维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)03－0345－03

德氮吡格对人肝癌细胞株增殖抑制的体外研究

李龙江[1], 陈志琼[1], 汤为学[2], 杨晓兰[1], 余 瑜[1]

(1.重庆市生物化学与分子药理重点实验室;2.重庆医科大学基础医学院病理生理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察德氮吡格(TNBG)对人肝癌细胞株 SMMC－7721 和 HepG2 增殖的影响,探讨其抗肿瘤作用机制。方法:运用 MTT 法检测德氮吡格对肿瘤细胞增殖的影响,流式细胞仪观察细胞周期分布情况,Western blot 分析 cyclinB1 和 $p34^{cdc2}$ 的变化。结果:德氮吡格作用 SMMC－7721 和 HepG2 细胞 72h 后,能抑制细胞增殖,呈剂量依赖性。流式细胞仪检测到两株细胞均有 S 期和 G2/M 期细胞增加,并且德氮吡格还能诱导 HepG2 细胞发生凋亡。Western blot 发现 CyclinB1 表达在药物处理组明显降低,而 $p34^{cdc2}$ 则无明显改变。结论:德氮吡格能抑制肿瘤细胞增殖,可能通过调控 CyclinB1 表达将肿瘤细胞阻滞于 G2/M 期,从而达到抗肿瘤的效应。

【关键词】SMMC－7721;HepG2;CyclinB1;细胞周期;增殖抑制

【中国图书分类法分类号】R979.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－12－17

Inhibition of proliferation of human hepatocellular carcinoma cell lines by TNBG in vitro

LI Longjiang, et al

(*Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology of Chongqing, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of TNBG on proliferation of human hepatocellular carcinoma cell lines SMMC－7721 and HepG2. *Methods*: MTT assay was used to test the effects of anti－proliferation. The flow cytometric analysis was used to detect the cell cycle distribution. Western blot was adopted for detecting the expression of cyclinB1 and $p34^{cdc2}$. *Results*: Anti－proliferation effects were observed in SMMC－7721 and HepG2 after intervention of TNBG for 72 hours, and the effects were in concentration－dependent manners. The cells showed S and G2/M arrest in both of cell lines, and apoptosis was induced only in HepG2. The expression of cyclinB1 was inhibited, while $p34^{cdc2}$ was not changed. *Conclusion*: TNBG can inhibit the proliferation of tumor cells, which is due to G2/M arrest caused by expression inhibition of cyclinB1 induced by TNBG.

【Key words】SMMC－7721, HepG2; CyelinB1; Cell cycle; Inhibition of proliferation

德氮吡格(TNBG)是具有创新构型的全合成新药,已获得国家发明专利(中国发明专利 ZL95111450.6)[1]。前期的体外细胞株筛选实验发现其有良好的抗肿瘤效应,但其作用机制不明。细胞周期调控是细胞正常增殖、分化的关键因素,它的失控是肿瘤发生的重要原因之一。许多抗肿瘤药物可通过将肿瘤细胞停滞在某个周期来抑制肿瘤的增生。目前,研究细胞周期控制机制来寻找肿瘤防治的靶点已引起人们的广泛关注[2]。本文以人肝癌细胞株 SMMC－7721 和 HepG2 为模型,通过研究德氮吡格对肿瘤细胞周期的影响,来探讨其抗肿瘤作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人肝癌细胞株 SMMC－7721 和 HepG2 由重庆医科大学病理生理教研室提供,细胞培养在含 10%小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)的 RPMI1640(美国 GIBCO)培养液中(内含 100U/L 青霉素、100μg/ml 链霉素),置于 37℃、5%CO_2 孵育箱内备用。

1.2 药物与试剂

德氮吡格(TNBG)由重庆医科大学药物化学和生物材料研究室自主全合成,用 1640 培养液配成 200μg/ml 溶液(储备液),室温保存。鼠抗人 CyclinB1 和 $p34^{cdc2}$,购自 Santa

作者介绍:李龙江(1973－),男,讲师,
主要研究方向:抗肿瘤药物药理学。

基金项目:国家自然科学基金资助(批准号 30371632)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

Cruz 公司,HRP 标记二抗购自北方同正生物技术有限公司。

1.3 MTT 法检测细胞增殖状态[3]

取对数生长期细胞,制成 5×10^4 个/ml 悬液,种植于 96 孔培养板内,每孔 200μl(1×10^4 个细胞/孔)。实验设肿瘤细胞对照组及四个实验组,每组设 8 个平行孔,每孔加药 20μl(将德氮吡格储备液用 1640 培养液稀释为工作液,工作浓度分别为 11、22、44、88μg/ml,加药 20μl 后终浓度分别为 1、2、4、8μg/ml),置于 37℃、5% CO_2 孵育箱内分别培养 72h 后吸去上清液,每孔加无血清培养液 200μl 及 5mg/ml MTT 20μl,继续培养 4h 后,吸去上清,每孔加 DMSO 200μl,在自动酶标仪上检测各孔吸光度值(A 值),波长为 570nm,实验重复 3 次。按下式计算各种药物浓度对肿瘤细胞的抑制率:

$$抑制率=(1-\frac{实验组平均A值}{对照组平均A值})\times100\%$$

1.4 流式细胞仪检测细胞周期分布及凋亡

取对数生长期细胞,制成 5×10^4 个/ml 悬液,取 20ml 接种于培养瓶中。设肿瘤细胞对照组及实验组,实验组最终药物浓度为 4μg/ml,培养 72h 后收集细胞,用 PBS 洗 2 次,缓慢加入预冷的 70% 乙醇 1ml 固定 1h。然后用 PBS 洗 2 次将等体积的细胞悬液和 PI 染液混合,4℃ 放置 30min,将样本放入流式细胞仪的样品室,以激发波长 488nm 测定,并用 ModfitLT2.0 软件分析细胞周期分布。

1.5 Western blot 分析周期蛋白变化

实验分组同流式细胞仪检测分组。对照组和试验组细胞培养 72h 后,弃培养液,冷 PBS 洗细胞 2 次。每瓶细胞加入 RIPA 裂解液 200μl,冰浴 10min,收集细胞裂解液,低温高速离心 12000g,30min,取上清液。采用 lowry 比色法,以 BSA 为标准蛋白绘制标准蛋白曲线,测定样品蛋白浓度。取 60μg 总蛋白行 10% SDS-PAGE 蛋白电泳(100V,20min;然后 120V,2h);蛋白转膜(15V,4℃,14~16h)后,10% 脱脂奶粉封闭,PBST 洗膜,加鼠抗人(1:500)CycinB1、$p34^{cdc2}$,室温孵育 1h,PBST 洗膜;加兔抗鼠(1:5000)HRP 标记二抗,室温孵育 1h,PBST 洗膜,DAB 显色。

1.6 统计学处理

采用统计软件包 SPSS10.0 进行分析,组间两两比较用 SNK 法。

2 结 果

2.1 德氮吡格对肝癌细胞的增殖抑制效应

德氮吡格处理两株肝癌细胞 72h 后,均有不同程度的增殖抑制效应,且呈剂量依赖性(组间比较 $P<0.05$)(见表 1)。而 IC_{50} 分别是:SMMC-7721 为 4.83μg/ml,HepG2 为 2.62μg/ml,两者比较有显著性差异($P<0.01$),说明 HepG2 对德氮吡格更敏感。

表 1 德氮吡格处理人肝癌细胞 72h 后的增殖抑制作用($n=8$)

药物浓度	SMMC-7721		HepG2	
(μg/ml)	A 值($\bar{x}\pm s$)	抑制率(%)	A 值($\bar{x}\pm s$)	抑制率(%)
0	1.464±0.019	0	1.682±0.103	0
1	1.314±0.010	10.25	1.192±0.031	29.15
2	1.088±0.021	25.71	0.962±0.050	42.81
4	0.908±0.032	37.97	0.524±0.026	68.83
8	0.302±0.041	79.40	0.188±0.037	88.85

表 2 德氮吡格处理人肝癌细胞 72h 后对细胞周期分布及凋亡影响

细胞	SMMC-7721			HepG2			
	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	凋亡率 (%)
对照	72.72	18.54	8.74	75.14	20.30	8.16	0
4μg/ml	40.01	28.32	23.67	54.23	31.91	13.86	16.27

2.2 德氮吡格对细胞周期分布及凋亡的影响

从表 2 可知,4μg/ml 德氮吡格作用细胞 72h 后,均可引起 SMMC-7721 和 HepG2 的 S 期、G2/M 期细胞较对照组有所增加,尤以 SMMC-7721 细胞显著。在 SMMC-7721 细胞,药物处理组 S 期、G2/M 期细胞分别为 28.32% 和 23.67%,而对照组为 18.54% 和 8.74%;而在 HepG2 细胞,药物处理组 S 期、G2/M 期细胞为 31.91% 和 13.86%,而对照组为 20.30% 和 8.16%,此外,在该株细胞还有凋亡峰的出现,凋亡细胞为 16.27%,而对照组为 0,呈明显变化。

2.3 Western blot 分析周期蛋白

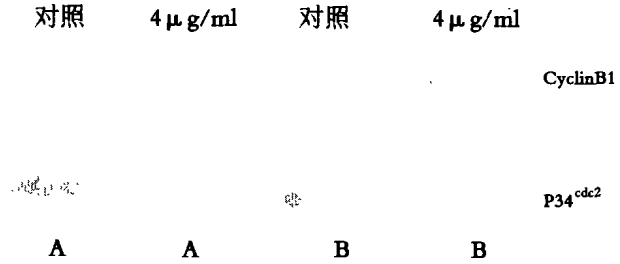


图 1 德氮吡格处理 72h 后 CyclinB1 和 $p34^{cdc2}$ 表达的变化
A:SMMC-7721,B:HepG2

4μg/ml 德氮吡格作用 SMMC-7721 和 HepG2 细胞 72h 后,与对照组相比,其 CyclinB1 表达均明显降低;但是 p34cdc2 表达则无明显变化。

3 讨 论

MTT 检测结果显示:不同浓度德氮吡格处理两

维普资讯 http://www.cqvip.com

株肝癌细胞 72h 后,均有不同程度的增殖抑制效应,且呈剂量依赖性(组间比较 $P<0.05$)。但是,两株细胞对德氮吡格的敏感性不一样,HepG2 较 SMMC-7721 的 IC_{50}小($P<0.01$),这可能和细胞建株时来源不一,细胞株间存在一定生物性状差异有关。

细胞周期,是指细胞从上一次分裂结束到下一次分裂终末的过程,它由 G1 期、S 期、G2 期和 M 期组成。G1 期为 DNA 合成前期,其主要任务是积累能量和原料,为 DNA 复制做准备;S 期为 DNA 合成期;G2 期称为 DNA 合成后期或丝裂前期;M 期即有丝分裂期,细胞进行分裂,细胞增殖。细胞周期在不同时相的多个检查点上受到调控,其中以 G1/S 期和 G2/M 期检查点最为重要,周期素依赖性激酶(Cyclin-dependent kinases, CDKs)、周期素(Cyclins)和周期素依赖性激酶抑制因子(Cyclin—dependent kinases inhibitors, CKIs)三类因子参与该调控过程。而在正常细胞的 G2/M 期,CyclinB1 和 $p34^{cdc2}$起着重要作用。$p34^{cdc2}$只有和 CyclinB1 结合后才有活性,二者结合形成的复合物称为成熟促进因子(maturation promoting factor, MPF),是启动有丝分裂的"引擎",调控细胞的分裂和增殖[4]。一些学者报道:在脑星形细胞瘤[5]、宫颈癌[6]、肺癌[7]、胃淋巴瘤[8]、食道鳞癌[9]、喉鳞癌[10]、舌鳞癌[11]等肿瘤中,Cyclin B1 都出现高表达,这可促进生长控制的缺失,肿瘤的进展,且不同程度的与其恶性生物学行为有关系。白藜芦醇[12]、云南霉素[13]、大黄素[14]等药物即是通过调控 CyclinB1 和 $p34^{adc2}$来诱导肿瘤细胞 G2/M 期阻滞,从而发挥抗肿瘤效应。本研究运用流式细胞仪分析细胞周期发现:德氮吡格可引起 SMMC-7721 和 HepG2 细胞 S 期和 G2/M 期细胞比例明显增加。S 期细胞增加提示有 DNA 复制的加强,但是由于药物抑制 CyclinB1 的表达,虽然此时 $p34^{cdc2}$的表达无明显变化,但仍可干扰 $p34^{cdc2}$和 CyclinB1 的复合物——MPF 功能,细胞不能进行正常的有丝分裂,细胞阻滞于 G2/M 期,最终表现出的效应仍是肿瘤细胞增殖受到抑制。而在 HepG2,除了有 G2/M 期阻滞外,流式细胞仪还检测到凋亡峰,提示德氮吡格可能还有诱导凋亡的作用,但尚需进一步实验证实。

综上所述:德氮吡格在体外能抑制肝癌细胞增殖,其机制可能是通过降低 CyclinB1 的表达,阻滞细胞于 G2/M 期来发挥抗肿瘤作用。

参 考 文 献

[1] 余 瑜.一种氮杂甾体化合物制备及其用途[P].中国发明专利,ZL95111450.6.

[2] 徐从高,张茂宏,杨兴季,等.癌—肿瘤学原理和实践[M].第 5 版,济南:山东科学技术出版社,2001;136-140.

[3] 汤为学,骆云鹏,王瑞雪.人实体瘤抗癌药物敏感试验 MTT 法的建立[J].重庆医科大学学报,1992;17(2):103-108.

[4] Lohka MJ, Hayes MK, Mailer JL. Purification of maturation promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events[J]. Proc Natl Acad Sic USA, 1988;85(9),3009-3013.

[5] Badie C, Bourhis J, Sobczak-Thepot J, et al. p53-dependent G2 arrest associated with a decrease in cyclins A2 and B1 levels in a human carcinoma cell line[J]. Br J Cancer, 2000;82(3):642-650.

[6] Southern SA, McDicken IW, Herrington CS. Evidence for keratinocyte immortalization in high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix infected with high-risk human papillomaviruses[J]. Lab Invest, 2000;80(4):539-544.

[7] Sofia JC, Jang SJ, Khuri FR, et al. Overexpression of cyclinB1 in early-stage non-small cell lung cancer and its clinical implication[J]. Cancer Res, 2000;60(15):4000-4004.

[8] Banerjee SK, Weston AP, Zoubine MN, et al. Expression of cdc2 and cyclinB1 in Helicobacter pylori-associated gastric MALT and MALT lymphoma: relationship to cell death, proliferation, and transformation[J]. AmJ Pathol, 2000;156(1):217-225.

[9] Nozoe T, Korenaga D, Kabashima A, et al. Significance of cyclinB1 expression as an independent prognostic indicator of patients with squamous cell carcinoma of the esophagus[J]. Clin Cancer Res, 2002;8(3):817-822.

[10] Dong Y, Sui L, Watanabe Y, et al. Clinical relevance of cyclinB1 overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Cancer Lett, 2002, 177(1):13-19.

[11] Hassan KA, El-Naggar AK, Soria JC, et al. Clinical significance of cyclinB1 protein expression in squamous cell carcinoma of the tongue[J]. Clin Cancer Res, 2001;7(8):2458-2462.

[12] 于 良,孙中杰,吴胜利,等.白藜芦醇对小鼠移植性肝癌组织中细胞周期蛋白的影响[J].第四军医大学学报,2002;23(23):2172-2174.

[13] 童 彤,郭素萍.抗肿瘤抗生素云南霉素对细胞周期的作用及分子机理[J].癌症,2000;19(4):289-292.

[14] 王心华,甄永苏.大黄素抑制人高转移巨细胞肺癌 PG 细胞的肿瘤转移相关性质[J].癌症,2001;20(8):789-793.