维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2001)01-0045-00

顺铂、5-氟尿嘧啶对人宫颈肿瘤细胞（Hela细胞）的相互作用

彭 勤[1]、彭 惠[2]、骆云鹏[3]、汤为学[3]

（1、重庆医科大学临床学院妇产科；2、重庆医科大学临床学院眼科；3、重庆医科大学病理生理学教研室 重庆 400016）

【摘 要】目的：观察顺铂、5-氟尿嘧啶及甲氨喋呤在体外对人宫颈肿瘤细胞（Hela细胞）的作用。并观察顺铂、5-氟尿嘧啶配伍对Hela细胞的相互作用。方法：采用MTT测定法观察顺铂、5-氟尿嘧啶及甲氨喋呤单用及合用对Hela细胞的影响，流式细胞仪观察凋亡及细胞周期的变化。并利用中效原理判定顺铂和5-氟尿嘧啶合用的效果。结果：顺铂和5-氟尿嘧啶单独应用时随着药物剂量增加，其抑制作用也增加，两药大剂量（大于中效剂量）合用时可产生拮抗作用（CI>1），小剂量（小于中效剂量）合用时可产生协同作用（CI<1）。甲氨喋呤在本实验条件下未见明显抑瘤作用。结论：顺铂和5-氟尿嘧啶合用小剂量产生协同作用，大剂量产生拮抗作用。

【关键词】 Hela细胞；抗癌药物；合用指数

【中国图书分类法分类号】R737.33 【文献标识码】A 【收稿日期】2000-04-20

The mutual effect of cisplatin and 5-fluorouracil on Hela cell line

PENG Qing, et al

(Department of Obstetrics and Gynecology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University, 400016)

【Abstract】 *Objective*: To study the ability of cisplatin, 5-fluorouracil and methotrexatum on inhibiting the proliferation of HeLa cell line. And to evaluate the killing mutual effects of PDD and 5-Fu on Hela cell line. *Methods:* To observe the effect of individual and associated drugs on HeLa cells the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used. The changes of cell period and the apoptosis were observed with flow cytometer (FCM) and the median-effect principle was also used. *Results:* Killing effects of the individual drugs were enhanced as drug concentration increased. We also observed that the interaction of drugs was at higher concentration(CI>1), synergism at lower concentration(CI<1). but methotrexatum had no obvious effect on HeLa cells in this experimental condition. *Conclusion:* The higher concentration with combination was observed in antagonism, the lower concentration in synergism.

【Key words】 Hela cells; Anticancer drug; Combination index

虽然某些子宫颈癌患者不适合化疗，但化疗在治疗子宫颈癌复发、转移时确有一定疗效，联合化疗对子宫颈癌复发者的有效率为21%～66%，中位有效率为45%。顺铂作为最有效的药物，常与其它药物联合使用。我们观察在体外应用顺铂（Cisplatin，PDD），5-氟尿嘧啶（5-fluorouracil，5-Fu）和甲氨喋呤（methotrexatum MTX）三种化疗药物对人宫颈肿瘤细胞（Hela细胞）的作用，用Chou-Talalay合用指数法（即中效原理）[1]定理分析前2种药物之间相互作用的效果。

1 材料和方法

1.1 材料

Hela细胞株：由重庆医科大学病毒性肝炎研究所赠送。培养基RPMI-1640（美GIBCO），经灭活新生小牛血清（杭州四季清生物工程材料有限公司），青霉素（10万u/L），链霉素（0.1g/L），四甲基偶氮唑盐（MTT，Fluka），用pH=7.4的PBS配成5mg/ml的溶液，除菌待用。二甲基亚砜（DMSO，苏州正兴化工研究所，分析纯）96孔培养板（美，Corning），微量振荡器（WZ-ZA型，北京海淀电子医疗仪器厂），自动酶标读数仪（E2500型，美Bio-Rad），细胞培养恒温箱（日本池本理化工业株式会社），超净工作台（苏州净化设备厂）。抗癌药物：顺铂（Cisplatin，PDD），5-氟尿嘧啶（5-fluorouracil，5-Fu），甲氨喋呤（methotrexatum MTX）。

1.2 方法

1.2.1 用MTT法检测药物作用 Hela细胞经0.25%胰酶消化传代、扩增，制成5×10^4/ml细胞悬液，接种于96孔培养板中

作者介绍：彭 勤（1954- ），男，主治医师，硕士

维普资讯 http://www.cqvip.com

（200μl/孔）。实验包括试剂对照，肿瘤细胞阴性对照及不同抗癌药物组。将3种单药的5个不同浓度分别加在96孔板内，每孔加药量20μl。每种剂量6个平行孔，PDD药物浓度（终浓度）为2.5，5，10，20，40μg/ml，5-Fu为25，50，100，200，400μg/ml、MTX为2.5、5、10、20、40μg/ml。两药合用（PDD+5Fu，PDD+MTX，5Fu+MTX）采用两药合用比例为1：1的方案，每孔加总药量仍为20μl（每种单药剂量浓缩1倍各加10μl），置于37℃，饱和湿度，含7%CO_2培养箱内培养68h后，2000r/min离心10min，弃上清，每孔加入200μl无血清的RPMI-1640及20μl MTT，继续培养4h，再离心弃上清后，每孔加DMSO200μl，微量振荡器振荡5min，自动酶标读数仪比色（波长600nm）。测出光密度OD值并计算药物对Hela细胞的抑制率，存活率：HeLa细胞存活率=抗癌药物组光密度值/细胞对照组光密度值×100%。抑制率=100%-存活率。

1.2.2　流式细胞仪检查　先制成2×10^5/ml细胞悬液，设肿瘤细胞阴性对照和PDD（5μg/ml）、5-Fu（50μg/ml）及PDD+5-Fu（5+50μg/ml）作用48h的实验组。消化后，用PBS液洗两次，轻轻打匀细胞，用75%酒精（1～2ml）固定，行流式细胞仪分析。

1.3　结果判定

用测得的光密度OD值进行抑制率计算。根据中效方程式$fa/fu=(D/Dm)^m$，进行中效作图$y=\log fa/fu$、$x=\log D$，$y=ax+b$（fa为效应，fu为1-fa，D为药物浓度，m为斜率），计算出PDD和5-Fu两种抗癌药物单用及合用时各自的中效剂量（$\log Dm=-b/m$，$b=y-ax$），然后计算出两药合用时10%～90%各种效应的合用指数（CI），$CI=(D)_1/(Dx)_1+(D)_2/(Dx)_2+\alpha(D)_1(D)_2/(Dx)_1(Dx)_2$，$D_1$，$D_2$为合用时产生X效应时两药各自所需浓度，$(Dx)_1$、$(Dx)_2$为两药单独使用时产生X效应时两药各自浓度。$\alpha=1$为两种相互非排斥性药物，$\alpha=0$为两种相互排斥性药物；CI<1协同，CI=1相加，CI>1拮抗[2]。

1.4　统计学方法

每份标本平行测定6孔，求其平均值（$\bar{x}\pm s$），采用SAS软件方差分析，q检验，每个药物试验组与阴性对照组比较。

2　结　果

2.1　MTX、5-Fu和PDD单用及合用对HeLa细胞的影响

MTX各实验组经统计学分析与对照组无明显差别，因此PDD+MTX，5Fu+MTX合用无明显意义。5-Fu、PDD及PDD+5-Fu药物组，随药物浓度的增加，存活率逐渐降低，抑制率逐渐增加（见表1）。

2.2　流式细胞仪分析

流式细胞仪观察肿瘤细胞阴性对照和PDD（5μg/ml）、5-Fu（50μg/ml）及PDD+5-Fu（5+50μg/ml）作用48h四个实验组细胞周期的变化，PDD及PDD+5-Fu组使细胞滞留于G_0-G_1期，5-Fu使细胞主要滞留于S期，此三个药物组均可见凋亡峰，见表2，图1～4。

表1　MTT法测定5-Fu和PDD单用及合用对HeLa细胞的影响（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	光密度(OD)值	存活率	抑制率	F	P
对照组	0.516±0.082				
5-Fu组(μg/ml)				72.05	0.0001
25	0.259±0.050*	44.38	55.62		
50	0.215±0.030*	41.67	58.33		
100	0.147±0.039*	28.49	71.51		
200	0.132±0.033*	25.58	74.41		
400	0.119±0.014*	23.06	76.94		
PDD组(μg/ml)				34.57	0.0001
2.5	0.115±0.038*	22.29	77.71		
5	0.099±0.007*	19.19	80.81		
10	0.076±0.021*	14.73	85.27		
20	0.041±0.011*	7.95	92.05		
40	0.019±0.080*	3.58	96.42		
PDD+5-Fu组(μg/ml)				139.15	0.0001
2.5+25	0.119±0.043*	23.06	76.93		
5+50	0.097±0.031*	18.80	81.20		
10+100	0.082±0.021*	15.89	84.11		
20+200	0.051±0.014*	9.88	90.12		
40+400	0.042±0.070*	8.14	91.86		

*与对照组比较，$P<0.05$

2.3　PDD及5-Fu相互作用分析

两种抗癌药物单用及两药合用时随着药物浓度增加其抑制作用也增加，见表1，据此表算得的X、Y输入SAS直线回归，相关分析程序，注意取log，并把药物浓度单位换算成μmol/L可直接求得直线的a、b、r，5-Fu：$Y=-0.793\pm0.388x$，$r=0.961$；PDD：$Y=-0.221+0.727x$，$r=0.960$；5-Fu+PDD：$Y=-0.694+0.459x$，$r=0.986$。另可求出中效浓度5-Fu为14.430μg/ml，PDD为0.604μg/ml，PDD+5-Fu为13.913μg/ml（其中PDD0.552μg/ml，5-Fu13.361μg/ml）。进而计算出两药合用时在不同抑制率时各自所需药物浓度之间相互作用是协同，相加，拮抗（见图5）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表2 肿瘤细胞阴性对照和各药物组作用48h对HeLa细胞周期的变化

图号	G_0-G_1 %	G_2-M%	S%	Apoptosis%
1(对照)	67.10	11.94	20.96	
2(PDD)	79.51	0	20.49	18.18
3(5-Fu)	36.65	22.94	40.41	14.95
4(PDD+5-Fu)	72.54	0.51	26.95	17.58

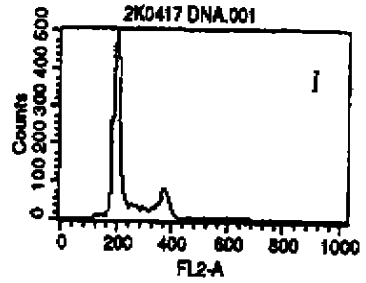


图1 肿瘤细胞阴性对照的流式细胞仪分析图

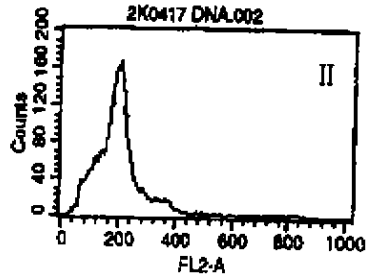


图2 PDD(5 μg/ml)作用HeLa细胞48h的流式细胞仪图，使细胞滞留于G_0-G_1期

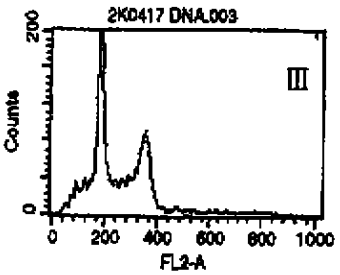


图3 5-Fu（50μg/ml）作用HeLa细胞48h的流式细胞仪图，细胞主要滞留于S期

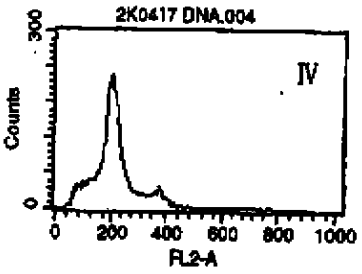


图4 PDD+5-Fu（5+50μg/ml）作用HeLa细胞48h的流式细胞仪图，使细胞滞留于G_0-G_1期

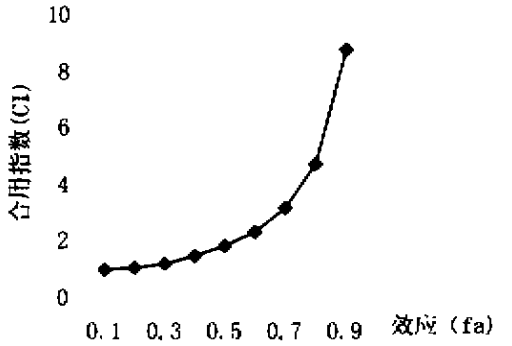


图5 5-Fu与PDD合用时的抑制作用与合用指数的关系

3 讨 论

动脉灌注，以铂类化合物为基础的联合化疗为复发宫颈肿瘤患者提供了新的治疗希望[3]。联合化疗的目的是提高疗效，降低用药剂量，减少毒副反应尤其是对骨髓的抑制作用；通过多渠道、多途径、多环节抗肿瘤提高疗效，避免产生抗癌药性；消除肿瘤细胞异质性和多重抗药异质性对化疗带来的不利影响；增加具有杀伤作用的细胞周期的时相广度和深度，即对处于细胞周期的多种时相细胞，均能有较强的杀伤作用[4-6]。

联合用药是肿瘤化疗的基本原则之一，且合用种数有增多的趋势。如何定量分析各成分之间的协同，相加或拮抗作用是人们多年探索的课题，目前多采用的Chou-Talalay 合用指数法(即中效原理)国外已广泛应用，国内也有报道[7]。此试验的PDD及5-Fu这两种抗癌药物单用时在体外对Hela细胞的抑制作用均较好，并随着药物剂量的增加，抑制作用增强。因此选为合用药，两药合用，用此中效原理分析，它们的中效浓度及各自用量均比单用中效浓度要小得多，这充分说明联合用药优点只需小剂量而达到高效，使药物不良反应减少。MTX在此研究条件下对Hela细胞无明显抑制作用，可能与MTX需体内活化有关，机理有待进一步探讨。流式细胞仪分析PDD及PDD+5-Fu组使细胞滞留于G0-G1期，5-Fu组使细胞主要滞留于S期，从而抑制细胞增生，产生其细胞毒作用，出现凋亡峰。

鉴于患者的个体差异及宫颈肿瘤复发，转移后对化疗的敏感性的问题，在化疗前行抗癌药物敏感性测试，以了解患者体外试验单药及联合用药情况，计算出中效浓度，定量分析各抗癌药物之间的

（下转第50页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

ml，术中及术后病理证实为海绵状血管瘤。表明sTNFR-I检测可用于PHC的病程分期和中晚期肝癌的辅助诊断，但对早期诊断价值不大。TNF在PHC的阳性率与sTNFR-I无差别，且与病期、门脉癌栓、AFP无关。我们认为，作为PHC肿瘤标志物，检测sTNFR-I意义大于TNF。

恶性肿瘤患者体内sTNFR升高的机制及意义尚不完全清楚。有报道TNF是最强有力的sTNFR促释放剂，但本研究中PHC血浆TNF、sTNFR-I无显著相关性，可能与影响sTNFR的因素较多有关。PHC常伴有严重的肝硬变背景，多数患者存在门脉高压症，此时由于胃肠道黏膜屏障功能降低、门体分流、肝脏网状内皮细胞受损，血中内毒素含量增高，而内毒素是sTNFR产生的又一强烈促进剂，这可能是肝硬变患者sTNFR-I也显著增高的一个原因。鉴于多种肿瘤细胞表达有大量的TNFR，且肿瘤细胞较正常细胞更易于脱落其表面蛋白，有人认为，恶性肿瘤患者体内高水平sTNFR除由机体免疫细胞受肿瘤抗原刺激产生外，至少有一部分为肿瘤细胞本身所释放，这可能是肿瘤细胞逃避内源性TNF攻击的一个机制，sTNFR的产生直接导致肿瘤细胞膜TNFR数目减少而降低对TNF毒性的敏感性，并抑制TNF的多种抗肿瘤活性。此观点最近已得到证实[4]。由于sTNFR参与了肿瘤病人的免疫机能下降，因此，高sTNFR常提示不良的预后[3,5]。本研究表明，随着PHC的进展，相对于sTNFR-I，TNF更加不足，因此导致患者的免疫功能进一步恶化，经有效治疗后sTNFR-I显著下降，提示有效治疗后PHC患者的免疫功能有一定程度的改善，与文献报道一致[6]。另外，高sTNFR-I与血清白蛋白呈负相关，与其他临床生化指标无关，可能也是sTNFR-I能独立提示预后的原因之一。总之，检测sTNFR-I对于了解PHC机体免疫状态、监测治疗、判断复发及预后有重要意义。如何阻止机体免疫细胞及肿瘤细胞释放sTNFR以加强免疫细胞活性和肿瘤细胞对TNF敏感性有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Diez-Kuiz A,Tilz GP, Zangerle R. et al. Soluble receptors for tumor necrosis factor in clinical laboratory diagnosis[J]. Eur J Haematol. 1995; 54(1): 1-6.

[2] Elsasser-Beile U, Gallati H, Weber W. et al. Increased plasma concentrations for type I and II tumor necrosis factor receptors and IL-12 receptors in cancer patients [J]. Tumor Biol. 1994; 15(1): 17-23.

[3] Langkopf F, Atzpodien J. Soluble tumor necrosis factor receptors as prognostic factors in cancer patients [J]. Lancet, 1994; 344: 57-60.

[4] Selinsky CL, Boroughs KL, Halsey WA, et al. Multifaceted inhibition of anti-tumor immune mechanism by soluble tumor necrosis factor receptor type I[J]. Immunology. 1998; 94(1): 88-93.

[5] Ott MG, Mannel DN, Gallati H, et al. Peripheral natural killer cell activity and intraperitoneal soluble p55 TNFR in patients with malignant ascites: two possible indicators for response to intraperitoneal combined TNF-α and IFN-γ [J]. Cancer Immunol Immunother. 1996; 42: 31-37.

[6] Jablonska E, Pietruska. Soluble TNF receptors release by polymorphonuclear cells and the serum levels in breast cancer patients before and after treatment[J]. Neoplasma. 1998;45(1): 17-20.

（上接第47页）

协同，相加，拮抗作用，为临床抗癌药物的选择及联合应用时剂量的选择提供参考。在化疗的前后，同时辅助放疗，以增强疗效，延长患者的生命[8]。

参 考 文 献

[1] 韩　锐．肿瘤化学预防及药物治疗[M]．北京：北京医科大学中国协和医科大学联合出版社，1991:315-320.

[2] 汤为学，程平艳，骆云鹏，等．顺铂、5-氟尿嘧啶长春新碱配伍对人肝癌细胞株（7721）的相互作用[J]．中国临床药学杂志，1998:7(1):5-9.

[3] Kumar L, Bhargava VL. Chemotherapy in recurrent and advanced cervical cancer[J]. Gynecol Oncol,1991;40:107-112.

[4] Blackledge G, Buxton EJ, Mould JJ, et al. Phase II studies of ifosfemide alone and in combination in cancer of the cervix[J]. Cancer Chemother Pharmacol. 1990:26[Suppl]:12-16.

[5] Young RC. Gynecologic Cancer. In Wittes RE(ed).Manual of oncologic therapeutics[J]. New York,1990;276-281.

[6] Gusberg SB .Cancer of cervix[J]. Female genital cancer. London:Churchill,1988:297-302.

[7] Garton GR,Gunderson LL,Webb MJ,et al. Intraoperative radiation therapy in gynecologic Cancer: the Mayo clinic experience[J]. Gynecol Oncol,1993;48:328-332.

[8] Hockel M, Poul GK. The combined operative and rediotherapeutic treatment (CORT)of recurrent tumors infiltrating the pelvic wall: first experence with 18 patients[J]. Gynecol Oncol,1992;46:20-25.