

雷公藤内酯醇对人口腔鳞状细胞癌细胞株 Tca8113 作用的实验研究

吴也可 宋东哲 景欢 王馨玉 赵振刚 吕胡玲 廖爽 陈谦明
(口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学 成都 610041)

[摘要] 目的 观察雷公藤内酯醇对人口腔鳞状细胞癌细胞株 Tca8113 的抑制作用, 并与传统化疗药物顺铂的作用相比较, 评价其作为抗头颈部恶性肿瘤药物的价值。方法 噻唑蓝比色法检测雷公藤内酯醇和顺铂对 Tca8113 增殖的抑制作用, 形态学观察经药物作用后细胞的生长情况。结果 雷公藤内酯醇对 Tca8113 的增殖有明显抑制作用, 呈量-效、时-效关系; 较小浓度的雷公藤内酯醇即可产生较好的抑制效果, 作用小于 7 d 时与顺铂相当, 7 d 时 0.001 mg·L⁻¹ 抑制率达 60%, 0.01 mg·L⁻¹ 抑制率达 90%, 显著优于顺铂($P<0.05$); 1、3、5 d 作用点时, 在大于 0.1 mg·L⁻¹ 时顺铂效果优于雷公藤内酯醇($P<0.05$), 7 d 时两者差异无统计学意义; 各个作用点雷公藤内酯醇的 50% 抑制浓度均小于顺铂。结论 雷公藤内酯醇对人口腔鳞状细胞癌细胞株 Tca8113 有明显的抑制作用, 呈量-效、时-效关系, 且在较低浓度和较长时间作用下其抑制率明显高于顺铂。

[关键词] 雷公藤内酯醇; 顺铂; 人口腔鳞状细胞癌细胞株 Tca8113; 抗肿瘤作用; 噻唑蓝

[中图分类号] R 730.53 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1673-5749.2011.05.008

Effect of triptolide on human oral squamous cell carcinoma cell line Tca8113 Wu Yeke, Song Dongzhe, Jing Huan, Wang Xinyu, Zhao Zhengang, Lü Huling, Liao Shuang, Chen Qianming. (State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the value of triptolide as an antitumor drug by observing its inhibitive effect on human oral squamous cell carcinoma (cell line Tca8113), and to compare it with conventional chemotherapeutics cisplatin. **Methods** Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to examine the inhibitive effect of triptolide on the proliferation of Tca8113 *in vitro*. The morphology of the cells treated with triptolide was observed by inverted phase contrast microscope. **Results** Triptolide had significant effect on Tca8113 in a dose-dependent and time-dependent manner ($P<0.05$); Lower concentration of triptolide could exert considerable inhibitive effect, the inhibitive rate of 0.001 mg·L⁻¹ and 0.01 mg·L⁻¹ triptolide was 60% and 90% at 7 days, respectively statistically significantly better than those of cisplatin; while the concentration more than 0.1 mg·L⁻¹, cisplatin was superior to triptolide in inhibiting the cells proliferation at 1, 3, 5 days ($P<0.05$); the 50% inhibitory concentration of triptolide was less than those of cisplatin at every time point. **Conclusion** Triptolide has significant suppressive effect on human oral squamous cell carcinoma cell line Tca8113 in dose- and time-dependent manner ($P<0.05$), and it works better than cisplatin at low concentrations with longer acting time.

[Key words] triptolide; cisplatin; human oral squamous cell carcinoma cell line Tca8113; anti-tumor effect; thiazolyl blue

雷公藤是卫矛科雷公藤属木质藤本植物, 其化学成分较多, 二萜内酯为其主要活性成分, 具有抗炎、抗肿瘤、免疫调节等作用, 临床上广泛用于治疗类风湿性关节炎、慢性肾炎、肝炎、各类肿瘤、血小板减少性紫癜和各种皮肤病^[1]。目

前, 其对白血病、鼻咽癌、卵巢癌等各种恶性肿瘤的抑制作用及其机制已被广泛深入的体内外实验所证实, 在口腔黏膜病中也被用于复发性口腔溃疡、口腔扁平苔藓和白塞氏病的治疗。

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)在全身恶性肿瘤中排第 6 位, 且呈逐年上升趋势^[2]。口腔黏膜癌变好发于亚洲的中南部, 与病毒感染、理化刺激(吸烟、饮酒等)以及

[收稿日期] 2010-11-15; [修回日期] 2011-06-24
[基金项目] 四川大学大学生创新实验计划基金资助项目(2009459)
[作者简介] 吴也可(1987—), 男, 四川人, 博士
[通讯作者] 陈谦明, Tel: 028-85405251

遗传等多种因素相关^[3-5]。目前临床使用的口腔黏膜癌变及 OSCC 的诊断和治疗技术较前已有长足的进步,但由于上述病变过程所涉及的发病机制未明,患者的临床治疗效果仍未取得明显改善^[6-7]。因此,深入探索口腔黏膜癌变及 OSCC 的发生发展机制,并在此基础上寻求 OSCC 治疗的新靶标和新途径已成为该领域研究的焦点与热点^[8-9]。

研究雷公藤对 OSCC 的抑制效果和作用机制,将有可能提高现有化疗药物的疗效,使肿瘤耐药现象好转,并为口腔肿瘤的治疗提供一定的思路和实验依据。本研究旨在详细观察雷公藤内酯醇对人 OSCC 细胞株 Tca8113 的抑制作用,评价其作为抗头颈部恶性肿瘤药物的价值。

1 材料和方法

1.1 材料

人舌低分化鳞状细胞癌细胞株 Tca8113(由四川大学口腔疾病研究国家重点实验室提供),所有细胞均培养于含 10% 小牛血清、100 U·mL⁻¹ 青霉素、100 g·L⁻¹ 链霉素的 RPMI-1640 培养基之中,于 5%CO₂、37 ℃ 及饱和湿度条件下进行传代培养;雷公藤内酯醇对照品(上海顺勃生物工程科技有限公司)使用二甲基亚砜配制为 200 mg·L⁻¹ 的储备液,用 0.22 μm 微孔滤膜-20 ℃ 下保存,使用前以 RPMI-1640 稀释至所需使用浓度,二甲基亚砜的终体积分数不超过 0.002%;顺铂(齐鲁制药有限公司),噻唑蓝(Sigma 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 噻唑蓝比色法检测雷公藤内酯醇对 Tca-8113 的抑制作用 在体外抗癌药物敏感性实验中,受试细胞分雷公藤内酯醇组和顺铂组,每组均设立阴性对照。用药浓度范围根据多次预实验中测得能起作用的最小浓度及能耐受的浓度来确定,共设置 7 个浓度梯度,相距 5~10 倍,分别是 0.001、0.01、0.1、1、10、50、100 mg·L⁻¹。每组均设立 4 个作用时间点,分别是 1、3、5、7 d。96 孔板中每组每个浓度和作用时间点均设置 1 个作用孔、4 个复孔和 1 个对照孔。

具体实验过程如下:取对数生长期细胞,调整细胞密度为 1×10⁵ 个·mL⁻¹;按每孔 200 μL 接种于 96 孔板内,孵育 24 h 贴壁后,吸出培养液,每孔中加入 200 μL 经培养液稀释的药物;加药后分别培养 1、3、5、7 d;每孔加 5 g·L⁻¹ 噻唑蓝溶

液 20 μL 孵育 4 h;去除培养液之后,每孔加入 150 μL 二甲基亚砜,摇床上低速振荡 10 min;酶标仪测定光密度(D)值,设定 492 nm 波长,检测每孔细胞的 D 值,每天测量 1 组,连续 4 d,按下式计算细胞生长率:细胞生长率/%=实验组 D 值/对照组 D 值×100%。50% 抑制浓度(50% inhibitory concentration, IC₅₀) 值用 Blizze 法计算。绘制曲线,经统计学分析后作图,以作用因素(药物浓度、时间)为横坐标、抑制率为纵坐标绘制曲线,了解时-效以及量-效关系。

1.2.2 形态学观察 取对数生长期细胞,以每孔 5×10⁵ 个的数量接种于 6 孔板,孵育 24 h 贴壁后,分别以 0.001、0.01、0.1、1、10、50、100 mg·L⁻¹ 雷公藤内酯醇作用 Tca8113 细胞,24 h 后于倒置相差显微镜下观察细胞的生长及形态变化。

2 结果

2.1 雷公藤内酯醇对人 OSCC 细胞株 Tca8113 的抑制作用

2.1.1 量-效关系分析 雷公藤内酯醇对 Tca8113 细胞株的作用随着其质量浓度的增大,抑制率增高,有量-效关系。与顺铂相比,雷公藤内酯醇在较小的质量浓度下即可产生较好的抑制效果,作用 7 d 时 0.001 mg·L⁻¹ 抑制率达 60%,0.01 mg·L⁻¹ 抑制率达 90%,作用 5 d 时 0.1 mg·L⁻¹ 抑制率达 50%。当质量浓度 ≤ 0.1 mg·L⁻¹ 并且作用时间 ≥ 7 d 时,雷公藤内酯醇对 Tca8113 的抑制作用优于顺铂(P<0.05);作用时间 < 7 d 时两者差异无统计学意义;而当质量浓度 > 0.1 mg·L⁻¹、作用时间 < 7 d 时,顺铂的作用效果优于雷公藤内酯醇(P<0.05),≥ 7 d 时两者差异无统计学意义。

2.1.2 时-效关系分析 两组实验中,随作用时间的延长,细胞生长率均降低,即抑制率增高,有时-效关系。1、3、5 d 作用点时顺铂的抑制效果较雷公藤内酯醇好,当作用时间 ≥ 7 d 时,雷公藤内酯醇逐渐起效,且体现出在较低质量浓度下(≤ 0.1 mg·L⁻¹)也具有较好的细胞生长抑制效果。

2.2 IC₅₀ 的比较

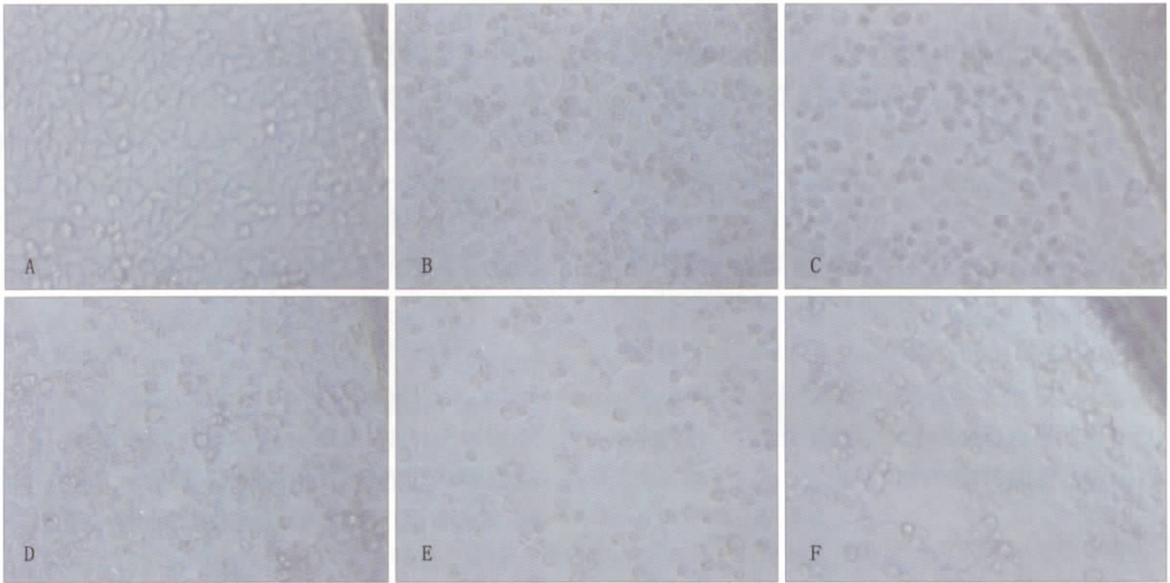
在作用的各个时间点,雷公藤内酯醇组的 IC₅₀ 均小于顺铂组(P<0.05)。

2.3 镜下观察细胞生长状况

未加药物时,24 h 培养后 Tca8113 细胞生长状态良好,呈菱形或长梭形,大小正常,生长旺盛;经雷公藤内酯醇处理后,普遍出现细胞体积

变小、皱缩，失去正常生长形态，细胞之间相互分离，其生长明显受到抑制，并且以上现象随药

物质量浓度的增加而加重(图1)。



A: 0.001 mg·L⁻¹; B: 0.01 mg·L⁻¹; C: 0.1 mg·L⁻¹; D: 1 mg·L⁻¹; E: 10 mg·L⁻¹; F: 100 mg·L⁻¹。

图 1 不同质量浓度雷公藤内酯醇作用 24 h 后 Tca8113 细胞生长状况 倒置相差显微镜 × 100

Fig 1 The growth of Tca8113 treated with various concentrations of triptolide after 24 h inverted phase contrast microscope × 100

3 讨论

目前传统的化疗药物如顺铂、甲氨蝶呤、环磷酰胺、5-氟尿嘧啶等，副作用大、广泛耐药，这些弊端深深困扰着医生和患者。然而雷公藤在其他肿瘤上已经表现出具有强烈的抑瘤特性、广泛的抑瘤谱、较小的副作用和耐药性等特性。Fidler 等^[10]研究报道，雷公藤内酯醇对肿瘤细胞有明显的抑制作用，在较低的质量浓度下即有明显的效果，与其他化疗药物合用能显著增强化疗敏感性。本实验研究表明，雷公藤内酯醇对Tca8113细胞有明显抑制作用，且随着质量浓度的增大和时间的延长，其抑制率逐步提高，呈量-效、时-效关系。

雷公藤内酯醇能在较低质量浓度时起到较好的疗效，虽然顺铂的最大效应高于雷公藤内酯醇，但雷公藤内酯醇的效价强度高于顺铂。结合两种药物各自的治疗窗、安全范围、治疗指数等参数，提示雷公藤内酯醇在头颈部恶性肿瘤的化学治疗中具有一定的临床应用价值。在时效关系上，前半段时间时顺铂的效果较好，雷公藤的效果则不是很明显；后半段时间时雷公藤逐渐起效，体现出在较低质量浓度时亦较好的细胞抑制效果。雷公藤起效较慢，这也是中草药、天然药物与西药、化学合成药的区别之一。但已有实验表明，雷公

藤与其他中成药如紫杉醇等相比，起效仍属较快的。

近年来有大量文献深入到分子层面详尽报道了雷公藤内酯醇抑制肿瘤生长的机制，这些机制可能正是雷公藤能增加肿瘤细胞对外界环境刺激敏感性以及抑制化疗后细胞周期阻滞的原因所在。另外，雷公藤与其他药物联用具有协同抗癌作用，因而在达到相同疗效时可减少药物用量，降低各种化疗药物严重的不良反应，具有较大的临床应用前景。

综上，同传统化疗药物顺铂相比，雷公藤起效较慢，效能较低，但效价强度较高，具有一定临床应用价值。

4 参考文献

- [1] 齐晓娟, 孟庆芳, 金香兰, 等. 雷公藤抗肿瘤作用及作用机制研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2005, 26(3) : 294-295.
- [2] 张雪梅, 陈悦, 侯敏敏, 等. 雷公藤内酯醇的抗肿瘤作用及机制研究[J]. 中华妇幼临床医学杂志:电子版, 2008, 4(5) 64-67.
- [3] Ragin CC, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer :A focus on human papillomavirus[J]. J Dent Res, 2007, 86(2) :104-114.
- [4] Choi S, Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squa-

均大于 1.5 mm，在安全距离范围以内。而通过传统 X 线片直接根据医生经验判断植入的对照组微种植体，脱落率达到 23.3%，经过术后对患者进行颌骨 CT 扫描，数据分析，松动的微种植体距离近远中牙根均小于 2.79 mm±1.16 mm。可以证明：在排除其他影响微种植体植入的稳定性因素下，距离牙根太近会影响微种植体的稳定性。经过统计分析可以发现：2 种不同的植入方法差异有统计学意义。通过三维导板引导微种植体植入可以有效降低微种植体植入的失败率。

综上所述，本研究方法对于需要采用种植支抗而植入区牙槽骨条件或根间距条件不佳的患者，相对常规方法具有更加明显的优势，能够有效减少因为损伤牙根和牙周造成的临床种植体的脱落。同时，医生在今后的三维引导模板的设计中需要考虑到如何避免软组织的增生干扰，提高成功率。当然，目前使用这种方法仍然还有一些不足之处，比如 CT 辐射强、费用高这些都对该方法应用于微种植体植入起到了限制作用。但是，也使今后正畸医生在微种植体定位植入方面多了一项非常不错的选择。医生可以根据患者的实际情况，权衡利弊，有选择地加以使用。笔者也将在进一步的研究中，通过更详细、更科学的设计来提高该方法的实用性和安全性。

4 参考文献

[1] Motoyoshi M, Uemura M, Shimizu N, et al. Recommended placement torque when tightening an orthodontic mini-implant[J]. Clin Oral Implants Res, 2006, 17(1) :109-114.

[2] Deguchi T, Nasu M, Murakami K, et al. Quantitative e-

valuation of cortical bone thickness with computed tomographic scanning for orthodontic implants[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2006, 129(6) :721.e7-721.e12.

[3] Kang YG, Kim JY, Lee YJ, et al. Stability of mini-screws invading the dental roots and their impact on the paradental tissues in beagles[J]. Angle Orthod, 2009, 79(2) :248-255.

[4] Asscherickx K, Wehrbein H, Sabzevar MM, et al. Success rate of miniscrews relative to their position to adjacent roots[J]. Eur J Orthod, 2008, 30(4) :330-335.

[5] Kim SH, Choi YS, Hwang EH, et al. Surgical positioning of orthodontic mini-implants with guides fabricated on models replicated with cone-beam computed tomography[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2007, 131(4 Suppl) :S82-S89.

[6] Sarment DP, Sukovic P, Clinthorne N. Accuracy of implant placement with a stereolithographic surgical guide [J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 2003, 18(4) :571-577.

[7] Inaba M. Evaluation of primary stability of inclined orthodontic mini-implants[J]. J Oral Sci, 2009, 51(3) :347-353.

[8] Cha JY, Kil JK, Yoon TM, et al. Miniscrew stability evaluated with computerized tomography scanning[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2010, 137(1) :73-79.

[9] Kuroda S, Sugawara Y, Deguchi T, et al. Clinical use of miniscrew implants as orthodontic anchorage :Success rates and postoperative discomfort[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2007, 131(1) :9-15.

[10] 张永清, 陈昕, 闫寒松, 等. 正畸支抗种植体定位尺的研制和应用[J]. 口腔医学研究, 2006, 22(4) :459.

[11] Huang LH, Shotwell JL, Wang HL. Dental implants for orthodontic anchorage[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2005, 127(6) :713-722.

(本文编辑 王晴)

(上接第526页)

mous cell carcinoma: Implications for therapy[J]. J Dent Res, 2008, 87(1) :14-32.

[5] Reshmi SC, Gollin SM. Chromosomal instability in oral cancer cells[J]. J Dent Res, 2005, 84(2) :107-117.

[6] Ziober BL, Mauk MG, Falls EM, et al. Lab-on-a-chip for oral cancer screening and diagnosis[J]. Head Neck, 2008, 30(1) :111-121.

[7] Mauk MG, Ziober BL, Chen Z, et al. Lab-on-a-chip-technologies for oral-based cancer screening and diagnostics :Capabilities, issues, and prospects[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1098 :467-475.

[8] Lippman SM, Sudbø J, Hong WK. Oral cancer prevention and the evolution of molecular-targeted drug development[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(2) :346-356.

[9] Mithani SK, Mydlarz WK, Grumbine FL, et al. Molecular genetics of premalignant oral lesions [J]. Oral Dis, 2007, 13(2) :126-133.

[10] Fidler JM, Li K, Chung C, et al. PG490-88, a derivative of triptolide, causes tumor regression and sensitizes tumors to chemotherapy[J]. Mol Cancer Ther, 2003, 2(9) :855-862.

(本文编辑 李彩)