

文章编号:1005-6947(2008)10-0998-05

· 基础研究 ·

# MCP对结肠癌肝转移的 galectin-3 表达的影响

刘海鹰, 黄志良, 杨国华

(广州医学院附属肿瘤医院 腹部外科, 广东 广州 510095)

**摘要:**目的 探讨 galectin-3 在小鼠结肠癌肝转移中的表达及 MCP 对其抑制的作用。方法 75 只 Balb/c 小鼠随机分为阴性对照组, 阳性对照组, 低浓度 MCP 组, 中浓度 MCP 组, 高浓度 MCP 组。阳性对照组和各 MCP 治疗组小鼠经脾脏下极包膜注入 CT-26 结肠癌细胞建立结肠癌肝转移模型。MCP 加入饮用水中, 各处理组的浓度分别为 0 mg/mL, 0.01 mg/mL, 0.025 mg/mL 和 0.05 mg/mL。3 周后观察各组小鼠肝转移情况。采用酶联免疫吸附实验 (ELISA) 方法检测小鼠血清 galectin-3 浓度; 制作肝转移瘤组织芯片、用免疫组化方法检测肝转移瘤组织中 galectin-3 的表达。**结果** (1) 除阴性对照组外各组脾脏原发瘤体积中位数分别为  $1.51 \text{ cm}^3$ ,  $0.93 \text{ cm}^3$ ,  $0.77 \text{ cm}^3$  和  $0.70 \text{ cm}^3$ 。高浓度 MCP 组肿瘤体积较对照组明显降低 ( $P < 0.05$ )。 (2) 除阴性对照组外, 各组肝转移率依次为 100%, 80%, 73.3% 和 60%。高浓度 MCP 组肝转移灶数目明显低于阳性对照组 ( $P < 0.05$ )。 (3) 阳性对照组和各治疗组血清 galectin-3 浓度均明显高于阴性对照组 (均为  $P < 0.01$ ); 阳性对照组与各治疗组间差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。 (4) 除阴性对照组外, 各组肝转移瘤组织中 galectin-3 表达相互间差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。**结论** galectin-3 在结肠癌肝转移中呈高水平表达; MCP 能明显抑制结肠癌的肝转移。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(10):998-1002]

**关键词:** 结肠肿瘤; 肝肿瘤/继发性; 肿瘤转移; 果胶; 小鼠

**中图分类号:** R 735.3 **文献标识码:** A

## The effect of modified citrus pectin on the expression of galectin-3 in liver metastasis from colon cancer

LIU Haiying, HUANG Zhiliang, YANG Guohua

(Department of Abdominal Surgery, the Affiliated Tumor Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510095, China)

**Abstract:** **Objective** To study the expression of galectin-3 in liver metastasis from colon cancer and its inhibition by modified citrus pectin (MCP) in mice. **Methods** Seventy-five Balb/c mice were randomly divided into 5 groups: negative control group, positive control group, low concentration MCP group, middle concentration MCP group and high concentration MCP group. CT-26 colon cancer cells were injected into the subcapsule of spleen in mice to establish a colon cancer liver metastasis model, but not in the negative group. The concentration of MCP in drinking water was 0.0%, 1.0%, 2.5% and 5.0% (w/v) in 4 cancer model groups respectively. Liver metastasis was observed after 3 weeks. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the concentration of Galectin-3 in serum, and tissue microarray technique and immunohistochemistry to analyze the expression of Galectin-3 in liver metastasis. **Results** (1) Except in the negative control groups, the median volume of splenic primary lesions in each group was  $1.51 \text{ cm}^3$ ,  $0.93 \text{ cm}^3$ ,  $0.77 \text{ cm}^3$  and  $0.70 \text{ cm}^3$  respectively. The volume in middle and high concentration MCP groups were

**基金项目:** 广东省中医药局科研计划重点项目 (2207141)。

**收稿日期:** 2008-06-10; **修订日期:** 2008-09-03。

**作者简介:** 刘海鹰, 男, 广州医学院附属肿瘤医院主任医师, 主要从事消化系统肿瘤基础及临床方面的研究。

**通讯作者:** 刘海鹰 E-mail:gzdlhy@yahoo.com.cn

significantly smaller than that in positive control group (both  $P < 0.05$ ). (2) Except in the negative group, the percentage of liver metastasis in each group was 100%, 80%, 73.3% and 60% respectively. The number of liver metastases in high concentration MCP groups was significantly fewer than in positive control group ( $P < 0.05$ ). (3) The concentration of galectin-3 in serum in positive control group and MCP-treatment groups was significantly higher than in the negative groups ( $P < 0.01$ ). But between the positive control group and MCP-treatment groups, there was no significant difference (all  $P > 0.05$ ). (4) Except in the negative groups, the expression of galectin-3 in liver metastases in each group showed no significant difference (all  $P > 0.05$ ). **Conclusions** The expression of galectin-3 was obviously increased in liver metastasis from colon cancer, and MCP can effectively inhibit the development of liver metastasis of colon cancer.

[ Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(10): 998 - 1002 ]

**Key words:** Colonic Neoplasms; Liver Neoplasms /second; Neoplasm Metastasis; MCP; Mice

**CLC number:** R 735.3

**Document code:** A

肝转移是影响结肠癌治疗效果和术后生存率的主要原因,抑制肝转移有助于提高结肠癌的疗效和生存率<sup>[1]</sup>。肿瘤细胞表面半乳糖凝素-3 (Galectin-3)与肿瘤转移过程中细胞黏附和聚集功能密切相关,多种高转移性肿瘤细胞能高表达 galectin-3<sup>[2]</sup>。改良柑橘果胶 (Modified citrus pectin, MCP)的主要成分半乳糖能有效封闭和阻断 galectin-3 的功能表达。本研究主要利用结肠癌肝转移动物模型,探讨 MCP 对结肠癌肝转移的抑制作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 6~8 周龄 Balb/c 雌性小鼠 75 只,由广东省医学动物实验中心提供(动物合格证号:SCXK 粤 2006A019),体重 20~25 g;实验小鼠无特殊病原菌。实验在中心 SPF 级动物实验室进行。

1.1.2 试剂和仪器 MCP 由美国圣特莱公司提供。羊抗鼠 galectin-3 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒购自美国 R&D 公司。羊抗鼠 galectin-3 免疫组织化学试剂盒购自深圳晶美生物制品公司。主要仪器包括美国 Beecher 组织芯片仪和上海科华 ST360 全自动多功能酶标仪。

1.1.3 细胞株及培养 小鼠结肠腺癌细胞株 CT-26 由我院生物工程实验室传代保存。细胞使用 RPMI-1640 细胞培养液(含 10% 新生小牛血清,青霉素 100 U/mL 及链霉素 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,购自杭州四季青生物工程有限公司),37  $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  培养箱中进行传代培养。

### 1.2 实验方法

1.2.1 结肠癌肝转移动物模型的建立 75 只小鼠随机分为 5 组,每组 15 只:阴性对照组(不予注射细胞),阳性对照组,低浓度 MCP 治疗组

(1%),中浓度 MCP 治疗组(2.5%),高浓度 MCP 治疗组(5%)。取处于指数生长期的 CT-26 细胞加入适量生理盐水配成  $1 \times 10^6/\text{mL}$  细胞悬液。除阴性对照组外,其余 4 组均用 4% 水合氯醛腹腔注射麻醉小鼠(0.1 mg/10 g),开腹,在脾脏下极包膜注入 CT-26 细胞悬液 0.05 mL,1 号丝线间断缝合切口关腹。3 个治疗组小鼠术后第 2 天开始药物实验,MCP 加入饮用水中配成相应浓度,对照组以同等量蒸馏水代替。实验期间小鼠自由进食。

1.2.2 病理观察 实验 3 周后摘眼球法采集小鼠外周血提取血清,引颈法处死小鼠。打开腹腔观察脾脏有无病灶,记录肿瘤大小和数目。肿瘤体积  $V = ab^2/2$  (a 为肿瘤最大径;b 为肿瘤最小径),如有多个肿瘤则计算体积总和。观察记录肝脏转移灶数目,所有转移瘤送病理切片 HE 染色。根据周志伟等<sup>[3]</sup>的方法将肝转移灶数目分为 4 个等级:0 级为肝脏无转移病灶;I 级为 1~5 个转移病灶;II 级为 6~10 个转移病灶;III 级为 >10 个转移病灶。

1.2.3 ELISA 法检测 galectin-3 浓度 小鼠外周血离心(3 000 r/min  $\times$  5 min)提取血清,严格按 ELISA 试剂盒说明进行操作(双抗体夹心法):血清以 1:20 稀释后每孔加入 100  $\mu\text{L}$ ,室温孵育 2 h,洗板,加入工作浓度辣根过氧化物酶标抗体 100  $\mu\text{L}$ ,室温孵育 2 h,洗板,再加入 100  $\mu\text{L}$  底物四甲联苯胺,室温避光孵育 20 min 后加入 50  $\mu\text{L}$  终止液,酶标仪 450 nm 波长处读取吸光度 (OD) 值。根据标准品 OD 值拟合标准曲线回归方程并绘制标准曲线,根据回归方程换算各样本 galectin-3 浓度。

1.2.4 肝转移瘤组织芯片制作 复查 HE 及免疫组化染色切片,选择典型癌灶(富有癌细胞且无坏死出血的区域),用组织芯片仪在预先准备

好的空白蜡块(25 mm × 25 mm × 20 mm)上按设计位置打孔,孔径 1.2 mm,孔间距 1.0 mm,排成 10 行 × 5 列共 50 点微阵列。用 1.2 mm 穿刺针将标记好的瘤体组织柱取出,转移到空白蜡块的相应位置,将 47 例组织芯安插于 2 个空白蜡块中,其中每个组织芯蜡块含 47 个组织芯(包括 2 个标记点)。将制成的组织芯蜡块面朝下放在铜板上 55 °C 放置 30 min,轻压模块使组织柱在模块上排平,冷却至室温,蜡块在 4 °C × 4 h 预冷后快速进行切片修整,切片待用。

**1.2.5 免疫组化染色法** 对肝转移瘤组织芯片和石蜡切片均进行 galectin-3 免疫组化染色。所有操作严格按照免疫组化试剂盒说明进行(enson 法):切片脱蜡、水化、修复抗原,洗涤后加入 3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,孵育 10 min,一抗孵育 30 min,二抗孵育 30 min,二氨基联苯氨(DAB)染色。结果判断由 2 名病理科医师双盲阅片。galectin-3 表达强度参考 Sanjuan 等<sup>[4]</sup>的标准,以胞浆或胞膜中呈棕黄色染色为阳性,按切片中阳性肿瘤细胞所占比例分为 4 级,阴性(-)为阳性细胞 < 10%,弱阳性(+)为 11% ~ 50%,阳性(++)为 51% ~ 75%,强阳性(+++)为 75% 以上。

### 1.3 统计学处理

所有数据采用 SPSS10.0 软件进行统计学处理。脾脏肿瘤体积、肝转移瘤数目、血清和组织 galectin-3 表达比较采用非参数检验方法。

## 2 结果

### 2.1 小鼠一般情况

实验 3 周无小鼠死亡。阳性对照组中 6 只荷瘤小鼠外观可见腹部明显隆起肿块;阳性对照组和各治疗组中部分荷瘤小鼠出现活动减少、反应迟缓、毛色暗淡、进食减少和精神萎靡等衰竭现象(图 1)。

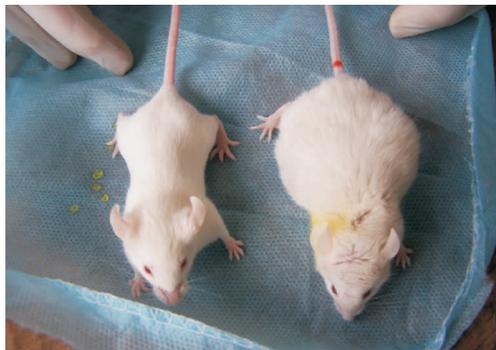


图 1 正常小鼠与荷瘤小鼠外观

### 2.2 肝脏转移瘤数目

除阴性对照组外,各组肝转移率:阳性对照组为 100%,低浓度 MCP 治疗组为 80%,中浓度 MCP 治疗组为 73.3%,高浓度 MCP 治疗组为 60%。后者肝转移数目均明显少于阳性对照组( $P < 0.05$ )(表 1)(图 2-3)。

表 1 各组肝脏转移瘤数目

| 组别      | n  | 肝转移数目(分级) |         |           |           | 转移率(%)             |
|---------|----|-----------|---------|-----------|-----------|--------------------|
|         |    | 0(0个)     | I(1~5个) | II(6~10个) | III(>10个) |                    |
| 阳性对照    | 15 | 0         | 2       | 7         | 6         | 100.0              |
| 低浓度 MCP | 15 | 3         | 6       | 2         | 4         | 80.0               |
| 中浓度 MCP | 15 | 4         | 7       | 1         | 3         | 73.3               |
| 高浓度 MCP | 15 | 6         | 4       | 2         | 3         | 60.0 <sup>1)</sup> |

注:1)与阳性对照组比较, $P < 0.05$



图 2 脾脏种植瘤与肝脏转移瘤

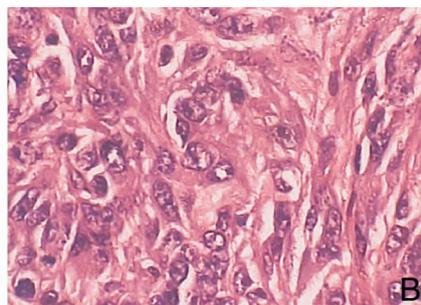
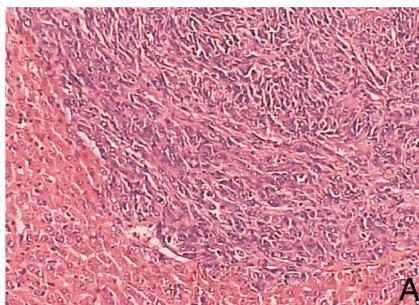


图 3 肝转移瘤病理切片 A:HE × 200; B:HE × 400

## 2.3 脾脏肿瘤体积

阳性对照组,低、中、高浓度 MCP 治疗组脾脏肿瘤体积中位数分别为  $1.51 \text{ cm}^3$ ,  $0.93 \text{ cm}^3$ ,  $0.77 \text{ cm}^3$  和  $0.70 \text{ cm}^3$ 。其中中、高浓度 MCP 组肿瘤体积明显低于对照组(均为  $P < 0.05$ )(表2)。

## 2.4 血清 galectin-3 浓度

根据标准曲线回归方程换算各样本血清 galectin-3 浓度。经检验,阳性对照组和各 MCP 治疗组血清 galectin-3 浓度明显高于阴性对照组( $P < 0.01$ );阳性对照组和各 MCP 治疗组之间血清 galectin-3 浓度差异均无显著性( $P > 0.05$ )(表3)。

表2 各组脾脏肿瘤体积( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | 例数 | 体积中位数 | 肿瘤体积( $\text{cm}^3$ ) |
|---------|----|-------|-----------------------|
| 阳性对照    | 15 | 1.51  | $1.71 \pm 1.29$       |
| 低浓度 MCP | 15 | 0.93  | $1.28 \pm 0.68$       |
| 中浓度 MCP | 15 | 0.77  | $0.90 \pm 0.55^{1)}$  |
| 高浓度 MCP | 15 | 0.70  | $0.76 \pm 0.30^{1)}$  |

注:1)与阳性对照组比较, $P < 0.05$

## 2.5 肝转移瘤组织中 galectin-3 的表达

镜下所见,肿瘤细胞胞浆内染成棕黄色颗粒

认定为表达阳性细胞。经统计分析,阳性对照组,低、中、高浓度 MCP 组肝转移瘤组织 galectin-3 表达强度差异无显著性(均为  $P > 0.05$ )(表4)(图4)。

表3 各组血清 Galectin-3 浓度( $\mu\text{g/mL}$ , $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | 例数 | galectin-3 浓度( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|---------|----|-----------------------------------|
| 阴性对照    | 15 | $14.63 \pm 10.08$                 |
| 阳性对照    | 15 | $91.01 \pm 12.94^{1)}$            |
| 低浓度 MCP | 15 | $82.75 \pm 20.33^{1)}$            |
| 中浓度 MCP | 15 | $79.01 \pm 17.64^{1)}$            |
| 高浓度 MCP | 15 | $85.94 \pm 15.52^{1)}$            |

注:1)与阴性对照比较, $P > 0.05$

表4 各组肝脏转移瘤中 galectin-3 表达强度

| 组别      | 例数 | galectin-3 表达强度 |        |        |          |
|---------|----|-----------------|--------|--------|----------|
|         |    | 阴性(-)           | 弱阳性(+) | 阳性(++) | 强阳性(+++) |
| 阳性对照    | 15 | 5               | 6      | 2      | 2        |
| 低浓度 MCP | 12 | 4               | 3      | 2      | 3        |
| 中浓度 MCP | 11 | 2               | 6      | 2      | 1        |
| 高浓度 MCP | 9  | 3               | 4      | 1      | 1        |

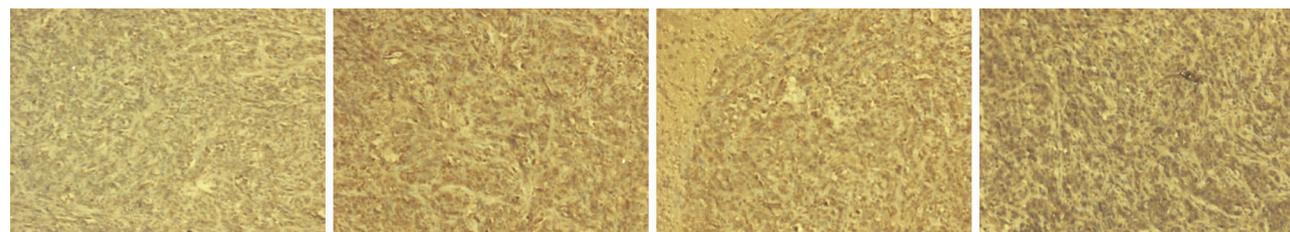


图4 小鼠肝转移瘤组织中 galectin-3 表达(EnVision 法  $\times 200$ ) A:阳性对照组; B:低浓度 MCP 治疗组; C:中浓度 MCP 治疗组; D:高浓度 MCP 治疗组

## 3 讨论

结肠直肠癌从原位生长到肝转移形成的过程包括原发肿瘤扩展浸润、肿瘤细胞脱落、黏附、聚集和继发生长侵袭。其中肿瘤细胞间相互聚集形成癌栓及与血管内皮、基底膜的黏附锚定是转移形成的关键环节;该过程主要涉及细胞表面多种糖类复合物调节因子,包括选择素、整合素和凝集素。galectin-3 能直接介导血液中的肿瘤细胞间聚集、肿瘤细胞与基质间的识别和黏附<sup>[5-6]</sup>。已证实多种高转移性肿瘤细胞均能高水平表达 galectin-3<sup>[7]</sup>,并在原发肿瘤和转移瘤病灶中均能

检测到 galectin-3 的高表达,其表达增加与肿瘤的生长、转移呈正相关<sup>[8-9]</sup>,并可作为某些肿瘤良、恶性病变的鉴别诊断标志<sup>[10]</sup>。因此,有可能通过封闭或阻断 galectin-3 介导的黏附聚集作用达到治疗和控制结肠癌肝转移的目的。

柑橘果胶(citrus pectin, CP)是从柑橘类植物细胞壁中提取的一种具有多支链的天然多糖,主要成分是半乳糖。MCP 则是 CP 经过特定 pH 值和温度处理以减少部分结构分支、变为更富含半乳糖和糖链结构的产物<sup>[11]</sup>。CP 不能与 galectin-3 相互作用,但 MCP 可作为 galectin-3 的一个高亲和力配体,对体内 galectin-3 配体有竞争性抑制作

用。Platt D 等<sup>[12]</sup>通过体外细胞凝集试验和细胞黏附试验证实, MCP 可通过封闭细胞表面的 galectin-3 而抑制细胞间的相互识别和黏附功能。当 MCP 达到一定浓度时, 肿瘤细胞表面 galectin-3 几乎被 MCP 结合封闭, 从而可阻断细胞间的相互识别和聚集。另外 MCP 也可通过完全封闭 galectin-3 位点以阻止肿瘤细胞从血管获取营养, 对肿瘤生长有一定的抑制作用<sup>[13-14]</sup>。但目前尚未发现 MCP 对肿瘤细胞有直接杀伤作用。体外实验已证实, MCP 具有抑制肿瘤细胞同型聚集和抑制肿瘤细胞与内皮细胞、组织基质黏附等作用<sup>[15]</sup>。动物实验证明, 口服 MCP 可抑制鼠前列腺癌和人乳腺癌、黑色素瘤的自发转移<sup>[12,16-17]</sup>。

本实验首次就 MCP 对结肠癌肝转移的影响作初步研究。本实验结果显示, MCP 对脾脏原位肿瘤生长和转移均有抑制作用。其中中、高浓度 MCP 组脾肿瘤体积和肝转移数目均与阳性对照组有明显差异, 表明 MCP 在一定浓度内能抑制肿瘤生长和肝转移且呈量效依赖关系。本结果与鼠前列腺癌、人乳腺癌和黑色素瘤转移的实验结果相似<sup>[12,16-17]</sup>, 提示 MCP 可通过相同作用机制抑制不同恶性肿瘤的转移。而低浓度 MCP 组对脾脏原位肿瘤生长和肝转移未见有明显抑制作用。这可能与样本量较少和非参数检验方法敏感性较低有关, 尚需进一步增加样本数量进行研究。

Raz 等<sup>[16]</sup>通过动物实验也证实 MCP 能有效抑制肿瘤的生长转移, 但通过免疫印迹 (Western Blot) 检测发现 MCP 对细胞 galectin-3 的表达无影响。本实验 ELISA 和免疫组化结果也显示, MCP 并未降低血清 galectin-3 的浓度和肝转移瘤 galectin-3 的表达, 但可明显抑制肝转移出现。分析原因可能是 MCP 只对肿瘤细胞表面 galectin-3 起封闭阻断作用, 而不影响肿瘤细胞自身表达和分泌 galectin-3<sup>[12,16]</sup>。

本研究结果表明, 一定浓度的 MCP 能明显抑制结肠癌肝转移和原位肿瘤生长, 其机制可能是通过封闭阻断肿瘤细胞表面 galectin-3 介导的细胞聚集、黏附作用而实现。MCP 作为一种来源于天然植物成分、高效低毒的药物, 可望为治疗结肠癌肝转移和其他恶性肿瘤转移开辟新的途径, 并可根肿瘤表达 galectin-3 的情况为患者提供个体化的治疗策略。如 MCP 联合化疗药物对结肠癌肝转移的抑制是否有协同作用尚需进一步深入研究。

## 参考文献:

- [1] Kinder HL, Shulman KL. Metastatic colorectal cancer [J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2001, 2(6):459-471.
- [2] Califice S, Castronovo V, Van Den Brule F, et al. Galectin-3 and cancer (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2004, 25(4):983-992.
- [3] 周志伟, 万德森, 王国强, 等. 血管生成抑制剂 YH-16 抑制结肠癌肝转移的研究 [J]. *癌症*, 2006, 25(7):818-822.
- [4] Sanjuan X, Fernandez PL, Castells A, et al. Differential expression of galectin-3 and galectin-1 in colorectal cancer progression [J]. *Gastroenterology*, 1997, 113(6):1906-1915.
- [5] Hughes RC. Galectins as modulators of cell adhesion [J]. *Biochimie*, 2001, 83(7):667-676.
- [6] Zou J, Glinsky VV, Landon LA, et al. Peptides specific to the galectin-3 carbohydrate recognition domain inhibit metastasis-associated cancer cell adhesion [J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26(2):309-318.
- [7] Iurisci I, Tinari N, Natoli C, et al. Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(4):1389-1393.
- [8] Nakamura M, Inufusa H, Adachi T, et al. Involvement of galectin-3 expression in colorectal cancer progression and metastasis [J]. *Int J Oncol*, 1999, 15(1):143-148.
- [9] Tsuboi K, Shimura T, Masuda N, et al. Galectin-3 expression in colorectal cancer: relation to invasion and metastasis [J]. *Anticancer Res*, 2007, 27(4B):2289-2296.
- [10] 王俯. Galectin-3 在甲状腺良恶性病变中的表达 [J]. *中国普通外科杂志*, 2007, 16(1):51-54.
- [11] Mark F, McCarty BA, Keith I, et al. Toward a core nutraceutical program for cancer management [J]. *Integrative cancer therapies*, 2006, 5(2):150-171.
- [12] Platt D, Raz A. Modulation of the lung colonization of B16-F1 melanoma cells by citrus pectin [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1992, 84(6):438-442.
- [13] Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, et al. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis [J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(3):899-909.
- [14] Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(1):29-41.
- [15] Inohara H, Raz A. Effects of natural complex carbohydrate (citrus pectin) on murine melanoma cell properties related to galectin-3 functions [J]. *Glycoconj J*, 1994, 11(6):527-532.
- [16] Nangia-Makker P, Hogan V, Honjo Y, et al. Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94(24):1854-1862.
- [17] Pient KJ, Naik H, Akhtar A, et al. Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87(5):331-332.