

IM94 对肝癌细胞的杀伤作用的实验研究

马胜林,冯建国,王炯(浙江省肿瘤医院,浙江 杭州 310022)

摘要:目的 探讨 IM94 对人肝癌细胞的杀伤作用。方法 采用 MTT 法分析 IM94 对人肝癌细胞 7721 生长的影响,用流式细胞术检测细胞有丝分裂周期及细胞凋亡,用 H.E.染色分析细胞的核分裂相。结果 IM94 对肝癌细胞有明显的抑制作用,从流式细胞术分析细胞阻滞在 G2 + M 期,并诱发细胞凋亡,在 24h 后,出现凋亡小峰。结论 IM94 能阻滞细胞分裂,诱导肝癌细胞凋亡。

关键词:IM94;肝癌细胞;细胞凋亡

中图分类号:R977.6;R979.1 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2003)03-0237-03

The killing effect of IM94 on hepatocellular carcinoma cells

MA Sheng-lin, FENG Jian-guo, WANG Jiong (Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To explore the killing effect of IM94 to human hepatocellular carcinoma cells. **METHOD** MTT method was used to analyse the influence of IM94 on human hepatocellular carcinoma. Flow cytometry was applied to detected the mitosis cycle and cell apoptosis, and karyoschisis was analysed by HE staining. **RESULTS** IM94 has obvious inhibitory effect on hepatocellular carcinoma cells. Cell was blocked at G2 + M stages, and cell apoptosis was induced. A small apoptosis spike was appeared in 24 hours. **CONCLUSION** IM94 can block mitosis and induce apoptosis of hepatocellular carcinoma cells.

KEY WORDS: IM94; hepatocellular carcinoma cells; apoptosis

癌症是威胁人类生命健康的疾病。抗肿瘤新药层出不穷,安生康(IM94)有效成分是从牛乳中分离纯化的小分子糖蛋白,其中蛋白占 14.78%,糖占 49.95%。本研究旨在探讨 IM94 对体外培养人肝癌 7721 细胞系的作用及其机制,

为临床提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料:

细胞:人肝癌细胞株(7721),从上海细胞库获得并由浙

江省肿瘤研究所提供; RPMI-1640 培养液含 20 % 小牛血清, 37℃ 单层贴壁培养^[1]。药物: 安生康 IM-94, 浙江爱生制药有限公司赠送。噻唑蓝(MTT) 从华美生物公司购买。

1.2 方法

1.2.1 药物对细胞的抑制: 取对数生长期的 7721 细胞, 制成单细胞悬液($1 \times 10^5 / \text{mL}$), $10 \mu\text{L}$ / 孔细胞悬液加入到 96 孔培养板, 体积分数为 5 % CO_2 孵箱培养 24h 后, 用 4℃ 冰箱 24h 培养使细胞同步化, 48h 后, 换含不同浓度(10, 20, 40, 60, $80 \mu\text{g} / \text{mL}$) 药物的培养液, 24h 每孔加 $10 \mu\text{L}$ MTT (5 mg / mL) 液, 继续培养 4 ~ 6h 后, 加 $100 \mu\text{L}$ 酸化异丙醇(盐酸酸化) 终止反应, 震荡 10 min, 酶标仪(ClinBio400 ATC) 570 nm 测量 A 值, 并求其抑制率^[2]。抑制率(%) = $(1 - \text{实验组平均 A 值} / \text{对照组平均 A 值}) \times 100$ 。(本实验所有的结果都是 3 次连续实验结果的平均值)

1.2.2 细胞凋亡测定, 流式细胞仪的测定 流式细胞术的细胞凋亡分析: 经药物处理后 4, 8, 12, 24, 48, 72h, 各组按常规的流式细胞术检测法收集并固定细胞; 检测前细胞经 $200 \times g$ 离心后, 倾去上清, 按顺序加入 A(含胰酶等), B(含胰酶抑制剂及 RNase A), C(含碘化丙酞 PI) 液各 10 min, (A, B, C 液 B. D. inc. USA), 流式细胞仪(FACS Calibur, B. D. USA) 检测 PI 标记的细胞核。按上述流式细胞术方法处理并分析各组细胞的凋亡小峰。流式细胞仪的测定按文献^[3]。

1.2.3 药物对细胞作用的时间依赖性

把 3×10^5 / 瓶及 1×10^4 / 孔细胞悬液分别接种到有盖片的 25 mL 培养瓶及 96 孔板中, 细胞经上述同步化后, 分别加入不同浓度(10, 40, $80 \mu\text{g}$) 的 IM-94, 培养至 4, 8, 12, 24, 48, 72h 后, 分别进行以下各指标检测:

① 药物对细胞抑制的时间依赖性: 用 MTT 法检测, 方法同前。细胞核分裂指数: 在上述不同的时间各取一片盖片固定于体积分数为 95 % 乙醇中, HE 染色后, 高倍镜下计数 2000 个细胞, 计算核分裂指数。

② 流式细胞术的细胞周期分析: 各组按常规的流式细胞术检测法收集并固定细胞; 检测前细胞经 $200 \times g$ 离心后, 倾去上清, 按顺序加入 A(含胰酶等), B(含胰酶抑制剂及 RNase A), C(含碘化丙酞 PI) 液各 10 min, 流式细胞仪检测 PI 标记的细胞核。

2 结果

2.1 药物对细胞的抑制

用 MTT 比色法检测不同浓度(10, 20, 40, 60, $80 \mu\text{g} / \text{mL}$) 的 IM-94 对细胞的抑制, 作用 24h 后, 其抑制率分别为 6.2, 35.8, 45.1, 77.2, 91.9 %。IC₅₀ 为 $59.92 \mu\text{g} / \text{mL}$ 。

2.2 通过流式细胞术检测发现, $40 \mu\text{g}$ IM-94 作用 24h 后, 出现了明显的凋亡小峰, 见图 1, 但继续培养。

2.3 药物对细胞作用的时间依赖性

2.3.1 药物对细胞抑制的时间依赖性

用 MTT 法检测结果, IM-94 低浓度($10 \mu\text{g} / \text{mL}$) 时, 抑制作用非常的弱, 几乎没有抑制, 而在中浓度时($40 \mu\text{g} / \text{mL}$) 具明显的时间依赖性, 而高浓度($80 \mu\text{g} / \text{mL}$) 中明显出现细胞抑

制, 见图 2。

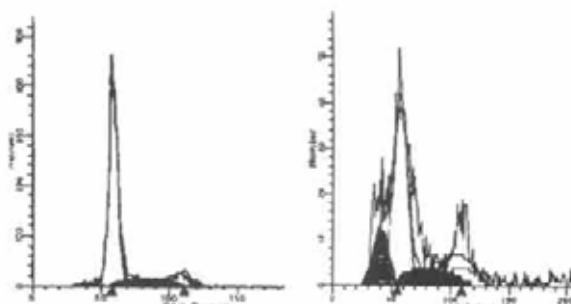


图 1 流式细胞术检测细胞凋亡(左图为对照)

Fig 1 Cell apoptosis detected by flow cytometry (control on the left)

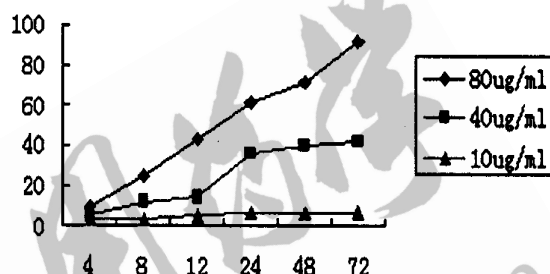


图 2 药物对细胞抑制的时间关系

Fig 2 Time dependent manner of drug inhibitory effect on cells

2.3.2 药物对细胞核分裂指数的影响

与对照组相比, 中浓度的 IM-94($10 \mu\text{g} / \text{mL}$) 作用至 8h 时细胞的核分裂相明显增加, 见图 3, 但随着药物浓度的增加, 细胞的核分裂相迅速减少。中浓度 IM-94($40 \mu\text{g} / \text{mL}$) 作用时间至 8h 细胞核分裂明显, 随着时间增加, 细胞的核分裂明显减少, 高浓度的 IM-94($80 \mu\text{g} / \text{mL}$) 在作用的早期就明显抑制细胞生长, 见图 3。

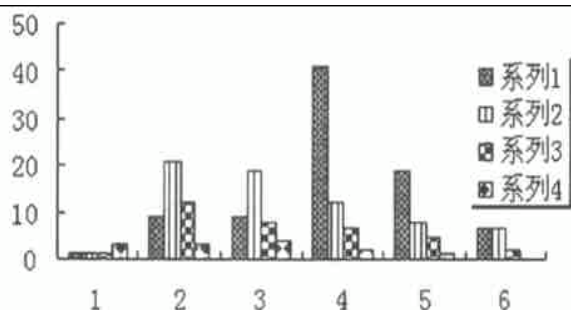


图 3 药物对细胞核分裂指数的影响

Fig 3 Influence of drug on karyostenosis

2.3.3 从流式细胞术的细胞周期及倍体分析结果发现, 低浓度($10 \mu\text{g} / \text{mL}$) 的 IM-94 作用至 12h 后, 基本和对照组相当, 而中浓度($40 \mu\text{g} / \text{mL}$) 的 IM-94 作用 12h 后, G₂ + M 相细胞明显高于对照组, 并随时间到 48h 后达到最大值。综合图 4 分析, IM-94($40 \mu\text{g} / \text{mL}$) 主要使该细胞阻滞于 G₂ + M 期, 而使 G₂ + M 进入 S 期的细胞明显减少。在高浓度时($80 \mu\text{g} / \text{mL}$) 早期就出现细胞杀伤, 见图 4。

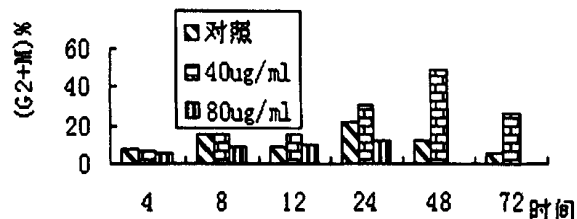


图4 药物针对(G₂ + M)期细胞比例的影响

Fig 4 Influence of drug on G₂ + M stage cells

3 讨论

越来越多的研究表明肿瘤的发生与细胞异常增殖有关,而细胞的异常凋亡是细胞异常增殖的原因^[4]。化疗是通过杀伤肿瘤细胞、抗肿瘤细胞增殖,促进细胞凋亡途径来实现。如何促使细胞凋亡,是寻找研究抗癌药物的关键之一。IM-94对肝癌7721杀伤作用的体外实验,从笔者的研究结果发现,当一定浓度的IM-94作用于7721细胞时有时间依赖性,对7721细胞进行40 µg/mL IM-94的处理,24h出现了明显的凋亡小峰;从细胞存活曲线发现,IM-94对细胞的杀伤也有时间依赖性;从细胞有丝分裂相及流式细胞术检测的(G₂ + M)期细胞的比例发现IM-94作用的靶点是G₂期。阻滞细胞进入S期,抑制其增殖并发生凋亡,从而对细胞的杀伤产生时间依赖性。IM-94杀伤7721细胞有量-效关系,人肝癌细胞7721存活率随着药物剂量的增大而显著下降,因而具有一定的剂量依赖性,当浓度高于80 µg/mL时,会产生药

物对细胞的直接杀伤作用,当药物浓度在20 ~ 80 µg/mL范围内,IM-94对细胞作用是通过抑制有丝分裂周期而产生。因此,IM-94对肝癌细胞作用可能是使阻滞在G₂ + M期同时,IM-94诱发细胞凋亡是其抗肿瘤作用的机制的另一个重要方面。考虑到IM-94有效成分分子糖蛋白,而真正起到抑瘤作用的很可能是多糖类物质,属于生物反应调节剂。

另外本研究发现,IM-94具有阻滞肝癌细胞从G₂ + M期进入S期,而放射治疗主要对细胞的G₂ + M期敏感,提示IM-94可能具有放射增敏作用。

参考文献

- [1] Johnson SA, Harper P, Hortobagyi GN, *et al.* Vinorelbine: an overview [J]. *Cancer Treat Rev*, 1996, 22: 127.
- [2] Binet S, Fellous A, Lataste H, *et al.* In situ analysis of the action of Navelbine on various types of microtubules using immunofluorescence [J]. *Semin. Oncol.*, 1989, 16 (Suppl. 4): 5.
- [3] Paccapelo A, Piana C, Rychlicki F, *et al.* Treatment of malignant gliomas: a new approach [J]. *Tumori*, 1998, 84 (5): 529.
- [4] Inadate Y, Fuhimoto S, Sueyoshi K, *et al.* Prediction of drug cytotoxicity in 9L rat brain tumor by using flow cytometry with a deoxy-ribonucleic acid binding dye [J]. *Neurosurgery*, 1997; 40 (4): 782.

收稿日期: 2002-07-30