

## 不同药物对人肺巨细胞癌 PGCL3 细胞表面表达的 血小板免疫相关抗原的影响<sup>△</sup>

中国中医研究院广安门医院(北京 100053) 张培彤\* 裴迎霞 祁 鑫 朴炳奎

**摘 要** 利用铺有 Matrigel 的 Boyden 小室观察抗 CD9、抗 CD42a、抗 CD 63、抗 TSP 抗体对 PGCL3 细胞侵袭作用的影响;采用流式细胞术观察 2.5、10、20 mg/L 的川芎嗪、丹参酮Ⅱ<sub>A</sub> 和 50、500、1 000 U/L 的水蛭素和凝血酶对 PGCL3 细胞膜表面 CD9、CD42a、CD63、TSP 表达的影响,观察川芎嗪、丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>、水蛭素和凝血酶对人肺巨细胞癌 PGCL3 细胞表面血小板免疫相关抗原 CD9、CD42a、CD63 和 TSP 表达的影响,部分阐述各种药物对肿瘤粘附和侵袭影响的不同作用机制。结果抗 CD9 抗体明显增加 PGCL3 细胞的侵袭,而抗 CD42a、抗 CD63、抗 TSP 抗体不同程度减少 PGCL3 细胞的侵袭。川芎嗪可使 CD9<sup>+</sup>、CD42a<sup>+</sup>、TSP<sup>+</sup> 细胞的数目减少,PGCL3 细胞表面 CD9 的表达减少;丹参酮Ⅱ<sub>A</sub> 使 CD9 的表达有所增加,CD63 和 CD42a 的表达有所下降,CD42a<sup>+</sup>、TSP<sup>+</sup> 的细胞数目下降;水蛭素使 CD9、CD63 和 CD42a 的表达有所减弱,CD42a<sup>+</sup>、CD63<sup>+</sup> 细胞的比例下降;凝血酶使 CD9 和 CD42a 的表达有所减弱,并使 CD42a<sup>+</sup> 的细胞数目减少。提示川芎嗪、丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>、水蛭素和凝血酶对 PGCL3 细胞表面表达的血小板免疫相关抗原 CD9、CD42a、CD63、TSP 的不同影响可能与它们对 PGCL3 细胞粘附和侵袭的不同作用有关。

**关键词** 川芎嗪 丹参酮Ⅱ<sub>A</sub> 水蛭素 凝血酶 血小板免疫相关抗原

血小板与恶性肿瘤的侵袭和转移密切相关,血小板表达的粘附蛋白和肿瘤细胞表面表达的血小板免疫相关抗原起着重要作用。已发现在 11 种人肿瘤细胞表面均表达 CD9、CD42a、CD63、TSP 等 4 种血小板免疫相关抗原。我们试图观察不同浓度活血药单体川芎嗪、水蛭素、丹参酮Ⅱ<sub>A</sub> 以及凝血酶对 PGCL3 细胞表面表达的 CD9、CD42a、CD63、TSP 的影响,阐述它们对 PGCL3 细胞侵袭能力影响的机制。

### 1 材料

PGCL3(人肺巨细胞癌细胞系,在裸鼠体内具高转移能力<sup>[1]</sup>)细胞来自北京医科大学病理学系,培养在含 10% 小牛血清的 RP-

MI 1640 培养液中。NIH 3T3 细胞来自北京医科大学病理学系,培养在含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,待细胞铺满瓶底 80% 时更换固定体积的新培养液,24 h 后收集培养上清备用。RPMI 1640 和 DMEM 培养基来自 GIBCO;新生牛血清来自杭州四季青生物工程材料研究所;Matrigel 来自北京医科大学细胞生物学系;直径 12 mm、孔径 8 μm 的微孔聚碳膜(Polycarbonate filter)(Millipore);抗 TSP 抗体(P10, IgG1)、抗 CD42a 抗体(SZ1, IgG2a)、抗 CD9 抗体(ALB6, IgG1)、抗 CD63 抗体(CLBGran/12, IgG1)、IgG1(679.1Mc7)和 IgG2a(U7.27)做同型对照, IgG1 FITC(679.1Mc7)、IgG1 PE

\* Address: Zhang Peitong, Guanganmen Hospital, Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing

张培彤 男,医学博士,硕士生导师,副主任医师。1994 年获中华医学会“第四届中国科学技术协会青年科技奖”提名,1995 年破格晋升副主任医师,1998 年获第三届中国杰出(优秀)青年科技创业奖,中国青年科技工作者协会成员。主要研究方向是根据中医瘀证和活血化瘀理论,从血小板与恶性肿瘤相互作用对转移具协同作用的角度探讨恶性肿瘤转移的防治方法及活血中药的作用机制。发表论文 20 余篇,参加和主持课题多次获奖。

<sup>△</sup>国家自然科学基金课题(39670912)

(679.1Mc7)、IgG2a FITC (U7.27)、CD9 FITC (ALB6, IgG1)、TSP PE (P10, IgG1)、CD42a FITC (SZ1, IgG2a)、CD63 FITC (CLBGran/12, IgG1), 以上单抗来自法国 Immunotech。牛血清白蛋白 Sigma。FACSort 流式细胞仪为美国 BD 公司产品。

2 方法

2.1 不同抗体对 PGCL3 细胞侵袭能力的影响: 用 0.02% EDTANa<sub>2</sub> 消化 PGCL3 细胞, 用无血清 PRMI 1640 洗 2 遍, 将 NIH 3T3 细胞培养上清液作为化学趋化物加入 Boyden 小室下室, 在上、下室之间加入多孔聚碳膜, 该膜预先铺好 Matrigel 0.05 mg, 在每个小室上室加入 1.2×10<sup>5</sup> 个细胞。细胞用 0.2 g/L 单克隆抗体在室温处理 20 min 后加入小室上室, 对照组采用 IgG1 或 IgG2a 作同型对照。在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 中孵育 6 h。反应结束后擦去膜上未穿过细胞, 将膜以甲醇固定, Gimsa 染色, 显微镜下观察并计数全部细胞, 每组细胞设 3 个平行样本, 重复 2 次。穿膜抑制率的计算公式如下:

侵袭抑制率 =  $\frac{\text{对照小室穿膜细胞数} - \text{处理小室穿膜细胞数}}{\text{对照小室穿膜细胞数}} \times 100\%$

2.2 不同药物对 PGCL3 细胞所表达血小板免疫相关抗原的影响: PGCL3 细胞用 0.02% EDTANa<sub>2</sub> 消化, 以 D-Hanks 液 (pH7.4) 吹打收集细胞, 以 0.5% 的 PBA (PBS 牛血清白蛋白) 洗 2 遍, 复悬于 0.5% PBA 溶液中。将 PGCL3 细胞分别以终浓度为 2.5、10、20 mg/L 的川芎嗪和丹参酮 II<sub>A</sub>, 100、500、1 000 U/L 的凝血酶和水蛭素或相应溶媒在室温处理 20 min 后加入小室上室, 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 中孵育。以 0.5% PBA 洗 2 遍, 复悬于 0.5% 的 PBA 溶液中。以 CD42a FITC、TSP PE、CD9 FITC、CD63 FITC 按常规方法标记染色, 对照管采用 IgG1 FITC、IgG2a FITC 或 IgG1 PE。细胞终浓度为 10<sup>8</sup> ~ 10<sup>9</sup> 个/L, 抗体浓度为 0.2 g/L。在室温暗处标记反应 30 min 后, 以 0.5% PBA 洗 1 遍, 用终浓度 0.1% PFA 固定, 置 4℃ 冰箱贮

存待测, 上机前过 200 目尼龙筛网, 每个试验重复 2~3 次, 每个样品收集 10<sup>4</sup> 个细胞。

2.3 流式细胞仪测试条件: FSC 电压 E-1, 增益 6.14, 线性; SSC 电压 320, 增益 1.00, 线性; FL1 电压 400, 对数; FL2 电压 340, 对数; 激光功率 15 mW, 激发光波长 488 nm。校正机器后, 先以前向角和侧向角散射光形成的散点图设定收集门, 以固定条件收集样本。每个样品管收集 10<sup>4</sup> 个肿瘤细胞后进行分析。采用 Macintosh Quadra 650 计算机和 Cell Quest 软件收集处理样品数据。

3 结果

3.1 不同抗体对 PGCL3 细胞侵袭能力的影响: 利用 Boyden 小室的单抗阻断研究显示, 抗 CD9 单抗处理 PGCL3 细胞导致细胞侵袭能力的明显增强, 而以抗 CD42a、TSP 和 CD63 抗体处理的 PGCL3 细胞侵袭能力有不同程度下降, 见图 1。

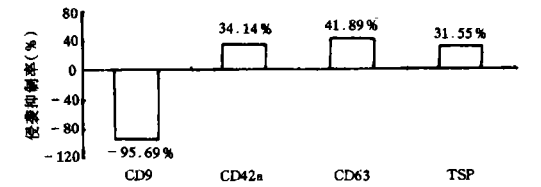


图 1 不同抗体对 PGCL3 细胞侵袭能力的影响

3.2 不同药物对 PGCL3 细胞所表达血小板免疫相关抗原的影响: 川芎嗪可使 CD9<sup>+</sup>、CD42a<sup>+</sup>、TSP<sup>+</sup> 细胞的数目减少, 还可使 PGCL3 细胞表面 CD9 的表达下降, 但它对 CD42a 和 TSP 的表达影响不大, 川芎嗪对 CD63 没有明显影响。丹参酮 II<sub>A</sub> 使 CD9 的表达有所上升, CD63 的表达有所下降, 但对二者阳性的细胞数目无明显影响。丹参酮 II<sub>A</sub> 可使 CD42a<sup>+</sup>、TSP<sup>+</sup> 的细胞数目下降, 减弱 CD42a 的表达, 对 TSP 的表达无明显影响。水蛭素在较大剂量时才使 CD9 的表达有所减弱, 可使 CD42a<sup>+</sup>、CD63<sup>+</sup> 细胞的比例下降, 并使 CD63 和 CD42a 的表达有所减弱。水蛭素对 TSP 无明显影响。凝血酶使 CD9 的表达有所减弱, 还使 CD42a<sup>+</sup> 的细胞数目

减少,表达有所下降,它对 CD63 和 TSP 的表达均无明显影响(见表 1、2)。

表 1 不同药物对 PGCL3 细胞膜表面不同抗原表达的影响

| 药物                | 剂量<br>(mg/L) | CD9   |       | CD42a |       | CD63  |       | TSP   |       |
|-------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                   |              | 阳性细胞  | 平均荧光  | 阳性细胞  | 平均荧光  | 阳性细胞  | 平均荧光  | 阳性细胞  | 平均荧光  |
| 川芎嗪               | 溶媒对照         | 9 250 | 38.68 | 5 388 | 16.47 | 5 945 | 20.87 | 3 990 | 11.21 |
|                   | 2.5          | 9 216 | 29.93 | 3 947 | 17.64 | 6 645 | 25.02 | 3 522 | 12.04 |
|                   | 10           | 8 624 | 30.43 | 3 928 | 17.66 | 6 222 | 21.90 | 2 995 | 10.45 |
|                   | 20           | 8 460 | 29.88 | 2 715 | 14.33 | 6 023 | 23.13 | 2 676 | 11.39 |
| 丹参酮Ⅱ <sub>A</sub> | 溶媒对照         | 9 235 | 31.71 | 3 924 | 17.41 | 6 367 | 23.06 | 3 467 | 12.26 |
|                   | 2.5          | 9 050 | 30.49 | 1 455 | 15.00 | 5 917 | 21.84 | 3 004 | 12.09 |
|                   | 10           | 9 195 | 33.91 | 1 131 | 13.39 | 5 687 | 21.13 | 2 288 | 11.77 |
|                   | 20           | 9 334 | 39.39 | 2 432 | 13.81 | 6 072 | 21.54 | 2 873 | 10.71 |

表 2 不同药物对 PGCL3 细胞膜表面不同抗原表达的影响

| 药物  | 剂量<br>(U/L) | CD9   |       | CD42a |       | CD63  |       | TSP   |       |
|-----|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|     |             | 阳性细胞  | 平均荧光  | 阳性细胞  | 平均荧光  | 阳性细胞  | 平均荧光  | 阳性细胞  | 平均荧光  |
| 水蛭素 | 溶媒对照        | 9 131 | 32.17 | 4 946 | 18.00 | 6 248 | 22.21 | 3 764 | 13.26 |
|     | 50          | 9 007 | 32.34 | 4 281 | 16.10 | 5 380 | 17.59 | 3 979 | 13.26 |
|     | 500         | 9 055 | 31.87 | 3 819 | 14.03 | 5 030 | 19.79 | 3 846 | 12.46 |
|     | 1 000       | 8 850 | 27.61 | 3 611 | 15.64 | 4 716 | 18.28 | 3 830 | 12.36 |
| 凝血酶 | 溶媒对照        | 9 131 | 32.17 | 4 946 | 20.05 | 6 248 | 22.21 | 3 764 | 13.26 |
|     | 50          | 9 159 | 31.23 | 4 501 | 18.00 | 6 669 | 21.07 | 3 468 | 12.82 |
|     | 500         | 9 095 | 29.30 | 3 513 | 16.12 | 6 313 | 21.69 | 3 922 | 12.41 |
|     | 1 000       | 8 832 | 27.77 | 3 087 | 15.12 | 6 600 | 21.80 | 3 397 | 12.58 |

4 讨论

我们在 11 种人肿瘤细胞表面均发现有血小板免疫相关抗原 CC9、CD42a、CD63 和 TSP 的表达。CD9、CD42a、CD63 和 TSP 通过与宿主细胞和宿主体内的生物活性物质(包括血小板、内皮细胞和内皮下基质)的粘附受体与配基的相互识别与结合,对肿瘤细胞的运动、粘附和播散起着不同的作用。CD9 对肿瘤的转移有抑制作用<sup>[2~4]</sup>,CD42a 和 TSP<sup>[5,6]</sup>的高表达对肿瘤的转移有促进作用,但对 CD63 的看法尚不一致<sup>[2,7,8]</sup>。川芎嗪、丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>、水蛭素、凝血酶对 CD9、CD42a、CD63 和 TSP 影响的真正意义还不清楚。

我们在 PGCL3 细胞对铺有纤维粘连蛋白的细胞培养板的粘附实验中发现,川芎嗪、水蛭素、凝血酶均有促进 PGCL3 细胞粘附的作用,丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>对这个过程有较为明显的抑制作用。在 Boyden 小室的实验中,凝血酶仍然表现出对 PGCL3 细胞和与血小板相互作用后 PGCL3 细胞侵袭的促进作用,而川芎嗪、丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>和水蛭素则对此显示了抑制作用。川芎嗪、丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>、水蛭素分别对 CD42a、TSP 不同程度的削弱作用可能是对

肿瘤细胞与血小板在肿瘤侵袭转移过程中相互协同作用进行抑制的机制之一。这个改变也可以用来解释削弱 PGCL3 细胞对内皮和内皮下基质粘附的机制。川芎嗪对 CD9 的明显抑制作用和丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>对 CD9 表达的增强很可能会影响到肿瘤细胞的运动和粘附过程,也许可以用来解释两种药物不同的作用机制,值得进一步探讨。丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>和水蛭素对 CD63 的轻度抑制作用可能与其抑制肿瘤细胞侵袭和转移的能力有关;凝血酶使 CD9 表达的减弱与其促进肿瘤细胞的侵袭和转移可能有直接关系,凝血酶对 CD42a 表达的减弱可能出自其使血小板 CD42a 减少的同一原理<sup>[9]</sup>,对肿瘤细胞的侵袭有促进作用。

参考文献

1 吴秉铨,等. 中华肿瘤杂志,1985,7(5):324  
2 Wright M D, et al. Immunol Today, 1994, 15:588  
3 Ikeyama S, et al. J Exp Med, 1993, 177:1231  
4 Miyake M, et al. Cancer Res, 1996,56:1244  
5 Walz-D A. Cancer Metastasis Rev, 1992,11:313  
6 Incardona F, et al. Cancer Res, 1995,55:166  
7 Metzelaar M J, et al. J Biol Chem, 1991,266:3239  
8 Demetrick D J, et al. J Nat Cancer Inst, 1992,84:422  
9 Michelson A D, et al. Blood, 1991,77:770

(1998-08-11 收稿)

Zhang Peitong, Pei Yingxia, Qi Xin, *et al.* (Guang'anmen Hospital, Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100053)

**Abstract** Effects of tetramethylpyrazine(Ⅰ), tanshinone Ⅱ A(Ⅱ), hirudin(Ⅲ) and thrombin(Ⅳ) on the expression of CD9, CD24a, CD63 and TSP on human pulmonary giant cell carcinoma (PGCL3) were investigated by Boyden Chamber covered with Matrigel with the aid of flow cytometry. Results showed that anti-CD9 antibody significantly augmented, while the other three antibodies (anti CD42a, anti CD63 and anti TSP), impaired the invasive potentials of PGCL3. Ⅰ decreased the expression of CD9 and the number of CD9<sup>+</sup>, CD42a<sup>+</sup> and TSP<sup>+</sup> cells; Ⅱ increased the expression of CD9, but decreased the expression of CD63 and CD42a as well as the number of CD42a<sup>+</sup> and TSP<sup>+</sup> cells; Ⅲ decreased both the expression of CD9, CD63 and CD42a and the number of CD42a<sup>+</sup> and CD63<sup>+</sup> cells; and Ⅳ decreased the expression of CD9, CD42a and the number of CD42a<sup>+</sup> cells. The different effects of these drugs on the expression of antigens immunologically related to platelet on PGCL3 cell surface may be related to their different influential actions on the adhesion and invasion of PGCL3 cells.

**Key words** tetramethylpyrazine tanshinone Ⅱ A hirudin thrombin flow cytometry antigen immunologically related to platelet adhesion and invasion

## 清开灵和 654-2 对谷氨酸神经毒性脑水肿的影响<sup>△</sup>

湖南医科大学湘雅医院儿科(长沙 410008) 岳少杰\* 罗自强\*\* 邓世林\*\*\*

虞佩兰 夏令伟\*\*\*

**摘要** 采用侧脑室注射谷氨酸诱发脑水肿,观察清开灵和 654-2 对谷氨酸神经毒性脑水肿的影响,结果发现:侧脑室注射谷氨酸可引起双侧大脑弥漫性脑组织水和钠含量增加,而伊文思蓝含量无明显的变化;大剂量清开灵可减轻谷氨酸所致脑组织水及钠含量的增加,而小剂量清开灵和 654-2 无明显作用,提示清开灵具有直接抗谷氨酸神经毒性作用,其作用与其剂量有关。

**关键词** 脑水肿 谷氨酸盐类 654-2 清开灵注射液

谷氨酸是中枢神经系统中一种重要的兴奋性神经递质,但当其细胞外浓度过高时,可产生兴奋性神经毒性,造成神经元的损伤。近年来的研究表明,谷氨酸的兴奋性神经毒性在多种脑损伤中起着重要的作用<sup>[1,2]</sup>。因此,寻找有效的抗谷氨酸神经毒性的中西药物是目前脑损伤防治研究的活跃领域。我们在谷氨酸神经毒性脑水肿的模型上,观察了清开

灵和 654-2 对谷氨酸神经毒性的影响,以探讨清开灵和 654-2 的脑保护机制,为临床小儿脑水肿的防治探索新的途径。

### 1 材料

SD 大鼠由我校实验动物中心提供。清开灵注射液(北京中医学院实验药厂,批号:9103102)主要组成:牛黄、水牛角、黄芩、银花、栀子等。谷氨酸钠(Sigma 公司)。654-2 注

\* Address: Yue Shaojie, Xiangya Hospital, Hunan University of Medical Sciences, Changsha  
岳少杰 副教授,1983 年获医学学士学位,1993 年获医学博士学位。主要从事新生儿疾病及小儿脑水肿防治的临床及实验研究。曾主持卫生部青年基金及国家自然科学基金青年基金课题各 1 项。已发表论文 10 余篇,并获湖南省科学进步三等奖。

\*\* 本大学生理教学研究 \*\*\* 本大学测试中心

△ 卫生部青年基金资助项目(93073) 国家自然科学基金资助项目(39700193)