

# 全反式维甲酸与 8-甲氧基补骨脂素联合应用 对口腔鳞癌细胞系的抑制作用

闫晓光 吴军正 陈建元

**摘要** 为研究全反式维甲酸(RA)与8-甲氧基补骨脂素(8-MOP)联合应用对2种口腔鳞癌细胞系的抑制作用特点,应用MTT法测试并绘制药物抑制曲线,用倒置显微镜观察细胞形态变化。结果表明:30%细胞生长抑制时,联合用药合并指数(CI<sub>50</sub>)不大于0.82;50%细胞生长抑制时,联合用药合并指数(CI<sub>50</sub>)在0.9到0.95之间,表明两药联合应用对2种口腔鳞癌细胞系呈现协同效应。单独应用RA、8-MOP或二者联合应用,有类似凋亡小体样结构出现。合适浓度的RA与8-MOP联合应用的临床价值有待进一步研究。

**关键词** 8-甲氧基补骨脂素 全反式维甲酸 舌癌 牙龈癌

8-甲氧基补骨脂素(8-MOP)做为PUVA疗法(psoralen ultraviolet A)的主要成分被广泛地应用在皮肤病治疗领域;全反式维甲酸(RA)是白血病分化诱导治疗的典型药物,在临床上有肯定的疗效。本文研究二者联合应用抗口腔癌的作用,旨在减少RA与8-MOP单独应用时的毒副作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞系

舌癌细胞系Tca8113由上海第二医科大学第九医院颌面外科提供,龈癌细胞系Ca9-22由日本癌研究组织库提供,细胞培养条件是:37℃,5%CO<sub>2</sub>及饱和湿度,培养液用含10%灭活胎牛血清的RPMI1640。

### 1.2 药物

8-MOP为天津药物研究院产品,RA为SIGMA产品。各种药物溶液均为无菌配制,使用时培养液稀释至所需浓度<sup>1</sup>。

### 1.3 药物对细胞增殖抑制作用的测定

药物对细胞生长的抑制作用按常规MTT法在96孔培养板中进行<sup>2</sup>,每种药按5倍级差配制4个浓度,每组设3个孔,药物作用时间为5d,实验重复3次,取平均值。

### 1.4 数据处理与分析

肿瘤细胞生长抑制率(%)=(对照组光吸收值-实验组光吸收值)/对照组光吸收值×100%。应用EXCEL软件绘制药物抑制作用拟合曲线,用作图法分别求出30%和50%细胞生长抑制时的药物浓度,并计算出30%和50%细胞生长抑制时8-MOP与RA联合用药的合并指数CI<sub>X</sub>(X=30或50)<sup>3</sup>:

$$CI_X = \frac{\text{联合用药时8-MOP用量} + \text{联合用药时RA用量}}{\text{单独用药时8-MOP用量} + \text{单独用药时RA用量}}$$

当CI<0.95时,表示两种药物呈协同作用;CI>1.05时,为拮抗作用;0.95<CI<1.05时,为相加作用。

### 1.5 相差显微镜观察细胞形态变化

加药以后5d内连续观察细胞形态的变化,第五天加MTT,4h后观察细胞活力。

## 2 结果

### 2.1 8-MOP与RA联合应用对2种细胞的抑制作用

小剂量RA与8-MOP联合应用表现出协同作用,随RA剂量的加大,依次表现出相加或拮抗作用(表1,图1~4)。

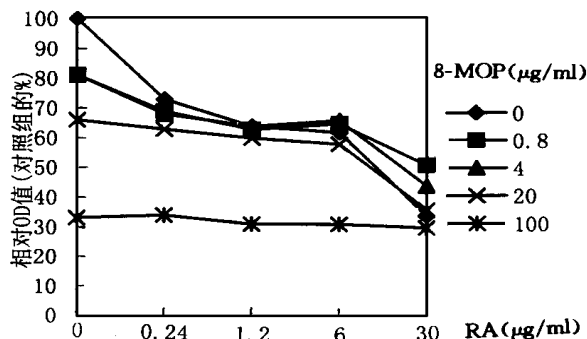


图1 RA单独应用及与8-MOP联合应用对舌癌细胞的生长抑制曲线

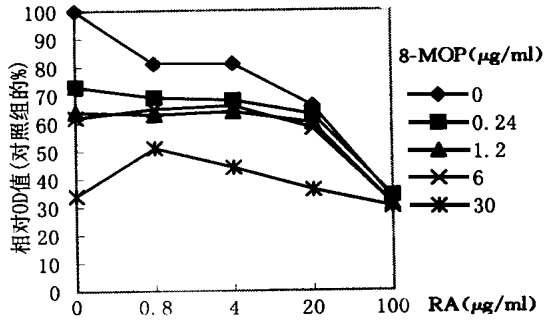


图2 8-MOP 单独应用及与 RA 联合应用对舌癌细胞的生长抑制曲线

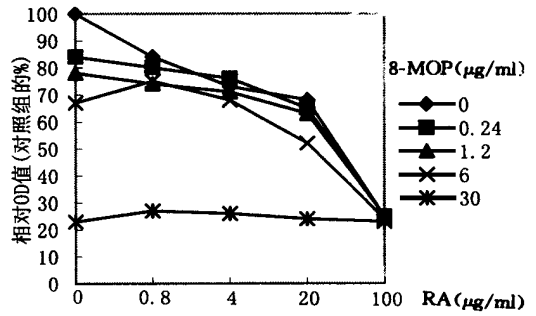


图4 8-MOP 单独应用及与 RA 联合应用对食管癌细胞的生长抑制曲线

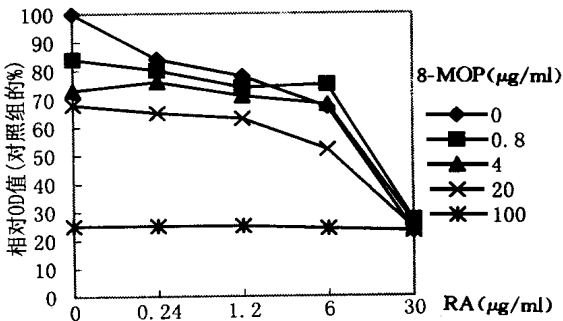


图3 RA 单独应用及与 8-MOP 联合应用对食管癌细胞的生长抑制曲线

RA 与 8-MOP 联合应用显示明显的浓度依赖性抑制作用,大剂量 RA 与小剂量 8-MOP 联合应用时呈现拮抗作用。

### 2.2 8-MOP 与 RA 联合应用对 2 种细胞形态的影响

细胞最初表现为增殖不活跃,分裂细胞少,随后细胞内颗粒增多,细胞皱缩,空泡形成,空泡大小不一,细胞膜起泡,类似凋亡小体样结构,小体能使 MTT 还原(图 5)。

表1 RA 与 8-MOP 联合应用抑制 Tca8113 或 Ca9-22 细胞生长时的用药浓度和合并指数

细胞类别	IC <sub>30</sub> (μg/ml)		C <sub>I50</sub>	IC <sub>50</sub> (μg/ml)		C <sub>I50</sub>
	RA	8-MOP		RA	8-MOP	
Tca8113	0.00 ± 0.0	15.60 ± 3.1		0.00 ± 0.0	46.9 ± 10.3	
	0.20 ± 0.2	4.00 ± 0.0*	0.82	0.24 ± 0.0	43.6 ± 4.0	0.95
	0.23 ± 0.3	0.80 ± 0.0*	0.68	1.20 ± 0.0	38.6 ± 3.6	0.91
	0.24 ± 0.0	0.56 ± 0.0*	0.70	6.00 ± 0.0	34.1 ± 1.3	1.19
	0.40 ± 0.5**	0.00 ± 0.0		11.28 ± 4.0	20.0 ± 0.0*	1.29
Ca9-22	0.00 ± 0.0	16.4 ± 10.1		0.00 ± 0.0	50.5 ± 10.8	
	0.24 ± 0.0*	11.7 ± 9.1	0.75	0.24 ± 0.0*	44.7 ± 15.8	0.90
	1.20 ± 0.0	4.4 ± 6.3	0.47	1.20 ± 0.0*	42.5 ± 11.9	0.92
	6.00 ± 2.2	0.0 ± 0.0		6.00 ± 0.0	24.3 ± 8.6	0.93
				8.43 ± 3.4	20.0 ± 0.0*	1.02
			13.40 ± 3.4	0.0 ± 0.0		

\* 联合用药与单独用药比较用药量明显减少(P < 0.05)  
 \*\* 30% 细胞生长抑制时 RA 对两种细胞的用药量差异显著(P < 0.05)

### 3 讨论

本实验发现:舌癌细胞 Tca8113 生长抑制率为 30% 时,RA 单独用药量非常小,只有 0.4 μg/ml,表明该细胞对 RA 极为敏感;食管癌 Ca9-22 细胞生长抑制率为 30% 时,RA 的用量为 6.0 μg/ml,明显比 30% Tca8113 细胞生长抑制时 RA 的用量大

(P < 0.05)。50% 细胞生长抑制时,RA 或 8-MOP 对 Tca8113 和 Ca9-22 细胞的用药量基本相同。在 RA 与 8-MOP 联合用药呈现协同作用时,一般表现为一种药物用药量的显著减少(P < 0.05),而另一种药物的用药量有一定程度的减少(P > 0.05),未见二者同时显著地减少(表 1)。

从药物对细胞的生长抑制曲线可以发现:较大

或较小剂量的 RA 对两种细胞表现出浓度依赖性抑制作用;在中等剂量(0.24~6.00 μg/ml)时,药物抑制曲线出现一个平台,RA 浓度提高,而细胞生长抑制率无明显变化(图 1, 3)。从图 2, 4 中可见:当 RA 为低浓度而 8-MOP 为高浓度时,二者联合应用表现出协同作用,作者在对粘液表皮样癌及其高转移细胞株的研究中,也发现了相似的结果,提示:RA 与 8-MOP 联合应用的基本原则为小剂量 RA 与较大剂量 8-MOP 联合应用。

颜会兰等<sup>4</sup>认为:维甲类化合物诱导细胞细胞凋亡的机制与细胞生长分化的不同方式有关,与细胞类型有关,维甲类抑制细胞生长,引起细胞分化终止,直至凋亡。其方式有三:首先诱导细胞分化,然后凋亡;同时诱导细胞分化和凋亡;单独诱导细胞凋亡,不依赖分化过程。本实验观察到类似凋亡小体样结构,它的形成方式有待进一步的研究。文献报道<sup>5</sup>,PUVA 疗法可以诱导凋亡,8-MOP 单用是否有凋亡作用还不清楚。

在细胞水平对 RA 和 8-MOP 的研究发现:它们参与对酶的合成、生长因子、结合蛋白、细胞外效应、免疫活动及蛋白激酶 C 连锁系统的调节作用<sup>6,7</sup>。目前研究表明,维甲酸对头颈癌及口腔癌前病变有抑制作用<sup>8</sup>。8-MOP 对头颈癌的研究少见报道,但它在皮肤病方面的应用提示它在头颈癌治疗领域可能有光明的应用前景。作者的研究工作显示,低浓度 RA 和 8-MOP 联合应用对癌细胞产生协同抑制效应,经计算,在临床常规用药条件下,RA 和 8-MOP 在血浆中最高理论浓度值分别为

24 μg/ml 和 132 μg/ml, RA 对 Tca8113 和 Ca9-22 细胞的相对抗肿瘤活性由单用时的均为 2,提高到联合用药时的 20; 8-MOP 对 Tca8113 和 Ca9-22 细胞的相对抗肿瘤活性由单用时的均为 3,提高到联合用药时的 3.3~5.5,联合用药以后相对抗肿瘤活性提高,二者联合应用有可能取得提高疗效、减轻毒副作用的效果。

(本文图 5 见中心插页 5)

#### 4 参考文献

- 1 于小忱,赵雪梅,高进,等.维甲酸对肿瘤细胞膜的影响及其与转移能力的相关性探讨.中华肿瘤杂志,1995,17:179
- 2 吴军正,司徒镇强,刘斌,等.MTT 实验及其在抗癌中药筛选中的应用.中华口腔医学杂志,1995,27:373
- 3 Tsai CM, Hsiao SH, Frey CM, et al. Combination cytotoxic effects of cis-diamminedichloroplatin (II) and 5-fluorouracil with and without leucovorin against human non-small cell lung cancer cell lines. Cancer Res, 1993, 53:1079
- 4 颜会兰,仇梅.维甲类化合物与细胞凋零:癌症的预防与治疗.国外医学肿瘤分册,1996,23:221
- 5 Rappersberger K, Ortel B, Forstinger C, et al. Therapy of cutaneous T-cell lymphomas. Wien Klin Wochenschr, 1994, 106:300
- 6 雷薇,吴.维甲酸对增殖分化调节的分子机制.国外医学分子生物学分册,1994,16:83
- 7 Caffieri S, Ruzzene M, Guerra B, et al. Psoralen-fatty acid cycloadducts activate protein kinase C (PKC) in human platelets. J Photochem Photobiol, 1994, 22:253

(1997-06-10 收稿)

## Inhibitory Effects of 8-methoxypsoralen Combining with All Trans Retinoic Acid on Oral Squamous Cancer Cell Lines

Yan Xiaoguang, Wu Junzheng, Chen Jianyuan

College of Stomatology, The Fourth Military Medical University

### Abstract

To study the inhibitory effects of 8-methoxypsoralen (8-MOP) combining with all trans retinoic acid (RA) on tongue cancer cell line Tca8113 and gingiva cancer cell line Ca9-22, MTT assay (tetrazolium-based colorimetric assay) was applied and the changes in morphology were observed with the inverted microscope. The results showed that with 30% growth inhibition of the cell lines, the Combination Indexes (CI<sub>30</sub>) of the two drugs were no more than 0.82, and with 50% growth inhibition, the Combination Index (CI<sub>50</sub>) were from 0.9 to 0.95, which indicated synergic combination effects of the two drugs against the two oral squamous cancer cell lines. Apoptosis-body-like structures were observed in the cells treated with RA, 8-MOP, or the combination of RA with 8-MOP. Whether combination of the two drugs at appropriate concentrations has clinical value needs to be investigated.

**Key words:** 8-methoxypsoralen    all trans retinoic acid    tongue cancer    gingiva cancer