表分为如下 4 组并给药, 每组 7 只。空白对照组: 生理盐水 (NS) $0.6 \text{ mL} \cdot \text{次}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃; 低剂量组: FFTLG $0.2 \text{ mL} + 0.4 \text{ mL NS} \cdot \text{次}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃; 中剂量组: FFTLG $0.4 \text{ mL} + 0.2 \text{ mL NS} \cdot \text{次}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃; 中药高剂量组: FFTLG $0.6 \text{ mL} \cdot \text{次}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃。低、中、高给药组用量各相当于成人临床用药量的 5 倍、10 倍、20 倍。造模后第 2 天起灌胃, 每日一次, 连续 21 d。

1.7 观察指标及方法

接种后观察肿瘤移植成功率、生长潜伏期, 动物进食与活动度, 排泄物等。全部动物末次灌药第 2 天断颈处死, 完整取出肿瘤, 剥离瘤体后称重 (W), 计算抑瘤率 (I): $I = (\text{对照组 } W - \text{治疗组 } W) / \text{对照组 } W \times 100\%$ 。

1.8 肿瘤组织 E 钙黏附素的检测

瘤体取下后经 10% 福尔马林固定, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋后, 行 E 钙黏附素单抗的免疫组化染色。免疫组化 ABC 法具体操作按试剂盒说明进行^[4-5], E-cad 呈棕黄色染色, 阳性数 $> 60\%$ 为阳性, 否则为阴性。

1.9 统计学方法

计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 计数资料以百分率表示。计量资料两组间比较用 *t* 检验, 计数资料两组间比较用 Fisher's Exact Test 检验。以 $P < 0.05$ 为显著性差异, *P*

<0.01 为非常显著性差异。使用 SPSS 9.0 统计软件包。

2 结果

2.1 一般状况观察

裸鼠接种后第 7 天,生理盐水组有一只裸鼠右腋背部首先长出肿瘤结节,随后 3 d 内各用药组均有裸鼠长出肿瘤结节。生理盐水组瘤体生长较快,FFTLG 高剂量组生长最慢,瘤体出现相对较晚。在后期,生理盐水组裸鼠较为消瘦。饮食、活动方面各组无明显差异。试验过程中,实验组的低、中剂量组各 1 只裸鼠因灌胃不当死亡。

2.2 各组用药对人肺巨细胞癌的抑制作用

FFTLG 三个剂量组对裸鼠 PG 实体瘤均有抑制作用,抑瘤率均大于 25%,低剂量用药组和中剂量用药组与生理盐水组对比有显著性差异 ($P < 0.05$)。高剂量用药组与生理盐水组对比有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。FFTLG 抑瘤率似呈剂量依赖。结果见表 1。

表 1 各组裸鼠瘤重及抑瘤率比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Weight of tumor and the rate of anticancer compared between each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	瘤重 /g	抑瘤率 /%
NS组	7	1.15 $\pm$ 0.22	--
低剂量组	6	0.85 $\pm$ 0.16 ¹⁾	25.57
中剂量组	6	0.83 $\pm$ 0.11 ¹⁾	27.63
高剂量组	7	0.76 $\pm$ 0.13 ²⁾	33.64

注:与 NS 组比较,¹⁾ $P < 0.05$;与 NS 组比较,²⁾ $P < 0.01$
Note: Compared with the NS group,¹⁾ $P < 0.05$; Compared with the NS group,²⁾ $P < 0.01$

2.3 各组用药对人肺巨细胞癌 E 钙黏素表达的影响

E-cad 呈棕黄色染色,以间质和胞膜着色为主,有的胞膜及近胞膜的胞浆均着色。高、中剂量组表达较多,NS 组表达较少或几乎不表达,各给药组阳性例数与 NS 组比较均与统计学意义,其中低剂量组与 NS 组对比无显著性差异 ($P > 0.05$),中、高剂量组与 NS 组对比有显著性差异 ($P < 0.05$)。结果见表 2。提示 FFTLG 可以上调人肺巨细胞癌 E-cad 的表达,高剂量作用更明显。试验中发现,E-cad 有表达的标本其 Cx43 都有表达,E-cad 表达高的标本其 Cx43 表达也相对较强(已另文报道)。

表 2 各组裸鼠种植瘤 E 钙黏附素表达比较

Tab 2 Expression of E-cad compared between each group

组别	例数	E-cad		P 值
		阳性例数	阳性率 /%	
NS组	7	1	16.7	
低剂量组	6	4	66.7	$P > 0.05$
中剂量组	6	5	83.3	$P < 0.05$
高剂量组	7	6	85.7	$P < 0.05$

3 讨论

复方藤梨根制剂是作者在前人经验的基础上,又经过长期的临床实践并通过实验研究证实治疗多种实体肿瘤有效的经验方,它符合中医学有关肿瘤治疗需扶正祛邪并用的理

论,它的药效机制很广泛^[6-7],对原发肿瘤的生长抑制作用,有一定的抗肿瘤转移、部分逆转肿瘤细胞的多药耐药等作用。

E-cad(epithelial cadherin)是相对分子质量为 1.2×10^5 的细胞黏附跨膜糖蛋白,普遍存在于各类上皮细胞,是介导同型细胞连接的钙依赖性黏附分子。它在胚胎发育、形态发生、上皮极性和维持上皮完整性等方面起着重要作用。大量研究表明,E-cad 低表达或缺失使肿瘤细胞丧失接触抑制,可导致细胞无限制增殖,失去分化,细胞之间连接松散,易于从局部脱落,有较强的侵袭能力,极易扩散和转移^[8]。

本试验研究 E-cad 呈棕黄色染色,以胞膜着色为主,有的胞膜及近胞膜的胞浆均着色。高、中剂量组表达较多,NS 组表达几乎没有。各给药组与 NS 组比较均与统计学意义,其中低剂量组与 NS 组对比无显著性差异 ($P > 0.05$),中、高剂量组与 NS 组对比有显著性差异 ($P < 0.05$)。提示 FFTLG 可以上调人肺巨细胞癌 E-cad 的表达,并与用量呈正相关趋势。试验中发现,所有 E-cad 表达阳性的标本都有 Cx43 免疫阳性反应,E-cad 表达越多 Cx43 表达愈强,Cx43 的表达与 E-cad 表达有正相关趋势,提示 FFTLG 可能通过上调 E-cad 表达促进 Cx43 的表达;这与体外研究结果一致^[9]。而少数有 Cx43 表达阳性的标本却没有 E-cad 阳性表达,提示在介导黏附和建立通讯功能中除了 E-cad 外,FFTLG 还可能通过其他一些黏附分子或物质在起作用^[10],其具体机制有待进一步探讨。

REFERENCES

[1] KRUTOVSKI KH V A, TROYANOVSKY S M, PICCOLI C, et al. Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein connexin43 on tumor cell growth in vivo[J]. Oncogen, 2000, 19(4): 505-513.

[2] YAMASAKI H, MESNIL M, OMORI Y, et al. Intercellular communication and carcinogenesis[J]. Mutat Res, 1995, 333(1-2): 181-188.

[3] ZHU W Y, ZHEGN J, FANG W G, et al. Isolation and characterization of human lung cancer cell subline with different metastatic potential[J]. Chin J Pathol(中华病理学杂志), 1995, 24(3): 165-167.

[4] WANG B Y, LI Y S, HUANG G S. The Technique of Pathology(病理学技术)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000: 354-437.

[5] XU L Z. Technology of Practical Oncopathology(实用肿瘤病理方法学)[M]. Shanghai: Shanghai Medicine University Publishing House, 1997: 161-175.

[6] GUO Y, XIE C S, FENG Z Q. The study of effects on accumulation and efflux of intracellular adrimycin with FFTLG for multidrug resistant cell lines K562/ADR and K562/VCR in vitro[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2002, 19(4): 42-45.

[7] LIN L, WANG Z S, YU L X. The study on role of the SanGen fomular to anti-carcinomas with Lewis lung cancer[J]. J Zhejiang

Tradit Chin Med Coll(浙江中医学院学报), 1995, 519(1): 37-39.

[8] HASHIMOTO M, NIWA O, NITLA Y, *et al.* Unstable expression of E-cadherin adhesion molecules in metastatic ovarian tumor cells[J]. Cancer Res, 1989, 80: 459-461.

[9] YAO Q H, GUO Y, YANG W H. The study of the effect of Fufang Tengligen mixture on Cx43 expression in lung cancer cellline

[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学杂志), 2006, 23(6): 435-438.

[10] ABUDARA V, GARCES G, SAE J C. Cells of the carotid body express connexin43 which is up-regulated by CAMP[J]. Brain Res, 1999, 849(1-2): 25-33.

收稿日期: 2007-01-26