

6种化合物对肝癌细胞活性影响的比较

周驰凯, 潘 强

(浙江理工大学生命科学学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018)

摘 要: 肝癌在全球,特别是在中国,有着很高的发病率。在中国,每10万人中约有将近40人罹患肝癌。在临床治疗肝癌等癌症的方法上,最常用最普遍的手段是手术治疗和化学治疗等方法。不同的化合物对不同的癌症细胞的细胞活力影响有很大的不同。为了比较不同的化合物对体外培养的肝癌细胞的细胞活力的影响,做了如下实验。利用MTT检测细胞活力的方法,分别检测了不同浓度的阿霉素,顺铂,依托泊苷,5-FU,甲硫哒嗪和白藜芦醇等6种常用化合物对肝癌细胞的细胞活力影响。实验结果表明,阿霉素,依托泊苷,甲硫哒嗪和白藜芦醇的IC₅₀值分别为0.25 μg/mL, 20 μg/mL, 500 μM, 20 μM。在一定的浓度范围内,随着阿霉素浓度的升高,肝癌细胞的细胞活力显著下降,正常肝细胞的活力也有一定的下降;随着依托泊苷的浓度的增加,肝癌细胞和正常肝细胞的细胞活力都显著下降;随着甲硫哒嗪的浓度的增加,肝癌细胞活力显著下降,正常肝细胞的活力几乎没有影响。

关键词: 肝癌; 细胞; 化学治疗; 化合物; 细胞活性

中图分类号: Q255

文献标志码: A

0 引 言

肝癌,是一种常发疾病,在人类癌症发病率中位列第三^[1]。特别是在中国,有着很高的肝癌发病率,全世界大约有50%的肝癌患者在中国^[2]。治疗肝癌已经到了刻不容缓的地步。肝癌可以通过手术和化学治疗等手段进行有效的治疗^[2-3]。化学治疗,又称化疗,使用一种或者多种对肿瘤细胞具有细胞毒性的药物进行治疗的方法^[4-5]。化疗不仅可以对原发肿瘤有效,对转移性肿瘤同样具有杀伤作用^[6]。不同的化合物有着不同的作用机理。一些是抑制DNA合成或者造成DNA损伤的基因毒性化合物。例如阿霉素(Doxorubicin),5-FU,顺铂(Cisplatin)和依托泊苷(Etoposide)等。还有一些是特异性抑制激酶活性。例如白藜芦醇(Resveratrol),甲硫哒嗪(Thioridazine)等。筛选出具有特异性的潜在的抗癌药物,对癌症的治疗有重大的意义。药物的研发到临床的应用,要经历一个漫长的过程。通过在细

胞水平上研究某一化合物对癌症细胞活性的影响,可以初步建立一个候选化合物库。

为了达到这一目的,筛选出具有高特异性的影响肝癌细胞的细胞活性的化合物,本研究利用这6种化合物在不同浓度的状态下对肝癌细胞的细胞活性的影响进行了初步的探讨,并为建立候选化合物库做前期准备。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

肝癌细胞系 BEL-7404, SMMC-7721, 和肝正常细胞系 QSG-7701 均由本实验室保存。本实验所用的细胞都使用含10% FBS的DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)培养基,并且在5% CO₂, 37℃培养箱中培养。DMEM购自GIBCO公司, FBS购自BioChrom公司。5-FU, 依托泊苷, 阿霉素, 顺铂, 白藜芦醇和甲硫哒嗪均购自Sigma公司。

二氧化碳培养箱型号为BBG16UV151L, Heraeus;

收稿日期: 2014-03-13

基金项目: 浙江理工大学科研启动基金(1204807-Y); 上海市自然科学基金(13ZR1446300)

作者简介: 周驰凯(1989-), 男, 江西九江人, 硕士研究生, 主要从事胚胎发育和肿瘤靶向治疗方面的研究。

通信作者: 潘 强, E-mail: loveqiang@126.com

倒置显微镜型号为 Olympus, IX71-22FL/PH; 酶联免疫检测仪/酶标仪型号为华运安特, DG5033A。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞的培养和传代

将两株不同的肝癌细胞和肝正常细胞放在温度为 37℃, 二氧化碳浓度为 5% 的培养箱中培养。每隔两天给细胞换新鲜的培养液, 并且在倒置显微镜下观察细胞的生长情况。当细胞长满时, 进行传代。确认没有污染和细胞状态良好后, 将培养液倒掉, 加入 2 mL 的 PBS 洗 1 次, 加入 0.5 mL 胰酶进行消化, 轻轻摇动让胰酶浸润所有细胞, 将细胞放入 37℃ 消化 3 min。待细胞变圆, 彼此分离后, 弃去胰酶, 加入有血清的培养液终止消化。接着, 用枪把细胞吹散均匀, 使之尽量分散成单个细胞。一部分细胞用于实验, 一部分细胞用于传代, 多余的细胞则废弃。

1.2.2 MTT 法检测细胞活力

将状态良好单细胞按 5×10^3 个/孔植入 96 孔板中培养, 待细胞贴壁后, 加入经过稀释的药物, 培养 48 h。之后加入 MTT 溶液, 使 MTT 在细胞溶液中的最终浓度为 5 mg/mL, 继续培养 4 h, 弃去培养, 加入 100 μ L 二甲基亚砜(DMSO)溶解。接着, 用酶联免疫检测仪于 595 nm 和 650 nm 处检测隔空的吸光值。

1.2.3 统计分析

数据的表现为平均值加减标准差, 它们之间差异的显著性是用 Student's *t* text。当 $P < 0.05$ 时, 认为差异显著。

2 结 果

2.1 基因毒性类化合物对肝癌细胞和肝正常细胞的细胞活性的影响

图 1(a)所示, 随着阿霉素的浓度的增加, 肝癌细胞 BEL-7404 和 SMMC-7721 的细胞活性显著下降, 其对肝癌细胞 BEL-7404 的 IC₅₀ 值为 0.25 μ g/mL, 对肝癌细胞 SMMC-7721 的 IC₅₀ 值为 0.60 μ g/mL。同时对比肝正常细胞 QSG-7701, 随着阿霉素浓度升高, 肝正常细胞 QSG-7701 的细胞活性也会产生一定的影响, IC₅₀ 值为 5 μ g/mL。这表明阿霉素是一种潜在的治疗肝癌的化合物。而其他的化合物, 随着浓度的增加, 5-FU 对两种肝癌细胞的活性影响都不高, 反而对肝正常细胞的活性影响更高; 顺铂几乎对两种肝癌细胞的活性没有影响, 反而对肝正常细胞有着一定的影响; 依托泊苷, 在杀伤肝癌细胞的同时也对肝正常细胞的细胞活性造成很大的影响。(图 1(b)–(d))。

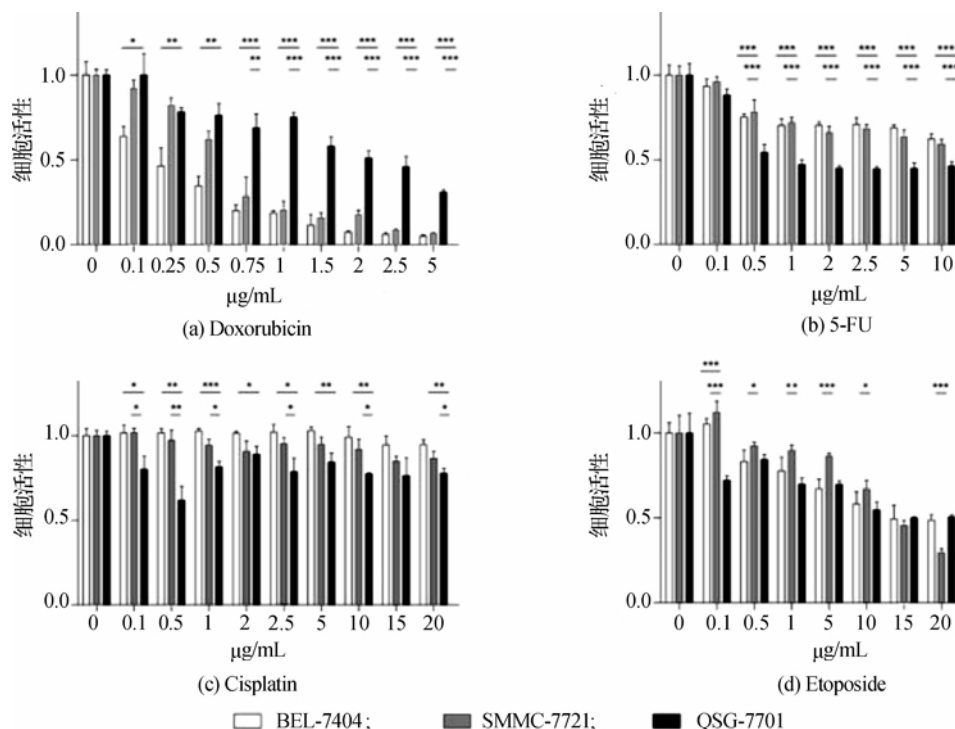


图 1 基因毒性化合物对肝癌细胞和肝正常细胞的作用

注: (a) 用不同浓度的阿霉素处理 BEL-7404, SMMC-7721 和 QSG-7701 后 48 h 用 MTT 检测细胞活性。
 (b)–(d) 在 (a) 同样的条件下, 分别使用不同浓度的 5-FU, 顺铂和依托泊苷对细胞进行处理后用 MTT 检测细胞活性的影响。药物浓度如图 1 中所示。

2.2 白藜芦醇和甲硫哒嗪对肝癌细胞和肝正常细胞的细胞活性的影响

如图 2(a)所示,当白藜芦醇的浓度小于或等于 200 μM 时,对两种肝癌细胞和肝正常细胞的细胞活性影响不明显;当浓度达到 1 000 μM 时,对肝癌细胞 BEL-7404 的细胞活性影响很大,能够抑制 80% 的细胞的细胞活性,其对肝癌细胞 BEL-7404

的 IC₅₀ 值约为 600 μM ;对肝癌细胞 SMMC-7721 的细胞活性也有一定的影响;但是,对肝正常细胞的细胞活性几乎没有影响。甲硫哒嗪对肝癌细胞活性的影响与白藜芦醇相似,当甲硫哒嗪的浓度达到 50 μM ,能够抑制约为 90% 的肝癌细胞 BEL-7404 和 SMMC-7721 的细胞活性,IC₅₀ 值都为 20 μM ;但是,对肝正常细胞的细胞活性几乎没有影响。

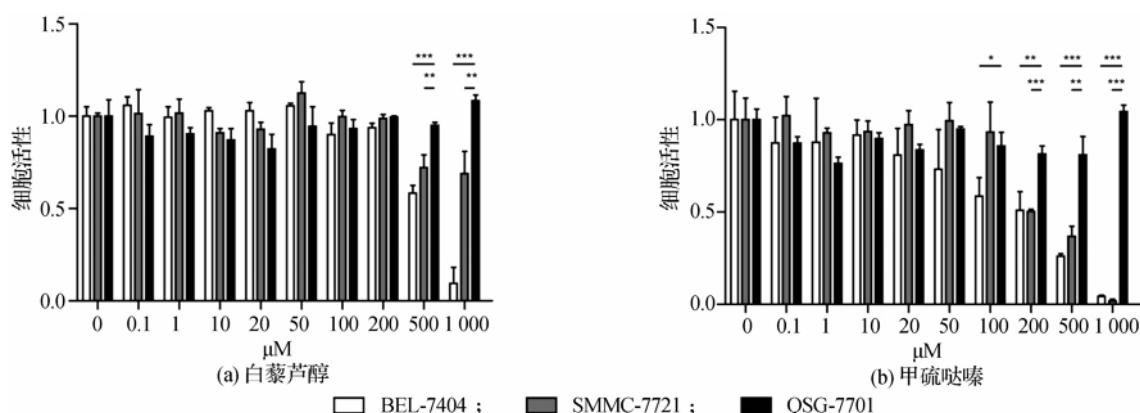


图 2 白藜芦醇和甲硫哒嗪对肝癌细胞和肝正常细胞的细胞活性的影响

注:(a)用不同浓度的白藜芦醇处理 BEL-7404, SMMC-7721 和 QSG-7701 之后 48 h, MTT 法检测细胞活性。(b) BEL-7404, SMMC-7721 和 QSG-7701 细胞用不同浓度的处理之后 48 h, 通过 MTT 检测细胞活性。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

3 讨 论

随着人们生活水平的提高,平均寿命大大延长,曾经严重影响人类健康的天花、鼠疫等疾病渐渐被消灭,但是由人类自身所引起的癌症的发病率却日益升高,死亡人数也逐年上升。在当今社会,癌症已经严重威胁着人类的健康。筛选出具有显著疗效的化疗药物,已经刻不容缓。化合物对细胞活性的影响有着不同的分子机制。有的是抑制 DNA 的合成,有的是导致 DNA 的断裂^[7-11],还有的是抑制蛋白质的合成^[12-15]。理想的化疗药物是这种化合物能够大部分或者完全抑制肿瘤细胞的细胞活性,而对正常的细胞的细胞活性没有影响或者影响较小。利用体外培养的肿瘤细胞和正常的细胞体系对单一或者多种化合物的评价是化疗药物筛选的最开始的一部分。通过这种方法可以筛选出对某种或者某几种的肿瘤细胞的细胞活性有较大影响的化合物。然后进一步的实验可以从中筛选出可以应用于临床的化疗药物。

在本实验中,分析了 6 种化合物在不同浓度的状态下对两种肝癌细胞和肝正常细胞的细胞活性的影响。MTT 细胞活性实验表明,白藜芦醇和甲硫哒嗪符合化疗药物筛选的最基本要求,即在某种的药物浓度下,可以绝大部分抑制肝癌细胞的细胞活

性,并且对正常肝细胞的细胞活性影响较小,这表明它们是两种很好的潜在的抗肿瘤活性的小分子化合物。

总之,笔者利用体外肝癌细胞培养系统的优点,初步的探讨了 6 种化合物的抗癌潜能,为建立抗癌化合物药物候选库做了前期的探索。为进一步的验证及动物和临床实验提供了依据。

参考文献:

- [1] 詹冬娣, 陈黎明, 卞丽芳, 等. 1 例肝癌合并下腔静脉及右心房癌栓的术后护理[J]. 中国实用护理杂志, 2013, 29(z2): 149-149.
- [2] 严律南, 王震侠. 肝癌肝移植的适应证及应用前景[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2006, 13(2): 132-134.
- [3] 樊 嘉, 王 征. 肝癌外科治疗的进展[J]. 实用医院临床杂志, 2011, 8(1): 16-19.
- [4] Krumbhaar E B. Role of the blood and the bone marrow in certain forma of gas poisoning: I. peripheral blood changes and their significance [J]. Journal of the American Medical Association, 1999, 72(1): 39-41.
- [5] Gilman A. The initial clinical trial of nitrogen mustard [J]. The American Journal of Surgery, 1963, 105(5): 574-578.
- [6] 诸 琦, 史 峰, 徐家裕, 等. 西咪替丁的抗消化道肿瘤作用[J]. 世界华人消化杂志, 1998, 6(1): 68-68.

- [7] Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley D B, et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2013, 13(10): 714-726.
- [8] Alderden R A, Hall M D, Hambley T W, et al. The discovery and development of cisplatin[J]. *Journal of Chemical Education*, 2006, 83(5): 728.
- [9] Milosavljevic N, Duranton C, Djerbi N, et al. Nongenomic effects of cisplatin: acute inhibition of mechanosensitive transporters and channels without actin remodeling [J]. *Cancer Research*, 2010, 70(19): 7514-7522.
- [10] Fornari F A, Randolph J K, Yalowich J C, et al. Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells[J]. *Molecular Pharmacology*, 1994, 45(4): 649-656.
- [11] Hande K R. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor[J]. *European Journal of Cancer*, 1998, 34(10): 1514-1521.
- [12] Tang H Y, Shih A, Cao H J, et al. Resveratrol-induced cyclooxygenase-2 facilitates p53-dependent apoptosis in human breast cancer cells[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2006, 5(8): 2034-2042.
- [13] Leiro J, Arranz J A, Fraiz N, et al. Effect of *cis*-resveratrol on genes involved in nuclear factor kappa B signaling[J]. *International Immunopharmacology*, 2005, 5(2): 393-406.
- [14] Benitez D A, Pozo Guisado E, Alvarez Barrientos A, et al. Mechanisms involved in resveratrol induced apoptosis and cell cycle arrest in prostate cancer derived cell lines[J]. *Journal of Andrology*, 2007, 28(2): 282-293.
- [15] Sachlos E, Risueno R M, Laronde S, et al. Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells[J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1284-1297.

Comparison of Effects of Six Chemical Compounds on Activity of Liver Cancer Cell

ZHOU Chi-kai, PAN Qiang

(Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Science,
Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Liver cancer in the world, especially in China, has a high morbidity. In China, about 40 people suffer from liver cancer in almost every 100,000 people. For the treatment of liver cancer, the most common ways include operation treatment and chemotherapy. The effects of different chemical compounds on cell activity of different cancer cells are greatly diverse. To compare the effects of different chemical compounds on cell activity of different cancer cells, the authors did the following experiments. MTT was used to detect influences of 6 common compounds with different concentrations (doxorubicin, cisplatin, etoposide, 5-FU, thioridazine and resveratrol) on cell activity of liver cancer cells. The results show that the values of IC₅₀ are 0.25 $\mu\text{g/mL}$ (doxorubicin), 20 $\mu\text{g/mL}$ (etoposide), 500 μM (thioridazine) and 20 μM (resveratrol). With certain concentration range, as doxorubicin concentration rises, activity of liver cancer cells drops significantly. Besides, the activity of normal liver cells declines to some extent. As etoposide concentration rises, activity of both liver cancer cells and normal liver cells drops obviously. As thioridazine concentration rises, activity of liver cancer cells falls obviously, and activity of normal liver cells is almost not influenced.

Key words: live cancer; cell; chemotherapy; chemical compounds; cell activity

(责任编辑: 许惠儿)