

以人肝癌细胞(BEL-7404)培养法筛选抗癌药

杨金龙 沈祖铭 孙以方* 韩家娴 胥彬

(中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

提要 人肝癌细胞(BEL-7404系) 2.5×10^2 - 2.5×10^4 接种于塑料微量培养板孔内, 以 $[^3\text{H}]$ 亮氨酸参入细胞量作细胞生长速率的指标。羟基喜树碱 1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 能显著抑制 $[^3\text{H}]$ 亮氨酸参入 BEL-7404 细胞的蛋白质, 其抑制率为 31-71%。筛选 40 个药物, 结果三尖杉酯碱、高三尖杉酯碱和石吊兰素对细胞生长有抑制。

关键词 人体肝癌; 培养细胞; $[^3\text{H}]$ 亮氨酸; 羟基喜树碱; 抗癌药物; 药物筛选

利用组织培养细胞进行药物研究, 勿需大量动物, 操作简便, 研究周期短和用药量少。但目前的常规操作方法, 准备工作量大, 耗费培养液和血清多。本实验建立了微量培养方法, 减少准备工作和培液用量⁽¹⁾, 本文报道微

1981年5月8日收稿 1984年9月26日修回

* 现在兰州医学院药理教研组

量培养人肝癌细胞(BEL-7404系)及药物实验的结果。

材 料

细胞株 人肝癌细胞(BEL-7404系)经长期培养后仍保持肝癌特征⁽²⁾。本实验所用细胞由中国科学院上海细胞研究所供给,并在本实验室连续传代二年余。

培养液 日本制 RPMI-1640 培养基粉末,用双蒸水配制,无菌过滤后加入 20% 小牛血清以及青霉素 200 U/ml,链霉素 100 U/ml。用 0.5% NaHCO₃ 调节 pH 为 7.0-7.2。

细胞消化液 胰酶由美国 Difco 厂生产,以 D-Hanks(无 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺)液配成 0.3% 溶液,用 1.4% NaHCO₃ 调节 pH 为 7.4-7.6。EDTA 消化液用磷酸缓冲液(PBS)配成 0.02%。T-E 混合消化液即由 0.3% 胰酶和 0.02% EDTA 等量混合而成。

[³H]leucine 和药物 [³H]leu 是上海原子核研究所产品,比活性为 20 Ci/mmol。羟基喜树碱(简称羟基)针剂(上海第十制药厂批号 790111)每安瓿含羟基 2 mg/2 ml,临用时稀释成所需浓度。其它药物均由我所合成,植化和抗生素研究室提供。

细胞培养盒 用附盖塑料培养盒,每盒有 40 孔,口径为 6.5 mm,平底直径为 5.5 mm,高 10 mm,每孔容量 0.25 ml。洗净后置于 90% 酒精中过夜。临用时取出置于 uv 灯下灭菌 1 h。

简易 CO₂ 培养匣 用有机玻璃制成无底方形空匣,置于有机玻璃槽中。槽内加入含 CuSO₄ 之蒸馏水,以达到密封作用。方形匣两侧各有一小孔,从一孔中注入含有 5% CO₂ 空气,封闭小孔。将已接种细胞的培养盒置于 CO₂ 培养匣内即可保持一定量的 CO₂ 培养。

实 验

接种不同细胞数的生长率比较 取生长 2-3 d 的 BEL-7404 细胞,用胰酶或直接收集

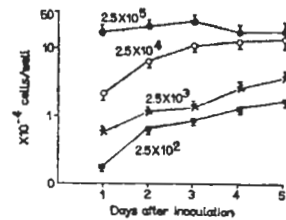


Fig 1. Relationship between inoculated cell number and growth of human hepatoma

细胞,用培液洗涤 1 次后计数,稀释成 1×10^6 /ml 细胞浓度,然后按 1:9 逐级稀释,得 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 和 1×10^3 细胞数 4 个浓度。每一浓度接种 20 孔,每孔 0.25 ml。随即分成 5 组,每天换新鲜培液,并取一组进行细胞计数。在终止实验时每孔中加入 0.02% EDTA 0.1 ml,消化 2 min 后加入 0.1% 台盼兰,作活细胞计数。结果如图 1。最大浓度组每孔接种 2.5×10^5 细胞数,经过 3 d 培养,细胞数略有升高,3 d 时为 3.4×10^5 ,随后逐渐下降,5 d 时近似接种数。接种 2.5×10^4 和 2.5×10^3 组细胞呈线形生长。 2.5×10^4 组,生长 5 d 后细胞为 18×10^4 ,相当于接种细胞的 7.2 倍。 2.5×10^3 组细胞一直保持稳定的生长,到 5 d 时相当于接种细胞的 20 倍。在接种 2.5×10^2 组细胞生长也较迅速。

[³H]leu 参入肿瘤细胞蛋白质的测定 选生长 3-7 d 的 BEL-7404 细胞,按上述方法稀释成每 ml 含细胞数 30×10^4 。每孔接种 7.5×10^4 细胞,生长 72 h 后更换含有 [³H]leu 的新鲜培液,剂量为 1.25, 0.625, 0.313 和 0.156 μ Ci/孔。4 h 后洗去培液,用生理盐水洗涤 3 次,甲醇固定 5 min,空气干燥,加入 10% TCA 沉淀 10 min。轻轻倒去上清液,加入甲醇洗去残余 TCA,置室温干燥。以 85% 甲酸 0.1 ml 和 H₂O₂ 0.1 ml,在 80℃ 消化 20 min,移入闪烁杯中加闪烁液测定。测定所得 cpm 与加入的 [³H]leu 剂量相关。加入 1.25 μ Ci 组测得 cpm 为 3266。随着剂量的减低,cpm 量也逐级下降,但在 leu 剂量较小时,cpm 读数偏低。

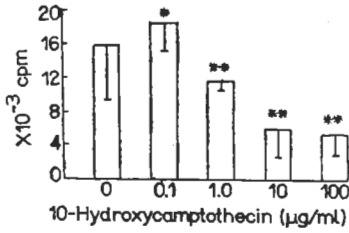


Fig 2. Effect of 10-hydroxycamptothecin on incorporation of [³H]leucine into protein of human hepatoma (BEL-7404) cells. $\bar{x} \pm SD$; * $p > 0.05$; ** $p < 0.05$

羟喜对 [³H]leu 参入 BEL-7404 细胞蛋白质的影响 取生长 3 d 的 BEL-7404 细胞, 稀释成 $8 \times 10^4/\text{ml}$ 。每孔接种 2×10^4 细胞, 培养 48 h 后加入羟喜, 羟喜最终浓度为 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。另一组加入无药培液作对照。继续培养 24 h 后洗去药液, 换入含有 [³H]leu 1 μCi 的新鲜培液, 再培养 4 h 后收集每孔细胞。按前法沉淀蛋白质, 用玻璃纤维膜吸附, 在脂溶性闪烁液中测定 cpm, 结果如图 2。对照组每孔 cpm 为 16776 ± 7194 , 细胞暴露于羟喜 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 培液中, cpm 为 18265 ± 2582 ($p > 0.05$)。羟喜 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 对 [³H]leu 参入细胞蛋白质的量即有影响, cpm 相当于对照组的 69%。在 10 和 100 μg 剂量时, 参入量相当于对照组的 37% 和 28%, ($p < 0.05$)。以同样方法接种细胞后与羟喜 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 接触 24 h, 然后作细胞计数, 结果 7 批实验细胞数相当率为 $40 \pm 11\%$, 与对照组相比 $p > 0.05$ 。

药物筛选 以此方法筛选 40 种合成药和中草药成分。接种一般采用生长 48-72 h 的细胞。细胞生长在培养盒中 24 h, 用分别含有 0.1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 各类被试化合物的培液更换, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 去除药液, 消化和收集细胞。进行细胞计数并与对照组比较, 求得细胞生长相当率。以相当率低于 50% 示为有效。结果 40 个样本中 3 个有效: 在 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度时, 三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱组的细胞数分别相当于对照组的 43.8% 和 46.9%, 石吊兰素为 34.9%。其它 37 个均无效(表 1)。

Tab 1. Effect of 40 substances tested on the growth of BEL-7404 cells. Comparison was made by the ratio of cell number of treated (T) to controls (C).

Test Substance	$\mu\text{g}/\text{ml}$	T/C (%)
	1	78.1
Harringtonine	10	84.4
	100	43.8
	1	62.5
Homoharringtonine	10	62.5
	100	46.9
<i>Lysionotus pauciflora</i> (alcoholic extracts)	1	84.4
	100	75.0
	1	87.6
Nevadensin	10	80.6
	100	34.9
Polysaccharides of <i>Acanthopanax senticosus</i>	1	92.3
	100	88.4
	1	80.8
<i>Acanthopanax senticosus-IX</i>	100	76.1
<i>Sarcandra glaber-1</i>	100	73.1
<i>Sarcandra glaber-2</i>	100	60.8
	1	88.5
<i>Sarcandra glaber-3</i>	100	100.0
Lappaconitin hydrobrominum	100	86.1
Lappaconitine	100	77.8
<i>Trichosanthes kirilowii</i> (TK)		
TK-CM-chromatograph-48	100	80.3
TK-CM-chromatograph-49	100	92.9
TK-CM-chromatograph-50	100	88.7
TK-CM-chromatograph-51	100	148.0
TK-CM-chromatograph-56	100	51.9
TK-P11-chromatograph-1	100	119.0
TK-P11-chromatograph-2	100	48.4
TK-P11-chromatograph-2.5	100	51.6
TK-P11-chromatograph-3	100	93.5
TK-P11-chromatograph-4	100	116.0
<i>Trichosanthes kirilowii</i> (non-protein)	100	96.8
	300	106.0
<i>Actinida arguta-1</i>	100	143.0
<i>Actinida arguta-2</i>	100	127.9
<i>Actinida arguta-3</i>	100	78.6

(Continued on p 147)

(Continued from p 146)

Test Substance	µg/ml	T/C (%)
<i>Equisetum arvense</i> (alcoholic extracts)	300	106.0
<i>Corynebacterium anaerobic</i> vaccine	0.1 ml	65.1
	0.01 ml	66.7
Fermentative fluid 72-2	100	86.1
A-4826	100	33.7
A-Rf-T	100	96.2
4-Oxalysine	1	84.4
	100	90.5
	250	42.9
4-Oxalysine-glycocoll	100	116.0
Double-4-oxalysine	100	109.0
Lycobetaine	1	79.4
	100	50.1
NAB-365	100	186.0
ZrCIPMBP-I	10	108.0
	100	112.0
TiCIPMBP-I	10	119.0
	100	88.5
HfCIPMBP-I	10	115.0
	100	112.0
5-OH-UR	100	104.0
FR	100	61.5

讨 论

利用体外培养细胞进行抗癌药物的研究虽然有其缺点,如有较高的假阳性等,但由于操作

简便和经济等优点,在用作大量药物的初筛仍有相当的地位。采用人体肿瘤细胞作材料,则更优于动物移植肿瘤。体外培养技术同样有助于细胞和分子药理学研究,为了简化操作步骤,减少使用药量,我们建立了此快速微量培养技术。本实验提示,每一样本接种人肝癌细胞250只,即能得到良好的生长曲线。以 $[^3\text{H}]$ leu作蛋白质前体参入试验,每孔加入0.625-1.25 µCi, cpm > 1000,数据也比较稳定。此方法操作简便,同样适用于其它细胞的培养⁽³⁾。

羟基是治疗肝癌有效的药物⁽⁴⁾,对肿瘤细胞有选择性作用⁽⁵⁾,本实验观察到此药物对BEL-7404系肝癌细胞也有抑制作用,以细胞计数所得数据与 $[^3\text{H}]$ leu参入结果进行比较,结果相仿,唯同位素方法略敏感,操作简便,可用作植物药有效成分分离的追踪筛选,有助于研究中草药的抗癌作用。本实验筛选40个药物中,发现三尖杉酯碱,高三尖杉酯碱,石吊兰素有效,值得进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Dawson M. *Cellular pharmacology*. 1st ed. Springfield:Thomas, 1972:3-128
- 2 陈瑞铭、朱德厚、叶秀珍、沈鼎武. 实验生物学报 1978;11:37
- 3 杨金龙、沈祖铭、韩家娟. 科学通报 1982;27:124
- 4 中国科学院上海药物研究所. 中华医学杂志 1978; 58:598
- 5 杨金龙、韩家娟、胥 彬. 中国药理学报 1980;1:44

Acta Pharmacologica Sinica 1985 Jun; 6 (2) : 144-148

CULTURED HUMAN HEPATOMA CELL (BEL-7404) FOR ANTICANCER DRUGS SCREENING

YANG Jin-long, SHEN Zu-ming, SUN Yi-fang, HAN Jia-xian, XU Bin
(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

ABSTRACT A quantitative method of tumor cell culture for evaluating anticancer agents *in vitro* was established. Typical cell-growth

curve was seen when human hepatoma (BEL-7404) $2.5 \times 10^2 - 2.5 \times 10^4$ cells/well were placed in plastic microtitre plates. The amount

of radioactivity of [^3H]leucine incorporated into cells was employed to assay the cell-growth rate.

10-Hydroxycamptothecin 1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inhibited significantly the growth of BEL-7404. The incorporation of [^3H]leucine into the protein of tumor cells was inhibited by 31-71%.

Among 40 drugs tested, harringtonine, homoharringtonine, and nevadensin inhibited markedly the growth of BEL-7404 cells.

KEY WORDS human hepatoma; cultured cells; [^3H]leucine; hydroxycamptothecin; antineoplastic agents; drug screening

* * * * *