

文章编号:1005-6947(2006)07-0536-03

· 基础研究 ·

他克莫司及阿霉素对肝癌细胞抑制作用的实验研究

张俊峰, 陈规划, 陆敏强, 李华, 蔡常洁, 杨扬, 陈伟

(中山大学附属第三医院 肝移植中心, 广东 广州 510630)

摘要:目的 探讨他克莫司(FK506)及阿霉素(ADM)对肝癌细胞的影响。方法 培养 HepG-2 肝癌细胞株,将其分成对照组、FK506组、ADM及FK506加ADM组,分别处理24~48h。采用MTT法检测细胞增殖,流式细胞术测定细胞周期及细胞凋亡。结果 肝癌细胞增殖能力在FK506作用48h后明显受到抑制;FK506对肝癌细胞有促进凋亡作用,在5~100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 浓度范围内,凋亡率随浓度增加而增加,超过100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 时,凋亡率减低。FK506及ADM均使 G_2 期显著延长;FK506联合ADM对 G_2/M 期的阻滞有协同作用。FK506与ADM有协同促凋亡作用。结论 FK506对肝癌细胞的增殖有抑制作用,能使 G_2 期阻滞,促凋亡。FK506与ADM体外联合应用对肝癌细胞有协同抑制作用。

关键词:肝肿瘤/药物疗法;他克莫司/治疗应用;阿霉素/治疗应用;肿瘤细胞,培养的

中图分类号:R735.7;R979.14

文献标识码:A

Inhibitory effect of combined tacrolimus and adriamycin on hepatocellular carcinoma: an experimental study

ZHANG Jun-feng, CHEN Gui-hua, LU Min-qang, LI Hua, CAI Chang-jie, YANG Yang, CHEN Wei

(The Center of Liver Transplantation of the Third Affiliated Hospital of Sun Yet Sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory effect of tacrolimus (FK506) and adriamycin (ADM) on hepatocellular carcinoma. **Methods** HepG-2 cells were cultured, and divided into 4 groups, namely control, FK506, ADM, FK506 + ADM groups, the cells were treated by the drugs for 24 to 48 hours respectively. The inhibitory rate of the cells was measured by MTT assay, and cell cycle and cell apoptotic rate were detected by flow cytometry (FCM). **Results** The ability of tumor cell growth were inhibited by FK506 after 48h; the apoptosis ratio was increased when FK506 was below 100 $\mu\text{g}/\text{L}$, and when it exceeded that value, the apoptosis ratio was decreased. FK506 and ADM significantly prolonged cell G_2 phase; combined tacrolimus and adriamycin had synergistic role effect on arresting the cell in G_2 phase, FK506 combined with adriamycin demonstrated synergistic effect on apoptosis. **Conclusions** FK506 could inhibit the growth of hepatocellular carcinoma, arrest the cell in G_2 phase, and increase apoptosis. FK506 combined with adriamycin demonstrated synergistic inhibitory effect on hepatocellular carcinoma.

Key words: Liver Neoplasms/drug ther; Tacrolimus/ther use; Tumor cell, Cultured; Adriamycin/ther use

CLC number: R735.7; R979.14

Document code: A

20世纪80年代以来,肝移植技术发展迅速,

已成为肝脏终末期疾病的重要治疗手段。尽管肝癌作为肝移植适应证仍存在争议,但在我国肝移植术仍是治疗无肝外转移的肝脏恶性肿瘤的有效方法,且取得了较好的效果。他克莫司(FK506)为目前肝移植术后基本抗免疫排斥药。阿霉素(adriamycin, ADM)为肝癌常用的有效化疗药物。FK506等免疫抑制剂与ADM联合应用是否会增加肝癌复发

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)资助项目(2003CB515507)。

收稿日期:2005-11-15; **修订日期:**2006-04-24。

作者简介:张俊峰,男,山东东明人,中山大学附属第三医院主治医师,主要从事肝癌肝移植基础与临床方面的研究。

通讯作者:陈规划 E-mail: chgh1955@263.com。

的问题一直困扰着移植外科医师。为此,笔者探讨 ADM 对肝癌肝移植术后应用的安全性。

1 材料和方法

1.1 材料

DNA 细胞周期及细胞凋亡流式细胞检测试剂盒购自 BD 公司、他克莫司(FK506)购自日本藤泽公司、四甲基偶氮唑蓝(MTT)购于美国 Sigma 公司。荧光定量仪 PE 7000 全自动荧光定量多聚酶链反应(PCR)仪购于美国 Perkin Elmer 公司;流式细胞仪购于 BD 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌细胞 HepG-2 购自中山大学细胞库,常规培养于 DMEM 完全培养液内(含 10% 小牛血清、100 μg/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素, pH7.2),置 37℃ 及 5% CO₂ 孵箱中培养,选对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 分组 FK506 设为 5, 10, 100, 500, 1 000, 5 000 μg/L 6 个浓度组, ADM 设为 1 000 μg/L。分成对照组、FK506 组、ADM 组及 FK506 加 ADM 组。HepG-2 细胞分别经过上述药物 24h 和 48h 处理后检测。

1.2.3 MTT 比色法检测细胞增殖 取 96 孔细胞培养板加入相同数目细胞,培养 24h,待细胞贴壁后,将 FK506 处理的相同数目细胞加入各个孔,同时设 3 个复孔,分别置于 37℃ 5% CO₂ 孵箱中培养 24h 及 48 h,然后每孔加入 15 μL MTT 染液,在 37℃ 5% CO₂ 孵箱中培养 4~6 h,每孔加入 10% 十二烷基硫酸钠(SDS)的盐酸溶液,再置孵箱中培养过夜,最后在酶联检测仪波长 570nm 测 OD 值。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 以 0.25% 胰蛋白酶消化后,收集细胞总数为 1×10^6 以上,以 1 500 r/min 离心 5 min 后,转入 1.5 mL Eppendorf 管内,加入冰磷酸盐缓冲液(PBS)(pH7.4)缓冲液,1 500 r/min 离心 5 min 后,再洗 1 次,弃去上清液,缓慢加入 -20℃ 预冷的 70% 乙醇 1.5 mL,固定细胞,充分震荡,使细胞分散,加入碘化丙啶(PI)和 annexin-VFITC 2 种染料各 5 μL,4℃ 保存 15 min 后,放置入流式细胞仪样品室,用 488nm 氩离子激光进行检测。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期 同上收集 10^6

细胞,75% 冷乙醇固定 10 min。RNA 酶消化,加 PI 染液,4℃ 避光静置 15 min。用流式细胞仪检测。

1.3 统计学处理

采用 Excel 软件中的方差分析和 *t* 检验进行统计学处理。 $\alpha = 0.05$ 为检验标准。

2 结果

2.1 FK506 对肝癌细胞增殖的抑制作用

经 FK506 处理 24h 的肝癌细胞 OD 值较对照组无明显差异,而作用 48h 后 OD 值较对照组明显降低($P < 0.05$)。表明经 FK506 处理 48h 的肝癌细胞增殖能力明显受到抑制(表 1)。

表 1 不同浓度 FK506 对 HepG-2 肝癌细胞作用 48h 后的 OD 值

FK506 浓度(μg/L)	<i>n</i>	肝癌细胞 OD 值($\bar{x} \pm s$)
对照组	4	1.036 ± 0.025
5	4	0.695 ± 0.019 [†]
10	4	0.763 ± 0.021 [†]
100	4	0.781 ± 0.015 [†]
500	4	0.732 ± 0.016 [†]
1 000	4	0.721 ± 0.021 [†]
5 000	4	0.705 ± 0.019 [†]

注:† 与对照组比较, $P < 0.05$

2.2 不同浓度 FK506 对肝癌细胞的作用

5~5 000 μg/L FK506 对 HepG-2 肝癌细胞作用 48h 后,细胞凋亡率在 5~100 μg/L 范围内随浓度的增加,其凋亡率逐渐增加;超过 100 μg/L 时,则出现凋亡率减低(表 2)。

表 2 不同浓度 FK506 对 HepG-2 肝癌细胞凋亡的影响

FK506 浓度(μg/L)	<i>n</i>	凋亡率(% , $\bar{x} \pm s$)
0	4	2.30 ± 0.124
5	4	56 ± 0.86 ¹⁾
10	4	7.29 ± 1.35 ¹⁾
100	4	10.63 ± 1.59 ¹⁾
500	4	2.64 ± 0.23 ²⁾
1 000	4	2.75 ± 0.12 ²⁾
5 000	4	2.15 ± 0.23 ²⁾

注:与对照组比较:1) $P < 0.05$; 2) 与对照组比较, $P > 0.05$

2.3 FK506 及 ADM 对肝癌细胞细胞周期的影响

在 FK506 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 对 HepG-2 肝癌细胞作用 48 h 时,与对照组比较,S 期缩短, G_2/M 期延长,差异有显著性 ($P < 0.05$)。

2.4 联合应用 FK506 与 ADM 的作用

单用 FK506 或 ADM 使 S 期显著缩短和 G_2/M

期延长。说明两者对细胞周期的影响主要阻滞于 G_2/M 期。FK506 联合 ADM 显示两者对 G_2/M 期的阻滞有协同作用。在 FK506 100 ng/mL 时对 HepG-2 肝癌细胞有促进细胞凋亡作用,并与 ADM 有此协同作用(表 3)。

表 3 FK506 + ADM 对 HepG-2 肝癌细胞细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	G_1/G_0 期	S 期	G_2/M 期	凋亡率
对照组	4	84.66 \pm 7.16	13.11 \pm 5.60	6.32 \pm 2.11	2.30 \pm 0.12
FK506	4	79.83 \pm 3.36	8.62 \pm 2.34 ¹⁾	13.86 \pm 3.64 ¹⁾	10.63 \pm 1.59 ¹⁾
ADM	4	73.56 \pm 6.55	7.36 \pm 1.01 ¹⁾	15.33 \pm 1.96 ¹⁾	20.93 \pm 3.70 ¹⁾
Fk506 + ADM	4	75.15 \pm 4.31	3.22 \pm 0.96 ¹⁾	23.11 \pm 3.13 ^{1),2),3)}	30.48 \pm 2.76 ^{1),2),3)}

注:1):与对照组比较, $P < 0.05$;2):与 ADM 组比较, $P < 0.05$;3)与 FK506 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

尽管肝癌肝移植患者术后面临高复发率的风险,但在一部分患者中,肝移植却获得了良好效果,甚至长期生存。Cherqui 等^[1] 研究显示,即使癌灶 $> 5 \text{ cm}$ 的患者移植术后 1,3 年无癌生存率分别达 70% 和 56%,与小肝癌组移植术后生存率相近。FK506 作为肝移植术后基本的免疫抑制剂,对肝癌的生物学影响及其与化疗合理应用有待深入研究。

本研究表明:FK506 对肝癌细胞作用 24 h 时,尚无明显的细胞抑制,当作用 48 h 后,肝癌细胞增殖能力显著受到抑制,不同浓度之间无显著统计学差别。FK506 对凋亡的影响表现出明显的量效关系,低浓度时凋亡增加,达一定浓度后,凋亡率骤降,呈双向作用。表明细胞生长抑制除与凋亡有关外,尚有直接造成肝癌细胞坏死等机制。

ADM 作为一种化疗药物,既可直接杀伤细胞致其坏死,又可诱导其凋亡。其机制大体有以下几点:(1) ADM 进入细胞后很快与细胞核结合,一部分与线粒体和微粒体结合,它们形成的复合物可导致 DNA 和 RNA 及蛋白质合成受抑,DNA 双螺旋不能卷曲,DNA 链易于折断,DNA 一旦受损便不易修复^[2]。(2) 诱导细胞凋亡是 ADM 发挥抗癌作用的重要机制^[3]。随其浓度的增加,凋亡细胞百分率逐步增加。若浓度继续增高,凋亡率不再增

加,而坏死细胞逐渐增多^[4]。钟雪云等^[5] 报道了 ADM 诱导肝癌细胞凋亡的阈值的研究,超过该值时才表现凋亡率的显著增加。

本研究发现,FK506 及 ADM 对细胞周期的影响主要阻滞于 G_2/M 期。FK506 联合 ADM 对 G_2/M 期的阻滞有协同作用。FK506 对 HepG-2 肝癌细胞有促进凋亡作用,与 ADM 有协同促凋亡作用。 G_2 期细胞的主要特征是 RNA 的合成和染色质的螺旋化,此期细胞对外界环境敏感,易受各种因素的影响^[2]。这为联合作用于 G_2 期的化疗药协助肝癌治疗提供了依据。实验表明 FK506 联合 ADM 对体外肝癌细胞在体外有协同作用,故推测,肝癌肝移植术后应用 FK506 联合 ADM 对控制肝癌复发转移可能有更好的结果。

参考文献:

- [1] Cherqui D. Role adjuvant treatment in liver transplantation for advanced hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 1998, 5(1): 35 - 40.
- [2] 张覃沐. 抗肿瘤药物的药理与临床应用[M]. 郑州:河南医科大学出版社,1999. 163.
- [3] 郑建勇,李开宗,王为忠,等. 阿霉素诱导人肝癌细胞凋亡机制研究[J]. 中国普通外科杂志,2005,14(7): 509 - 511.
- [4] 唐正严,齐琳,丁见. 表阿霉素诱导膀胱癌细胞凋亡的实验研究及预防浅表性膀胱癌术后复发的疗效观察[J]. 实用预防医学,2006,13(1): 30 - 31.
- [5] 钟雪云,陈运贤,孙晓东. 顺铂与阿霉素诱导肝细胞肝癌细胞凋亡阈值研究[J]. 中国病理生理杂志,2000,16(3): 199 - 202.