

活血药对人肺癌细胞粘附和侵袭的影响*

张培彤 裴迎霞 祁 鑫 朴炳奎

内容提要 目的:观察活血药川芎嗪、水蛭素、丹参酮ⅡA和凝血酶对高转移人巨细胞肺癌 PGCL3(简称 PGCL3)和低转移人肺腺癌 PAa(简称 PAa)细胞的粘附和侵袭的影响。方法:用不同浓度的川芎嗪、丹参酮ⅡA、水蛭素和凝血酶分别处理 PGCL3 和 PAa 细胞,观察 PGCL3 和 PAa 细胞单独或与血小板作用后对纤维粘连蛋白的粘附和 Boyden 小室的侵袭改变。结果:川芎嗪、水蛭素和凝血酶在不同程度上增加 PGCL3 细胞的粘附,而丹参酮ⅡA抑制这种粘附。川芎嗪、丹参酮ⅡA和水蛭素抑制 PGCL3 细胞对 Boyden 小室的侵袭,凝血酶明显促进这个过程。川芎嗪、丹参酮ⅡA、水蛭素抑制血小板与 PGCL3 和 PAa 细胞侵袭的协同作用,凝血酶对这个过程有促进作用。结论:活血药对肿瘤细胞的侵袭和转移可能既有抑制作用又有促进作用。

关键词 川芎嗪 水蛭素 丹参酮ⅡA 凝血酶 肺癌细胞 粘附 侵袭

Influence of Blood-Activating Drugs on Adhesion and Invasion of Cells in Lung Cancer Patients Zhang Peitong, Pei Yingxia, Qi Xin, et al *Guang'anmen Hospital, China Academy of TCM, Beijing (100053)*

Objective: To investigate the influence of some blood-activating drugs like Tetramethylpyrazine, Tanshinone II A, Hirudin and thrombin on adhesive and invasive behavior of PGCL3 and PAa cell lines. **Methods:** Using the above-mentioned blood-activating drugs in various concentration to treat PGCL3 and PAa cells, and the changes in adhesion to fibronectin and invasion in Boyden Chamber of these cells, alone or after interacted with human platelets, were observed. **Results:** Tetramethylpyrazine, Hirudin and thrombin could increase the adhesion of cells to fibronectin and Tanshinone II A decrease it. Tetramethylpyrazine, Tanshinone II A and Hirudin inhibited the invasion of PGCL3 cells in Boyden Chamber, and thrombin augmented the process. **Conclusion:** The blood-activating drugs may either inhibit or promote the invasion and metastasis of PGCL3 and PAa cells in the light of various conditions.

Key words Tetramethylpyrazine, Hirudin, Tanshinone II A, thrombin, lung cancer cell, adhesion, invasion

肿瘤细胞对内皮下基质的粘附和侵袭是肿瘤转移的重要步骤。活血药物对肿瘤侵袭和转移究竟是抑制还是促进,目前没有一致的意见。本实验检查高转移人巨细胞肺癌 PGCL3(简称 PGCL3)和低转移人肺腺癌 PAa(简称 PAa)细胞对纤维粘连蛋白(fibronectin)包被的 96 孔细胞培养板的粘附能力,以及川芎嗪、水蛭素、丹参酮ⅡA、凝血酶对这个粘附作用的影响。检查 PGCL3 和 PAa 细胞以及血小板与 PGCL3、PAa 相互作用后 PGCL3 和 PAa 对铺有 Matrigel 微孔滤膜的 Boyden 小室的侵袭穿透能力,同时观察不同浓度川芎嗪、水蛭素、丹参酮ⅡA 和凝血酶对这个过程的影响。

材料和方法

1 材料

PGCL3 为人巨细胞肺癌细胞系,PAa 为人肺腺癌细胞系,分别在裸鼠体内具有较高和较低的转移能力^{〔1〕},二者均来自北京医科大学病理教研室;培养在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中。NIH3T3 细胞来自北京医科大学病理教研室,培养在含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,待细胞铺满瓶底 80% 时更换固定体积的新培养液,24h 后收集培养上清备用。纤维粘连蛋白由北京医科大学细胞生物学系提供;川芎嗪、丹参酮ⅡA 由中国医学科学院药物及生物制品检定所提供;水蛭素、Apyrase 均为 Sigma 产品;Matrigel 来自北京医科大学细胞生物学系;直径 12mm,孔径 8 μ m 微孔聚碳膜为 Millipore 产品。

* 国家自然科学基金资助课题(No.39670912)

中国中医研究院广安门医院(北京 100053)

2 方法

2.1 PGCL3 细胞铺满瓶底 80% 时, 用胰蛋白酶 EDTANa₂ 消化细胞后, 用无血清 RPMI1640 培养液洗 2 次备用。将细胞分别用不同浓度川芎嗪、丹参酮 II A、水蛭素、凝血酶处理 (37℃, 20min)。取 96 孔培养板, 每孔加入浓度为 20mg/L 的纤维粘连蛋白 50μl, 在超净台过夜风干后放 4℃ 冰箱备用, 用前以无血清 RPMI1640 湿润。每孔加入处理过的细胞 250μl, 细胞数为 2.5×10^4 , 37℃, 5% CO₂ 条件下孵育, 观察不同时间点 PGCL3 细胞对纤维粘连蛋白包被的 96 孔培养板的粘附能力。采用 Nikon 倒置显微镜在恒定区域计数, 每个设 3 个平行孔观察, 每次试验重复至少 3 次。粘附抑制率计算公式如下:

$$\text{粘附抑制率}(\%) = \frac{\text{对照孔粘附细胞数均值} - \text{处理孔粘附细胞数均值}}{\text{对照孔粘附细胞数均值}} \times 100\%$$

2.2 将 NIH 3T3 细胞培养上清液作为化学趋化物加入 Boyden 小室下室, 在上下室之间加入微孔聚碳膜, 该膜预先铺好 Matrigel 50μg, 在每个小室上室加入 2×10^5 个 PGCL3 或 PAa 细胞。细胞用不同浓度的川芎嗪、丹参酮 II A、水蛭素、凝血酶或相应溶媒在 37℃ 处理 20min 后加入小室上室, 在 37℃ 5% CO₂ 中孵育。反应结束后擦去膜上未穿过的细胞, 将膜以甲醇固定, Gimsa 染色, 显微镜下观察并计数全部细胞, 每组细胞设 3 个样本 (并设 3 个平行空白小室做对照), 重复两次, 观察肿瘤细胞与人血小板 (PLT) 相互作用后对 Boyden 小室的浸润能力时, 抽取健康人静脉血, 以 3.8% 柠檬酸钠抗凝 1:4 (v/v) 分离富血小板 (PRP) 后, 加入 150u/L 的 Apyrase, 然后以 EDTANa₂ D-Hank's 洗涤 2 次, 复悬于 HEPES Buffer (pH=7.4) 中计数备用。小室上室肿瘤细胞浓度为 5×10^8 /L, 血小板浓度为 1×10^{10} /L。当观察川芎嗪、丹参酮 II A、水蛭素、凝血酶对肿瘤细胞与人血小板作用的影响时, 上室药液的终浓度川芎嗪、丹参酮 II A 分别为 2.5mg/L、10mg/L、20mg/L, 水蛭素、凝血酶分别为 50u/L、500u/L、1000u/L。计算不同药物对 PGCL3 细胞侵袭抑制率的公式如下:

$$\text{侵袭抑制率}(\%) = \frac{\text{对照小室穿膜细胞数均值} - \text{处理小室穿膜细胞数均值}}{\text{对照小室穿膜细胞数均值}} \times 100\%$$

结 果

1 各种活血药对 PGCL3 细胞对纤维粘连蛋白基质粘附的影响 PGCL3 细胞对纤维粘连蛋白基质的粘附时间点以 2h 为最佳, 故每次实验均取 2h 进行观察。川芎嗪、水蛭素、凝血酶在不同程度上有增加 PGCL3 细胞粘附的作用, 而丹参酮 II A 对细胞的粘附

有抑制作用。2.5mg/L、10mg/L、20mg/L 浓度的川芎嗪对 PGCL3 细胞粘附率的增加分别为 17.67%、24.61% 和 41.16%; 50u/L、500u/L 和 1000u/L 的水蛭素和凝血酶对 PGCL3 细胞粘附率的增加分别达到 17.52%、47.18%、80.80% 和 12.43%、40.40%、83.33%; 丹参酮 II A 对 PGCL3 细胞粘附的抑制率分别为 9.16%、32.53% 和 80.96%。

2 各种活血药对 PGCL3、PAa 细胞单独或与血小板相互作用后侵袭能力的影响 见表 1。PGCL3 细胞穿膜数目最多的时间位在 6h, 而 PAa 细胞穿膜数目最多的时间位点是 8h, 当这两种细胞与人血小板相互作用后, PGCL3 细胞穿膜细胞数目最多的时间位点由原来的 6h 提前至 4h; PAa 细胞的穿膜高峰也有提前, 但在 8h 的时候, 细胞的穿膜数量仍然很高。似乎 PAa 细胞与血小板相互作用后穿膜能力的提高比 PGCL3 细胞还要明显一些。同 PAa 细胞比较, PGCL3 细胞与血小板相互作用后穿膜高峰期比较集中, 而 PAa 细胞穿膜的延续时间相对较长。无血小板参与时, 下述 PGCL3 细胞的实验选取 6h, PAa 细胞选取 8h 作为反应终止时间; 有血小板参与时, PGCL3 细胞反应终止时间为 4h, PAa 细胞为 6h。川芎嗪、丹参酮 II A、水蛭素对 PGCL3 细胞的穿膜能力有抑制作用, 凝血酶对 PGCL3 细胞的穿膜能力有明显的增强作用 (见表 2、3)。川芎嗪、丹参酮 II A、水蛭素对血小板与 PGCL3 细胞或与 PAa 细胞的侵袭协同作用有抑制作用; 凝血酶则对血小板与 PGCL3 细胞侵袭协同作用有明显的增强作用 (见表 4、5)。

表 1 PGCL3、PAa 细胞在不同时间点的穿膜细胞数目的结果 (个/膜)

组别	2	4	6	8	10	24h(h)
PGCL3	未做	192	1406	492	192	不能看到完整的细胞形态
PGCL3 加 PLT	844	1337	616	492	—	未做
PAa	未做	152	177	878	480	未做
PAa 加 PLT	未做	676	1506	1632	1168	未做

表 2 两药不同浓度对 PGCL3 细胞的侵袭抑制率 (%)

组别	2.5	10	20(mg/L)
川芎嗪	26.70	50.90	39.70
丹参酮 II A	18.66	49.79	68.56

表 3 两药不同浓度对 PGCL3 细胞的侵袭抑制率 (%)

组别	50	500	1000(u/L)
水蛭素	26.80	49.10	80.10
凝血酶	-46.25	-80.52	-60.71

表 4 两药对 PGCL3 和 PAa 细胞与血小板作用协同侵袭的抑制率(%)

组别		2.5	10	20(mg/L)
川芎嗪	PGCL3	46.26	55.31	58.91
	PGCL3 加 PAa	43.87	42.06	74.61
丹参酮 II A	PGCL3	23.80	60.60	73.03
	PGCL3 加 PAa	26.05	39.50	61.46

表 5 两药对 PGCL3 和 PAa 细胞与血小板作用协同侵袭的抑制率(%)

组别		50	500	1000(u/L)
水蛭素	PGCL3	24.33	49.69	67.53
	PGCL3 加 PAa	45.72	48.68	54.67
凝血酶	PGCL3	-46.78	-90.23	-68.89
	PGCL3 加 PAa	-50.33	-85.98	-77.77

讨 论

肿瘤细胞自原发瘤脱落,到最终在靶组织定居、增殖而形成转移灶,至少 3 次与基底膜相互作用(粘附并破坏基底膜)。阻断肿瘤细胞对基底膜的粘附和跨越是阻止肿瘤侵袭和转移的重要途径⁽²⁾。有许多不同的体外实验系统评价肿瘤细胞的侵袭能力⁽³⁾,如利用包含基底膜的组织膀胱壁、羊膜、晶体囊和鸡的绒毛膜尿囊膜的实验模型。也有人使用冻干的 IV 型胶原、层粘连蛋白和重组基底膜如 Matrigel 在 Boyden 小室和 Petri 小碟中评价肿瘤细胞的侵袭行为。培养板粘附细胞和 Boyden 浸润小室均是研究肿瘤细胞侵袭和转移行为较为简便的方法。

我们采用纤维粘连蛋白包被细胞培养板,用 Matrigel 包被 Boyden 小室中的滤膜做为模拟的基底膜屏障对在裸鼠体内高转移的人肺巨细胞癌系 PGCL3 和在裸鼠体内低转移的人肺腺癌细胞系 PAa 的侵袭转移能力进行观察。人成纤维细胞 NIH 3T3 的

培养上清包含已知的(如纤维粘连蛋白和胶原)和未知的趋化因子放置于小室的下室刺激细胞的快速穿过。

川芎嗪、水蛭素、凝血酶均有促进 PGCL3 细胞对纤维粘连蛋白的粘附作用,丹参酮 II A 对这个过程有较为明显的抑制作用。凝血酶对 PGCL3 对 Boyden 小室的侵袭有促进作用;川芎嗪、丹参酮 II A 和水蛭素则显示了抑制作用。也许水蛭素、川芎嗪、丹参酮 II A 和凝血酶对 PGCL3 的运动或分泌溶解细胞外基质酶的能力有不同影响。PGCL3 细胞对 Boyden 小室的侵袭能力要比 PAa 强。血小板明显加快两种肺癌细胞的侵袭过程,使穿膜的高峰时间提前约 2h。血小板促癌细胞侵袭的过程受到川芎嗪、丹参酮 II A、水蛭素的明显遏制,而凝血酶促进这个过程。就这个实验本身而言,我们也许可以认为 3 种活血药物在肿瘤细胞与血小板相互作用的这个促转移环节有抗转移作用,但它们在转移过程中发挥作用的利弊尚需进一步推敲。川芎嗪、水蛭素促进肿瘤细胞对纤维粘连蛋白基质粘附的现象也许意味着在某个转移环节上对肿瘤细胞转移的促进。

参 考 文 献

1. 吴秉铨,孙毓恺,郑 杰,等. 裸鼠体内建立人类高转移癌系. 中华肿瘤杂志 1985;7(5):324.
2. Nicolson GL. Metastasis; organ colonization and the cell surface properties of malignant cells. Biochim Biophys Acta 1982;695:133—176.
3. Albini A, Lwamoto Y, Kleinman HK, et al. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. Cancer Res 1987;47:3239—3245.

(收稿:1998-05-06 修回:1998-10-09)

读者·作者·编者

也谈西药也有“寒热温凉”等药性

邹世昌

《中国中西医结合杂志》1998 年第 18 卷第 1 期第 17 页中,陈康黔在“试论西药也有‘寒热温凉’等药性”一文中谈到:“西药实际上也和中药一样,是具有‘寒热温凉’等中药的药性”,我在临床中也有同样的体会。例如用青霉素治疗咽喉痛、咳嗽、痰黄稠,用药后症状消除,痰转白色,而又不出现大便硬结副作用,这样,青霉素便属于“寒凉性”药物;用四环素、土霉素后很容易出现大便硬结难解,特别是土霉素,那么这类药的药性即属“温热性”药物;红霉素用后易出现口苦、恶心、纳呆,这种副

作用表现属于中医的“湿热”性质。甲氧咪胍、雷尼替丁用药久了易出现肾阳虚的表现,这类药属“寒凉性”药物;阿托品类用后易出现心悸、面色潮红、口干、脉数,因而它是“温热性”药物。

因此,西药的选用,也可根据“辨证”来用药,以便减少副作用,使患者更易接受治疗,或在中西药结合治疗疾病时,注意两类药的药性在合用时是否需要相互协同或相互抵消,以便更切合病情,提高疗效。

(收稿:1998-05-29)