

高温、利多卡因、足叶乙苷联合法 体外净化白血病细胞

童秀珍^① 洪文德 罗绍凯 谭路坚 庞国元

(中山医科大学附属第一医院血液科,广州,510080)

提 要 采用体外造血细胞培养技术,应用高温、利多卡因、足叶乙苷(足叶乙甙,VP-16)联合法,研究其在体外对白血病细胞的杀伤作用。结果表明:高温、利多卡因、VP-16 三者联用比高温+利多卡因、高温+VP-16,能更有效地杀伤白血病细胞,而正常粒单系克隆形成单位(GM-CFU)仍约有 50% 存活。41℃ 60min+0.75mmol/L 利多卡因+8.5μmol/L VP-16 联合处理后,HL-60、U937、K562 细胞分别只存活 0.01%、9.40%、33.66%。另外,从这个联合方案说明对于不同类型的白血病效果不一,在其自身骨髓移植(ABMT)时,体外净化骨髓要采用不同的净化方案。

关键词 急性非淋巴细胞白血病(ANLL); 体外净化; 利多卡因; 足叶乙苷(VP-16); 热处理

中图分类号 R733.74

目前对体外净化方法的研究有物理学、免疫学、药理学等,国内外已有不少作者报道了单种和 2 种联用于体外净化骨髓的方法,但 3 种联用的净化方法报道较少。本文报道高温、利多卡因、足叶乙苷(足叶乙甙,VP-16)联合法,体外杀伤不同类型的白血病细胞的效果,为临床应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 培养细胞来源 GM-CFU 培养用的细胞来源于 20 例正常人骨髓分离的单个核细胞悬液。

1.1.2 细胞株 HL-60 细胞株作为急性早幼粒白血病(M₃)的模型,U937 细胞株作为急性单核白血病(M₅)的模型,K562 细胞株作为红白血病(M₆)的模型。以上细胞均用 10% 的小牛血清 1640 液进行传代培养,待细胞处于对数生长期用于实验。

1.1.3 药物 利多卡因每支 5ml,含 0.1g,浙江太兴制药厂出品。足叶乙苷(VP-16)每支 5ml,含 0.1g,江苏连云港制药厂出品。

1.2 方法

1.2.1 实验处理 正常人骨髓和 HL-60、U-

937、K562 细胞株均采用以下同等处理条件:

(1)高温+利多卡因:选用 2 种浓度利多卡因(分别为 0.5mmol/L、0.75mmol/L)与上述细胞分别在 41℃ 水浴 60min,用集落培养方法检测其净化作用。(2)单用 VP-16、VP-16+高温:选择 3 种浓度 VP-16 (为 0.85μmol/L、4.25μmol/L、8.5μmol/L)与上述细胞分别置于 37℃、41℃ 共孵育 60min,其它处理同前。(3)高温+利多卡因+VP-16 联合处理:利多卡因浓度为 0.50mmol/L、0.75mmol/L,VP-16 浓度分别为 0.85μmol/L、4.25μmol/L、8.5μmol/L 与上述细胞分别置于 41℃ 共孵育 60min,其它处理同前。

1.2.2 GM-CFU 的培养方法 按文献[1]完成。

1.2.3 细胞株培养方法 根据预试验结果,3 种细胞株浓度均为 5×10^3 个/ml,不加条件培养液,其余与 GM-CFU 培养方法相同。

1.2.4 统计学处理 采用方差检验。*t* 检验。

2 结果

2.1 高温联用利多卡因对各种细胞的作用

结果如表 1 所显示:单纯高温 41℃ 60min 处理后,除 GM-CFU 外,3 个细胞株的实验组

^① 第一作者,28 岁,女,硕士 住院医师

与 37℃ 对照组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。若联用利多卡因,除 GM-CFU、K562 细胞之外,HL-60、U937 细胞的实验组与 41℃ 比较,有显著性差异 ($P < 0.01$)。41℃ 60min 联用利

多卡因 0.75mmol/L 处理后,GM-CFU 的存活率为 80.28%,而 HL-60、U937 细胞株的存活率分别为 34.85%、51.39%。

表 1 高温联用利多卡因(LID)对各种细胞集落数(存活率)的影响 $\bar{x} \pm s$

处理因素	GM-CFU	HL-60	U937	K562
温度(℃) 利多卡因(mmol/L)	(n=20)	(n=10)	(n=8)	(n=8)
37 0	110.30±33.66 (1.00)	795.20±44.19 (1.00)	480.60±9.13 (1.00)	429.50±14.75 (1.00)
41 0	101.15±10.33 (0.9170)	604.20±22.44 ¹⁾ (0.7604)	341.20±12.36 ¹⁾ (0.7100)	355.50±5.71 ¹⁾ (0.8277)
41 0.5	97.90±25.45 (0.8880)	323.90±31.33 ²⁾ (0.4003)	295.70±9.22 ²⁾ (0.6152)	354.63±8.89 (0.8256)
41 0.75	88.53±20.99 (0.8028)	277.10±38.71 ²⁾ (0.3485)	249.60±23.33 ²⁾ (0.5193)	321.50±10.05 (0.7485)

1)41℃ 与 37℃ 处理后的集落数进行比较 ($P < 0.05$)

2)41℃ 与 41℃ + 利多卡因处理后的集落数进行比较 $P < 0.05$

2.2 VP-16 + 高温对各种细胞的作用

结果如表 2 所显示,除 GM-CFU、K562 细胞之外,HL-60、U937 细胞的集落形成的抑制作用随 VP-16 浓度的增加而增加,HL-60、U937 细胞株的实验组与空白对照组比较 ($P <$

0.05)。3 种细胞中 K562 细胞对 VP-16 最不敏感。若 VP-16、高温(41℃) 60 min 联用,对于 3 种细胞株,其杀伤效果比单纯 41℃ 大 ($P > 0.05$),而不增加对正常骨髓 GM-CFU 的抑制作用 ($P < 0.05$)。

表 2 VP-16 或联用 41℃ 对各种细胞集落数(存活率)的影响 $\bar{x} \pm s$

温度(℃)	VP-16 ($\mu\text{mol/L}$)	GM-CFU (n=20)	HL-60 (n=10)	U937 (n=8)	K562 (n=8)
37	0	110.30±33.06 (1.00)	795.20±49.19 (1.00)	480.60±9.19 (1.00)	429.50±14.75 (1.00)
	0.85	90.45±19.09 (0.8206)	577.0±55.92 ¹⁾ (0.7256)	250.1±19.79 ¹⁾ (0.5203)	373.5±12.51 (0.8696)
	4.25	88.6±29.11 (0.8032)	395.4±49.11 ¹⁾ (0.4972)	235.1±0.99 ¹⁾ (0.4891)	356.2±8.53 (0.8293)
	8.5	76.05±28.84 (0.6894)	67.0±21.37 ²⁾ (0.0843)	204.3±5.71 ¹⁾ (0.4250)	301.3±18.35 (0.7015)
41	0	101.15±10.33 (0.9170)	604.7±22.44 (0.7604)	341.2±12.36 (0.7100)	355.5±5.71 (0.8277)
	0.85	88.75±23.81 (0.8046)	417.5±44.53 ³⁾ (0.5250)	172.87±21.21 ³⁾ (0.3195)	293.1±21.99 ³⁾ (0.6824)
	4.25	84.4±26.25 (0.7631)	237.9±51.25 ³⁾ (0.2991)	140.0±22.09 ³⁾ (0.2913)	280.1±11.52 ³⁾ (0.6521)
	8.5	68.85±16.58 (0.6242)	57.7±12.06 ⁴⁾ (0.0725)	119.±5.18 ³⁾ (0.2476)	256.5±18.69 ³⁾ (0.5922)

1)为 3 种浓度 VP-16 与空白对照组比较 $P < 0.05$; 2) $P < 0.01$; 3) 为 41℃ 与 VP-16 + 41℃ 比较 $P < 0.05$; 4) $P < 0.01$

2.3 高温、利多卡因、VP-16 联合法对各种细胞的作用

结果如表3所示:各细胞株的实验组与相应对照组(41℃+0.5mmol/L 利多卡因)比较有显著性差异($P<0.05$),而GM-CFU,只有当41℃60min+利多卡因0.5mmol/L+VP-16为8.5 μ mol/L时与相应对照组比较($P<0.05$)。提高利多卡因浓度为0.75mmol/L+高温41℃+VP-16,3个细胞株(HL-60、U937、

K562)与相同条件下的GM-CFU比较均有显著性差异($P<0.05$)。当41℃60min+利多卡因为0.75 μ mol/L+VP-16为8.5 μ mol/L联合处理以后,HL-60、U937、K562细胞分别只存活0.01%、9.94%、33.94%,而GM-CFU的存活率仍有49.32%。表明这种联合方案对正常造血细胞杀伤少而对各白血病细胞杀伤大,是较好的一种组合。

表3 41℃+利多卡因(LID)+VP-16联合法对各种细胞集落数(存活率)的影响 $\bar{x}\pm s$

处理因素		GM-CFU (n=20)	HL-60 (n=10)	U937 (n=8)	K562 (n=8)
温度+LID (℃)(mmol/L)	VP-16 (μ mol/L)				
41+0.5	0	97.95±25.45 (0.8909)	323.9±31.33 (0.4073)	295.7±9.22 (0.6152)	354.63±8.89 (0.8256)
	0.85	78.3±21.11 (0.7098)	198.2±47.35 ¹⁾ (0.2492)	155.1±5.82 ¹⁾ (0.3227)	275.5±19.65 ¹⁾ (0.6414)
	4.25	71.05±20.63 (0.6364)	163.2±27.61 ¹⁾ (0.2052)	109.5±4.98 ¹⁾ (0.2278)	252.0±12.42 ¹⁾ (0.5867)
	8.5	64.15±18.16 ¹⁾ (0.5816)	79.0±8.58 ²⁾ (0.099)	79.75±5.20 ¹⁾ (0.1659)	227.±10.64 ¹⁾ (0.5285)
41+0.75	0	88.55±20.99 (0.8028)	277.1±38.71 (0.3481)	249.6±23.33 (0.5193)	321.5±10.05 (0.7485)
	0.85	66.65±16.43 (0.6042)	66.0±16.36 ³⁾ (0.0829)	110.6±23.29 ³⁾ 0.2301	207.5±14.88 ³⁾ (0.4831)
	4.25	65.75±18.28 (0.5966)	54.8±53.72 ⁴⁾ (0.0689)	88.01±24.93 ⁴⁾ (0.1833)	173.6±15.91 ³⁾ (0.4042)
	8.5	54.4±14.15 (0.4932)	0.1±0.32 ⁴⁾ (0.0001)	47.8±13.27 ⁴⁾ (0.0994)	146.±14.19 ³⁾ (0.3399)

1)高温+0.5mmol/L LID+VP-16与41、℃+0.5mmol/L LID比较 $P<0.05$; 2) $P<0.01$

3)各白血病细胞存活率与相同条件下的GM-CFU比较 $P<0.05$; 4) $P<0.01$

3 讨论

自身骨髓移植(ABMT)已成为治疗急、慢性白血病和淋巴瘤等恶性肿瘤的一种有效方法之一,但由于病人骨髓中残留恶性肿瘤细胞,导致复发率较高.因此,目前体外净化骨髓已引起极大的关注并已成为ABMT的关键问题之一。

白血病细胞为异质性细胞群,从白血病干细胞到无增殖能力的终末细胞.单一种净化方法很

难达到彻底地杀伤白血病各阶段分化细胞的作用.高温虽然可以有选择性地杀伤白血病细胞的作用,但杀伤效果有限^[2].高剂量的药物杀伤肿瘤细胞效应大,但对正常骨髓的抑制也大.如用125 μ mol/L VP-16能杀伤5个对数级以上的肿瘤细胞,这时GM-CFU只存活1%^[3].许多作者研究表明几种净化方法联用,可起到协同作用,而且可以减少药物剂量来避免对正常骨髓的抑制作用. Tamayo^[4]报道单用Asta-Z(50 μ g/

ml)、VP-16(85 μ mol/L)处理的 HL-60 细胞株分别可杀伤 3.3 个 log 和 2.3 个 log。两者联用(Asta-Z 20 μ g/ml + VP-16 34 μ mol/L)则对 HL-60 细胞株能杀伤大于 4 个 log,而对正常 GM-CFU 抑制没有相应增加,本实验显示了高温(41 $^{\circ}$ C)联用利多卡因高温、41 $^{\circ}$ C + VP-16 比单纯高温能更有效地杀伤白血病细胞,对 GM-CFU 也有影响,但明显比对白血病的一些细胞株少。如单纯高温(41 $^{\circ}$ C)、高温(41 $^{\circ}$ C) + 利多卡因 0.75mmol/L、高温(41 $^{\circ}$ C) + VP-16 8.5 μ mol/L 处理后,对 HL-60 细胞分别存活为 76.04%、34.85%、8.43%,对于 GM-CFU 分别存活为 91.70%、80.28%、68.94%、高温 + 利多卡因 + VP-16 三者联用则比单纯高温、高温 + 利多卡因、高温 + VP-16 有效地杀伤白血病细胞,而 GM-CFU 仍近有 50% 的存活,如 0.75mmol/L 利多卡因 + 41 $^{\circ}$ C 60min + 8.5 μ mol/L VP-16 联合处理后,HL-60、U937、K562 细胞株分别只存活 0.01%、9.40%、33.66%,另外,从这个联合方案也表明对不同类型的白血病细胞效果不一,对急性早幼粒白血病效果较好,其次为急性单核细胞白血病,对红白血病(急性非淋巴细胞白血病中 M₂

型)效果欠佳。说明对于不同类型的白血病患者,在 ABMT 时其体外净化骨髓要采用不同的净化方案。

参 考 文 献

- 1 Burgess AW, Wilson EMA, Met calf D. Stimulation by human placental conditioned medium of hematiopoietic colony formation by human marrow cell. *Boold*, 1977, 49 : 573
- 2 Moriyama Y, Narita M, Sato K, et al. Application of hyperthermia to the treatment of human acute leukemia, purging human leukemic progenitor cell by heat. *Blood*, 1986, 67 : 802
- 3 Ciobanu N, Paietta E, Andreff M, et al. Etoposide as an in vitro purging agent for the treatment of acute leukemias and lymphomas in conjunction with autologous bone marrow transplantation. *Exp Hematol*, 1986, 14 : 626
- 4 Tamayo E, Herve P. Preclinical studies of the combination of mafosfamide (Asta-Z) and etoposide (VP-16) for purging leukemic autologous marrow. *Exp Hematol*, 1988, 16 : 97

(1993-07-09 收稿 1994-03-14 修回)

STUDIES ON THE COMBINATION OF HYPERTHERMIA LIDOCAINE AND ETOPOSIDE FOR PURGING LEUKEMIC CELLS IN VITRO

Tong Xiuzhen Hong Wende Luo Xiaokai Tang Lujian Pang Guoyan

(Department of Internal Medicine, First Affiliated Hospital

Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

Using the semi-solid t-CFU and GM-CFU culture method, we investigated the effect of hyperthermia, lidocaine, etoposide on leukemic cell lines, and normal human bone marrow GM-CFU colony growth in vitro. The results showed that the combination of hyperthermia, lidocaine and etoposide could produce more additive tumor cell killing than hyperthermia plus lidocaine or, hyperthermia plus etoposide, while, under the same experimental conditions, normal hematopoietic precursors were spared, following hyperthermia 41 $^{\circ}$ C for 60min plus 0.75mmol/L lidocaine plus 8.5 μ mol/L etoposide treatment, the survival rate was 0.01% for

HL-60, 9.94% for U937, 33.97% for K562. These results also showed that the treatment had various effect on the different kinds of leukemia, so the different purging treatment should be used in ABMT.

Key words ANLL; purging in vitro; lidocaine; etoposide; heat treatment

• 简 讯 •

《鼻咽癌 92 分期》得到全国同行公认

本校肿瘤医院闵华庆教授等在“八五”国家医学科技攻关《鼻咽癌综合治疗最优方案的研究》中,收集了从 1985~1987 年该院经 CT 检查进行系统规范首程放疗,并随访 5 年的 412 例鼻咽癌病例资料,结合目前认为较科学的 Cox 模型和临床经验筛选出影响预后的因素,并利用电子计算机反复模拟对各种 T、N 和分期组合的 5 年生存曲线进行比较,以 Log-rank test 作显著性检验,从而对原发病灶“T”和颈淋巴结转移灶“N”提出了有别于以往的概念。当将这一新分期与美国的 AJC 分期、欧洲的 UICC 分期、及香港、东南亚使用的何氏分期及我国 1979 年的长沙分期作全面对比分析后,显示 AJC、UICC 与长沙分期中 I、II 期病者的 5 年生存率曲线出现交叉或重叠现象;与何氏分期中 III 及 IV 期生存曲线接近。而闵华庆教授等提出新的分期方案,各期生存曲线能均匀地拉开,各期病例数的分布更为合理,其 5 年生存率 I 至 IVa 期分别为 89.7%,75.9%,51.3%和 22.2%。而 IVb 期为 0%。该分期方法是建立在原长沙分期的框架上,为各地医师所熟悉,具有简单易记的特点。

新的分期方案,于 1992 年 5 月在广州举行的“第六届全国鼻咽癌学术会议”上提出后,经同年 11 月在福州由谷毓之、刘泰福教授主持的“中华放射肿瘤学会鼻咽癌专题研讨会”上再次进行了专题讨论。认为这新分期方案,应用了新的技术、方法先进合理,因此得到公认并命名为《鼻咽癌 92 分期》,决定推荐在国内应用。1993 年 5 月全国肿瘤防治研究办公室在“八五”恶性肿瘤防治研究项目中期总结与评估报告中,亦再次确认,《鼻咽癌综合治疗最优方案的研究》已提前 1 年完成了我国鼻咽癌临床分期。相信这一新的鼻咽癌临床分期,今后经过各地的验证,将得以更进一步地完善。

(冯世容)