

[文章编号] 1000-2200(2004)02-0115-03

·基础医学·

10-羟基喜树碱联合热疗对肝癌协同杀伤作用的研究

祝子华¹, 祝金泉²

[摘要] 目的: 研究 10-羟基喜树碱(HCPT)联合热疗对肝癌细胞有无协同杀伤作用, 为临床应用提供实验依据。方法: 人肝癌细胞株 SMMC-7721 进行细胞培养、传代, 实验分成四组: (1) 单纯热疗组; (2) 单纯 HCPT 组; (3) 热疗与 HCPT 联合组; (4) 对照组, 各组分别进行实验, 用 MTT 法测定各组对细胞的杀伤作用。结果: 单纯热疗显示温度 43℃、44.5℃(各 30 min) 对 SMMC-7721 细胞有明显的杀伤作用($P < 0.01$), 而 40℃、41.5℃(各 30 min) 对细胞杀伤作用不明显($P > 0.05$)。HCPT 对肝癌 SMMC-7721 细胞有明显的杀伤作用($P < 0.01$), 呈时间依赖性和浓度依赖性($P < 0.01$)。HCPT 联合热疗对细胞的杀伤作用明显强于单纯的 HCPT 或热疗的作用($P < 0.01$)。结论: HCPT 联合热疗对肝癌细胞的杀伤有明显的协同作用。

[关键词] 肝肿瘤; 10-羟基喜树碱; 温热疗法; 协同作用

[中国图书资料分类法分类号] R 735.7 [文献标识码] A

Synergic effect of the combination of thermotherapy and 10-hydroxycamptothecine(HCPT) on hepatoma cells in vitro

ZHU Zi-hua, ZHU Jin-quan

(Department of Gastroenterology, Shanghai Pudong New Area Gongli Hospital, Shanghai 200135, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether the combination of thermotherapy and HCPT has a synergic effect on the hepatoma cells(SMMC-7721 cell line) in vitro. **Methods:** The experiment consists of four groups: thermotherapy, chemotherapy (HCPT), thermo-chemotherapy (chemotherapy combined with HCPT) and control group. **Results:** Thermotherapy within 30 minutes with a temperature of 43℃, 44.5℃ had an obviously inhibited SMMC-7721 cells($P < 0.01$), while 40℃, 41.5℃ hardly had any effect on the cells($P > 0.05$). HCPT had a great cytotoxicity effect on SMMC-7721 cells in dose and time-dependant manner($P < 0.01$). The cytotoxicity could be enhanced when HCPT was combined with thermotherapy($P < 0.01$). **Conclusions:** The combination of HCPT and thermotherapy has a remarkable synergic effect on hepatoma cells.

[收稿日期] 2003-06-28

[作者单位] 1. 上海市浦东新区公利医院 消化科, 上海 浦东 200135
(本文在江西医学院完成); 2. 江西医学院第一附属医院
消化病研究所, 江西 南昌 330006

[作者简介] 祝子华(1969-), 男, 江西上饶人, 硕士, 主治医师。

[Key words] liver neoplasms; 10-Hydroxy camptothecine; thermotherapy; synergic effect

性愈低, 脂质过氧化产物愈多, 即脂质过氧化过程愈强。另外, 过氧化氢酶可防止脂质过氧化增强对细胞膜结构的破坏作用。而过氧化氢是一种毒性物质, 由于过氧化氢酶的作用使其生成水及游离的分子氧, 如果这种酶缺乏可导致细胞氧化应激升高, 从而最终导致细胞功能衰退。CAT 与 SOD、GSH-Px 构成人体重要抗氧化酶系统, 三者协同作用以减少活性氧基的产生, 防止脂质过氧化及其中间代谢产物对机体的损害, 具有十分重要的生理功能。而且它们能有效地捕捉和清除机体内过量的超氧阴离子自由基等自由基和过氧化氢等, 阻断和防止由超氧阴离子自由基所引发的一系列自由基反应的病理性加剧, 维持体内氧化和抗氧化动态平衡, 保护细胞膜免受氧化和脂质过氧化损伤, 若人体内上述抗氧化剂含量和抗氧化酶活性显著降低, 就会诱发疾病。

而大豆异黄酮可参与调节和提高体内抗氧化酶的活性, 如 SOD 是体内特异清除超氧阴离子自由基的一种抗氧化酶, 它把超氧阴离子自由基歧化生成过氧化氢, 而过氧化氢仍然具有细胞毒性, 还可以经过 Fenton 反应生成羟基自由基, 体内的 CAT 和 GSH-Px 则可以将过氧化氢转化为无任何毒性的水。

[参考文献]

- [1] 刘锦, 鲁映青, 金雀异黄素对低密度脂蛋白氧化修饰及氧化型低密度脂蛋白诱导的血管内皮细胞 c-myc mRNA 表达的抑制作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10(6): 509~512.
- [2] 彩拉, 陈必珍, 刘永华. 冠心病病人血清过氧化氢酶及血脂观察[J]. 内蒙古医学院学报, 2003, 25(3): 164~165.
- [3] 李燕. 大豆异黄酮的抗氧化作用及其防治疾病作用[J]. 国外医学·卫生学分册, 2001, 28(2): 100~113.
- [4] 闫祥华, 顾景范, 孙存普. 大豆异黄酮抗脂质过氧化作用及其机制初探[J]. 解放军预防医学杂志, 2000, 18(1): 14~17.

肝癌单纯的手术、化疗、放疗和湿热疗法(热疗)等效果均不满意,已逐渐被综合治疗所取代。近年来随着热疗体外技术的改进和选择肝动脉灌注栓塞热化疗新技术的开展,热化疗综合治疗肝癌显示美好前景。10-羟基喜树碱(HCPT)是从喜树中提取的具有抗肿瘤作用的生物碱,对肝癌、胃癌、结肠癌、膀胱癌等有明显的作用^[1],然而单一应用HCPT对肿瘤缓解率仍然很低,本研究探讨HCPT联合热疗对肝癌细胞有无协同杀伤作用,为临床进行热疗、化疗综合治疗肝癌提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 DMEM、MTT分析纯(Sigma公司),HCPT(湖北黄石美升药业有限公司),小牛血清(华美生物工程公司),肝癌SMMC-7721细胞株(江西省医学科学研究所)。

1.2 肝癌细胞株SMMC-7721的培养 将SMMC-7721细胞置于37℃、5%CO₂培养箱,用10%的小牛血清DMEM液培养,反复传代3至4次,用0.15%胰蛋白酶、-0.02%EDTA消化液消化,用培养液调整细胞浓度为 1×10^5 /ml备用。

1.3 细胞毒性作用检测 MTT法^[2]。

1.4 实验分组与方法

1.4.1 单纯热疗组 取5块96孔板接种细胞悬液,每孔100 μl(1.0×10^4 /孔),并设调零孔,于37℃、5%CO₂条件下培养24 h后(细胞已贴壁),取其中4块分别置于温度可调控的多功能箱中(± 0.1 ℃),于不同温度(40℃、41.5℃、43℃、44.5℃)加热30 min,再放回37℃、5%CO₂培养箱中继续培养72 h。同时设置空白对照组(调零孔)和阴性对照组(不加热即37℃培养72.5 h)。MTT法测定吸光度A值,计算细胞抑制率(IR%)。IR=[(1-实验A值)/对照组A值]×100%。

1.4.2 单纯HCPT组 96孔板(共4块)接种细胞悬液,每孔100 μl(1.0×10^4 /孔),并设调零孔,于37℃、5%CO₂条件下培养24 h后,将每块板孔分成10组,每组设4个复孔,各组加入不同浓度HCPT,其浓度(μg/ml)依次为0.2、0.39、0.78、1.0、1.56、3.12、6.25、12.5、25、50。其中1.0 μl/ml是根据有关文献^[3]计算HCPT血浆峰值浓度(PPC)的参考值。阴性对照组则加入等量的PBS液,在培养箱中继续培养于不同时间(6、24、48、72 h)后,按MTT法测定每孔的吸光度A值,计算IR(%)和半数抑制浓度(IC₅₀)。IC₅₀采用加权线性回归法经计算

机计算。

1.4.3 HCPT联合热疗组 于96孔板接种细胞悬液,每孔100 μl(1.0×10^4 /孔),并设调零孔,于37℃、5%CO₂条件下培养24 h后,加HCPT 10 μl(1 μg/ml),并立即置于恒温箱中于不同温度(40℃、41.5℃、43℃、44.5℃)加热30 min,放回37℃、5%CO₂培养箱中继续培养72 h,同时每块孔板设立调零孔和阴性对照组,后者为既不加药也不加热即37℃培养72 h 30 min的一组。按MTT法测定吸光度A值,计算IR,并应用Burgi修正公式^[3]对药物联合热疗的相互作用进行判断: $q = E_{A+B} / (E_A + E_B - E_A \times E_B)$ 。其中E_A、E_B分别代表单纯药物和热疗对细胞的抑制率,E_{A+B}为两者合用对细胞的抑制率。若q值大于1.15判为协同作用,q值介于0.85~1.15判为相加作用,q值小于0.85判为拮抗作用。

1.5 统计学方法 采用方差分析和q检验。

2 结果

2.1 单纯热疗对SMMC-7721细胞的杀伤作用 不同温度对SMMC-7721细胞的抑制率不同:(1)40℃、41.5℃热疗组与对照组(37℃)差异均无显著性($P > 0.05$);(2)43℃、44.5℃热疗组与对照组差异均有显著性($P < 0.01$)(见表1)。43℃、44.5℃热疗组在显微镜下见部分培养细胞由贴壁生长变为悬浮,折光性差,而40℃、41.5℃热疗组的细胞却无明显变化,因此40℃、41.5℃对细胞的抑制作用很弱,而43℃、44.5℃对细胞具有很强的抑制作用。

2.2 单纯HCPT对SMMC-7721细胞的杀伤作用 HCPT作用不同时间对SMMC-7721细胞的抑制率差异有显著性($P < 0.01$),作用时间愈长,对细胞的抑制率愈大,IC₅₀就愈小,HCPT对细胞的杀伤作用存在浓度依赖性和时间依赖性(见表2)。

表1 不同温度对SMMC-7721细胞的杀伤作用($n_i = 4; \bar{x} \pm s$)

温度(℃)	A值	抑制率(%)
37(对照)	0.331±0.035	0
40	0.317±0.023	4.2
41.5	0.316±0.019	4.5
43	0.208±0.029 **	37.2
44.5	0.159±0.036 **	52.0
F	28.39	—
P	< 0.01	—
MS组内	0.01	—

q检验:与对照组比较 ** $P < 0.01$

2.3 HCPT 联合热疗对肝癌 SMMC-7721 细胞的杀伤作用 单纯 HCPT 组、热药联合组与单纯热疗组间 A 值差异均有显著性 ($P < 0.01$)。联合组对细胞抑制率高于单纯 HCPT 组和热疗组, 经修正 Burgi 公式计算 q 值, q 值均大于 1.15, 热疗 HCPT 两者间存在协同作用(见表 3)。

表 2 HCPT ($1.0 \mu\text{g/ml}$) 于不同时间 SMMC-7721 细胞的杀伤作用 ($n_i = 4; \bar{x} \pm s$)

作用时间(h)	A 值	抑制率(%)	IC50($\mu\text{g/ml}$)
对照	0.331±0.024	0.0	—
6	0.335±0.045	0.0	> 100
24	0.246±0.018 $\Delta\Delta\#\#$	25.7	2.60
48	0.217±0.021 $\Delta\Delta\#\#$	34.4	1.23
72	0.140±0.025 $^{*}\Delta\Delta$	57.7	0.58
F	33.72	—	—
P	< 0.01	—	—
MS _{组内}	0.001	—	—

q 检验: 与对照组比较 $^{*}\Delta\Delta P < 0.01$; 与 6 h 比较 $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 72 h 比较 $\#\# P < 0.01$

表 3 不同温度联合 HCPT ($1 \mu\text{g/ml}$) 对 SMMC-7721 细胞的杀伤作用 ($n_i = 4; \bar{x} \pm s$)

温度(°C)	热药联合组 A 值	单纯热疗组 A 值	单纯 HCPT 组 A 值	F	P	MS _{组内}	Burgi 公式 q 值
37	0.140±0.025 $\Delta\Delta$	0.331±0.035	0.140±0.025 $\Delta\Delta$	58.96	< 0.01	0.001	—
40	0.081±0.015	0.317±0.023	—	17.19 *	< 0.01	—	1.271
41.5	0.058±0.013	0.316±0.019	—	21.89 *	< 0.01	—	1.369
43	0.012±0.007	0.208±0.029	—	13.14 *	< 0.01	—	1.364
44.5	0.006±0.005	0.159±0.036	—	8.42 *	< 0.01	—	1.341
对照组	0.331±0.035	0.331±0.035	0.331±0.035	0.00	1.00	0.001	—

q 检验: 与热药联合组比较 $\Delta\Delta P < 0.01$; * 示 t 值

3 讨论

早在 100 年前就有学者作过温热治疗肿瘤的尝试, 但由于受到肿瘤热疗加热技术的限制, 肿瘤热疗学发展较慢。近 20 年来由于多学科的介入, 体外加热装置与技术获得很大进步, 并以大量生物学理论为依据, 肿瘤热疗又重新受到重视^[3]。单纯热疗用于人体肿瘤因无法杀灭全体癌细胞群, 效果并不理想, 多数主张热疗合并其他疗法(如化疗、放疗), 它能明显地提高肿瘤的缓解率。本实验 HCPT 联合热疗进行肝癌治疗的体外研究为临床选用合理的热化疗方案提供了实验依据。

本实验发现 40°C 、 41.5°C 各 30 min 对细胞杀伤作用很弱, 而 43°C 、 44.5°C 各 30 min 对细胞具有明

显杀伤作用。HCPT 作用 SMMC-7721 细胞 6、24、48、72 h 的 IC50 分别为 > 100 、2.6、1.23 和 $0.58 \mu\text{g/ml}$, HCPT 最高抑制效应达到 100%。根据药物在体外对肿瘤细胞有杀伤作用的判断标准[合成化合物或植物提取纯品的半数肿瘤细胞抑制浓度 ($\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$) 或植物粗提取物的 $\text{IC}_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$, 并且有细胞毒性计量依赖关系, 其最高抑制效应达 80% 以上], HCPT 对 SMMC-7721 细胞有明显的杀伤作用。本实验结果还显示 HCPT 浓度愈高, 作用时间愈长, 对细胞的抑制率就愈大, IC50 就愈小, 表明 HCPT 存在浓度依赖和时间依赖的特性。HCPT 以高于 PPC 10 倍的浓度 ($12.5 \mu\text{g/ml}$) 作用 6 h SMMC-7721 细胞无明显杀伤作用, 而以 PPC 浓度 ($1 \mu\text{g/ml}$) 作用 72 h 其对细胞的抑制率达到 57.7%。这说明 HCPT 对细胞的杀伤作用以时间依赖为主, 此与氟脲嘧啶的作用特性相似, 如果临床采用低剂量持续静脉输注方法其抗癌效果可能会比一次性静脉推注效果好。HCPT 杀伤细胞的机理, 有许多研究证实: (1) HCPT 作用于 S 期, 为细胞周期特异性药物, S 期的作用较 G1 和 G2 期明显; (2) HCPT 选择性抑制拓扑异构酶 I (topoisomerase I), 干扰 DNA 的复制; (3) 诱导肿瘤细胞发生凋亡^[4]。

HCPT 联合热疗对细胞杀伤作用的结果表明: HCPT 与热疗两者存在明显的协同作用, 不仅 43°C 、 44.5°C 如此, 40°C 、 41.5°C 与 HCPT 合用也有协同作用。两者协同作用的机理^[5] 可能为: (1) 温热破坏细胞膜的稳定性, 使细胞的通透性增加, 使 HCPT 进入细胞内增多; (2) 相互抑制了由温热及 HCPT 引起的肿瘤细胞损伤的修复如 DNA 损伤的修复、DNA 的合成。在人体内是否有此现象, 有待临床观察。

[参 考 文 献]

- [1] 何帮顺, 胡国清. 羟基喜树碱为主联合方案治疗晚期胃肠道肿瘤临床疗效观察[J]. 中国肿瘤临床, 2003, 30(2): 119~121.
- [2] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 世界图书出版社西安分公司, 1996: 135.
- [3] 夏景林, 杨秉辉, 叶胜龙, 等. TNP-470 和 丝裂霉素 联用 对 肝 癌 生 长 和 转 移 抑 制 作 用 的 实 验 研 究 [J]. 癌 症, 2000, 19(4): 341~343.
- [4] Zhang XW, Qing C, Xu B. Apoptosis induction and cell cycle perturbation in human hepatoma hep G2 cells by 10-hydroxycamptothecin[J]. *Anticancer Drugs*, 1999, 10(6): 569~76.
- [5] 李 建 人. 高 热 治 疗 恶 性 肿 瘤 的 临 床 应 用 [J]. 国 外 医 学·肿 瘤 学 分 册, 1994, 21(4): 219~223.