

36~39

金荞麦提取物抑制肿瘤细胞侵袭、转移和 HT-1080 细胞产生 IV 型胶原酶的研究*

刘红岩 韩锐

(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

R285.5
R730
R286.91

中国图书分类号 R 284.1; R 979.1

摘要 目的 探讨金荞麦提取物对肿瘤细胞侵袭和转移的影响。方法 以人工重组基底膜及小鼠黑色素瘤高转移株自发性肺转移模型观察了金荞麦提取物对 B16-BL6 细胞的体外抗侵袭活性和体内抗转移作用;用聚丙烯酰胺凝胶电泳法进一步观察了其对人纤维肉瘤 HT-1080 细胞 IV 型胶原酶的产生及活性的影响;同时用 WST 法观察了该药的细胞毒性。结果 金荞麦提取物在 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量下能明显抑制 B16-BL6 细胞侵袭;在 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量下能有效抑制 B16-BL6 黑色素瘤细胞在 C57/BL6 小鼠体内自发性肺转移。该药对 B16-BL6 和 HT-1080 细胞无明显细胞毒作用。该药能抑制 HT-1080 细胞 IV 型胶原酶的产生,但对酶的活性无明显影响。结论 金荞麦提取物具有明显的抗癌侵袭和转移的作用。

关键词 金荞麦;侵袭;转移;IV 型胶原酶

金荞麦 (*Fagopyrum cymosum* Meissn) 为多年生草本植物,在中国民间用以治疗肺脓疡及鼻咽癌等疾病。近年来我们发现其具有癌化学预防及抗癌活性,对化学致癌物 DMBA 和巴豆油诱发的小鼠皮肤乳头状瘤显示明显的抑制作用。

癌的侵袭及转移是一复杂的过程。癌细胞在原发灶增殖后游离并粘附于基底膜,释放多种基质蛋白酶破坏基底膜,侵入血管或淋巴管,在远处部位再侵袭破坏血管内膜基底膜,侵入组织,在远隔部位形成转移灶。IV 型胶原是基底膜的主要构成成分,而 IV 型胶原酶是降解 IV 型胶原的特异的一种基质水解酶,在癌细胞侵袭降解基底膜的过程中发挥重要作用。因此,设法抑制 IV 型胶原酶(MMPs)的分泌及活性,可能是有效干预癌侵袭、转移过程的途径之一。本文观察了金荞麦提取物对 B16-BL6 黑色素瘤细胞高转移株的细胞毒性,体外抗侵袭作用及体内抗转移作用,并进一步观察了其 HT-1080 细胞 MMPs 的产生及活性的影响。

1997-05-02 收稿,1997-09-24 修回

* 日本文部省富山医科药科大学和汉药研究所资金资助

作者简介:刘红岩,女,46 岁,曾在日本富山医科药科大学和汉药研究所任客座研究员;

韩锐,男,66 岁,研究员,博士生导师,曾在日本富山医科药科大学和汉药研究所任客座教授并被授予名誉博士

1 材料和方法

1.1 实验材料 B16-BL6 小鼠黑色素瘤细胞高转移株,HT-1080 人纤维肉瘤细胞,由日本国立富山医科药科大学和汉药研究所病态生化部门提供。Transwell cell culture chamber 由美国 Costar 公司购得。Polyvinyl Pyrrolidone-Free (PVPF) 滤膜,孔径 $8.0 \mu\text{m}$,由美国 Nucleopore 公司购得。ELISA 酶标仪,系日本 Intermed 社产品,Immunomini NJ-2300 型。电泳装置系日本 MARYSOL 社产品,KS-8020 型。C57BL/6 小鼠,♂,18~22 g,由日本三协株式会社提供。

1.2 药品及试剂 金荞麦提取物(原花色素 proanthocyanidine)^[1],由中国医学科学院药物研究所提供。hematoxyllin, eosin, human-fibro-nectin (h-FN), acrylamide, *N,N*-methylenebis(BIS), sodium dodecyl sulfate (SDS), *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED), ammonium peroxydisulfate (APS) 均为日本和光纯药业株式会社产品。Matrigel (MG) 由美国 Cell-aborative Research Inc 购得。Eukitt 由日本高桥技研硝子株式会社购得。4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-Nitro-phenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate (water-soluble sulfonated tetrazolium, WST) 由 Dojindo Laboratories 购得。trizma base 为 Sigma 公司产品。gelatin 为日本岩城硝子试剂株式会社产品。coomassie brilliant blue 为 Fluka 产品。TIMP-2 由济木育夫教授提供。

1.3 癌细胞增殖抑制实验 将对数增殖期的 B16-BL6 及 HT-1080 细胞以 5×10^7 个 $\cdot \text{L}^{-1}$ 接种于 96 孔培养板内,在 37°C , 0.05 CO_2 恒温箱内培养 24 h 后,实验组加入不同浓度的药物,对照组加入等体积的溶剂,继续培养 48 h。加入 10 倍稀释的 WST 溶液,每孔 $100 \mu\text{l}$, 37°C , 0.05 CO_2 恒温箱内孵育 4 h,用 ELISA 酶标仪,波长 450 nm ,测定 OD 值。

1.4 癌细胞侵袭和运动能力实验^[2~4] 制备基底膜,将 PVPF 滤膜贴于 Transwell chamber 上,在滤膜上面涂趋化剂 Fibronectin $5 \mu\text{g}$,在滤膜底面涂 Matrigel $5 \mu\text{g}$,在 chamber 内加入 2×10^5 个瘤细胞

及不同浓度的药物,置于含有 0.1% BSA-EMEM 的 24 孔板内,37℃,0.05 CO₂ 恒温箱内温孵 4 h。用甲醇固定滤膜,HE 染色,用棉签擦去膜背面的残余细胞,在 400 倍光镜下每膜计数 5 个视野,取平均值,进行统计学处理。细胞运动实验:滤膜不涂 Matrigel,余同侵袭实验。

1.5 IV型胶原酶测定^[4~6] 将 HT-1080 细胞接种于 3 cm 培养皿内,37℃,0.05 CO₂ 条件下培养 24 h 后,改用无血清 Hams-DMEM 培养,同时加入不同浓度的药物,并设空白对照及溶剂对照,继续培养 24 h,收集各组上清液。测酶活性时,将细胞接种于培养瓶内培养 48 h 后,再进行无血清培养 24 h,收集上清液。SDS 聚丙烯酰胺凝胶制备:7.5% 分离胶:29.2% acrylamide/0.8% BIS 2.5 ml,18.2% trizma base/0.4% SDS 2.5 ml,0.2% gelatin 5 ml,APS 15 mg,搅拌脱气后加入 TEMED 10 μl。4.36% 浓缩胶:29.2% acrylamide/0.8% BIS 0.68 ml,6.1% trizma base/0.4% SDS 1.5 ml,APS 10 mg,去离子水 3.82 ml,TEMED 5 μl。将样品缓冲液与样品按 1:2 混和,加入明胶孔内,4℃ 低温下电泳:开始以 10 mA 走电泳,溴酚蓝至分离胶处,将电压加至 15 mA,继续电泳约 2~3 h。用去离子水将胶漂洗两次后,移入温孵缓冲液洗胶。测定酶活性时将胶切成若干段,分别装入含有不同浓度药物的塑料袋中,37℃ 水浴孵育 96 h。测定酶产生时将整胶封入温孵缓冲液塑料袋中,37℃ 水浴孵育 24 h。用去离子水洗胶两遍,用考马氏蓝染色 1 h,用脱色液脱色 2 h,可见 IV 型胶原酶 92 ku 和 72 ku 两条白色条带。

1.6 体内自发转移实验 将生长良好的 B16-BL6 细胞用 PBS 配制成 1×10¹⁰ 个·L⁻¹ 浓度的细胞悬液,每只小鼠后肢爪垫皮下接种 50 μl (含 5×10⁵ 个瘤细胞)。随机分组,于接种后次日口服给药,金荞麦提取物 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹,以 Taxol 为阳性对照,5 mg·kg⁻¹·d⁻¹,腹腔注射。接种后 3~4 wk,当瘤体 ≥10 mm³ 时,将小鼠用乙醚麻醉,无菌条件下切掉患肢。2 wk 后处死动物,解剖取肺,Bouin 液固定,于解剖显微镜下计数肺转移结节数。采用 Mann-Witney U-检验进行统计学处理^[7]。

2 结果

2.1 金荞麦提取物对癌细胞增殖的影响 结果表明金荞麦提取物对 B16-BL6 细胞及 HT-1080 细胞增殖无明显抑制,其 IC₅₀ 大于 100 mg·L⁻¹ (表 1)。说明它无明显细胞毒作用。

2.2 金荞麦提取物对 B16-BL6 细胞侵袭和运动能

力的影响 实验证明金荞麦提取物在 1 mg·L⁻¹、10 mg·L⁻¹ 及 100 mg·L⁻¹ 时对 B16-BL6 细胞侵袭均显示不同程度的抑制,且抑制强度呈剂量效应依赖性。高浓度(100 mg·L⁻¹)时,抑制率达 59% (表 2)。它对 B16-BL6 细胞的运动能力未显示明显的抑制作用(表 3)。

表 1 金荞麦提取物对 B16-BL6 及 HT-1080 细胞增殖的影响

浓度 /mg·L ⁻¹	抑制率/%		IC ₅₀ /mg·L ⁻¹	
	B16-BL6	HT-1080	B16-BL6	HT-1080
10	16	0		
100	22	0	>100	>100

表 2 金荞麦提取物对 B16-BL6 细胞侵袭的抑制作用(±s,n=10)

组别	浓度 /mg·L ⁻¹	侵袭细胞数	抑制率
		/个·视野 ⁻¹	/%
对照	—	108±8.4	—
金荞麦提取物	1	81±12.1	25
	10	75±10.7*	30
	100	44±5.2**	59

与对照组相比,*P<0.05,**P<0.01

表 3 金荞麦提取物对 B16-BL6 细胞移动的影响(±s,n=10)

组别	浓度/mg·L ⁻¹	运动细胞数	抑制率/%
对照	—	67.4±11.6	—
金荞麦提取物	1	67.5±12.05	0
	10	57.7±11.55	14
	100	45.3±8.91	33

2.3 金荞麦提取物对 IV 型胶原酶的影响 实验表明金荞麦提取物在 100 mg·L⁻¹ 剂量下能明显抑制 HT-1080 细胞 MMP-2 (分子质量 72 ku) 和 MMP-9 (分子质量 92 ku) 的产生。72 ku 和 92 ku 两条带与对照组相比,明显减弱(图 1),但对 MMP-2 和 MMP-9 的活性无抑制作用(图 2)。

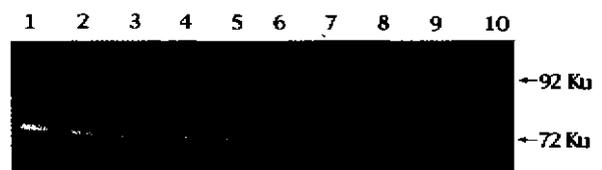


图 1 金荞麦提取物对 HT-1080 细胞 IV 型胶原酶产生的影响

1:空白对照;2:溶剂对照;3,4:金荞麦提取物 0.1 mg·L⁻¹;5,6:1 mg·L⁻¹;7,8:10 mg·L⁻¹;9,10:100 mg·L⁻¹

2.4 金荞麦提取物对 B16-BL6 细胞肺转移的抑制作用 实验结果表明,金荞麦提取物 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 连续口服 39 d,对 B16-BL6 细胞的肺转移有

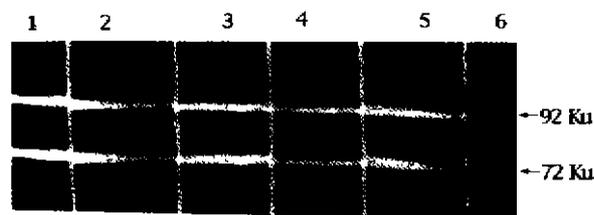


图2 金荞麦提取物 HT-1080 细胞IV型胶原酶活性的影响

1:空白对照;2:溶剂对照;3,4,5:金荞麦提取物 1 mg · L⁻¹, 10 mg · L⁻¹, 100 mg · L⁻¹;6:TIMP-2 100 mg · L⁻¹

明显的抑制作用。8只小鼠中有4只肺组织表面未见转移结节,有2只肺转移结节仅为1。而对照组9只小鼠则100%发生肺转移(表4)。

表4 金荞麦提取物对小鼠 B16-BL6 细胞转移的抑制作用

组别	剂量/mg · kg ⁻¹	肺转移/荷瘤鼠	肺转移结节数
对照		9/9	15.6 ± 26.41
金荞麦提取物	200 × 39	4/8	6.3 ± 14.24*
Taxol	5 × 39	3/8	1.8 ± 2.38**

与对照组比较,*P<0.05,**P<0.01

3 讨论

肿瘤侵袭及转移是肿瘤病人治疗失败的主要原因。很大一部分肿瘤病人在初治时已有微小的或潜在的转移病灶。为了能彻底治愈癌症,控制肿瘤侵袭和转移是重要关键。为此寻找抗侵袭和抗转移的药物是当务之急,特别是寻找高效低毒的天然产物更具有实用价值。我们的研究表明金荞麦提取物对B16-BL6细胞的侵袭及转移有明显的抑制作用而无细胞毒作用,说明其毒性低,适合肿瘤病人术后或化疗时预防转移应用并可长期用药。

肿瘤细胞在转移过程中,至少必须二次侵袭,突破瘤周围的基底膜和二次穿过血管的基底膜。金荞麦提取物能明显抑制B16-BL6细胞自发性肺转移,显然是由于其具有较强的抗侵袭活性。一般认为癌细胞的侵袭与其运动、粘附和分泌金属蛋白酶的酶力有关^[8]。金荞麦提取物对B16-BL6细胞的趋化性运动能力无明显抑制作用,提示其抗癌细胞侵袭作用不是通过抑制癌细胞运动而发挥的。基底膜是肿

瘤侵袭的主要靶点,IV型胶原则是构成基底膜的主要成分。所以,IV型胶原酶在肿瘤侵袭过程中发挥十分重要的作用。普遍认为IV型胶原酶水平可能是肿瘤的恶性程度的标志之一^[9]。IV型胶原酶主要有72ku和92ku二种亚型。我们的实验证明金荞麦提取物虽然对HT-1080细胞IV型胶原酶的活性无抑制作用,但能明显抑制IV型胶原酶的产生,使72ku和92ku的表达明显减弱,提示这一作用是其抗侵袭活性的重要因素之一。

临床肿瘤病人在确诊后需要干预肿瘤细胞侵袭及转移播散,金荞麦是常用中草药,没有明显毒性,口服用药方便,将为临床控制肿瘤侵袭和转移提供有用药物,值得深入研究。

(本工作在日本富山医科药科大学完成,得到济木育夫教授、奥亨先生和村田纯先生的支持与帮助,特此致谢。)

参考文献

- 1 刘永隆,房其年,张秀琴 *et al.* 金荞麦有效成分的研究. *药理学报*, 1983;18(7):545~7
- 2 Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK *et al.* A rapid *in vitro* assay for quantitative the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res*, 1987;47:3239~45
- 3 Saiki I, Murata J, Watanabe K *et al.* Inhibition of tumor cell invasion by Ubeninex(bestatin) *in vitro*. *Jap J Cancer Res*, 1989;80:873~8
- 4 韩锐主编. *抗癌药物研究与实验技术*, 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997:353~5,361~2,356~61
- 5 Reich R, Thompson EW, Iwamoto Y *et al.* Effects of inhibitors of plasminogen activator, serine proteinase and collagenase invasion of basement membrane by metastatic cells. *Cancer Res*, 1988;48:3307~12
- 6 Kubota S, Mitsudomi I, Yamada Y. Invasive human fibrosarcoma DNA mediated induction of a 92 ku a gelatinase/type VI-collagenase leads to an invasive phenotype. *Biochem Biophys Res Comm*, 1991;181:1539~47
- 7 Korin BP. *Introduction to Statistical Methods*, Cambridge, Massachusetts, Withrop Publishers, Inc, 1977:284~9,400~3
- 8 Aznavoorian S, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer*, 1993;71:1368~83
- 9 Macdougall JR, Matrisian LM. Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 1995;14:351~62

Extract of fagopyrum cymosum meissn inhibits tumor cell invasion and metastasis and suppresses type IV collagenase production of HT-1080 cells

LIU Hong-Yan, HAN Rui

(Institute of Materia Medica, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050)

ABSTRACT AIM To study anti-invasive and anti-metastatic activities of fagopyrum cymosum

39-41

白细胞介素1对体外培养小鼠骨髓基质细胞增殖及细胞周期的影响*

R329.28

R372

肖学军 吴曙光

(第一军医大学药物研究所, 广州 510515)

中国图书分类号 R 329.28; R 973

摘要 目的 研究白细胞介素1对小鼠骨髓基质细胞增殖的影响。方法 取出小鼠骨髓基质细胞作原代培养,用³H-TdR 参入法及 MTT 法观察其增殖情况,利用流式细胞仪观察其细胞周期的变化。结果 白细胞介素1在 250×10³~1000×10³ U·L⁻¹范围内可促进小鼠骨髓基质细胞的增殖,并引起S期细胞的增多。结论 白细胞介素1可促进体外培养的小鼠骨髓基质细胞增殖。

关键词 白细胞介素1;骨髓基质细胞;增殖;细胞周期

骨髓基质细胞是造血微环境的重要组成部分。它不仅为造血干细胞的生长提供附着的场所,而且还通过与造血干细胞的直接接触和分泌多种生长因子传递信息,调节和影响造血干细胞的成熟和分化^[1]。骨髓基质细胞结构和功能的异常可导致多种疾病的发生。同时,骨髓基质细胞的损伤也是化疗、放疗后造血功能迟迟不能恢复的原因之一^[2]。因此,其细胞的生长发育、分化功能等及其影响因素一直是研究的热点之一。

白细胞介素1(IL-1)是近年来发现的一种生物活性非常广泛的细胞因子,在造血功能的调控中起着非常重要的作用,对化疗和放疗引起的造血功能损伤也有很好的保护作用^[3]。研究表明,IL-1对造血干细胞的成熟和分化有重要的调节作用,且这种作用部分是通过促进骨髓基质细胞释放某些生长因子,如集落刺激因子等而实现的^[3]。但IL-1对骨髓基质细胞调控及机理的研究尚少。

我们利用原代培养的小鼠骨髓基质细胞,研究了IL-1对骨髓基质细胞增殖及细胞周期的影响。

1 材料与方法

1.1 动物 C₃H/HeN 纯系小鼠,♂,8~10 wk 龄,由第一军医大学实验动物中心提供。

1.2 IL-1 重组人白细胞介素1α(recombinant human interleukin-1α, rhIL-1α)由大日本制药公司提供。该制剂小鼠胸腺细胞有丝分裂活性(LAF)为 2×10⁷ U·mg⁻¹蛋白,蛋白浓度为 2.0 g·L⁻¹(Micro-Kjeldahl 法测定),内毒素含量低于 0.05 μg·g⁻¹蛋白(Limulus 法测定)。

1.3 原代细胞培养^[2] 取健康成年♂实验小鼠,脊髓离位处死,取出双侧后肢长骨,剪开两端,无菌注射器吸取 RPMI 1640 基础培养基反复冲洗骨髓腔,冲出的细胞经计数后按终浓度 2×10⁶·L⁻¹接种于 96 孔培养板中,培养液为 RPMI 1640 基础培养基

1997-05-14 收稿,1997-09-22 修回

*国家自然科学基金资助课题, No 391700856

作者简介:肖学军,男,28岁,医学硕士,主要从事细胞因子药理学研究;

吴曙光,男,43岁,教授,博士生导师,主要从事细胞因子药理学研究

meissn on B16-BL6 melanoma cells (highly metastatic cell line) and inhibitory effect on type IV collagenase production of HT-1080 cells. **METHODS** Reconstituted basement membrane invasion assay was utilized to evaluate the invasive activity of cancer cells. Tyep IV collagenase production was assessed by PAGE substrate zymography. WST assay was used to examine the cytotoxicity of fagopyrun cymosum meissn. **RESULTS** The extract of fagopyrun cymosum meissn significantly inhibited membrane invasion of B16-BL6 bearing C57/BL6 cell at a concentration of 100 mg·L⁻¹ and effectively suppressed the spontaneous

lung metastasis on B16-BL6 bearing C57/BL6 mice at the dosage of 200 mg·kg⁻¹. Extract of fagopyrun cymosum inhibited the production of type IV collagenases of human fibrosarcoma cells line HT-1080 but it has no effect on the activity of this enzyme. **CONCLUSION** Extract of fagopyrun cymosum meissn has the notable inhibitory effects on tumor invasion and metastasis. Type IV collagenase inhibition may correlate with the anti-invasive and anti-metastatic activities of Fagopyrun cymosum.

KEY WORDS fagopyrun cymosum meissn; invasion; metastasis; type IV collagenases