

加温联合化疗对人舌癌 SCC-25 细胞杀伤作用的实验研究

郑光勇 王大章 毛祖彝 又贺泉 铃木安里 齋藤和子

摘要 采用 MTT 法评价了人舌鳞状细胞癌 SCC-25 细胞对几种常用抗癌药物联合加温的敏感性。正常温度 (37 °C) 时 SCC-25 细胞对化疗药物敏感性顺序为: 阿霉素、顺铂、丝裂霉素 C、博来霉素、氮甲喋呤、匹莱霉素、5-氟尿嘧啶; 40~45 °C 温度范围内, 不同抗癌药物联合加温对 SCC-25 细胞杀伤作用表现出各自的最佳作用温度, 在有效药物浓度条件下, 药物浓度增加不能显著地改变药物联合加温的综合癌细胞杀伤效应。

关键词 MTT 法 热-化疗 口腔癌

早在 100 多年前就有人意外地发现高热能够治愈恶性肿瘤。近 20 年来, 世界各国学者对高热治癌进行了大量的基础实验和临床应用研究, 高热杀灭癌细胞的效应得到证实。但是, 今天的高热治癌处于起步阶段, 没有剂量单位, 生物学作用不太清楚, 对正常组织的耐受和损伤也知道得很少, 只知道治疗恶性肿瘤有效。本实验围绕热-化疗治癌的临床实践, 试图探讨化疗药物剂量、加温温度、热化疗作用时间、分割治疗间隔时间等剂量因素对抗癌效果的影响。本文报告不同药物剂量, 加温温度的相互关系及对人舌癌 SCC-25 细胞杀伤作用的影响。

1 材料和方法

1.1 抗癌剂

种类: 博来霉素 (BLM), 顺铂 (CDDP), 匹莱霉素 (PEP) (日本化学, 东京生产); 氮甲喋呤 (MTX), 5-氟尿嘧啶 (5-Fu), (武田药品, 大阪); 丝裂霉素 c (MMC), 阿霉素 (ADR), (协和发酵, 东京生产)。

浓度¹: 分别采用供试药品人血浆高峰浓度 (PPC, peak plasma concentration) 的 1 倍、5 倍和 10 倍 (1 × PPC, 5 × PPC 和 10 × PPC)。

1.2 实验用细胞及培养

实验用癌细胞为美国人 (白种人) 舌鳞状上皮癌细胞 SCC-25, CRL-1628 细胞系 (Flow Laboratories Inc, Virginia, USA)。

常规方法培养, 培养基为含 10% (v/v) 牛胎儿血清 (FBS; Flow Lab) 的 DMEM/F12 (1:1) 混合培养液, 每周传代率为 1:2。

实验前 24 h, 将细胞用 96 孔平面培养板 (No. 3596; Oster, Mass, USA) 培养。用含 1.25×10^5 /ml 细胞的培养基悬浮液 0.2 ml 分注于每孔, 培养 24 h。最终实验时调整细胞数为 2.0×10^4 /孔。

1.3 加温联合药物对 SCC-25 细胞杀伤作用测定 (MTT 法)

1.3.1 实验分组: a. 空白对照组: 37 °C 条件下常规培养, 无任何抗癌剂; b. 单纯药物组: 7 种药物, 分别 3 种浓度 (1 × PPC, 5 × PPC, 10 × PPC), 37 °C 条件下常规培养; c. 单纯加温组: 分别于 40 °C, 43 °C, 45 °C 温度下加温 40 min 后 37 °C 条件下常规培养; d. 加温联合药物组: 7 种药物在上述三种浓度下分别联合水浴加温 40 min (分别上述 3 种温度条件) 后, 37 °C 条件下常规培养。

1.3.2 实验处理: 将单层 SCC-25 细胞形成的每孔培养上清液除去加入含上述 3 种浓度的不同抗癌剂的培养液 0.1 ml/孔。对 C 组 (单纯加温组) 和 d 组 (加温联合药物组) 置于电热水浴恒温箱中分别于 40 °C, 43 °C, 45 °C 条件下加温 40 min (温度误差: ± 0.1 °C)。a, b, c, d 4 组置于同一 CO₂ 孵箱 (37 °C, 5% CO₂-95% 空气) 中培养 24 h。采用 MTT 法² 测定各孔 SCC-25 细胞存活

作者单位: 610041 华西医科大学口腔医学院 (郑光勇, 王大章, 毛祖彝) 日本齿科大学新 分校 (又贺泉, 铃木安里, 齋藤和子)

数: 每孔加入 0.01 ml MTT 液(四唑盐), 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-diphenyl tetrazolium bromide), 37 °C 恒温条件下孵育 4 h 以酸化异丙醇终止反应后在微孔板比色仪上测定其光密度(OD 值)。

1.3.3 癌细胞生长抑制率的计算: 根据所测各标准孔光吸收值(OD 值), 建立标准细胞相关曲线(光密度值: 细胞数), 计算生存细胞数。以下式计算抑制率(R%)

$$\text{细胞生长抑制率 (R \%)} = \frac{\text{空白组细胞数} - \text{实验组细胞数}}{\text{空白组细胞数}} \times 100\%$$

上述实验重复 3 次。

2 结 果

在本实验条件下, 正常温度(37 °C)时人舌癌 SCC-

附表 加温联合抗癌剂对人舌癌 SCC-25 细胞生长抑制作用的测定(MTT 法)

药物	药物浓度 (PPC ×)	37 °C IR (%)	40 °C IR (%)	P 值	43 °C IR (%)	P 值	45 °C IR (%)	P 值
BLM	×1	27.72 ± 3.50	29.42 ± 5.83		32.10 ± 8.10		52.52 ± 9.21	**
	×5	28.56 ± 4.07	28.34 ± 6.53		45.40 ± 5.18	**	60.70 ± 13.22	**
	×10	31.30 ± 6.06	36.88 ± 7.58		49.83 ± 5.45	*	63.66 ± 14.58	**
CDDP	×1	30.96 ± 7.23	54.85 ± 2.79	**	68.88 ± 6.13	**	69.45 ± 8.64	**
	×5	40.73 ± 4.92	59.77 ± 1.22	**	67.04 ± 2.95	**	74.40 ± 6.36	**
	×10	52.99 ± 9.00	61.61 ± 4.45	*	70.51 ± 5.99	**	77.31 ± 8.82	**
MTX	×1	25.53 ± 4.58	27.23 ± 5.74		39.20 ± 8.65	*	53.32 ± 4.38	**
	×5	27.18 ± 5.01	37.96 ± 1.45		44.03 ± 6.47	**	52.34 ± 3.64	**
	×10	26.77 ± 6.77	30.24 ± 2.89		46.60 ± 5.57	**	54.52 ± 7.25	**
5-Fu	×1	11.99 ± 3.85	22.00 ± 5.51	*	35.81 ± 5.12	**	46.66 ± 12.06	**
	×5	13.51 ± 4.01	28.94 ± 4.65	*	41.61 ± 10.94	**	48.06 ± 10.87	**
	×10	20.47 ± 2.98	30.32 ± 4.37	*	33.56 ± 9.28	*	52.21 ± 10.25	**
PEP	×1	21.13 ± 3.21	30.10 ± 6.90		37.21 ± 4.27	**	53.89 ± 6.50	**
	×5	24.28 ± 7.59	26.40 ± 7.26		43.32 ± 5.30	**	52.02 ± 7.63	**
	×10	26.70 ± 7.27	33.70 ± 6.02		46.89 ± 6.27	**	56.48 ± 4.06	**
MMC	×1	30.10 ± 6.32	39.96 ± 8.55		41.56 ± 3.52	*	48.70 ± 10.21	**
	×5	34.28 ± 7.59	38.35 ± 6.71		44.08 ± 4.69	*	51.81 ± 9.16	**
	×10	37.65 ± 10.57	44.58 ± 8.35		45.85 ± 6.27		55.16 ± 5.06	**
ADR	×1	51.42 ± 8.41	61.12 ± 7.15	*	52.06 ± 1.47	*	54.99 ± 9.21	
	×5	50.69 ± 9.67	59.46 ± 4.67	*	54.74 ± 3.66		58.46 ± 9.98	
	×10	55.68 ± 7.68	62.28 ± 5.21	*	68.16 ± 3.57	*	71.06 ± 4.32	**

注: PPC——药物人血浆高峰浓度; IR% = 细胞生长抑制率

n = 9 * P < 0.05 ** P < 0.01

3 讨 论

3.1 关于试验方法

本实验采用 MTT 试验(tetrazolium-based

25 细胞对 7 种常用抗癌剂的敏感性依次为: ADR > CDDP > MMC > BLM > MTX > PEP > 5-Fu (P < 0.05, 见附表); 其中 CDDP 的杀伤细胞作用随着药物浓度的增加而明显增强 (P < 0.01), 但药物浓度的变化对 ADR, BLM, MTX, PEP 的杀细胞作用无明显影响 (P > 0.05), 单纯加温(40~45 °C)条件下, 对 SCC-25 细胞生长抑制率为 15%~20%, 加温(40~45 °C)联合化疗均能不同程度地增强抗癌剂对 SCC-25 细胞的杀伤作用(附表), 其中 CDDP 对热的增敏作用最为敏感, 即使在低等加温(40 °C)条件下也能迅速提高其杀细胞作用 (IR% > 50%, P < 0.01), BLM, PEP, MTX, 5-Fu, MMC 是随着温度的增加其杀细胞作用增强, 但 ADR 的杀细胞作用并不随温度的增加而加强 (P > 0.05)。

colorimetric assay) 是通过比色测定细胞数量和活性的抗癌药物敏感性试验新方法, 其敏感性与克隆形成法、颜料排除法、同位素掺入法相似, 但更简单、迅速。其基本原理为, 在活细胞的

线粒体中含有丰富的脱氢酶,可使 MTT 分子还原。淡黄色的 MTT 还原后形成不溶于水的紫色结晶物,该结晶物可溶于二甲基亚砷等有机溶剂。由于结晶物形成的量与细胞数量及其活性有关(只有活细胞才可使 MTT 分子还原),通过比色,测定光密度(OD)值,即可反映细胞的数量及其活性²。

3.2 高热与化疗联合应用的杀癌效应

化疗药物与高热并用对癌细胞的综合杀伤效应受到许多因素的影响,特别是癌细胞对药物的敏感性、最佳作用温度²直接影响其综合杀伤效应。本实验结果显示,SCC-25 细胞对几种临床常用药物的敏感性不同,其敏感性顺序为:ADR, CDDP, MMC, BLM, MTX, PEP, 5-Fu, 其中,SCC-25 细胞对 CDDP 表现出明显的药物浓度依赖性,即随着浓度的增高,CDDP 对癌细胞的毒性、杀伤作用增强。上述药物对 SCC-25 细胞的杀伤作用,在临床热疗常用温度(40~45 /40 min)条件下均有不同程度的增加,但显示出明显的差别。ADR, CDDP 合并加热 40 时即显示出增效作用,但进一步增加温度(43, 45)并不明显增加其抗癌效应;MMC, BLM, MTX, PEP, 5-Fu 在 40 加温条件下,对 SCC-25 细胞的抗癌作用无明显增强效应,随着温度的增加,其抗癌作用缓慢地增

强,达到 45 时抗癌作用明显增强。表明各种不同的抗癌药物在高温条件下的作用机制可能不同,故与高热并用时所产生的综合抗癌效应亦有差别。癌细胞对药物本身的敏感性和作用温度是影响热-化疗对癌细胞综合杀伤效应的重要因素。而在有效浓度条件下,药物浓度的改变不能显著地影响热-化疗的抗癌作用(附表)。

在目前热-化疗治癌临床中,除透热技术和测温技术不够完善是影响加温治癌广泛开展的一个主要问题外,不能确切掌握不同个体的恶性肿瘤对药物的敏感性(这也是化疗本身需解决的问题)和选择最佳加温温度也是临床上影响热-化疗疗效的重要因素之一。因此,临床热-化疗治癌的实践应当强调个体化治疗原则,以利提高疗效。

4 参考文献

- 1 韩锐主编 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 419
- 2 Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays J Immunol Methods, 1983; 65 55
- 3 赵彼得 高热治癌进展 见:杨在春,高显思主编 医学新技术及其应用 北京人民军医出版社,1989 443

(1996-01-29 收稿)

The Experimental Study on Anticancer Effect of Hyperthermochemotherapy

Zheng Guangyong, Wang Dazhang, Mao Zhuyi

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Izumimata, Anri Suzuki, Kazuko Saito

School of Dentistry at Niigata, the Niigata Dental University

Abstract

This paper reported on the anticancer effect of hyperthermochemotherapy for the human tongue cancer cell (SCC-25 cell line) in vitro. The result showed that (1) at 37 the order of drug sensitization was as follows: ADR, CDDP, MMC, BLM, MTX, PEP, 5-Fu; (2) under the 40~45 /40 min, the anticancer drugs showed an optimum effective temperature separately. The authors also observed the effects of drugs dosage for the hyperthermochemotherapy in this study.

Key words: MTT assay thermochemotherapy oral cancer