

槐耳浸膏干预荷瘤裸鼠肝癌转移的实验研究

李立新 叶胜龙 王艳红 孙瑞霞 薛琼 陈洁 高东梅 汤钊猷

近年来原发性肝癌的发病率在我国有不断上升的趋势。其5年生存率较前虽有所上升,但仍不容乐观。发病隐匿、早期转移和治疗后易复发是生存率低下的原因。目前手术切除仍是最有效的治疗方法,但远期疗效有待进一步提高。槐耳浸膏是一个目前在肿瘤治疗领域较有前途的药物。临床实践证明,它对原发性肝癌、肺癌、食管癌和胃癌等肿瘤有独特疗效。本次实验通过槐耳浸膏在动物体内干预肝癌的转移来探讨槐耳浸膏抑制肝癌转移的机制,为临床治疗肝癌提供部分理论依据。

材料和方法

一、材料

肝癌 LCFD20 细胞系由复旦大学肝癌研究所建立。裸鼠购自中科院动物实验中心,其中雄鼠 12 只,雌鼠 12 只,鼠龄 5 周,体重在 15 g 左右。槐耳浸膏由江苏盖天力药业有限公司提供。匀浆液含 50 mmol/L Tris-HCl、75 mmol/L NaCl 和 4 mmol/l PMSF。上样缓冲液含 0.125 mol/L Tris-HCl (pH 6.8)、20%甘油、4% SDS 和 0.005% 溴酚蓝。考马斯亮蓝染液含 0.5% 考马斯亮蓝、45% 甲醇和 10% 乙酸。脱色液含 50% 甲醇和 10% 乙酸。10% 聚丙烯酰胺凝胶、电泳液、10 × 复性缓冲液及 10 × 显影缓冲液均购自 invitrogen 公司。低分子量标准蛋白购自中科院生化所东风生物技术公司,其中含 6 个蛋白质:兔碳酸化酶 B,牛血清白蛋白,兔肌动蛋白,牛碳酸干酶,胰蛋白酶抑制剂和鸡蛋清溶菌酶。FS-2 型内切式匀浆机构自江苏金坛仪器厂。

二、方法

将裸鼠平均分成槐耳浸膏治疗组和生理盐水对照组,每组 12 只裸鼠,雌雄对半。将等量的 LCFD20 瘤块接种于裸鼠的肝包膜下。槐耳浸膏组每天按 2 g/kg 剂量灌胃^[1],对照组每天灌生理盐水。灌胃给药体积均为 0.2 ml/只。饲养裸鼠 4 周后处死裸鼠,取出瘤体,称取瘤体重量,查看腹腔淋巴结转移情况,取出裸鼠的肝和肺作病理切片以了解转移情况。

将以上肝肿瘤组织置于 - 80 °C 冰箱保存。标本从 - 80 °C 冰箱中取出在未解冻时切割、称量,每 0.1 g 组织加入预冷的 0.5 ml 匀浆液匀浆,匀浆过程中用冰浴将匀浆物温度控制于较低温度以免酶失活。结束后将匀浆物置于 2 ml Eppendorf 管中,低温离心机离心 20 min,吸取上清液。将该上清液与 2 × 上样缓冲液按 1:1 比例混合,室温放置 10 min。每孔上样 10 ~ 25 μl,设置恒压 125 V,电泳 60 ~ 120 min 至溴酚蓝泳到胶的底部结

束。将凝胶置于 1 × 复性缓冲液中,室温轻轻振荡 30 min。弃去复性缓冲液,加入 1 × 显影缓冲液,室温振荡平衡 30 min,将凝胶置于新鲜的 1 × 显影缓冲液中,37 °C 孵育反应至少 4 h。考马斯亮蓝染液染色 30 min,脱色液脱色至深蓝背景中亮带出现。计算机扫描蛋白电泳条带,采用 ImageMaster VDS 软件分析扫描结果。

三、统计学分析

应用 SPSS 11.0 统计软件包,采用四格表精确卡方对两组肺转移灶、肝内播散灶和淋巴结转移数等数据进行统计学分析。采用 Paired Samples Test 方法对两组瘤重数据、基质金属蛋白酶 (MMP-2、MMP-9) 浓度进行统计学分析。

结果

解剖及病理学检查的结果提示,治疗组中肿瘤的肺转移灶、肝内播散灶及腹腔淋巴结转移数均明显少于对照组(见表 1),两者差异有显著性,说明槐耳浸膏确能阻抑肝癌细胞的增殖和转移。

表 1 槐耳浸膏干预荷瘤裸鼠肝肿瘤生长和转移的实验研究

	肺转移灶	肝内播散灶	淋巴结转移数	瘤重 (g)
对照组	50.00 % (6/12)	58.33 % (7/12)	41.67 % (5/12)	1.78 ± 0.39
治疗组	8.33 % (1/12)	16.67 % (2/12) *	8.33 % (1/12)	1.18 ± 0.32 *

与对照组比较 * P < 0.05, P < 0.01

对于两组肿瘤组织中基质金属蛋白酶活性的测定表明,经过槐耳浸膏作用的荷瘤裸鼠,其肿瘤组织中的基质金属蛋白酶活性 (MMP-2、MMP-9) 明显低于对照组(见表 2),两者差异有显著性。

表 2 槐耳浸膏对荷瘤裸鼠肝肿瘤组织中基质金属蛋白酶活性的影响

	对照组	治疗组
MMP-9	11.32 ± 2.98	7.22 ± 3.10 *
MMP-2	75.65 ± 7.08	50.54 ± 9.28 *

与对照组比较 * P < 0.05

讨论

槐耳浸膏在临床肿瘤治疗中是一种目前应用较广的真菌抗癌药物。大量的临床实践已证明它对原发性肝癌、肺癌、食管癌和胃癌等肿瘤有独特疗效,可以延长肿瘤患者的生存时间,提高机体免疫力,改善临床症状^[1]。本次实验从槐耳浸膏

基金项目:复旦大学“211”工程肿瘤学科建设项目(2003-257号);上海市临床医学中心建设项目(ZX01B01)

作者单位:200032 上海 复旦大学肝癌研究所,中山医院,上海市肝脏肿瘤临床医学中心

通讯作者:叶胜龙,Email:slye@shmu.edu.cn



在动物体内干预肝癌细胞转移的角度来探讨槐耳浸膏的抑癌机制。实验证明槐耳浸膏在动物体内确有抑制肿瘤生长,减少肿瘤远处播散的功效。

肿瘤细胞的侵袭转移是一个涉及多方面、关系复杂的过程。它在脱离原发灶后必须突破细胞外基质及基底膜屏障,向周围纤维结缔组织及血管浸润,进而向远处转移。其中细胞外基质和基底膜降解是肿瘤侵袭转移中最关键的一步^[2]。它主要由基质金属蛋白酶(MMP)、透明质酸酶及大量吞噬细胞来完成,而在其中起重要作用的是 MMP-2 及 MMP-9,因为 MMP-2 及 MMP-9 不仅可以降解细胞外基质成分,也是降解细胞外基质型胶原的主要酶^[3]。大量研究表明,MMP-2 的表达与肿瘤细胞的浸润表型和转移潜力有关。Giannelli 等^[4]研究发现,具有侵袭表型的人肝癌细胞系能产生和活化高水平的 MMP-2,此类癌细胞常常在细胞外基质底物表面发生迁移并能侵袭穿过人工基底膜。与邻近正常肝组织相比肝癌组织中 MMP-2 的酶原和活化形式均有增加^[5]。MMP-9 也是 MMP 家族中极其重要的一员,它和多种恶性肿瘤的侵袭转移有密切关系。有包膜浸润的肝癌组织中 MMP-9 的表达显著高于无浸润的肝癌组织^[6]。MMP-9 mRNA 主要在癌上皮细胞表达,表达水平的增高常伴随着肿瘤包膜的侵犯。MMP-9 酶原形式在肿瘤组织和正常组织中基本相同,但其活性形式仅存在于癌组织中。肝癌患者血浆 MMP-9 水平也显著增高,尤其在有门脉侵犯的患者,但其水平与肿瘤大小、组织分级和 AFP 水平均无相关性,有效治疗后血浆 MMP-9 水平也无显著改变^[5,7]。当肝癌组织中 MMP-9mRNA、MMP-2mRNA 都有强烈表达时患者的生存期更短^[5]。

本次实验发现,治疗组 MMP-2 及 MMP-9 的含量均分别低于对照组,两组差异有显著性,说明经槐耳浸膏作用后,肿瘤组织中 MMP-2 及 MMP-9 的表达均有下降,从而导致肿瘤侵袭转移的能力降低。这一结果与以上的动物实验相符。

随着实验研究的不断深入,人们对槐耳浸膏抑癌的机制将会有更多的认识,相信槐耳浸膏在肿瘤的治疗中会发挥一定的作用。

参 考 文 献

- 1 庄毅. 真菌抗癌药物槐耳颗粒的研制. 中国肿瘤, 1999, 8: 540-543.
- 2 何琼琼, 程瑞雪. 基质金属蛋白酶与肝癌侵袭转移. 国外医学生理病理科学与临床分册, 2002, 22: 33.
- 3 王迎春. 基质金属蛋白酶及其抑制剂在肝硬化中的表达. 世界华人消化杂志, 1997, 7: 795.
- 4 McKenna G, Chen Y, Smith RM, et al. A role for matrix metalloproteinases and tumor host interaction in hepatocellular carcinomas. Am J Surg, 2002, 183: 588-594.
- 5 蒋扬富, 杨治华, 胡敬群, 等. 血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶-9 在原发性肝癌中的表达及其临床意义. 癌症, 2000, 19: 17-19.
- 6 Sakamoto Y, Mafune K, Mouri M, et al. Overexpression of MMP-9 correlates

with growth of a small hepatocellular carcinoma. Int J Oncol, 2000, 17: 237-243.

- 7 Yoshizaki T, Sato H, Furukawa M. Recent advances in the regulation of matrix metalloproteinase 2 activation: from basic research to clinical implication. Oncol Rep, 2002, 9: 607-611.

(收稿日期:2006-02-16)