维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)03－0305－03

10－HCPT 对人肝癌细胞 QGY 和 HepG2 生长增殖的抑制作用

祝葆华[1], 姚榛祥[1], 江黎明[2], 吴　平[2], 何惠娟[2], 杨　展[2]

(1.重庆医科大学临床学院普外科,重庆　4000016;2.广东医学院附属医院中心实验室,广东 湛江　524023)

【摘　要】目的:探讨 10－HCPT 对人肝癌细胞 QGY 和 HepG2 生长增殖的影响。方法:分别用不同浓度 10－HCPT 作用 QGY 和 HepG2 细胞 48h 和相同浓度作用不同时间,以 MTT 法检测细胞生长指数(GI),软琼脂克隆形成试验检测细胞克隆形成率。结果:10～360μg/ml 和 30～360μg/ml 10－HCPT 分别作用 QGY 和 HepG2 细胞 48h 后,均有显著性生长抑制作用($P<0.05$),且呈量效依赖关系。100μg/ml 10－HCPT 作用 24h、36、48 和 72h 对两种细胞均具有显著性抑制作用($P<0.05$)。实验组两种细胞克隆形成率较对照组均显著降低($P<0.05$)。结论:10－HCPT 对人肝癌细胞 QGY 和 HepG2 体外生长增殖均具有抑制作用。

【关键词】10－羟基喜树碱;肝癌:HepG2;QGY

【中国图书分类法分类号】R979.1　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2003－09－04

Inhibition on growth and proliferation of human hepatoma cell lines QGY and HepG2 treated by 10－HCPT

ZHU Baohua, et al

(*Department of General Surgery, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of 10－HCPT on the growth and proliferation of human hepatoma cell lines QGY and HepG2 in vitro. *Methods*: QGY and HepG2 were cultured in RPMI1640. They were treated by different concentrations of 10－HCPT for 48 hours, and by a dose of 100μg/ml of 10－HCPT for different hours. The cell growth indexes (GI) were detected by MTT colorimetric assay. The clone formation rates of QGY and HepG2 were observed by soft agar assay. *Results*: The GI of HepG2 and QGY cells treated by 10－HCPT with concentration 10～360μg μg/ml and 30～360μg μg/ml were significantly lower than that of control groups respectively ($P<0.05$), and the inhibitive effect increased with concentrations ranging from 30 to 360μg/ml in a dose－dependent manner. The effects of 100μg/ml10－HCPT on the growth of QGY and HepG2 cells for 24 hours were significant as compared with control groups($P<0.05$). The inhibition in 36～72 hours was highly significant ($P<0.01$), while not significant among themselves ($P>0.05$). The clone formation rates of QGY and HepG2 of experimental groups were significantly lower than that of control groups respectively ($P<0.01$). *Conclution*: 10－HCPT could inhibit the growth and proliferation of human hepatoma cell lines QGY and HepG2 effectively in vitro.

【Key words】10－HCPT;Hepatoma;HepG2;QGY

肝动脉介入化疗是对中晚期肝癌有效的治疗方法之一,寻找高效的区域化疗药物,对于肝癌的综合治疗具有重要意义[1]。10－羟基喜树碱(10－hydroxycamptothecin,10－HCPT)是从我国洪桐科植物喜树中分离的四个单体中抗癌作用最强的微量植物碱,已成功地应用于某些肿瘤的治疗和预防[2]。目前,10－HCPT 对于人肝癌的体外研究较少,本实验选择人肝癌细胞株 QGY 和 HepG2,观察了 10－HCPT 在体外对人肝癌细胞生长增殖的抑制作用,为其在肝癌综合化疗中的应用提供理论依据。

1　材料和方法

1.1　材料

人肝癌细胞株 QGY 和 HepG2 由重庆医科大学肝脏病研究所提供,10－HCPT(中国医学科学院药植所新药中心提供),RPMI1640(Gibco),噻唑蓝(MTT,Sigma),二甲基亚枫(DMSO,日本进口分装),琼脂粉(Agar agar powder,日本进口分装)。6 孔和 96 孔细胞培养板(Corning),IMT－2 倒置

作者介绍:祝葆华(1964－　),男,博士生,
主要研究方向:肝癌肝移植。

维普资讯 http://www.cqvip.com

相差显微镜(Olympus),5140 型 CO_2 孵育箱(Napco),Multiskan MK3 型酶标仪(Labsystems Dragon)。

1.2 QGY 和 HepG2 的培养

用含 15%灭活小牛血清的 RPMI 1640,在 37℃、5%CO_2 孵育箱中培养 QGY 和 HepG 2,3 天传代 1 次,培养至对数生长期备用。

1.3 不同浓度 10-HCPT 对 QGY 和 HepG2 体外生长的影响

取对数生长期 QGY 和 HepG2 细胞,常规消化,调整细胞计数至(5~9)×10^4/ml,以每孔 100μl 接种于 96 孔培养板,37℃、5%CO_2 孵育箱中培养 24h 备用。取 10-HCPT 溶液(1mg/ml)2ml,用 RPMI1640(不含小牛血清及青、链霉素)稀释成如下浓度:10μg/ml、30μg/ml、90μg/ml、180μg/ml 和 360μg/ml。弃各孔培养液,每孔加入各浓度 10-HCPT 溶液 100μl,每浓度设 6 个重复孔,对照组加入等体积 RPMI1640。在 37℃、5%CO_2 孵育箱中培养 48h 后,每孔加入 MTT 溶液(5mg/ml)20μl,继续孵育 4h,吸出各孔液体,每孔加入 DMSO 100μl,震荡溶解 15min,MK3 型酶标仪测定各孔吸光度 OD_{490} 值,计算相对生长指数(relative cell growth index,GI)。GI=实验组 OD_{490}/对照组 OD_{490}×100%,GI>100%为刺激生长,GI<100%为抑制生长。

1.4 10-HCPT 抑制 QGY 和 HepG2 细胞生长的时间效应

取 QGY 和 HepG2 细胞,弃各孔培养液,每孔均加入 100μg/ml 的 10-HCPT 溶液 100μl,在 37℃、5%CO_2 孵育箱中培养。在作用 12h、24h、36h、48h 和 72h 后,吸出 6 孔液体,按 1.3 进行 MTT 染色,酶标仪测定各孔吸光度 OD_{490} 值,计算 GI,绘制时间效应曲线。

1.5 10-HCPT 对 QGY 和 HepG2 克隆形成率的影响

取 QGY 和 HepG2 细胞,常规消化,用 RPMI1640 清洗 2 次。分别用 100μg/ml 10-HCPT 溶液(实验组)和 RPMI1640(对照组)重悬 HepG2,调整细胞计数至 400/ml。用 RPMI1640 配制 0.6%琼脂,微波炉加热至溶解,按每孔 3ml 平铺于 6 孔细胞培养板,自然冷却至凝固,剩余琼脂置于 45℃水浴,分别与以上细胞悬液等量混合,分别以每孔 2ml 加入各培养孔(即 400 个/孔细胞),设 6 个重复孔。置 37℃、5%CO_2 孵育箱中培养 6 天后,倒置显微镜下观察克隆形成率。克隆标准:直径>50μm 的细胞团。克隆形成率(%)=(克隆数/接种细胞数)×100%。

1.6 计学处理

实验数据以($\bar{x}\pm s$)表示,采用统计学软件 SPSS 10.0 进行分析,多组间比较采用随机分组单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验。

2 结 果

2.1 不同浓度 10-HCPT 对 QGY 和 HepG2 细胞生长的影响

与对照组比较,10μg/ml 浓度 10-HCPT 作用于 HepG2 细胞 48h 后,即有显著性生长抑制作用($P<0.05$),30μg/ml 浓度 10-HCPT 对 QGY 细胞生长始有显著性抑制作用($P<0.05$),随着其浓度增加,对 QGY 和 HepG2 生长抑制作用均增强,呈量效依赖关系。详见表 1。

表 1 不同浓度 10-HCPT 对 QGY 和 HepG2 细胞 GI 的影响(%,$\bar{x}\pm s$,$n=6$)

组别	浓度(μg/ml)	人肝癌细胞 GI(%)	
		HepG2	QGY
对照	0	100	100
1	10	84.72±9.75*	92.67±6.34△
2	30	77.86±8.69**	87.83±5.45△△
3	90	68.80±6.83**	73.46±4.67△△
4	180	60.54±8.62**	61.88±4.45△△
5	360	47.62±8.35**	51.79±4.38△△

注:与对照组比较:*$P<0.05$;**$P<0.01$;△$P>0.05$;△△$P<0.01$

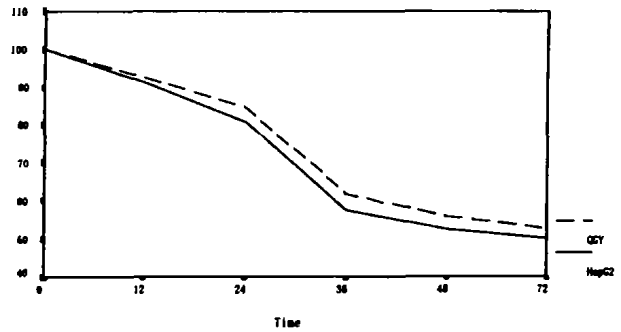


图 1 10-HCPT 抑制 QGY 和 HepG2 细胞生长的时间效应

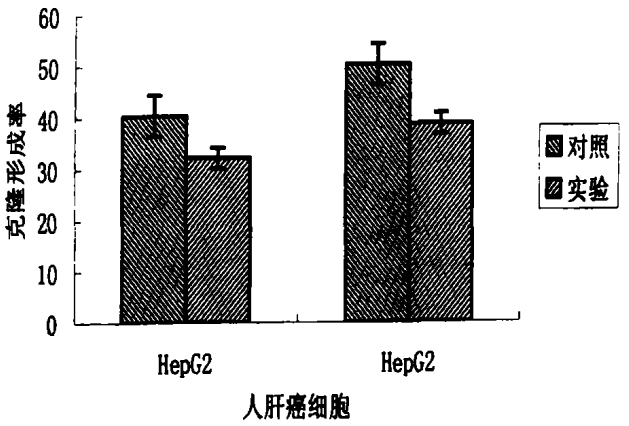


图 2 10-HCPT 对 QGY 和 HepG2 细胞克隆形成率的影响

2.2 10-HCPT 抑制 QGY 和 HepG2 细胞生长的时间效应

100μg/ml 浓度的 10-HCPT 作用于 HepG2 细胞 12h,无显著生长抑制作用($P>0.05$),作用 24h

维普资讯 http://www.cqvip.com

后,其生长抑制作用与对照组有显著差异($P<0.05$),作用 36h、48h 和 72h 其差异具非常显著性 $P<0.01$),三者之间差异无显著性($P>0.05$)。见图 1。

2.3 10-HCPT 对 QGY 和 HepG2 细胞克隆形成率的影响

与对照组比较,100μg/ml 浓度的 10-HCPT 实验组 0GY 和 HepG2 细胞克隆形成率均显著性降低($P<0.05$)。见图 2。

3 讨 论

国内外多数学者认为,肝癌的体外药物敏感试验,以肝癌细胞株进行 MTT 比色分析法与临床疗效具有良好的相关性[3]。本研究分别采用 MTT 比色分析法和软琼脂克隆形成试验,探讨了 10-HCPT 对人肝癌细胞 QGY 和 HepG2 体外生长和增殖的影响。实验结果表明:10-HCPT 对人肝癌细胞 QGY 和 HepG2 的体外生长增殖具有明显的抑制作用,并具有剂量依耐性;提示 10-HCPT 对人肝癌细胞 QGY 和 HepG2 均具有杀伤作用。

10-HCPT 的抗癌作用与阻断肿瘤细胞拓扑异构酶Ⅰ(Topo-I)有关。DNA 拓扑异构酶(DNA-Topo)在生物界普遍存在,是能够改变 DNA 空间结构状态,调节 DNA 空间构型的动态变化,直接参与或影响 DNA 复制、转录的关键性酶类,Topo 可催化 DNA 分子在双螺旋基础上的超螺旋状态和解旋状态之间的相互转换过程。根据不同的催化机制,Topo 可分成Ⅰ型(Topo-Ⅰ)和Ⅱ型(Topo-Ⅱ)[4]。Topo 能完成细胞内的多种反应,其中拓扑异构酶Ⅰ对维持 DNA 结构和功能以及保证细胞的存活至关重要,并与肿瘤细胞分化、增殖关系密切,因此 DNA-Topo-Ⅰ抑制剂能选择性杀伤增殖的肿瘤细胞。10-HCPT 是 Topo-Ⅰ特异抑制剂,其与 Topo-Ⅰ以及 DNA 结合后,可阻断 DNA 在切口部位的重新结合,抑制 DNA 合成并导致双链 DNA 断裂,从而控制 DNA 复制,阻断 RNA 合成,干扰细胞分裂周期,使染色体 DNA 产生断裂及降解等多种效应,导致肿瘤细胞死亡[5,6]。

10-HCPT 亦可显著抑制组蛋白 H_1 和 H_3 磷酸化,其对肿瘤细胞的致死作用至少部分与其抑制组蛋白 H_1 和 H_3 的磷酸化有关,在机体多种调控蛋白协同作用下,可最终导致肿瘤细胞死亡[7]。10-HCPT 亦可和拓扑异构酶Ⅰ/单链 DNA 复合体形成稳定的结合体,抑制 Topo-I 解旋和再连接功能,诱导 DNA 不可逆性断裂,启动细胞周期阻滞(cycle arrest)和凋亡信号,诱导 S 期肿瘤细胞发生凋亡。10-HCPT 还可增加 HepG2 细胞 P53 和 Bax 的表达,而降低 Bcl-2 和生长增殖因子(growth-proliferating factor, AFP)的表达[8]。由此推断,10-HCPT 通过与人肝癌 QGY 和 HepG2 细胞 Topo-I 特异性结合,导致肝癌细胞 DNA 损伤、启动细胞周期阻滞和凋亡程序,从而发挥对 QGY 和 HepG2 体外生长增殖的抑制效应。另有研究表明,DNA 拓扑异构酶(DNA-Topo)基因在肝癌组织中表达上调[9],为 10-HCPT 在肝癌化疗中的应用提供了理论依据。

总之,本实验通过人肝癌细胞 QCY 和 HepG2 的体外抗癌药物敏感实验,证明了 10-HCPT 可有效抑制 QCY 和 HepG2 体外生长增殖,为 10-HCPT 在肝癌综合化疗中的应用提供了实验依据。

参 考 文 献

[1] 杨甲梅. 合理选择原发性肝癌的治疗方法[J]. 肝胆外科杂志,2002;10(5):321-322.

[2] 孟繁浩,巩丽颖,佟 馨,等. 抗癌药物——喜树碱类衍生物研究进展[J]. 生命的化学,2002;22(3):265-267.

[3] 姜圣亮,谭江平,石林祥,等. MTT 法检测肝癌细胞化疗敏感性方法学探讨[J]. 同济大学学报(医学版),2002;23(4):296-298.

[4] Sinha B K. Topoisomcrasc inhibitors, A review of their therapeutic potential in cancer[J]. Drags, 1995;49:11-19.

[5] Malonne H, Atassi G DNA topoisomerases targeting drags: mechanisms of action and perspectives[J]. Anticancer Drugs, 1997;8(9):811-822.

[6] Ling Y H, Soler R P, Tseng M T, et al. Effect of DNA topoisomerase I inhibitor, 10-hydroxycamptothecin, on the structure and function of nuclei and nuclear matrix in bladder carcinoma MBT-2 cells[J]. Anticancer Res, 1993;13:1613-1618.

[7] Ling Y H, Xu B. Inhibition of phosphoryalation of histone H_1 and H_2 induced by 10-hydroxycamptothecin, DNA topoisomerase I inhibitor, in murine ascites hepatoma cells[J]. Acta Pharmacologyica Sinica 1993;14(6):546-550.

[8] Zhang X W, Xu B. Differential regulation of P53, c-Myc, Bcl-2, Bax and AFP protein expression, and caspase activity during 10-hydroxycamptothecin-induced apoptosis in HepG2 cells[J]. Anti-cancer Drugs, 2000;11(9):747-756.

[9] 刘莲新,姜洪池. DNA 依赖蛋白激酶和 DNA 拓扑异构酶在肝癌组织中的表达[J]. 中华消化杂志,2001;21(6):331-334.