

人口腔鳞癌细胞系对淋巴靶向葫芦素 BE 聚乳酸纳米微粒的敏感性研究

杨 凯 王昌美 温玉明 李龙江 王晓毅 陈绍维

摘要 目的:探讨人口腔鳞癌细胞系(Tca8113和BcaCD885)对颈淋巴结靶向性葫芦素BE聚乳酸纳米微粒(CuBE-PLA-NP)的敏感性。方法:用四唑盐显色法(MTT法)检测用不同剂量的CuBE-PLA-NP和CuBE在1~8d内8个时间点对Tca8113和BcaCD885的抗癌活性,计算出2种药物在8个时间点对2种癌细胞的抑癌率和药物的半数抑癌率浓度。结果:CuBE-PLA-NP和CuBE对Tca8113和BcaCD885均有强的杀伤作用,其杀伤效应均呈时间依赖性和剂量依赖性。结论:经改型后的淋巴靶向CuBE-PLA-NP没有降低CuBE成份的抗癌活性,同时,由于CuBE-PLA-NP具有淋巴靶向性,更有利于杀灭口腔癌颈淋巴结转移灶内的癌细胞。

关键词 葫芦素BE 聚乳酸 纳米微粒 口腔癌 颈淋巴结转移 靶向化疗 四唑盐显色法

Effects of Cucurbitacin BE Poly(lactic Acid) Nanoparticles on Human Oral Squamous Carcinoma Cell Lines

Yang Kai

Department of Stomatology, the First Medical Hospital, Chongqing Medical University

Wang Changmei, Wen Yuming, Li Longjiang, et al

West China College of Stomatology, Sichuan University

Abstract

Objective: The aim of this study was to study cytotoxic effects of cucurbitacin BE poly(lactic acid) nanoparticles (CuBE-PLA-NP) on human oral squamous carcinoma cell lines Tca8113 (tongue carcinoma) and BcaCD885 (buccal carcinoma). **Methods:** The chemosensitivity of Tca8113 and BcaCD885 to CuBE-PLA-NP and CuBE was tested using MTT assay, the inhibitory rate and 50% inhibition concentrations values (IC₅₀) of these two drugs against these two cancer cell lines were evaluated in 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 days with different concentrations. **Results:** Both CuBE-PLA-NP and CuBE showed very high anti-cancer effects on Tca8113 and BcaCD885, and the anticancer efficacy of these two drugs was dose- and time-dependent. **Conclusion:** The effects of CuBE-PLA-NP on lymph nodes of metastatic cancer cells were higher than that of CuBE.

Key words: cucurbitacinBE poly(lactic acid) nanoparticles oral carcinoma cervical lymph node metastasis targeted chemotherapy MTT assay

研究¹证明:葫芦素BE(cucurbitacinBE, CuBE)对人类高分化鳞癌细胞株BcaCD885和人舌低分化鳞癌细胞株Tca8113有较强的杀伤作用。在此基础上,

作者根据口腔癌周毛细淋巴管的解剖生理特点,选择聚乳酸(poly(lactic acid), PLA)为载体,CuBE为模型药物,合成制备具有颈淋巴结靶向性的葫芦素BE聚乳酸纳米微粒(cucurbitacinBE poly(lactic acid) nanoparticles, CuBE-PLA-NP)²以对口腔癌颈淋巴结转移灶行靶向化疗。本研究用四唑盐显色法(MTT法)体外检测CuBE-PLA-NP对人口腔鳞癌细胞(Tca8113和BcaCD885)的抗癌活性,并与CuBE的抗癌活性对比观察,为以后的实验提供依据。

本课题为卫生部科学基金(编号98-1-221)及重庆医科大学附属第一医院科研启动基金(编号2002007)资助项目

作者单位:400016 重庆医科大学附属第一医院口腔颌面外科(杨凯),四川大学华西口腔医学院(王昌美,温玉明,李龙江,王晓毅),中山大学附属第二医院口腔外科(陈绍维)

1 材料和方法

1.1 实验材料

人舌低分化鳞癌细胞株 Tca8113 和人类高分化鳞癌细胞株 BcaCD885(原华西医科大学卫生部口腔生物医学工程重点实验室提供); CuBE(天津药物研究所); CuBE-PLA-NP 和 PLA-NP(原华西医科大学药学院药剂教研室提供)。

1.2 设立测试抑癌药物浓度

先行预实验,初步确定实验药物的浓度范围为 0.1 ~ 10.0 μg/ml,在正式实验中,依次测试 5 个药物浓度:0.01、0.10、1.00、10.00、20.00 μg/ml。CuBE-PLA-NP 的浓度系指其内所含 CuBE 量的浓度。

1.3 实验步骤

将生长旺盛的 Tca8113 和 BcaCD885 癌细胞经胰酶消化后用含 15%小牛血清的 PRMI1640 培养液制备成癌细胞悬液,以每孔 190 μl 接种于 96 孔培养板上,共 8 板,每孔癌细胞数量为 2 × 10⁴ 个/孔,培养 24 h 后加入 10 μl 不同高浓度的 CuBE 和 CuBE-PLA-NP 药液,使之稀释成所依次测试的 5 个药物浓度:0.01、0.10、1.00、10.00、20.00 μg/ml,设立 2 个对照组, CuBE 的对照组加入等量的 10 μl 培养液, CuBE-PLA-NP 的对照组加入 10 μl PLA-NP 液(以抵消 PLA-NP 微粒可能对光密度值的影响),每组 4 孔,分别培养至 1、2、3、4、5、6、7、8 d 后,每孔加入 30 μg MTT 液,继续培养 4 h,吸除孔内液体,每孔加入 200 μl 二甲基亚砷,振荡 10 min 后用 BIO-TEK 自动微板读数仪测定光吸收值(OD),波长为 595 nm。

1.4 半数抑癌率浓度值(IC₅₀)的测定

表 1 CuBE 和 CuBE-PLA-NP 对 Tca8113 和 BcaCD885 在不同时间点的 IC₅₀值(μg/ml)

Tab 1 IC₅₀ values of CuBE and CuBE-PLA-NP to Tca8113 and BcaCD885 at various time points

药物	细胞株	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d
CuBE	Tca8113	0.625	0.461	0.372	0.126	0.083	0.081	0.081	0.079
	BcaCD885	1.153	0.928	0.813	0.507	0.332	0.329	0.327	0.325
CuBE-PLA-NP	Tca8113	1.324	0.731	0.611	0.457	0.221	0.131	0.107	0.082
	BcaCD885	2.453	1.835	1.475	1.126	0.883	0.675	0.421	0.310

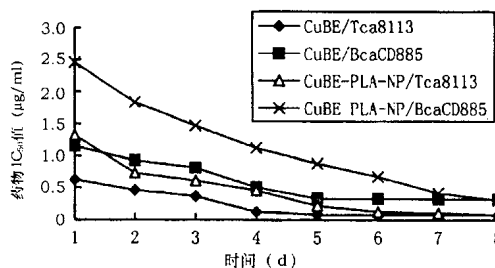


图 1 CuBE 和 CuBE-PLA-NP 对 Tca8113 和 BcaCD885 的时间依赖性杀伤曲线

Fig 1 Time-response curve of CuBE and CuBE-PLA-NP against Tca8113 and BcaCD885

IC₅₀值是指使细胞生长抑制达 50% 时药物的浓度,在 MTT 实验中,IC₅₀值也可用使光吸收值降低至对照组的 50% 时药物的浓度来表示¹,用这一对应关系根据 OD 值即可得出 IC₅₀值^{3,4},其值越小,药物的抑癌作用越强,其中 OD 值用每组各孔中的 OD 值的均值(OD)计算。

1.5 抑癌率的计算

据 OD 值可计算各组的抑癌率,并可判断各种药物的抑癌敏感性。抑癌率(%) = $\frac{\text{对照孔OD} - \text{实验孔OD}}{\text{对照孔OD}} \times 100\%$,判断抑癌敏感程度的标准为:敏感(抑癌率 > 50%);中等敏感(抑癌率 30% ~ 50%);不敏感(抑癌率 < 30%),据前期研究⁵ 结果选择第 5 天时观察药物剂量依赖性杀伤效应。

2 结果

2.1 IC₅₀的测定

以半数抑癌率浓度值(IC₅₀)来比较 CuBE 和 CuBE-PLA-NP 在 1 ~ 8 d 内不同的时间点对 Tca8113 和 BcaCD885 的杀伤效应(表 1),时间依赖性杀伤效应曲线见图 1。从表 1 和图 1 可看出:CuBE 对 Tca8113 和 BcaCD885 的时间依赖性杀伤效应主要在用药物后的前 5 d,5 d 后其时间依赖性杀伤效应增加很小,但 CuBE-PLA-NP 由于是缓释剂,它对 Tca8113 和 BcaCD885 的时间依赖性杀伤效应一直持续在整个实验的 8 d,但在相同浓度的相同时间点,其 IC₅₀大于 CuBE 的 IC₅₀。

2.2 抑癌率

第 5 天时,CuBE 和 CuBE-PLA-NP 对 Tca8113 和 BcaCD885 的抑癌率情况见表 2。其剂量依赖性杀伤效应曲线见图 2。从表 2 和图 2 可看出:CuBE 和 CuBE-PLA-NP 对 Tca8113、BcaCD885 均有高度敏感的杀伤活性,且这种杀伤作用呈剂量依赖性,即药物浓度越大,杀伤作用越强。

3 讨论

目前,MTT 法被认为是一种能较好地反映体内

情况的体外筛选抗癌药物的方法^{5,6},本实验采用MTT法反映药物对细胞的抑制率,方法简便,结果可信。

表2 第5天时 CuBE 和 CuBE-PLA-NP 对 Tca8113 和 BcaCD883 的抑癌率(%)

Tab 2 Inhibition rate of CuBE and CuBE-PLA-NP against Tca8133 and BcaCD885 at 5 d(%)

药物浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	CuBE		CuBE-PLA-NP	
	Tca8113	BcaCD885	Tca8113	BcaCD885
0.01	19.1	9.8	13.2	-
0.10	62.3	38.2	35.9	14.3
1.00	86.8	77.3	81.0	53.2
10.00	100.0	93.6	100.0	81.8
20.00	100.0	100.0	100.0	94.1

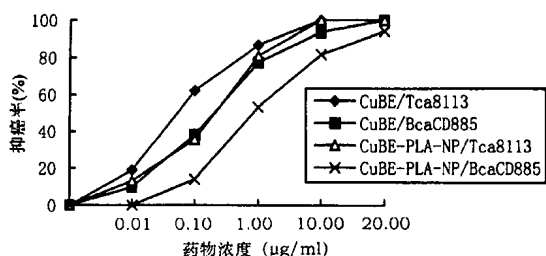


图2 CuBE 和 CuBE-PLA-NP 对 Tca8113 和 BcaCD883 的剂量依赖性杀伤效应曲线

Fig 2 Dose-response curve of CuBE and CuBE-PLA-NP against Tca8133 and BcaCD885

从本实验结果可看出:CuBE-PLA-NP 与 CuBE 对 Tca8113 和 BcaCD885 均有强的杀伤作用,其杀伤作用呈剂量和时间依赖性,但 CuBE 抗癌效应的时间依赖性主要在用药前 5 d 之内,5 d 后其抗癌效应随时间增大的变化很小,前期体外释药实验⁵发现,CuBE-PLA-NP 在 5 d 时释放的总药量已接近 70%,加之 Tca8113 和 BcaCD885 在 5 d 时也已经历了约 4 个倍增时间,而且,无论 CuBE 或 CuBE-PLA-NP 在 5 d 时其 IC_{50} 值均在实验测试的浓度范围内(0.01~20.00 $\mu\text{g/ml}$),因此,作者选择第 5 天来着重观察药物的剂量依赖性杀伤效应较为客观合适。由于 CuBE-PLA-NP 是缓释剂,它的抗癌时间依赖性杀伤效应一直持续到本实验的最后时间点,即第 8 天。本实验证实了作者所制备的 CuBE-PLA-NP 没有降低其内 CuBE 成份的抗癌活性,它对人口腔鳞癌细胞具有强的杀伤作用,其杀伤作用呈时间和剂量依赖性。本体外药敏实验为以后的动物实验和临床实验提供了依据。

CuBE-PLA-NP 在各个时间点对两种癌细胞的杀伤力均比 CuBE 小,这是因为 CuBE-PLA-NP 是缓

释剂,药物的释放需要一定的时间,结合前期研究的 CuBE-PLA-NP 体外缓释实验可知²,CuBE-PLA-NP 内所含药物在 7 d 时其累计释放药量仅为 71.2%,因此,此结果仅仅只代表体外抑癌情况,并没反映药物在伴随着有不断被分解代谢的体内抑癌情况,更没有反映出 CuBE-PLA-NP 在体内具有靶向性的优势。但从上表 IC_{50} 值得出一个肯定结论:CuBE-PLA-NP 对 Tca8113 和 BcaCD885 仍有强大的杀伤作用。从体外实验中看,Tca8113 对 CuBE 和 CuBE-PLA-NP 比 BcaCD885 更为敏感。由于 CuBE-PLA-NP 是缓释剂,其药物释放需要一定的时间,因此,在相同时间点和相同浓度时 CuBE 的抗癌效应高于 CuBE-PLA-NP,但这是体外情况,如果在体内,CuBE 的半衰期是 10.6 h^7 ,它很快不断地被分解代谢,难以象体外一样维持持续有效的浓度,而且 CuBE 无靶向性,它高浓度的分布区不一定是治疗靶区,由于 CuBE-PLA-NP 是缓释靶向制剂,它能在 CuBE 不断地被分解代谢的同时,不断释放补充新的 CuBE,以便在治疗靶区能维持持续有效的药物浓度,从而更有效地杀灭癌细胞。

参考文献

- 1 杨凯,温玉明,李超英,等.口腔鳞癌细胞系对葫芦素 BE 的敏感性研究.临床口腔医学杂志,2001,17(1):17~18
- 2 杨凯,温玉明,李龙江,等.颈淋巴靶向葫芦素 BE 聚乳酸纳米微粒冻干制剂的研制.华西口腔医学杂志,2001,19(6):347~349
- 3 Carmichael J, Mitchell JB, DeGraff WG, et al. Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay. Br J Cancer, 1988, 57(6):540~547
- 4 Ohe Y, Nakagawa K, Fujiwara Y, et al. In vitro evaluation of the new antitumor agents KT6149, MX-Z, SM5887, menogaril, and liblemycin using cisplatin-or-adriamycin-resistant human cancer cell lines. Cancer Res, 1989, 49(10):4098~4102
- 5 Hof's HP, Wagener DJ, Bakker V. Concentration and sequence dependent synergism of ethyldeshydroxy-sparsomycin in combination with antitumor agents. Anticancer Drugs, 1994, 5(1):35~42
- 6 Nozue M, Hishida M, Todoroki T, et al. Selection of three of 24 anticancer agents in poorly differentiated gastric cancer cell lines evaluated by the AVC delta IC_{50} ratio. Anticancer Drugs, 1995, 6(2):291~302
- 7 刘颖菊,刘文清.葫芦素的药理与临床应用.中草药,1992,23(11):605~608

(2001-08-31 收稿)

(本文编辑 刘怡)