

# 羟基喜树碱的鼻咽癌治疗方案实验性探讨

梁永钜, 符立梧, 杨安奎, 田 晖, 潘启超

(中山医科大学肿瘤防治中心, 广东 广州 510060)

**摘要:**【目的】探讨以拓扑异构酶I抑制剂羟基喜树碱(HCPT)为基础的治鼻咽癌联合方案。【方法】实验采用人鼻咽癌(NPC)细胞株 SUNE1, 体外细胞毒测定用 MTT 法, 体内实验采用 SUNE1 裸鼠移植瘤模型, 研究 HCPT 与顺铂(DDP)或(和)5-氟尿嘧啶(5-FU)联合用药方案的抗癌效果。【结果】在体外实验中, HCPT、DDP 和 5-FU 单用对 SUNE1 的  $IC_{50}$  分别为 3.3、2.8、8.6  $\mu\text{mol/L}$ ; HCPT、DDP 和 5-FU 在 1:1:2 的剂量比例合用的条件下, HCPT 与 DDP 或(和)5-FU 合用均具有明显的协同抗 NPC 作用。体内实验也表明 HCPT 与 DDP 合用具有协同抗 NPC 作用( $P < 0.01$ ), HCPT 与 5-FU 合用未见明显的相加或协同作用, HCPT 与 DDP 及 5-FU 合用抗 NPC 效果较单药和两药合用为优。【结论】HCPT+DDP 和 HCPT+DDP+5-FU 具有协同抗 NPC 作用。

**关键词:** 鼻咽肿瘤/药物治疗; 喜树碱/治疗应用; 顺铂/治疗应用; 氟尿嘧啶/治疗应用

中图分类号: R734 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)06-0423-04

## Experimental Study on Hydroxycamptothecin Therapy for Nasopharyngeal Cancer

LIANG Yong-ju, FU Li-wu, YANG An-kui, TIAN Hui, PAN Qi-chao

(Cancer Centre, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510060, China)

**Abstract:** 【Objective】To investigate the topoisomerase I inhibitor 10-hydroxycamptothecin-based chemotherapy for nasopharyngeal cancer(NPC). 【Method】The anticancer effect of 10-hydroxycamptothecin (HCPT) in with 5-fluorouracil (5-FU) and/or cisplatin (DDP) were evaluated by MTT assay *in vitro* and by using the model of human NPC (SUNE1) xenograft in nude mice *in vivo*. 【Result】*In vitro*, HCPT, 5-FU and DDP had potent cytotoxicity to SUNE1 cells, their  $IC_{50}$  were 3.3  $\mu\text{mol/L}$ , 8.6  $\mu\text{mol/L}$ , 2.8  $\mu\text{mol/L}$ , respectively, and, in the dose rate of HCPT:DDP:5-FU=1:1:2, HCPT in combination with DDP or/and 5-FU had synergistic effect. *In vivo*, HCPT in combination with DDP had synergistic anticancer effect ( $P < 0.01$ ), additivity or synergism was not observed in the combination of HCPT and 5-FU, the anticancer effect of HCPT+DDP+5-FU was better than single drug and 2 drug combination. 【Conclusion】HCPT+DDP and HCPT+DDP+5-FU possess synergistic effect against NPC.

**Key words:** nasopharyngeal neoplasms/drug therapy; camptothecin/therapeutic use; cisplatin/therapeutic use; fluorouracil/therapeutic use

含顺铂(DDP)的化疗方案对鼻咽癌(nasopharyngeal cancer, NPC)化疗效果较好,常用的化疗方案是顺铂+5-氟尿嘧啶(5-FU)加或不加博来霉素。不含铂类的化疗方案效果较差。复发性 NPC 对常规的化疗方案常不敏感。因此,探讨 NPC 新的化疗方案十分必要。拓扑异构酶(Topo I)抑制剂抗肿

瘤作用机制有别于其它抗癌药,此类药物干扰 Topo I 的 DNA 链断裂-重连接反应,导致 DNA 单链断裂。有报道 Topo I 抑制剂能增强 DDP 和 5-FU 的抗肿瘤作用<sup>[1,2]</sup>。因此,我们拟通过体外和体内实验对 Topo I 抑制剂羟基喜树碱(10-hydroxycamptothecin, HCPT)、DDP 和 5-FU 联合用药的协同作用

收稿日期: 2001-05-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770840)

作者简介: 梁永钜(1952-)男,广东广州人,副主任技师

© 1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

进行研究,以图为鼻咽癌的化疗提供可选择的方案。

## 1 材料与方 法

### 1.1 药品及试剂

HCPT 为黄石飞云制药公司产品,DDP 为山东齐鲁制药厂产品,5-FU 为科鼎公司产品。MTT 为 Sigma 公司产品。

### 1.2 细胞株及其培养

鼻咽癌细胞株 SUNE1 由中山医科大学肿瘤防治中心建株<sup>[3]</sup>。按常规采用含体积分数为 10% 小牛血清、青霉素  $10^5$  U/L 和链霉素 100 mg/L 的 RP-MI1640 培养液,置 37 °C、体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 温箱中培养。

### 1.3 体外细胞毒的测定

用 MTT 法测定。以  $3 \times 10^3$  /孔细胞接种于 96 孔板上,每孔总体积为 0.19 mL,培养 24 h 后,加入  $10 \mu\text{L}$  不同浓度的药物,同时设立生理盐水对照组,药物作用 72 h,结束前 4 h 加入  $10 \mu\text{L}$  浓度为 10 g/L 的 MTT 溶液,培养结束倾去培养液,加入二甲基亚砷,振动完全溶解蓝色结晶,用酶联仪在 570 nm 波长测定吸光度。分别计算抑制细胞生长 50% 时的药物浓度(半数抑制浓度),即 IC<sub>50</sub> 值。以 Zhou 等<sup>[4]</sup> 方法设计研究 HCPT 与 DDP 或(和)5-FU 的联合作用,经预试测定 3 个药物对 SUNE1 细胞的 IC<sub>50</sub> 并参照 3 个药物的 IC<sub>50</sub> 比值,3 个药物的 2 或 3 个药按固定的剂量比例即 HCPT 为 1、DDP 为 1、5-FU 为 2 联合应用,并从低到高排列多个浓度作体外细胞毒试验。以 Zhou 等提出的中效方程(式 1)和联合指数(combination index, CI, 式 2 和图 1 表示为  $I_c$ )方程(式 2)计算不同抑制率下的剂量及 CI (量符号为  $I_c$ )。

$$\lg(f_a/f_u) = m \lg D - m \lg D_m \quad (\text{式 } 1)$$

$$I_c = \frac{D_1}{D_{x1}} + \frac{D_2}{D_{x2}} \quad (\text{式 } 2)$$

式 1 中  $f_a$  为被药物影响部分(fraction affected),  $f_u$  为未被药物影响部分(fraction unaffected),  $D$  为剂量,  $D_m$  为  $f_a = 50\%$  的剂量,即 IC<sub>50</sub>,  $m$  为量效曲线  $\lg(f_a/f_u)$  对  $\lg D$  的斜率。式 2 中  $D_{x1}$  和  $D_{x2}$  分别是 2 个药物单用抑制率为  $x$  的剂量,  $D_1$  和  $D_2$  是两个药物合用抑制率为  $x$  的剂量,3 药联用则在式的右边加上相应的第 3 项。CI 或  $I_c > 1$  为拮抗作用,CI 或  $I_c = 1$  为相加作用,CI 或  $I_c < 1$  为协

同作用。以阐明其化疗方案的合理性。

### 1.4 实验动物

BALB/c 裸小鼠 72 只,由中山医科大学动物中心提供,雌雄各半,6 周龄,体质量为 18 ~ 25 g,由中山医科大学动物中心无菌饲养。

### 1.5 SUNE1 裸鼠移植瘤模型的建立及体内抗肿瘤作用

每鼠腋窝皮下接种  $10 \times 10^6$  SUNE1 细胞,待肿瘤长至直径 3 ~ 5 mm 时,按性别分层随机分 8 组,每组 9 只(其中雄鼠 4 ~ 5 只),设生理盐水对照组、HCPT 组、DDP 组、5-FU 组、HCPT + DDP 组、HCPT + 5-FU 组、DDP + 5-FU 组和 HCPT + DDP + 5-FU 组。给药方案为 HCPT 1.5 mg/kg、DDP 2 mg/kg、5-FU 20 mg/kg,隔日腹腔注射给药,每周 3 次,连续给药 3 周。每 3 d 称量鼠体质量 1 次,以调整给药量。末次给药后第 3 天结束实验杀鼠,称体质量,计算实验前后体质量变化率,取出肿瘤,称瘤质量,计算各组的抑瘤率(inhibition rate, IR, 量符号为  $r_i$ )。

$$r_i = 100\% - \frac{\text{实验组瘤质量}}{\text{生理盐水对照组瘤质量}} \times 100\%$$

## 2 结 果

### 2.1 单药及联合用药对 SUNE1 的体外细胞毒作用

在本实验条件下 HCPT、DDP、5-FU 及 4 种联合用药有良好的线性量效  $\lg D$  对  $\lg(f_a/f_u)$  关系,相关系数  $r$  在 0.98 ~ 0.99 之间;HCPT、DDP 和 5-FU 的量效关系中效方程的斜率  $m$  分别为 0.59、1.30 和 0.81,表明 DDP 剂量对抑制率的影响较大,联合用药的剂量对抑制率的影响与相应的单药有一定的联系。HCPT、DDP 和 5-FU 对 SUNE1 细胞的半数抑制浓度 IC<sub>50</sub> 值分别为  $(3.27 \pm 1.39)$ 、 $(2.84 \pm 0.36)$ 、 $(8.57 \pm 2.37) \mu\text{mol/L}$ ,4 种联合用药方案中各药的 IC<sub>50</sub> 均明显低于单药的 IC<sub>50</sub>。两药或 3 药合用抗 NPC 效果较单药为优,其中作用最强为 HCPT + DDP + 5-FU,其次顺序为 HCPT + DDP、HCPT + 5-FU、DDP + 5-FU(表 1)。

联合指数(CI 或  $I_c$ )分析表明,当 DDP + 5-FU 联合应用的剂量在抑制率大于 35% 时,CI 或  $I_c < 1$ ,最低达 0.67,显示明显有协同作用。而含有 HCPT 的联合用药即 HCPT + DDP、HCPT + 5-FU 和 HCPT + DDP + 5-FU 效果更好,联合应用的剂量在抑制率大于 20% 时,CI 或  $I_c < 1$ ,最低分别达

表 1 HCPT、DDP、5-FU 单药和联合用药对 SUNE1 体外抑制作用

Table 1 The inhibitory effect of HCPT, DDP and 5-FU in single or combination on NPC *in vitro*

Regimen	Drug	$D_m / (\text{mmol/L})$	$m$	$r$
Single drug	HCPT	$3.27 \pm 1.39$	$0.59 \pm 0.01$	$0.9892 \pm 0.0122$
	DDP	$2.84 \pm 0.36$	$1.30 \pm 0.10$	$0.9866 \pm 0.0042$
	5-FU	$8.57 \pm 2.37$	$0.81 \pm 0.05$	$0.9828 \pm 0.0061$
H+D	HCPT	$0.98 \pm 0.42$	$1.05 \pm 0.02$	$0.9852 \pm 0.0036$
	DDP	$0.98 \pm 0.42$		
H+F	HCPT	$1.30 \pm 0.81$	$0.82 \pm 0.16$	$0.9871 \pm 0.0121$
	5-FU	$2.60 \pm 1.61$		
D+F	DDP	$1.56 \pm 0.31$	$1.26 \pm 0.11$	$0.9936 \pm 0.0007$
	5-FU	$3.12 \pm 0.60$		
H+D+F	HCPT	$0.64 \pm 0.26$	$1.14 \pm 0.04$	$0.9834 \pm 0.0099$
	DDP	$0.64 \pm 0.26$		
	5-FU	$1.29 \pm 0.51$		

Note: A average of 3 assay,  $\bar{x} \pm s$ ; The parameters  $D_m$  is  $IC_{50}$ ;  $m$  and  $r$  are slope and the correlation coefficient of the plot  $\lg(f_u/f_u)$  versus  $\lg D$

0.61、0.38 和 0.36, 表现出较强的协同作用, 其中以 3 药联合协同作用最强(图 1)。

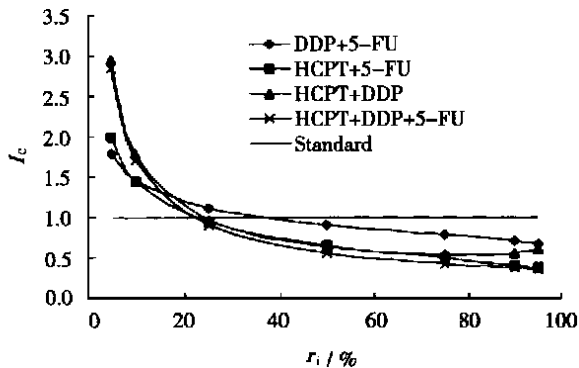


图 1 HCPT、DDP 和(或)5-FU 联合用药的协同作用

Fig. 1 The synergistic effect of HCPT combination with DDP and/or 5-FU

$I_c$ : combination index (CI);  $CI$  or  $I_c < 1$  is synergism,  $CI$  or  $I_c > 1$  is antagonism,  $r_i$ : inhibition rate (IR)

### 2.2 单药及联合用药对 SUNE1 裸鼠移植瘤的抑制作用

实验采用正交设计, 以 HCPT、DDP、5-FU 为研究因素, 每因素有 2 个水平, 即给药与不给药, 共设 8 组, 即生理盐水对照组、HCPT 组、DDP 组、5-FU 组、HCPT + DDP 组、HCPT + 5-FU 组、DDP + 5-FU 组和 HCPT + DDP + 5-FU 组。实验结束时对照组平均瘤质量 1.4 g, 实验前后体质量变化率为 +11.2%。单药抑瘤率为 HCPT 23.0%、DDP 30.3%、5-FU 33.5%, 体质量变化率分别为 +9.0%、+5.7%、+9.5%。联合用药抑瘤率为

HCPT + DDP 54.8%、DDP + 5-FU 46.0%、HCPT + 5-FU 40.3% 和 HCPT + DDP + 5-FU 59.5%, 体质量变化率分别为 +6.4%、+3.5%、+4.3%、和 +0.4%。HCPT + DDP 具有显著协同作用 ( $P < 0.01$ ), 毒性与单药相近, HCPT + DDP + 5-FU 抗癌作用强于单药及两药合用。DDP + 5-FU 和 HCPT + 5-FU 的抗癌率分别为 46.0% 和 40.3%, 协同作用不显著。

### 3 讨论

已开发成功的 Topo I 抑制剂主要有法国的 irinotecan (CPT-11)、美国的 topotecan (TPT)、和我国的羟基喜树碱 (10-hydroxycamptothecin, HCPT)<sup>[5]</sup>。许多临床前研究表明拓扑异构酶 I 抑制剂与 DDP 合用具有协同或相加作用<sup>[6]</sup>。Goldwasser 等<sup>[1]</sup>指出 Topo I 抑制剂延缓 DDP 介导的 DNA 链交联的逆转, 从而抑制 DNA 修复, 高浓度 DDP (150  $\mu\text{mol/L}$ ) 能增加 Topo I 抑制剂对 Topo I 的抑制活性。de Jonge 等<sup>[2]</sup>报道 CPT-11 和 5-FU 合用, 对胸苷合成酶的抑制作用较单用 5-FU 更强。本研究表明: HCPT + DDP 在体外和体内对 NPC 均具有协同抗 NPC 作用, 而且体外实验 HCPT + DDP 在较低浓度下 (HCPT 和 DDP 各 1  $\mu\text{mol/L}$ ) 即见协同作用; HCPT + 5-FU 在体外对 NPC 有协同作用而在体内则未见明显的协同作用。由于 HCPT + DDP 和 HCPT + DDP + 5-FU 有

较好的协同作用且效果均较 DDP+5-FU 为优, 因此可考虑作为 DDP+5-FU 的替代方案应用于临床治疗 NPC。另有报道 Topo I 抑制剂对由多药抗药性相关蛋白(MRP)及 P-糖蛋白(P-gp)介导的多药抗药性的肿瘤细胞有效<sup>[7]</sup>。Rowinsky 等<sup>[8]</sup> 临床研究表明对传统化疗药物耐药的实体瘤先用 DDP, 后用 TPT 效果优于先用 TPT 后用 DDP, 两者合用效果明显优于单药。Chou 等<sup>[3]</sup> 以人畸胎瘤细胞株 833K 细胞及其相应的对 DDP 耐药株 833K/64CP10 研究表明 TPT 与 DDP 合用在敏感细胞株及耐药株均具有显著的协同作用。提示以 Topo I 抑制剂为基础的方案可能对复发 NPC 仍有效, 值得进一步探索。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Goldwasser F, Valenti M, Misset J L, *et al.* Potentiation of cisplatin cytotoxicity by 9-Amino-camptothecin [ J ] . Clin Cancer Res 1996 2(4):687.
- [ 2 ] de Jonge M J, Sparreboom A, Verweij J. The development of combination therapy involving camptothecins: a review of preclinical and early clinical studies [ J ] . Cancer Treat Rev 1998 24(3):205.

- [ 3 ] 吴荫棠, 汪慧民, 杨小平, 等. 鼻咽癌裸鼠移植瘤及其相应体外细胞株的建立与特性研究 [ J ] . 癌症, 1995, 14 (2): 83.
- [ 4 ] Chou T C, Motzer R J, Tong Y, *et al.* Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan, and cisplatin against human teratocarcinoma cells growth: a rational approach to clinical protocol design [ J ] . J Natl Cancer Inst, 1994 86(20): 1517.
- [ 5 ] Arbuck S G, Takimoto C H. An overview of topoisomerase I-targeting agents [ J ] . Semin Hematol, 1998 35 (3 Suppl 4): 3.
- [ 6 ] al-Sarraf M, Hussein M. Head and neck cancer: present status and future prospects of adjuvant chemotherapy [ J ] . Cancer Invest, 1995, 13(1):41.
- [ 7 ] Jansen W J, Hulscher T M, van Ark-Otte J, *et al.* CPT-11 sensitivity in relation to the expression of P170-glycoprotein and multidrug resistance associated protein [ J ] . Br J Cancer, 1998 77(3): 359.
- [ 8 ] Rowinsky E K, Kaufmann S H, Baker S D, *et al.* Sequences of topotecan and cisplatin: Phase I, pharmacologic and *in vitro* studies to examine sequence dependence [ J ] . J Clin Oncol, 1996, 14(12): 3074.

(编辑 黄小延, 张敏瑞)

## ·新成果·

### 角膜地形及全角膜厚度的系列研究

课题组负责人 刘祖国

(中山医科大学眼科中心, 广东 广州 510060)

本课题组在国际上最先建立了正常人角膜后表面形态的正常值, 首次报道我国国人的正常角膜前表面地形图, 正常人全角膜厚度的正常值, 全角膜厚度彩色编码图形的分类方法及标准。在干眼的研究中, 首次发现了干眼患者的全角膜厚度减少, 角膜前表面的规则性明显降低, 且角膜厚度减少及角膜前表面规则性降低的程度与此病的严重程度明显相关。此发现不仅阐明了干眼患者早期视力下降及波动的原因, 而且获得了从角膜形态及厚度方面诊断干眼及评价干眼严重程度的新指标。首次发现了长期(5年以上)戴角膜接触镜患者角膜厚度明显变薄, 对预防角膜屈光手术严重并发症的发生具有特别重要的临床意义; 获得了角膜形态异常性角膜病的角膜形态变化规律, 提出此类疾病的形态学诊断标准, 极大地提高早期诊断率。通过对近视眼角膜形态的观察, 从角膜形态方面阐明了轻、中度近视发病的机理; 通过观察角膜屈光手术及各种眼前段手术后角膜形态的变化规律, 率先总结如何使这些手术最小程度地影响角膜形态的系列经验; 在国际上首次提出 LASIK 手术后剩余角膜床厚度的安全值(大于 250  $\mu\text{m}$ ), 目前此标准已成为国际此手术的安全标准。该项成果业已荣获 2000 年度中国高校科学技术一等奖。

(黄小珍)