

原卟啉钠体外对人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞的抑制作用

许金鹏^{1*}, 张慧慧², 李朝品³, 黄开泉¹, 赵金红³, 姜玉新³

(1. 安徽中医学院第一附属医院检验中心, 合肥 230031; 2. 凤台县计划生育服务中心, 安徽 淮南 232101; 3. 皖南医学院, 安徽 芜湖 241002)

[摘要] 目的: 研究原卟啉钠(NAPP)体外对人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞的抑制作用。方法: 通过对人正常肝细胞株 QSG-7701 细胞的药物毒性实验筛选出 NAPP 对人正常肝细胞无明显毒性的最大无毒浓度(TC₀)。以 TC₀ 为起始浓度, 10 倍梯度稀释成 5 个不同的 NAPP 浓度, 作用于体外培养的人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞, 通过 MTT 比色法测定 NAPP 对 SMMC-7721 细胞的增殖抑制作用; 经倒置光学显微镜和 Hoechst33258 染色倒置荧光显微镜进行形态学观察, 计数凋亡细胞, 并计算凋亡指数(AI); 采用 Annexin V-FITC/PI 双标流式凋亡检测试剂盒经流式细胞仪检测 SMMC-7721 细胞凋亡和坏死率。结果: 不同浓度 NAPP 作用后, SMMC-7721 细胞的增殖明显受到抑制, A 值明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且抑制率呈一定的浓度-时间依赖性; 光学显微镜下见细胞个数明显减少, 细胞密度明显变稀, 细胞形态发生了明显变化, 很多细胞间的连接消失, 细胞变圆、皱缩或见细胞外形变长呈长梭形; 荧光显微镜下细胞呈典型的凋亡形态学改变, AI 显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 经流式细胞仪检测, 可见 SMMC-7721 细胞凋亡和坏死率不同程度升高。结论: NAPP 在体外对人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞具有一定的抑制增殖、促进凋亡和坏死的作用。

[关键词] 原卟啉钠; 肝癌细胞; SMMC-7721 细胞; 细胞周期; 凋亡; 流式细胞术

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0173-06

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110721.1733.007 **[网络出版时间]** 2011-07-21 17:33

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110721.1733.007.html>

Inhibitory Effect of Protoporphyrin Disodium on Human Hepatoma Carcinoma Cell Strain of SMMC-7721 Cells *in Vitro*

XU Jin-peng^{1*}, ZHANG Hui-hui², LI Chao-pin³, HUANG Kai-quan¹, ZHAO Jin-hong³, JIANG Yu-xin³

(1. Laboratory Center, The First Affiliated Hospital, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China; 2. Family Planning Service Center of Fengtai County, Huainan 232101, China; 3. Wannan Medical College, Wuhu 241002, China)

[Abstract] **Objective:** To study the inhibitory effect of protoporphyrin disodium (NAPP) on human hepatoma carcinoma cell strain of SMMC-7721 cells *in vitro*. **Method:** The maximum atoxic concentration (TC₀) of NAPP was determined by drug toxicity test on normal human hepatocyte strain of QSG-7701 cells. TC₀ was used as the initial concentration, five different concentrations of NAPP were diluted by 10 times gradient dilution, and applied to treat the human hepatoma carcinoma cell strain of SMMC-7721 cells cultured *in vitro*. MTT assay was used for evaluating the proliferation inhibitory effect of NAPP. Morphological observation for SMMC-7721 cells was undertaken via the inverted optical microscope and inverted fluorescence microscope after Hoechst33258 staining. Apoptotic cells were counted and apoptosis index (AI) was calculated. Flow cytometry was applied to measure the apoptosis and necrosis rates of SMMC-7721 cells through Annexin V-FITC/PI double staining with apoptosis

[收稿日期] 20110313(009)

[基金项目] 安徽省教育厅省级重点项目(KJ2008A099)

[通讯作者] * 许金鹏, 硕士, 临床检验技师, 主要从事生物化学与临床生化检验研究, Tel: 0551-2838534, E-mail: cpli018@126.com

detection kit. **Result:** The proliferation of SMMC-7721 cells was inhibited dramatically after the treatment of different concentrations of NAPP, and the *A* values were decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The inhibition rate was depended on the concentration of NAPP and the treatment time to some extent. These were visible in the optical microscope that cell number reduced obviously, cell density was thinning markedly, the appearance of SMMC-7721 cells was changed evidently, significantly, many conjunctions between cells disappeared, and cells became round and corrugativus or cellular shape turned slender like Fusiform shape. The SMMC-7721 cell nucleus showed the typical changes of apoptosis morphology in fluorescence microscope, and AI increased remarkably ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Flow cytometry showed that apoptosis and necrosis rates of SMMC-7721 cells were raised to different level. **Conclusion:** NAPP can inhibit the proliferation of human hepatoma carcinoma cell strain of SMMC-7721 cells and promote its apoptosis and necrosis.

[**Key words**] protoporphyrin disodium; hepatoma carcinoma cell; SMMC-7721 cell; cell cycle; apoptosis; flow cytometry

原卟啉钠 (protoporphyrin disodium, NAPP) 是一种卟吩衍生物, 化学名称为 1,3,5,8-四甲基-2,4-二乙烯基卟吩-6,7-二丙酸钠, 由 4 个吡咯环经 4 个次甲基键连接而成的含共轭双键的大环化合物, 可由动物血液中的血红素经人工提取、加工而制得的水溶性钠盐。NAPP 是一种肝功能改善剂, 具有提高肝脏血流量和氧利用率, 促进细胞组织呼吸, 改善蛋白质和糖代谢等作用^[1]。原卟啉作为机体的一种活性物质, 广泛分布于体内, 在细胞基质中, 它是过氧化氢酶、细胞色素、过氧化物酶和其他多种呼吸酶的辅基, 是细胞呼吸、代谢必不可少的物质^[2], 而肿瘤组织细胞代谢增加, 因此 NAPP 等卟啉化合物可在肿瘤组织中特异性聚集。近年, 国内外学者利用卟啉化合物的这一性质, 将其作为光敏剂或声敏剂, 应用于肿瘤治疗的光动力学疗法或声动力学疗法中^[3-4]。NAPP 等卟啉衍生物在被激光或超声波激活后可协同产生强烈的抗肿瘤效应, 且对正常组织损伤很小, 作为肿瘤治疗的一类新药。此外, 亦有报道, NAPP 对肝癌、胃癌、食道癌、肺癌等有抑制癌性疼痛、预防转移、增加食欲的作用^[2]。日本有学者对 NAPP 自身的抗肿瘤活性进行了研究^[5]。但有关 NAPP 对肿瘤细胞的确切抑制效果等未见详细报道。本研究通过将 NAPP 作用于体外培养的人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞, 研究了其体外对 SMMC-7721 细胞的生长抑制及诱导凋亡作用的效果, 并对其量效关系进行了初步探讨。

1 材料

1.1 细胞株 人正常肝细胞株 QSG-7701 细胞、人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞 (均购自中国科学院上

海生命科学研究院细胞资源中心)。

1.2 试剂 RPMI 1640 培养液 (吉诺生物医药技术有限公司, 批号 09081602); 胎牛血清 (杭州四季青生物公司, 批号 090728); 噻唑蓝 (MTT) (批号 M5655), $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 碘化丙啶 (PI) 原液 (批号 P4864), Hoechst 33258 (批号 861405), 二甲基亚砷 (DMSO, 批号 D4540)、胰蛋白酶 (批号 T6424), 青霉素 (批号 P3032), 链霉素 (批号 S9137), $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ RNaseA 原液 (Boiled, 批号 R4642), Annexin V -FITC/PI 双标流式凋亡检测试剂盒 (批号 APOAF-20TST), 均购自 Sigma 公司; 原卟啉钠 (Sigma 公司, 纯度 $\geq 98.0\%$, 批号 258385), 使用时用 RPMI 1640 培养液溶解配制所需浓度, 过滤除菌即可。

1.3 仪器 IX71FL 型倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); 普通双目光学显微镜 (日本 Olympus 公司); TDL80-2B 型台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); MCO-15AC 型三洋 CO_2 培养箱 (日本三洋电子有限公司); SW-CJ-2A 型净化工作台 (吴江市新长城空调净化有限公司); ZD-9556 型摇床 (金坛市盛蓝仪器制造有限公司); BS224S 电子分析天平 (感量 0.0001 g , 赛多利斯科学仪器有限公司); Anthos lucy2 酶标仪 (奥地利 Anthos 公司); Eipcs XL 型流式细胞仪 (美国 Beckman-Coulter 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 将 QSG-7701 细胞和 SMMC-7721 细胞接入 25 cm^2 培养瓶, 培养于含 10% 胎牛血清和 $1 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素, $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素双抗的 RPMI 1640 完全培养液中, 置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 , 饱和湿度的培养箱中培养。每日用倒置显微镜观察细胞形

态及生长情况,2~3 d 换 1 次培养液。QSG-7701 细胞 4~5 d 传代 1 次,SMMC-7721 细胞约 3 d 传代 1 次,取处于对数生长期的细胞用于实验。

2.2 对人正常肝细胞株 QSG-7701 细胞的细胞毒性

QSG-7701 细胞传至第 5 代,用 0.25% 胰酶消化,收集处于对数生长期的细胞,并调整单细胞悬液的细胞密度为 4×10^4 个/mL,接种于 96 孔培养板,每孔 100 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度下培养 24 h,待细胞贴壁后,吸弃孔内 1640 培养液,加入含不同浓度 NAPP (1 000, 100, 10, 1.0, 0.1, 0.01, 0.001 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 1640 培养液,每孔 100 μL ,每个浓度 5 个复孔,同时设细胞对照(含 1640 培养液和 QSG-7701 细胞)和空白对照(仅加 1640 培养液,不含细胞)。NAPP 作用 48 h 后,每孔加 MTT ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 20 μL ,4 h 后吸弃各孔内液体,每孔加 DMSO 150 μL ,室温震荡 10 min,用酶标仪在 492 nm 波长处测定各孔吸光度 (A),并计算细胞存活率 (%) 和最大无毒浓度 (TC_0)。一般认为,在某一浓度药物作用下,若细胞存活率 > 95%,此药物浓度即为 TC_0 ,该浓度对培养细胞无明显毒性,为药物作用的安全浓度^[6]。以对人正常肝细胞无明显毒性的 TC_0 为起始浓度,将 NAPP 10 倍梯度稀释成 5 个浓度进行后续实验。

$$\text{细胞存活率} = \frac{A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白对照组}}}{A_{\text{细胞对照组}} - A_{\text{空白对照组}}} \times 100\%$$

2.3 对人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞的抑制作用

2.3.1 对 SMMC-7721 细胞增殖的影响

SMMC-7721 细胞传至第 5 代经胰酶消化,收集处于对数生长期的 SMMC-7721 细胞,调整单细胞悬液的细胞浓度为 4×10^4 个/mL,接种于 96 孔培养板,每孔 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度下培养 24 h,待细胞贴壁后,吸弃孔内完全培养液。根据 2.2 细胞毒性实验结果确定的对人正常肝细胞无明显毒性的 5 个 NAPP 浓度, (100, 10, 1.0, 0.1, 0.01 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 每孔 100 μL ,每个浓度 5 个复孔,同时设细胞对照(含 1640 培养液和 SMMC-7721 细胞)和空白对照(仅加 1640 培养液,不含细胞)。分别于 NAPP 作用 24, 48, 72 h 后,每孔加 MTT ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 20 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 4 h,吸去孔内液体,每孔加 DMSO 150 μL ,室温震荡 10 min,用酶标仪在 492 nm 波长处测定各孔吸光度 (A 值),分别计算不同时间相应浓度 NAPP 对 SMMC-7721 细胞的增殖抑制率和半数抑制浓度 (IC_{50})。 IC_{50} 是实验组存活细胞为对照组的 50% (即 SMMC-7721 细胞的增殖抑制率为 50%) 时所对

应的 NAPP 浓度。

$$\text{增殖抑制率} = \frac{A_{\text{细胞对照组}} - A_{\text{实验组}}}{A_{\text{细胞对照组}} - A_{\text{空白对照组}}} \times 100\%$$

2.3.2 对 SMMC-7721 细胞形态的影响 将干净无菌的盖玻片置 6 孔板内,每孔接种密度为 5×10^5 个/mL 的 SMMC-7721 细胞悬液 1 mL,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 条件下培养 6 h,待细胞贴壁后再加入 1640 培养液 2 mL,继续培养 24 h 至 SMMC-7721 细胞铺满盖玻片表面 80% 以上时,吸弃孔内培养液。根据 2.2 细胞毒性实验结果确定的对人正常肝细胞无明显毒性的 5 个 NAPP 浓度,加入含相应浓度 NAPP 的 1640 培养液,每孔 3 mL,同时设细胞对照组(加入不含 NAPP 的 1640 培养液)。NAPP 作用 48 h 后,吸尽孔内液体,加入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 70% 乙醇 2 mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜固定。去固定液,用 PBS 洗 3 遍,每次 3 min,风干。加入 Hoechst 33258 染色液 ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 2 mL,室温避光染色 30 min,PBS 洗 2 遍,避光风干,封片,倒置荧光显微镜下观察并拍照。在荧光显微镜下,正常细胞核呈弥散均匀的蓝色荧光,凋亡细胞核呈团块状或碎块状致密浓染的强荧光。每张细胞爬片在镜下随机观察 5 个视野,分别计数每个视野中的凋亡细胞和正常细胞,并计算凋亡指数 (apoptosis index, AI)。

$$\text{凋亡指数} = \frac{\text{凋亡细胞数}}{\text{凋亡细胞数} + \text{正常细胞数}} \times 100\%$$

2.3.3 对 SMMC-7721 细胞凋亡的影响 收集处于对数生长期的 SMMC-7721 细胞,调整单细胞悬液的细胞密度至 1×10^6 个/mL,接种 6 孔板,每孔 1 mL,每孔再加入 1640 培养液 2 mL,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 条件下培养 24 h,吸弃孔内培养液。NAPP 给药浓度、给药量与 2.3.2 相同,同时设细胞对照(加入不含 NAPP 的 1640 培养液),NAPP 作用 48 h 后,0.25% 胰酶消化,1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,收集 SMMC-7721 细胞,用 4 $^{\circ}\text{C}$ PBS 洗涤 2 次,采用 Annexin V-FITC/PI 双标流式凋亡检测试剂盒,参照说明书进行操作,用流式细胞仪检测 SMMC-7721 细胞凋亡和坏死情况。用 System II 软件进行分析,分辨并计算出正常细胞、早期凋亡细胞、晚期凋亡细胞和坏死细胞所占比率。

2.4 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 15.0 统计软件进行单因素方差分析,采用 LSD 进行组间均数的两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,用曲线回归分析计算 IC_{50} 。

3 结果

3.1 对人正常肝细胞株 QSG-7701 细胞的细胞毒性
由表 1 可以看出,当 NAPP 浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 及以下时,细胞存活率 $> 95\%$,由此确定 $\text{TC}_0 = 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,即 NAPP 在此浓度时对人正常肝细胞无明显毒性。

3.2 对人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞增殖的影响
由表 2 可以看出,各给药组的 A 值均明显降低,且随着 NAPP 浓度的增加和作用时间的延长,A 值下降更显著,与细胞对照组比较,差异有显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。根据不同作用时间和浓度所对应的细胞增殖抑制率可以看出,同一作用时间,随着 NAPP 浓度的增加,细胞增殖抑制率随之增加;同一浓度,随着 NAPP 作用时间的延长,细胞增殖抑制率亦增加。表明 NAPP 对人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞的增殖具有明显抑制作用,并显示出一定的剂量和时间依赖效应。经计算,NAPP 作用 SMMC-

表 1 原卞啉钠对人正常肝细胞株 QSG-7701 细胞的毒性作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	终质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A 值	细胞存活率/%
空白对照	-	$0.093 \pm 0.006^{2)}$	-
细胞对照	-	0.966 ± 0.065	100.00
原卞啉钠	1 000	$0.825 \pm 0.089^{2)}$	83.85
	100	0.924 ± 0.092	95.19
	10	0.935 ± 0.086	96.45
	1.0	0.947 ± 0.086	97.82
	0.1	0.954 ± 0.076	98.63
	0.01	0.961 ± 0.088	99.43
	0.001	0.964 ± 0.097	99.77

注:与细胞对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

7721 细胞 24,48,72 h 后的半数抑制浓度 IC_{50} 分别为 264,24,9 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 2 不同浓度原卞啉钠作用 24,48,72 h 后对 SMMC-7721 细胞增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	终质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h		48 h		72 h	
		A	抑制率/%	A	抑制率/%	A	抑制率/%
空白对照	-	$0.102 \pm 0.010^{2)}$	-	$0.102 \pm 0.009^{2)}$	-	$0.096 \pm 0.007^{2)}$	-
细胞对照	-	0.720 ± 0.088	0	1.146 ± 0.096	0	1.439 ± 0.153	0
原卞啉钠	0.01	0.668 ± 0.079	8.41	$1.031 \pm 0.062^{1)}$	11.02	$1.184 \pm 0.060^{2)}$	18.99
	0.1	$0.644 \pm 0.053^{1)}$	12.30	$0.947 \pm 0.052^{2)}$	19.06	$1.092 \pm 0.100^{2)}$	25.84
	1.0	$0.586 \pm 0.047^{2)}$	21.68	$0.785 \pm 0.063^{2)}$	34.58	$0.910 \pm 0.086^{2)}$	39.39
	10	$0.509 \pm 0.057^{2)}$	34.14	$0.649 \pm 0.052^{2)}$	47.61	$0.752 \pm 0.056^{2)}$	51.15
	100	$0.459 \pm 0.053^{2)}$	42.23	$0.575 \pm 0.051^{2)}$	54.69	$0.605 \pm 0.066^{2)}$	62.10

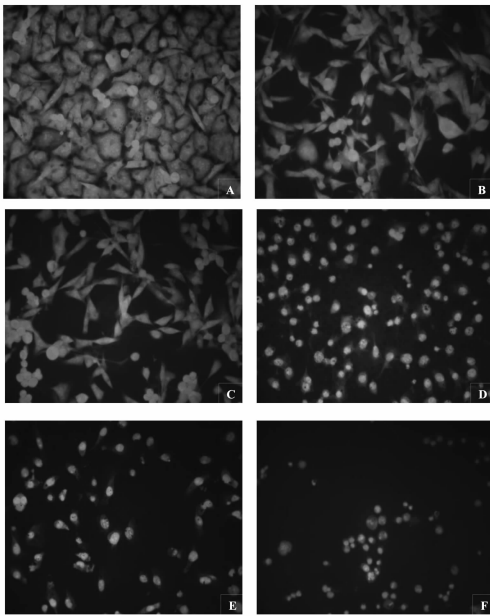
3.3 对人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞形态的影响

3.3.1 倒置光学显微镜下观察 镜下见体外培养的人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞呈贴壁生长,具有人肝癌细胞的典型形态特征。细胞对照组 SMMC-7721 细胞生长密集,分布均匀,排列紧密,细胞呈多边形或长梭形,少量呈圆形、卵圆形和不规则形,细胞形态完整,胞浆丰满,培养液中偶见漂浮的细胞。而经不同浓度 NAPP 作用 48 h 后,SMMC-7721 细胞生长受到明显抑制,细胞数量减少,细胞密度明显降低,体积变小,细胞由梭形皱缩、变圆,或变长呈长梭形,细胞间连接疏松,细胞间隙增大,排列疏松、凌乱。SMMC-7721 细胞肿胀,胞浆内颗粒增多,胞质溶解、胞核有固缩凝集现象,细胞周围细胞碎片增多,贴壁性变差、脱壁,培养液中有许多呈圆形的漂浮细胞。随着 NAPP 浓度的增高,抑制作用逐渐增

强,以 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时抑制作用最明显,部分细胞已裂解为碎片。提示,NAPP 能够明显抑制人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞生长和增殖。

3.3.2 Hoechst 33258 染色倒置荧光显微镜下观察

细胞对照组 SMMC-7721 细胞核着色均匀,边界规则整齐,发出均匀弥散的蓝色荧光,无明显的浓染团块和亮蓝色凋亡小体;经不同浓度 NAPP 作用 48 h 后,各组 SMMC-7721 细胞形态学变化较大,均出现不同程度的凋亡形态学改变,表现为细胞体积缩小,胞浆减少,核固缩,细胞核染色质浓缩成块,发出致密浓染的亮蓝色荧光,有的碎裂成大小不等的团块呈条状、新月形、帽状和碎片状,晚期凋亡细胞核染色质高度凝集、边缘化,胞膜破裂,核裂解成碎块,出现亮蓝色凋亡小体,随着 NAPP 浓度增高,凋亡细胞也随之增多,以 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组最多。见图 1。



A. 细胞对照组;B. 0.01 mg·L⁻¹原卟啉钠组;
C. 0.1 mg·L⁻¹原卟啉钠组;D. 1.0 mg·L⁻¹原卟啉
钠组;E. 10 mg·L⁻¹原卟啉钠组;F. 100 mg·L⁻¹原卟啉钠组

图1 不同浓度原卟啉钠作用 SMMC-7721 细胞
48 h 后细胞的形态(×200)

通过对凋亡细胞的计数,计算出不同浓度 NAPP 作用 48 h 后 AI 为 4.62% ~ 34.07%,且随着 NAPP 浓度增加,AI 随之升高,呈一定的剂量依赖效应(表 3)。

表 3 不同浓度原卟啉钠作用 48 h 后对 SMMC-7721 AI 的影响

组别	终质量浓度 /mg·L ⁻¹	AI/%
细胞对照	0	2.81 ± 0.64
原卟啉钠	0.01	4.62 ± 0.52
	0.1	7.14 ± 1.09 ¹⁾
	1.0	15.48 ± 1.90 ²⁾
	10	25.61 ± 3.93 ²⁾
	100	34.07 ± 5.16 ²⁾

3.4 对人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞凋亡和坏死的影响 由表 4 可以看出,与细胞对照组比较,不同浓度 NAPP 作用 48 h 后,各给药组凋亡和坏死细胞明显增多,呈现一定剂量依赖性,以 100 mg·L⁻¹组凋亡和坏死率最高,达 52.70%。表明 NAPP 在体外能够明显促进 SMMC-7721 细胞凋亡和坏死。

表 4 不同浓度原卟啉钠作用 48 h 后对 SMMC-7721 细胞凋亡和坏死率的影响

组别	终质量浓度/mg·L ⁻¹	早期凋亡率/%	晚期凋亡率/%	坏死率/%	凋亡和坏死率/%
细胞对照	0	0.56	0.43	3.87	4.86
原卟啉钠	0.01	11.20	1.39	2.80	15.39
	0.1	0.34	0.92	27.00	28.26
	1.0	5.20	9.36	28.30	42.86
	10	10.30	8.57	31.90	50.77
	100	11.70	11.00	30.00	52.70

4 讨论

肿瘤的发生发展与细胞凋亡密切相关,探讨能有效诱导肿瘤细胞凋亡的药物已成为肿瘤治疗的关键^[7-8]。另一方面,卟啉衍生物作为光敏剂或声敏剂,用于肿瘤治疗的光动力学疗法(PDT)和声动力学疗法(SDT)^[3-4]的研究报道很多,但 NAPP 等卟啉衍生物本身对肿瘤细胞的抑制作用尚未见报道。因此,本研究采用体外培养的人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞进行实验,以 NAPP 进行直接干预,来探讨 NAPP 在体外对 SMMC-7721 细胞的生长抑制及诱导凋亡作用。

本研究首先采用 MTT 法进行细胞毒性实验,发现 NAPP 对人正常肝细胞毒性很小,当 NAPP 浓度

为 100 mg·L⁻¹及以下时,人正常肝细胞株 QSG-7701 细胞存活率均 > 95%。又根据 NAPP 对 QSG-7701 细胞的最大无毒浓度(TC₀)梯度稀释的 5 个浓度作用于人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞,通过 MTT 实验,测得各给药组 A 值较细胞对照组显著降低(P < 0.05 或 P < 0.01),间接反映出各给药组的活细胞数较细胞对照组明显减少,且随着 NAPP 浓度的增加和作用时间的延长,A 值降低越明显,呈一定的剂量和时间依赖效应。

根据抗肿瘤药物疗效的评价标准之一,即体外抑瘤试验中,合成化合物的半数抑制浓度 IC₅₀ < 10 mg·L⁻¹,并且有细胞毒性的剂量依赖关系,其最高抑制效应达 80% 以上,可判定样品在体外对细胞有

杀伤作用^[9]。本研究中, NAPP 作用于体外培养的人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞 72 h 后的 IC₅₀ 为 9 mg·L⁻¹, 最高抑制率超过 60%, 由此可以判定 NAPP 在体外对 SMMC-7721 人肝癌细胞具有一定的杀伤作用。

通过显微镜观察, 我们发现给药组 SMMC-7721 细胞的形态发生了明显变化, 很多细胞间的连接消失, 细胞皱缩、变圆, 甚至脱落, 胞体肿胀变形; 经 Hoechst 33258 染色, 荧光显微镜观察发现, SMMC-7721 细胞出现不同程度的凋亡形态学改变, 细胞体积缩小, 胞浆减少, 核固缩, 核染色质浓缩成块发出致密浓染的亮蓝色荧光, 有的核裂解成碎片, 出现亮蓝色荧光的凋亡小体; 通过计数凋亡细胞, 得出不同浓度 NAPP 作用后 AI 明显升高。

碘化丙啶(PI)是一种不能透过完整细胞膜的核酸染料, 因而 PI 无法进入早期凋亡的细胞内, 只有在细胞膜完整性被破坏的凋亡中晚期和坏死细胞, PI 才能进入其细胞内使细胞核红染。而 Annexin V 是一种 Ca²⁺ 依赖性的膜磷脂结合蛋白, 能特异性地与早期凋亡过程中翻转到细胞膜外的带负电的磷脂(如磷脂酰丝氨酸等)高亲和力结合, 并用 FITC 标记 Annexin V 作为荧光探针, 利用流式细胞仪即可检测早期凋亡细胞^[10]。因此, 将 Annexin V 与 PI 匹配, 就可以将正常细胞、早期凋亡、晚期凋亡及坏死细胞区分开来。本研究经流式细胞仪检测发现不同浓度 NAPP 组凋亡和坏死率较细胞对照组明显升高, 且呈现一定剂量依赖性, 以 100 mg·L⁻¹ 组最高。

综上所述, 可见 NAPP 在体外对人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞具有一定的抑制增殖、促进凋亡和坏死的作用, 表现出一定的抗肿瘤活性, 但其诱导 SMMC-7721 细胞凋亡和坏死的分子机制还需要在

今后的工作中进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 樊德厚, 王永利. 中国药物大全·西药卷[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 453.
- [2] 杨宗炎. 原卟啉钠片临床应用会在沪举行[J]. 中国新药与临床杂志, 1987(5): 311.
- [3] Liu Q, Wang X, Wang P, et al. Sonodynamic antitumor effect of protoporphyrin IX disodium salt on S180 solid tumor[J]. Chemotherapy, 2007, 53 (6): 429.
- [4] Liu Q, Wang X, Wang P, et al. Sonodynamic effects of protoporphyrin IX disodium salt on isolated sarcoma 180 cells[J]. Ultrasonics, 2006, 45 (1/4): 56.
- [5] 汪建生. 治疗肝炎药物 - 原卟啉钠[J]. 临床医学, 1988, 8(3): 383.
- [6] 夏伟良, 谢海洋, 沈岩, 等. 环孢素和他克莫司在体外对乙型肝炎病毒复制影响的对比研究[J]. 中华医学杂志, 2006, 86 (2): 111.
- [7] Ishiwata N, Jinn Y, Tsukada Y, et al. Relationship between apoptosis and immunohistochemical staining for proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in non-small cell lung cancer [J]. Anticancer Res, 2000, 20 (3A): 1445.
- [8] 于志坚. 我国肝癌早诊早治研究现状[J]. 南通大学学报: 医学版, 2008, 28 (2): 79, 84.
- [9] 司徒镇强, 吴正军. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版西安公司, 1996: 135.
- [10] Vemes J, Haanen C, Steffens N, et al. A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled AnnexinV [J]. J Immunol Methods, 1995, 184 (1): 39.

[责任编辑 聂淑琴]