

秋水仙碱和松胞素B对实验性肝癌细胞凝集的影响

王祖武 周佩琴 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

提要 通过对 HepA 凝集现象的定量分析, 证明 CB 2-5 $\mu\text{g/ml}$ 能对 WGA, ConA 及 PHA 等 3 种凝集素诱导的 HepA 凝集起抑制作用, CC 虽仅对 PHA 诱导的凝集有直接抑制能力, 但能加强或协同 CB 的作用。CN 1-2 mg/ml 能阻断 WGA 诱导作用, 2 mg/ml 时部分逆转 WGA 已诱导的凝集现象; 如细胞先经 CB (4 μM) 处理, 可使 GN 完全逆转 WGA 诱导的 HepA 凝集作用。从而证明, CSS 在 HepA 的凝集素受体运动的 TMC 中具有重要作用。

关键词 秋水仙碱; 松胞素 B; 实验性肝癌; 凝集素; 细胞凝集现象; 细胞骨架结构; 越膜控制

近年在肿瘤细胞膜生物特性的研究中发现, 各种凝集素如麦胚凝集素 (WGA), 蓖麻素 (RCA), 大豆凝集素 (SBA), 伴刀豆素 (Con A) 和植物血凝素 (PHA) 等能够诱导肿瘤或转化细胞发生高度凝集作用, 已被列为恶性细胞膜的重要特征之一⁽¹⁾。因此, 利用上述凝集素作为分子水平的探测物来研究肿瘤细胞膜结构的动力学特性具有一定意义。目前认为, 细胞表面成分的局部排列和运动对确定肿瘤的特异行为具有重要意义, 尤其是细胞骨架结构 (CSS) 与膜受体运动关系密切, 可形成越膜控制系统 (TMCS) 来进行调节⁽²⁾。越膜控制 (TMC) 理论是生物膜构造模式的一项重要发展⁽³⁾, 肿瘤细胞之所以易为凝集素诱导, 很可能在于 CSS 的变异⁽⁴⁾。因此关于膜组分的 TMC 研究将对肿瘤细胞表型特征的阐明具有重要作用。但目前的根据基本上来自于体外培养细胞的实验结果^(5,6)。为了进一步证实在实验动物肿瘤细胞质膜下的 CSS 对凝集素受体的运动是否也存在 TMC 机制, 本工作采用细胞凝集的定量分析法研究微管 (MT) 抑制物秋水仙碱 CC 和微丝 (MF) 抑制物松胞素 B (CB) 对 WGA, Con A 和 PHA 等 3 种凝集素诱导的

实验性肝癌腹水细胞 (HepA) 凝集作用的影响。

材 料 和 方 法

一、药物 CC 由昆明制药厂出品。CB 由美国 Calbiochem Behring Corp 出品。WGA 由美国 P-L Biochemicals, Inc 出品。Con A 由英国 BDH Chemicals Ltd 出品。PHA 由上海生物化学研究所东风药厂出品。N-乙酰葡萄糖胺 (GN) 由上海试剂厂出品。

二、肿瘤细胞 本所保存的小鼠 HepA, 经超显微结构检查仍保持恶性肝癌细胞的特征, 于接种后 8 d 左右抽取腹水, 用生理盐水与 0.07M 磷酸缓冲液的混合液 (9:1) pH=7 洗涤 2 次, 配成 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的悬液待用, 并同时镜检其形态是否完好, 细胞稀释液和药物配制液亦用上述缓冲液。

三、细胞凝集定量测定法 按 rbc 膜凝集分光定量分析法⁽⁷⁾ 改变其总体积, 吸收波长、肿瘤细胞数和凝集素浓度。取 0.5 ml 细胞悬液, 加入 PHA (100 $\mu\text{g/ml}$) ConA (20 $\mu\text{g/ml}$) 或 WGA (30 $\mu\text{g/ml}$) 在 37°C 保温 10 或 30 min。试药在加凝集素之前后加入, 总体积为 2 ml。保温后立刻转入冰浴, 以终止反应。均匀地搅动悬液 10 s, 再静置 10 min 后取出上清液 1 ml, 并稀释一倍, 用 751 型分光光度计在 600 nm 波长下测定 OD, 同时设不加凝集素或其它药物的对照组。

细胞凝集%(AR) = (1 - 实验组 OD/对照组 OD) × 100.

结 果

一、CC 和 CB 对 PHA 诱导的 HepA 凝集作用的影响 从表 1 可见, CC 和 CB 都能对 PHA 所诱导的 HepA 凝集产生非常显著的抑制作用。PHA (100 μg/ml) 与 2.5×10^7 /ml 的 HepA 在 37°C 温育 30 min 后能使 $54 \pm$ (SD) 15% 的细胞发生凝集。如果在加 PHA 之前 3 min 先加入 CC 或 CB (5 μg/ml), 而后一起保温则使 AR 分别下降至 $36 \pm 9\%$ 与 $32 \pm 6\%$, 与 PHA 组间差别 $P < 0.01$ 。

二、CC 和 CB 对 ConA 诱导的 HepA 凝集作用的影响 从表 2 可见, 20 μg/ml 的 ConA 在 37°C 温育 10 min 后可使 $57 \pm 15\%$ 的细胞发生凝集。若先用 CC 或 CB (5 μg/ml) 作用于细胞 15 min 后, 再进行凝集试验, CB 能对之产生显著抑制作用, AR 降至 $40 \pm 9\%$ ($P < 0.05$), 而 CC 作用后仍可得到 54 ± 15 ($P > 0.05$)。当

表 1 Effect of CC and CB on PHA-mediated HepA agglutination

Group	No of mice	OD ($\bar{x} \pm$ SD)	P value
Control	5	1.06 ± 0.07	< 0.01
PHA	5	0.49 ± 0.13	
CC, PHA	5	0.68 ± 0.17	< 0.01
CB, PHA	5	0.72 ± 0.13	< 0.01

表 2 Effect of CC and CB on Con A-mediated HepA agglutination

Group	No of mice	OD ($\bar{x} \pm$ SD)	P value
Control	3	1.22 ± 0.09	< 0.01
Con A	3	0.52 ± 0.13	
CC, Con A	3	0.56 ± 0.15	> 0.05
CB, Con A	3	0.73 ± 0.17	< 0.05
CC+CB, Con A	3	0.91 ± 0.09	< 0.01

CC 与 CB 各用一半剂量, 即 2.5 μg/ml 时, 两者能够协同抑制细胞凝集, 使 AR 降至 $26 \pm 2\%$, 与 ConA 组相比较 $P < 0.01$ 。

三、CC 和 CB 对 WGA 诱导的 HepA 凝集作用的影响 由表 3 可见, WGA 30 μg/ml 与 HepA 2.5×10^7 /ml 在 37°C 温育 30 min 后可使 $49 \pm 15\%$ 的细胞发生凝集。若在加 WGA 前 3 min 前就加入 CC 或 CB (5 与 2 μg/ml 两种浓度) 一起温育, CB 可使 AR 发生明显下降, 5 μg/ml 组为 $36 \pm 8\%$, 2 μg/ml 组是 $31 \pm 8\%$, 与 WGA 组相比, $P < 0.01$ 。然而 CC 则不能对 WGA 的凝集作用有所影响, 仍可得到 $47 \pm 19\%$ 与 $49 \pm 20\%$ 的 AR, 与 WGA 组之间 $P > 0.05$ 。当 CC 与 CB 各用半量 (分别为 2.5 与 1 μg/ml 两种浓度) 联合作用时, AR 可降低至 $29 \pm 3\%$ 与 $22 \pm 3\%$ 不但与 WGA 组之间 $P < 0.01$, 而且与 CB+WGA 组之间 $P < 0.05$ 。可见, 尽管 CC 本身对 WGA 诱导的凝集反应没有直接影响, 却能促进或协同 CB 对凝集反应产生抑制或对抗作用。

四、CB 对 WGA 诱导的 HepA 凝集的作用方式 从表 4 可见, WGA 与 HepA 2.5×10^7 /ml 在 37°C 相互作用 10 min 后可使 $44 \pm 8\%$ 的细胞发生凝集。如果在凝集试验开始前先用 CB (2 μg/ml) 处理 3 或 15 min, 则可使 AR

表 3 Effect of CC and CB on WGA-mediated HepA agglutination

Group	No of mice	OD ($\bar{x} \pm$ SD)	P value
Control	5	1.24 ± 0.09	< 0.01
WGA	5	0.63 ± 0.19	
CC ^a , WGA	5	0.66 ± 0.27	> 0.05
CC ^b , WGA	5	0.63 ± 0.25	> 0.05
CB ^a , WGA	5	0.80 ± 0.18	< 0.01
CB ^b , WGA	5	0.85 ± 0.22	< 0.01
(CC+CB) ^c , WGA	4	0.89 ± 0.09^e	< 0.01
(CC+CB) ^d , WGA	5	0.97 ± 0.15^e	< 0.01

a 5 μg/ml; b 2 μg/ml; c 2.5 μg/ml; d 1 μg/ml; e Compared with CB, WGA, $P < 0.05$

表 4 Effective mode of CB on WGA-mediated HepA agglutination

Group	No of mice	OD ($\bar{x} \pm SD$)	P value
Control	3	1.12 \pm 0.10	<0.01
WGA	3	0.63 \pm 0.11	
CB ^a , WGA	3	0.96 \pm 0.11	<0.05
CB ^b , WGA	3	0.89 \pm 0.05	<0.05
WGA, CB ^b	3	0.67 \pm 0.14	>0.05

a Exposed for 3 min; b Exposed for 15 min

表 5 Effect of GN on WGA-mediated HepA agglutination

Group	No of mice	OD ($\bar{x} \pm SD$)	P value	P value
Control	9	1.08 \pm 0.08	<0.001	
WGA	9	0.41 \pm 0.17		<0.001
GN ^a , WGA	4	0.74 \pm 0.35	>0.05	<0.05
GN ^b , WGA	4	0.91 \pm 0.14	<0.01	>0.05
WGA, GN ^b	5	0.76 \pm 0.25	<0.05	<0.05
CB, WGA, GN ^b	5	1.03 \pm 0.14 ^c	<0.01	>0.05

a 1 mg/ml; b 2 mg/ml; c Compared with WGA, GN^b, P<0.01

分别下降至 $19 \pm 2\%$ 与 $21 \pm 1\%$, $P < 0.05$ 。但若在 WGA 与细胞相互作用 10 min 后再加 CB 作用 15 min, 则不能显著影响 WGA 的凝集诱导作用, 所以 CB 不能逆转 WGA 的细胞凝集作用, 而只能产生抑制或阻断作用。

五、GN 对 WGA 诱导的 HepA 凝集的影响 从表 5 可见, GN 1 mg/ml 预先作用 15 min 可使 WGA 在 37°C 诱导的 HepA 细胞 AR 从 $62 \pm 18\%$ 降至 $32 \pm 15\%$, 与 WGA 组间 $P > 0.05$, 2 mg/ml 作用下, 则 AR 仅为 $16 \pm 3\%$, $P < 0.05$ 。当 WGA 诱导细胞发生凝集 10 min 后再加 GN 2 mg/ml 处理 15 min, 则比予先用 GN 2 mg/ml 处理的凝集抑制作用弱, AR 为 $30 \pm 9\%$ ($P < 0.05$)。可见, GN 可以逆转 WGA 的凝集作用, 只是所需剂量较大。如

果细胞先用 CB 2 μ g/ml 处理 15 min 后进行凝集试验 10 min, 而后再用 GN 处理 15 min 则完全逆转 WGA 诱导的凝集作用, $OD = 1.03 \pm 0.14$ 与对照细胞 (1.08 ± 0.08) 相近 ($P > 0.05$), 可见 CB 与 GN 可以阻断和逆转两方面协同进行, 完全对抗 WGA 的作用。

讨 论

本实验结果表明, MT 抑制物 CC 和 MF 抑制物 CB 都能影响 HepA 细胞的凝集, 尤其是 CB 对上述 3 种凝集素诱导的凝集现象都有抑制作用。CC 则仅能抑制 PHA 诱导的细胞凝集, 然而却能协同 CB 一起显著抑制 3 种凝集素的诱导作用。可见, MT 对受体糖蛋白的锚定作用和 MF 的收缩功能对 HepA 细胞的凝集具有重要影响, 而且这二种同属于 CSS 的机械化学蛋白 (MCP) 能起着协同调节的作用。

在上述 3 种凝集素中, 肿瘤细胞对 WGA 的诱导作用比较敏感, 因而进行了进一步的实验, 发现 CB 对凝集的影响主要为阻断或抑制作用, 不能逆转已经发生的凝集。可见, 当细胞已发生凝集后, 在相邻细胞间产生了继发的附着力, 这时再企图通过 CB 对 MF 的破坏作用来对抗凝集已无济于事。在本实验中, 采用专一的糖半抗原 GN 来与 WGA 受体竞争凝集素, 结果表明, 它不但能有效阻断, 甚至可部分逆转 WGA 诱导 HepA 的凝集作用。然而, 由于有核细胞的凝集作用较难逆转, 易于产生相邻细胞间的继发粘连作用, 不像 rbc 在发生凝集后仍易于为糖半抗原所完全逆转。为此, 我们研究了 CB 与 GN 的相互配合作用, 当细胞内的 MF 被 CB 破坏后, WGA 的细胞凝集作用已被抑制掉一半, 这时再用 GN 进行对抗就可达到完全逆转 HepA 凝集的作用, 而大于两者的相加作用。由此可见, CSS 的受损, 虽不能直接影响细胞发生凝集后的继发粘连作用, 但却有助于凝集素从其受体结合部位游离出来。总之, 从上述实验结果可以证实, 细胞质膜下含有 MCP 的 CSS 不仅在培养细胞中,

而且能在实验性肿瘤细胞的凝集中施展其重要的 TMC 作用, 值得进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 Nicolson GL. *Int Rev Cytol* 1974; 39:89
- 2 Edelman GM, Yahara I, Wang JL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973 May; 70(5):1442
- 3 Nicolson GL, Poste G, Ji TH. *The dynamics of cell membrane organization*. In: Poste G, Nicolson GL, eds. *Cell surface review*, vol 3.

1st ed. NY: North-Holland Publ Co, 1977:40-51

- 4 ditto. *Biochim Biophys Acta* 1976 Apr 30; 458 (1):1
- 5 Lazarides E, Burrige K. *Cell* 1975 Nov; 6(3):289
- 6 Nicolson GL, Poste G. *Biochim Biophys Acta* 1979 Jul 5; 554(2):520
- 7 Singer JA, Morrison, M. *ibid* 1975 Nov 3; 406 (3):553

Acta Pharmacologica Sinica 1981 Jun; 2 (2) : 135—138

EFFECT OF COLCHICINE AND CYTOCHALASIN B ON CELL AGGLUTINATION OF EXPERIMENTAL HEPATOMA

WANG Zu-wu, ZHOU Pei-qing

(Shanghai Institute of Materia Medica, Academia Sinica, Shanghai 200031)

ABSTRACT It was assessed that the effects of cytoskeletal inhibitors colchicine (CC) and cytochalasin B (CB) on lectin-mediated cell agglutination of ascitic hepatoma of mice by quantitative spectrophotometric determinations. Both CB and CC (2 or 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 4 or 10 μM) prevented the agglutination mediated by wheat germ agglutinin (WGA), concanavalin A (Con A) and phytohemagglutinin (PHA). CB alone could significantly inhibit the agglutination mediated by all of 3 lectins by 30—40%. Though it inhibited the agglutination mediated only by PHA, CC enhanced synergistically the effect of CB

upon these 3 lectins.

N-acetyl-D-glucosamine (GN, an appropriate sugar hapten inhibitor, 1—2 mg/ml or 4—8 mM) inhibited or even partially reversed the agglutination mediated by WGA. Complete reversal could be acquired if cells were pretreated with 4 mM of CB. It is surmised that the complete reversal of WGA-mediated agglutination might be achieved by the combined action of GN and CB.

KEY WORDS colchicine; cytochalasin B; experimental hepatoma; lectin; cell agglutination; cytoskeletal system; transmembrane control