

足叶乙甙与8-甲氧基补骨脂素对人粘液表皮样癌高转移细胞株抑制作用

李焰 吴军正 司徒镇强 刘斌 韩建勋

摘要 目的: 观察足叶乙甙(VP16)与8-甲氧基补骨脂素(8-MOP)联合用药对人粘液表皮样癌高转移细胞株(Mc3)的抑制作用。方法: 采用MTT法及克隆形成法观察VP16与8-MOP联合用药对粘液表皮样癌的抑制作用。结果: Mc3细胞对VP16有较高的敏感性,且呈显著的剂量依赖性,其IC₅₀值为1625.67 ng/ml;小剂量的8-MOP可刺激Mc3细胞增殖,高浓度的8-MOP则明显抑制Mc3细胞生长,其IC₅₀为75500 ng/ml;VP16与8-MOP联合应用时,采用分别低于VP16 IC₅₀的100、320和1000 ng/ml药物浓度,联合用药的合并指数(CI)均小于0.95,分别为0.350、0.599和0.880;VP16对Mc3细胞的生长及克隆形成有明显的抑制作用,IC₅₀为126 ng/ml。结论: 8-MOP与抗癌药物VP16联合应用,显示明显协同抑制效应,VP16对Mc3细胞克隆形成有抑制作用。

关键词 粘液表皮样癌 肿瘤转移 足叶乙甙 8-甲氧基补骨脂素

粘液表皮样癌是常见的涎腺恶性肿瘤,低分化的涎腺粘液表皮样癌侵袭和转移力强,常发生淋巴系统或远隔脏器转移,目前尚缺乏有效的化疗药物,其原因主要是它对传统化疗药物不敏感¹。足叶乙甙(VP16)是一种抗肿瘤植物药,据报道²,VP16在体外对肿瘤细胞有明显的细胞毒作用,有显著的抗癌活性,动物实验表明VP16对小鼠Lewis肺癌的肺转移有抑制作用,使转移灶减少。8-甲氧基补骨脂素(8-MOP)为中药补骨脂的有效成份之一。近年来,第四军医大学口腔医学院口腔生物学教研室有关研究证明,8-MOP对人粘液表皮样癌高转移细胞株(Mc3)有抑制作用。本文观察VP16对Mc3的抑制作用,检测VP16对口腔肿瘤的抗癌活性,同时选择不同剂量的VP16与8-MOP联合应用,旨在观察两种药物联合应用时对Mc3细胞的抑制作用,为临床化疗合理选择理想的抗肿瘤药物,进一步治疗粘液表皮样癌及肿瘤转移等提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人粘液表皮样癌细胞系MEC-1由第四军医大学口腔医学院口腔生物学教研室建立,其高转移细胞株克隆的筛选及其生物学特性见参考文献³。细胞常规培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液中,5% CO₂, 37℃,饱和湿度。VP16(大连制药厂生产),8-MOP(天津药物研究所生

产),采用灭菌溶液配制高浓度贮存液,使用前用培养液稀释至所需浓度。

1.2 细胞生长曲线测定

细胞计数法:细胞常规消化,配制成单细胞悬液,按照 1.0×10^4 /ml浓度接种于24孔培养板,5% CO₂, 37℃培养8 d,每天取1组(3个平行孔)细胞,消化后计数。实验重复3次,取均数绘制细胞生长曲线,同时计算对数生长期的细胞倍增时间。

1.3 细胞数与光吸收值的关系

配制不同密度的细胞悬液,其细胞数为 $1.0 \times 10^3 \sim 3.2 \times 10^5$ /ml,分别接种于96孔培养板,每一浓度设3个平行孔,常规培养24 h,采用MTT法测定每孔光吸收值(OD)。

1.4 MTT法药物敏感性测定

取对数生长期细胞,常规消化,接种于96孔培养板, 1.0×10^3 /孔,24 h后,细胞贴壁,加入6个不同浓度梯度的药液,每一浓度设5个平行孔,VP16剂量为10~3200 ng/ml;对照孔不加药,设12个平行孔,常规培养,药物作用5 d后,按常规MTT比色法测定OD值,实验重复3次,取平均值绘制药物浓度依赖曲线并计算药物的半抑制浓度(IC₅₀值),并根据临床最大用药量(D)药物在血浆中浓度理论值(PPC)⁴计算药物的相对抗肿瘤活性(RAA)⁵。

$$PPC(\mu\text{g/ml}) = \frac{60 \times D(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}/\text{d})}{5000} \times 2 \times 1000$$

$$RAA = \frac{PPC(\mu\text{g/ml})}{IC_{50}(\mu\text{g/ml})}$$

1.5 联合用药

本课题为国家自然科学基金资助项目(编号39370740)
作者单位: 710032 第四军医大学口腔医学院口腔生物学教研室

接种细胞于96孔板, 选用VP16及8-MOP各4个浓度联合应用药物接触方案, 5 d 后以MTT 法测定OD 值, 实验重复3次。取均数绘制联合用药剂量- 效应曲线, 计算 IC₅₀ 值及50% 抑制时联合用药的合并指数(CI₅₀)⁶。

$$CI_{50} = \frac{VP16 \text{用量}}{VP16 IC_{50}} + \frac{8-MOP \text{用量}}{8-MOP IC_{50}}$$

判断标准: CI₅₀ < 0. 95 为协同效应; CI₅₀ > 1. 05 为拮抗效应; CI₅₀ 介于 0. 96~ 1. 04 之间为相加效应。

1. 6 克隆形成法测定VP16对M c3的抑制作用

采用双层琼脂培养法, 铺设含20% 胎牛血清的RPM I 1640的底层培养基于24孔培养板, 琼脂的浓度为0. 5%; 上层培养基琼脂浓度为0. 3%, 同时含有4个不同浓度梯度的药液及500/孔的细胞悬液, 每组设4个平行孔, 对照组不加药, 常规培养2周, 以每个集落细胞数等于或多于50个细胞为一个克隆, 计数, 实验重复2次, 取均数计算克隆形成率, 作图法计算VP16对M c3克隆形成的半抑制浓度(IC₅₀)。

2 结 果

2. 1 细胞数与OD 值的关系

OD 值随着细胞数增加而升高, 采用 Sigma Pbt4. 1 软件分析细胞数量与MTT 还原产物光吸收值的关系, 结果(图1)所示, 接种细胞数量在 1. 0 × 10³ ~ 3. 2 × 10⁵ /m l 范围内与OD 值呈显著正相关, 相关系数 r = 0. 96, 表明MTT 实验适用于该细胞株药物敏感性实验。

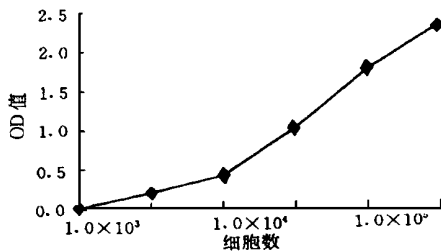


图1 细胞数与对应的OD 值

2. 2 细胞生长曲线

细胞倍增时间为26. 4 h, M c3细胞生长稳定(图2)。

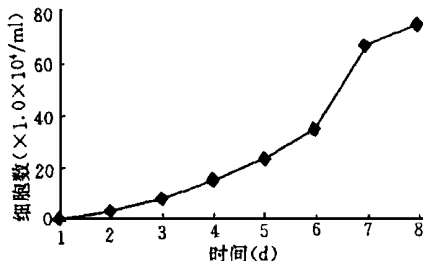


图2 细胞生长曲线

2. 3 药物敏感性实验MTT 法测定

随着VP16药物浓度的增加, 细胞生长明显抑制, 其作用特点表现为明显的浓度依赖性。VP16对M c3细胞作用的 IC₅₀ 值为1625. 67 ng/m l, RAA 值 7. 24 (图3)。小剂量8-MOP 可促进细胞增生, 随着药物浓度的增加, 细胞生长明显抑制, 其对M c3细胞的 IC₅₀ 值为75500 ng/m l(图4)。

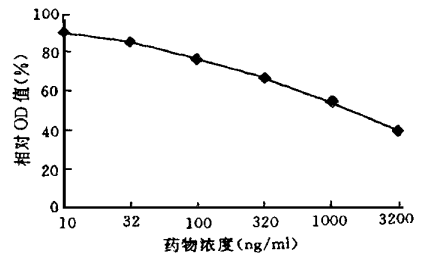


图3 MTT 法测定VP16剂量- 效应曲线

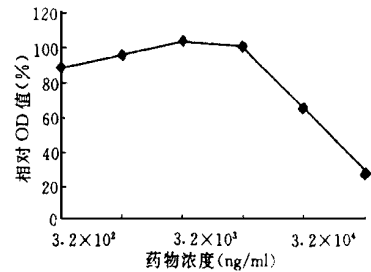


图4 8-MOP 剂量- 效应曲线

2. 4 VP16对M c3细胞克隆形成的抑制作用

不同浓度的VP16不同程度抑制M c3细胞的克隆形成, 随着药物浓度增加, 克隆形成逐渐减少, 呈明显的药物浓度依赖性。根据克隆形成药物剂量- 效应曲线作图(图5), 求得 IC₅₀ 值为126 ng/m l, RAA 值为93. 4(表1)。

表1 不同剂量VP16对M c3细胞克隆形成的影响

药物浓度 (ng/ml)	克隆数	克隆形成率 (%)	克隆抑制率 (%)
0	73. 0	14. 6	
32	63. 3	12. 6	13. 18
100	37. 5	7. 5	48. 63
320	29. 5	5. 9	59. 58
1000	8. 3	1. 67	88. 53

2. 5 联合用药实验

VP16与8-MOP 联合应用, 可增强VP16对细胞的生长抑制作用(表2)。

表2 VP16与8-MOP对M c3细胞联合用药
药物浓度及合并指数

VP16浓度 (ng/ml)	8-MOP的 IC ₅₀ (ng/ml)	CI ₅₀	合用效应
0	75500		
100	21780	0.350	协同
320	30400	0.599	协同
1000	20000	0.880	协同

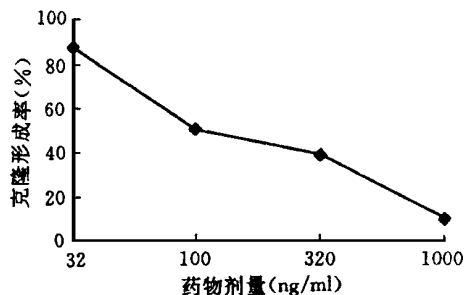


图5 克隆法测定VP16剂量-效应曲线

3 讨 论

肿瘤细胞的浸润、转移过程复杂⁷。为有助于了解癌转移的重要环节,第四军医大学口腔医学院口腔生理学教研室于1990年建立了人粘液表皮样癌细胞系MEC-1,并采用裸鼠体内人工肺转移和体外细胞培养的方法从MEC-1细胞系中筛选出人粘液表皮样癌高转移细胞株(M c3)。近年来又发现,M c3细胞对阿霉素(ADM)、平阳霉素(PYM)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、长春新碱(VCR)等抗癌药物有较强的敏感性。本实验应用VP16作用于人粘液表皮样癌高转移细胞株,根据文献报道⁸加入药物后观察3~6个倍增时间,实验选用药物接触时间为5 d(4~5个倍增时间)。药物敏感性实验MTT法表明,VP16对M c3细胞生长有明显的抑制作用,并呈浓度依赖性。联合用药实验所见,低浓度的VP16不能明显抑制M c3细胞的生长,但其与不同剂量的8-MOP联合应用的药物接触方案,可增强其对细胞的抑制作用,使M c3细胞对VP16的药物敏感性明显增强;单独用药时,小剂量的8-MOP可刺激M c3细胞生长,浓度高则可明显抑制细胞生长。然而,VP16与8-MOP的联合用药,采用分别低于VP16 IC₅₀的100、320和1000 ng/ml等药物浓度与低于8-MOP IC₅₀的剂量联合应用,其联合用药的合并指数(CI)均小于0.95,分别为0.350、0.599和0.880,显示两种药物联合应用具有明显的协同抑制效应。联

合用药可减少化疗药物的使用剂量,减少药物的毒性反应,延缓细胞的耐药性发生,有可能以低剂量的VP16佐以8-MOP获得与高剂量VP16单用的效果,从而减轻VP16的毒副作用,同时在人粘液表皮样癌的治疗,特别是防治转移方面可能有一定意义,值得进一步研究。

在克隆形成率测定试验中同时可见VP16作用于M c3细胞,克隆形成明显减少,并且其克隆形成率减少亦与VP16药物剂量呈浓度依赖性,VP16对M c3细胞的生长抑制和克隆形成抑制表明其在人粘液表皮样癌的治疗,特别是防治转移方面可能有一定意义。另外,值得注意的是MTT法与克隆形成法结果相比较,前者IC₅₀值是后者的12.8倍,RAA值则后者是前者的12.9倍,而克隆形成率与肿瘤细胞的恶性程度,特别是癌侵袭和转移力有关。有资料报道³,M c3细胞克隆形成与肿瘤转移率有明显的相关性,由此根据实验结果推断,VP16可能对人粘液表皮样癌高转移细胞有一定作用。

4 参考文献

- 1 Bloch A. Induced cell differentiation in cancer therapy. *Cancer Treat Rep*, 1984, 68(1): 199~ 201
- 2 韩 锐 肿瘤化学预防及药物治疗. 北京: 北京医科大学·中国协和医科大学联合出版社, 1991: 227~ 278
- 3 吴军正, 司徒镇强, 刘志斌, 等. 涎腺粘液表皮样癌高转移细胞克隆的筛选及其生物学特性. *第四军医大学学报*, 1998, 19(1): 1~ 4
- 4 张友会. 现代肿瘤学. 北京: 北京医科大学·中国协和医科大学联合出版社, 1993: 263~ 264
- 5 Wu Junzheng, Situ Zhenqiang, Wang Wei, et al. Chemosensitivity of salivary gland and oral cancer cell lines. *Clin Med J*, 1992, 105(12): 1026~ 1028
- 6 Tsai CM, Hsiao SH, Frey CM, et al. Combination cytotoxic effects of cis-diamminedichloroplatinum (II) and 5-fluorouracil with and without leucovorin against human non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res*, 1993, 53(5): 1079~ 1084
- 7 周柔丽. 纤维粘连蛋白及层粘连蛋白与肿瘤细胞的浸润和转移. *细胞生物学杂志*, 1985, 2(7): 49~ 54
- 8 Aley MC, Scudiero DA, Monks A, et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res*, 1988, 48(3): 589~ 601

(1998-03-02收稿, 1999-04-02修回)

(下转第345页)

3 讨 论

3.1 眼裂高度增加的原因

重睑成形术使下垂的上睑皮肤上提,并与睑板前筋膜粘着,睁眼时上睑皱褶下部皮肤随睑板整体向上后方向移动并重叠出现皱褶。虽然上睑皮肤表面积未改变,但是皮肤重叠,导致眼裂高度变大。

3.2 睫毛显露长度增大的原因

单睑时上睑下垂的皮肤将睑缘及部分睫毛遮盖,重睑形成后下垂的皮肤被上提,上睑缘显露,睫毛也全长显露。

3.3 睫毛上翘角度增大的原因

重睑成形术使上睑皱褶下部的皮肤与睑板前筋膜粘着,从而使上睑下部皮肤与睑板的运动一体化。睁眼时睑板的运动不仅是向上运动,并同时沿眼球的球面向上后方运动,这种向后的移动造成上睑缘稍呈外翻状,这时睫毛也随之上翘。

3.4 术后外眼形态的整体变化

由于眼裂高度显著增大,眼睛变大,使角膜(黑眼珠)暴露更多,则外眼比术前变得更加明亮有神。粗黑密集的睫毛全长显露,上翘,并向上外方向自然展开,增添了眼睛的美感。重睑皱褶使上睑形成阶梯,上方皮肤形成亮区,皱褶下部皮肤相对呈暗区,上睑缘露出灰色纹理,玉白色的巩膜与清晰透明的黑眼珠相衬托,使外眼出现多层次、颇具魅力的立体效果。

4 参考文献

- 1 宋儒耀 美容整形外科学 北京:北京出版社,1990:19,1895
- 2 张涤生 实用美容外科学 上海:上海科技出版社,1990:39~45

(1999-03-04收稿,1999-08-06修回)

Morphological Changes of External Eyes Before and After Blepharoplasty

Yu Zineng, Wen Bo, Xu Baohua, et al

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology,
West China University of Medical Sciences

Abstract

Objective: To discuss the morphological changes of external eyes before and after blepharoplasty. **Methods:** A survey of 92 patients treated by blepharoplasty was carried out to compare the external eye morphology of pre-operation with that of post-operation. **Results:** It was found significant differences in the post-operative patients, including the increased length and height of eyelids, and obvious changes of the length and angle of the exposed eyelashes. **Conclusion:** Blepharoplasty makes the eyelashes exposed and held up, and increases the up-to-low distance of eyelids. These changes promote the beauty of eyes.

Key words: blepharoplasty morphology of external eyes

(上接第337页)

Inhibitory Effects of Etoposide Combined with 8-methoxypsoralen on Highly Metastatic Human Mucopolymorphous Carcinoma Cells

Li Yan, Wu Junzheng, Situ Zhenqiang, et al

Department of Oral Biology, Stomatological College, the Fourth Military University

Abstract

Objective: To study the inhibitory effects of Etoposide (VP16) combined with 8-methoxypsoralen (8-MOP) on human highly metastatic mucopolymorphous carcinoma cells (M c3). **Methods:** M c3 cells were exposed to the drugs and their combinations at various concentrations. The inhibitory effects were tested with microculture tetrazolium colorimetric assay (MTT assay) and colony forming assay. **Results:** The IC_{50} values of VP16 and 8-MOP were 1625.25 ng/ml and 750000 ng/ml respectively, the CI_{50} of the combination at 100320 and 1000 ng/ml of VP16 with 8-MOP were 0.350, 0.599 and 0.880 respectively. **Conclusion:** The data indicate that combination of VP16 and 8-MOP is synergic in the inhibition of M c3 cell growth.

Key words: mucopolymorphous carcinoma neoplasm metastasis etoposide 8-methoxypsoralen