维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2001)04－0391－02

LAMS 抑制肝癌细胞增殖和促凝活性的实验研究

董浦江,姚檬祥

(重庆医科大学临床学院器官移植研究室 重庆 400016)

【摘 要】目的:观察 LAMS 抑制肝癌细胞增殖和促凝活性的效果。方法:比较 LAMS 处理的肝癌细胞生长曲线、AgNoRs 含量变化;用一步法 APTT 测定 LAMS 拮抗肝癌细胞分泌物的促凝血作用。结果:LAMS 处理后的肝癌细胞增殖受抑制、AgNoRs 数量减少,LAMS 能拮抗肝癌细胞分泌物对 APTT 的影响。结论:LAMS 可有效地抑制肝癌细胞增殖和促凝活性。

【关键词】昆布多糖硫酸酯;肝肿瘤;增殖;促凝

【中国图书分类法分类号】Q546;R735.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2001－01－04

Experimental study of LAMS restrain multiplication and procoagulant activity of hepatic cancer cells

DONG Pu－jiang, et al

(Research Laboratory of Transplantation, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】 ***Objective***: To study the effects of LAMS for restraining multiplication and procoagulant activity of liver cancer cells. ***Methods***: By comparing the growth curves and AgNoRs contents of liver cancer cells treated with or without LAMS. Procoagulant activity of hepatic cancer cells was measured by one step APTT method. ***Results***: After treatment with LAMS, the proliferation of liver cancer cells were inhibited and AgNoRs contents were decreased. LAMS could antagonize the effects of secretion of liver cancer cells on APTT. ***Conclusion***: LAMS can effectively restrain the proliferation and procoagulant activity of hepatic cancer cells.

【Key words】 Laminarin sulphate; Hepatic cancer; Proliferation; Procoagulant

切断肿瘤细胞生长过程中的血凝增高,继而促进肿瘤细胞更趋恶化这种病理循环,将有利于肿瘤治疗。本文通过体外实验以探讨昆布多糖硫酸酯(Laminarin sulphate LAMS)抑制肝癌细胞株的增殖和促凝活性。

1 材料和方法

1.1 LAMS 按参考文献[1]提取昆布多糖并制备昆布多糖硫酸酯。以苯酚－硫酸法[2]测定其多糖为 30%。按试验测得 LAMS 对 HepG2、SMMC－7721 细胞 IC_{50} 的平均浓度为 40μg/ml,使用时以 RPMI－1640 培养液稀释,0.22μm 滤器过滤。

1.2 实验细胞 HepG2 细胞、SMMC－7721 细胞由本实验室常规培养,实验时用含 10%小牛血清的 RPMI－1640 培养液将细胞浓度调成 2×10^4/ml。

1.3 实验血浆 部分凝血活酶时间(APTT)测试用血浆为中国医科院输血研究所提供的正常质控血浆。

1.4 测定细胞生长曲线 实验细胞液 1ml,处理组加 20μlLAMS 液,对照组加 20μlRPMI－1640 培养液。置 37℃,5%CO_2 培养 6 天(第三天给未计数的细胞换液),每隔 24h 计细胞数,一式三份,用均数绘制细胞生长曲线。

1.5 LAMS 对肝癌细胞核仁嗜银蛋白的影响 取测定生长曲线的实验组、对照组 HepG2、SMMC－7721 细胞,按文献[3]进行染色和记数。

1.6 LAMS 拮抗肝癌细胞对 APTT 的影响 LAMS 实验组,取正常质控血浆 100μl、测定生长曲线处理组培养三天的上清液 10μl,(一式三份);肝癌细胞分泌物实验组,取正常质控血浆 100μl、测定生长曲线对照组培养三天的上清液 10μl,(一式三份);对照组,正常质控血浆 100μl、含 10%小牛血清 RPMI－1640 培养液 10μl,(一式三份);混匀,20℃ 静置 5min,尔后按 APTT 测定试剂盒(中国医科院输血研究所产品)说明书进行测定。

作者介绍:董浦江(1953－),男,主管技师,江苏省宜兴市人,主要研究方向:肿瘤免疫。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2 结 果

2.1 LAMS 对肝癌细胞生长曲线的影响见图 1，LAMS 作用 1 天 HepG2、SMMC－7721 细胞生长速度明显变缓，增殖受抑制的态势持续到用药 2 天，作用 3～5 天该两株细胞增殖速度又明显受抑制。而对照组细胞均增殖正常。

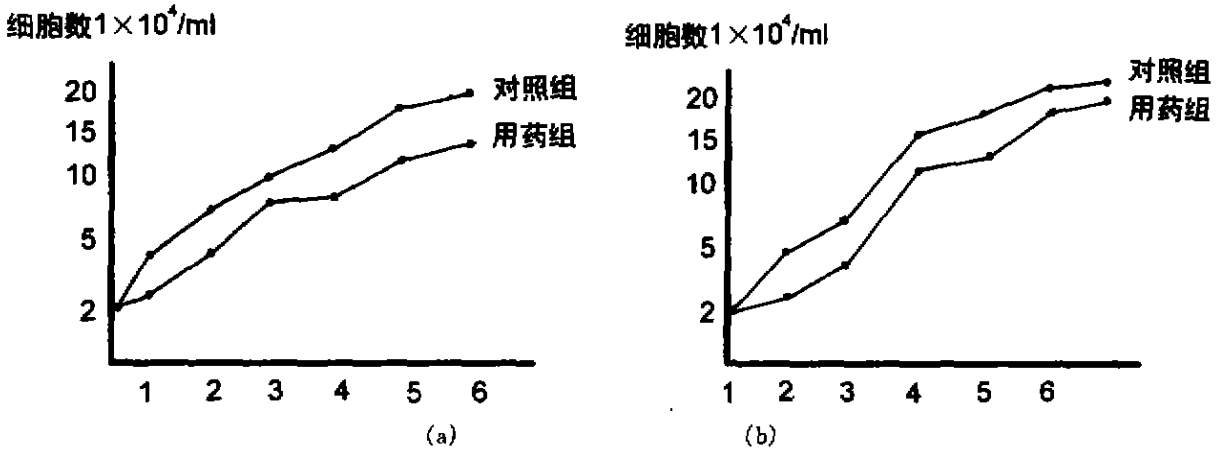


图 1 LAMS 对肝癌细胞生长曲线的影响

(a. HepG2 细胞生长曲线、b. SMMC－7721 细胞生长曲线)

2.2 LAMS 对肝癌细胞核仁嗜银蛋白的影响见表 1，两种肝癌细胞核仁嗜银蛋白数量的变化规律与细胞生长曲线的变化近似。

表 1 LAMS 对肝癌细胞 AgNoRs 含量的影响

	AgNoRs 均数					
	1d	2d	3d	4d	5d	6d
HepG2 细胞实验组	2.1*	2.3*	3.6	2.8*	3.6*	4.5
HepG2 细胞对照组	4.2	3.8	4.8	4.7	5.0	5.1
SMMC－7721 细胞实验组	2.8*	3.4*	4.8*	3.9*	4.7	5.2
SMMC－7721 细胞对照组	5.4	5.8	5.7	5.4	5.6	5.9

* 与相应对照比较 $P<0.05$

2.3 LAMS 拮抗肝癌细胞分泌物对 APTT 的影响见表 2，LAMS 实验组与对照组无明显差异（$P>0.05$）；肝癌细胞分泌物实验组明显较对照组缩短（$P<0.05$）。

表 2 LAMS 拮抗肝癌细胞分泌物对 APTT 的影响(s)

细胞株	对照组	LAMS 实验组	肝癌细胞分泌物组
HepG2 细胞	39.4±0.5	40.2±0.9*	34.3±0.8**
SMMC－7721 细胞	39.4±0.5	41.1±0.8*	31.2±0.9**

* 与对照组比较 $P>0.05$

** 与对照组比较 $P<0.05$

3 讨 论

抑制肿瘤细胞的促凝活性，改善肿瘤细胞的外环境是治疗肿瘤的又一新方向。近来，人们用具有抗凝作用的肝素，在治疗肿瘤的实验和临床应用中取得了可喜的结果[4,5]。LAMS 有与肝素类似的结构，可模拟肝素的一些生物活性[6]。为探讨 LAMS 抑制肝癌细胞增殖和促凝活性，本实验检测了 LAMS 对肝癌细胞生长曲线和 AgNoRs 含量的影响，以及拮抗肝癌细胞分泌物干扰 APTT 的现象。

细胞生长曲线是观察细胞生长基本规律的重要方法；AgNoRs 含量反映 rRNA 合成的水平。两者分别从宏观和微观的角度反应了细胞的增殖活性。本实验结果显示 LAMS 作用 24～48h 及 72～100h 两株肝癌细胞的增殖明显受抑制，AgNogRs 含量亦随之变化。说明 LAMS 抑制该两株肝癌细胞增殖的作用时间主要在用药 1 天内，可持续 2 天（第 3～5 天增殖受抑制是由于更换含 LAMS 培养液所致）。

肿瘤细胞可分泌多种物质作用于凝血系统，使之呈高凝状态，此种高凝状态又促使肿瘤细胞增殖、浸润及转移[7]。APTT 为检测内源性凝血的过筛试验。本实验结果证实肝癌细胞分泌物可通过影响内源性凝血系统使凝血时间缩短，LAMS 能有效拮抗该影响。

综上所述，LAMS 可有效地抑制该两株肝癌细胞增殖，并抑制其促凝活性。至于 LAMS 抑制肝癌细胞增殖的机理及与抑制促凝活性是否关联，有待进一步研究。

（下转第 396 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

stimulation of rHuTNF[10]. In the mode of "DOX first, TNF second", DOX can induce increased rHuTNF cytotoxicity, suggesting that the tumor cells, perhaps in the presence of DOX, can no longer make these protecting, detoxifying enzymes and, as a result, are destroyed. Furthermore, DOX could enhance Fas receptor expression on the plasma membrane of colon cancer[9].

In general, the interaction of DOX and rHuTNF was found to be schedule－dependent in colon cancer cell line COLO205. Marked synergism was observed in most instances of treatment when DOX was administered prior to, but not following rHuTNF. rHuTNF kills cancer cells, but also induces a protective mechanism in the cells. However, the anti－tumor effect of TNF can be enhanced in the presence of DOX, Suggesting that the addition of DOX interferes with the protective mechanism, and the tumor cells then become more suseptible to the cytotoxic action of TNF.

REFERENCES

[1] Luo Y－P, Liu R, Salmon SE. Combinations of recombinant human tumor necrosis factor exhibit synergistic effects against human cancer cell lines[J]. Cancer Res, 1987;28(Sup): 283.

[2] Salmon SE, Bertino JR. 癌症的治疗原则[M]. 见: Bennett JC, Plom F(白永权, 主译). 第 20 版, 西塞尔内科学. 西安: 世界图书出版公司, 1999;1542－1562.

[3] Hamburger AW, Salmon SE, Primary bioassay of human tumor stem cells[J]. Science, 1977;197:461－463.

[4] Salmon SE, Hamburger AW, Soehnien B et al. Quantitation of differential sensitivity of human tumor stem cell to anti－cancer drugs[J]. N Egl J Med, 1978;298:1321－1327.

[5] Von Hoff DD, Kronmal R, Salmon SE, et al. A Southwest Oncology Group study on the use of human tumor clonig assay for predicting response in patients with ovarian cancer[J]. Cancer 1991;17:20.

[6] Devita JR, VT. 肿瘤处的原则与化学治疗[M]. 见: Helmen S, Rosenberg SA(徐从高, 张茂宏, 杨兴季等译). 第五版, 肿瘤学原理. 济南: 山东科技出版社 2001;350－365.

[7] Lu FC. Basic toxicology[M]2nd Ed. New York: Hemisphere Publishing Co, 1991;69－70.

[8] 北中千史, 口野嘉幸. ネクロ—シス样形态在示すカスペ—ゼ非依存的プログフム细胞死—アポトーシスと制御机构をにするもゥ一つの细胞死亡[J]. 蛋白质 核酸 酵素, 1999;4(14):2091～2100.

[9] Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, et al. Inhibitionof caspases increase the sensitivity of cells to nercrosis mediated by tumor necrosis factor[J]. J Exp Med, 1998;187:1477－1485.

[10] Luo Y－P, Liu R, Salmon SE. Schedule－dependent interaction of recombinant human tumor necrosis factor (rHuTNF) and doxorubicin against human colon cancer cell aline (SW480)免疫学杂志, 2001;17(4):254－258.

[11] Micheau O, Solary E, Hamman NA, et al. Sensitization of cancer cells with cytotoxic drugs to Fas mediated cytotoxicity [J]. J Natl Cancer, 1997;89:783－789.

(上接第 392 页)

参 考 文 献

[1] 范曼芳, 陈琼华. 褐藻淀粉和褐藻淀粉硫酸酯的制取、分析及生物活性比较 [J]. 中国药科大学学报, 1988;19(1): 30－34.

[2] 李晓晖, 李书平, 何云庆, 等. 灵芝多糖的含量测定研究 [J]. 中草药, 1997;28(9):530－531.

[3] 曹世龙. 肿瘤学新理论与新技术 [M]. 第'1 版. 上海: 上海科技教育出版社, 1997;539－567.

[4] Zacharski LR, Omstein DL. Mamourian AC. Low－molecular－weight heparin and cancer [J]. Semin Thromb Hemost, 2000;(5) 1:69－77.

[5] Drstein DL, Zacharski LR. The use of heparin for treating human malighancies [J]. Haemostasis, 1999;29(S1):48－60.

[6] Miao H Q, Rirka I, Tamar P, et al. Laminarin sulfate mimics the effects of heparin on smooth muscle cell propiferation and basic fibroblast growth factor－receptor binding and mitogenic activity [J]. J Cell Physiol, 1995;164(3):482－490.

[7] 王振义. 血栓与止血基础理论与临床 [M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1997;546－554.