

姬松茸多糖对 HT-29 细胞与内皮细胞侵袭、黏附的影响和作用

牟华*

(辽宁医学院机能实验中心, 辽宁 锦州 121001)

[摘要] 目的:探讨低分子量姬松茸多糖(LMPAB)对肿瘤细胞与内皮细胞侵袭和黏附的影响和作用。方法:不同剂量的 LMPAB (5,10,20 mg·L⁻¹) 分别作用于人结肠癌细胞(HT-29)和人脐静脉内皮细胞(HUVECs) 48 h,采用 MTT 法检测 LMPAB 对 HT-29 和 HUVECs 增殖的影响,采用分光光度法检测 LMPAB 对 HT-29 细胞与 HUVECs 黏附的影响,采用 Transwell 双层小室观察 LMPAB 对 HT-29 迁移穿过单层 HUVECs 的影响。结果:不同剂量 LMPAB(5,10,20 mg·L⁻¹) 对 HT-29 和 HUVECs 增殖无显著性作用;使 HT-29 黏附于单层 HUVECs 的数量得到了明显的抑制,抑制率分别为 26.96% ,23.60% ,27.66% ;对 HT-29 迁移穿过 HUVECs 也具有抑制作用,抑制率分别为 23.96% ,23.59% ,41.36% 。结论:低分子量姬松茸多糖通过抑制 HT-29 肿瘤细胞与内皮细胞的黏附以及肿瘤细胞迁移穿过内皮细胞而发挥其抗肿瘤转移作用。

[关键词] 低分子量姬松茸多糖;黏附;肿瘤转移;迁移

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0216-03

Effect of *Agaricus blazei* Polysaccharide on Invasion and Adhesion of Colon Carcinoma HT-29 to Endothelium

MU Hua*

(Liaoning Medical Collage, Jinzhou 121001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of low molecular weight polysaccharide isolated from *Agaricus blazei* (LMPAB) on tumor cell adhesion and transmigration to HUVECs. **Method:** HT-29 cell and HUVECs proliferation were analyzed by MTT. Adhesion and transmigration ability of HT-29 to monolayer HUVECs were examined by spectrophotometry and Transwell chambers. **Result:** LMPAB (5, 10, 20 mg·L⁻¹) showed no cytotoxic affect to HT-29 cells as well as the proliferation of HUVEC. LMPAB could significantly decrease counts of HT-29 adhesion to and transmigration through HUVECs. **Conclusion:** LMPAB exerts the anti-tumor metastasis activity via inhibition adhesion and transmigration of tumor cells to and through HUVECs.

[Key words] low molecular weight polysaccharide of *Agaricus blazei*; adhesion; metastasis; transmigration

肿瘤转移是一个复杂阶梯式过程,受许多因素共同影响。从理论上推论,阻断其中某一环节,则有可能阻断肿瘤转移^[1]。肿瘤细胞与血管内皮细胞的黏附是肿瘤转移的关键环节。肿瘤细胞从原发瘤进入血液循环,在适宜部位黏附于血管内皮细胞,穿出

管壁转移到次生灶,涉及肿瘤细胞与内皮细胞相互作用。因此,对两种细胞间相互作用的研究具有重要意义。低分子量姬松茸多糖(low molecular weight polysaccharide of *Agaricus blazei*, LMPAB)是姬松茸子实体经水提、醇沉、脱蛋白和层析纯化得相对分子质量为 48 000 的多糖,结构分析显示其主体结构为 β -(1→3)-D 葡聚糖,研究发现, LMPAB 具有抗肿瘤转移的作用^[2],本研究拟观察 LMPAB 对肿瘤细胞与内皮细胞侵袭和黏附的影响,以探讨其抗肿瘤转移的部分作用机制。

[收稿日期] 20101104(005)

[通讯作者] *牟华, Tel: 0416-4673330, Email: 479213480@qq.com

1 材料

1.1 药物 姬松茸 *Agariicus blazei* 购于辽宁中医药大学, LMPAB 由辽宁医学院机能实验中心将实体粉末, 料水比为 1:20 在 100 °C 条件下用水浸提 3 次, 每次 4 h, 取上清液, 减压浓缩、乙醇醇析、离心、真空干燥, 得粉末, 易溶于水, 用苯酚-硫酸法测定含糖量 17.2%, 相对分子质量为 48 000。结构分析显示其主体结构为 β -(1 \rightarrow 3)-D 葡聚糖。

1.2 细胞株和试剂 人结肠癌细胞系 (HT-29) 和人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 购于南京凯基生物科技发展有限公司; RPMI 1640 培养基 (SH30809)、胎牛血清 (16000-044) 均购于 Gibco 公司; 胰蛋白酶 (9002-07-07), EDTA, MTT 和 HEPES (7365-45-9) 购于 Sigma 公司。Rose Bengal (632-69) 购于 Sigma 公司; 以 pH 7.3 的 PBS 配制成 0.25% 的溶液, 常温保存; 纤维黏连蛋白 (FN) 购于 Roche 公司; 细胞膜红色荧光探针 (DiI) 购于上海碧云天生物技术有限公司; 小牛血清白蛋白 (BSA) 购于 TBD 公司。

2 方法

2.1 MTT 法检测 LMPAB 对 HT-29 和 HUVECs 细胞增殖的影响 将 HT-29 或 HUVECs 细胞以 5×10^4 /孔密度接种于 96 孔板中, 待细胞生长至 80% 融合后, 分别给予质量浓度为 5, 10, 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LMPAB 处理, 每个浓度设 5 个平行孔, 共孵育 48 h 后, 每孔更换为 180 μL 新的培养基, 再加入 20 μL MTT 溶液 ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 继续培养 4 h。弃去液体, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砜 (DMSO), 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光度 (A)。

2.2 LMPAB 对 HT-29 细胞跨内皮迁移的影响 将 HUVECs 以每孔 10^4 个/孔细胞接种于 8 μm 孔径的 12 孔的聚碳酸酯膜上 (即 transwell 小室上层), 培养 3~5 d 后可用于实验。每孔中加入 5, 10, 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LMPAB, 共孵育 48 h 后, 弃去 transwell 上层小室液体, 加入 100 μL ($4 \times 10^8/\text{L}$) DiI 标记的 HT-29 细胞。同时, 在下层加入含 FN ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 1 640 完全培养基, 于 37 °C, 5% CO_2 培养 8 h。多聚甲醛固定 30 min 后, 用棉签轻轻擦去聚碳酸酯膜上细胞, 将聚碳酸酯膜取下, 背面朝上在荧光显微镜下每孔随机选 5 个区域计数。

2.3 LMPAB 对 HT-29 与 HUVECs 黏附的影响^[3] 用无血清 RPMI 1640 培养液稀释 FN 至 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,

以 50 μL /孔加入 96 孔培养板, 4 °C 过夜, 包被备用。去除培养液后, 每孔加入 50 μL 含 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 的无血清 RPMI 1640 培养液, 置 37 °C 孵育 30 min。配制含 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 和 1% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液, 调整细胞密度为 5×10^4 /孔, 分别将密度为 $2.5 \times 10^5/\text{mL}$ 的 HT-29 细胞悬液 200 μL 接种于包被 FN 的 96 孔培养板, 每组平行 5 个复孔, 治疗组分别加入 5, 10, 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LMPAB, 置于 37 °C, 5% CO_2 培养 1 h, 去除未黏附的细胞, 用含 10% 小牛血清培养液清洗 2 遍; 加 0.25% Rose Bengal 100 μL /孔, 室温放置 5 min, 去除染料 Rose Bengal, 用含 10% 小牛血清培养液清洗 2 遍; 每孔加 95% 乙醇: PBS (1:1) 200 μL , 室温放置 30 min; 最后测定 570 nm 吸光度 (A_{570})。按照公式计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (\text{对照组 } A - \text{实验组 } A) / \text{对照组 } A \times 100\%$$

2.4 统计方法 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计, 多组间差异的显著性分析用单因素方差分析, 组间两两比较方差齐用 SNK 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 LMPAB 对 HT-29 和 HUVECs 增殖的影响 为了检测 LMPAB 对 HT-29 和 HUVECs 是否具有直接的细胞毒作用。不同剂量的 LMPAB (5~20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 分别作用于 HT-29 细胞和 HUVECs 48 h, MTT 法检测显示 LMPAB 对 HT-29 细胞和 HUVECs 的增殖无明显作用。

3.2 LMPAB 对 HT-29 细胞跨内皮迁移的影响 Transwell 小室实验结果显示, 在 5~20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量范围内, LMPAB 能够降低穿过单层内皮细胞的肿瘤细胞数量 ($P < 0.05$)。见图 1, 表 1。

表 1 LMPAB 对 HT-29 细胞侵袭能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	药物浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	穿过单层内皮的 HT-29 数/个	抑制率 /%
空白对照	-	31.20 \pm 6.04	-
LMPAB	5	23.53 \pm 2.82 ¹⁾	23.96 \pm 3.21
	10	23.66 \pm 3.24 ¹⁾	23.59 \pm 5.22
	20	18.13 \pm 2.29 ¹⁾	41.36 \pm 5.36

注: 与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.3 LMPAB 对 HT-29 与 HUVECs 黏附的影响 HT-29 细胞黏附于 HUVECs 的实验结果显示 (表 2), 在 5~20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量范围内, 黏附于 HUVECs 的 HT-29 细胞数目与空白对照组相比减少 ($P < 0.05$)。

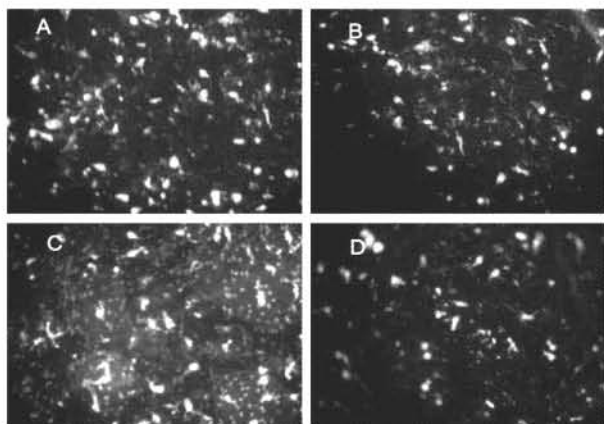


图 1 LMPAB 对 HT-29 细胞侵袭能力的影响

A. 空白对照组; B. LMPAB 5 mg·L⁻¹ 组;
C. LMPAB 10 mg·L⁻¹ 组; D. LMPAB 20 mg·L⁻¹ 组

表 2 LMPAB 对 HT-29 与 HUVECs 黏附的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	药物浓度 /mg·L ⁻¹	A ₅₇₀	抑制率 /%
空白对照	-	0.575 ± 0.060	-
LMPAB	5	0.419 ± 0.027 ¹⁾	26.96
	10	0.439 ± 0.039 ¹⁾	23.60
	20	0.415 ± 0.038 ¹⁾	27.66

4 讨论

转移是恶性肿瘤的主要生物学特性,同时也是导致绝大多数肿瘤患者的死亡重要因素。局部治疗、靶向治疗只能对原位瘤发挥作用,一旦发生转移乃至全身性播散就很难治愈。因此,寻求抑制肿瘤侵袭、转移的药物尤为重要。肿瘤的转移是包括肿瘤细胞脱离原发部位、穿过细胞外基质发生局部浸润、进入和穿出血管或淋巴管、在远处形成转移瘤等步骤的复杂过程^[4]。其中,个体肿瘤细胞从原发肿瘤脱落游离是肿瘤侵袭第一步,其本质是肿瘤细胞间黏附因子的损失,结果是赋予肿瘤细胞转移潜能。接着更为重要的是循环肿瘤细胞与脉管内皮细胞及细胞外基质细胞的黏附,这些都是肿瘤转移过程中的关键步骤。其中,肿瘤细胞与内皮细胞间相互作用是造成肿瘤器官特异性转移的重要环节^[5]。因此,抑制肿瘤细胞黏附和迁移穿过内皮细胞能够阻止肿瘤的转移,从而发挥抗肿瘤的作用^[6]。

本实验室进一步研究发现,LMPAB 具有抑制 Bel-7402 肿瘤的侵袭能力,减少黑色素瘤 B16 的实验性肺转移,但抗转移的作用机制仍不清楚,我们在本研究中观察了 LMPAB 对肿瘤细胞与内皮细胞黏附的影响,以期阐明其抗肿瘤转移的部分作用机制。实验结果发现 LMPAB 对体外培养的 HT-29 细胞及 HUVECs 并没有直接的细胞毒作用。通过体外模拟了血液循环中的肿瘤细胞穿过血管内皮这一过程,对 HT-29 和 HUVECs 之间相互作用进行了研究。黏附实验结果显示不同剂量的 LMPAB 与 HUVEC 共孵育 48 h 后,HT-29 黏附于单层内皮细胞的数量得到了明显的抑制。Transwell 小室实验显示不同剂量的低分子量姬松茸多糖对于 HT-29 迁移穿过 HUVECs 也具有抑制作用。这些结果显示抑制肿瘤细胞黏附并迁移穿过内皮细胞可能是低分子量姬松茸多糖抗肿瘤转移的机制之一。

[参考文献]

- [1] Gong Y, Sun X, Huo L, et al. Expression of cell adhesion molecules, CD44s and E-cadherin, and microvessel density in invasive micropapillary carcinoma of the breast[J]. *Histopathology*, 2005, 46(1):24.
- [2] Niu Y C, Liu J C, Zhao X M. et al. A low molecular weight polysaccharide isolated from *Agaricus blazei* suppresses tumor growth and angiogenesis *in vivo* [J]. *Oncol Rep*, 2009, 21(1): 145.
- [3] Gamble J R, V adas M A. A new assay for the measurement of the attachment of neutrophils and other cell types to endothelial cells[J]. *J Immunol Methods*, 1988, 109 (2): 175.
- [4] Garbett E A, Reed M W R, Brown N J. Proteolysis in colorectal cancer [J]. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 1999, 52 (3):140.
- [5] Song G, Ohashi T, Sakamoto N, et al. Adhesive force of human hepatoma HepG2 cells to endothelial cells and expression of E-selectin[J]. *Mol Cell Biomech*, 2006, 3 (2):61.
- [6] Valster A, Tran N L, Nakada M, et al. Cell migration and invasion assays [J]. *Methods*, 2005, 37: 208.

[责任编辑 聂淑琴]