

· 实验研究 ·

丹参对肝癌转移复发防治作用的研究*

孙靖璟[△] 周信达 刘银坤

内容提要 **目的:**观察丹参对 SMMC-7721 肝癌细胞株(7721 细胞)侵袭粘附能力和对裸鼠人肝癌切除术后转移复发的影响。**方法:**以流式细胞仪测量丹参对 7721 细胞表面细胞间粘附分子-1(ICAM-1)的表达的影响。以细胞侵袭实验观察丹参对 SMMC-7721 细胞侵袭运动能力及对已与纤维连接蛋白(FN)粘附的 7721 细胞脱落的影响。以 MTT 法测量丹参对 7721 细胞与 FN 粘附的影响。以细胞粘附实验观察丹参对 7721-7721 细胞, 7721-内皮细胞, 7721-淋巴细胞之间粘附的影响。以 LCI-D20 裸鼠人肝癌转移模型为材料, 观察丹参对早期和晚期肝癌切除术后转移复发的影响。**结果:**丹参处理的 7721 细胞 ICAM-1 表达明显低于对照组, 丹参可抑制 7721 细胞的侵袭能力, 促进已粘附细胞的脱落, 可抑制 7721 与 7721 细胞、淋巴细胞、内皮细胞的粘附, 并对早期和晚期裸鼠人肝癌切除术后的肝内和远处转移复发有防治作用。**结论:**丹参可抑制 SMMC-7721 细胞的侵袭粘附能力, 防治裸鼠人肝癌切除术后的转移复发。

关键词 肝癌 肿瘤转移 粘附分子 抗粘附 丹参

Study on Preventive and Therapeutic Effect of Radix Salviae Miltiorrhizae on Recurrence and Metastasis of Liver Cancer Sun Jingjing, Zhou Xinda, Liu Yinkun *Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai (200032)*

Objective: To study the inhibitory effect of Radix Salviae Miltiorrhizae (RSM) on adhesive and invasive ability of SMMC-7721 liver cancer cells, and on the metastasis and recurrence on post-hepatectomy liver cancer in nude mice. **Methods:** Effect of RSM on SMMC-7721 cell membrane intercellular adhesive molecule-1 (ICAM-1) expression was observed by immunofluorescence flow cytometry; effect on invasive ability and of SMMC-7721 cell and the detachment of which attached to fibronectin (FN) by cell migration experiment; effect on adhesion of SMMC-7721 cell with FN by MTT method and effect on adhesion between 7721-7721, 7721-lymphocyte and 7721-endothelial cell by cell adhesion experiment. LCI-D20 human liver cancer metastasis model, after hepatectomy, was used to observe the effect of RSM on recurrence and metastasis of liver carcinoma in nude mice. **Results:** ICAM-1 expression in SMMC-7721 cells incubated with RSM was significantly lower than that in cells did not treated with RSM. RSM could inhibit the invasive ability of SMMC-7721 cell and made the cells already attached to FN exfoliated. It could also inhibit the adhesion of 7721-7721, 7721-lymphocyte and 7721-endothelial cell. And RSM showed preventive and therapeutic effect on intrahepatic and remote metastasis/recurrence of early and late human post-hepatectomy liver cancer in nude mice. **Conclusion:** RSM could inhibit the invasion and adhesion of SMMC-7721 cell and could also prevent and inhibit metastasis and recurrence of human liver cancer after hepatectomy in nude mice.

Key words liver cancer, tumor metastasis, adhesion molecule, anti-adhesion, Radix Salviae Miltiorrhizae

尽管肝癌切除术后采取了免疫治疗, 中药治疗和预防性经皮股动脉穿刺肝动脉栓塞术(TAE)等手段防

治转移复发, 但肝癌切除术后 5 年复发率仍高达 61.5%, 即使是小肝癌术后 5 年复发率也高达 43.5%⁽¹⁾。肝癌的转移复发仍然是目前影响肝癌患者预后和获得长期生存率的关键。近年来肿瘤细胞的高粘附特性直接与肿瘤的高转移特性有关引起了人们的注意⁽²⁾。本实验观察丹参对 SMMC-7721 细胞粘附能

*本课题受美国 CMB 基金(93-583)、国家自然科学基金(No. 396707)和国家“九五”攻关课题基金(96-906-01-15)资助

上海医科大学中山医院肝癌研究所(上海 200032)

[△] 现在第二军医大学东方肝胆外科医院(上海 200438)

力及转移能力的影响。

材料和方法

1 材料

1.1 SMMC-7721 肝癌细胞株引自第二军医大学,上海医科大学中山医院肝癌研究所 LCI-D20 裸鼠人肝癌高转移模型。鼠抗人 ICAM-1 单抗(R&D 公司)。羊抗鼠 FITC 二抗(BD 公司)。牛 FN 蛋白(1mg/ml, Sigma 公司)。四氮甲基唑蓝(MTT):ESRVA 进口分装。³H-TdR(上海同位素公司)。M199 培养液(GIBCO 公司),RPMI-1640 培养基(GIBCO 公司)。

1.2 LS-6500 液体闪烁计数器(Bekman 公司),FACS Calibur 流式细胞仪(Bekman 公司),3350UV 酶标仪(BioRed 公司)。

1.3 复方丹参注射液 上海第九制药厂生产,批号:950917,每支 2ml,含丹参、降香各 1g。

2 方法

2.1 流式细胞仪检测 7721 细胞膜表面 ICAM-1 表达 7721 细胞株传代后加入含有丹参 10 μ g/ml 的 RPMI-1640 细胞培养液为丹参组,对照组加入等体积的生理盐水,培养 72h。以 0.01% 的 EDTA 消化,制成细胞悬液。PBS 洗涤后,加入鼠抗人 ICAM-1 单抗(0.33mg/ml)30 μ l, 4℃, 孵育 30min 后,加入 1:40 稀释的羊抗鼠 FITC 抗体 20 μ l, 4℃ 孵育 30min。FACS Calibur 流式细胞仪检测闪烁计数值。

2.2 7721 细胞对 FN 的侵袭和粘附试验 将 7721 细胞悬液加入 FN 包被的 6 孔细胞培养板上,至细胞长满后,在底部刮出一条 2mm 宽的无细胞带。换细胞培养液,除去悬浮的细胞。在培养孔内加入丹参 10 μ g/ml,对照组加入与丹参等容量的生理盐水。在细胞生长 12、24、36h 观察无细胞带的宽度及细胞附壁情况。

2.3 MTT 法定量测定 7721 细胞与 FN 的粘附 1 $\times 10^6$ /ml 的 7721 细胞悬液加入 FN 包被的 96 孔细胞培养板上,每孔 100 μ l。同时加入 RPMI-1640 培养液 100 μ l。在培养孔内丹参组按 10 μ g/ml 加入丹参注射液,阳性对照组加入等容量的生理盐水,不加细胞为阴性对照组,每实验设计 5 复孔。37℃, CO₂ 孵育箱内 10min, 20min, 40min 后,分别倾去细胞悬液。Hank's 冲洗 3 次除去未粘附细胞。加入 5mg/ml MTT 20 μ l。37℃, CO₂ 孵育箱内 4h。倾去液体,加入 0.04N 的盐酸异丙醇 200 μ l。3350UV 酶标仪上测定各孔在 570nm 处的 OD 值,参考波长 630nm,以 OD 值代表粘

附细胞数。

2.4 内皮细胞的原代培养 取新鲜的人脐带,向脐静脉中注入 0.25% 的胰酶与 0.01% 胶原酶的混合消化液。37℃ 孵育 20min。抽取消化液,离心后弃上清,加入含 20% 灭活小牛血清、10% 灭活胎牛血清和 700mg/L ECGF 粗提物的 M199 培养液制成细胞悬液。37℃, 5% 的 CO₂ 孵育箱内培养,隔天换液 1 次。细胞融合后,0.02% EDTA 和 0.25% 胰酶等量混合的消化液消化后,按 1:3 移入新瓶传代供使用。

2.5 7721 细胞的标记 7721 细胞传代后,37℃, 5% 的 CO₂ 孵育箱内生长 24h。更换为含³H-TdR 5 μ Ci/ml 的培养液,标记 36h。Hank's 液洗涤 3 次,胰酶消化(0.25%)制成细胞悬液供使用。

2.6 细胞粘附实验 7721 细胞之间的粘附靶细胞和待测细胞均为 7721 细胞。7721 - 内皮细胞之间的粘附,内皮细胞为靶细胞,7721 细胞为待测细胞。将靶细胞传代到 96 孔板中,生长至细胞融和。每孔加入标记好的浓度为 2.5 $\times 10^5$ /ml 的待测细胞 100 μ l。丹参组加入丹参注射液 10 μ g/ml,对照组加入等体积的生理盐水,不除去未粘附的标记细胞的阳性对照,每样品设 3 复孔。37℃ 放置 20min、40min、60min、90min 后,倾去细胞。Hank's 液洗涤 3 次。胰酶消化,将细胞吸到 49# 醋酸纤维滤纸上,晾干。LS-6500 液体闪烁计数器测定闪烁值(cpm)。细胞粘附百分比 = (粘附细胞 cpm - 空白 cpm) / (总细胞 cpm - 空白 cpm)。

2.7 丹参对 LCI-D20 裸鼠人肝癌转移模型肝癌切除术后转移复发的影响 本模型肝癌接种后 19 天发生转移⁽²⁾,裸鼠肝癌 0.2cm $\times$ 0.2cm $\times$ 0.2cm 原位接种后 16 天(转移前,早期)和 22 天(转移后,晚期)分别行肝癌切除术,术后隔日皮下注射复方丹参注射液 10 μ g/ml,共 5 天。接种后 35 天,以摘眼球放血的办法处死动物,取双肺放于 10% 福尔马林溶液中固定,石蜡包埋,每个蜡块间隔 50 μ m 切取 5 μ m 厚切片 1 张,连续 10 张,双侧肺共 20 张,记录 20 张切片转移灶的总数。记录肉眼肝内转移灶数目、分布及切缘复发情况。切缘复发灶直径按(肿瘤最大径 + 与其垂直的肿瘤直径) $\div$ 2 计算。观察记录腹内转移累及部位。转移灶累及的部位 = 腹内转移累及脏器或部位的数目 + 肺转移(有转移灶为 1,无转移灶为 0) + 肝转移(有转移灶为 1,无转移灶为 0)。

结 果

1 7721 细胞膜 ICAM-1 流式细胞仪检测结果 对照组闪烁计数值为 1531.30,丹参组治疗后为

473.13。可见丹参处理后的 7721 细胞表面 ICAM-1 表达明显降低。

2 7721 细胞的侵袭能力和其与 FN 粘附的形态学观察 对照组无细胞带随时间推移逐渐缩窄最后基本消失(图 1), 丹参组细胞带在生长 36h 后仍很宽, 缩窄不明显(图 2)。对照组加入药物培养后 12h、24h、36h 细胞有少量脱落(图 3), 丹参组细胞生长欠佳, 细胞较加药前明显稀疏但细胞脱落不明显, 可能为细胞毒作用的结果(图 4)。

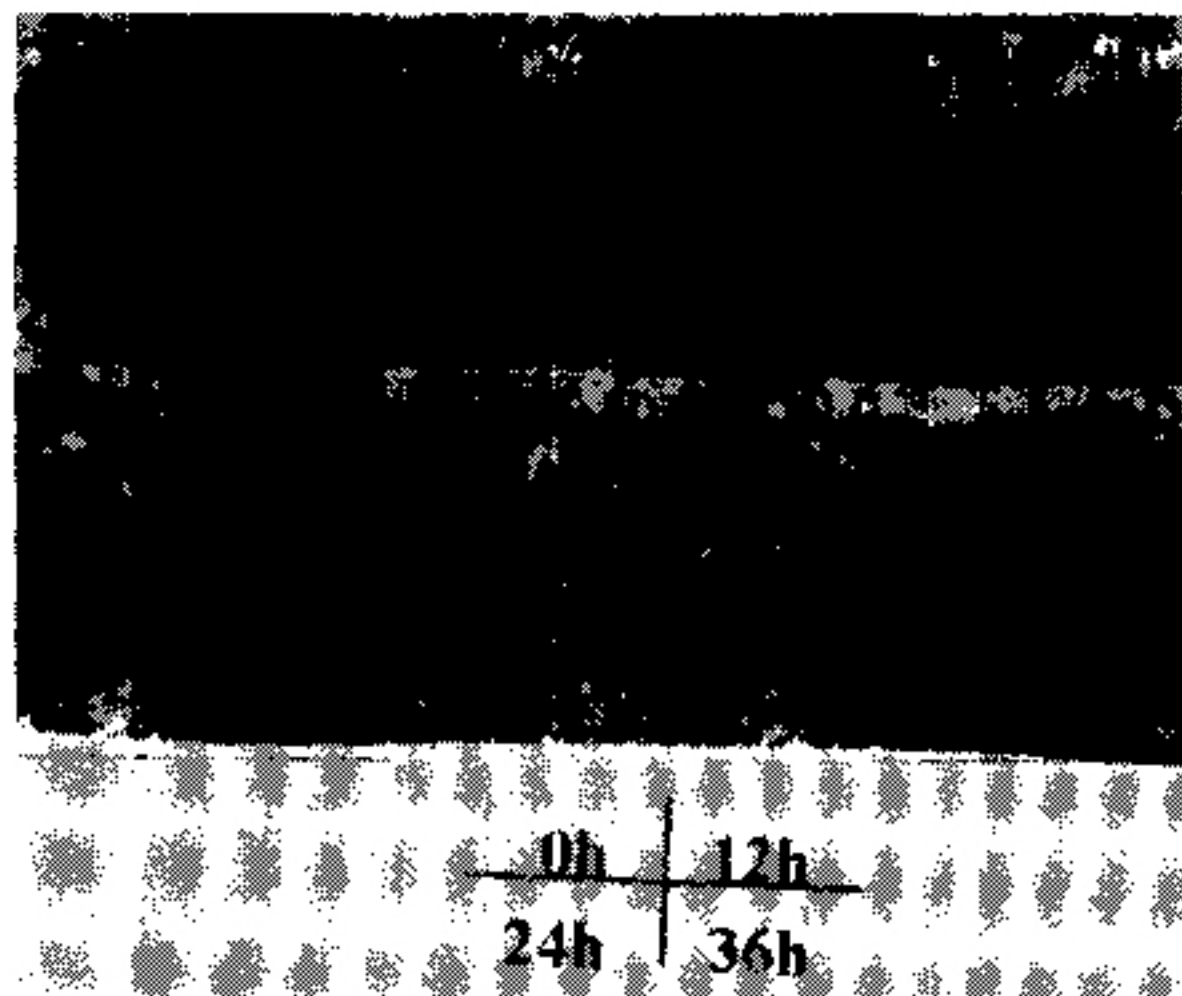


图 1 对照组 7721 细胞不同时间侵袭运动能力

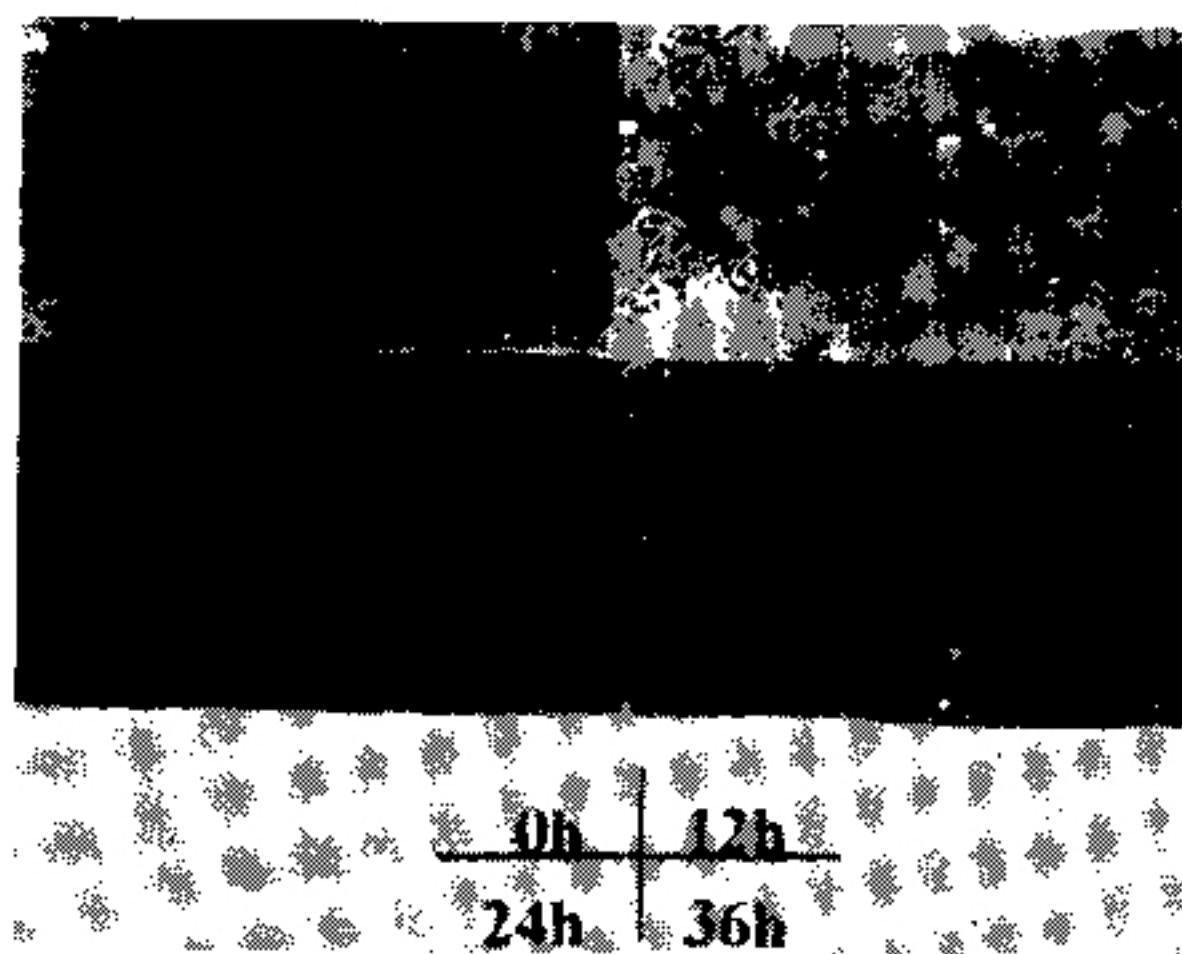


图 2 丹参组 7721 细胞不同时间侵袭运动能力

3 7721 细胞与 FN 粘附的 MTT 法定量检测结果 见表 1。可见丹参组粘附到 FN 上的 7721 细胞明显少于阳性对照组。

4 7721 细胞与不同细胞之间的粘附 见表 2、3。

丹参组 7721 细胞之间的粘附率在作用 40min, 60min 时较对照组低, 说明丹参可抑制 7721 细胞之间

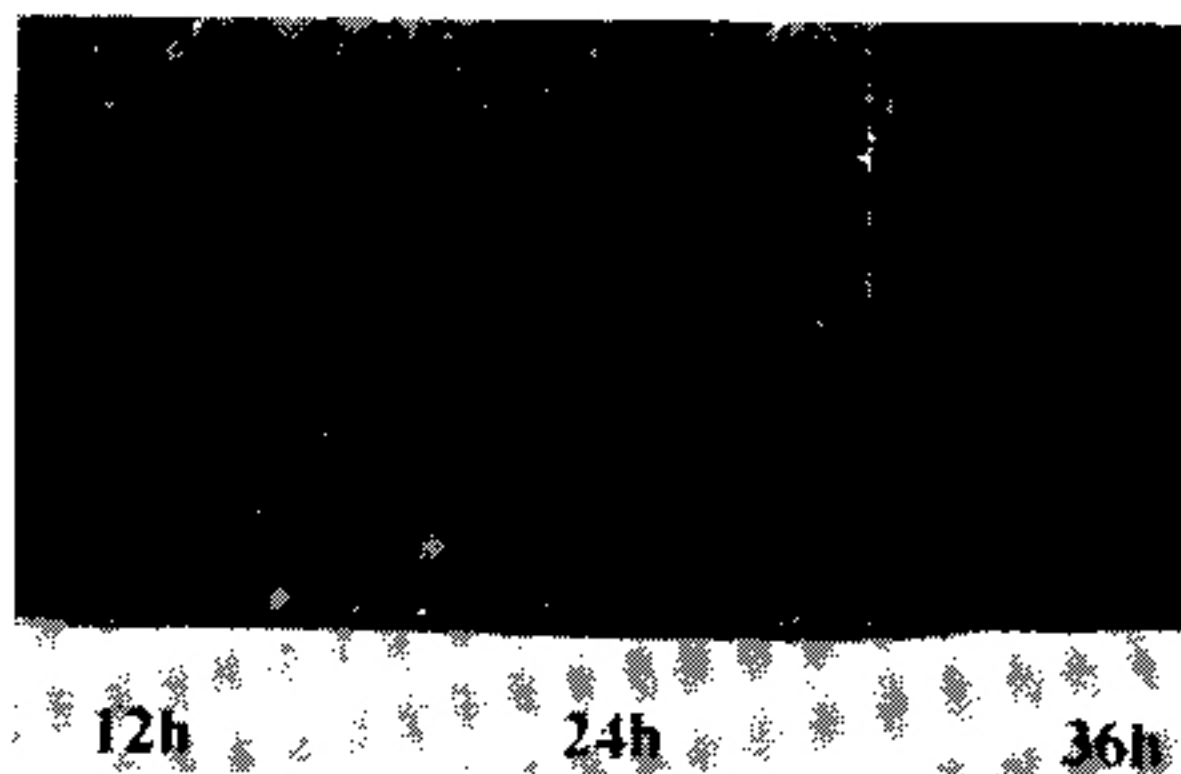


图 3 对照组不同时间 7721 细胞 - FN 粘附情况

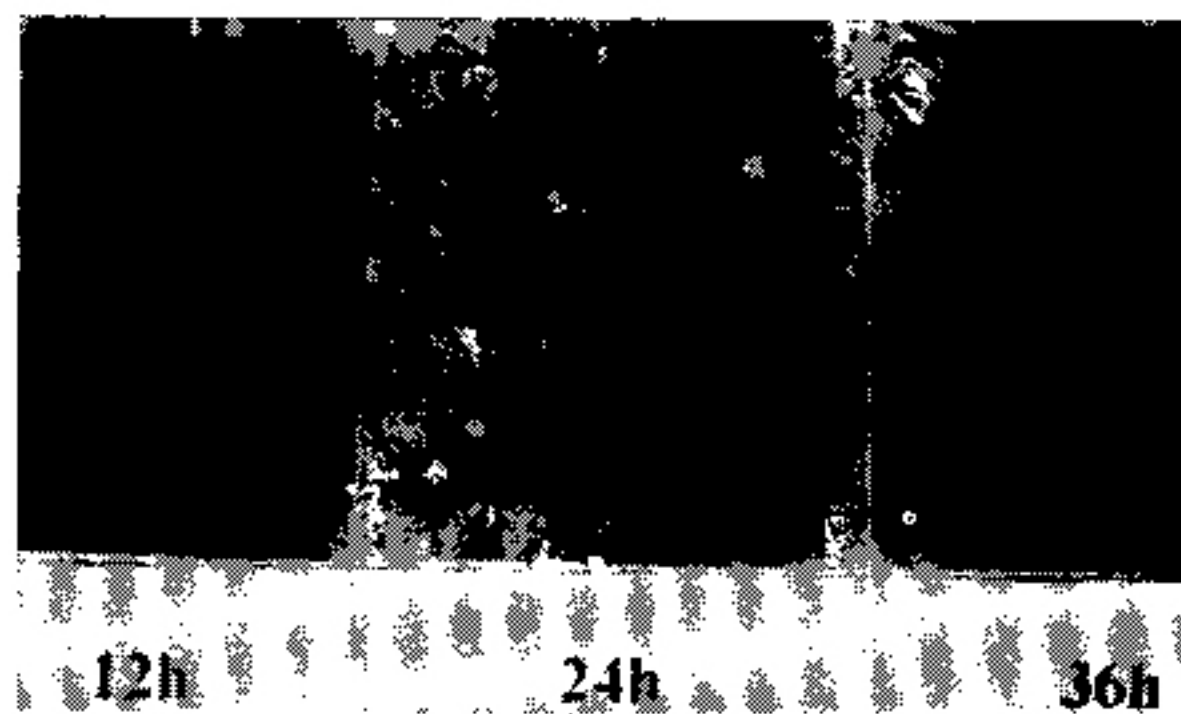


图 4 丹参组不同时间 7721 细胞 - FN 粘附情况

的粘附, 减少循环中肿瘤细胞之间形成团块的机会。

在作用较长时间后, 丹参对 7721-内皮细胞之间的粘附也有抑制作用。提示它可减少肿瘤细胞在毛细血管的着床。

5 丹参对 LCI-D20 裸鼠人肝癌转移模型肝癌切除术后转移复发的影响

5.1 肝内局部转移复发情况 见表 4。正常裸鼠肝脏为 7 个叶。早期切除丹参组肝内转移灶数目和转移灶累及的肝叶数均少于对照组。晚期切除丹参组肝内转移灶数目减少, 与对照组比较并无明显统计学差异, 但转移累及肝叶数明显少于对照组, 观察其转移灶主要集中在切缘周围, 可能以局部侵袭转移为主。丹参对切缘肿瘤复发无抑制作用。

5.2 远处转移情况 见表 5。

表 1 各组不同时间 7721 细胞 - FN 粘附的 OD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OD 值		
		10min	20min	40min
阳性对照	5	20.0 ± 5.6	46.0 ± 16.7	56.6 ± 9.0
丹参	5	10.0 ± 3.8**	25.3 ± 9.7*	30.2 ± 15.8**
阴性对照	5	4.8 ± 2.3	5.4 ± 1.2	8.0 ± 5.6

注: 与阳性对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 2 两组不同时间 7721-7721 细胞之间粘附的粘附率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OD 值		
		20min	40min	60min
对照	3	10.2 ± 1.2	63.2 ± 35.6	60.8 ± 10.1
丹参	3	12.1 ± 3.9	30.2 ± 1.8*	28.8 ± 4.1*

注:与对照组比较, * $P < 0.05$

表 3 两组不同时间 7721-内皮细胞之间粘附的粘附率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OD 值			
		20min	40min	60min	90min
对照	3	3.4 ± 1.2	19.3 ± 9.2	83.9 ± 34.9	96.2 ± 11.1
丹参	3	2.7 ± 1.9	6.2 ± 7.7	31.9 ± 23.2*	79.7 ± 13.2**

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 4 各组肝癌切除术后肝内转移复发情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	转移阳性鼠数	肝内转移灶数目 (个/只)	累及叶数 (个/只)	切缘肿瘤直径 (cm)
早期对照	5	5/5	7.2 ± 2.3	3.7 ± 0.6	1.1 ± 0.2
早期丹参	5	5/5	2.0 ± 0.7*	1.6 ± 0.6*	0.6 ± 0.4
晚期对照	5	5/5	8.6 ± 8.2	4.6 ± 1.5	0.9 ± 0.4
晚期丹参	5	4/5	4.0 ± 3.0	2.0 ± 1.2*	0.7 ± 0.5

注:与相应对照组比较, * $P < 0.01$

表 5 各组肝癌切除术后远处转移情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	肺内转移灶个数 (个/只)	肺转移阳性鼠数	转移灶累及部位数	发生转移鼠数
早期对照	5	2.8 ± 2.5	4	6.8 ± 0.5	5
早期丹参	5	2.8 ± 5.0	1	3.5 ± 1.3**	5
晚期对照	5	63.8 ± 28.1	5	6.8 ± 3.0	5
晚期丹参	5	4.4 ± 3.3**	3	4.0 ± 0.7*	5

注:与相应对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

除肺远处转移灶外,肉眼尚可见切口、肠系膜、生殖腺、肝门部、肾下极、脾门、膈肌、胰腺上缘转移。尽管各实验组所有 5 只实验动物均发生转移,早期丹参组转移灶累及的脏器数明显少于对照组,肺内转移灶数目与对照组相似,晚期肝癌切除术后应用丹参组肺转移灶数目及转移累及的脏器数均少于对照组,并有 2 只动物未发生转移。

讨 论

肿瘤转移过程中,肿瘤细胞要与各种宿主细胞(内皮细胞、血小板和淋巴细胞等)或(和)细胞外基质、基底膜成分发生相互粘附,这一过程增加了肿瘤细胞生存、俘获和侵袭的能力,是转移发生的重要因素之一,因此抗粘附治疗可能是抗转移的一个新方向^[3]。我们前期研究发现细胞间粘附分子-1(ICAM-1)与肝癌的转移复发有关^[4-6]。丹参为传统中药,其活血化瘀作

用已广泛应用于临床。近年来还发现它能抑制体外红细胞与内皮细胞的粘附和血小板聚集,并能通过改变肿瘤细胞膜而影响肿瘤细胞与宿主组织的亲和力,对肿瘤细胞有杀伤作用^[7-9]。本研究发现,丹参处理后的 7721 细胞表面 ICAM-1 表达明显下降,丹参明显抑制了 7721 细胞的侵袭运动能力及其与 FN、7721 细胞、内皮细胞之间的粘附。因此认为它可减少肿瘤细胞进入循环和肿瘤细胞与血管内皮细胞粘附在循环中形成瘤栓的能力,降低肿瘤细胞从循环中游出的机会。动物实验结果显示无论在转移发生前后行肝癌切除,丹参均能抑制裸鼠人肝癌转移模型肝癌切除术后的肝内和远处转移复发,但对切缘复发无明显抑制作用。我们的实验结果表明:丹参通过抑制肿瘤细胞的侵袭粘附能力,降低裸鼠人肝癌切除术后的转移复发。

参 考 文 献

1. Zhou XD, Tang ZY, Yu YQ, et al. Recurrence after resection of α -fetoprotein-positive hepatocellular carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol 1994;120(6):369-373.
2. Danen EKJ, Marcinkiewicz C, Cornelissen IM, et al. The disintegrin eristostatin interferes with integrin $\alpha_4 \beta_1$ function and with experimental metastasis of human melanoma cells. Exp Cell Res 1998;238:188-196.
3. Saiki I, Yoneda J, Igarashi Y, et al. Antimetastatic activity of polymeric RGDT peptides conjugated with poly(ethylene glycol). Jpn J Cancer Res 1993;84:558-565.
4. 孙靖璟,周信达,刘银坤,等.裸鼠肝癌转移模型组织中细胞间粘附分子-1 表达的研究.见:李春海,陆士新主编.肿瘤生物学研究进展.北京:军事医学科学院出版社,1997:124-127.
5. 孙靖璟,周信达,刘银坤,等.肝癌组织中细胞间粘附分子的表达与肝癌侵袭转移关系的研究.中国癌症杂志 1997;3:161-164.
6. 孙靖璟,周信达,周 铭,等.血清中细胞间粘附分子的表达与肝癌侵袭转移关系的影响.中华医学杂志 1998;5:383.
7. 王 玲,黄 勋,丁肇华,等.丹参对离体红细胞与内皮细胞粘附特性的影响.华西医药杂志 1995;10:193-196.
8. 谢梅林,陈葆基,顾振纶,等.丹心 I 号、丹心 II 号对人血小板聚集的影响.中国医药杂志 1994;29:146-147.
9. Chang WL, Chen CF. Cytotoxic activities of tanshinone against human carcinoma cell lines. Am J Chin Med 1991;19:207.

(收稿:1998-11-20 修回:1999-01-10)