

多西紫杉醇联合丝裂霉素 C 抑制宫颈癌细胞的增殖与迁移作用

竹 梦^{1,2},高文蔚^{1,2},舒 怡^{1,2},付贵华^{1,2},魏 巍^{1,2},范 彪⁴,魏 蕾^{1,2,3}

Effect of Docetaxel Combined with Mitomycin C on Proliferation and Migration of HeLa Cells

ZHU Meng^{1,2}, GAO Wenwei^{1,2}, SHU Yi^{1,2}, FU Guihua^{1,2}, WEI Wei^{1,2}, FAN Biao⁴, WEI Lei^{1,2,3}

1. Department of Pathology and Pathophysiology of Wuhan University, Wuhan 430071, China; 2. The Central Laboratory of Basic Medical Science; 3. Hubei province Allergy and the immunity related disease focal point laboratory; 4. The Second College of Clinical Medicine

Corresponding Author: WEI Lei, E-mail: leiweif r@hotmail.com

Abstract :Objective To investigate effect of Docetaxel(Doc)combined with Mitomycin C (MMC) on proliferation and migration of HeLa cells. **Methods** Proliferation and migration ability of HeLa cells were tested by MTT and wound healing assay respectively. The combined effect of Doc and MMC was evaluated by "Q value". **Results** The inhibition effect of Doc or MMC on proliferation of HeLa cells was dose dependent (Doc:0.5 μg/L vs 0.1 μg/L, $P < 0.05$; MMC:10 μg/L vs 2.5 μg/L, $P < 0.05$); "Q value" exceed 1.0, which indicated the synergistic effect of Doc and MMC. The migration velocity of cells in (Doc + MMC) group (0.035 μm/h) was lower than Control (0.173 μm/h, $P < 0.05$) group, Doc (0.079 μm/h) and MMC (0.075 μm/h) group. **Conclusion** Doc and MMC dose-dependently inhibit proliferation and migration of HeLa cells respectively, and there was synergistic effect of the combination therapy. That may be on account of the different targets of two drugs.

Key words:Docetaxel;MMC;HeLa cells;Proliferation;Migration

摘 要:目的 探讨多西紫杉醇(Doc)联合丝裂霉素 C(MMC)抑制宫颈癌细胞的增殖与迁移作用。方法 MTT实验测定 HeLa 细胞增殖能力,损伤修复实验测定细胞迁移速度。计算 Q 值反映多西紫杉醇和丝裂霉素 C 联合用药效果。结果 多西紫杉醇、丝裂霉素 C 都能够抑制 HeLa 细胞的增殖,作用具有浓度依赖性(Doc:0.5 μg/L vs 0.1 μg/L, $P < 0.05$; MMC:10 μg/L vs 2.5 μg/L, $P < 0.05$);Q 值 > 1,显示两者联合用药有相加作用;同时损伤修复实验显示联合用药组细胞迁移速度(0.035 μm/h)显著低于空白对照组(0.173 μm/h, $P < 0.05$)及单独用药组(Doc 0.079 μm/h, MMC 0.075 μm/h)。结论 多西紫杉醇和丝裂霉素 C 能抑制宫颈癌细胞增殖与迁移,具有一定量效关系;两者联合用药具有协同作用,这可能与两者药效学靶点不同有关。

关键词:多西紫杉醇;丝裂霉素 C;HeLa 细胞;增殖;迁移

中图分类号:R737.3 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2008)12-0866-03

0 引言

宫颈癌是女性生殖系统常见的三大恶性肿瘤之一,死亡率居妇科恶性肿瘤首位,严重威胁着妇女的生命和健康。目前,宫颈癌的治疗方法多采用手术、化疗等综合治疗方法。宫颈癌的化疗方案较多,但大多数毒性、副反应较大,因此寻找一些毒性小、副

反应少且有一定疗效的新化疗方案显得极其重要。本研究探讨多西紫杉醇(Doc)、丝裂霉素 C(MMC)单独或联合应用对 HeLa 细胞的影响,观察经不同浓度 Doc、MMC 单独和联合处理后 HeLa 细胞增殖与迁移的变化,以期为临床上药物治疗宫颈癌以及联合用药等方面提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人宫颈癌 HeLa 细胞由武汉大学典型培养物保藏中心提供;RPMI1640 培养基购自 Hyclone 公司;新生胎牛血清购自 Gibco 公司;MTT 购自 Amresco 公司;DMSO 购自 Amresco 公司;多西紫杉醇购自山东齐鲁制药有限公司;丝裂霉素 C 购自浙江海正

收稿日期:2008-01-28;修回日期:2008-06-25

基金项目:四川大学 CMB 华西医学教育研究中心资助项目(CMB# 00-721);武汉大学 2007 年大学生科学研究和创新性实验面上项目(445#)

作者单位:1. 430071 武汉大学基础医学院病理学与生理生理学系,2. 基础医学院实验教学中心,3. 湖北省过敏及免疫相关疾病重点实验室,4. 第二临床学院

通信作者:魏蕾, E-mail: leiweif r@hotmail.com

作者简介:竹梦(1987-),男,本科,主要从事肿瘤病理生理的研究

药业股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 常规培养宫颈癌细胞(HeLa 细胞)

10 %小牛血清、100 u/ml 青霉素、100 u/ml 链霉素 RPMI1640 培养液,置 37、5 %CO₂ 饱和湿度培养箱培养备用。细胞分四组:空白对照组(Con)、多西紫杉醇组(Doc)、丝裂霉素 C 组(MMC)、多西紫杉醇 + 丝裂霉素 C 组(Doc + MMC)。

1.2.2 MTT 实验

0.25 %胰酶消化细胞,10 %小牛血清 RPMI1640 培养液配成 2 ×10⁴/ml 的悬液,加入 96 孔板,每孔 200 μl。37、5 % CO₂ 培养 24 h。设空白对照(Con)组、不同浓度 Doc 组(0、0.25、0.5、1、10、40、100 μg/L)、不同浓度 MMC 组(0、2.5、5.0、10、20 μg/L)、Doc + MMC 组,每组 5 复孔,加药,培养 72 h。实验终止前 4 h 每孔加 5 mg/ml MTT 液 20 μl,继续培养 4 h,快速倾倒入弃上清,每孔加二甲亚砜(DMSO)100 μl,轻轻震荡 10 min,结晶物充分溶解后酶标仪比色,570 nm 波长处测定吸光度 OD 值。实验重复 3 次。计算抑制率:抑制率(%) = (1 - 加药组平均 OD 值/对照组平均 OD 值) ×100 %。

使用公式:Q = E / (P_A + P_B - P_A × P_B) 观察联合用药有无相加作用。其中 P_A 代表 A 药效果,P_B 代表 B 药效果,P_A + P_B - P_A × P_B 即为两药合用效果期望值,E 为 A、B 两药合用实际观察值。若 Q = 1,说明实际疗效是两药效果相加;Q > 1,说明实际疗效超过相加;Q < 1,说明两药可能相互拮抗。

1.2.3 损伤修复实验

10 %小牛血清 RPMI1640 培养液调 HeLa 细胞浓度 2 ×10⁵/ml,12 孔板加细胞悬液 200 μl/孔,重复 3 孔,细胞长成单层换 1 %小牛血清的 RPMI1640 培养液同步化 12 h,划“一”字形划痕,PBS 冲洗。Con 组加培养液,实验组加 Doc(0.5 μg/L)、MMC(10 μg/L)和 Doc(0.5 μg/L) + MMC(10 μg/L),每组 5 复孔,拍照,37、5 % CO₂ 培养箱培养 24 h 拍照,测迁移距离,实验重复 3 次。计算迁移速度:迁

移速度 = 迁移距离/迁移时间。

1.2.4 统计学方法

SPSS 15.0 统计软件分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示;组内各剂量方差分析,联合用药组各剂量单因素析因分析。

2 结果

2.1 多西紫杉醇、丝裂霉素 C 对 HeLa 细胞增殖影响

Doc、MMC 单独用药,随着作用浓度增大,Doc(浓度:0.1、0.5、1、10、40、100 μg/L) 抑制 HeLa 细胞增殖作用 [抑制率(%) : 23.43 ± 8.28、28.81 ± 10.39^{*}、35.51 ± 6.02、32.05 ± 9.18、33.41 ± 14.50、44.12 ± 28.56, (n = 5, ^{*} P < 0.05 vs 0.1 μg/L)], MMC(浓度:2.5、5、10、20、100 μg/L) 抑制 HeLa 细胞增殖作用 [抑制率(%) : 32.87 ± 8.61、43.57 ± 3.39、46.09 ± 0.25^{*}、57.33 ± 3.40、63.11 ± 0.75, (n = 5, ^{*} P < 0.05 vs 2.5 μg/L)] 均增强,并且两者之间存在正相关关系 (r_{Doc} = 0.895, P_{Doc} = 0.016 < 0.05 r_{MMC} = 0.786, P_{MMC} = 0.0115 < 0.05)。

表 1 显示:Doc、MMC 联合用药,HeLa 细胞 MTT 值较两者单独使用显著下降,平均抑制率明显增高。计算 Q 值,选取 Doc、MMC 联合用药代表性一组计算 Q 值:Doc(0.5 μg/L) + MMC(10 μg/L),抑制率为 59.01 %, Q 值为 1.2425 > 1,提示两者联合用药对 HeLa 细胞增殖抑制起协同作用。

2.2 多西紫杉醇、丝裂霉素 C 对 HeLa 细胞迁移影响

表 2 显示:两者单独使用细胞迁移能力均小于对照组,这表示 Doc、MMC 均影响细胞迁移能力。两者联合用药对细胞迁移能力影响更为显著,迁移速度远小于对照组,也较单独用药组小很多,差异具有统计学意义,提示两者联合用药可以增强彼此抑制细胞迁移作用。

3 讨论

多西紫杉醇选择性地与微管蛋白 亚基 N-末端第 31 位氨基酸结合,促进微管蛋白聚合成稳定的

表 1 多西紫杉醇联合丝裂霉素 C 对 HeLa 细胞增殖影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab 1 Proliferation inhibition effect of Doc combined with MMC on HeLa cells($\bar{x} \pm s, n = 5$)

MMC (μg/L)	Doc(μg/L)				
	10	1	0.5	0.1	0
20	77.94 ± 1.23 [#]	66.57 ± 0.66	64.58 ± 3.18	63.45 ± 6.17	65.88 ± 3.84
10	73.25 ± 3.13 [#]	64.50 ± 17.9 [#]	59.01 ± 1.93 [#]	55.01 ± 5.17 [#]	26.24 ± 9.50
5	63.23 ± 11.14 [#]	52.65 ± 14.30 [#]	41.62 ± 16.19	38.71 ± 6.56	25.37 ± 13.54
2.5	39.01 ± 37.41	37.61 ± 8.72	30.13 ± 4.43	26.60 ± 7.45	17.93 ± 24.26
0	32.05 ± 9.18	35.51 ± 6.02	28.81 ± 10.39	23.43 ± 8.28	0

[#] : Q > 1 vs 0 μg/L group

表 2 多西紫杉醇联合丝裂霉素 C 对 HeLa 细胞迁移影响 ($\bar{x} \pm s, n=3, \mu\text{m/h}$)

Tab 2 Effect of Doc combined with MMC on migration of HeLa cells ($\bar{x} \pm s, n=3, \mu\text{m/h}$)

Time (h)	Con	Doc (0.5 $\mu\text{g/L}$)	MMC (10 $\mu\text{g/L}$)	Doc(0.5 $\mu\text{g/L}$) + MMC(10 $\mu\text{g/L}$)
0 ~ 12	0.127 \pm 0.093	0.109 \pm 0.093	0.065 \pm 0.021	0.033 \pm 0.085
0 ~ 24	0.173 \pm 0.093	0.079 \pm 0.045	0.075 \pm 0.030	0.035 \pm 0.106*

*: $P < 0.05$ vs Con group

微管,抑制微管解聚,从而形成稳定的微管束,破坏微管系统的正常平衡,导致增殖期的肿瘤细胞阻滞在 G_2/M 期,并且诱导该期细胞凋亡^[3-4]。研究表明,多西紫杉醇可以诱导 bcl-2 蛋白磷酸化,从而使其抑制凋亡功能下降,破坏促凋亡蛋白与抗凋亡蛋白之间的平衡,导致细胞凋亡^[5]。多西紫杉醇对多种肿瘤都有很强的抗癌活性,临床单一用药有效率达到 30%~50%,通过调整给药剂量和给药方案,可将有效率提高 20%左右,但是由于多西紫杉醇价格昂贵,限制了其应用范围。

丝裂霉素 C 是一种周期非特异性抗肿瘤抗生素,通过与 DNA 的共价交联而抑制 DNA 的复制或使其中的一条 DNA 链烷基化,阻止有丝分裂,从而导致细胞死亡。丝裂霉素 C 可引起细胞周期时相变化,降低细胞 DNA 合成 S 期细胞数量,中断 G_2/M 期向 G_1 期的转化,导致细胞增殖停滞在 G_2/M 期,增加了 G_2/M 期细胞数目^[1-2];此外低剂量丝裂霉素 C 使 CD_4^+ 辅助细胞功能上调, CD_8^+ 抑制细胞功能下调,从而表现为细胞免疫功能增强,并且 CD_4^+ 辅助细胞功能增强可以促进 B 细胞分化成熟,产生大量抗体,增强机体体液免疫功能^[6],因而减轻化疗药物带来的毒副作用。

丝裂霉素 C 可导致细胞增殖被阻断在 G_2/M

期,增加 G_2/M 期细胞数目,多西紫杉醇可诱导停滞在 G_2/M 期肿瘤细胞凋亡,因此两者联合使用可能具有一定的协同作用。本实验研究结果表明:多西紫杉醇、丝裂霉素 C 单独或联合使用均可抑制 HeLa 细胞增殖和迁移,且两者联合用药有相加作用 (Q 值 > 1)。这两种药物的联合使用既发挥了丝裂霉素 C 价格相对便宜且小剂量可以增强机体的免疫功能的优势,又可以表现出多西紫杉醇近期疗效肯定、毒副作用较小的特点,因此两者联合应用在增强患者化疗效果、减少患者痛苦、减轻患者及其家属经济负担等方面是很有前景的,这可能会为宫颈癌的治疗新方案提供一定的理论基础,但是最佳方案及给药途径还有待临床试验进一步确定。

参考文献:

- [1] 时京,孔垂泽,王侠,等. 丝裂霉素 C 与 C2-神经酰胺或抗 Fas 单克隆抗体联合治疗膀胱癌的体外研究[J]. 中国医科大学学报, 2007, 36(1): 41-46.
- [2] Isbarn H, Budaeus L, Pichlmeier U, et al. Comparison of the effectiveness between long-term instillation of mitomycin C and short-term prophylaxis with MMC or bacille Calmette-Guerin. Study of patients with non-muscle-invasive urothelial cancer of the urinary bladder[J]. Urology, 2008, 47(5): 608-615.
- [3] Morqan TM, Pitts TE, Gross TS, et al. RAD001 (Everolimus) Inhibits Growth of Prostate Cancer in the Bone and the Inhibitory Effects Are Increased by Combination With Docetaxel and Zoledronic Acid[J]. The Prostate, 2008, 68(8): 861-871.
- [4] Koshiyama M, Kinezak M, Uchida T, et al. Chemosensitivity testing of paclitaxel versus docetaxel in human gynecological carcinomas: A comparison with carboplatin[J]. Anticancer Reserch, 2006, 26(5B): 3655-3659.
- [5] 蔡昱. 多西紫杉醇抑制宫颈癌细胞低氧诱导因子-1 基因低氧性活化的影响[J]. 现代医药卫生, 2008, 24(8): 1109-1111.
- [6] 黄丙俭,贺放学. 低剂量丝裂霉素对癌症患者免疫功能的影响[J]. 医药导报, 2005, 24(3): 201-203.

[编辑:周永红;校对:杨 卉]