

·基础研究·

组胺对 C57BL/6 小鼠 B16 黑色素瘤转移行为的影响

秦迎松¹, 张旭², 李俐¹, 于红丽³

Effect of Histamine on Metastasis of Melanoma B16 Cell Xenograft in C57BL/6 Mice

QIN Ying-Song¹, ZHANG Xu², LI Li¹, YU Hong-Li³

1. 徐州医学院
病理生理学教研室,
江苏 徐州 221002
2. 徐州医学院附院
耳鼻喉科,
江苏 徐州 221002
3. 徐州医学院
神经生物学教研室,
江苏 徐州 221002

1. Department of Pathophysiology,
Xuzhou Medical College,
Xuzhou, Jiangsu, 221002,
P. R. China
2. Department of
Otorhinolaryngology,
Affiliated Hospital of Xuzhou
Medical College,
Xuzhou, Jiangsu, 221002,
P. R. China
3. Department of Neurobiology,
Xuzhou Medical College,
Xuzhou, Jiangsu, 221002,
P. R. China

通讯作者:秦迎松

Correspondence to:QIN Ying-Song
Tel:86-516-82771517
E-mail:qinyingsong@xzmc.edu.cn

基金项目:江苏省教育厅自然科学
基金项目(No. 05KJB320140)

Grant:Natural Science Foundation
of Jiangsu Province
(No. 05KJB320140)

收稿日期:2006-12-06

修回日期:2007-01-30

[ABSTRACT] BACKGROUND & OBJECTIVE: In the biotherapy for tumors, microvessel permeability is the main barrier for large molecular antibody-coupled antitumor drugs to enter the tumor mass. Histamine may enrich these drugs in the tumor matrix through enhancing microvessel permeability and tissue-fluid formation. This study was to investigate whether the increased microvessel permeability and more tissue fluid formation could increase the probability of lymphatic or hemal metastasis of tumor cells. METHODS: Cultured melanoma B16 cells were inoculated into the left armpit of C57BL/6 mice to develop melanoma. Five days after inoculation, the test group were injected subcutaneously at the dorsal part with histamine (300 mg/kg) every other day for 5 times, while the control group were given normal saline. The metastasis statuses in the lymph node, liver, lung, spleen, and brain were examined by histochemistry. Student *t*-test and Fisher's exact test were used respectively to analyze the effects of histamine on tumor growth and metastasis. RESULTS: All the mice developed melanoma after inoculation. At the end of the experiment, the tumor weight was significantly lighter in test group than in control group [(5.26 ± 1.55) g vs. (6.96 ± 1.31) g, $P < 0.01$]. The lymphatic and hemal metastasis rates were significantly lower in test group than in control group (33.3% vs. 75.0%, $P < 0.05$; 25.0% vs. 75.0%, $P < 0.05$). CONCLUSION: Histamine can inhibit the metastasis of melanoma B16 cells in C57BL/6 mice either through lymphatic or hemal route, and this partly because of its inhibitory effect on tumor growth.

KEYWORDS: Histamine; Melanoma; B16 cell; Metastasis; Mouse

【摘要】背景与目的:肿瘤生物治疗中微血管壁通透性是大分子抗体偶联药物进入瘤体的主要屏障。组胺可通过增加微血管壁通透性和组织液的生成促进抗体偶联物在肿瘤局部的富集。本研究观察组胺所致微血管壁通透性的增加和组织液的生成增多是否会增加肿瘤血行及/或淋巴的转移。方法:采用瘤细胞悬液接种法将小鼠黑色素瘤细胞 B16 注入小鼠左上肢腋部皮下,建立 C57BL/6 小鼠荷瘤模型。实验组接种第 6 天起,背部皮下注射 300 mg/kg 组胺,隔日一次,共 5 次,对照组注射等体积生理盐水。组织化学方法检测肿瘤细胞在各脏器的转移情况。分别用 Student *t*-test 和四格表资料确切概率法分析组胺对肿瘤细胞增殖和转移的作用。结果:接种成瘤率 100%。300 mg/kg 组胺隔日一次皮下注射能明显抑制肿瘤的生长,实验组与对照组瘤重分别为 (5.26 ± 1.55) g 和 (6.96 ± 1.31) g,二者间差异有统计学意义($P < 0.01$)。实验组与对照组淋巴结转移率分别为 33.3% 和 75.0%,血行转移率分别为 25.0% 和 75.0%,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:组胺能够抑制 C57BL/6 小鼠 B16 黑色素瘤的血行和淋巴转移,该抑制作用

部分与其抑制瘤细胞的增殖有关。

关键词:组胺;黑色素瘤;B16 细胞;转移;小鼠

中图分类号:R730.58 文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2007)08-0833-04

抗体偶联药物是目前抗肿瘤治疗研究的热点^[1,2],但据推算,肿瘤组织的单抗摄取量仅为 0.005%(每克组织中注入剂量)^[3],血管壁的通透性和致密的细胞间质成为大分子药物进入瘤细胞的主要屏障。组胺是一种具有生理活性的小分子胺,能够增加微血管壁通透性,使大量的炎性细胞和抗体等生物活性物质聚集于炎症局部发挥作用。外源性组胺还具有抑制肿瘤细胞增殖,促使肿瘤组织退行性变、增加淋巴细胞在瘤体内渗透等作用^[4,5]。实验证明,荷瘤机体的肿瘤组织对组胺最敏感,300 mg/kg 组胺皮下注射能明显增加 C57BL/6 小鼠 B16 黑色素瘤内微血管壁的通透性,使伊文思蓝和抗体更多地富集于肿瘤组织,而对其它脏器不产生明显的水肿、出血等不良反应,为组胺与抗体偶联物的联合应用提供依据。本研究进一步表明,应用组胺后微血管壁通透性的增加和随之而来的组织液的生成增多,不但没有增加肿瘤细胞血行和淋巴转移的概率,反而使其降低,该结果部分的与组胺对肿瘤细胞的生长抑制作用有关。

1 材料与方法

1.1 实验材料

组胺购自上海化学试剂采购供应站。胰蛋白酶、RPMI-1640 细胞培养基购自上海普飞生物技术有限公司。小鼠黑色素瘤细胞 B16 购自上海午立生物技术有限公司。胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。C57BL/6 小鼠由徐州医学院动物实验中心提供,动物合格证号 SYXK(苏)2002-0038。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠荷瘤模型的建立 5~6 周龄 C57BL/6 小鼠,体重 18~22 g,雌雄不限。采用细胞悬液接种方法。收集培养的对数生长期的 B16 细胞,调整细胞密度至 $1 \times 10^7/\text{ml}$,以每只 200 μl 剂量接种于小鼠左上肢腋部皮下。

1.2.2 动物分组 荷瘤小鼠随机分成 2 组,每组 12 只。实验组接种第 6 天起,背部皮下注射 300 mg/kg 组胺,隔日一次,共 5 次;对照组相同部位注

射相同体积的生理盐水,方案同前。末次给药后第 2 天,即接种第 15 天时取材。两组小鼠每次给药前及最后取材前均用游标卡尺测量肿瘤最长径(L)和最短径(W),按公式 $L \times W^2 \times 0.52$ 计算肿瘤体积(V),并按 $(V_n - V_{n-1})/V_{n-1}$ 计算肿瘤生长指数, n 为测量次数。

1.2.3 观测指标 取材时完整摘除肿瘤,滤纸吸干后称重;取肝、脾、肺、脑组织及各级引流淋巴结,常规制备石蜡切片,HE 染色,观察组胺对肿瘤细胞血行及淋巴转移的影响。以肝、脾、肺、脑出现转移灶为血行转移阳性,局部淋巴结内出现非蔓延性转移灶为淋巴转移阳性。

1.3 统计学分析

组胺对肿瘤生长的抑制作用,采用 SPSS 11.0 统计学软件,通过两独立样本的 t 检验方法进行组间差异的统计学分析。组胺对肿瘤血行及淋巴转移概率的影响,采用四格表资料的确切概率法进行组间差异的统计学分析。以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 C57 小鼠荷瘤模型的建立

实验过程中未见明显排斥反应,成瘤率 100%。B16 细胞起源于 C57BL/6 小鼠,该模型能够更好地模拟人体荷瘤的实际情况。

2.2 组胺对肿瘤细胞生长的抑制作用

300 mg/kg 组胺隔日一次皮下注射能明显抑制 B16 细胞在 C57BL/6 小鼠体内的生长。实验组与对照组瘤重分别为 $(5.26 \pm 1.55)\text{g}$ 与 $(6.96 \pm 1.31)\text{g}$,二者间差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。从肿瘤生长指数看,其抑制作用在实验初期更加明显,随着肿瘤不断生长,抑制强度渐趋减弱,而二组瘤体积差别则日益明显(图 1)。

2.3 组胺对肿瘤细胞血行及淋巴转移行为的影响

淋巴转移:对照组 12 只荷瘤小鼠中,9 只发现有淋巴结转移,转移率 75.0%。其中 1 只瘤体较大,长满整个腋窝,已无法分辨淋巴结,但对侧腋窝有一阳性淋巴结,其余个体分别有 1~4 个淋巴结阳性。实验组有 4 例发生淋巴结转移,转移率 33.3%,转移淋巴结的个数 1~3 个。侵入淋巴结的肿瘤细胞并不聚集成癌巢,且迅速分化成熟,合成大量的黑色素颗粒,不合成黑色素的幼稚细胞极少见(图 2A)。而在瘤体内,却常有大片的幼稚细胞存在(图 2B)。

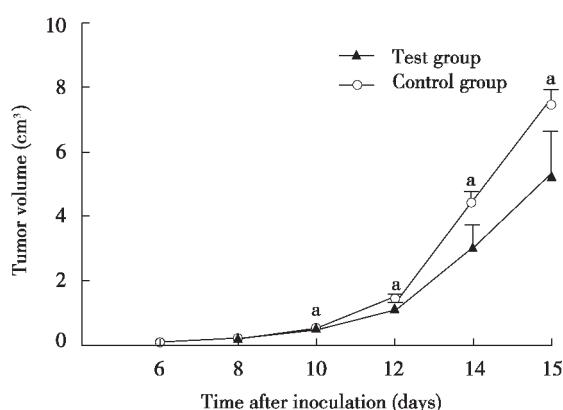


图 1 组胺对 C57BL/6 小鼠 B16 黑色素瘤生长的影响
Figure 1 Effect of histamine on tumor growth of melanoma B16 cells in C57BL/6 mice

血行转移:对照组 12 只小鼠均未见肝、脑转移;肺转移 3 例,转移率 25.0%,转移灶极小,不超过一个高倍视野(图 2C)。脾转移 9 例(包括上述 3 例肺转移),转移率 75.0%,其中 4 例肉眼可见脾背侧段变黑,而形态未见明显改变。镜下转移灶的分布无明显规律,似沿脾小梁分布者居多,且细胞体积较大,深入到脾实质中的瘤细胞体积小,成熟度高(图 2D)。脾被膜下转移不明显,可能与其结构致密有关。从转移的例数和转移灶的大小看,脾转移的发生先于肺转移出现。实验组仅发现 3 例镜下可见的脾转移,转移率 25.0%,未发现明显的肺转移。实验组与对照组相比,血行转移及淋巴转移率均明显降低($P < 0.05$)。

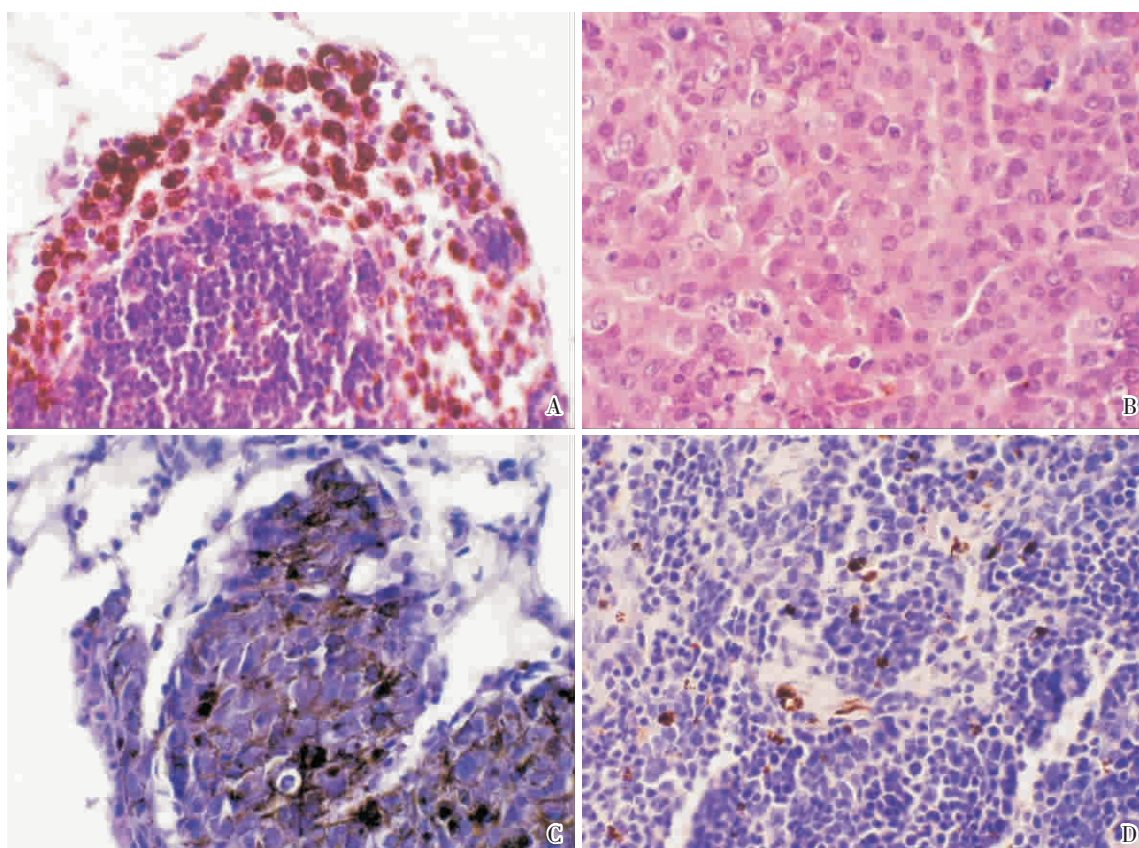


图 2 组胺对 C57BL/6 小鼠 B16 黑色素瘤转移的影响(HE ×400)

Figure 2 Effect of histamine on the metastasis of melanoma B16 cells in C57BL/6 mice (HE ×400)

- A: Tumor cells congregated in the marginal sinus of the metastatic lymph node, separated from each other, and differentiated into melanin-forming cells.
- B: Comparing with those in the metastatic lymph node, some of the tumor cells in the tumor mass are in blooming growth and are poorly differentiated.
- C: Metastasis in the lung occurs later than that in the spleen, and the metastatic tumor cells are gathered into a nest.
- D: Metastatic tumor cells in the spleen are mature. Their growth are strongly inhibited, as seen from the cell size, and distribute randomly.

3 讨 论

由实验结果可知, 组胺皮下注射能明显抑制 B16 细胞在 C57BL/6 小鼠体内的生长。其具有扩张血管、增加微血管壁通透性和组织液生成的作用, 并没有增加肿瘤细胞血行和/或淋巴转移的概率。相反, 组胺使其血行及淋巴转移概率明显降低, 后者部分的与组胺抑制肿瘤细胞增殖有关。

组胺抑制肿瘤细胞增殖的机制尚不清楚。有文献认为组胺能够抑制巨噬细胞、中性粒细胞等吞噬细胞中氧自由基的生成和释放, 保护自然杀伤细胞和 T 细胞不受氧化应激损伤, 间接发挥抗肿瘤作用^[6]。我们认为组胺增加微血管壁通透性, 使瘤细胞间组织液的生成增多, 也是导致肿瘤生长抑制的一个重要原因。尤其是肿瘤组织内血管和淋巴管的发育不完善, 存在许多没有相互交通的盲端, 导致组织液的回流障碍。组胺使瘤内组织液生成增多、瘤细胞间水肿加剧, 进而加重瘤细胞营养不良, 激化其营养供应不足与生长代谢旺盛间的矛盾, 促使瘤细胞坏死或凋亡, 并降低其转移能力。

组胺抑制肿瘤生长的现象已有文献报道^[4], 其早期抑制作用较后期强的结论也与上述文献相一致, 后者可能与组胺频繁应用时其受体脱敏有关。进一步优化组胺的剂量、给药方案和疗程, 将有益于长期、持续发挥组胺的抗肿瘤活性。

更为重要的是, 组胺增加微血管壁通透性和组织液生成的作用不但没有增加肿瘤细胞血行及淋巴转移的概率, 反而明显抑制了转移的发生, 这为组胺与大分子抗体偶联抗肿瘤药物的联合应用提供了前提和依据。组胺增加微血管壁通透性和组织液生成的作用, 使大分子药物有更多的机会进入肿瘤间质并在其中富集, 从而增强药物的肿瘤杀伤活性。

[参 考 文 献]

- [1] Pastan I, Hassan R, Fitzgerald D J, et al. Immunotoxin therapy of cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(7):559-565.
- [2] 梁治平, 刘长征, 程竞仪, 等. PYM-BAC₅ 和 ¹³¹I-BAC₅ 联合导向治疗鼻咽癌的实验研究 [J]. *癌症*, 2003, 22(8):831-835.
- [3] Dykes P W, Bradwell A R, Chapman C E, et al. Radioimmunotherapy of cancer: clinical studies and limiting factors [J]. *Cancer Treat Rev*, 1987, 14(2):87-106.
- [4] Burtin C, Scheinmann P, Salomon J C, et al. The influence of intraperitoneal injections of histamine on tumour growth in fibrosarcoma-bearing mice [J]. *Cancer Lett*, 1981, 12(3):195-201.
- [5] Lespinats G, Bonnet M, Thouzeau S, et al. Enhancement by serotonin of intra-tumour penetration of spleen cells [J]. *Br J Cancer*, 1984, 50(4):545-547.
- [6] Donskov F, Middleton M, Fode K, et al. Two randomised phase II trials of subcutaneous interleukin-2 and histamine dihydrochloride in patients with metastatic renal cell carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2005, 93(7):757-762.

[编辑及校对:张 菊]