

亲细胞非均质分子脂质对人脑胶质瘤细胞系的抑制作用

陈衍城, 顾宇翔, 王宇倩

(复旦大学附属华山医院神经外科, 上海 200040)

[摘要] 目的: 研究不同浓度亲细胞非均质分子脂质(CHML)对人脑胶质瘤细胞的抑制作用。方法: 将指数生长长期的SHG-44胶质瘤细胞分6组, 在1~5组分别加入浓度为500、200、100、50、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的CHML-6.0和CHML-6.1复合液, 第6组加培养液作对照。于24、48、72小时进行MTT检测, 测定A值。结果: 各药物组与对照组的A值之间差别均有极显著的意义, 其中两两比较检验表明500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组的A值与其他组比较差异有显著性。结论: CHML对人脑胶质瘤细胞有显著抑制作用, 并有一定剂量-效应关系, 尤其是500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的药物组作用更为突出。

[关键词] 人脑胶质瘤细胞; MTT法; 亲细胞非均质分子脂质

中图分类号: R730.269 文献标识码: A 文章编号: 1007-3639(2002)01-0057-02

Influence of cytotropic heterogenous molecular lipids(CHML) in human gliocytoma cell line CHEN Xian-cheng, GU Yu-xiang, WANG Yu-qian. (Department of Neurosurgery, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

[Abstract] **Purpose:** To study the influence of cytotropic heterogenous molecular lipids (CHML) at different concentrations in human gliocytoma. **Methods:** The A values of SHG-44 gliocytoma which were divided into 6 groups were measured by MTT test at 24, 48, 72 hours. CHML of different concentrations were methylated in the 1st-5th groups and inoculum was methylated in the 6th group. **Results:** The A values of the 1st-5th groups were low compared with the 6th group. A significant difference was found in the groups in which the CHML concentration were 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. **Conclusions:** These data indicate that CHML influenced gliocytoma significantly and there is correlation between dose and effect. The effect of CHML concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and of 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ are prominent especially.

[Key words] gliocytoma; MTT test; cytotropic heterogenous molecular lipids

亲细胞非均质分子脂质(CHML)是脂质类抗癌新药。CHML是针对增殖的癌细胞比正常细胞需要更多脂质维持其生长的特性设计的。这种具有超强生物活性的药物分子只相当于细胞体积的十万分之一,对癌细胞有亲和性,能够选择性进入癌细胞,促使胞质内细胞器的分解和细胞膜的破坏,加速癌细胞的凋亡。现国家药品监督管理局批准作为西药第三类药品进入临床研究(批件1999-L0075),本实验应用MTT(四氮甲基唑蓝)法检测CHML对体外人脑胶质瘤的杀灭效果,以研究CHML治疗人脑胶质瘤的可行性。

材料和方法

一 靶细胞 采用苏州医学院提供的人脑恶性胶质瘤体外细胞系SHG-44,其材料来源于女性32岁的患者,额叶星形胶质瘤II~III级,培养于37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 贺利氏BB₁₆气体培养箱的含20%小牛血清RPMI1640(GIBCO)培养液中。

二 药物 CHML由美国高立食品药品有限公司提供,两种型号分别为CHML-6.0和CHML-6.1(LOT 97090777)。该两种型号需配制成复合液同时使用,以加强药效和减少抗药性,用5%葡萄糖生理盐水配制成CHML-6.0浓度为5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和CHML-6.1浓度为2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的复合母液。因复合液中CHML-6.0和CHML-6.1的浓度比恒定,所以实验中所采用的复合液的浓度以CHML-6.0的浓度来表示。

三 主要试剂 四氟甲基唑蓝(MTT, Sigma),用 pH 7.2 的 PBS 液配成 5 g/L 溶液,过滤除菌,4 °C 避光保存。甲脂溶解液为含 0.01 mol/L 盐酸的 10 % SDS(Serva)。

四 实验方法 将指数生长期的 SHG-44 胶质瘤细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化洗涤后,再用含血清的培养液将其配制成 $10^5/\text{ml}$ 的细胞悬液,按每孔 $100 \mu\text{l}$ 接种于 96 孔培养板中,共计 18 孔。接种 24 小时细胞贴壁后,将 18 孔分成 6 组,每组 3 个孔。第 1~5 组为药物组,每孔分别加入 CHML-6.0 和 SHML-6.1 的复合液及相应量的培养液,共 $100 \mu\text{l}$,以使 1~5 组的 CHML-6.0 浓度分别为 500、200、100、50、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$,第 6 组加入培养液 $100 \mu\text{l}$ 作为对照组。培养 24 小时后弃去上清液,每孔中加入 $20 \mu\text{l}$ 的 MTT,再培养 4 小时各加入 $100 \mu\text{l}$ 甲脂溶解液。在 37°C 恒温下震荡 5 分钟,待结晶充分溶解后置于 BIO-RAD 318MC 型酶标仪上,测定各孔在 570nm 波长处吸光度 A 值。按同法另制成 2 块培养板分别加入不同浓度 CHML 液后培养 48、72 小时再加入 MTT 反应 4 小时,测定 A 值,检测不同浓度药物在不同时间对 SHG-44 人脑胶质瘤细胞的作用。

五 统计处理 采用随机区组的方差分析,再进一步对各组作两两比较(Student-Newman-Keuls 法)(SAS 软件包)。

结 果

一 CHML 对人脑胶质细胞的抑制作用 由图 1 中不同浓度药物组在不同时间的 3 孔 A 值的平均值可见,24 小时、48 小时、72 小时各药物组与对照组的 A 值之间差别均有极显著的意义($P < 0.01$),说明 CHML 对人脑胶质瘤细胞的生长具有显著的抑制作用。

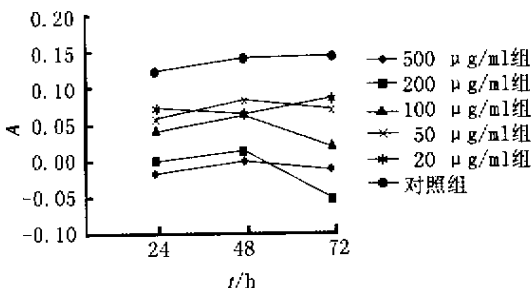


图 1 不同时间不同浓度 CHML 的 A 平均值

二 CHML 对人脑胶质瘤细胞生长抑制作用的剂量-效果关系 由图 1 还可见,随着药物浓度的增高, A 值逐渐降低($F = 31.47, P < 0.01$),两两比

较检验表明 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组的 A 值与其他组间有显著性差异($P < 0.05$),说明肿瘤细胞生长抑制率随着药物浓度的增高而提高,但 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组与 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组之间差异不显著,100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组间差别亦无显著性($P > 0.05$)。此外,同一浓度的不同用药时间的 A 值相互之间差异无显著性($F = 1.93, P > 0.05$)。

讨 论

神经胶质瘤起源于神经外胚层,约占成人颅内原发肿瘤的 30%~50%,手术切除肿瘤是目前临床上减少颅内肿瘤细胞的最迅速、最有效的方法,尤其是显微手术的发展,使肿瘤得到了最大限度的切除。术后放疗和化疗是胶质瘤重要的辅助治疗,但由于受到血脑屏障的影响,大多数大分子、水溶性及带电荷的化疗药物在脑内难以达到或维持长时间的有效浓度,传统的治疗方法仍不能从根本上改变这一难治性肿瘤的自然转归,恶性胶质瘤的复发很难避免,而一旦复发在数周至数月内患者的病死率可达 100%。因此,胶质瘤的生存率及中位生存期等预后指标近 20 年来几乎没有改善^[1,2]。

随着分子生物学和分子遗传学及免疫学研究的不断发展,对神经胶质瘤的病因及治疗的研究达到了一个新的水平,生物治疗正日益受到重视。在脂质领域的研究尤其是脂质的抗癌研究,目前尚无重大突破。CHML 是针对增殖的癌细胞比正常细胞需要更多脂质维持其生长特性设计的。CHML 可选择性激活肿瘤细胞的 p53 通道,并由此促使肿瘤细胞(乳腺癌 MCF-7,结肠癌 RKO,白血病 ML-1)的凋亡。同时 CHML 也可不经过 p53 通道促使肺癌细胞 H1299 凋亡。由于肿瘤细胞对 CHML 的敏感性远胜于非肿瘤细胞,因此 CHML 较其他临床应用的抗肿瘤药物副作用要小得多。虽然这种超敏感性和抗癌性的确切机制并不十分明确,但它已表现出对乳腺癌、皮肤癌、直肠癌、肺癌的细胞系有良好的抗癌效果^[3]。

目前,国内外尚无 CHML 对人脑胶质瘤细胞作用的任何研究。由于考虑到 CHML 本身为非均质分子脂质,符合高脂溶性、相对分子质量(M_r)小、非离子化、作用时间短、能通过血脑屏障、对正常脑组织毒性小的抗胶质瘤药物的理想要求。

(下转第 64 页)

浆免疫反应性 ET-1(γ ET-1)水平显著高于肝硬化患者,并与肿瘤大小呈正相关,Shankar 等^[1]测定 30 例肝癌患者血浆 ET-1 水平,均表现为升高,用免疫组化方法测定发现肿瘤组织内的肿瘤细胞、肌纤维及上皮细胞均聚集有高水平的 ET-1,提示肿瘤细胞可产生 ET-1。

本组 52 例胃癌患者血浆 ET-1 水平显著高于正常对照组,说明胃癌患者血浆 ET-1 水平与正常人之间有一定差异,胃癌患者血浆 ET-1 水平与临床分期有关,Ⅳ期胃癌血浆 ET-1 水平显著高于Ⅲ期和Ⅱ期,Ⅲ期明显高于Ⅱ期,说明血浆 ET-1 水平与胃癌的发展程度相关;不同病理类型胃癌患者之间血浆 ET-1 水平差异无显著性,提示胃癌患者血浆 ET-1 水平可能与病理类型无关;本研究结果表明化疗后有效者血浆 ET-1 水平下降,其降低的水平与胃癌化疗的近期疗效呈正相关,因此血浆 ET-1 水平测定可作为判断胃癌的化疗效果及预后的良好指标。

[参 考 文 献]

- [1] Yanagisawa M, Kuriyama H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells[J]. *Nature* ,1998 **332**(6163) :411-415.
- [2] Asham EH, Loizidou M, Taylor I, et al. Endothelin-1 and tumor development[J]. *Eur J Surg Oncol* ,1998 **24**(1) :57-60.

- [3] Shehri M, Hirata Y, Nakjima T, et al. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine growth factor for human cancer lines[J]. *J Clin Invest* ,1991 **87**(3) :1867-1871.
- [4] Kusuha M, Yamaguchi K, Nagasaki K, et al. Production of endothelin in human cancer cell lines[J]. *Cancer Res* ,1990 **50**(11) :3257-3261.
- [5] Gaid A, Harnid QA, Springall DR, et al. Detection of endothelin-immunoreactivity and mRNA in pulmonary tumor[J]. *J Pathol* ,1990 **162**(1) :15-22.
- [6] Yokokawa K, Hirata Y, Schichiri M, et al. Endothelin-producing tumor[J]. *Nippon Rinsho* ,1992 **50**(Suppl) :715-717.
- [7] Kojima K, Nihei Z. Expression of endothelin-1 immunoreactivity in breast cancer[J]. *Surg Oncol* ,1995 **4**(6) :309-315.
- [8] Nakagawa K, Nishino K, Takane K, et al. Measurement of immunoreactive endothelin-1 in plasma of a patient with malignant hemangioendothelioma[J]. *Nippon Hifukai Gakkai Zasshi* ,1990 **100**(14) :1453-1456.
- [9] Ishibashi M, Fujita M, Nagai K, et al. Production and secretion of endothelin by hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Endocrinol Metab* ,1993 **76**(2) :378-383.
- [10] Nakamura M, Ohashi M, Tabata S, et al. High plasma concentrations of endothelin-like immunoreactivities in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Am J Gastroenterol* ,1993 **88**(2) :248-252.
- [11] Shankar A, Loizidou M, Aliev G, et al. Raised endothelin-1 levels in patients with colorectal liver metastases[J]. *Br J Surg* ,1998 **85**(4) :502-506.

(收稿日期 2001-01-31 修回日期 2001-07-28)

(上接第 58 页)

MTT 法技术上较成熟、对化疗药物敏感性预测的准确率高,已成为在科研和临床上广泛应用的肿瘤化疗药敏试验方法^[46]。本实验以 MTT 法检测体外培养的 SHG-44 人脑胶质瘤细胞对 CHML 的敏感性,结果表明 CHML 对体外人脑胶质瘤细胞有显著抑制作用,并有一定剂量-效应关系,尤其是 500 μ g/ml 和 200 μ g/ml 的药物组作用更为突出。因为 500 μ g/ml 与 200 μ g/ml 组间差异无显著性,我们认为可以选用 200 μ g/ml 的浓度药物应用于治疗人脑胶质瘤。药物作用 24、48、72 小时 A 值差异无显著性,说明药物可以成功的抑制肿瘤细胞增殖,这为进一步研究 CHML 对实验动物和临床患者胶质瘤治疗浓度的选择提供了初步的理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] Lesser GJ, Grossman S. The chemotherapy of high - grade astrocytomas[J]. *Semin Oncol* ,1994 **21**(2) :220-235.
- [2] Mak M, Fung L, Strasser JF, et al. Distribution of drugs following controlled delivery to the brain interstitium[J]. *J Neurooncol* ,1995 **26**(2) :91-102.
- [3] Zhan Q, Xu Z. CHML suppresses cell growth and induces apoptosis in multiple human tumor lines[J]. *Anticancer Res* ,1999 **19**(4B) :2893-2899.
- [4] Sargent JM, Taylor CG. Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukaemia[J]. *Br J Cancer* ,1989 **60**(2) :206-210.
- [5] Tonn JC, Schachenmayr W, Kraemer HP. *In vitro* chemosensitivity test of malignant gliomas: clinical relevance of test results independent of adjuvant chemotherapy[J]. *Anticancer Res* ,1994 **14**(3B) :1371-1375.
- [6] 刘宇军,王国民,贾永锋. MTT 法在榄香烯乳对人膀胱癌 T24 细胞体外实验中的应用. 上海医科大学学报,1997 **24**(2) :127-129.

(收稿日期 2001-04-19 修回日期 2001-10-04)