

吉西他滨的体内外抗肝癌作用研究

孙家跃^{1*}, 左靖¹, 金义光²(1.宿州市立医院药剂科, 安徽宿州 234000; 2.军事医学科学院放射与辐射医学研究所药物化学研究室, 北京 100850)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)28-3941-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.28.18

摘要 目的:研究吉西他滨的体内外抗肝癌作用。方法:取5、10、20、30、50、70、90 μmol/L的吉西他滨水溶液作用于人乳腺癌MCF-7细胞和人肝癌HepG2细胞,采用MTT法(450 nm)测定作用24、48、72 h后细胞的吸光度,计算细胞抑制率和半数抑制浓度(IC₅₀)。在小鼠右前腋皮下接种0.2 ml肝癌H22细胞株(2×10¹⁰个/L)建立荷瘤小鼠,将其随机分为对照组(生理盐水)与吉西他滨组(40 mg/kg),每组5只,每隔2 d尾iv药物1次,共给药3次,记录体质量变化和计算抑瘤率。结果:吉西他滨对MCF-7细胞和HepG2细胞均有抑制作用,其24 h的IC₅₀分别为30、>90 μmol/L;48、72 h的IC₅₀均<5 μmol/L。两组荷瘤小鼠的体质量差异无统计学意义,吉西他滨对小鼠H22瘤的抑制率为75.76%。结论:吉西他滨体内外均有较好的抗肝癌作用。

关键词 吉西他滨;肝癌;细胞;实体瘤;体内;体外

Study on Inhibitory Effects *in vivo* and *in vitro* of Gemcitabine on Liver Cancer

SUN Jia-yue¹, ZUO Jing¹, JIN Yi-guang² (1.Dept. of Pharmacy, Suzhou Municipal Hospital, Anhui Suzhou 234000, China; 2.Lab of Pharmaceutical Chemistry, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study inhibitory effects *in vivo* and *in vitro* of gemcitabine on liver cancer. METHODS: MCF-7 cells and HepG2 cells were treated with different concentrations of gemcitabine solutions (5, 10, 20, 30, 50, 70 and 90 μmol/L). The absorbance of cells was determined by MTT assay after treated for 24, 48 and 72 h. The inhibition ratio and 50% inhibiting concentration (IC₅₀) of cells were calculated. Tumor-bearing mice were established by inoculating 0.2 ml liver cancer H22 cell line via right anterior axillary, and then randomly divided into control group (normal saline) and gemcitabine group (40 mg/kg) with 5 mice in each group. They were given relevant medicine intravenously every 2 days, for 3 times. The changes of body weight and inhibition ratios were recorded. RESULTS: Gemcitabine can inhibit MCF-7 cells and HepG2 cells, and IC₅₀ of gemcitabine to them were 30 and >90 μmol/L within 24 h respectively, and those of gemcitabine to them were all lower than 5 μmol/L after 48 h and 72 h. There was no statistical significance in body weight of tumor-bearing mice between 2 groups, and inhibitory rate of gemcitabine to H22 cell line was 75.76%. CONCLUSIONS: Gemcitabine can inhibit liver cancer *in vivo* and *in vitro*.

KEYWORDS Gemcitabine; Liver cancer; Cell; Solid tumor; *in vivo*; *in vitro*

endothelial phenotype[J]. *Pharmacol Rep*, 2008, 60(1): 21.

[8] Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling[J]. *Cell Signal*, 2012, 24(5):981.

[9] Morawietz H. LOX-1 receptor as a novel target in endothelial dysfunction and atherosclerosis[J]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2010, 135(7):308.

[10] Mehta JL, Chen J, Hermonat PL, et al. Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and relat-

ed disorders[J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 69(1):36.

[11] Mehta JL, Sanada N, Hu CP, et al. Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet[J]. *Circ Res*, 2007, 100(11):1 634.

[12] Chen XP, Xun KL, Wu Q, et al. Oxidized low density lipoprotein receptor-1 mediates oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of reactive oxygen species[J]. *Vascul Pharmacol*, 2007, 47(1):1.

[13] Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, et al. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NADPH oxidase [J]. *Circulation*, 2004, 109(2):227.

* 副主任药师。研究方向:抗肿瘤药物。电话:0557-3022635。
E-mail:sjy660579@163.com

(收稿日期:2014-12-12 修回日期:2015-03-12)

(编辑:张静)

肝脏是人体内最大的器官,在消化、储存能量及生物转化解毒等方面扮演重要的角色。肝癌分为原发性肝癌和转移性肝癌。我国的肝癌多属于原发性肝癌,病死率高,在恶性肿瘤死亡中位居第3位,仅次于胃癌、食管癌。原发性肝癌的治疗主要包括手术治疗、化疗、放疗及各种方式综合治疗等^[1],以手术切除疗法为主、同时运用各种手段进行综合治疗是目前肝癌治疗的主要方案^[2-3]。但20世纪90年代至今,肝癌患者相对5年生存率一直在10%以下,主要是因为肝癌的高复发率和有效治疗药物的缺乏^[4],因此有效、相对安全的化疗药物的选择一直是研究热点。

吉西他滨是核苷类抗癌药,具有高缓解率、可延长生存期和低副反应等优势,能明显提高患者的生活质量,有效延长患者的生命,且在门诊使用符合药物经济学原则。临床上常应用于非小细胞肺癌、胰腺癌、乳腺癌等癌症^[5-7],也有一些报道吉西他滨联合其他抗肿瘤药物治疗肝癌^[8-9]。本文将进一步研究吉西他滨对肝癌细胞的体内外抑制作用,为吉西他滨对肝癌的临床治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

BS110S型电子天平(德国Sartorius公司);Heal Force®力康纯水仪(上海康雷分析仪器有限公司);GL-88B型涡旋混合器(江苏海门麒麟医用仪器厂);TGL-16B型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

吉西他滨原料药(北京凯莱森医药科技有限公司,批号:20110203,纯度:99.6%);DMEM培养基、二甲亚砜(DMSO,分析纯)均购自国药集团化学试剂有限公司;MTT试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.3 细胞株

人乳腺癌MCF-7细胞株购自北京化工大学细胞库;人肝癌HepG2细胞株购自北京师范大学细胞库;小鼠肝癌H22细胞株由军事医学科学院放射与辐射医学研究所提供。

1.4 动物

SPF级昆明小鼠,♂,体质量25~30 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号:SCXK(京)2012-0001。该动物实验通过军事医学科学院动物伦理委员会同意。

2 方法

2.1 吉西他滨对HepG2和MCF-7细胞的抑制作用

将HepG2和MCF-7细胞分别用DMEM培养液稀释至 1×10^4 个/ml,接种于两块96孔板中,200 μ l/孔。于5% CO₂和37 $^{\circ}$ C饱和湿度培养箱中培养24 h后,加不同浓度的吉西他滨使其终浓度分别为5、10、20、30、50、70、90 μ mol/L。分别作用24、48、72 h后,除去培养液,每孔加20 μ l MTT,4 h后加150 μ l DMSO溶解。于酶标仪450 nm波长处测定各孔的光密度(OD),计算细胞抑制率,抑制率(%)=[(不加药孔OD值-加药孔OD值)/加药孔OD值] $\times 100\%$ ^[10]。采用SPSS软件Probit回归分析计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

2.2 吉西他滨对小鼠肝肿瘤的抑制作用

将H22细胞株复苏稀释后于无菌条件下接种在小鼠腹腔内增殖7 d,从瘤株生长较好的小鼠腹腔抽取H22细胞液,生理

盐水稀释至 2×10^{10} 个/L,取0.2 ml皮下接种于小鼠右前腋下,10 d后,手触有硬块即为瘤接种成功。挑取10只荷瘤大小均匀的小鼠随机分为对照组(生理盐水)与吉西他滨组(40 mg/kg),每组5只,每隔2 d尾iv药物1次,共给药3次^[11]。观察小鼠毛发和精神状态,记录每天体质量变化。末次给药后第2天处死小鼠,摘取实体瘤,称瘤湿质量,计算吉西他滨的抑瘤率。抑瘤率(%)=(对照组平均瘤湿质量-吉西他滨组平均瘤湿质量)/对照组平均瘤湿质量 $\times 100\%$ 。

2.3 统计学方法

实验数据采用SPSS 16.0统计软件进行One-way ANOVA分析,检验标准 $\alpha=0.05$,比较各组间差异。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 吉西他滨对MCF-7和HepG2细胞的抑制作用

作用24 h时,吉西他滨对MCF-7的IC₅₀为30 μ mol/L,对HepG2的IC₅₀>90 μ mol/L;而作用48、72 h时,吉西他滨对MCF-7和HepG2的IC₅₀均<5 μ mol/L。吉西他滨作用24 h时对MCF-7细胞的抑制率均大于对HepG2细胞的抑制率,差异有统计学意义($P<0.05$)。吉西他滨对MCF-7细胞和HepG2细胞的抑制作用见图1。

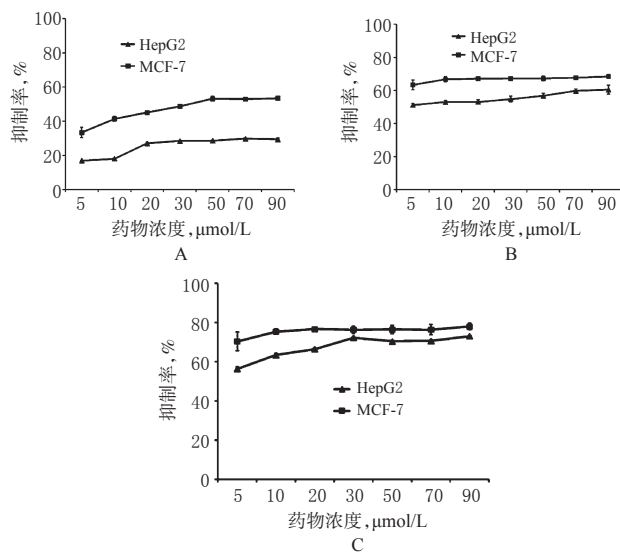


图1 吉西他滨对MCF-7细胞和HepG2细胞的抑制作用

A. 24 h; B. 48 h; C. 72 h

Fig 1 Inhibitory effect of gemcitabine on MCF-7 cells and HepG2 cells

A. 24 h; B. 48 h; C. 72 h

3.2 吉西他滨对荷瘤小鼠精神状态和体质量的影响

实验过程中,对照组荷瘤小鼠逐日消瘦,运动量减少,精神不振,毛发暗沉;而吉西他滨组荷瘤小鼠食欲正常,毛发有光泽,较活跃。对照组荷瘤小鼠瘤质量的增加消除了消瘦带来的体质量减少,导致其与吉西他滨组荷瘤小鼠的体质量差异无统计学意义,因此小鼠体质量对实验结果无影响。两组荷瘤小鼠的体质量测定结果见图2。

3.3 吉西他滨对荷瘤小鼠的抗肿瘤作用

对照组荷瘤小鼠的实体瘤湿质量分别为4.4、3.3、4.3、4.5、5.3 g,平均质量为(4.36 \pm 0.64) g;吉西他滨组荷瘤小鼠的实体

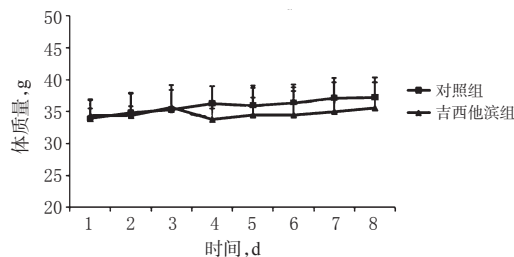


图2 两组荷瘤小鼠的体重测定结果

Fig 2 Body weight of tumor-bearing mice in 2 groups

瘤湿质量分别为 1.9、0.9、0.9、1.1、0.8 g, 平均质量为 (1.12 ± 0.41) g, 吉西他滨对荷瘤小鼠的抑制率为 75.76%。

4 讨论

吉西他滨是一线抗肿瘤药物,对癌细胞有较强的杀灭作用。但目前其临床应用大多局限于对其特殊敏感的癌细胞,如乳腺癌、胰腺癌、非小细胞肺癌等,在肝癌的治疗上却应用较少。本研究结果显示, $\geq 30 \mu\text{mol/L}$ 的吉西他滨体外作用 72 h, 对人肝癌细胞的抑制作用与其对人乳腺癌细胞的抑制作用相当; 动物实验也初步表明, 吉西他滨对小鼠 H22 实体瘤有较好的抑制作用。笔者认为临床上未将吉西他滨作为肝癌治疗首选药的主要原因可能是吉西他滨的肝组织分布不够高, 在肝周围不易达到较高的治疗浓度, 且较低的肝靶向性易引起较严重的副作用。笔者建议将吉西他滨与靶向材料相结合制成靶向肝组织的抗肿瘤药物, 应会有较广阔的临床应用前景。

参考文献

[1] 李哲夫, 李杨, 陈孝平. 原发性肝癌的诊治进展及展望[J]. 临床普外科电子杂志, 2013, 1(2): 11.
 [2] 李宗芳, 王志东. 中晚期肝癌的综合治疗现状[J]. 西部医

学, 2013, 25(10): 1 441.

[3] Maggs JRL, Suddle AR, Aluvihare V, et al. Systematic review: the role of liver transplantation in the management of hepatocellular carcinoma[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2012, 35(10): 1 113.
 [4] 马晓洁, 宋明洋, 谭榜宪. 原发性肝癌放疗联合其他治疗的新进展[J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(1): 139.
 [5] 周晓红. 吉西他滨联合顺铂治疗晚期乳腺癌疗效观察[J]. 现代预防医学, 2012, 39(15): 3 830.
 [6] 张子旭. 吉西他滨双药联合化疗对比单药化疗治疗晚期胰腺癌的疗效与安全性的 Meta 分析[J]. 中国药房, 2013, 24(32): 3 039.
 [7] 张婉珠, 程斌, 梁斌鑫. 吉西他滨联合顺铂治疗晚期非小细胞肺癌的疗效观察[J]. 中国药房, 2013, 24(40): 3 770.
 [8] 义维丽, 房亮, 周文献, 等. 吉西他滨联合奥沙利铂治疗晚期原发性肝癌的临床研究[J]. 医药前沿, 2014, 4(11): 10.
 [9] 王建, 任雷, 郭源, 等. 树突状细胞瘤苗联合吉西他滨对肝癌干细胞的杀伤效应[J]. 中国现代普通外科进展, 2014, 17(2): 85.
 [10] Stella B, Arpicco S, Rocco F, et al. Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules[J]. *Int J Pharm*, 2007, 344(1/2): 71.
 [11] 左靖, 杨明, 李森, 等. 吉西他滨脂质衍生物聚合物胶束的制备及其理化性质和抗肿瘤活性[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28(3): 408.

(收稿日期: 2015-02-15 修回日期: 2015-04-18)

(编辑: 邹丽娟)

健康城市建设活动即将全面启动

本刊讯 2015年8月29日, 全国爱卫办在山东省威海市召开健康城市建设研讨会。会上, 全国爱卫办介绍了《关于开展健康城市建设的指导意见》草案, 复旦大学代表课题组介绍了健康城市评价指标体系的研究进展情况, 与会的青岛、威海、泸州等市政府领导、世界卫生组织代表、相关专家和媒体代表从不同的角度, 对指导意见和指标体系提出了意见和建议。

国家卫生和计划生育委员会副主任、国家中医药管理局局长王国强出席了会议。他指出, 健康城市建设是全面建成小康社会、建设健康中国的重要内容, 是推进新型城镇化、解决当前“城市病”问题的重要抓手, 是“将健康融入所有政策”理念的有效实现形式, 要作为新时期爱国卫生运动的重要内容, 抓好顶层设计, 全面推进实施。王国强强调, 在健康城市建设中, 要准确把握和国家卫生城市的关系、内涵范围和工作方式等关键问题, 进一步加强与世界卫生组织的合作, 广泛听取各方面意见和建议, 把健康城市作为卫生城市的升级版, 总结经验, 开拓创新, 把这项利民的工作设计好、组织好、实施好。

据悉, 健康城市是世界卫生组织在 20 世纪 80 年代为应对

城市发展中出现的影响健康的问题, 如环境污染、公共服务不足、饮水和食品安全问题、慢性病高发、精神压力增大等, 倡导和发起的一项全球行动战略。中国政府对此积极响应, 在国家卫生城市创建的基础上, 1994 年和 1997 年, 全国爱卫办分别选择部分城市, 与世界卫生组织开展了健康城市项目合作。2007 年, 全国爱卫办批准杭州、大连、苏州等 10 个城市开展了健康城市试点工作。2008 年和 2010 年, 全国爱卫办与世界卫生组织合作, 在杭州和大连成功举办了两届国际健康城市市长论坛。通过积极倡导和试点带动, 各地对健康城市建设活动进行了积极探索, 如健康北京、健康上海、健康苏州、健康大连等, 健康城市建设活动已经在我国具有了良好的理论和实践基础。国务院《关于进一步加强新时期爱国卫生工作的意见》中明确提出, 要结合推进新型城镇化建设, 鼓励和支持开展健康城市建设, 促进城市建设与人的健康协调发展。

下一步, 全国爱卫办将尽快修改完善健康城市建设指导意见和指标体系, 争取在今年年底前印发实施, 从而全面启动全国健康城市建设活动。