

# 半抗原 2,4-二硝基氟苯体内外抑制肝细胞癌的初步研究

李开春,袁振刚,戴兆云  
(复旦大学附属华东医院,上海 200040)

**摘要:** [目的] 初步研究半抗原 2,4-二硝基氟苯(2,4-DNFB)在体内外对肝细胞癌的抑制作用。[方法] 用不同浓度的 DNFB、氟尿嘧啶(5-Fu)(对照组)分别处理 SMMC-7721 肝癌细胞株 72h,用 MTT 法测定 72h 细胞存活率,并计算 50%和 90%抑制浓度(IC<sub>50</sub>和 IC<sub>90</sub>)。经 H22 肝癌细胞株皮下种植成功的 18 只昆明鼠随机分成 3 组:DNFB 组、无水乙醇(Ethanol)组、磷酸盐缓冲液(PBS)组(对照组),并分别瘤内注射 100 $\mu$ l 的 DNFB、Ethanol 和 PBS,每周 2 次,共 4 次。瘤内注射结束 2 周后剥离肿瘤称重,计算抑瘤率。[结果] DNFB 和 5-Fu 对 SMMC-7721 肝癌细胞株的 IC<sub>50</sub> 分别为 32.22 $\mu$ mol/L 和 3.62 $\mu$ mol/L;IC<sub>90</sub> 分别为 49.53 $\mu$ mol/L 和 >200 $\mu$ mol/L。DNFB 组、无水乙醇组和 PBS 对照组最终的瘤重分别为 0.97 $\pm$ 0.53g、1.55 $\pm$ 0.76g 和 3.79 $\pm$ 0.75g。与 PBS 对照组比较,DNFB 组和无水乙醇组的抑瘤率分别为 74.43%( $P=0.00004$ )和 59.20%( $P=0.00045$ ),DNFB 组和无水乙醇组之间的差异无统计学意义( $P=0.16$ )。[结论] DNFB 可在体内外抑制肝癌细胞的生长。

**关键词:** 半抗原;二硝基氟苯;氟尿嘧啶;半数抑制浓度;乙醇;肝癌

中图分类号:R735.7 文献标识码:A 文章编号:1004-0242(2013)01-0063-04

## Preliminary Study of Inhibitory Effects of Hapten 2,4-Dinitrofluorobenzene on Hepatocellular Carcinoma in vitro and in vivo

LI Kai-chun, YUAN Zhen-gang, DAI Zhao-yun  
(Huadong Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China.)

**Abstract:** [Purpose] To investigate inhibitory effect of hapten 2,4-dinitrofluorobenzene (2,4-DNFB) on hepatocellular carcinoma (HCC) in vitro and in vivo. [Methods] SMMC-7721 cells were treated with DNFB and 5-fluorouracil (5-Fu) (control group) under different concentrations for 72 hours. The methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method was used to determine survival rate of HCC cells, and to calculate IC<sub>50</sub> and IC<sub>90</sub>. Eighteen Kunming mice, of which H22 cells were successfully implanted into subcutaneousness, were randomly divided into three groups, DNFB group, Ethanol group and PBS group (control group), and 100 $\mu$ l DNFB, ethanol and PBS were intra-tumor rally injected in each group, twice a week for two weeks, respectively. After two weeks, the tumor were weighted and the rates of tumor inhibition (RTI) were calculated. [Results] Contrations of DNFB and 5-Fu to reach IC<sub>50</sub> of SMMC-7721 cells were 32.22 $\mu$ mol/L and 3.62 $\mu$ mol/L respectively, and those to reach IC<sub>90</sub> were 49.53 $\mu$ mol/L and >200 $\mu$ mol/L, respectively. The tumor weights in DNFB group, Ethanol group and PBS control group were 0.97 $\pm$ 0.53g, 1.55 $\pm$ 0.76g and 3.79 $\pm$ 0.75g, respectively. Compared with PBS control group, the RTI was 74.43% in DNFB group ( $P=0.00004$ ) and 59.20% in Ethanol group ( $P=0.00045$ ), but there was no statistically difference between DNFB group and Ethanol group ( $P=0.16$ ). [Conclusion] Hapten DNFB can inhibit HCC growth in vitro and in vivo.

**Key words:** haptens; dinitrofluorobenzene; fluorouracil; inhibitory concentration 50; ethanol; hepatocellular carcinoma

原发性肝癌是指原发于肝脏的恶性上皮性肿瘤,其组织来源大多为肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC),在世界范围内发病率位居第 5 位,死

亡率位居第 3 位,其中 50%~55%发生在中国<sup>[1]</sup>。肝细胞癌起病隐匿,多数病人就诊时已属晚期。美国肝脏疾病研究协会(AASLD)和欧洲肝脏研究协会(EASL)等一些国际治疗指南均建议对晚期肝癌采取免疫治疗<sup>[2,3]</sup>。在小鼠动物模型中,可通过皮肤外搽半抗原

收稿日期:2012-07-24;修回日期:2012-10-25

基金项目:上海市科委医学引导类课题(10411961600)

通讯作者:戴兆云, E-mail: daizhaoyun@sina.com

2,4-二硝基氟苯 (2,4-dinitrofluorobenzene, DNFB) 制作变态反应性皮炎模型<sup>[4]</sup>, 提示 DNFB 可激发局部免疫反应。本文研究 DNFB 在体内外对肝癌细胞的抑制作用, 为肝癌免疫治疗提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

2,4-二硝基氟苯(DNFB)购自美国 Sigma 公司, 纯度>99.5%。氟尿嘧啶(5-Fu)购自上海旭东海普药业公司。SMMC-7721 肝癌细胞株由复旦大学生物化学实验室惠赠。昆明种 C57BL/6 小鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司 (生产许可证号 SCXK (沪) 2011-0003, 使用许可证号: SYXK (沪) 2011-0015), 均为健康雄性, 6 周龄, 每只体重 20~22g。小鼠肝癌 H22 细胞株由上海医工院实验室传代维持。RPMI-1640 培养液购自美国 Gibco 公司。胎牛血清购自杭州四季青生物工程公司。无水乙醇购自上海江莱生物科技有限公司。

### 1.2 细胞培养和体外肝癌细胞株的抑制实验

SMMC-7721 肝癌细胞株, 按常规方法复苏, 在含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度培养。分别取对数生长期 10<sup>3</sup> 个细胞进行 96 孔板培养。12h 后, 分别加入一定剂量的 DNFB(溶于标准磷酸盐缓冲液)和 5-Fu(对照组)进行药物干预实验, 使其终浓度均分别为 0、2、10、50、100 和 200 μmol/L, 并设立不加药的空白对照。实验数据每个浓度同时做 6 个孔测定, 并在相同条件下重复 3 次。72h 后, 小心吸干每孔细胞中的培养基, 加入 100 μl 含 5mg/ml MTT 的新鲜培养基, 于 37℃ 保温 4h。然后吸去 MTT 培养基, 加入裂解液充分裂解细胞后, 置于酶标仪中采用 570nm 波长读取光密度值(OD)。细胞抑制率=(对照组 OD 均值-药物组 OD 均值)/对照组 OD 均值×100%。同时计算 50% 和 90% 抑制浓度 (IC<sub>50</sub> 和 IC<sub>90</sub>)。

### 1.3 荷瘤鼠肝癌模型的建立和目标化合物的体内抑制实验

H22 肝癌细胞株复苏培养后, 用标准磷酸盐缓冲液(PBS)制备成浓度为 1×10<sup>7</sup> 个/ml 的细胞悬液。选取健康雄性昆明鼠, 体重 20~22g, 每只昆明鼠右侧腋部皮下接种 100 μl H22 肝癌细胞, 1 周后取皮下移植成功, 且生长均匀的 18 只昆明鼠肝癌模型用于体内抑制实验。昆明鼠肝癌模型随机分成 3 组: DNFB 组、无水乙醇(Ethanol)组和 PBS 组(对照组), 每组 6 只。触及皮下肿瘤结节中心给药, 每组分别瘤内注射 100 μl 的 DNFB(1mg DNFB 溶于 PBS 至终体积 100 μl)、100 μl 无水乙醇和 100 μl 的 PBS(1mg/100 μl), 每周 2 次, 共 4 次。给药结束 2 周后颈椎脱位处死小鼠, 解剖剥离瘤块, 称取瘤重, 以及小鼠去瘤后体重等指标。肿瘤抑制率=(1-给药组平均瘤重/对照组平均瘤重)×100%。

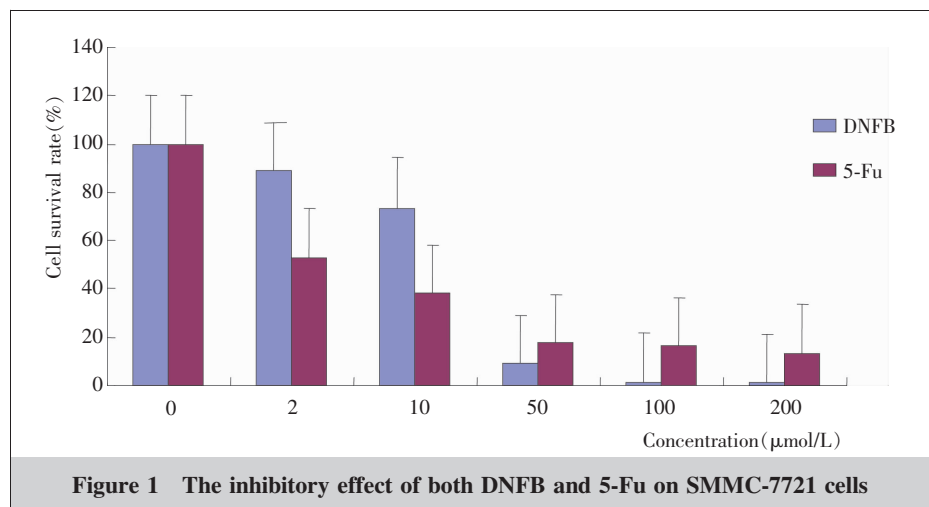
### 1.4 统计学处理

数据分析应用 SPSS 13.0 统计软件, 实验数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 体外肝癌细胞株抑制实验结果

不同浓度组化合物 OD 值与空白对照组 OD 值比较均有统计学差异( $P < 0.001$ )。随着化合物浓度的增加, 细胞抑制率逐渐增加, 细胞成活率逐渐下降 (Figure 1)。



DNFB 对 SMMC-7721 肝癌细胞株的  $IC_{50}$  和  $IC_{90}$  分别为  $32.22\mu\text{mol/L}$  和  $49.53\mu\text{mol/L}$ , 而 5-Fu 对 SMMC-7721 肝癌细胞株  $IC_{50}$  和  $IC_{90}$  分别为  $3.62\mu\text{mol/L}$ 、 $>200\mu\text{mol/L}$ 。

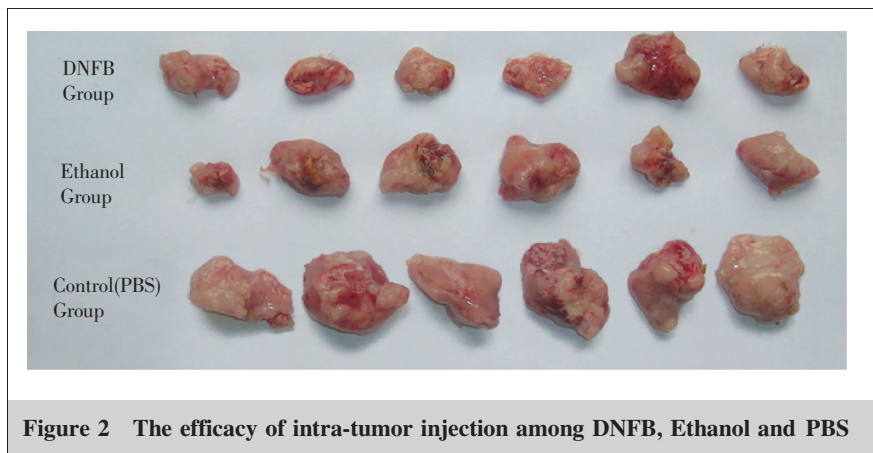
## 2.2 荷瘤鼠肝癌模型体内抑制实验结果

实验组和对照组的肿瘤形态欠规则,肿瘤血管丰富,中心坏死少,符合细胞悬液法成瘤特点(Figure 2)。DNFB 组、无水乙醇(Ethanol)组、PBS 对照组最终的肿瘤重量分别为  $0.97\pm0.53\text{g}$ 、 $1.55\pm0.76\text{g}$  和  $3.79\pm0.75\text{g}$ 。与 PBS 对照组比较,DNFB 组的抑瘤率为  $74.43\%$  ( $P<0.001$ ), 无水乙醇组的抑瘤率为  $59.20\%$  ( $P<0.001$ )。DNFB 组与无水乙醇组之间的差异无统计学意义( $P=0.16$ )(Table 1)。

**Table 1 The effects of intra-tumor injection of three groups on mice bearing H22 (n=6)**

| Group       | Mice weight(g)<br>(after tumor dissection) | Tumor<br>weight(g) | Rate of tumor<br>inhibition(%) |
|-------------|--------------------------------------------|--------------------|--------------------------------|
| DNFB        | $28.80\pm2.19$                             | $0.97\pm0.53$      | 74.43**                        |
| Ethanol     | $25.72\pm0.70$                             | $1.55\pm0.76$      | 59.20*                         |
| PBS control | $28.68\pm3.78$                             | $3.79\pm0.75$      | -                              |

Compared to control group: \* $P=0.00045$ , \*\* $P=0.00004$



**Figure 2 The efficacy of intra-tumor injection among DNFB, Ethanol and PBS**

## 3 讨论

2,4-二硝基氟苯(2,4-DNFB)化学名为 1-氟-2,4-二硝基氟苯,完全由人工化学合成。由于它需要与其他组织结合形成完全抗原才能产生免疫应答,因而被确定为半抗原<sup>[5]</sup>。其作为最早被确定的经典半抗原,DNFB 可强烈诱导效应 T 细胞产生迟发型超敏反应(delayed-type hypersensitivity,DTH),又称 IV 型超敏反应。该反应与补体和抗体无关,是一种以单核

细胞浸润和细胞损伤为主要特征的炎症反应。在医学科研中,DNFB 常被用于制作小鼠自身免疫性肠炎模型<sup>[6]</sup>和小鼠接触性变态反应性皮炎模型<sup>[7]</sup>等。

目前研究较多的半抗原除了 DNFB 以外,还有结构类似的 2,4-二硝基氯苯(2,4-dinitrochlorobenzene,DNCB)。同样,DNCB 也常被用于制作小鼠自身免疫性肠炎模型<sup>[8]</sup>和接触性皮炎模型<sup>[9]</sup>等。临床上以 DNCB 丙酮溶液外用治疗皮肤疾病已有 30 年时间,除了外搽治疗皮肤疣和斑秃外,也常用于测定机体的非特异性细胞免疫功能<sup>[10]</sup>。由慢性病毒感染引起的长年不愈的皮肤疣,经外用该类半抗原可使约 80%~90%的皮肤疣消失<sup>[11]</sup>。以上应用半抗原制成变态反应动物模型和半抗原外用治疗皮肤疣的确切疗效,表明半抗原可激发效应 T 细胞产生免疫反应,并且在一定程度上可诱导机体对原本耐受的病毒感染再次产生免疫应答,提高疾病的免疫原性,促进机体免疫系统识别并强化攻击,从而治愈疾病。考虑到恶性肿瘤的发生发展也有类似的免疫耐受机制,我们设想在肝脏肿瘤局部应用半抗原可能也会产生类似的抑瘤效果。

本文体外肝癌细胞株研究结果表明,在体外无免疫反应参与的情况下,DNFB 可直接抑制肝癌细胞的生长,特别是 90%抑制浓度( $IC_{90}$ )仅为  $49.53\mu\text{mol/L}$ ,而对照 5-Fu 的  $IC_{90}$  则超过  $200\mu\text{mol/L}$ ,说明其 90%的抑瘤活性强于 5-Fu。有文献<sup>[12]</sup>报道  $IC_{90}$  较  $IC_{50}$  对临床疗效的指导意义更大。有趣的是,在体外细胞系中,并没有机体复杂的免疫系统参与,半抗原 DNFB 能够直接抑制肝癌细胞,且部分指标优于 5-Fu。这种现象并不能用 DNFB 激发的免疫效应来解释,可能的解释是,DNFB 类似于细胞毒化疗药物,直接作用于肿瘤细胞 DNA 或者干扰 DNA 和蛋白质合成,抑或影响肿瘤细胞信号传导等其他机制,值得进一步深入研究。图 1 显示,DNFB 浓度由  $10\mu\text{mol/L}$  上升至  $50\mu\text{mol/L}$  时,细胞存活率急剧下降。DNFB 在这个浓度区间引起肝癌细胞的明显抑制效应,这个现象比较特殊,也难以用 DNFB 的毒性来解释,也许把浓度差减少后进行细化实验,

是个值得进一步研究的方法之一。

荷瘤鼠肝癌模型体内抑制实验也进一步证实了DNFB的抑瘤活性。考虑到临床上常应用无水乙醇瘤内注射治疗原发性肝癌<sup>[13]</sup>,而较少直接应用5-Fu行瘤内注射,本文荷瘤鼠模型随机分为DNFB组、无水乙醇组和PBS对照组,未设立5-Fu组。实验结果表明,与对照组比较,DNFB组的抑瘤率为74.43% ( $P<0.01$ ),无水乙醇组的抑瘤率为59.20% ( $P<0.01$ )。尽管DNFB组抑瘤率高于无水乙醇组,但差异无统计学意义 ( $P=0.16$ ),可能与例数较少有关。至于半抗原DNFB是直接抑制肝癌细胞,还是间接通过DTH免疫效应抑制肝癌细胞尚难确定。一般而言,DTH反应发生较慢,通常在接触相同抗原后24~72h出现免疫反应,因此又称迟发型超敏反应。考虑到本实验使用半抗原瘤内注射前,并无初次的免疫致敏过程,使用时间也仅有2周,不能完全用半抗原诱导的DTH效应来解释。

本文实验结果表明DNFB与无水乙醇一样具有抑瘤作用,提示DNFB可作为潜在的单药,有望用于原发性肝癌的瘤内注射治疗。戴兆云等<sup>[14]</sup>以同样具有二硝基苯结构的DNCB进行瘤内注射治疗小鼠黑色素瘤,取得了突出疗效。Lu等<sup>[15,16]</sup>将同样是半抗原的异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)与叶酸通过肽键偶联,通过选择性作用于肿瘤细胞表面的叶酸受体,已经在动物模型上显示出较强的抑瘤活性。本文研究的二硝基苯结构比FITC结构简单,化学上更易合成DNFB与叶酸的共价偶联物,为原发性肝癌的免疫治疗提供更多的选择<sup>[17]</sup>。

## 参考文献:

- [1] El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(7):2557-2576.
- [2] Pardee AD, Butterfield LH. Immunotherapy of hepatocellular carcinoma: unique challenges and clinical opportunities [J]. *Oncoimmunology*, 2012, 1(1):48-55.
- [3] Flecken T, Schmidt N, Spangenberg HC, et al. Hepatocellular carcinoma-from immunobiology to immunotherapy[J]. *Z Gastroenterol*, 2012, 50(1):47-56.
- [4] Kim MS, Hur YG, Kim WG, et al. Inhibitory effect of Platycodon grandiflorum on T(H)1 and T(H)2 immune responses in a murine model of 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2011, 106(1):54-61.
- [5] He XJ, Chu YQ, Dai ZY, et al. A potential carrier for targeted therapy of DNFB hapten induced immune [J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2009, 17(13):1350-1354. [何晓俊, 储艳秋, 戴兆云, 等. 抗体可以作为半抗原二硝基氟苯免疫靶向治疗的载体 [J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(13):1350-1354.]
- [6] Xiao WB, Liu YL. Changes of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T regulatory cells in rat model of colitis induced by 2,4-dinitrofluorobenzene [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(11):2528-2532.
- [7] Kim H, Lee MR, Lee GS, et al. Effect of Sophora flavescens Aiton extract on degranulation of mast cells and contact dermatitis induced by dinitrofluorobenzene in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 142(1):253-258.
- [8] Venkataranganna MV, Rafiq M, Gopumadhavan S, et al. NCB-02 (standardized curcumin preparation) protects dinitrochlorobenzene-induced colitis through down-regulation of NFkappa-B and iNOS [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(7):1103-1107.
- [9] Choi JH, Park BH, Kim HG, et al. Inhibitory effect of Psidium guajava water extract in the development of 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(8):2923-2929.
- [10] Yang GL, Wang XS. *Modern dermatology*[M]. Shanghai: Shanghai Medical University Press, 1996:78-80. [杨国亮, 王侠生. *现代皮肤病学*[M]. 上海:上海医科大学出版社, 1996:78-80.]
- [11] Gibbs S, Harvey I, Sterling J, et al. Local treatments for cutaneous warts: systematic review[J]. *BMJ*, 2002, 325(7362):461.
- [12] Pourgholami MH, Woon L, Almajid R, et al. In vitro and in vivo suppression of growth of hepatocellular carcinoma cells by albendazole [J]. *Cancer Lett*, 2001, 165(1):43-49.
- [13] Lin LW, Lin XY. Ultrasound guided percutaneous ethanol injection in treatment for hepatic carcinoma[J]. *China Cancer*, 2007, 16(3):167-171. [林礼务, 林学英. 超声介入无水乙醇消融治疗肝癌[J]. *中国肿瘤*, 2007, 16(3):167-171.]
- [14] Dai ZY, Zhang HH, Gu XY, et al. Effect of intra-tumor injection with ethanol solution of dinitrochlorobenzene on transplanted melanoma in mice [J]. *Tumor Journal of the World*, 2006, 5(2):86-88. [戴兆云, 章宏海, 顾翔宇, 等. 二硝基氟苯酒精溶液对黑色素瘤小鼠瘤内注射的疗效[J]. *世界肿瘤杂志*, 2006, 5(2):86-88.]
- [15] Lu Y, Xu LC, Parker N, et al. Preclinical pharmacokinetics, tissue distribution, and antitumor activity of a folate-hapten conjugate-targeted immunotherapy in hapten-immunized mice[J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(12):3258-3267.
- [16] Lu Y, Klein PJ, Westrick E, et al. Strategy to prevent drug-related hypersensitivity in folate-targeted hapten immunotherapy of cancer[J]. *AAPS J*, 2009, 11(3):628-638.
- [17] Xie F, Zhang X, Li H, et al. Adoptive immunotherapy in postoperative hepatocellular carcinoma: a systemic review [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8):e42879.