

胸腺嘧啶脱氧核苷对离体胃癌细胞化疗的生物调节^①汪建平^{1②} 王吉甫¹ 宇佐美真² 斋藤洋一²

(1 中山医科大学附属第一医院外科;广州,510080 2 日本神户大学附属医院第一外科;神户,650)

提 要 在人胃癌细胞培养液中,添加不同浓度的胸腺嘧啶脱氧核苷(TdR),通过测定培养液中的 TdR 浓度的变化,肿瘤细胞计数、线粒体活性分析,观察 TdR 在 5-氟尿嘧啶(5-FU)化疗中对胃癌细胞增殖的影响。实验结果表明,TdR 与 5-FU 合用能显著增强 5-FU 的杀伤癌细胞的作用;从而证实 TdR 具有辅助抗肿瘤的生物学调节作用。

主题词 胸腺嘧啶核苷一磷酸/治疗作用;胃肿瘤/药物治疗法;氟尿嘧啶/治疗应用

中图分类号 R730.53

胃癌术后化疗是提高 5 年生存率的主要方法。但大剂量化疗常给病人带来很大的痛苦,小剂量化疗又不能起到满意的效果。为了解决这一问题,人们通过实验发现,在化疗时投与其它的辅助性药物,有时可增强化疗的效果,同时又能减轻化疗的副作用,因而提出了癌化疗生物调节作用(biochemical modulation)的理论^[1]。本实验在人胃癌细胞的培养液中加入胸腺嘧啶脱氧核苷(thymidine, TdR),以观察 TdR 对胃癌细胞增殖的影响,并在不同实验组中加入 5-氟尿嘧啶(5-FU),观察 TdR 对 5-FU 杀伤癌细胞的生物学调节作用。试图了解 TdR 增强 5-FU 的实际效用,探讨其作用机理及临床应用的可能性。

1 材料与方 法

1.1 细 胞

人胃癌细胞株(加藤Ⅱ号)。培养初浓度为 2×10^4 /ml,在 37℃,含 5%CO₂ 的空气条件下培养。

1.2 主要试剂

5-FU 为日本协和发酵工业公司生产。TdR 为 Sigma Chemical Company 产品, TdR 液自行配制,浓度 7.4mmol/L。

1.3 培养液

Willams-E 培养液,含青霉素 10μg/ml,卡那霉素 100μg/ml,小牛血清 10%,过滤灭菌,分装保存。

1.4 实验分组

分为阴性对照组, TdR 添加组, 5-FU 添加组,

TdR+5-FU 添加组共 4 组进行比较。TdR 的添加浓度为原液 740μmol/L, 74μmol/L, 7.4μmol/L, 5-FU 的添加浓度为 0.01μg/ml, 0.1μg/ml, 1.0μg/ml。

1.5 测 定

1.5.1 细胞计数 每一个培养皿取 5 份标本进行细胞计数,吹匀细胞后,取 0.1ml 于 96 穴培养板中,用 0.15%台盼蓝 50μl 滴入穴孔中反复抽吸染色,然后在细胞计数板上计数。

1.5.2 培养前后 TdR 浓度的测定 每个培养皿在培养前后取上清液 -80℃保存,成批检测。

1.5.3 线粒体活性分析 细胞培养 72h 后,每一培养皿取 0.5ml 细胞悬液,分注到 96 穴培养板中,每穴 0.1ml(即一个培养皿 5 份检测标本),3 000r/min, 5min,离心。弃上清,每穴加 0.4%MTT 液[3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasolium bromide] 10μl; 0.1mol/L 琥珀酸钠 10μl,在含 5%CO₂ 空气的培养箱中,37℃培养 3h。3h 后每穴加硫酸二甲酯 150μl,振荡反应 10min,用比色分析仪测定(MTP-2, Microplatychotometer Corana Electric, 日本产),测定波长 550nm,对照波长 630nm^[2]。

1.6 统计学处理

Student *t* test 分析。

2 结 果

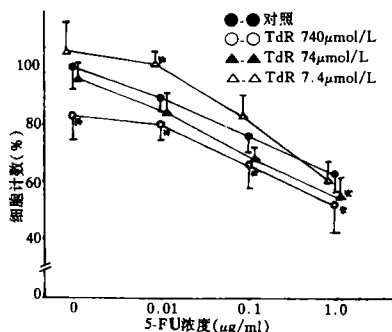
2.1 细胞计数

分对照组, TdR 添加组, 5-FU 添加组, TdR+5-

① 日本兵库县国际技术交流基金资助课题;

② 第一作者,1954 年出生,男,博士,副教授

FU 添加组共 4 组进行比较。不同浓度的 TdR 添加组与对照组比较,细胞增殖数量无明显差异。设对照组为 100%,TdR 各浓度组分别为 85%,96%,104%。单用 5-FU 组(浓度为 $1\mu\text{g/ml}$)68%,TdR740 $\mu\text{mol/L}$,5-FU 添加组为 55%,比单 5-FU 组有更强的抑制胃癌细胞增殖的作用(附图)。不同浓度的 TdR (740 $\mu\text{mol/L}$, 74 $\mu\text{mol/L}$, 7.4 $\mu\text{mol/L}$) 添加 5-FU ($1\mu\text{g/ml}$)组分别是 55%,58%,64%。高浓度两组与单 5-FU 对照组之间有统计学显著差异。



附图 TdR 和 5-FU 添加后胃癌细胞计数的变化

纵坐标表示细胞的百分比,以对照组的细胞数为 100%,横坐标为 5FU 浓度, $\bar{x} \pm s$, * 表示 $P < 0.05$, $n = 6$

2.2 培养前后 TdR 浓度的变化

TdR 的消耗量与有无添加 5-FU 相关显著。无添加 5-FU 组 3d 培养后的 TdR 消耗量为 54.4%,而添加 5-FU 组消耗量为 72.2%,两组比较有统计学显著差异,而且在高浓度 TdR 添加和低浓度添加,消耗比例亦有统计学显著差异,见附表。

附表 胃癌细胞培养 72h 后培养液中 TdR 消耗量

TdR ¹⁾ ($\mu\text{mol/L}$)	5-FU(-)	5-FU(+)
740	54.4 ± 11.9 ²⁾	72.2 ± 6.9
74	92.3 ± 3.1	≈100

1)TdR 两种浓度及有无添加 5-FU 时的 TdR 消耗量;

2)740 $\mu\text{mol/L}$ 组 5-FU 阴性和阳性组之间有统计学显著差异, $P < 0.05$

3.3 线粒体活性

线粒体活性表明细胞的增殖能力。实验表明: TdR 添加后能明显增强 5-FU 杀伤肿瘤细胞的作用。添加的浓度越高,肿瘤细胞增殖的抑制作用越明显,线粒体活性越低。这与细胞数的结果基本一致。

TdR+5-FU 组的线粒体活性较单用 5-FU 组明显降低,浓度 74 $\mu\text{mol/L}$ TdR 与 5-FU 合用比单用 5-FU 的线粒体活性降低 8%,TdR 添加浓度为 740 $\mu\text{mol/L}$ 时比单独用 5-FU 的线粒体活性降低 19%。两者之间有统计学显著差异, $P < 0.05$ 。

3 讨论

5-FU 是消化道恶性肿瘤的主要化疗药物之一。核苷酸对 5-FU 的抗肿瘤的调节被认为主要是通过抑制双氢嘧啶脱氢酶(dihydropyrimidine dehydrogenase)从而减少了对 5-FU 的分解并可使 5-FU 加速进入癌细胞的 RNA^[3]。双氢嘧啶脱氢酶被认为是由肝脏产生,它可以加速分解 5-FU。5-FU 本身对宿主无毒性作用,其代谢产物对宿主细胞产生毒性反应^[4]。如果抑制了双氢嘧啶脱氢酶的活性,即可减少 5-FU 的分解,从而延长了 5-FU 在血中的半衰期,增强了杀伤肿瘤细胞的作用^[5]。动物实验中,在 5-FU 投与前 1h 应用 uracil,可以使 5-FU 在血中的半衰期延长 5 倍,生物学实验表明,uracil 对双氢嘧啶脱氢酶有不可逆的阻抑作用^[6]。

Thymidine 的作用是使 5-FU 进入癌细胞 RNA 增加。有人报道,嘧啶类物质可以减轻 5-FU 的毒性作用,动物实验表明,若同时投入嘧啶类药物,5-FU 的用量可达到致死量的两倍^[7]。

本实验在人胃癌细胞培养液中添加 TdR,以观察 TdR 对肿瘤细胞增殖的影响以及与 5-FU 合用时对 5-FU 的抗肿瘤的调节作用。实验结果表明,当 TdR 的浓度在 74 $\mu\text{mol/L}$ 时对肿瘤细胞的增殖有一定的抑制作用,但统计学无显著性意义。而与 5-FU 合用时,对癌细胞的增殖有明显的抑制作用。其结果与单用 5-FU 组相比两者之差有显著性意义, $P < 0.05$ 。为便于观察对比,本实验所用的 5-FU 浓度是较低浓度的。在预实验中曾采用高浓度的 5-FU,对肿瘤的杀伤作用过于强大,则观察不到或掩盖了 TdR 的生物调节作用。

核苷酸的消耗量与有否应用 5-FU 表现出明显的不同,消耗量减少可以理解肿瘤细胞数目减少^[8]。主要表现在应用 5-FU 以后,TdR 的利用增加。提示在 5-FU 的抗肿瘤的调节作用上,TdR 起着较大的作用。

本实验的结果表明,TdR 与 5-FU 同时应用,从细胞增殖动力学角度增强了 5-FU 的杀伤肿瘤细胞作用,提示核苷酸类药物具有辅助抗肿瘤的调节

节作用。在目前尚未开发出更有效的抗癌药物之时,在投与化疗药物的同时,应用核苷酸类药物应是一种较好的增进化疗效果、改善生活质量的新方法。

参 考 文 献

- 1 Inabe M. Potentiation of antitumour activity of 5-fluorouracil by biochemical modulators (in Japanese). *Jpn J Cancer Chemother*, 1988, 15 : 381
- 2 Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983, 65 : 55
- 3 Tuchman M, Rannaraine MLRR, O'Dea R. Effects of uridine and thymidine on the degradation of 5-fluorouracil, uracil, and thymidine by rat liver dihydropyrimidine dehydrogenase. *Cancer Res*, 1985, 45 : 5553
- 4 Grem JL, Fischer PH. Alteration of fluoroacil metabolism in human colon cancer cells by dipyridamole with a selective increase in fluoro-deoxyuridine monophosphate levels. *Cancer Res*, 1986, 46 : 6191
- 5 Nord LD, Stolfi RL, Martin DS. Biochemical modulation of 5-fluorouracil with lencovirin or delayed uridine rescue. *Biochem Pharmacol*, 1992, 43 : 2543
- 6 Parker WB, Ohyanagi H, Furuchi H, et al. Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacol Ther*, 1990, 48 : 381
- 7 Usami M, Ohyanagi H, Furuchi K, et al. Augmentation of hepatic regeneration after partial hepatectomy in rats by nucleosides and a nucleotide mixture (in Japanese) *Jpn J Surg Metal Nutr*, 1992, 26 : 187
- 8 Wang JP, Usami M, Yasuda I, et al. Effect of nucleosides and a nucleotide mixture on proliferation of human gastric cancer cells (KATO III). *Jap Kube Med Sci*, 1994, 40 : 65

(1995-05-04 收稿 1995-07-28 修回)

BIOCHEMICAL MODULATION OF THYMIDINE IN CHEMOTHERAPY OF HUMAN GASTRIC CANCER CELLS IN VIVO

Wang Jianping¹ Wang Jifu¹ Usami Makoto² Saitoh Yoichi²

(1 Department of Gastroenterological Surgery, First Affiliated Hospital,
Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080

2 First Division of Surgery, Affiliated Hospital, Kube University of Japan, Kube 650)

The effect of thymidine plus 5-FU on the adjuvant treatment of carcinoma ventriculi were evaluated by adding the drugs to the culture of human gastric cancer cells (KATO III) and analysing the changes in the concentration of thymidine, the count of the cancer cells and the activity of the cell mitochondria. The result suggests that the combination of 5-FU with thymidine enhance the antitumour effect of 5-FU indicating that thymidine play some role in the biochemical modulation of the adjuvant treatment.

Subject headings thymidine monophosphate/therapeutic use; stomach neoplasms/drug therapy; fluorouracil/therapeutic use