

## 活性分析

### 软琼脂克隆形成实验评价药物体外抑瘤性与成瘤性<sup>\*</sup>

齐乃松<sup>1,2</sup>, 郭建<sup>3</sup>, 王雪<sup>1</sup>, 文海若<sup>1\*\*</sup>

(1. 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176;  
2. 河南省食品药品检验所, 郑州 450003; 3. 首都医科大学附属北京同仁医院急诊科, 北京 100730)

**摘要 目的:** 分别采用肿瘤细胞系和转化细胞系摸索软琼脂克隆形成实验的适宜条件, 并对冬凌草甲素 (oridonin, ORI) 的抑瘤性和没食子酸乙酯 (ethyl gallate, EG) 促瘤性进行评价。**方法:** 1) 摸索实验条件: 采用 6 孔板固态培养法, 按不同密度 (每孔 500~20 000 个) 将肿瘤细胞系 (Hela, K562 和 HepG2) 和转化细胞系 (Bhas 42) 与软琼脂混合铺板, 计数克隆形成率。2) HepG2 细胞分别与质量浓度为 0.016、0.08、0.4、2、10、50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 ORI 溶液混合后铺板; Bhas 42 细胞预先经质量浓度为 0.3、1、3  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 EG 溶液处理后, 镜下观察细胞达到转化状态后, 与软琼脂混合铺板培养。经培养后观察给药处理对克隆形成率的影响。3) 利用流式细胞仪分析 ORI 和 EG 对细胞周期的影响。**结果:** 细胞接种密度为每孔 1 000 个左右时, 利用肿瘤细胞和转化细胞开展软琼脂克隆形成实验效果较好。ORI 作为抑瘤药物在低浓度条件可显著降低 HepG2 细胞的克隆形成率 ( $P < 0.01$ ), 且对细胞增殖有抑制作用。EG 随给药浓度增加可显著升高 Bhas 42 的克隆形成率 ( $P < 0.01$ ), 但对细胞增殖影响不显著。**结论:** 软琼脂克隆形成实验以克隆形成率为检测指标, 可较为简便而灵敏地检测药物引起的抑瘤性和促瘤性。该实验结果与细胞周期分析结果相互印证。两者的有机结合, 可用于药物对细胞增殖及成瘤性的影响的初步分析。

**关键词:** 软琼脂克隆形成实验; 试验条件; 肿瘤细胞系; 转化细胞系; 成瘤性; 抑瘤性; 冬凌草甲素; 没食子酸乙酯

中图分类号: R 917      文献标识码: A      文章编号: 0254-1793 (2017) 03-0444-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.03.12

### Tumor suppression effect and tumorigenicity of drugs evaluated by soft agar colony formation assay<sup>\*</sup>

QI Nai-song<sup>1,2</sup>, GUO Jian<sup>3</sup>, WANG Xue<sup>1</sup>, WEN Hai-ruo<sup>1\*\*</sup>

(1. Beijing Key Laboratory, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China; 2. Henan Provincial Institute of Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China;  
3. Emergency Department, Beijing Tongren Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100730, China)

**Abstract Objective:** To investigate the appropriate conditions for soft agar colony formation assay using tumor and transformed cell lines, and evaluate the tumor suppression effect of oridonin (ORI) and the tumorigenicity of

\* 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2015ZX09501004-002); 中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金课题 (2014C1); 北京市自然科学基金项目 (7142127)

\*\* 通信作者 Tel: (010) 67876252; E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn  
第一作者 Tel: 18595506217; E-mail: qinaisongepu@163.com

ethyl gallate (EG) respectively. **Methods:** 1) Experimental conditions: tumor cell lines (Hela, K562 and HepG2) and transformed cell line (Bhas 42) were mixed with soft agar on 6-well culturing plates at different density (500–20 000 cells per well), and the colony formation rates were calculated. 2) HepG2 cells were mixed with ORI at concentrations of 0.016, 0.08, 0.4, 2, 10, 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; Bhas 42 cells were pretreated with EG at concentrations of 0.3, 1, 3  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  and subsequently plated with soft agar while the transformation state was observed. The effects of ORI and EG on colony formation rates were examined. 3) Effects of ORI and EG on cell cycles were analyzed by flow cytometry. **Results:** Both tumor cells and transformed cells achieved optimized effects when the cells were plated at the density of 1 000 cell per well. ORI as an antitumor drug significantly reduced the clone formation rate ( $P < 0.01$ ) and exhibited inhibition effect on proliferation of HepG2 cells. EG was able to increase the clone formation rate in a concentration-dependent pattern, but had no effect on the cell proliferation. **Conclusion:** In the soft agar colony formation assay, clone formation rate is used to estimate the tumor suppression effect and the tumorigenicity induced by drugs in a simple and sensitive manner. Our colony formation assay results are consistent with the cell cycle analysis data. By combining both methods, drug-induced cell proliferation and tumor suppression/tumorigenicity could be effectively predicted.

**Keywords:** soft agar colony formation assay; test conditions; tumor cell lines; transformed cell lines; tumorigenicity; tumor suppression effect; oridonin; ethyl gallate

软琼脂克隆形成实验采用肿瘤细胞系或转化细胞系,通过观察细胞在软琼脂中的细胞集落形成能力,对其可能发生转化并在动物体内的成瘤性潜能进行评价。FDA有关使用动物细胞生产的生物制品的相关法规中指出,体外软琼脂克隆形成实验可为细胞致瘤性评价提供更多的信息<sup>[1]</sup>。有研究比较软琼脂克隆形成实验与裸鼠体内接种法的检测结果,发现两者相关性较好,且前者更为灵敏<sup>[2]</sup>。对于肿瘤细胞系,细胞传代次数与软琼脂克隆法的敏感性成正相关。

本研究分别利用肿瘤细胞系(Hela, K562和HepG2)和转化细胞系(Bhas 42)建立了6孔板固态培养法体外软琼脂克隆形成实验方法,并利用该方法对冬凌草甲素(oridonin, ORI)的抑瘤性和没食子酸乙酯(ethyl gallate, EG)的促瘤性进行评价。此外本研究还通过细胞周期分析,药物的抑瘤性/促瘤性与细胞增殖的关系进行分析。其中Bhas 42细胞是在Balb/c 3T3细胞基础上导入小鼠纤维性肉瘤病毒v-Ha-ras基因构建而成,认为已处于启动状态<sup>[3]</sup>。该细胞系暴露于非遗传毒性致癌物条件下,无需经过启动剂的预处理便可引起细胞恶性转化。利用其开展软琼脂克隆形成实验并用来评价药物成瘤性,尚未见文献报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试剂与培养基 ddH<sub>2</sub>O使用MilliQ-A10超纯

水机生产的超纯水, 121 °C、15 min 高压灭菌, 4 °C冰箱保存; 豆蔻酰佛波醇乙酯(phorbol myristate acetate, PMA, Sigma公司); 冬凌草甲素对照品(oridonin, ORI, 中国食品药品检定研究院); 没食子酸乙酯(ethyl gallate, EG, Sigma公司); RPMI 1640培养基(Hyclone公司); MEM培养基(Gibco公司); DMEM/F12培养基(Gibco公司); 胎牛血清(FBS, Ausvin公司); 1%青链霉素混合液(南京凯基生物技术发展有限公司); 0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液(Gibco公司); 琼脂糖(Life公司); PBS(Hyclone公司); PI/RNase Staining Buffer(BD公司)。

1.1.2 细胞系及培养条件 Hela、K562及HepG2(传代次数大于100次)来自中国医学科学院细胞库,采用RPMI 1640(10% FBS)复苏,并于37 °C、5% CO<sub>2</sub>条件下扩增培养。Bhas 42细胞系(BALB/c 3T3细胞系经v-Has-ras基因转染后构建,传代次数10次以内)来自日本JCRB细胞库,用MEM(含15% FBS)培养基复苏并接种于25 cm<sup>2</sup>培养瓶中,于37 °C、5% CO<sub>2</sub>条件下培养,待细胞密度约为70%~80%时改用含5% FBS的DMEM/F12培养基传代扩增。

1.2 软琼脂克隆形成实验(6孔板固态培养法)

1.2.1 0.5%底层琼脂的制备 采用超纯水制备1%琼脂糖溶液,将其于121 °C、15 min条件下高压灭菌,置于42 °C水浴,加入含20% FBS的2×细胞培养

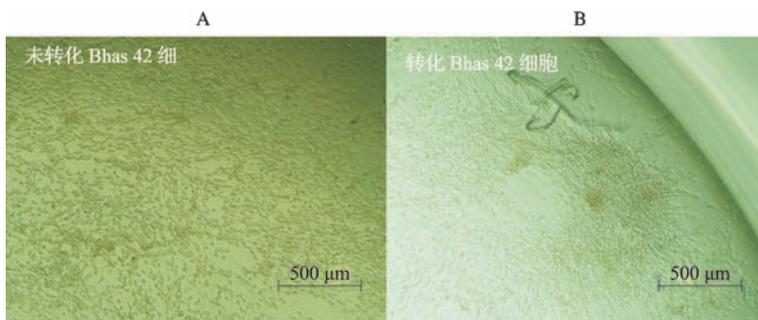
液等体积混合,使琼脂糖终浓度为 0.5%,迅速倒入 6 孔细胞培养板中,每孔 4 mL。室温凝固后置 2~8 °C 保存备用。使用前需在 37 °C 培养箱内平衡 30 min 以上。

**1.2.2** 0.35% 上层琼脂的制备 将制备好的 0.7% 琼脂糖溶液置于 42 °C 水浴。用培养基将细胞制成单细胞悬液,计数,并稀释为  $2.5 \times 10^4$  个  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> (以每孔 5 000 个细胞为例)。取无菌试管,每管加细胞液 0.2 mL、含 20% FBS 的 2 $\times$  细胞培养液 2 mL 和 0.7% 琼脂糖 2 mL,混合均匀后铺在底层琼脂上,每孔 2 mL,共 2 个复孔。室温凝固后,置 37 °C 孵箱培养 14~21 d。

**1.2.3** 镜下观察 细胞经连续培养约 16 d 后在显微

镜下观察,计数大于 10 个细胞的集落数,并计算细胞克隆形成率(细胞克隆形成率 = 平均每孔细胞克隆数 / 每孔中加入的细胞数  $\times$  100%)。

**1.2.4** 细胞接种密度的选择 分别按每孔 500、1 000、2 000、5 000、10 000、20 000 个的密度接种 Hela、K562、HepG2 及 Bhas 42 细胞,其中 Bhas 42 细胞分无处理组和 PMA (50 ng  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) 处理组,PMA 采用 0.1% DMSO 现用现配,每组平行 2 孔。Bhas 42 细胞为可转化细胞,PMA 处理组和下述的 EG 给药组细胞铺板前使用的 Bhas 42 细胞均预先经 PMA 给药 10 d,此时镜下可观察到转化灶的形成(图 1)。持续观察克隆形成情况,铺板、观察、计数方法同上。



A. 未转化 (untransformed) B. 转化 (transformed)

图 1 Bhas 42 细胞形态图

Fig. 1 Representative images of Bhas 42 cells (10 $\times$ 10)

**1.2.5** 药物抑瘤性与成瘤性 根据预实验结果确定 HepG2 及 Bhas 42 细胞接种密度为每孔 1 000 个。HepG2 细胞设空白对照组 (ddH<sub>2</sub>O)、溶媒对照组 (0.1% 和 1% DMSO)、ORI (0.016、0.08、0.4、2、10、50  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) 组; Bhas 42 细胞设空白对照组 (ddH<sub>2</sub>O)、溶媒对照组 (0.1% DMSO)、阳性对照组 (PMA 50、100 ng  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>)、和 EG (0.3、1、3  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) 组。ORI、PMA、EG 溶液均采用 0.1% DMSO 配制,现用现配。制备上层琼脂时将相应浓度的药物、浓度为  $0.5 \times 10^4$  个  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的细胞液 0.2 mL、含 20% FBS 的 2 $\times$  细胞培养液 2 mL 和 0.7% 琼脂糖 2 mL 混合均匀后铺在底层琼脂上,每孔 2 mL,每组平行 2 孔。持续观察克隆形成情况,铺板、观察、计数方法同上。数据采用  $\chi^2$  检验对组间百分率进行统计学分析;如果 1 个或多个浓度组出现浓度依赖性和 / 或可重复性的集落克隆率增加,则判定为存在抑瘤性或成瘤性;反之则为阴性。

### 1.3 细胞周期分析

HepG2 和 Bhas 42 分别复苏于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,

接种于 6 孔板。HepG2 细胞设空白对照组 (ddH<sub>2</sub>O)、溶媒对照组 (0.1% DMSO) 和 ORI (0.016、0.08、0.4、2、10  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) 组; Bhas42 细胞设溶媒对照组 (0.1% DMSO) 和 EG (0.3、1、3  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) 组,连续给药处理 5 d。给药培养结束后,经 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液消化,转入离心管内,1 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 5 min。再使用 3 mL PBS 洗涤 2 次,1 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 5 min,细胞以移液器吹打均匀。将上述 PBS 细胞悬液加入 5 mL 4 °C 预冷的 70% 乙醇中,封口,4 °C 过夜。1 200 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 5 min 收集细胞,使用 PBS 洗涤 2 次。每管加入 PI/RNase Staining Buffer 0.5 mL,染色 15 min,移液器吹打均匀,过 300 目尼龙筛。轻弹试管后,使用流式细胞仪 (BD FACS Calibur™ Flow Cytometer) 进行检测。分析用软件为 Modfit LT (Verity Software House)。各组数据采用单因素方差分析,当 P < 0.05 时差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 软琼脂克隆形成实验条件

结果显示(表 1)不同肿瘤细胞系的克隆形成率

在细胞接种密度为每孔 500~2 000 个时较高,当细胞接种密度超过每孔 5 000 个时,克隆形成率呈下降趋势。实验中观察到大克隆的周围往往会形成多个小克隆,接种密度大于每孔 5 000 个容易出现克隆融合,影响计数结果;而接种密度为每孔 500 个时多形成小克隆,亦不便于观察区分。克隆形成率与细胞密度有关,细胞接种太密集(每孔大于 5 000 个)时,可因缺乏营养而影响细胞生长。铺板 2 周左右可观察到因细胞接种密度不同引起的培养基颜色深浅差异。因此采用 HeLa、HepG2 或 K562 考察药物对克隆形成是否存在抑制作用时,6 孔细胞培养板的接种密度选用每孔 1 000 个较为适宜。以上结论也符合文献报道<sup>[2,4]</sup>。考虑到 3 周后克隆密度较大,可在铺板后 14~16 d 左右进行观察(图 2)。因肿瘤细胞的代数与成瘤性密切相关,研究前应大量扩增相同代数细胞用于试验。

表 1 肿瘤细胞系细胞接种密度与克隆形成率比较 (n=2)

Tab. 1 Comparison of cell seeding densities and clone formation rates in tumor cell lines

细胞系 (cell line)	接种密度 (seeding density) / 个·孔 <sup>-1</sup> (cell·well <sup>-1</sup> )	平均克隆数 (averaged clone count) / · cm <sup>-2</sup>	克隆形成率 (clone formation rate) / %
Hela	500	26	12.6
	1 000	36	8.6
	2 000	84	10.1
	5 000	125	6.0
	10 000	169	4.1
	20 000	299	3.6
K562	500	18	8.4
	1 000	28	6.7
	2 000	34	4.0
	5 000	38	1.8
	10 000	64	1.5
	20 000	117	1.4
HepG2	500	21	10.1
	1 000	48	11.5
	2 000	73	8.8
	5 000	111	5.3
	10 000	163	3.9
	20 000	245	2.9

Bhas 42 细胞是在 Balb/c 3T3 细胞基础上导入了小鼠纤维性肉瘤病毒 v-Ha-vas 基因构建的一种为转化细胞系<sup>[5-6]</sup>。PMA 作为促癌剂用作 Bhas 42 细胞转化实验的阳性对照<sup>[6]</sup>。文献报道 PMA 可通过激活蛋白激酶 C 发挥致癌活性<sup>[7]</sup>。未经促癌剂 PMA 处理的细胞的克隆形成率在各个密度下条件下均低于 PMA (50 ng·mL<sup>-1</sup>) 处理组。提示以 Bhas 42 细胞系研究药物是否有促癌作用,并以 PMA 作为阳性对照是适宜的。在细胞接种密度为每孔 1 000~2 000 个时,阴性组与阳性组的克隆数差异最为明显。

表 2 转化细胞系 (Bhas 42) 细胞接种密度与克隆形成率比较 (n=2)

Tab. 2 Comparison of cell seeding densities and clone formation rates in transformed bhas 42 cell line

处理 条件 (treatment)	接种密度 (个·孔 <sup>-1</sup> ) seeding density (cell·well <sup>-1</sup> )	平均克隆数 (averaged clone count) / · cm <sup>-2</sup>	克隆形成率 (clone formation rate) / %
—	500	1	0.6
	1 000	2	0.4
	2 000	3	0.3
	5 000	4	0.2
	10 000	9	0.2
	20 000	13	0.2
PMA 50 ng·mL <sup>-1</sup>	500	2	1.0
	1 000	7	1.6
	2 000	8	1.0
	5 000	10	0.5
	10 000	28	0.7
	20 000	41	0.5

## 2.2 软琼脂克隆形成实验对药物抑瘤性的评价

如表 3 所示,与空白对照比较,以 0.1% DMSO 为溶媒 HepG2 细胞的克隆形成率与对照组无显著差异,1% DMSO 可增加克隆形成率但与对照组比较未见统计学意义上的显著差异 (P>0.05)。ORI 作为抑瘤药物在低浓度条件下即显示了显著抑瘤性 (P<0.01) 且呈现给药浓度相关趋势。

为验证克隆数形成的减少是否与细胞增殖能力有关,进一步对 ORI 是否对 HepG2 细胞的细胞周期进行分析。结果发现随着 ORI 处理浓度的升高,停留在 G1 期的细胞比率逐渐增加,S 期细胞比率相应减少 (P<0.01),即存在一定的 G1 期阻滞,提示 ORI 通过抑制遗传物质复制抑制细胞增殖。

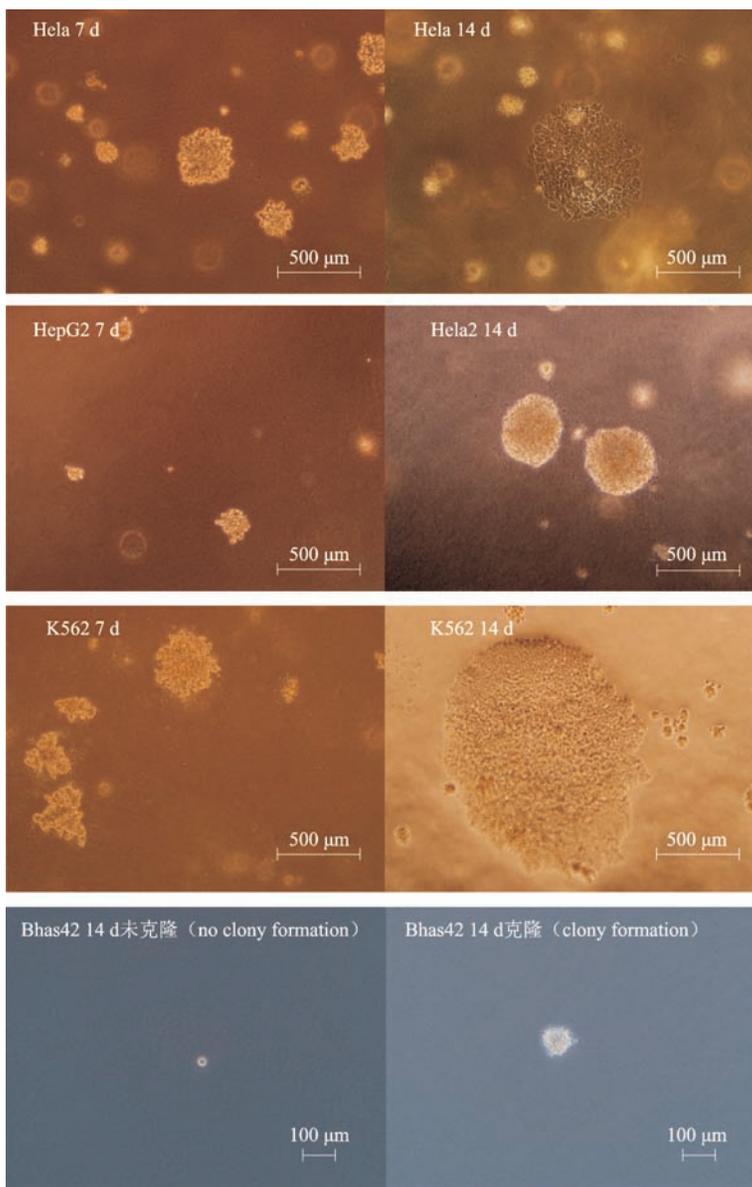


图2 软琼脂克隆形成实验细胞成瘤图例

Fig. 2 Representative image of soft agar colony formation assay

表3 冬凌草甲素对 HepG2 细胞克隆形成的作用 (n=2)

Tab. 3 Effects of oridonin to the clony formation of HepG2 cells

处理条件 (treatment)	平均克隆数 (averaged clone count) / $\text{cm}^{-2}$	克隆形成率 (clone formation rate) / %
ddH <sub>2</sub> O	85	82
0.1%DMSO	74	71
1% DMSO	109	104
ORI 0.016 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	44	42**
ORI 0.08 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	34	33**
ORI 0.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	32	31**
ORI 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	12	11**
ORI 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	10	9**
ORI 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	4	4**

与 0.1%DMSO 比较 (compared with 0.1% DMSO), \*\*P<0.01

表4 冬凌草甲素对 HepG2 细胞周期的影响 (n=3)

Tab. 4 Effects of oridonin to the cell cycle of HepG2 cells

处理条件 (treatment)	G1 期 (phase G1) / %	S 期 (phase S) / %
ddH <sub>2</sub> O	70.99 ± 1.07	27.20 ± 1.96
0.1% DMSO	72.82 ± 3.18	26.37 ± 2.82
ORI 0.016 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	72.85 ± 2.10	24.21 ± 1.94
ORI 0.08 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	86.94 ± 0.04	13.06 ± 0.04**
ORI 0.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	86.78 ± 2.19	13.22 ± 2.19**
ORI 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	83.68 ± 2.27	16.32 ± 2.28**
ORI 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	90.04 ± 2.34	9.30 ± 2.77**

与 0.1%DMSO 比较 (compared with 0.1% DMSO), \*\*P<0.01

### 2.3 软琼脂克隆形成实验对药物成瘤性的评价

与空白对照组克隆形成率(4.6%)及溶媒对照组克隆形成率(5.9%)比较,PMA 阳性对照组高浓度条件下的克隆形成率(16.1%)具有显著性增加( $P<0.01$ )。EG 高浓度组( $3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 克隆形成率为 16.0%)与溶媒对照组比较存在显著性增加( $P<0.01$ ),且克隆形成率的增加呈浓度相关趋势。提示 EG 促进了 Bhas 42 细胞恶性转化,细胞成瘤性增加。在进一步的细胞周期分析结果(表 6)中观察 EG 对 Bhas 42 细胞的 G1 期和 S 期细胞百分率并未产生显著改变( $P>0.05$ )。提示药物并非通过影响细胞周期来增强细胞成瘤性。

表 5 没食子酸乙酯对 Bhas42 细胞克隆形成的作用 ( $n=2$ )

Tab. 5 Effects of ethyl gallate to the clony formation of Bhas42 cells

处理条件 (treatment)	平均克隆数 (averaged clone count) / $\cdot \text{cm}^{-2}$	克隆形成率 (clone formation rate) / %
ddH <sub>2</sub> O	5	4.6
0.1% DMSO	6	5.9
PMA 50 ng $\cdot \text{mL}^{-1}$	13	12.8
PMA 100 ng $\cdot \text{mL}^{-1}$	17	16.1**
EG 0.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	6	5.9
EG 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	10	9.9
EG 3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	17	16.0**

与 0.1% DMSO 组比较 (compared with 0.1% DMSO), \*\* $P<0.01$

表 6 没食子酸乙酯对 Bhas42 细胞周期的影响 ( $n=3$ )

Tab. 6 Effects of ethyl gallate to the cell cycle of Bhas42 cells

处理条件 (treatment)	G1 期 (phase G1) / %	S 期 (phase S) / %
0.1% DMSO	80.56 $\pm$ 3.40	19.44 $\pm$ 3.40
EG 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	76.62 $\pm$ 2.48	23.38 $\pm$ 2.48
EG 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	81.83 $\pm$ 5.78	18.17 $\pm$ 5.78

### 3 讨论

本研究结果提示 ORI 对肝癌细胞成瘤率有明显抑制,文献报道 ORI 具有抗肝癌效应<sup>[8-10]</sup>。ORI 的抗肿瘤分子机制可能与端粒酶活性改变而诱导细胞凋亡有关,而端粒酶的活性受到细胞周期的影响<sup>[11-13]</sup>。ORI 的具体作用机制可能与诱发肿瘤细胞凋亡,影响细胞周期等有关。

EG 是一种酚类抗氧化剂食品添加剂。赵景春等人<sup>[14]</sup>采用 BALB/c 3T3 细胞模型研究证明没食子

酰没食子儿茶素(EGCG)对 PMA 的促癌作用有抑制作用。文献报道没食子酸丙酯(propyl gallate, PG)可能具有致癌性。而 EG 与 PG 结构相似,课题组前期通过 Bhas 42 细胞转化试验高通量检测方法发现与空白对照组相比,EG 可以促进 Bhas 42 细胞发生转化并具有显著性差异,推测 EG 可能具有非遗传毒性致癌性<sup>[15]</sup>。将转化后的 Bhas 42 细胞进行体外软琼脂克隆形成实验,验证 EG 对 Bhas 42 成瘤性的影响,结果表明 EG 转化后的 Bhas 42 细胞成瘤性显著增加,细胞发生恶性转化,佐证了 EG 可能具有非遗传毒性致癌性风险。

软琼脂克隆形成实验采用肿瘤细胞系或转化细胞系,通过观察细胞在软琼脂中的细胞集落形成能力,对其可能发生转化并在动物体内的成瘤性潜能进行早期预测和筛选,之后再针对获得阳性结果的供试品有针对性地开展动物实验。本实验采用 HepG2 细胞和 Bhas 42 细胞分别对药物抑瘤性以及成瘤性进行评价,该方法简单、经济,并且不需要特殊仪器设备,结果可靠,可以很好支撑体内致瘤性试验结果。其中肿瘤细胞系和转化细胞系的状态是该方法成功的关键。肿瘤细胞系的克隆形成能力随细胞代数增多而提高,建议使用传代次数在 100 代以上的细胞系,且评价不同药物时使用的细胞代数差异不大。而转化细胞系的转化能力则随着细胞传代次数增加而逐渐降低,因此应将使用时的细胞代数控制在 10 代以内。转化细胞首先需要经药物处理,明确观察到转化灶的发生以确定细胞转化能力优良之后,才能继续用于软琼脂克隆形成实验。其次,克隆形成的与培养基、培养条件及时间等因素有关,克隆的计数标准也需进行一定规范化。各个实验室课通过积累相关的背景数据,有助于对药物的作用做出合理评价。在对药物的成瘤性和抑瘤性进行判断时,应与其他体外或体内研究结果结合综合考虑。

肿瘤的发生发展与细胞周期机制调控息息相关。细胞癌变后细胞周期抑制基因活性受到抑制,从而导致细胞周期进程快速运转,例如 p53/p21 和 p16<sup>INK4a</sup>/pRB 基因<sup>[16-18]</sup>等。而传统的致癌实验耗费大量动物,且实验周期在 2~3 年,费时费力。本研究首次利用 Bhas 42 转化细胞对药物的成瘤性进行评价,该结果可与 Bhas 42 细胞转化试验有机结合,对评价药物或新型化合物潜在致癌性具有重要的实际意义。将软琼脂克隆形成实验与细胞周期分析或其他肿瘤相关

因子表达研究相结合,有助于更好地对药物的潜在抑癌性或致癌性进行早期筛选和预测。

#### 参考文献

- [ 1 ] FDA. Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals [ S ]. 1993
- [ 2 ] 孟淑芳,林林,李修兰,等. 软琼脂克隆法与裸鼠体内接种法检测细胞致瘤性的比较 [ J ]. 中国生物制品学杂志, 2006, 19 ( 5 ): 516  
MENG SF, LIN L, LI XL, *et al.* Test for tumorigenicity of cells by soft agar cloning method and inoculation in nude mice [ J ]. *Chin J Biol*, 2006, 19 ( 5 ): 516
- [ 3 ] SAKAI A, SASAKI K, HAYASHI K, *et al.* An international validation study of a Bhas 42 cell transformation assay for the prediction of chemical carcinogenicity [ J ]. *Mutat Res*, 2011, 725 ( 1 ): 57
- [ 4 ] 武双,李劲涛,钟儒刚,等. 人乳头状瘤病毒 16 型 E6E7 基因与 MCA, TPA 协同诱导细胞恶性转化的实验研究 [ J ]. 山东医药, 2012, 52 ( 17 ): 35  
WU S, LI JT, ZHONG RG, *et al.* A synergistic transformation response induced by HPV 16 E6E7 gene and MCA/TPA [ J ]. *Shandong Med J*, 2012, 52 ( 17 ): 35
- [ 5 ] ELLIS RW, DEFEO D, MARYAK JM, *et al.* Dual evolutionary origin for the rat genetic sequences of Harvey murine sarcoma virus [ J ]. *J Virol*, 1980, 36 ( 2 ): 408
- [ 6 ] SASAKI K, MIZUSAWA H, ISHIDATE M. Isolation and characterization of ras-transfected balb/3t3 clone showing morphological transformation by 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate [ J ]. *Jpn J Cancer Res*, 1988, 79 ( 8 ): 921
- [ 7 ] LEE YY, RYU MS, KIM HS, *et al.* Regulations of reversal of senescence by PKC isozymes in response to 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate via nuclear translocation of pErk1/2 [ J ]. *Mol Cells*, 2016, 39 ( 3 ): 266
- [ 8 ] TIAN W, CHEN S. Recent advances in the molecular basis of anti-neoplastic mechanisms of oridonin [ J ]. *Chin J Integr Med*, 2013, 19 ( 4 ): 315
- [ 9 ] DUAN HQ, LI MY, GAO L, *et al.* Mechanism concerning antitumor effect of oridonin on multiple myeloma cell line U266 [ J ]. *J Exp Hematol*, 2014, 22 ( 2 ): 364
- [ 10 ] ZHANG H, LIU YX, JIA M, *et al.* Oridonin inhibits tumor growth in glioma by inducing cell cycle arrest and apoptosis [ J ]. *Cell Mol Biol*, 2013, 60 ( 6 ): 29
- [ 11 ] LANDBERG G, NIELSEN H, NILSSON P, *et al.* Telomerase activity is associated with cell cycle deregulation in human breast cancer [ J ]. *Cancer Res*, 1997, 57 ( 3 ): 549
- [ 12 ] BUCHKOVICH KJ, GREIDER CW. Telomerase regulation during entry into the cell cycle in normal human T cells [ J ]. *Mol Biol Cell*, 1996, 7 ( 9 ): 1443
- [ 13 ] ZHU X, KUMAR R, MANDAL M, *et al.* Cell cycle-dependent modulation of telomerase activity in tumor cells [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93 ( 12 ): 6091
- [ 14 ] 赵景春,鄂文. 没食子酰表没食子儿茶素对 TPA 促癌的抑制作用 [ J ]. 卫生毒理学杂志, 2001, 15 ( 2 ): 81  
ZHAO JC, E W. Study of inhibitory effect of EGCG on promotion cancer of TPA [ J ]. *J Heal Toxicol*, 2001, 15 ( 2 ): 81
- [ 15 ] 王颖. Bhas 42 细胞转化试验方法学及其应用研究 [ D ]. 北京: 中国食品药品检定研究院, 2013  
WANG Y. The Methodolgy and Application Research of Bhas 42 Cell Transformation Assay [ D ]. Beijing: National Institutes for Food and Drug Control, 2013
- [ 16 ] LEVINE AJ. p53, The cellular gatekeeper for growth and division [ J ]. *Cell*, 1997, 88 ( 3 ): 323
- [ 17 ] CAMPISI J, DI FAGANA FA. Cellular senescence: when bad things happen to good cells [ J ]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2007, 8 ( 9 ): 729
- [ 18 ] COLLINS CJ, SEDIVY JM. Involvement of the INK4a/Arf gene locus in senescence [ J ]. *Aging Cell*, 2003, 2 ( 3 ): 145

( 本文于 2016 年 3 月 17 日收到 )