

人肝癌细胞对顺铂敏感性研究

牛锐利 韩仁章 李若婷 汪雨欣 宗宪春*

牡丹江师范学院 黑龙江 牡丹江 157011

【摘要】：肝癌是最常见的恶性肿瘤之一，在其治疗过程中，常用的化疗药物为铂类药物。不同类型肝癌细胞对铂类药物的耐受能力不尽相同，同时药物化疗过程中铂类药物的使用剂量对癌细胞的抑制作用也有较大差别。研究拟通过 MTT 法检测顺铂作用下 Huh-7 细胞的生长抑制率，确定顺铂用药浓度范围和作用时间。并采用流式凋亡、流式周期观察不同浓度顺铂作用后 Huh-7 细胞凋亡和细胞周期变化情况，探讨顺铂与肝癌细胞的敏感性关系。结果表明，随着顺铂浓度和时间的增加，Huh-7 细胞的生长抑制率逐渐升高。在 12 μ M 顺铂处理 Huh-7 细胞 24h 时细胞生长抑制率达 50%。流式周期结果显示 Huh-7 细胞 blank 组 G1 期细胞达 51.07%，G2 期细胞 22.37%，S 期细胞占 26.56%。Huh-7 细胞顺铂处理组 G1 期占 57.31%，G2 期占 19.86%，S 期占 22.84%。很明显得出加入顺铂后细胞 G1 期占比增多，而 S 期，G2 期占比相对减少。同时流式凋亡结果显示顺铂处理组细胞晚调和死亡指数增强。Huh-7 细胞对 12 μ M 顺铂处理 24h 后细胞增殖能力明显减弱，而细胞凋亡数量增加。

【关键词】：顺铂；肝癌细胞；细胞凋亡；细胞周期

A study of the sensitivity of human liver cancer cells to cisplatin

Ruili Niu, Renzhang Han, Ruoting Li, Yuxin Wang, Xianchun Zong*

Mudanjiang Normal University Heilongjiang Mudanjiang 157011

Abstract: Liver cancer is one of the most common malignant tumors, and in its treatment process, the commonly used chemotherapy drugs are platinum drugs. Different types of liver cancer cells have different tolerances to platinum drugs, and the inhibitory effect of platinum drugs on cancer cells during drug chemotherapy is also quite different. The study proposes to detect the growth inhibition rate of Huh-7 cells under the action of cisplatin by MTT method, and determine the concentration range and duration of cisplatin. The sensitivity relationship between cisplatin and hepatocellular carcinoma cells was explored by using flow cytometry and flow cytometry cycle to observe the apoptosis and cell cycle changes of Huh-7 cells after different concentrations of cisplatin. The results showed that as the concentration and timing of cisplatin increased, the growth inhibition rate of Huh-7 cells gradually increased. The cell growth inhibition rate reached 50% when Huh-7 cells were treated with 12 μ M cisplatin for 24 h. The results of the flow cytometry cycle showed that the G1 stage cells in the Blank group of Huh-7 cells reached 51.07%, the G2 stage cells were 22.37%, and the S stage cells accounted for 26.56%. The Huh-7 cell cisplatin treatment group accounted for 57.31% of the G1 stage, the G2 stage accounted for 19.86%, and the S stage accounted for 22.84%. It is obvious that the proportion of cells in the G1 phase increases after the addition of cisplatin, while the proportion of the G2 phase in the S phase is relatively reduced. Simultaneous flow cytometry results showed enhanced late apoptosis and death index in the cisplatin-treated group. The proliferation ability of Huh-7 cells to 12 μ M cisplatin treatment was significantly weakened after 24 h, while the number of apoptosis increased.

Keywords: Cisplatin; Liver cancer cells; Apoptosis; Cell cycle

顺铂为目前常用的金属铂类络合物，具有抗癌谱广的特点^[1]。其抗癌的机理在于能与 DNA 结合形成交叉键，破坏 DNA 结构，使其不再复制；高浓度时也抑制 RNA 及蛋白质的合成^[2]。顺铂在抗肿瘤方面有着独到的疗效，现目前大部分化疗药物均用到顺铂，并且还有不少学术家提出顺铂联合中药使用在治疗癌症方面有独特的理念^[3-6]。但在临床治疗中，以铂类药物为基础的联合化疗依然存在一些难以解释的问题。例如，同一病理患病的肝癌患者，即使分期相同，使用同一化疗方案，却仍有很大的差异。究其原因，化疗失败可能与不同肿瘤细胞对于铂类药物的耐药程度有关^[7]。人肝癌细胞系（Huh-7）是由 Naka bayashi 等人建立的，细胞源自一个日本男性高分化肝细胞肝癌

^[8]。本实验拟通过以肝癌细胞 Huh-7 为研究对象，顺铂浓度和处理时间为因变量来探究顺铂对 Huh-7 肝癌细胞的最适作用方案，并观察此方案下 Huh-7 细胞的增殖和凋亡情况，探究顺铂对 Huh-7 细胞的作用效果及其敏感性。希望借本研究为肝癌的临床化疗提供更有效的治疗方案，为患者提供一定的帮助。

1 材料与方法

1.1 材料

实验细胞：肝癌细胞（Huh-7）由武汉赛维尔生物有限公司提供。

试剂：顺铂（DDP）购自齐鲁制药有限公司，DMEM/HIGH GLUCOSE（1 $\times$ ）、胎牛血清（Fetal Bovine Serum/FBS）、PBS

均购于 Hyclone, MTT 液由武汉赛维尔生物有限公司提供, 胰酶 Trypsin 购自 Amresco, BD Matrigel™ 购自 Becton, Dickinson and Company。

试剂配制: 顺铂 (DDP) 用纯水配成 1mmol/L 母液, 使用时需用 DMEM/HIGH GLUCOSE (无 FBS) 配成工作液 -20℃ 保存。细胞培养液: DMEM/HIGH GLUCOSE+10%FBS+1%双抗。细胞冻存液配制为 DMSO:DMEM:FBS=1:3:6。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与传代

Huh-7 细胞培养于含 10%胎牛血清, 1%双抗的高糖 DMEM 培养基中, 培养条件为 37℃, 5%CO₂, 细胞呈贴壁生长, 每天换液, 2d 传一次代, 一培养皿可传代 2 皿。

1.2.2 MTT 法测顺铂作用最适浓度和时间

将对数生长期 Huh-7 细胞经胰酶消化, 制成细胞悬液, 按 4000 细胞每孔接种于 96 孔板, 置于 5%CO₂, 37℃ 培养过夜。将培养基吸出, 加入 0μM, 4μM, 8μM, 12μM, 16μM 及 18μM 浓度顺铂培养基, 分别作用 12h, 24h 和 48h, 并且每组设置 3 个重复实验。经相应时间处理后加入 20μl MTT 溶液 (5mg/ml, 即 0.5%MTT), 培养箱中孵育 4 小时。小心地吸除上清液 (注意不要触碰到细胞), 加入 150μl DMSO (二甲基亚砷), 在摇床低速 (120~140rpm/min) 震荡 10min 使结晶物充分溶解。使用酶标仪测定其在 490nm 光的吸收值, 按公式计算药物对细胞的抑制率。

实验组: 实验组细胞 DMSO 溶解的吸光度值

阴性对照: 对照组细胞 DMSO 溶解的吸光度值

空白对照: DMSO 溶液的吸光度值

实验结果计算:

$$\text{增值率} = \frac{\text{实验组 OD 值} - \text{空白对照组 OD 值}}{\text{阴性对照组 OD 值} - \text{空白对照组 OD 值}} \times 100\% \quad (\text{式 1})$$

$$\text{抑制率} = 1 - \text{增值率} \quad (\text{式 2})$$

1.2.3 流式周期检验药物对细胞作用

取对数生长期的 Huh-7 细胞消化并接种于 6 孔板中。12h 后用 0μM, 12μM 浓度的顺铂作用于细胞, 37℃ 5%CO₂ 培养箱培养 24h。细胞消化后用 4℃ 预冷的 PBS 清洗两次, 最后加入 -20℃ 预冷的 75%乙醇重悬细胞, 冰浴过夜。PBS 清洗两次后加入 100ul PBS 重悬细胞, 加入 2μl 浓度为 1mg/ml 的 RNaseA (去离子水配制), 37℃ 水浴 40min。加入 100μl 浓度为 100μg/ml 的 PI 染色液 (PBS 配制), 避光染色 20min。上机检测: 流式细胞仪激发波长为 488nm, 用 Cell Quest 及 Modfit 软件分析细胞周期以确定细胞周期分布。

1.2.4 流式凋亡检验药物对细胞作用

取对数生长期的 Huh-7 消化并种于 6 孔板中。12h 后用 0μM, 12μM 浓度的顺铂处理细胞, 37℃, 5%CO₂ 培养箱培养 24h。收集细胞培养液于流式管中 (有少量悬浮细胞)。制备细胞悬液并收集于流式管中, 1500r·min⁻¹ 离心 5min 弃上清。用 4℃ 预冷的 PBS 清洗细胞并离心得到沉淀, 300μL 的 Binding Buffer 重悬。加入 5μL Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5μL Propidium Iodide 混匀, 室温下避光反应 5-15min。于 1h 内上机检测: Annexin V-FITC 的绿色荧光通过 FITC 通道 (FL1) 检测, PI 红色荧光通过 PI 通道 (FL2) 检测。流式细胞仪参数如下: 激发波长 Ex=488nm, 发射波长 Em=530nm。

2 结果

2.1 细胞培养

Huh-7 细胞为贴壁细胞, 低密度时呈多边形, 高密度时偏向于梭形, 细胞每 2d 传代一次。

2.2 MTT 法测顺铂作用最适浓度和时间

采用 MTT 法测顺铂作用最适浓度和时间, 使用酶标仪测定其在 490nm 光的吸收值, 按公式增值率
$$= \frac{\text{实验组 OD 值} - \text{空白对照组 OD 值}}{\text{阴性对照组 OD 值} - \text{空白对照组 OD 值}} \times 100\%$$
 计算药物对细胞的抑制率。

随着顺铂浓度的升高 Huh-7 细胞生长抑制率不断升高, 在 48h 时 Huh-7 细胞生长抑制情况无太大变化, 甚至出现顺铂浓度为 18μM, 处理 24h 时比处理 48h 的生长抑制率要高的情况。顺铂处理后 Huh-7 细胞生长抑制率达到 50% 时顺铂浓度大约在 12μM 左右。

2.3 顺铂作用下流式周期法检测细胞周期结果

采用流式周期实验方法得到如图 3 所示结果, 结果显示 Huh-7 细胞 blank 组 G1 期荧光强度在 107.44, 占总细胞量的 51.07%, G2 期荧光强度在 200.53, 占总细胞量的 19.86%, S 期细胞量占 26.56%。Huh-7 细胞经 12μM 顺铂处理组中, G1 期占总细胞量的 57.31%, G2 期占总细胞量的 19.86%, S 期细胞量占 22.84%。很明显加入顺铂后细胞 G1 期占比增多, 而 S 期, G2 期占比相对减少。

2.4 流式凋亡法检测顺铂作用后细胞凋亡结果

采用流式凋亡实验方法得到实验结果, 在 12μM 顺铂作用 24h 后, Huh-7 细胞机械损伤由 10.4% 升高至 11.7%, 晚凋和细胞死亡由 2.57% 升高至 4.18%, 早凋量由 1.14% 增高到 0.41%, 而正常细胞由 86.9% 降低至 83.7%。

3 讨论

随着人们生活水平的提高, 基础医疗已覆盖全国各地, 很多病症已经不再威胁人类的生命安全, 但是癌症仍然是我们的

头号大敌。肝癌是常见的恶性肿瘤之一，其侵袭性强，无明确的边缘。化疗是肝癌的主要治疗方式之一，顺铂作为常用的化疗药物有明显治疗效果。本实验通过 MTT 法，细胞凋亡和流式周期探究顺铂对肝癌 Huh-7 细胞的敏感性。通过 MTT 法检测时，96 孔板边缘孔用无菌 PBS 填充以防止中间细胞培养基蒸发变少影响细胞的增殖，检测结果显示，随着顺铂浓度的升高 Huh-7 细胞生长抑制率不断升高，但当顺铂浓度增大到一定限度和作用时间后，Huh-7 细胞生长抑制率无明显变化甚至会减弱。顺铂处理后 Huh-7 细胞生长抑制率达到 50% 时顺铂浓度大约在 12 μ M 左右，因此在接下来的流式细胞周期和细胞凋亡实验中选用 12 μ M 浓度顺铂，处理时间为 24h。

顺铂作为肿瘤化疗药物，主要抑制细胞 DNA 的复制，若通过流式周期检测细胞周期情况，预想结果细胞应在 G1 期占比增多。流式周期结果显示，Huh-7 细胞顺铂组 G1 期细胞比 blank 组高 6.24%，而 G2 期和 S 期顺铂组细胞量都相对降低。说明顺铂对于肝癌细胞 Huh-7 的抑制在于 G1 期，其抑制了细胞内 DNA 的复制。流式凋亡检测前细胞密度最好达 80%~

90%，因其加入顺铂处理后考虑到会有部分细胞凋亡，因此细胞种板时应注意细胞密度。流式凋亡用以检测在细胞经顺铂处理后促进癌细胞凋亡数量变化。实验结果表明，Huh-7-DDP 组在机械损伤，早调，晚调和死亡时期的占比中均高于 Huh-7-blank 组，其中晚调和死亡时期的 Huh-7-DDP 组比 Huh-7-blank 组高 1.61%。而 Huh-7-blank 组正常细胞则比 Huh-7-DDP 组细胞高 3.2%。细胞的凋亡量明显增多，尤其是晚调和细胞死亡数量，说明顺铂通过影响 DNA 的复制促进了细胞的凋亡。

4 结论

本实验探讨了人肝癌细胞 Huh-7 对化疗药物顺铂的敏感性，实验结果表明 Huh-7 细胞在 12 μ M 顺铂作用 24h 细胞生长抑制率达 50%。细胞周期结果显示顺铂作用后的 Huh-7 细胞更多停留在 G1 期，说明低浓度顺铂对 Huh-7 便起到了抑制其 DNA 复制从而降低了其增殖能力。细胞凋亡实验结果显示 12 μ M 顺铂增加了 Huh-7 细胞的凋亡数量，并且大多为晚调和死亡时期。

参考文献:

- [1] Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug[J]. Bioorg Chem. 2019 Jul; 88: 102925.
- [2] Guo L, Zheng J, Zeng H, Zhang Z, Shao G. Atorvastatin potentiates the chemosensitivity of human liver cancer cells to cisplatin via downregulating YAP1[J]. Oncol Lett. 2021 Feb; 21(2): 82.
- [3] Hassanen EI, Korany RMS, Bakeer AM. Cisplatin-conjugated gold nanoparticles-based drug delivery system for targeting hepatic tumors[J]. J Biochem Mol Toxicol. 2021 May; 35(5): e22722.
- [4] 王辉, 边晨峰. 顺铂联合吉西他滨循环热灌注化疗对肝癌腹腔积液患者恶性肿瘤特异性生长因子、癌胚抗原水平的影响[J]. 中国药业, 2021, (03): 63-65.
- [5] 胡超, 肖幸华, 唐林, 刘检. 复方木鸡颗粒联合顺铂对人肝癌 HepG2 细胞增殖及凋亡的机制研究[J]. 现代药物与临床, 2020, (08): 1512-1516.
- [6] 王自闯, 陈小永, 张娟. 枸杞多糖联合顺铂对肝癌小鼠抑瘤作用及其对免疫功能的影响[J]. 东南大学学报(医学版), 2018, (05): 896-900.
- [7] 陈静, 鲁康洋, 李明凤, 尹玉, 曹立宇, 蔡永萍. FoxM1 促进 ABCA8 表达参与骨肉瘤对顺铂化疗的耐药性[J]. 临床与实验病理学杂志, 2020, 36(10): 1180-1185.
- [8] 王秋萍. 新型肝癌细胞株的建立及其生物学功能初探[D]. 湖南大学, 2013.

作者简介: 姓名: 牛锐利 (1996-), 性别: 女, 民族: 汉, 籍贯: 安徽阜阳, 职务/职称: 研究生, 学历: 研究生, 单位: 牡丹江师范学院, 研究方向: 细胞工程。

通讯作者: 宗宪春 (1966-), 教授, 硕士生导师, 主要研究方向: 遗传学。

基金项目: 牡丹江师范学院研究生创新项目 (kjsx2020-71mdjnu), 黑龙江省教改项目 (SJGY20180525)。