

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.11.008

消癌平对荷瘤昆明小鼠细胞间黏附因子的影响

赵和平, 刘燕燕

Effect of Xiao-ai-ping(XAP) on Adhesion Molecule-1 Kunming Mice Bearing H22

ZHAO He-ping, LIU Yan-yan

Department of oncology, The First Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Abstract: Objective To observe the effect of Xiaoaiping on expression of adhesion molecule-1 in mice. **Methods**

Liver cancer cells(H22) were transplanted subcutaneously into Kunming mice right armpit to establish experimental model. 50 mice were randomly divided into 5 groups as well as normal group. XAP with 0.01 ml/(g · d), 0.02 ml/(g · d) and 0.04 ml/(g · d) doses (low, medium and high doses) was intraperitoneally injected d1~14. The negative control treated by saline, and positive control group was injected 5-Fu by 5~20 mg/(kg · d) d1~7. ELISA was used to test sICAM-1 level, calculation spleen index and inhibition rate. **Results** The tumor inhibition rates in low, medium and high-dose groups injected with XAP were 20.7%, 31.6%, 38.63% respectively, and higher than that in negative control group, while the high-dose group was similar to positive control group (45.97%). Compared with negative control group, spleen index in each research groups were increased statistically($P < 0.05$); and similar to positive control group ($P > 0.05$). Secretion capacities in Low, medium and high-dose group were (53.26 ± 9.36) ng/L, (35.75 ± 11.16) ng/L, (29.13 ± 8.52) ng/L respectively and more decreased, compared with negative group ($P < 0.05$). No obvious difference was observed between the high-dosage group and the positive group ($P > 0.05$). **Conclusion** Xiaoaiping inhibited tumor growth, and improve immune function, through reducing the expression of serum cell adhesion molecule-1 in tumor-bearing mice.

Key words: Xiaoaiping; Kunming mice bearing H22; sICAM-1; Metastasis

摘要:目的 探讨消癌平对荷 H22 小鼠抑瘤率、脾指数的影响,并检测血清中细胞黏附分子-1(ICAM-1)的表达。**方法** 雌性昆明小鼠 55 只,其中 5 只正常饲养,50 只建立荷 H22 昆明小鼠模型,随机分为 5 组:阴性对照组、阳性对照组、消癌平低、中、高剂量组。消癌平低、中、高剂量组分别按 0.01、0.02、0.04 ml/g 剂量连续腹腔注射 14 天;阴性对照组予等体积的 0.9%氯化钠溶液,腹腔注射 14 天;阳性对照组,给予腹腔注射 5-Fu,20 mg/(kg · d),连续 7 天。采用 ELISA 法检测小鼠血清 sICAM-1 的变化,计算各组的抑瘤率及脾指数。**结果** 消癌平注射液对 H22 荷瘤小鼠具有明显的抑瘤作用,低、中、高剂量组抑瘤率分别为:20.7%、31.6%、38.63%;与阴性对照组平均瘤重相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);消癌平各剂量组脾指数与阴性对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),而阳性对照组差异无统计学意义($P > 0.05$);血清 sICAM-1 的表达:消癌平低、中、高剂量组的分泌量分别为: (53.26 ± 9.36) ng/L、 (35.75 ± 11.16) ng/L、 (29.13 ± 8.52) ng/L;与阴性对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);高剂量组与阳性对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);与正常小鼠相比,各组差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 中药消癌平可以抑制肿瘤的生长,并可改善机体的免疫功能,同时降低荷瘤小鼠血清中细胞黏附分子-1 的表达,达到抑制肿瘤转移的目的。

关键词: 消癌平; 荷 H22 昆明小鼠; 可溶性细胞间黏附因子-1; 转移

中图分类号: R73-36; R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)11-1249-04

收稿日期:2011-05-11;修回日期:2011-07-22

作者单位:030001 太原,山西医科大学第一临床医学院肿瘤科

作者简介:赵和平(1954-),男,本科,教授,主要从事消化道肿瘤的研究

0 引言

原发性肝癌是我国常见恶性肿瘤之一,其死亡率在消化系统恶性肿瘤中居第三位^[1],严重威胁人类的健康和生命。肝癌早期症状多不明显,大部分

患者就诊时已属中晚期,失去了手术治疗的最佳时机,此时患者处于“带瘤生存”状态,抑制或者延缓肝癌的侵袭转移成为治疗的首要目的。中药消癌平为临床常用的抗癌药物,有高效低毒的特点,能有效抑制多种肿瘤的生长,延长患者的生存期并有效改善生存质量^[2]。本实验通过观察消癌平在体内外实验中对肝癌细胞侵袭转移的影响,探讨其可能的抗侵袭转移机制,为临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雌性清洁级昆明小鼠 55 只,体重 17~22 g,周龄 4~6 周,由山西省肿瘤医院提供。

1.1.2 瘤细胞株 小鼠肝癌细胞系 H22 细胞株,由山西省肿瘤医院研究所提供。

1.1.3 药品 消癌平注射液:南京圣和药业有限公司,生产批号:200909181;5-氟尿嘧啶(5-Fluorouracil, 5-Fu, 0.25 g/10 ml);上海旭东海普药业有限公司,生产批号:100409。

1.1.4 试剂及器材 sICAM ELISA 试剂盒 上海森雄科技有限公司,产品编号: SXM066;游标卡尺(0~150 mm):中国上海,型号 60104;AY220 型分析天平:日本 Shimadzu 公司产品。

1.2 实验方法

构建小鼠肝癌荷瘤模型,随机分为 5 组,每组 10 只,另 5 只正常饲养。消癌平低、中、高剂量组分别给予消癌平注射液 0.01 ml/g、0.02 ml/g、0.04 ml/g;阳性对照组给予 5-Fu 20 mg/(kg·d)^[3];阴性对照组给予等体积无菌 0.9%氯化钠溶液;均连续腹腔给药 14 天。称瘤重、脾重分别计算抑瘤率和脾指数;ELISA 法检测血清可溶性细胞间黏附分子-1(sICAM-1)水平。

1.3 统计学方法

应用 SPSS16.0 软件进行统计学分析,所有数据以均数±标准差表示。组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验和方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物大体情况

实验观察模型组小鼠出现精神萎靡、弓背、竖毛等现象;消癌平各剂量组活动度、反应性等无明显变化;5-Fu 组表现出行动迟缓、反应迟钝及皮毛失去光泽等不良反应。部分瘤体生长迅速,出现坏死。

2.2 大体及病理观察

肿瘤与周围肝组织间界线模糊,呈侵袭性生长,可侵袭至胸骨、锁骨,难以剥离。瘤组织剖面为鱼肉样,较大的瘤组织中央可见液化性坏死区。光学显微镜下阴性对照组肿瘤细胞不规则形,细胞分化差,核大,深染,核质比大,核分裂象多见;消癌平注射液中剂量组肿瘤细胞大小不一,可见片状坏死区以及核固缩、核碎裂等细胞形态学变化,见图 1,2。

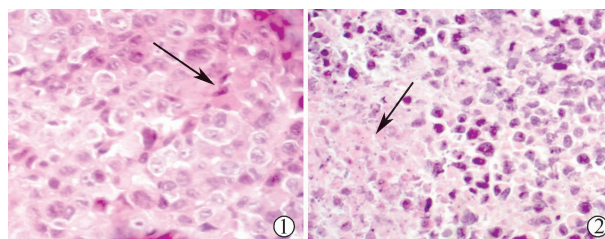


图 1 肝癌细胞核固缩($\times 200$)

Figure 1 Hepatoma nucleic pyknosis($\times 200$)

图 2 肝癌组织坏死($\times 200$)

Figure 2 Hepatoma nucleic necrosis($\times 200$)

2.3 脾指数

消癌平各剂量组可显著提高荷瘤小鼠脾指数,与阴性对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$);阳性对照组用药前后脾脏改变不明显,与消癌平各组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。表明消癌平可能通过改善小鼠的免疫功能来增强机体的抗肿瘤作用,见表 1。

表 1 各组昆明 H22 实体瘤小鼠的脾指数($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The spleen index in each group ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Spleen index
Negative control	5	0.046 ± 0.008
XAP with low dosage	9	0.076 ± 0.011* Δ
XAP with moderate dosage	9	0.099 ± 0.01* Δ
XAP with high dosage	9	0.125 ± 0.038* Δ
Positive control	8	0.062 ± 0.012

Note: *: $P<0.05$ vs. negative control group; Δ : $P<0.05$ vs. positive control group

2.4 抑瘤率

消癌平注射液对 H22 荷瘤小鼠具有明显的抑瘤效应,低、中、高剂量组抑瘤率分别为 20.7%、31.6%、38.6%,各组较阴性对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),抑瘤率呈剂量依赖性,见表 2。5-Fu 组抑瘤率为 45.97%,与高剂量组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 各组的抑瘤率 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The tumor inhibition rates in each groups ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Tumor weights (g)	Inhibition rates(%)
Negative control	5	7.92 ± 0.48	—
XAP with low dosage	9	6.28 ± 0.54	20.7*△
XAP with moderate dosage	9	5.41 ± 0.38	31.6**△
XAP with high dosage	9	4.86 ± 0.61	38.6***
Positive control	8	4.20 ± 0.59	45.97***

Note : * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ vs. negative control group, △ : $P < 0.05$ vs. positive control group

2.5 血清 sICAM-1 的表达

消癌平低、中、高剂量组血清中 sICAM-1 的表达分别为: (53.26 ± 9.36) ng/L、(35.75 ± 11.16) ng/L、(29.13 ± 8.52) ng/L。与正常小鼠相比, 各组均有差异; 与阴性对照组相比, 消癌平低、中、高剂量组差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 高剂量组与阳性对照组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 中、低剂量与阳性对照相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 各组昆明 H22 荷瘤小鼠血清 sICAM-1 值

Table 3 The sICAM-1 in each group ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	sICAM-1 (ng/L)
Negative control	5	62.48 ± 16.16△#
XAP with low dosage	9	53.26 ± 9.36*△#
XAP with moderate dosage	9	35.75 ± 11.16**△#
XAP with high dosage	9	29.13 ± 8.52***#
Positive control	8	25.01 ± 3.47***#
Normal control	5	18.02 ± 7.92***△

Note : * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ vs. negative control group, △ : $P < 0.05$ vs. positive control group, # : $P < 0.01$ vs. normal control group

3 讨论

消癌平注射液是乌骨藤的灭菌水溶剂。乌骨藤成分主要有苷类、糖类、有机酸及其他。现代药理研究发现^[4]: 乌骨藤中独特的化学成分“新 C21 甾体苷”具有诱导和促使微管蛋白聚合、微管装配与微管稳定的独特作用机制, 从而彻底铲除肿瘤细胞有丝分裂的原生动力。前期实验已证实, 消癌平在细胞水平可以抑制肝癌细胞的运动, 从而可能达到抑制肿瘤转移的目的。氟尿嘧啶 (5-Fu) 为作用于细胞周期特异性药, 临床上常用于肝癌的治疗。那么, 中药消癌平在肝癌的治疗过程中扮演怎样的角色?

细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecular-1, ICAM-1) 属于免疫球蛋白超基因家族成员, 其配体有淋巴细胞功能相关抗原-1 (lymphocyte

function-associated antigen-1, LFA-1) (CD11a/CD18) 和巨噬细胞抗原复合体-1 (Mac-1) (CD11b/CD18)^[5]。研究证实: ICAM-1 可表达于多种癌细胞表面, 发挥机体免疫系统抗肿瘤作用; 癌细胞表面的 LFA-1 与淋巴管内皮细胞表面的 ICAM-1 特异性结合, 有利于转移的形成^[6]。ICAM-1 在各种因素作用下, 膜外部分脱落入血, 成为可溶性形式 sICAM-1 (soluble ICAM-1, sICAM-1), 仍有结合配体的能力并发挥作用。sICAM-1 可能通过以下机制协助肿瘤转移^[7]: (1) 血清中 sICAM-1 的升高可反映细胞上 ICAM-1 的表达状况^[8], 它的存在封闭了循环中 T 淋巴细胞表面的 LFA-1 和巨噬细胞的 MAC-1 的受体, 使其丧失了对肿瘤抗原的提呈作用和对肿瘤细胞的细胞毒性作用。可以说, sICAM-1 可干扰宿主免疫监视系统, 阻止免疫细胞与肿瘤细胞有效黏附^[9], 有利于肿瘤侵袭发展并形成转移^[10]。(2) 与带有 LFA-1 的可游走的淋巴细胞结合、入血, 有利于癌细胞的转运。(3) ICAM-1 的 DNA 序列中第 341~404 残基区存在与 C3、C4 封闭蛋白一致的序列。抗体封闭实验表明, ICAM-1 的作用可能与其对 C3 的封闭作用有关。因此, sICAM-1 可能帮助肿瘤细胞逃避机体的免疫监测, 从而为侵袭转移创造了条件。

本实验选用的荷 H22 昆明小鼠皮下移植性肝癌模型, 是目前国内外用于抗肿瘤药物筛选的最常见模型^[11], 具有与人肝癌相似的恶性行为与特征。因此, 从某种程度上讲可以体现消癌平抗侵袭转移的能力。实验观察消癌平可不同程度上减慢瘤体的生长, 与阴性对照组相比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 5-Fu 组抑瘤率为 45.97%, 与高剂量组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。消癌平各剂量组的脾指数与阴性对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与 5-Fu 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。提示 5-Fu 对肝癌有明显的抑制作用, 但同时存在着化疗药物的不良反应: 如行动迟缓、反应迟钝及皮毛失去光泽等。消癌平在抑制肿瘤生长的同时可动员机体免疫功能, 达到抑制肿瘤的侵袭转移的目的。本实验发现: 阴性对照组取标本时, 肿瘤周围存在水肿, 考虑宿主组织间质水肿可使瘤细胞分离, 减少局部宿主组织结构的抵抗, 有利于瘤细胞向宿主组织侵袭, 为肿瘤转移到淋巴道或血道提供有利条件。

sICAM-1 的表达随着消癌平剂量的增加减少, 且各组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示: 消癌平可能一方面通过直接抑制肿瘤细胞的增殖而达到减少 sICAM-1 的分泌, 另一方面, 脾指数的增加

表明消癌平可以调节机体的免疫功能,增强效应细胞的功能活性,并可能通过诱导内源性的白细胞介素、TNF、干扰素等细胞因子来调节机体免疫功能,进而发挥抑瘤作用抑制肿瘤的侵袭转移^[12];阳性对照组的抑瘤效果明显,但其不良反应更体现了消癌平抗肿瘤的优越性。在某种意义上讲,sICAM-1 的降低可能提示患者预后较其升高或不变化者好,但具体结论尚须进一步研究。此研究与王金果等^[13]的中药甲乙煎的动物实验研究中降低局部瘤组织中细胞黏附分子的表达水平结论相似。总之,消癌平可通过直接抑瘤或通过调动机体积极抗瘤以达到抗侵袭转移的目的,但是其作用的机制具体是什么,上、下游具体通路是什么,还有待于进一步研究。因此,ICAM-1 可能为抗侵袭转移治疗的靶点、并且可能为判断疾病预后提供一定的价值。

参考文献:

- [1] 刘厚钰.原发性肝癌 [M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,2005: 450-457.
- [2] 唐东平,韦长元,唐凯,等.康莱特注射液对肝癌化疗增敏作用的实验研究[J]. 肿瘤防治杂志,2001,8(4): 396-397.
- [3] Ozel L, Ozel MS, Toros AB, et al. Effect of early preoperative 5-fluorouracil on the integrity of colonic anastomoses in rats [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(33): 4156-4162.
- [4] 蒋毅,罗思齐. 通关藤中新 C₂₁-甾体甙的化学结构研究[J]. 中国医药工业杂志, 1996, 27(9): 391-395.
- [5] 官成浓,杨丰,银正民,等. 原发性肝癌患者血清可溶性细胞间粘附分子-1 的测定及其临床意义[J]. 实用癌症杂志, 2002, 17(2): 164-166.
- [6] 廖颖,赵玲辉,李晓冬,等. 小鼠移植瘤淋巴管分布及细胞间粘附分子-1 的表达[J]. 解剖学杂志, 2005, 28(4): 416-418.
- [7] Hallahan DE, Geng L, Shyr Y. Effects of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) null mutation on radiation-induced pulmonary fibrosis and respiratory insufficiency in mice[J]. J Natl Cancer Inst, 2002, 94(10): 733-741.
- [8] Salvi A, Arici B, Alghisi A, et al. RNA interference against urokinase in hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice [J]. Tumour Biol, 2007, 28(1): 16-26.
- [9] 束美宝,项建杰,魏启春,等. 肺癌血 sICAM-1 和 TNF- α 水平检测及其临床意义[J]. 浙江医学, 2002, 24(7): 392-394.
- [10] 孙婧璟,周信达,刘银坤,等. 肝癌组织中细胞间粘着分子-1 的表达与肝癌侵袭转移关系的研究[J]. 中国癌症杂志, 1997, 7(3): 161-164.
- [11] 李海燕,方肇勤,梁尚华. 小鼠移植性肝癌(H22)模型的研究及在中医药抗肿瘤中的应用[J]. 中国中医基础医学杂志, 2000, 6(1): 27-29.
- [12] 陈润涛,陈秉,夏源,等. 性别对荷 H22 肝癌小鼠肿瘤生长的影响[J]. 中国职业医学, 2008, 35(4): 283-285.
- [13] 王金果,刘亚娟. 甲乙煎影响 H22 小鼠肝癌组织黏附分子 CD54 表达的实验研究[J]. 河北中医, 2009, 31(5): 756-758.

[编辑:黄国珍;校对:周永红]

• 简讯 •

《实用肿瘤学杂志》征订启事

《实用肿瘤学杂志》是 1987 年创刊,由东北三省肿瘤防治办公室合办的肿瘤专业性学术期刊,于 2009 年 6 月被“中国科技论文统计源期刊”收录,现为中国科技核心期刊。本刊公开发行,中国标准刊号:CN23-1212/R,ISSN1002-3070,为双月刊。栏目有:肿瘤学基础理论研究、临床研究、临床应用及边缘学科等研究的论著、论著摘要、病例报告、经验与教训、方法与技术、讲座、会议(座谈)纪要、临床病理(病例)讨论、国内外学术动态、医学见闻等栏目。读者对象为从事肿瘤专业研究及临床工作的中高级广大医务工作者。

敬请读者及作者踊跃投稿,欢迎订阅,每期定价 10.00 元,全年订价 60.00 元。需订阅者请到当地邮局订阅,邮发代号 14-159,错过订阅时间可直接向编辑部订阅,款汇至联系地址。

联系地址:黑龙江省哈尔滨市南岗区保健路 6 号

邮 编:150081

联系电话:451-86298293,86623347

E-mail: syzlxzz@126.com

传 真:0451-86665003

《实用肿瘤学杂志》编辑部