

### 3种常用抗癌药物对人肝癌细胞 HepG2抑制作用的研究

贾 静<sup>1</sup>,李悦悦<sup>2</sup>,朱臻宇<sup>1</sup>,柴逸峰<sup>1</sup>,张国庆<sup>2</sup> (1. 第二军医大学药学院,上海 200433; 2. 东方肝胆外科医院药剂科,上海 200438)

**摘要** 目的:研究 3种常用抗癌药物对于 HepG2细胞的抑制情况。方法:细胞铺 96孔板,3种抗癌药物以不同浓度给药,每浓度设 3复孔,不加药组做空白对照,MTT法测定,以抑制率对药物浓度作图。结果:在 1~420  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内,5-氟尿嘧啶抑制效果最差;20~300  $\mu\text{g/mL}$  丝裂霉素 C抑制效果好于长春新碱;1~20  $\mu\text{g/mL}$  和 300~420  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内,长春新碱抑制效果好于丝裂霉素 C。结论:该方法评价对比了 3种常用的抗癌药物对于人肝癌细胞的抑制效果,为药物筛选中阳性药物的选择提供一定借鉴。

**关键词** MTT; HepG2; 半数抑制浓度; 5-氟尿嘧啶; 硫酸长春新碱; 丝裂霉素 C

**中图分类号**: R979. 1      **文献标识码**: A      **文章编号**: 1006 - 0111 (2009) 05 - 0332 - 03

### Inhibition research of three commonly-used anti-tumor drugs against HepG2 cell line

JIA Jing<sup>1</sup>, LI Yue-yue<sup>2</sup>, ZHU Zhen-yu<sup>1</sup>, CHAI Yi-feng<sup>1</sup>, ZHANG Guo-qing<sup>2</sup> (1. Department of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China)

**ABSTRACT Objective:** To establish an inhibition research method of three commonly-used anti-tumor drugs against HepG2 cell line. **Methods:** The determination was performed on a 96-well plate. The drugs were administered in a series of concentrations, and each concentration was triplicate. Cells without drugs were set as a negative control. Followed by determination of MTT method, the inhibition ratio was plotted to concentration. **Results:** The inhibition ability of 3 drugs were different when the concentration were in different range. On the whole, the inhibition ability of 5-Fu was the weakest one. **Conclusion:** The method evaluates and compares the inhibition ability of 3 commonly-used anti-tumor drugs against HepG2 cell line, and could be a reference in positive control of drug screening experiment.

**KEY WORDS** MTT; HepG2;  $IC_{50}$ ; 5-Fu; Vincristine; Mitomycin C

人肝癌细胞系 HepG2自建立以来,已成为进行抗癌药物筛选及研究肝癌发病机制的重要细胞系,陈富强等对 HepG2细胞系进行了生长曲线、分裂指数染色体核型等生物学特性的研究<sup>[1]</sup>。目前,该细胞系已经广泛应用于基因表达、内源性物质作用机制、外源性物质影响以及病毒感染机制的研究中<sup>[2-6]</sup>。在利用该细胞系进行抗癌药物筛选时,通常选择一种临床常用药物作为阳性对照,以考察待筛选药物的活性。但是,临床药物种类繁多且效果各异,选择阳性对照药物时缺乏依据,因此本研究采用 MTT法研究了 3种较为常用的抗癌药物——5-氟尿嘧啶、硫酸长春新碱、丝裂霉素 C对于 HepG2的抑制情况,并对其抑制情况的差异进行研究,为利用该细胞系进行药物筛选实验时阳性对照药物的选

择提供一定借鉴。

#### 1 材料

**1.1 药物与试剂** 5-氟尿嘧啶(批号 080806)、硫酸长春新碱(批号 0806V1)和丝裂霉素 C(批号 349AGK)分别为上海旭东海普药业有限公司、深圳万乐药业有限公司和协和发酵工业株式会社的产品;四甲基偶氮唑盐(MTT)购自 Sigma公司;胰蛋白酶购自上海吉泰科技有限公司;DMSO培养基和胎牛血清购自 Gibco公司;青霉素和链霉素购自华北制药有限公司;二甲亚砜(DMSO)购自国药集团化学试剂有限公司;实验用水为灭菌重蒸水。

**1.2 细胞株** 人肝癌细胞系 HepG2由上海诗丹德生物技术有限公司惠赠。

**1.3 仪器** 超净工作台(苏净集团),CO<sub>2</sub>培养箱(Theumo Foma),倒置显微镜(重庆光电仪器总公司),酶标仪(上海雷勃分析仪器有限公司),超声波

作者简介:贾静(1982-),女,硕士研究生。E-mail: jiajing007@yahoocom.cn

通讯作者:张国庆。E-mail: guoqing\_zhang91@126.com.

清洗仪(上海科导超声仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞铺板** 选择处于对数生长期的细胞,倒去培养液, Hanks液冲洗,加胰蛋白酶消化 1~3 min,弃去胰蛋白酶,加入适量 DMEM 培养基,终止消化,镜检计算细胞浓度,加入相应量培养基,制成  $5 \times 10^4$  / mL 的细胞悬液,以 8道移液器加细胞悬液至 96孔板中, 200  $\mu$ L / 孔;移入 37  $^{\circ}$ C  $CO_2$  培养箱培养 24 h。

**2.2 细胞给药** 25 mg/mL 的 5 氟尿嘧啶溶液以 PBS 稀释, 1 mg 硫酸长春新碱粉末、5 mg 丝裂霉素 C 粉末均溶于 1 mL PBS 溶液,分别制成 5、1、5 mg / mL 的储备液。以 DMEM 培养基稀释储备液,得到一系列浓度的药液; 96孔板弃去原液,每孔先加入 100  $\mu$ L DMEM 培养基,再加入 100  $\mu$ L 稀释后的药物溶液,板上终浓度均为: 1、3、10、15、30、45、60、120、180、240、300、360、420  $\mu$ g/mL,每个浓度设 3 个复孔,以不加药组为空白对照;加药完毕后移入 37  $^{\circ}$ C  $CO_2$  培养箱培养。丝裂霉素遇光易分解,故配药及给药时需避光进行操作。

**2.3 检测方法** 给药培养 48 h 后,弃去孔内液体,加 DMEM 培养基 190  $\mu$ L / 孔和 MTT (5 mg/mL) 10  $\mu$ L / 孔。37  $^{\circ}$ C 5%  $CO_2$  培养箱中温孵 4 h 后,弃板上各孔内原有液体,加 DMSO 200  $\mu$ L / 孔以溶解甲臞沉淀。室温置 30 min 后,用酶标仪在 570 nm 波长下测定各孔光密度值 (OD)。计算药物抑制率: 药物抑制率 =  $1 - \frac{\text{实验组光密度值}}{\text{对照组光密度值}} \times 100\%$ ,以药物抑制率对浓度作图。

## 3 结果

本文采用 MTT 法研究了 3 种常用的抗癌药物——5 氟尿嘧啶、硫酸长春新碱、丝裂霉素 C 对于人肝癌细胞系 HepG2 的抑制情况。各曲线的相关系数均大于 0.98,说明相关性较好,拟合曲线与真实值接近,能反应实际的抑制情况。

以半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 为衡量标准,丝裂霉素 C ( $IC_{50} = 22.3 \mu\text{g/mL}$ ) 的抑制效果最佳,长春新碱 ( $IC_{50} = 44.8 \mu\text{g/mL}$ ) 次之,5 氟尿嘧啶 ( $IC_{50} = 92.8 \mu\text{g/mL}$ ) 的抑制效果最差,见表 1。

比较 3 者的抑制曲线 (图 1),在实验设计的 1~420  $\mu\text{g/mL}$  的浓度范围内,三者均以浓度依赖性的方式抑制人肝癌细胞系 HepG2,但是抑制效果差别较大。如图所示,5 氟尿嘧啶和丝裂霉素 C 抑制曲线形态相似,呈现相同的抑制走向,但丝裂霉素 C 抑制曲线处于 5 氟尿嘧啶平行上方,可见丝裂霉素 C 对肝癌细胞抑制效果明显优于 5 氟尿嘧啶。与这

两种药物不同,硫酸长春新碱在此浓度范围内对肝癌细胞呈线性抑制。其抑制水平与丝裂霉素 C 较接近,且在初始浓度 1  $\mu\text{g/mL}$  (即每条曲线上的第一个点) 的条件下,显示出远大于另两种药物的抑制率 (接近于半数抑制浓度),说明硫酸长春新碱对该细胞系作用敏感,在较低浓度情况下仍能达到很好的抑制效果。在 20~300  $\mu\text{g/mL}$  范围内,丝裂霉素 C 的抑制效果优于硫酸长春新碱,但在 300  $\mu\text{g/mL}$  之后,丝裂霉素 C 对肝癌细胞抑制率渐趋于平坦,而硫酸长春新碱仍以线性形式增加,抑制效果好于丝裂霉素 C。

表 1 3 种常用药物对肝癌细胞 HepG2 抑制情况的相关参数

药物	抑制曲线	浓度范围 ( $\mu\text{g/mL}$ )	相关系数	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
5 氟尿嘧啶	$Y=0.0963 \text{Ln}(x)+0.0637^{1)}$	1~420	0.989	92.8
硫酸长春新碱	$Y=0.001x+0.4552^{2)}$	1~420	0.988	44.8
丝裂霉素 C	$Y=0.0982 \text{Ln}(x)+0.1951^{3)}$	1~420	0.990	22.3

1)、2)、3)  $x=C$

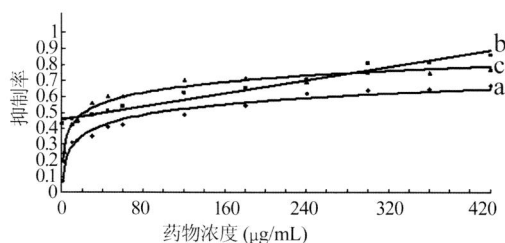


图 1 3 种常用抗癌药物对肝癌细胞 HepG2 的抑制曲线  
a-5 氟尿嘧啶; b-硫酸长春新碱; c-丝裂霉素 C

综上所述,硫酸长春新碱和丝裂霉素 C 抑制效果均优于 5 氟尿嘧啶,但是考虑到硫酸长春新碱低浓度时仍能达到较好的抑制效果,而且丝裂霉素 C 见光容易分解,给实验操作带来不便,因此,这三种常用的抗癌药物中,硫酸长春新碱是最适宜作为药物筛选实验中的阳性药物,以评价待测化合物的活性。

## 4 讨论

3 种常用的抗癌药物——5 氟尿嘧啶、硫酸长春新碱、丝裂霉素 C,临床使用时间长,而且疗效确切,所以在药物筛选的实验中,这三种药物也是较为常用的阳性对照药物<sup>[7-12]</sup>。但是这 3 种药物的作用机制是完全不同的。其中,5 氟尿嘧啶是作用于 S 期的药物,在细胞内转变为 5 氟尿嘧啶脱氧核苷酸,抑制脱氧胸苷酸合成酶,阻止脱氧尿苷酸甲基化转变为脱氧胸苷酸,影响 DNA 的合成;还可在体内

(下转第 361 页)

种西药成分时,质谱法是一种终端确证方法,江苏省药检所建立了舒骨宁片中非法添加双氯芬酸钾的质谱检测方法,但作为日常工作中的常规打假手段,质谱检测方法仪器昂贵,成本较高,需要专门的技术人员,不利于在基层推广使用,并且,质谱法极高的灵敏度对于检测必须添加到一定浓度才能发挥药效的西药也是一种浪费;高效液相色谱法分析时间略长,且溶剂用量较大<sup>[3]</sup>。笔者建立的 CE 检测方法快速、简便、溶剂用量少、检测限符合检测要求,可作为快速打假的一种手段。

**4.3 缓冲体系的选择** 确定该方法的缓冲体系前,考察过非水体系<sup>[4,5]</sup>、偏酸体系、中性体系和偏碱体系,试验结果表明,pH(6.50±0.02)时,出峰时间短,分离度和峰形符合含量测定的要求。溶剂的酸碱度是如何影响双氯芬酸钾的色谱行为还有待进一步的试验确证。

**4.4 定量计算** 毛细管电泳法中,毛细管内缓冲液

极其微小的变化也会引起出峰时间的漂移和峰面积较大的变化,因此,采用 CE方法法定性定量时,每进样5次,须以0.1M的NaOH和缓冲液冲洗柱子,以保证出峰时间和峰面积的重现性。

#### 参考文献:

- [1] 刘荣,冯端浩,邓夕军,等.紫外分光光度法测定双氯芬酸钠凝胶剂的含量[J].中国现代应用药学杂志,2001,18(6):481.
- [2] 中国药典 2005版[S].第二部.2005:60.
- [3] 李家春,吴沉,彭国平,反相离子对色谱法测定复方双氯芬酸钠注射液的含量[J].医药导报,2006,25(10):1064.
- [4] 杨静,刘文英,张奕华,非水毛细管电泳法测定双氯芬酸衍生物ZLR-8的含量[J].中国药科大学学报,2005,36(4):326.
- [5] 尹茶.非水毛细管电泳法及其应用[J].国外医学药学分册,1997,24(4):202.

收稿日期:2009-03-25

(上接第 333页)

可转化为5-氟尿嘧啶核苷,以伪代谢产物形式掺入RNA中干扰蛋白质的合成。硫酸长春新碱是作用于M期的药物,与纺锤丝微管蛋白结合,从而影响微管装配和纺锤丝的形成。丝裂霉素C是周期非特异型药物,可使细胞的DNA解聚,同时阻碍DNA的复制,从而抑制肿瘤细胞分裂。文献报道中并未阐述选择阳性对照药物是以药物的抑制效果为依据还是以药物的作用机制为依据。本研究选取了3种常用的阳性对照药物,比较了其对于人肝癌细胞系HepG2的抑制情况,以抑制效果为衡量指标,认为硫酸长春新碱是该细胞系体外药物筛选时较适宜的阳性对照药物。

本研究中对3种常用的抗癌药物抑制情况进行比较,只是针对于人肝癌细胞系HepG2的,由于体外细胞系类别很多,不同种类不同来源的细胞间存在一定差异,所以并不适用于其它种类和来源的细胞系;而且,本文只是研究药物对于体外培养的细胞株的抑制情况,并非针对临床抗肿瘤药物用药指导。

#### 参考文献:

- [1] 陈富强,李煜,李瑶,等.人肝癌细胞系HepG2生物学特性分析[J].内蒙古大学学报(自然科学版),2007,38(3):306.
- [2] Rodriguez-Melendez R, Griffin JB, Zempleni J. The expression of genes encoding ribosomal subunits and eukaryotic translation

initiation factor 5A depends on biotin and bisnorbiotin in HepG2 cells [J]. J Nutr Biochem, 2006, 17: 23.

- [3] Gao FJ, Cui SX, Chen MH, et al. Des-gamma-carboxy p10-thrombin increases the expression of angiogenic factors in human hepatocellular carcinoma cells [J]. Life Sci, 2008, 83: 815.
- [4] Wang ZY, Burke PA. Effects of Hepatocyte Nuclear Factor-4 on the Regulation of the Hepatic Acute Phase Response [J]. J Mol Biol, 2007, 371: 323.
- [5] 徐庆,陈全斌,义祥辉,等.荔枝核提取物对HepG2细胞系HBsAg与HBeAg表达的影响[J].中国医院药学杂志,2004,24(7):393.
- [6] Jia F, Zhang YZ, Liu CM. Stable inhibition of hepatitis B virus expression and replication in HepG2. 2.15 cells by RNA interference based on retrovirus delivery [J]. J Biotechnol, 2007, 128: 32.
- [7] 王敏,贾正平,马骏,等.瑞香狼毒总黄酮提取物的抗肿瘤作用[J].中国中药杂志,2005,30(8):603.
- [8] 唐玲,葛迎春,刘平,等.油茶籽提取物对体外培养不同肿瘤细胞增殖的抑制作用[J].辽宁中医药大学学报,2008,10(10):141.
- [9] 赵灿国,董伟华,孔天翰.蝎毒及其分离组分对4种肿瘤细胞生长的抑制作用[J].广州医学院学报,2006,34(1):26.
- [10] 王曼,孙兴怀.曲尼司特对培养兔晶状体上皮细胞的作用[J].眼科研究,2004,22(5):485.
- [11] 张春红,张连学,李向高,等.人参二萜脂肪酸抗肿瘤活性的初步研究[J].中药材,2006,29(11):1200.
- [12] 李亚娟,周洪澜,葛岩,等.槲寄生碱对人腺样囊性癌细胞的抑制作用[J].吉林大学学报(医学版),2008,34(4):601.

收稿日期:2009-02-25