

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)12-1069-02

# SRB 法检测大鼠原发肝癌细胞、骨髓间充质干细胞和 HepG2 细胞的抗肿瘤药物敏感差异

罗敏<sup>1</sup>, 周媛<sup>1</sup>, 宫卫东<sup>2</sup>, 周思朗<sup>3</sup>, 张婧<sup>1</sup>, 张积仁<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>南方医科大学珠江医院肿瘤中心, 广东 广州 510282, <sup>2</sup>第四军医大学唐都医院介入科, 陕西 西安 710038, <sup>3</sup>解放军第 421 医院肿瘤科, 广东 广州 510318 )

## Differences in chemosensitivity to anti-cancer drugs among hepatocarcinoma cells, bone marrow mesenchymal stem cells and HepG2 cells by SRB assay in rats

LUO Min<sup>1</sup>, ZHOU Yuan<sup>1</sup>, GONG Wei-Dong<sup>2</sup>, ZHOU Si-Lang<sup>3</sup>, ZHANG Jing<sup>1</sup>, ZHANG Ji-Ren<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oncology Center, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China, <sup>2</sup>Department of Interventional Radiology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China, <sup>3</sup>Department of Oncology, PLA 421 Naval Hospital, Guangzhou 510318, China

**【Abstract】** AIM: To study the differences in chemosensitivity to 4 anticancer drugs among hepatocarcinoma cells, MSCs (marrow mesenchymal stem cells) and HepG2 cells by SRB assay. **METHODS:** The primary liver carcinoma in rats was induced by diethylnitrosamine. Tumor cells and MSCs from 8 hepatocarcinoma rats were separated. The inhibition rates of hepatocarcinoma cells, MSCs and HepG2 cells were measured and analyzed by SRB assay. **RESULTS:** The chemosensitivity of hepatocarcinoma cells and HepG2 cells to adriamycin, cisplatin and nolatrexed dihydrochloride were higher than that of MSCs, while the chemosensitivity of HepG2 cells and MSCs to MCC was higher than that of hepatocarcinoma cells. **CONCLUSION:** The MSCs have a distinct chemoresistance mechanism like the tumor stem cells.

**【Keywords】** liver neoplasms; tumor stem cells; mesenchymal stem cells; SRB drug sensitivity assay

**【摘要】**目的: 应用 SRB 法探讨不同药物对骨髓间充质干细胞(MSCs)、肝癌细胞(HC)和 HepG2 细胞的药敏差异。方法: 雌性清洁级 SD 大鼠 20 只, 应用二乙基亚硝胺饲喂法建立大鼠原发性肝癌模型, 选取诱癌成功大鼠 8 只分别原代培养 HC 与 MSCs, 同时培养 HepG2 细胞系细胞, SRB 法进行

药物敏感实验, 观察药物敏感性的差异。结果: 对阿霉素、顺铂、洛拉曲克的敏感度从高到低依次为 HepG2 细胞, HC, MSCs。而丝裂霉素药敏显示 3 种细胞药物敏感度从高到低依次为 HepG2, MSCs, HC。结论: HC 药敏实验与 HepG2 细胞和 MSCs 存在一定异同。

**【关键词】** 肝肿瘤; 肿瘤干细胞; 间质干细胞; SRB 药物敏感实验

**【中图分类号】** R730.53

**【文献标识码】** A

## 0 引言

原发性肝癌细胞中也存在类似于其他实体瘤肿瘤干细胞的强增殖性细胞亚群, 其在表面标志、耐药性、强增殖性等方面与骨髓间充质干细胞(marrow mesenchymal stem cells, MSCs)存在相同点<sup>[1]</sup>。而细胞系则被认为是不同于肿瘤干细胞的永生细胞。我们使用二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)制备大鼠原发性肝癌模型, 应用 SRB 法药物敏感实验检测抗肝癌药物(阿霉素、顺铂、丝裂霉素、洛拉曲克)对肝癌细胞(hepatocarcinoma cells, HC), MSCs 和 HepG2 细胞杀伤作用, 为探讨耐药机制不同的细胞特征差异提供新的线索。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 雄性清洁级 SD 大鼠 20 只, 鼠龄 8 wk, 体质量(102.7 ± 10.2)g, 由南方医科大学动物实验中心提供; HepG2 细胞由广东省人民医院肿瘤科惠赠; L-DMEM, RPMI-1640, 胎牛血清为杭州四季青产品, SRB, DEN 为美国 Sigma 公司产品, 阿霉素(规格: 10 mg/支)为浙江海正药业股份有限公司产品; 顺铂(规格: 10 mg/瓶)为山东齐鲁药业股份有限公司产品; 丝裂霉素为浙江海正制药厂产品; 洛拉曲克(nolatrexed dihydrochloride, AG337)为北京康辰医药发展有限公司产品。

**1.2 方法** 采用 DEN 诱发大鼠肝癌模型, 即用 0.25 g/L DEN 水溶液为诱癌剂, 放在水中大鼠自由饮水。12 ~ 16 wk 后选取诱癌成功的大鼠 8 只进行实验。将大鼠处死, 750 mL/L 乙醇浸泡 3 min。无菌条件下剥离肿瘤, 取肝癌组织约 1 g, 置于含 500 U/L 青霉素,

收稿日期 2007-01-26; 接受日期 2007-03-02

基金项目 国家自然科学基金(30572152)

通讯作者: 罗敏, 硕士生(导师张积仁), Tel: (020)61643202

Email: coffeeqll@126.com

500 g/L 链霉素的无菌 PBS 液中. 切取无坏死肝癌组织块, 用 Hank 液漂洗 2 次, 剪碎为  $0.5 \text{ mm}^3 \sim 1 \text{ mm}^3$ , 放入 25 mL 培养瓶贴壁, 加少量含 200 mL/L 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液. 翻置 25 mL 培养瓶, 50 mL/L  $\text{CO}_2$ , 37°C 恒温箱中培养 2~3 h. 再次翻转, 加足量含 200 mL/L 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液. 根据培养液改变情况 2~3 d 换液. 同只大鼠在 HC 原代培养取材后, 无菌条件下分离股骨胫骨, 咬去骨两端, 用 L-DMEM 培养基冲出骨髓于离心管中, 吹打制成细胞悬液. 贴壁培养法纯化 MSCs<sup>[2]</sup>.

抗癌药物工作液浓度为该药的标准血浆峰浓度 2 倍. 血浆峰浓度 (mg/L) = 药物用量 (mg/kg)  $\times$  60 kg/5000 mL  $\times$  2  $\times$  1000 mg/g. 四种药物分别配成 20X 溶液. 取培养瓶中细胞, 调整细胞密度至  $3 \times 10^7$  个/L, 180  $\mu\text{L}$ /孔接种至 96 孔板, 预培养 24 h 后, 每孔加药物 20  $\mu\text{L}$  (终浓度为配制浓度的 1/10), 每种药物设 3 个复孔, 每孔总液量为 200  $\mu\text{L}$ , 继续在培养箱内培养 48 h, 甩去培养液风干. 每孔加冰冷 500 g/L 三氯醋酸 50  $\mu\text{L}$  (终浓度为 100 g/L) 固定 60 min 后去离子水洗 4~5 次, 干燥. 每孔加 4 g/L SRB 100  $\mu\text{L}$  作用 30 min, 10 mL/L 醋酸轻洗 4 次, 甩干. 每孔加 10 mmol Tris-base 200  $\mu\text{L}$  摇动混匀, 在平板振荡器上振荡 5 min, 在酶联免疫检测仪测定 A 值, 用空白对照调零, 所用波长为 490 nm. 将所获 HC 生长抑制率定义为药物对 HC 的体外抑制率. 抑瘤率 (%) = (无药细胞对照孔 A 值平均值 - 用药孔 A 值平均值) / 无药细胞对照孔 A 值平均值  $\times$  100%.

统计学处理: 采用 SPSS 10.0 统计软件. 各化疗药物对 HC 抑制率、MSCs 抑制率和 HepG2 抑制率组间进行配对 *t* 检验, 不同化疗药物对 HC 抑制率, MSCs 抑制率, HepG2 抑制率分别进行 One-way ANOVA 分析.

## 2 结果

对阿霉素、顺铂、洛拉曲克 3 种药物的敏感性为: HC  $\approx$  HepG2 > MSCs, 对丝裂霉素的敏感差异从高到低依次为: MSCs  $\approx$  HepG2 > HC, 差异具有统计学意义. 3 种化疗药物对 HC 抑制率、对应 MSCs 抑制率与 HepG2 抑制率, 之间存在统计学差异 ( $P < 0.001$ ). 洛拉曲克和阿霉素对 HC 抑制率相对较高, 而丝裂霉素对 MSCs 的抑制率较高 (表 1).

## 3 讨论

肝癌化疗的有效率低下依然是目前临床晚期肝癌的棘手问题, 建立一个体外化疗药物敏感实验系

表 1 HC, MSCs 和 HepG2 抑制率 ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

化疗药物	MSCs	HC	HepG2
阿霉素	30.49 $\pm$ 3.36 <sup>bd</sup>	50.53 $\pm$ 4.99	56.15 $\pm$ 4.26
顺铂	35.09 $\pm$ 4.62 <sup>bd</sup>	48.33 $\pm$ 5.15	47.20 $\pm$ 4.78
丝裂霉素	57.70 $\pm$ 6.17 <sup>b</sup>	39.56 $\pm$ 6.64	59.53 $\pm$ 5.47
洛拉曲克	29.53 $\pm$ 4.56 <sup>bd</sup>	57.57 $\pm$ 6.39	58.85 $\pm$ 4.01

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs HC, <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs HepG2.

统, 进行个体化治疗, 有望提高肝癌化疗疗效<sup>[3]</sup>. 现在临床常用的药敏实验主要有 MTT 比色法、放射性同位素标记物掺入法、三磷酸腺苷生物发光法、区别染色细胞毒法、流式细胞仪测定法等, 各有不同的优缺点<sup>[4-5]</sup>. SRB 法药物敏感实验成本相对三磷酸腺苷生物发光法低, 相对 MTT 结果准确并能保存较长时间 (15~20 d), 是 NCI 推荐的一种较新筛选抗癌药物的方法. HepG2 细胞系细胞本身是永生化细胞, 但目前普遍认为细胞系与现在提出的肿瘤干细胞虽然在增殖性和永生化方面一样, 但细胞系缺乏分化能力, 与肿瘤干细胞存在某种尚未明了的差异. 我们的实验结果表明, 阿霉素和洛拉曲克杀伤细胞作用较强, 而 MSCs 对阿霉素、顺铂、洛拉曲克敏感性明显低于肿瘤细胞和 HepG2 细胞. 而丝裂霉素对 HepG2 细胞和 MSCs 的抑制率却远远高于 HC. 这些差异说明 HC 和干细胞样细胞存在不同的抗药物机制, 其抗药物杀伤能力相差较大. 肿瘤干细胞也可能存在相同的耐药机制. 细胞系药物敏感类似于普通 HC, 相对抑制率都较其他两者高, 但在抗丝裂霉素杀伤上却于间充质干细胞相似. 细胞系存在类似干细胞样细胞药物作用位点, 可能为区别于普通 HC 但类似肿瘤干细胞的功能结构, 还有待通过进一步的实验研究来清楚阐明.

## 【参考文献】

- [1] 周思朗, 李鹏, 曹漫明, 等. 大鼠肝癌干细胞生物学行为研究 [J]. 中华肝脏疾病杂志, 2006, 14(5): 364-366.
- [2] Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection [J]. J Cell Biochem. 2003, 89(6): 1235-1249.
- [3] 陈涛, 褚忠华, 刘建平, 等. 体外化疗药物敏感实验对指导原发性肝癌个体化治疗的临床意义 [J]. 癌症, 2005, 24(8): 1018-1022.
- [4] Liu S, Peng Z, Lou J, et al. An evaluation of adenosine triphosphate bioluminescence assay for tumor in vitro chemosensitivity testing [J]. Huaxi Yike Daxue Xuebao, 2002, 31(3): 330-333.
- [5] Lwadata Y, Fujimoto S, Yamauia A. Differential-chemosensitivity in human intracerebral gliomas measured by flow cytometric DNA and analysis [J]. Int J Mol Med, 2002, 10(2): 187-192.