大肠癌细胞对 5-氟尿嘧啶和奥沙利铂的敏感性

汪 冰[1]，颜登国[2]
（1. 贵阳医学院 校医院，贵州 贵阳 550004；2. 贵阳医学院附院 肛肠外科，贵州 贵阳 550004）

［摘 要］**目的**：比较 5-氟尿嘧啶（5-FU）和亚叶酸（FA）联合应用（FUFA）、奥沙利铂（LOHP）以及 LOHP 加 FUFA 对 DukesB 和 C 期结直肠癌细胞的抑制作用。**方法**：收集术前未化疗，手术切除的大肠癌标本 60 例，将肿瘤标本制成浓度为 2×10^5/ml 细胞悬液，分别加入终浓度为 0.01、0.1 和 1 倍血浆峰值浓度（PPC）的 FUFA、LOHP 和 LOHP 加 FUFA，用 MTT 法测定肿瘤细胞生存率。**结果**：组间比较显示：FUFA 和 LOHP 之间的综合疗效无统计学差异（$P=0.338$），FUFA 和 LOHP 加 FUFA 之间也没有统计学差异（$P=0.138$）。与 LOHP 单独用药相比较，LOHP、FUFA 联合用药的综合肿瘤细胞存活率降低，显示出统计学上的差异（$P=0.033$）。**结论**：对临床上确诊的 DukesB 和 C 期结直肠癌细胞，FUFA 和 LOHP 在单药用药时都具有抑制作用，而该作用在 LOHP 加 FUFA 时增强，二药联合具有协同作用，这些作用呈现剂量相关性。

［关键词］结直肠肿瘤；氟尿嘧啶；奥沙利铂
［中图分类号］R735.34 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2012）01-0048-04

Drug Sensitivity of Colorectal Cancer Cells to 5-fluorouracil and Oxaliplatin

WANG Bing[1], YAN Dengguo[2]
(*1. College Hospital, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Anorectal Surgery, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China*)

［**Abstract**］**Objective**: To compare the inhibitory effects of 5-fluorouracil (5-FU) combined with folinic acid (FA) (FUFA), oxaliplatin (LOHP) and combination of LOHP with FUFA on clinical diagnosed human colorectal cancer cells of Dukes stages B and C. **Methods**: Sixty operatively resected colorectal cancer tissue samples of patients without previous chemotherapy were collected. The tissues were processed to cancer cell suspension at concentration of 2×10^5/ml. Cells were exposed to FUFA, LOHP and LOHP + FUFA, and the final concentrations of the drugs were 0.01, 0.1 and 1 time of peak plasma concentration (PPC). The survival rates of cancer cells were examined with MTT method. **Results**: There was no statistical difference between cancer cell survival rates (CCSR) in groups FUFA and LOHP ($P=0.338$), so was that between groups FUFA and LOHP + FUFA ($P=0.138$). The CCSR of group LOHP + FUFA was significant lower than that of group LOHP ($P=0.033$). **Conclusions**: Both FUFA and LOHP have inhibitory effect on clinical diagnosed Dukes B and C colorectal cancer cells. The effect is stronger when these drugs are combinatively used. A dose-related effect occurs.

［**Key words**］colorectal neoplasms; fluorouracil; oxaliplatin

大肠癌是常见的恶性肿瘤之一，目前其发病率排名全国高发性恶性肿瘤的第四位。化疗在过去几年有了很大发展，研究显示，5-氟尿嘧啶（5-fluorpuracil，5-FU）通过和亚叶酸（folinic acid，FA）的联合应用（FUFA），5-FU 的临床反应率得到了大大的提高。奥沙利铂（Oxaliplatin，LOHP）通过抑制 DNA 的合成从而诱导细胞凋亡。LOHP 的单体具有临床抗癌的效果，在结直肠癌的治疗中 LOHP 和

FUFA 的联合用药能起到协同抗癌的作用。到目前为止,大多数体外药物敏感性试验都是用单一细胞株进行的,而临床上患者的肿瘤细胞具有多样性,为更好模拟临床,本实验利用体外细胞毒实验 MTT(3-(4,5)-dimetrylthiahiazo(-z-yl)-3,5-diphenytetrazoliumromide)法比较 FUFA、LOHP、LOHP 加 FUFA 对临床上确诊的 DukesB 和 C 期结直肠癌细胞的杀伤作用。

1　材料和方法

1.1　研究对象

肿瘤细胞标本均来源于贵阳医学院临床 2010 年 9 月 ~2011 年 5 月进行结直肠癌根治性手术的 60 例患者,并且术前未化疗,手术切除的大肠癌标本均 HE 染色,经病理证实。其中低分化腺癌 3 例,中分化腺癌 22 例,低-中分化腺癌 4 例;管状腺癌 21 例,粘液腺癌 6 例,粘液及管状腺癌 1 例;类癌 3 例;Dukes 分期 B 期 39 例,C 期 21 例;60 例大肠癌患者中,男 33 例,女 27 例;年龄最大 81 岁,最小 28 岁,平均 60.3 岁。

1.2　主要药品、化学试剂和实验仪器

1.2.1　实验药品　5-FU:天津金耀氨基酸有限公司产品;LOHP:南京制药有限公司产品;FA:山西普德药业有限公司产品。

1.2.2　药物浓度配置和终浓度　与细胞接触的药物终浓度为 1,0.1 及 0.01 倍药物峰浓度(PPC)。药物峰浓度值分别如下:5-FU 60 mg/L,LOHP 3.20 mg/L, FA 163 mg/L[1~3]。分别配制成 5 倍终浓度:5-FU:300 mg/L,30 mg/L,3 mg/L;LOHP 16 mg/L,1.6 mg/L,0.16 mg/L;FA 815 mg/L, 81.5 mg/L,8.15 mg/L。

1.2.3　化学试剂　RPMI 1640 培养基为美国 GIBCO 公司生产;小牛血清:华美公司;Ficoll 淋巴细胞分离液:上海试剂二厂生产;胰蛋白酶:SIGMA 公司产品; 四甲基偶氮唑蓝(MTT):SIGMA 公司产品。

1.2.4　实验仪器　2010 酶标仪:郑州安图生物技术有限公司。

1.3　细胞悬液的制备

取外科手术切除的大肠癌肿瘤原发病灶,经病理证实且术前未行化疗。标本离体后,即刻置于 RPMI 1640 培养基,Hank 液中洗涤 2 次,再次置于 RPMI 1640 的培养基中,室温搅拌 6 ~24 h。将消化后的细胞悬液过滤,悬液经 400 r/min,10 min 离心,收集单个细胞,用无钙镁的 Hank 液将细胞洗 2 遍后,将其悬浮于 5 ml 75% 的 Ficoll 淋巴细胞分离液(含有 10% 小牛血清,用 RPMI 1640 培养基稀释,比重为 1.055)中。离心 2 000 r/min 后收集位于 Ficoll 淋巴细胞分离液界面上的富含肿瘤细胞的悬液, 经 1% 台盼蓝 (trypan blue)染色,于高倍显微镜确定肿瘤细胞活性在 90%,用 RPMI 1640 完全培养液调整肿瘤细胞的浓度为 2×10^5/ml。

1.4　肿瘤细胞体外培养和 MTT 比色分析

取 96 孔无菌培养板,每孔加入含有 2×10^5/ml 肿瘤细胞的 RPMI 1640 细胞悬液 100 μl,每组设 8 复孔,37 ℃,5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养6 h,各孔按给药方案分别加入各种化疗药物 25 μl,另设无肿瘤细胞的空白对照组和不加化疗药物的肿瘤细胞对照组。在 37 ℃,5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养 48 h 后,各孔中加入浓度为 5 g/L 的 MTT 应用液 25 μl,37 ℃孵育 4 h,板式离心后,吸去上清液,每孔加入二甲基亚砜 (DMSO)200 μl,在微型震荡器上震荡 5 min,使结晶颗粒完全溶解,将培养板置于 2010 酶标仪上,于波长 540 nm 测定每孔吸光值(OD),每组取 8 孔的平均值。

1.5　实验药物的评价标准

根据测得的 OD 值,按肿瘤细胞生存率(%) = (实验孔 OD_{540} - 空白对照孔 OD_{540})/(肿瘤细胞对照组 OD_{540} - 空白对照孔 OD_{540}) ×100% 计算肿瘤细胞生存率。

1.6　给药方案

设实验组、无肿瘤细胞的空白对照组和不加化疗药物的肿瘤细胞对照组,每组设 8 复孔,按 3 个方案给药。方案一:各孔分别加入 0.01、0.1、1 PPC FUFA;方案二:各孔分别加入 0.01、0.1、1 PPC LOHP;方案三:各孔分别加入 0.01、0.1、1 PPC FUFA 和 LOHP,必须先加入 LOHP 2 h 后,再加入相同浓度 FUFA。

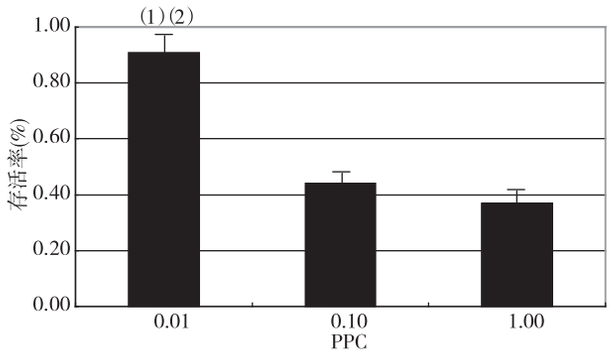
1.7　统计学分析

数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。同一药物不同剂量之间肿瘤细胞存活率的比较采用 Non-parametic Test-Kruskal-Wallis Test (SPSS 11.0),即用 SPSS 进行非参数多组定量资料 Kruskal-Wallis 秩和检验的两两比较;不同药物组间的比较采用 One-Way-Anova LSD Test (SPSS 11.0),即采用最小显著差法的单因素方差分析。之前已作过正态性检验和方差齐性检验。检验水准 $\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　同一药物不同剂量对肿瘤细胞抑制作用的比较

2.1.1　FUFA 在 0.01、0.1、1 PPC 时的肿瘤细胞抑制作用　在终浓度为 0.01 PPC 时，肿瘤细胞的存活率为 0.91 ± 0.52；在终浓度为 0.1 PPC 时，肿瘤细胞的存活率为 0.44 ± 0.48；在终浓度为 1 PPC 时，肿瘤细胞的存活率下降为 0.37 ± 0.33。组间差异具有统计学意义（$P < 0.001$）。见图 1。



注：(1) 与终浓度为 0.1 PPC 比较，$P < 0.001$；
(2) 与终浓度为 1 PPC 比较，$P < 0.001$

图 1　不同剂量 FUFA 处理下的肿瘤细胞存活率

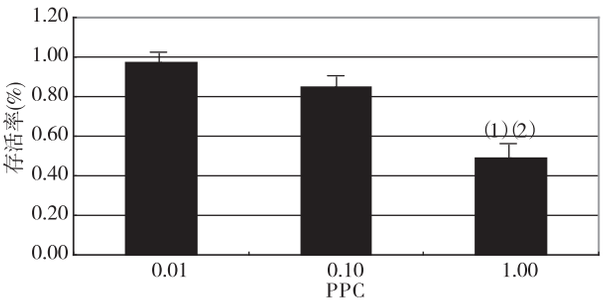
Fig. 1　Survival rates of cancer cells exposed to FUFA of different concentrations

2.1.2　LOHP 在 0.01、0.1、1 PPC 时的肿瘤细胞抑制作用　在终浓度为 0.01 PPC 时，肿瘤细胞的存活率为 0.97 ± 0.52；在终浓度为 0.1 PPC 时，肿瘤细胞的存活率为 0.84 ± 0.46，和终浓度为 0.01 PPC 组比较差异不具有统计学意义（$P = 0.163$）。在终浓度为 1 PPC 时，肿瘤细胞的存活率下降为 0.50 ± 0.31，该值低于前 2 个浓度作用下的细胞存活率（$P < 0.001$）。见图 2。

2.1.3　FUFA 和 LOHP 联合用药在 0.01、0.1、1 PPC 时的肿瘤细胞抑制作用　在此联合用药下，肿瘤细胞的存活率于终浓度为 0.01 PPC 时为 0.38 ± 0.25；在终浓度为 0.1 PPC 时为 0.24 ± 0.19，在终浓度为 1 PPC 时，肿瘤细胞的存活率为 0.13 ± 0.10。组间比较差异具有统计学意义（$P = 0.001$）。见图 3。

2.2　不同药物对肿瘤细胞抑制作用的比较

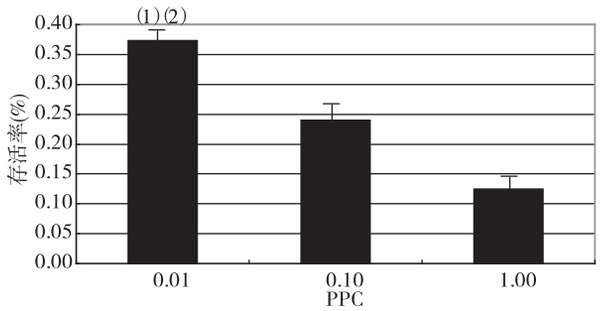
FUFA、LOHP 单独用药和 LOHP 加 FUFA 联合用药的综合肿瘤细胞存活率分别为 0.57 ± 0.29，0.77 ± 0.24 和 0.25 ± 0.12。组间比较显示：FUFA 和 LOHP 之间的综合疗效无统计学差异（$P = 0.338$），FUFA 和 LOHP 加 FUFA 联合用药之间也没有明显的统计学差异（$P = 0.138$）。与 LOHP 单独用药相比较，LOHP 加 FUFA 联合用药的综合肿瘤细胞存活率明显的降低，具有统计学意义（$P = 0.033$）。见图 4。



注：(1) 与终浓度为 0.01 PPC 比较，$P < 0.001$；
(2) 与终浓度为 0.1 PPC 比较，$P < 0.001$

图 2　不同剂量 LOHP 处理下的肿瘤细胞存活率

Fig. 2　Survival rates of cancer cells exposed to LOHP of different concentrations



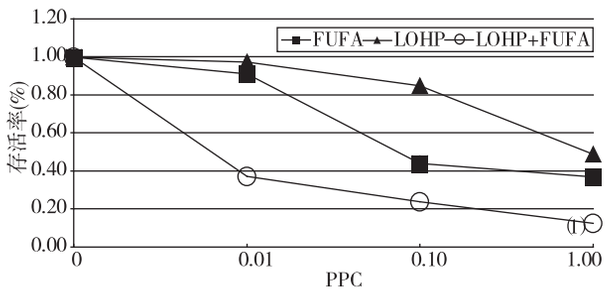
注：(1) 与终浓度为 0.1 PPC 比较，$P = 0.001$；
(2) 与终浓度为 1 PPC 比较，$P = 0.001$

图 3　不同剂量 LOHP 加 FUFA 处理下的肿瘤细胞存活率

Fig. 3　Survival rates of cancer cells exposed to LOHP + FUFA of different concentrations

3　讨论

化疗在恶性肿瘤治疗过程中具有不可替代的地位。5-FU 是一种在过去 30 年中经典的抗癌药，LOHP 是新型的有机铂制剂。作为一线治疗措施，目前已有 3 个大型的随机临床实验比较了 LOHP 加 FUFA 和 FUFA 的临床效果[4~6]。综合分析，联合用药在临床疗效上略优于单独用药。



注:(1) FUFA 加 LOHP 联合用药与 LOHP 单独用药比较,$P=0.033$

图 4　不同剂量 FUFA,LOHP 单药和 LOHP 加 FUFA 处理下的肿瘤细胞存活率比较

Fig. 4　Comparison of survival rates of cancer cells exposed to LOHP, FUFA alone and LOHP + FUFA of different concentrations

在本实验中,通过使用 MTT 法,比较现在临床上最常用的化疗方案对临床确诊的结直肠癌患者(Dukes B 或 C 期)手术切除标本肿瘤细胞的抑制作用,用于评估药物的化疗效果。结果显示:FUFA 作为经典的抗癌药物在单药应用中显示了较强的肿瘤细胞抑制作用,该抑制作用呈现出一定的剂量相关关系。LOHP 作为单药应用同样显示了对肿瘤细胞的抑制作用,该作用在峰值浓度时最明显。与 FUFA 相比,LOHP 抑制作用稍弱,但这种差异无统计学意义。LOHP 加 FUFA 联合应用显示了最强的剂量相关性肿瘤细胞抑制作用,与 LOHP 的抑制作用相比,有统计学上差异,而与 FUFA 相比差异却没有统计学意义。这说明,二者的联合具有协同作用,却不是相加的效果。这和某些文献的报道吻合[7,8]。

与大多数报道的结直肠癌体外肿瘤细胞抑制实验相比,本实验的优势在于使用的是临床标本,这代表了临床病症的多样性,因而该实验的结果能模拟临床。而类似研究,多采用的是单一的细胞株,虽然便于研究,受试对象有同一性,但得到的结果具有高度选择性。在本实验中,所有的患者的临床分期都处于 DukesB 和 C 期,实验结果对于预后评估也具有一定的参考价值。本研究为将来进一步探讨 FUFA 和 LOHP 在治疗大肠癌方面提供了一定的实验依据。

4　参考文献

[1] Koehne CH, Kretzschmar A, Wils J. First-line chemotherapy for colorectal carcinoma-we are making progress [J]. Onkologie, 1998(21): 280 – 289.

[2] Fizazi K, Viala J, Daniel C, et al. Raltitrexed (Tomudex) and oxaliplatin: an active out-patient regimen in malignant mesothelioma [J]. Eur J Cancer, 1999 (4): 252.

[3] Anderson JH, Kerr DJ, Setanoians A, et al. A pharmacokinetic comparison of intravenous versus intra-arterial folic acid[J]. Br J Cancer, 1992(1): 133 – 135.

[4] de Gramont A, Figer A, Seymour M, et al. Leucovorin and 5-fluorouracil with or without oxaliplatin as first line treatment in advanced colorectal cancer[J]. J Clin Oncol, 2000(18): 2938 – 2947.

[5] Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, et al: Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated flurouracil-leucovorin as first line treatment of metastatic colorectal cancer [J]. J Clin Onocol, 2000 (18): 136 – 147.

[6] Grothey A, Deschler B, Kroening H, et al. Phase Ⅲ study of bolus 5-fluorouracil (5-FU)/folinic acid (FA) (Mayo) vs. weekly high-dose 24h 5-FU infusion/ FA + oxaliplatin (OXA) (FUFOX) in advanced colorectal cancer (ACRC) (abstract 512)[J]. Proc Am Soc Clin Oncol, 2002(21): 129.

[7] Fischel JL, Rostagno P, Formento P, et al. Ternary combination of irinotecan, fluorouracil-folinic acid and oxaliplation: results on huma colon cancer cell lines [J]. British J of Cancer, 2001(4): 579 – 585.

[8] Schuell B, Scheithauer W. Raltitrexed und Oxaliplatin beim Kolorektalem Karzinom: In Vitro und In-Vivo-Untersuchungen einer synergistisch wirksamen Zytostatikakombination[J]. Acta Medica Austriaca, 2004(4): 124 – 131.

(2011 – 10 – 08 收稿,2011 – 11 – 28 修回)

编辑:周　凌