

要由细胞凋亡和坏死后产生的, Bret 将细菌脂多糖、四氯化碳、氯化汞等一些可以导致细胞死亡的化学试剂注入小鼠体内, 数小时后即可在实验小鼠血浆中检测到循环 DNA 水平的升高, 并且对于同一种试剂来讲, 循环 DNA 量的多少与所用试剂剂量呈明显的正相关。因而, Bret 等^[3]认为循环 DNA 量的改变是反映细胞死亡现象一个敏感而特异的指标。Jahr 等^[4]通过对实验动物和临床肿瘤患者标本研究也证实了这一点, 而且他们用电泳的方法区别了细胞坏死和凋亡来源的循环 DNA。(2) 细胞主动分泌或释放产生的 DNA 片段。应用核酸酶除去培养的肿瘤细胞表面的核酸后约 2 h, 细胞表面又重新出现核酸, 表明细胞主动分泌或释放的 DNA 也是循环 DNA 的一个重要来源。这 2 种来源都对循环 DNA 的产生均起着重要的作用, 只是在不同的生理和病理情况下各自所发挥的作用不同。

目前循环 DNA 除了广泛应用于肿瘤学和产前诊断外, 循环 DNA 的检测也正有效地应用于其他疾病的诊断中, 包括外伤、中风、糖尿病和自身免疫性疾病等^[5,6]。结果显示血浆循环 DNA 与 GCS 评分呈负相关, 随着颅脑损伤严重程度的增加, 其循环 DNA 水平也相应的显著增加, 与 Loy 等^[7]研究结果一致。循环 DNA 水平升高的原因除了创伤后组织细胞大量破坏死亡, 包括核酸在内的细胞内容物大量释放至外周血所致外, 还可能与循环 DNA 清除降低有关。血浆循环 DNA 的清除主要在肾脏进行, 肝脏也参与少量的清除。本研究的创伤性颅脑损

伤患者主要内脏器官包括肾脏和肝脏并没有受到损伤, 其功能也正常, 因此, 颅脑损伤导致的组织细胞大量破坏死亡是血浆循环 DNA 水平升高的主要原因。颅脑创伤后, 血浆循环 DNA 水平检测不但对于颅脑损伤的诊断有一定价值, 而且与其损伤严重程度显著相关, 即血浆循环 DNA 水平越高, 颅脑损伤程度也就越严重。因此, 血浆循环 DNA 水平检测可以作为诊断颅脑损伤一项灵敏指标。

参考文献

- 1 Campello Yurgel V, Ikuta N, Brondani da Rocha A, et al. Role of plasma DNA as a predictive marker of fatal outcome following severe head injury in males. *Neurotrauma*, 2007, 24: 1172-1181.
- 2 潘世扬, 王俊宏. 循环 DNA 的临床应用研究进展. *齐鲁医学检验*, 2004, 15: 1-2.
- 3 Bret L, Lulé J, Alary C, et al. Quantitation of blood plasma DNA as an index of in vivo cytotoxicity. *Toxicology*, 1990, 61: 283-292.
- 4 Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*, 2001, 61: 1659-1665.
- 5 胡影, 倪虹. 人体游离循环 DNA 的研究进展. *遗传*, 2008, 30: 815-820.
- 6 王惠民, 赵建华, 钱晖, 等. 分子诊断学的一些研究进展. *临床检验杂志*, 2009, 27: 401-404.
- 7 Loy M, Chiu RW. Next-generation sequencing of plasma/serum DNA: an emerging research and molecular diagnostic tool. *Clin Chem*, 2009, 55: 607-608.

(收稿日期: 2011-09-12)

doi:10.3969/j.issn.1002-7386.2012.08.013

· 论著 ·

索拉非尼对人肝癌 HepG2 细胞株生物学行为的影响及意义

林萍萍 张利敏 张雪宁 张弘 康玲伶

【摘要】 目的 观察索拉非尼对人肝癌细胞株 HepG2 细胞生物学行为的影响。**方法** 体外构建转染人肝癌 HepG2, 设索拉非尼干预组与非干预组, 用 MTT 法和流式细胞术观察 2 组细胞生物学功能行为变化。**结果** 干预组细胞 Raf 激酶的表达明显抑制, 且随着用药时间不断延长(1、3、5、7 d) Raf 激酶的表达逐步下降。干预组细胞 Raf 激酶表达呈逐步下降趋势。药物干预前表达率为 100%、干预后 1 d 为 78%、3 d 为 49%、5 d 为 38%、7 d 为 20% 逐步表达下调。与非干预组比较, 干预组 S 期细胞明显减少 ($P < 0.05$)。**结论** 索拉非尼对可以有效地抑制人肝癌 HepG2 细胞 Raf 激酶的表达, 使 S 期细胞明显减少, 从而抑制 HepG2 细胞的生长。

【关键词】 索拉非尼; 肝肿瘤; 细胞生物学

【中图分类号】 R 735.7 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-7386(2012)08-1152-02

项目来源: 承德市科学技术研究与发展指导计划项目(编号: 200922079)

作者单位: 067000 河北省承德市, 承德医学院附属医院(林萍萍、张弘、康玲伶); 河北化工医药职业技术学院(张利敏); 河北医科大学第二医院(张雪宁)

通讯作者: 康玲伶, 067000 承德医学院附属医院;

E-mail: letitia_ker@yahoo.com.cn

肝癌的发病机制十分复杂, 其发生、发展和转移与多种基因的突变及细胞信号传导通路和异常等密切相关, 而其中存在的多个关键性环节正是分子靶向治疗的理论基础和潜在靶点。近年来, 分子靶向药物治疗肝癌已逐渐引起重视, 并正成为新的研究热点^[1]。本研究探讨索拉非尼的肝癌抗肿瘤性, 为寻找肝癌的有效治疗手段提供科学的理论依据, 以提高肝癌治疗有效率, 降低病死率。我们建立大鼠皮下肝癌模型, 通过免疫组化技术检测肿瘤组织中 Raf 激酶阳性率、流式细胞仪检测肿瘤

细胞凋亡率^[2],探讨索拉非尼治疗作用,为进一步临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人肝细胞癌细胞株 HepG2 由四季青生物技术公司提供,索拉非尼由拜耳医药保健股份公司生产。携带绿色荧光蛋白的 siRNA P 质粒表达载体, RPMI1640 培养基(美国 GIBCO),转染试剂、总 RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒(大连 TaKaRa 公司)。XSB-1A 倒置显微镜,PCR 仪。

1.2 实验方法

1.2.1 HepG2 的转染:取 HepG2 18×10^5 个,用 RPMI 1640 培养基(含 10% 小牛血清,100 U/ml 青霉素及 100 μ g/ml 链霉素)置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内进行培养。待细胞融合度 > 80% 时,用 0.25% 的胰蛋白酶溶液进行消化,制成单细胞悬液,其中 1/2 加入索拉非尼进行药物干预,干预组与非干预组分别孵育 1、3、5、7 d 行 siRNA 重组质粒转染,将空质粒转染对照及转染细胞接种于 6 孔板中,转染 48 h。生物测序结果表明, HepG2 质粒正确表达。备测 HepG2 细胞为人肝癌细胞,来源于肝癌组织。该细胞与肝癌发生发展预后密切相关。但其生长受到 Raf 激酶的表达影响。索拉非尼对人肝癌 HepG2 细胞株生物学行为的影响亦在于此,

1.2.2 HepG2 中 Raf 激酶活性测定:采用荧光共振能量转移(FRET)^[3]检测非干预组及干预组(各时点)的 Raf 激酶活性(1、3、5、7 d)用酶联免疫检测仪在波长为 400 nm 处测定其荧光强度。所以分别检测 2 组 HepG2 细胞周期及 Raf 激酶的表达情况^[4]。

1.2.3 HepG2 细胞周期和凋亡率的测算:采用流式细胞术分别测定干预组及非干预组 HepG2 细胞周期,制备 1×10^6 个细胞悬液,置体积分数 0.70 乙醇中 4℃ 固定过夜,离心去上清,细胞重悬于 0.4 ml 的 PBS 中,加 5 g/L RnaseA 10 μ l,37℃ 处理 1 h,加溴化丙啶染色液,4℃ 染色过夜。应用流式细胞仪根据细胞在凋亡过程中发生一系列形态、生化变化从多个方面对细胞凋亡进行定性和定量测定。

1.3 统计学分析 应用 SPSS11.5 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

与非干预组比较,干预组 HepG2 细胞 Raf 激酶的表达明显抑制,加药后第 1、3、5、7 d Raf 激酶表达率分别为 96.34%、78.21%、65.21%、45.11% (*P* < 0.05);与非干预组比较,干预组 S 期细胞明显减少 (*P* < 0.05),细胞凋亡率(%)明显升高 (*P* < 0.05)。见表 1。

3 讨论

索拉非尼是一种口服多激酶抑制剂,可以显著延长肝癌患者生命^[5]。其抗癌机制尚不明确,可能机制主要有:(1)靶向作用于 Ras/Raf/MEK/ERK(信号级联通路)信号传导通路中的 Raf 激酶,阻断肿瘤细胞增殖,促进细胞凋亡;(2)通过抑制血管内皮细胞(VEGFR)和血小板衍生生长因子(PDGR)而阻断肿瘤新生血管形成,间接抑制肿瘤细胞的生长^[6]。

Ras/Raf/MEK/ERK 信号传导通路存在于人体大多数细胞

表 1 2 组 Raf 激酶活性、细胞周期及细胞凋亡率比较 $\bar{x} \pm s$

组别	Raf 激酶活性(%)	细胞周期			细胞凋亡率(%)
		S 期	G0/G1 期	M/G2 期	
非干预组	98.11	96.1 ± 1.1	98.2 ± 2.1	89.0 ± 1.2	23.11
干预组	45.21	45.3 ± 2.2 *	65.1 ± 4.1	46.8 ± 1.3	58.12 *
1 d	96.34 *	68.1 ± 12.1 *	77.2 ± 3.1	88.1 ± 2.9	21.11 *
3 d	78.21 *	57.0 ± 2.1 *	65.6 ± 2.4	67.9 ± 2.1	38.23 *
5 d	65.21 *	41.0 ± 3.1 *	39.0 ± 2.7	45.6 ± 2.3	40.33 *
7 d	45.11 *	26.1 ± 1.1 *	40.0 ± 3.3	34.2 ± 3.4	59.22 *

注:与非干预组比较, **P* < 0.05

内,可将细胞外刺激信号转导至细胞及其核内,在细胞增殖、分化、转化及抑制凋亡等方面起着重要的作用。Raf 为该通路中的关键激酶之一,可通过依赖 Ras 的方式发挥信号转导调节作用^[7]。一旦该通路发生过度激活,可引起的细胞增殖加速与细胞生存期延长,导致肿瘤的发生发展。控制细胞增殖关键在于细胞能否通过 G1/S 期,进入 S 期。而调控细胞 G1/S 期转换的主要分子是细胞周期素依赖性 Raf 激酶。因此,Raf 激酶的过度表达与肿瘤发生有关,抑制 Raf 激酶活性能够抑制肿瘤细胞增殖^[8]。

本研究显示干预组 HepG2 细胞凋亡比率、较非干预组为高 (*P* < 0.05), HepG2 细胞 Raf 激酶的表达率干预组较非干预组为低 (*P* < 0.05),且 2 组随着时间延长(1、3、5、7 d)表达逐步降低。因此说明 HepG2 细胞的增殖、分化和凋亡是一系列协调的反应过程,在这些反应中生长因子起重要的调控作用,生长因子通过其相应的膜受体触发了一系列的信号转导过程,从而发挥其功能^[9]。在这一信号转导过程中 Raf 激酶起着关键作用,本研究证实索拉非尼对 Raf 激酶活性有较强抑制剂的作用从而抑制 HepG2 细胞生长,促进其凋亡,以便提高肝癌治疗效果并改善预后。索拉非尼是一种新型的口服多靶点抗肿瘤药,通过抑制肿瘤细胞 Raf 激酶活性,而起到双重抗肿瘤的作用。故索拉非尼治疗肝癌成为一种趋势,以有效减少肿瘤复发、转移,提高肝癌的治疗效果^[10]。

参考文献

- 1 韦伟,郭荣平,李锦清,等. 不同序贯的西妥昔单抗与化学治疗药物联合对 HepG2 和 Bel-7402 细胞的增殖抑制作用. 中山大学学报(医学科学版),2008,29:556-561.
- 2 Wright PK. Targeting vesicle trafficking: an important approach to cancer chemotherapy. Recent Pat Anticancer Drug Discov,2008,3:137-147.
- 3 顾艳宏,束永前,黄普文,等. 吉西他滨联合厄洛替尼治疗晚期胰腺癌的观察. 临床肿瘤杂志,2006,11:515-517.
- 4 Toh Y, Pencil SD, Nicolson GL. Analysis of the complete sequence of the novel candidate metastasis-associated gene, total, differentially expressed in mammary adenocarcinoma and breast cancer cell lines. Gene,1995,159:97-104.
- 5 董天峰,李晓丹,倪虹. AFP 基因 siRNA 表达质粒稳定转染肝癌细胞克隆的构建. 南开大学学报,2006,39:58-62.
- 6 杨建辉,张建国,李国华. 反义核苷酸在恶性肿瘤研究中的现状和展望. 肿瘤防治研究,2004,31:182-184.
- 7 张红梅,张利旺,任军,等. 树突状细胞-肝癌细胞株 HepG2 融合细胞来源的 exosome 抗肝癌效应的实验研究. 现代肿瘤医学,2006,11:5-8.
- 8 焦宇,陆涛. 抗肿瘤药物 Raf 激酶抑制剂的研究进展. 海峡药学,2007,19:1-5.
- 9 管忠震. 肝细胞癌的靶向治疗-索拉非尼治疗肝细胞癌明显延长存活期. 中国处方药,2007,8:52.
- 10 彭扬,陆涛. Raf 激酶抑制剂研究进展. 中南药学,2008,6:219-222.

(收稿日期:2011-09-12)