

桂皮酸诱导白血病肝癌肺癌细胞的分化和抗肺癌细胞侵袭作用

黄 炜, 黄济群, 朱文渊, 张东方, 廖兆全

(广州医学院肿瘤研究所, 广东 广州 510182)

摘要: 【目的】探讨桂皮酸对人早幼粒白血病细胞(HL-60)、人肝癌细胞(BEL-7402)、人肺癌细胞(PGCL3)分化和抗PGCL3细胞侵袭的影响。【方法】用组织学方法观察各种癌细胞分化的形态学表现;用硝基四氮唑蓝(NBT)还原试验定量测定HL-60细胞的机能分化;用放射免疫测定法(RIA)测定肝癌细胞AFP分泌量,用酶学方法测定该细胞的鸟氨酸氨基甲酰转移酶(OCT)、酪氨酸- α -酮戊二酸转氨酶(TAT)、碱性磷酸酶(ALP)和 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)的比活力;用层粘连蛋白粘附测定法、纤粘蛋白趋化迁移测定法和重建基底膜侵袭测定法测定肺癌细胞的粘附、运动和侵袭能力。【结果】1 mmol/L和2.5 mmol/L桂皮酸处理使HL-60细胞形态向成熟方向分化,NBT反应显著增强($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。1 mmol/L和3 mmol/L桂皮酸处理使BEL-7402和PGCL3细胞出现分化改变,使BEL-7402细胞AFP分泌量和 γ -GT比活力显著下降($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),反映肝癌细胞分化的OCT、TAT和ALP 3种酶的比活力则显著升高($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),使PGCL3细胞软琼脂集落形成率下降,细胞的粘附能力下降(3 mmol/L $P < 0.01$),运动和侵袭能力均显著降低($P < 0.001$)。【结论】桂皮酸具有诱导HL-60、BEL-7402和PGCL3细胞分化并有抗PGCL3细胞侵袭的作用。

关键词: 桂皮酸; 白血病, 早幼粒细胞; 癌, 肝细胞; 肺肿瘤; 诱导分化; 肿瘤浸润

中图分类号: R733.6⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)01-0040-04

The Effects of Cinnamic Acid on the Differentiation of Leukemia Cells, Hepatocarcinoma Cells and Lung Cancer Cells, and the Invasive Ability of Lung Cancer Cells HUANG Wei, HUANG Ji-qun, ZHU Wen-yuan, ZHANG Dong-fang, LIAO Zhao-quan. (Cancer Research Institute, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China)

Abstract 【Objective】To investigate the effect of cinnamic acid (CA) on the differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60), human hepatocarcinoma cells (BEL-7402), human lung cancer cells (PGCL3), and the invasive ability of the PGCL3 cells. 【Methods】The morphological differentiation of the cancer cells was observed by histological technique. Functional differentiation of HL-60 cells was examined with NBT reduction test. The AFP secretary amount of the hepatocarcinoma cells were determined with radioimmunoassay (RIA), and the specific activities of ornithine carbamoyl transferase (OCT), tyrosine- α -ketoglutarate transaminase (TAT), alkaline phosphatase (ALP) and γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT) were assayed by enzymological methods. The adhesion ability, the migrated ability and invasive ability were determined with the laminin adhesion test, the chemotactic migration test and the invasion test of reconstituted basement membrane. 【Results】1 mmol/L and 2.5 mmol/L of CA induced maturation in morphology, enhanced the NBT reaction ($P < 0.01$ and $P < 0.05$) of the HL-60 cells. 1 mmol/L and 3 mmol/L of CA induced maturation in morphology of the BEL-7402 cells and PGCL3 cells, decreased the secretary amount of AFP and the specific activity of γ -GT ($P < 0.05$ and $P < 0.01$), increased the specific activities of OCT, TAT and ALP ($P < 0.05$ and $P < 0.01$), that represented differentiation of hepatocarcinoma cells of the BEL-7402 cells. Decrease of the colony forming rate in the semisolid agar ($P < 0.001$), adhesion rate (3 mmol/L $P < 0.01$), the migrated ability and invasive ability ($P < 0.001$) of the PGCL3 cells were also observed after CA treatment. 【Conclusion】Our studies identified that CA could induced differentiation of HL-60 cells, BEL-7402 cells and PGCL3 cells, and could inhibit the invasive ability of the PGCL3 cells.

Key words: cinnamic acid; promyelocytic leukemia cell; carcinoma, hepatocellular; neoplasm, lung; induced differentiation; neoplasm invasiveness

诱导肿瘤细胞向正常细胞分化和抗侵袭转移是近年来肿瘤研究的热点,寻找天然物质作为肿瘤细胞分化诱导剂及侵袭转移抑制剂具有特别重要

的意义。1995年美国国家癌症研究所Liu等^[1]首次报道桂皮酸可抑制胶质母细胞瘤和黑色素瘤等肿瘤细胞增殖,并能诱导黑色素瘤细胞分化。鉴于

收稿日期: 2001-05-15

基金项目: 广州市科委基金资助项目(S98Z309)

作者简介: 黄 炜(1962-),男,广东揭阳人,副研究员,中山医科大学1999届硕士生。

桂皮酸是一种安全而来源广泛的天然物质,为了进一步探讨桂皮酸的抗肿瘤作用,本研究用桂皮酸处理人早幼粒白血病细胞(HL-60)、人肝癌细胞(BEL-7402)和克隆化高转移人肺巨细胞癌细胞(PGCL3),用癌细胞分化的特异指标和近年来提出的定量测定癌细胞侵袭能力的新方法进行研究,发现桂皮酸有诱导HL-60、BEL-7402和PGCL3细胞分化和抗PGCL3细胞侵袭的作用,报道如下。

1 材料和方法

1.1 细胞株、培养条件和实验分组

HL-60细胞由暨南大学医学院药理教研室赠送, BEL-7402细胞由中国科学院上海细胞生物学研究所提供, PGCL3细胞由北京医科大学病理教研室提供。3种细胞均培养于含体积分数为10%热灭活小牛血清的RPMI-1640培养基中, 37℃恒温密闭培养, 取对数生长期细胞进行实验。桂皮酸浓度由细胞存活率和细胞增殖抑制率实验确定, HL-60细胞设1 mmol/L和2.5 mmol/L桂皮酸处理组, BEL-7402和PGCL3细胞均设1 mmol/L和3 mmol/L桂皮酸处理组, 每组设3个平行样品。

1.2 测定方法

HL-60细胞涂片用Wright-Giemsa染色, 光镜下观察细胞形态改变。在TPA激活下的NBT还原试验参照Collins等^[2]方法进行。BEL-7402细胞AFP分泌量按中国原子能科学研究院试剂盒说明书测定, 细胞鸟氨酸氨基甲酰转移酶(OCT)、酪氨酸- α -酮戊二酸转氨酶(TAT)、碱性磷酸酶(ALP)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)活性和蛋白质含量测定见本研究室发表的论文^[3-5]。PGCL3细胞层粘连蛋白粘附试验参照Kumagai等^[6]方法进行, 通过涂布纤粘蛋白的聚碳酸酯微孔滤膜的趋化运动试验参照Kantor等^[7]方法进行, 用基底膜胶(matrigel)重建基底膜的降解侵袭试验参照Albini等^[8]方法进行, 软琼脂集落形成试验和Con A凝集试验按常规方法进行。

2 结果

2.1 桂皮酸对HL-60细胞形态和NBT还原能力的影响

1 mmol/L和2.5 mmol/L桂皮酸处理后从第4天起HL-60细胞形态出现明显的分化改变, 由对照组的胞核大而圆, 染色质分散, 含2~4个核仁,

胞浆碱深染, 核质比例大转变为胞核固缩, 染色质致密变粗, 核仁减少或消失, 核质比例减小。两个浓度桂皮酸处理均使HL-60细胞NBT还原反应阳性率增强, 桂皮酸处理后NBT还原反应从第2天起即明显增强($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$), 随着培养天数的增加, 阳性反应逐步增强。高剂量组增强更为显著, 呈剂量依赖关系(图1)。

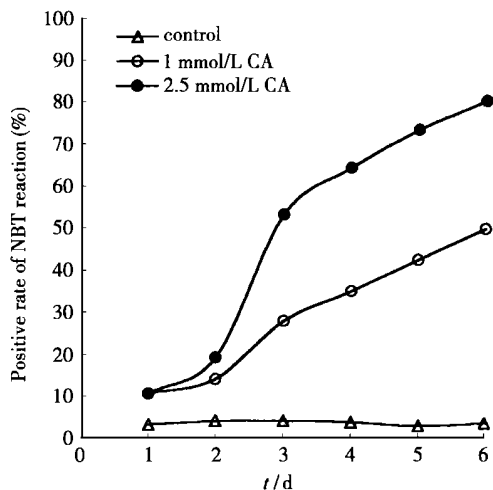


图1 桂皮酸对HL-60细胞硝基四氮唑蓝(NBT)反应的影响

Fig. 1 The influence of cinnamic acid(CA) on nitro blue tetrazolium (NBT) reaction of HL-60 cells

2.2 桂皮酸对BEL-7402细胞形态、AFP分泌量和各种酶活性的影响

1 mmol/L和3 mmol/L桂皮酸处理后从第3天起细胞形态出现分化改变, 主要表现为胞体增大, 核质比例减小, 细胞由原来的长梭形、卵圆形为主转变为以多边形为主。第4天起AFP分泌量和 γ -GT比活力均明显降低($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 反映肝癌细胞分化的指标OCT、TAT、ALP比活力则明显升高($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$), 见图2。

2.3 桂皮酸对PGCL3细胞形态、软琼脂集落形成率和Con A凝集反应的影响

桂皮酸处理3 d后细胞形态出现分化改变, 相当部分细胞呈长梭形, 甚至呈星形, 有突起伸出, 胞体明显增宽, 核质比例减小, 3 mmol/L桂皮酸处理组细胞形态改变比1 mmol/L处理组更明显。两种浓度桂皮酸处理组细胞的软琼脂集落形成率都明显低于对照组, 1 mmol/L桂皮酸处理14 d, 软琼脂集落形成率由对照组的 $18.7\% \pm 4.1\%$ 降至 $5.7\% \pm 2.3\%$ ($P < 0.001$), 3 mmol/L处理组则降至

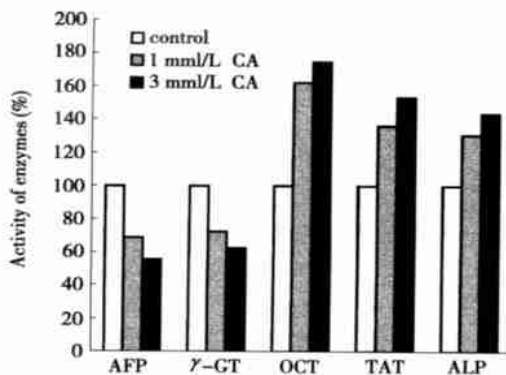


图2 桂皮酸处理4天 BEL-7402 细胞 AFP 分泌量和各种酶比活力的变化

Fig. 2 The variation of AFP secretion and specific activity of various enzymes of BEL-7402 cells treated with cinnamic acid(CA) for 4 days

4.3% ± 1.1% ($P < 0.001$)。对照组细胞在 12.5 μg Con A 中凝集反应最明显; 1 mmol/L 桂皮酸处理组细胞只在 12.5 μg 和 25 μg Con A 中出现少量凝集反应; 3 mmol/L 桂皮酸处理组细胞则在各浓度 Con A 中均未出现凝集反应。

2.4 桂皮酸对 PGCL3 细胞粘附、运动和侵袭能力的影响

1 mmol/L 和 3 mmol/L 桂皮酸处理 4 d, PG-CL3 细胞在层粘连蛋白基质上的粘附百分率均下降, 3 mmol/L 桂皮酸处理组细胞在 45 min 以后的粘附百分率由对照组的 48.0% ± 7.3% 降至 27.0% ± 4.5%, 差异非常显著(卡方检验, $P < 0.01$), 1 mmol/L 桂皮酸处理后降至 40.5% ± 5.6%, 与对照组比较差异无显著性($P > 0.05$)。两种浓度桂皮酸处理 4 d, PGCL3 细胞穿膜运动细胞数由对照组的 423 ± 56 分别降至 277 ± 52 和 222 ± 51 ($P < 0.001$), 降解穿过重建基底膜的细胞数由对照组的 339 ± 23 分别降至 234 ± 44 和 186 ± 35 ($P < 0.001$)。两个浓度处理组之间的粘附、运动和侵袭能力均有显著性差异($P > 0.05$), 呈剂量依赖关系。

3 讨论

桂皮酸是从肉桂树皮等植物中分离的单体化合物, 是苯丙氨酸在植物组织内的脱氨基产物, 它是调节植物细胞生长和分化的激素样物质。在人体内的代谢产物苯甲酸和马尿酸对正常细胞或肿瘤细胞都没有抑制增殖作用和细胞毒性作用^[1]。

有关桂皮酸对肿瘤细胞的影响国外只有初步研究, 对肿瘤细胞分化和侵袭作用只见对黑色素瘤细胞进行了诱导分化和侵袭试验的报道^[1]。我们的研究发现桂皮酸具有诱导 HL-60 细胞、BEL-7402 细胞和 PGCL3 细胞的分化作用。除细胞形态向高分化方向转变外, 代表 HL-60 细胞分化的 NBT 还原反应明显增强; BEL-7402 细胞还表现一系列生化指标的改变, 代表肝细胞恶变的指标 AFP 分泌量和 γ-GT 比活力明显下降, 代表肝癌细胞分化的指标 OCT、TAT 和 ALP 比活力则明显上升; PGCL3 细胞软琼脂集落形成率和 Con A 凝集反应降低, 这表明桂皮酸使该细胞的锚着不依赖性生长的恶性特征减弱, 可能使细胞膜表面成簇分布的 Con A 受体向正常细胞的随机分布转变。本研究 and Liu 等人^[1]的研究证明桂皮酸可以诱导多种癌细胞分化, 桂皮酸的这些作用对癌细胞可能具有普遍意义。

自 80 年代发现层粘连蛋白和层粘连蛋白受体以来, 对癌细胞侵袭转移分子机理的认识有了新的突破, 明确了粘附、运动和降解侵袭是癌细胞侵袭转移的 3 个基本环节^[9], 并于 80 年代中期和 90 年代初期先后提出了对这 3 个基本环节进行定量测定方法。本研究采用这些新的方法从癌细胞侵袭转移的基本环节揭示了桂皮酸对 PGCL3 细胞有明显的抗侵袭作用。癌细胞侵袭转移必须多次穿过基底膜屏障, 必须有足够的运动能力向基底膜迁移, 同时必须通过细胞膜的层粘连蛋白受体与基底膜的层粘连蛋白粘附, 促使癌细胞释放各种蛋白水解酶以降解基底膜的各种蛋白质组分, 从而突破基底膜屏障实现侵袭转移。本研究证明桂皮酸对这几方面都有显著抑制作用, 说明桂皮酸抗侵袭作用的机理不是对某一个环节的阻断, 而是通过多个环节实现其抗侵袭作用。

桂皮酸在我国是中药的一种有效成分, 在西方国家是长期广泛使用的一种食物添加剂, 早在 60 年代初期就被美国 FDA 批准食用, 说明是一种安全的低毒性天然化合物, 本研究揭示桂皮酸对几种癌细胞具有诱导分化和抗肺癌细胞侵袭作用, 表明桂皮酸作为一种治疗肿瘤的潜在选择是值得深入研究的。

参考文献:

- [1] Liu L, Hudgins W R, Shack S, et al. Cinnamic acid: A natural product with potential use in cancer intervention [J]. Int J Can-

- cer, 1995, 62(3): 345.
- [2] Collins S J, Rusoetti F W, Gallagher R E, *et al.* Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethyl sulfoxide [J]. *J Exp Med*, 1979, 149(4): 969.
- [3] 黄 炜, 陈 涛, 廖兆全 等. 维甲酸对人体肝癌细胞几种酶活性的影响 [J]. *广州医学院学报*, 2000, 27(3): 5.
- [4] 朱文渊, 黄 炜, 黄济群. 丁酸钠对 BEL-7402 人肝癌细胞几种酶活性的影响 [J]. *实用癌症杂志*, 1998, 13(3): 187.
- [5] 彭 安, 黄 炜, 黄济群. 维甲酸对 BEL-7402 人肝癌细胞的诱导分化作用 [J]. *中国现代医学杂志*, 2000, 10(2): 15.
- [6] Kumagai H, Tajima M, Ueno Y. Effect of cyclic RGD peptide on

- cell adhesion and tumor metastasis [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 1991, 177(1): 74.
- [7] Kantor J O, McCormick B, Steeg P S, *et al.* Inhibition of cell motility after nm23 transfection of human and murine tumor cells [J]. *Cancer Res*, 1993, 53(9): 1971.
- [8] Albin A, Iwamoto Y, Kleinman H K, *et al.* A rapid in vitro assay for quantitating the invasion potential of tumor cells [J]. *Cancer Res*, 1987, 47(5): 3239.
- [9] Stetler-Stevenson W G, Liotta L A. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis [J]. *Cancer*, 1993, 71(4): 1368.

(编辑 黄小延)

(上接第 28 页 from page 28)

胞损伤有关。从 ET-1 下降 cTnI 升高的关系推测, ET-1 可能在心脏损伤过程中起一定的作用。

参考文献:

- [1] Better O S. History of the crush syndrome: from the earthquakes of Messina Sicily 1909 to Spitak, Armenia 1988 [J]. *Am J Nephrol*, 1997, 17(3-4): 392.
- [2] Michaelson M. Crush injury and crush syndrome [J]. *World J Surg*, 1992, 16(5): 899.
- [3] Miyauchi T, Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system [J]. *Annu Rev Physiol*, 1999, 61(1): 391.
- [4] Odeh M. The role of reperfusion-induced injury in the pathogenesis of the crush syndrome [J]. *N Eng J Med*, 1991, 324(20):

- 1417.
- [5] Abassi Z A, Hoffman A, Better O S, *et al.* Acute renal failure complicating muscle crush injury [J]. *Semin Nephrol*, 1998, 18(5): 558.
- [6] Huang Y S, Yang Z C, Yan B G, *et al.* Pathogenesis of early cardiac myocyte damage after severe burns [J]. *J Trauma*, 1999, 46(3): 428.
- [7] Apple F S. Tissue specificity of cardiac troponin I, cardiac troponin T and creatine kinase MB [J]. *Clin Chim Acta*, 1999, 284(2): 151.
- [8] Murphy J T, Horton J W, Purdue G F, *et al.* Evaluation of troponin I as an cardiac dysfunction after thermal injury [J]. *J Trauma*, 1998, 45(4): 700.

(编辑 黄小延, 张敏瑞)

(上接第 39 页 from page 39)

- 互作用 [J]. *国外医学生理学病理科学与临床分册*, 1998, 18(2): 125.
- [2] 陈 修, 陈维洲, 曾贵云. *心血管药理学* [M]. 第 2 版 北京: 人民卫生出版社, 1998. 67~68.
- [3] Dorje F, Levey A I, Bram M R, *et al.* Immunological detection of muscarinic receptor subtype protein(m1-m5) in rabbit peripheral tissues [J]. *Mol Pharmacol*, 1991, 40(4): 459.
- [4] Bram M R, Collins R M, Spiegel A. Localization of mRNAs encoding the α -subunits of signal-transducing G proteins with brain and among peripheral tissues [J]. *FEBS Lett*, 1987, 222(1): 181.
- [5] Wall S J, Yasuda R B, Li M, *et al.* Development of antisera selective for m4 and m5 muscarinic cholinergic receptors; distribution of m4 and m5 receptors in rat brain [J]. *Mol Pharmacol*, 1991, 40(5): 783.
- [6] Blake A D, Anthony N M, Chen H H, *et al.* Drosophila nervous system muscarinic acetylcholine receptor: transient functional expression and localization by immunocytochemistry [J]. *Mol Pharmacol*, 1993, 44(4): 716.
- [7] Magnusson Y, Marullo S, Hoyer S, *et al.* Mapping of a func-

- tional autoimmune epitope on the beta-1 adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy [J]. *J Clin Invest*, 1990, 86(5): 1658.
- [8] Magnusson Y, Hoyer S, Lengagne R, *et al.* Antigenic analysis of the second extra-cellular loop of the human beta-adrenergic receptors [J]. *Clin Exp Immunol*, 1989, 78(1): 42.
- [9] Fu L X, Magnusson Y, Bergh C H, *et al.* Localization of a functional autoimmune epitope on the muscarinic acetylcholine receptor 1 in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy [J]. *J Clin Invest*, 1993, 91(5): 1964.
- [10] Merrifield R B. Solid phase peptide synthesis [J]. *J Am Chem Soc*, 1963, 85(2): 2149.
- [11] Green N H, Alexander H, Olson A, *et al.* Immunogenic structure of the influenza virus hemagglutinin [J]. *Cell*, 1982, 28(3): 477.
- [12] 巴德年. *当代免疫学技术与应用* [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998. 158~167.
- [13] 孙瑞元. *定量药理学* [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987. 393~452.

(编辑 黄小延)