

环孢素影响化疗药物对视网膜母细胞瘤细胞的抑制作用

毛羽翔, 吴中耀, 杨华胜, 郑健, 林少芬

(中山大学 中山眼科中心, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】评价不同浓度环孢素(cyclosporin, CSA)影响化疗药物卡铂与足叶乙甙抑制视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, Rb)细胞的促效作用。【方法】实验分为卡铂组(G1)、卡铂+0.5 mg/L CSA组(G2)、卡铂+1.0 mg/L CSA组(G3)及足叶乙甙组(G4)、足叶乙甙+0.5 mg/L CSA组(G5)、足叶乙甙+1.0 mg/L CSA组(G6), 每组各加样5孔。G7组为不同浓度CSA单独作用于Rb细胞。用从0.004至1.00 mg/L倍数增加的9个不同浓度含量化疗药物卡铂和足叶乙甙及加入0.5 mg/L和1.0 mg/L浓度的环孢素作用于体外培养的SO-Rb50细胞。采用MTT法比较各组Rb细胞的生长抑制情况,通过计算Rb细胞抑瘤率、半数细胞抑制所需药物浓度 IC_{50} 值及倒置显微镜下Rb细胞形态学检查,观察环孢素影响化疗药物抑制Rb细胞的作用。【结果】卡铂及足叶乙甙加入CSA作用于SO-Rb50细胞,其细胞抑瘤率较单独应用卡铂及足叶乙甙时增高,G1~G6组的 IC_{50} 值(mg/L)分别为:0.335、0.183、0.130、0.113、0.099、0.077,随着CSA的加用及浓度的增加, IC_{50} 值逐渐降低。G1与G2、G3组及G4与G5、G6组的抑瘤率分别作t检验,统计学分析均有显著性差异($P < 0.01$)。G1与G2、G3组及G4与G5、G6组 IC_{50} 的分别作方差分析检验,统计学分析均有显著性差异($P = 0.005$)。单纯CSA组抑瘤率与药物浓度无相关关系($P > 0.1$)。倒置显微镜观察显示加用环孢素后随药物浓度增加Rb细胞坏死变形较卡铂组及足叶乙甙组明显。【结论】CSA单独作用于SO-Rb50细胞无抑制杀灭作用,但CSA能促进卡铂及足叶乙甙对SO-Rb50细胞的抑制杀灭作用。随着CSA浓度增加,卡铂及足叶乙甙对Rb细胞的抑制作用越明显。

关键词:视网膜母细胞瘤/药物治疗;环孢素/治疗应用;卡铂/治疗应用;足叶乙甙/治疗应用

中图分类号:R739.7

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2004)03-0212-05

Cyclosporin on the Inhibitory Effect of Chemotherapeutic Drugs on Retinoblastoma Cells in Vitro

MAO Yu-xiang, WU Zhong-yao, YANG Hua-sheng, ZHENG Jian-liang, LIN Shao-fen
(Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract:【Objective】To evaluate the enhanced effects of different concentrations of cyclosporin on chemotherapeutic drugs (carboplatin and etoposide) for inhibiting SO-Rb50 cells in vitro. 【Methods】The research were divided into 7 groups: G1 (carboplatin group), G2 (carboplatin + 0.5 mg/L CSA group), G3(carboplatin + 1.0 mg/L CSA group), G4(etoposide group), G5 (etoposide + 0.5 mg/L CSA group), G6 (etoposide + 1.0 mg/L CSA group), and G7 (different concentrations of CSA alone). The effects of 9 different concentrations (0.004 mg/L to 1.0 mg/L double increased) of chemotherapeutic drugs (carboplatin and etoposide) and chemotherapeutic drugs mixed with cyclosporin (0.5 mg/L and 1.0 mg/L) on SO-Rb50 cells in vitro were studied respectively. MTT method was used to observe the growth inhibition of SO-Rb50 cells in each group. By comparing with the inhibitory rate of Rb cells and IC_{50} in each group and the modality changes of Rb cells with converted microscope, we could evaluate the effect of CSA on the chemotherapeutic drugs on Rb

收稿日期:2003-05-16

基金项目:广东省科技计划重点基金资助项目(B30104)

作者简介:毛羽翔(1965-),男,广东兴宁人,博士生,主治医师;吴中耀,教授,博士生导师。

cells. 【Results】 When the chemotherapeutic drugs (carboplatin and etoposide) mixed with different concentrations of CSA in vitro, the inhibitory rates of chemotherapeutic drugs on SO-Rb50 cells were higher than that in the chemotherapeutic drugs alone. The IC_{50} (mg/L) in G1 ~ G6 were : 0.335, 0.183, 0.130, 0.113, 0.099, 0.077, respectively. When CSA mixed with chemotherapeutic drugs and the concentration of CSA increased, the IC_{50} in each group decreased gradually. There were statistical significant differences in the inhibitory rates and IC_{50} among G1, G2, G3 and G4, G5, G6. The inhibitory rate was not related to CSA concentration in G7 group. Under the covered microscope, the modality changes of Rb cells in group with CSA and chemotherapeutic drugs were markedly different from that with chemotherapeutic drugs alone. 【Conclusions】 CSA alone has no inhibitory effect on Rb cells alone. Different concentrations of CSA can enhanced the inhibitory effects of chemotherapeutic drugs (carboplatin and etoposide) on Rb cells in vitro. The higher the concentrations of CSA, the more significant the inhibitory effects of carboplatin and etoposide on Rb cells.

Key words: retinoblastoma/drug therapy; cyclosporin/therapeutic use; carboplatin/therapeutic use; etoposide/therapeutic use

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2004, 25(3): 212 - 216]

视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, Rb)是危害婴幼儿视力和生命最常见的眼内恶性肿瘤,以往对Rb的治疗方法多采用眼球摘除手术。随着诊治水平的提高,世界上越来越多的采用化疗减容等保守方法治疗Rb,治疗后其生存率及眼球保存率有了较大的提高^[1,2]。但Rb细胞对化疗药物耐药性问题一直是影响Rb保守治疗疗效的重要原因之一。有研究发现Rb化疗失败患者肿瘤细胞中可发现抗多种药物的P黏蛋白高度表达。因而有学者提出P黏蛋白高度表达可能是Rb细胞对化疗药物反应低下的原因^[3,4]。本研究采用MTT法,通过应用P黏蛋白抑制剂—环孢素联合化疗药物卡铂和足叶乙甙作用于SO-Rb50细胞,观察环孢素对化疗药物抑制Rb细胞的促效作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 化疗药物 足叶乙甙(etoposide, Vp-16)江苏恒瑞医药股份有限公司生产;卡铂(carboplatin):山东济南齐鲁制药厂生产;环孢素(cyclosporin, CSA):瑞士诺华制药有限公司生产,上述药物用生理盐水配制。

1.1.2 肿瘤细胞株 视网膜母细胞瘤SO-Rb50细胞,中山眼科中心病理室提供。

1.2 实验分组

实验分为:卡铂组(G1)、卡铂+0.5 mg/L CSA

组(G2)、卡铂+1.0 mg/L CSA组(G3);足叶乙甙组(G4)、足叶乙甙+0.5 mg/L CSA组(G5)、足叶乙甙+1.0 mg/L CSA组(G6);G7组为不同浓度CSA单独作用于Rb细胞。

1.3 实验方法

分别将指数生长期SO-Rb50细胞以 1×10^5 个/mL种植于96孔培养板,每孔种植0.2 mL细胞悬液。G1及G4组按从0.004~1.0 mg/L倍数增加的9组不同浓度含量分别加入卡铂及足叶乙甙,G2、G3组及G5、G6组按上述不同质量浓度在加入卡铂和足叶乙甙的同时分别加入0.5及1.0 mg/L浓度CSA。G7组按从0.031~1.0 mg/L倍数增加的6组不同浓度单独加入CSA作用于Rb细胞。每个浓度及对照组均设5个平行孔。置37℃CO₂培养箱中孵育48 h。在终止前18 h及甲瓚结晶形成后,于倒置显微镜下对各组细胞进行观察及照相。加入5 g/L的MTT每孔20 μL,4 h后吸除上清液,加二甲基亚砷100 μL,置微量振荡器上振荡10 min以充分溶解结晶物,用上清液加二甲基亚砷调零,Σ960 Metertech酶联免疫检测仪检测吸光度A值(检测波长:490 nm)。按以下公式计算各组细胞生长抑制率:

$$\text{细胞生长抑制率} = (1 - A_{\text{用药物组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100\%$$

1.4 统计方法

应用SPSS 10.0统计软件进行数据处理,两组间样本分析采用t检验方法,多组间样本分析采用方差分析方法。

2 结果

2.1 MTT 检查结果

2.1.1 CSA 影响卡铂抑制视网膜母细胞瘤细胞的作用 卡铂 + 不同质量浓度 CSA 组 (G2, G3 组) 细胞抑瘤率较单独应用卡铂 (G1) 时增高 (表 1), 引起半数细胞抑制死亡所需药物浓度 (IC_{50} 值) 随 CSA 浓度增加而逐渐降低, G1、G2、G3 组 IC_{50} 分别为 0.335、0.183、0.130 mg/L。G1 组与 G2、G3 两组的抑瘤率分别作 t 检验, $t=3.218$ 、 3.033 , $P < 0.01$, 两组差异均有显著性。G1、G2、G3 组 IC_{50} 值用方差分析方法比较, $P=0.005$, 按 $\alpha=0.05$, 各组 IC_{50} 值之间差异有显著性。

表 1 卡铂加入 0.5 mg/L 及 1.0 mg/L CSA 后 Rb 肿瘤细胞抑瘤率

Table 1 The inhibition rates of carboplatin mixed 0.5mg/L and 1.0 mg/L CSA on Rb cells ($\bar{x} \pm s, \%$)

Carboplatin (mg/L)	Carboplatin (G1)	Carboplatin + CSA 0.5 mg/L(G2)	Carboplatin + CSA 1.0 mg/L(G3)
1.000	64.4 ± 3.7	78.3 ± 5.4	87.5 ± 6.8
0.500	55.2 ± 4.8	66.5 ± 2.4	74.4 ± 4.4
0.250	47.3 ± 2.1	54.9 ± 4.4	61.8 ± 5.2
0.125	37.9 ± 3.3	45.7 ± 3.1	49.5 ± 5.7
0.063	29.5 ± 5.0	32.0 ± 1.1	36.5 ± 3.7
0.031	21.1 ± 2.2	22.6 ± 3.1	22.4 ± 2.4
0.016	14.6 ± 0.8	16.9 ± 1.1	19.4 ± 1.4
0.008	8.5 ± 1.5	7.4 ± 0.5	13.2 ± 1.2
0.004	5.4 ± 0.6	4.9 ± 1.0	8.8 ± 0.9

G1 compared with G2, $t=3.218$, $P < 0.01$; G1 compared with G3, $t=3.033$, $P < 0.01$

2.1.2 CSA 影响 Vp-16 抑止视网膜母细胞瘤细胞的作用 足叶乙甙 + 不同质量浓度 CSA 组 (G5、G6) 细胞抑瘤率较单独应用足叶乙甙 (G4) 时增高, 随着加入的 CSA 浓度增加其 IC_{50} 值逐渐降低, G4、G5、G6 组 IC_{50} 值分别为 0.113、0.099、0.077 mg/L。G4 组与 G5、G6 两组的抑瘤率分别作 t 检验, $t=2.916$, 3.005 , $P < 0.01$, 两组差异均有显著性。G4、G5、G6 组 IC_{50} 值用方差分析比较, $P=0.005$, 按 $\alpha=0.05$, G4、G5、G6 组 IC_{50} 值之间差异均有显著性 (表 2)。

2.1.3 CSA 单独作用于视网膜母细胞瘤细胞的情况 将 CSA 药物浓度与吸光值作相关关系分

表 2 VP-16 加入 0.5 mg/L 及 1.0 mg/L CSA 后 Rb 细胞抑瘤率

Table 2 The inhibition rates of etoposide mixed 0.5 mg/L and 1.0 mg/L CSA on Rb cells ($\bar{x} \pm s, \%$)

Carboplatin (mg/L)	Vp-16 (G4)	Vp-16 + CSA 0.5 mg/L(G5)	Vp-16 + CSA 1.0 mg/L(G6)
1.000	73.8 ± 5.4	81.8 ± 4.7	90.6 ± 7.3
0.500	64.4 ± 4.9	70.3 ± 4.4	82.2 ± 5.1
0.250	60.3 ± 2.2	63.2 ± 3.4	70.8 ± 4.4
0.125	52.6 ± 3.2	52.6 ± 2.1	59.5 ± 4.6
0.063	39.2 ± 1.9	46.5 ± 2.9	47.2 ± 3.3
0.031	24.6 ± 2.0	36.2 ± 4.2	30.3 ± 3.2
0.016	10.5 ± 1.1	23.4 ± 2.2	17.0 ± 2.5
0.008	4.7 ± 0.6	12.1 ± 1.5	6.6 ± 0.3
0.004	0.1 ± 0.1	4.4 ± 0.8	1.4 ± 0.2

G4 compared with G5, $t=2.916$, $P < 0.01$; G4 compared with G6, $t=3.005$, $P < 0.01$

析, $P > 0.1$, 统计学分析无显著性差异 (表 3)。故可认为单纯 CSA 药物浓度与 Rb 肿瘤细胞的抑制无相关关系。

表 3 CSA 作用于 Rb 细胞的吸光度与抑瘤率

Table 3 The absorbency value and inhibition rates of CSA on Rb cells

CSA (mg/L)	Hole	A	Inhibition rate (%)
1.000	5	0.664 ± 0.024	11.95 ± 0.50
0.500	5	0.686 ± 0.037	9.09 ± 2.13
0.250	5	0.698 ± 0.011	7.39 ± 1.36
0.125	5	0.740 ± 0.029	1.89 ± 0.85
0.063	5	0.726 ± 0.051	3.83 ± 0.74
0.031	5	0.750 ± 0.030	0.00 ± 0.00
Comparison	5	0.754 ± 0.023	

2.2 倒置显微镜观察结果

未加入化疗药物前, 倒置显微镜下可见 Rb 细胞紧密粘附成团, 细胞附壁性好, 细胞个体大, 边界清晰透亮 (图 1)。加入不同浓度卡铂和足叶乙甙药物后, SO-Rb50 细胞数随着药物浓度增加, 镜下细胞逐渐稀疏, 细胞个体体积逐渐缩小, 堆积成团的 Rb 细胞结合力下降, 松散成个体漂浮, 细胞附壁逐渐减少。原来边界清晰、透亮的细胞逐渐变得边界模糊, 细胞内颜色加深。部分细胞内的细胞器开始皱缩, 细胞核浓缩, 部分可见崩解。视野内可见细胞崩解碎片增多 (图 2, 3)。在相同浓度的卡铂和足叶乙甙组内加入 CSA 后, 可见 Rb 细胞的形态改变较

以上所述更明显(图 4),且随着 CSA 浓度的增加, Rb 细胞松散皱缩,变形、坏死改变越来越明显。单独加入不同浓度 CSA 的 SO-Rb50 细胞,其细胞形态与未加药对照组无明显差异。视野内细胞密度大, Rb 细胞间聚集成团,细胞附壁良好,细胞边界清晰,透亮,个体大小均匀。未发现细胞内细胞器和细胞核的浓缩、崩解等情况。

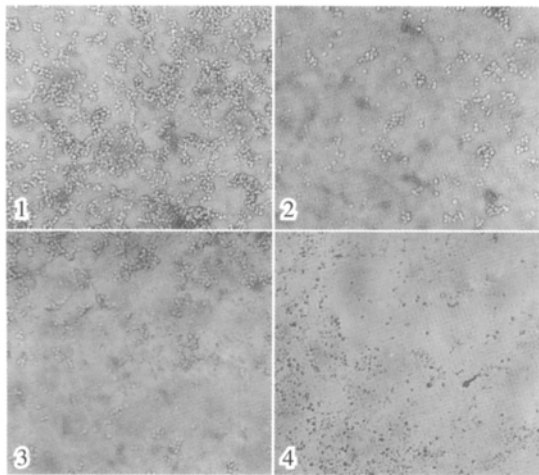


图 1 未用化疗药物培养的 SO-RB50 细胞

图 2 加用 0.25 mg/L 卡铂培养的 SO-RB50 细胞

图 3 加用 0.125 mg/L 足叶乙甙培养的 SO-RB50 细胞

图 4 加用 0.25 mg/L 卡铂 + 1.0 mg/L CSA 培养的 SO-RB50 细胞

Fig. 1 SO-RB50 cells cultured without chemotherapeutic drugs ($\times 20$)

Fig. 2 SO-RB50 cells cultured with 0.25 mg/L carboplatin ($\times 20$)

Fig. 3 SO-RB50 cells cultured with 0.125 mg/L etoposide ($\times 20$)

Fig. 4 SO-RB50 cells cultured with 0.25 mg/L carboplatin + 1.0 mg/L CSA ($\times 20$)

3 讨论

3.1 环孢素影响化疗药物对 Rb 细胞疗效的机制

随着对视网膜母细胞瘤诊治水平的提高,目前越来越多的学者在采用保守治疗方法治疗 Rb 以达到保留眼球及部分有用视力的目的。化疗减容是 Rb 保守治疗的重要方法之一。所谓化疗减容^[5]是指对以往肿瘤较大需采取眼球摘除术的患者,采用全身或局部化疗方法使肿瘤体积缩小,再联合激光、冷冻、局部巩膜板敷贴放疗等手段进行综合治疗。此方法是目前世界上 Rb 治疗首选的保守治疗

方法,其治疗后生存率及眼球保存率有了较大的提高^[1,2,6]。但有学者发现^[7],部分 Rb 患者在进行数个化疗疗程后会出现疗效下降或无效现象,部分化疗患者肿瘤复发时再使用原来有效的同一化疗方案时也会出现治疗无效的情况,因而 Rb 化疗的耐药性引起人们的重视。以往的研究发现,Rb 细胞对化疗药物容易产生多药耐药性作用,其中 20% ~ 30% Rb 细胞即使未经化疗药物作用也会产生耐药性^[8,9]。基础研究发现在 Rb 化疗失败患者肿瘤细胞中可发现抗多种药物的 P 黏蛋白高度表达,因而有学者提出这可能是 Rb 细胞对化疗反应低下的原因^[3,4]。P 黏蛋白是一种依赖 ATP 的膜转移因子,其通过向细胞外转运化疗药物而促使化疗药物从耐药的肿瘤细胞中外流。而大剂量的环孢素是 P 黏蛋白抑制剂,在动物实验及临床应用中,发现环孢素可逆转 Rb 细胞对多种化疗药物的耐药作用,使化疗药物在肿瘤细胞中积聚而达到抑制和杀灭肿瘤细胞的作用^[7]。本研究采用不同浓度的环孢素联合化疗药物卡铂和足叶乙甙作用于 Rb 细胞,通过 MTT 法测量及倒置显微镜下观察 Rb 细胞的生长情况,评价环孢素影响卡铂及足叶乙甙抑制和杀灭 Rb 细胞的促效作用。

本组实验所采用的化疗药物卡铂(carboplatin)及足叶乙甙(etoposide, VP-16)是目前世界上治疗小儿恶性肿瘤新一代化疗药物,卡铂是非特异性作用于细胞循环阶段的药物,它通过影响肿瘤细胞 DNA 的链内与链间的交叉,产生细胞毒性作用而抑制杀灭肿瘤细胞^[10]。足叶乙甙是半合成的鬼臼酯素衍生物,具有广谱抗肿瘤活性,作用机制为抑制核苷转移,抑制肿瘤细胞 DNA、RNA 及蛋白质合成。从本组实验结果发现,不同浓度的卡铂及足叶乙甙均对 SO-Rb50 细胞有抑制杀灭作用。卡铂及足叶乙甙药物浓度越高, Rb 细胞数量越少,细胞抑瘤率越高, Rb 细胞抑瘤率与药物浓度呈剂量相关效应。

3.2 环孢素对化疗药物卡铂和足叶乙甙抑制 Rb 细胞的增效作用

通过对环孢素的药物代谢动力学的研究发现,环孢素在血浓度较高剂量下存在剂量疗效相关关系,靶细胞暴露于环孢素越充分,疗效越好^[2,3]。卡铂及足叶乙甙加入不同浓度的 CSA 后,SO-Rb50 细胞抑瘤率较单独应用卡铂及足叶乙甙时增高,且加入 CSA 浓度增加细胞抑瘤率也增加,加用 CSA 后 IC₅₀ 值逐渐降低,两组抑瘤率及 IC₅₀ 值统计学显示

差异有显著性。这说明 CSA 能够提高卡铂和足叶乙甙对 Rb 细胞的抑制杀灭作用。在使用较高浓度卡铂和足叶乙甙时,随着 CSA 浓度的增加,卡铂及足叶乙甙对 Rb 细胞抑制效果越明显。但在低浓度足叶乙甙作用于 Rb 细胞时,加入 CSA 的浓度变化对细胞抑瘤率影响不明显,这可能与低浓度足叶乙甙抑制 Rb 细胞的作用不如卡铂有关。

Rb 细胞发生坏死、凋亡首先可以看到细胞逐渐疏松,细胞间结合力下降,附壁逐渐减少;然后可见细胞数量逐渐减少,细胞发生坏死、皱缩,细胞崩解碎片增多。从倒置显微镜下观察随着化疗药物浓度的增加,SO-Rb50 细胞数逐渐稀疏,细胞结合力下降,附壁逐渐减少。细胞发生坏死、皱缩,细胞崩解碎片增多。在相同浓度的卡铂和足叶乙甙组内加入 CSA 后,Rb 细胞的形态改变较同一浓度单纯化疗药物作用所致改变更明显,且随着 CSA 浓度的增加,Rb 细胞坏死凋亡改变越来越明显。这也从形态学上显示随着 CSA 的加入及浓度的增加,化疗药物对 Rb 细胞的杀灭作用逐渐增强,CSA 具有提高化疗药物杀灭 Rb 细胞疗效的作用。

单独应用不同浓度 CSA 作用于 SO-Rb50 细胞,其细胞抑瘤率并无明显改变。其细胞形态与对照组相比,细胞密度、细胞附壁情况及细胞之间联结状况均未见明显差异。提示单纯 CSA 对 Rb50 细胞并无抑制杀灭作用,卡铂与足叶乙甙加入 CSA 后 Rb 细胞抑瘤率提高与 CSA 抑制 Rb 细胞的多药耐药性,促进了化疗药物对 Rb 的疗效有关。高浓度 CSA 作用于 SO-Rb50 细胞所引起的较低的抑瘤率,可能与培养液内高含量 CSA 对 Rb 细胞的毒性作用有关。

从本实验结果我们认为 CSA 单独作用于 SO-Rb50 细胞无抑制杀灭作用,虽然对 CSA 对化疗药物卡铂及足叶乙甙治疗 Rb 细胞的促效作用机理尚不明确,但 CSA 能提高卡铂及足叶乙甙对 SO-Rb50 细胞的抑制杀灭作用。在相同浓度的化疗药物作用下,CSA 药物浓度增加,可增进卡铂及足

叶乙甙对 Rb 细胞作用的效果。这为我们在今后临床应用化疗药物治疗 Rb 过程中合理使用环孢素提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Kingston J E, Hungerford J L, Madreperla S A, et al. Results of combined chemotherapy and radiotherapy for advanced intraocular retinoblastoma [J]. Arch Ophthalmol, 1996, 114(11): 1339-43.
- [2] Shields C L, DePotter P, Himmelstein B, et al. Chemoreduction in the initial management of intraocular retinoblastoma[J]. Arch Ophthalmol, 1996, 114(11): 1330-8.
- [3] Chan H S, Deboer G, Thiessen J J, et al. Combining cyclosporin with chemotherapy controls intraocular retinoblastoma without requiring radiation [J]. Clin Cancer Res, 1996, 2(9): 1499-508.
- [4] Chan H S, Thorner P S, Haddad G, et al. Multidrug resistant phenotype in retinoblastoma correlates with P-glycoprotein expression[J]. Ophthalmology, 1991, 98(9): 1425-31.
- [5] 吴中耀. 视网膜母细胞瘤诊治研究进展[J]. 中山医科大学学报, 1998, 19(3): 161-4.
- [6] Shields C L. Turning up the heat on retinoblastoma [J]. Rev Ophthalmol, 1997, 4(3): 116-8.
- [7] White L. Chemotherapy in retinoblastoma: current status and future directions [J]. Am J Paediatr Haematol Oncol, 1991, 13(2): 189-201.
- [8] 金捷, 易玉珍, 郑健, 等. 骆驼蓬总碱、氟尿嘧啶对视网膜母细胞瘤细胞系 SO-Rb50 生物学效应的研究[J]. 中华眼科杂志, 1990, 26(5): 286-8.
- [9] Zhao D Y, Shields C L, Shields J A, et al. New developments in the management of retinoblastoma[J]. J Ophthalmic Nurs Technol, 1998, 17(1): 13-8.
- [10] Cole S P, Bhardwaj G, Gerlach J H, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line[J]. Science, 1992, 258(5088): 1650-4.

(编辑 刘清海)