

Research the Cytotoxicity of Docetaxel Combined with Carboplatin in Osteosarcoma Cell Line MG-63

Ze'en Tan, Lele Dong*

Graduate College of Baotou Medical College, Baotou Inner Mongolia

Email: 406349601@qq.com, *dong_le_le@126.com

Received: Mar. 9th, 2015; accepted: Mar. 22nd, 2015; published: Mar. 30th, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objective: To research the cytotoxicity of docetaxel combined with carboplatin on osteosarcoma cell line MG-63. **Methods:** Using MTT assay, we obtained the mean IC50 of docetaxel and caboplatin for the osteosarcoma cell line MG-63. The MG-63 was incubated with IC50 docetaxel, IC50 carboplatin and 1/2 IC50 docetaxel + 1/2 IC50 carboplatin for 24 h, 48 h, 72 h. The cytotoxicity of each group was measured by MTT assays. **Result:** By the formula $IC_{50} = \lg - 1[X_m - i(\Sigma P - 0.5)]$ to obtain the IC50 of docetaxel and carboplatin for osteosarcoma cell MG-63 were 0.25 mg/ml and 4.00 mg/ml respectively. The mean cytotoxicity index (CI) of 0.25 mg/ml docetaxel, 2 mg/ml carboplatin and 0.125 mg/ml docetaxel + 2 mg/ml carboplatin for 24 h were 38.6%, 48.7% and 60.0% respectively ($P < 0.05$); and those for 48 h were 44.3%, 49.2% and 73.0% respectively ($P < 0.05$); and those for 72 h were 59.3%, 58.6% and 79.9% respectively (the 0.25 mg/ml docetaxel group and 2 mg/ml carboplatin group $P > 0.05$; the combined group compared with the other two groups $P < 0.05$). The cytotoxicity index of combined group was significant increased. **Conclusion:** The combination of half dose docetaxel with carboplatin appears more active as docetaxel or carboplatin alone in full doses in treatment of osteosarcoma cell line MG-63 *in vitro*.

Keywords

Osteosarcoma, Docetaxel, Carboplatin, Sytotoxicity

*通讯作者。

多西紫杉醇协同卡铂对骨肉瘤细胞 MG-63 细胞毒性的实验研究

谭泽恩, 董乐乐*

包头医学院研究生院, 内蒙古 包头

Email: 406349601@qq.com, dong_le_le@126.com

收稿日期: 2015年3月9日; 录用日期: 2015年3月22日; 发布日期: 2015年3月30日

摘要

目的: 研究多西紫杉醇和卡铂联用对骨肉瘤细胞MG-63的增殖抑制作用, 寻找新的骨肉瘤临床治疗方案。
方法: 采用MTT法细胞毒性试验, 测定多西紫杉醇及卡铂对MG-63细胞株的抑制率并计算其IC50值, 根据所测得的IC50值, 分别用IC50多西紫杉醇、IC50卡铂、1/2 IC50多西紫杉醇 + 1/2 IC50卡铂作用于MG-63细胞株24 h、48 h、72 h, 比较三组药物处理方法对MG-63细胞株的抑制率。结果: 根据相应实验结果制作生长曲线通过公式 $IC_{50} = lg - 1[X_m - i(\Sigma P - 0.5)]$ 求得两药的IC50值分别为0.25 mg/ml和4.00 mg/ml。分别用0.25 mg/ml多西紫杉醇、4 mg/ml卡铂、0.125 mg/ml多西紫杉醇+2 mg/ml卡铂与骨肉瘤细胞株MG-63作用24 h时, 其细胞毒性指数(CI)分别为: 38.6%、48.7%和60.0%, 3组比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 作用48 h时, 其细胞毒性指数(CI)分别为: 44.3%、49.2%、73.0%, 3组比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 作用72 h时, 其细胞毒性指数(CI)分别为59.3%、58.6%、79.9%, 多西紫杉醇组于卡铂组比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 联用组与另外两组比较差异均由统计学意义($P < 0.05$)。结论: 半量多西紫杉醇、卡铂联合应用比单独应用多西紫杉醇或卡铂对骨肉瘤细胞株的细胞毒性作用更强。

关键词

骨肉瘤细胞, 多西紫杉醇, 卡铂, 细胞毒性作用

1. 引言

骨肉瘤属于常见的恶性骨肿瘤之一, 好发于青少年的长骨干骺端, 尤以股骨下段和胫骨上段多见。在上世纪 70 年代以前, 骨肉瘤的治疗仍是以外科治疗为主, 其术后 5 年存活率不足 20% [1]。Rossen 教授于 1976 年提出新辅助化疗概念是骨肉瘤治疗史上的重要突破, 而其在 1982 年将新辅助化疗的概念进一步完善, 提出“术前化疗-手术-术后化疗”的新思路, 使得骨肉瘤 5 年生存率由原来的不足 20% 上升至 60%~70% [2]。多西紫杉醇是一种新型广谱抗肿瘤药物, 它属于紫杉类化合物, 其在细胞内浓度要比紫杉醇高 3 倍且在细胞内滞留时间较紫杉醇更长[3]。卡铂是骨肉瘤化疗的经典药物之一, 其可作为顺铂的替代用药。二者单独应用于恶性肿瘤的疗效以得到肯定, 但是由于卡铂作为二代铂类抗肿瘤药, 其骨髓抑制的毒副作用抑制是限制其应用于临床的一大障碍, 而对于两者联用是否能通过减少剂量而减轻二者的毒副作用, 增加其对骨肉瘤细胞毒性作用的研究较少, 本实验旨在探索多西紫杉醇于卡铂联用, 其对骨肉瘤细胞的毒性作用, 以期为以后的临床应用提供理论基础。

2. 材料与方法

2.1. 材料与设备

人成骨肉瘤细胞系 MG-63，购自协和医科大学细胞中心；多西紫杉醇，购自江苏恒瑞医药；卡铂，购自齐鲁制药。DMEM 培养基及胎牛血清均购自 GIBCO 公司。DMSO 及胰蛋白酶均由包头医学院第一附属医院中心实验室提供；其他材料：MTT、DMSO、96 孔板及其他耗材均由包头医学院第一附属医院中心实验室提供。

2.2. 方法

1) 细胞培养：将细胞培养与含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中(含青霉素 80 U/ml、链霉素 100 μg/ml)，在温度为 37℃、CO₂ 体积分数为 5% 的细胞培养箱内闭式传代培养。取传代后第 2 天的处于对数生长期的骨肉瘤细胞备用。2) 细胞处理一：将密度为 1×10^5 U/ml 的细胞悬液接种在 96 孔板上，每孔加 100 μl 细胞悬液，并在每孔加入浓度梯度为 0, 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml, 1 mg/ml 的多西紫杉醇及卡铂，每孔设 5 个复孔。再将 96 孔板置入细胞培养箱继续培养 48 H。3) MTT 法：培养 48 H 后，向每孔加入 MTT 液 20 μl，继续培养 4 H，弃上清，再加入 DMSO 150 μl，震荡摇匀，使结晶完全溶解，用全自动酶标仪(波长 540 nm)测定其每孔的吸光度值(A 值)，并通过测得的 A 值计算其细胞毒性指数(CI)。CI = (对照组 A 值 - 实验组 A 值)/对照组 A 值 × 100%。根据上述结果制作不同浓度的多西紫杉醇及卡铂作用于骨肉瘤细胞 MG-63 48H 的细胞毒性指数对药物浓度的生长曲线图。并根据曲线图求出多西紫杉醇及卡铂对骨肉瘤细胞 MG-63 的半数抑制浓度(IC₅₀)。4) 细胞处理二：根据所得两药对 MG-63 的 IC₅₀，分设单多西紫杉醇组，即 IC₅₀ 浓度的多西紫杉醇，单卡铂组，即 IC₅₀ 浓度的卡铂，联用组，即 1/2 IC₅₀ 浓度的多西紫杉醇+1/2 IC₅₀ 浓度的卡铂，分别加入铺满 MG-63 细胞悬液的 96 孔板里，每孔设 5 个复孔。分别培养 24 H、48 H 和 72 H 后，用 MTT 法测其 A 值，并计算其 CI 值，重复 3 次。

2.3. 统计学处理

应用 SPSS 13.0 软件，将所得数据以均数±标准差表示，组间比较采用 One Way Anova 的方法。

3. 结果

1) 不同浓度的多西紫杉醇与骨肉瘤细胞株 MG-63 作用 48H 后，其 A 值、CI 值和生长曲线，见表 1、图 1。

根据图 1 的生长曲线所示，并用公式 $IC_{50} = \lg - 1[X_m - i(\Sigma P - 0.5)]$ 可求得多西紫杉醇对骨肉瘤细胞 MG-63 的 IC₅₀ 为：0.25 mg/ml。

Table 1. The A value and CI of different concentration docetaxel for osteosarcoma cell line for 48 h

表 1. 不同浓度多西紫杉醇与骨肉瘤细胞株作用 48 h 后的 A 值及 CI

多西紫杉醇(mg/ml)	A 值	CI 值(%)
对照组	0.792 ± 0.025	-
0.01	0.519 ± 0.013	34.4%
0.1	0.456 ± 0.023	42.4%
1	0.326 ± 0.091	58.8%

注：各组间比较 P < 0.05，差异有统计学意义。

2) 不同浓度的卡铂与骨肉瘤细胞株 MG-63 作用 48 h 后, 其 A 值、CI 值和生长曲线, 见表 2、图 2。

Table 2. The A value and CI of different concentration carboplatin for osteosarcoma cell line for 48 h

表 2. 不同浓度卡铂与骨肉瘤细胞株作用 48 h 后的 A 值及 CI

卡铂(mg/ml)	A 值	CI 值(%)
对照组	0.792 ± 0.025	-
0.01	0.591 ± 0.016	25.3%
0.1	0.510 ± 0.023	35.6%
1	0.451 ± 0.091	43.1%

注: 各组间比较 P < 0.05, 差异有统计学意义。

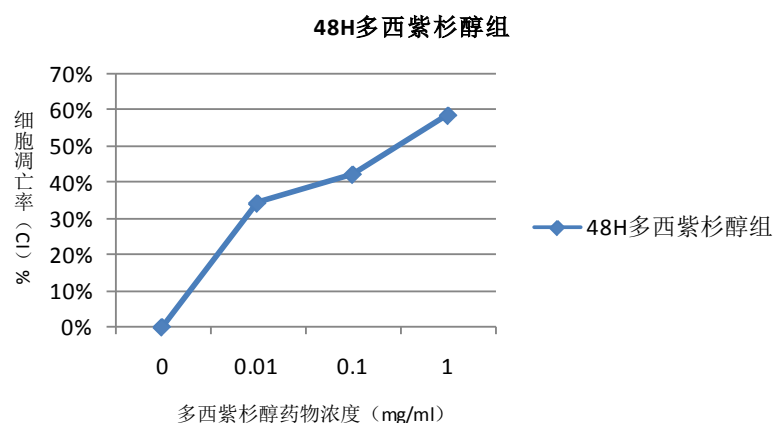


Figure 1. The growth curve of different concentration docetaxel for osteosarcoma cell line MG-63 for 48 h (IC₅₀ is 0.25 mg/ml)

图 1. 骨肉瘤细胞 MG-63 与不同浓度多西紫杉醇作用 48 h 后的生长曲线 (IC₅₀ 为 0.25 mg/ml)

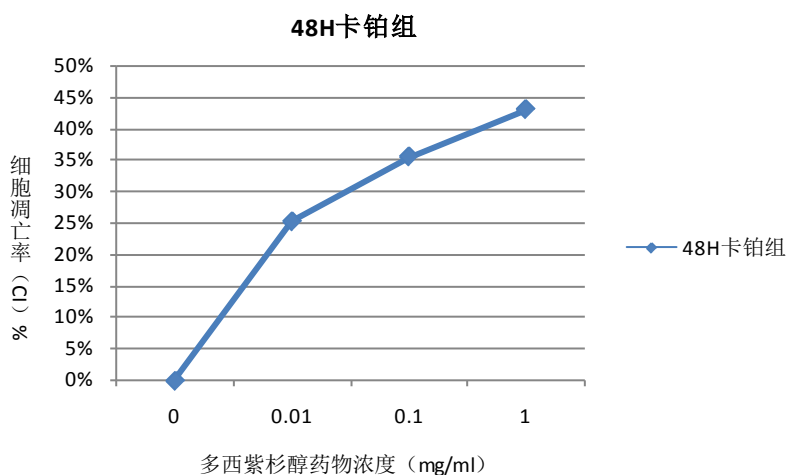


Figure 2. The growth curve of different concentration carboplatin for osteosarcoma cell line MG-63 for 48 h (IC₅₀ is 4.0 mg/ml)

图 2. 骨肉瘤细胞 MG-63 与不同浓度多西紫杉醇作用 48 h 后的生长曲线 (IC₅₀ 为 4.0 mg/ml)

根据图 2 的生长曲线所示,并用公式 $IC_{50} = \lg - 1[X_m - i(\Sigma P - 0.5)]$ 可求得卡铂对骨肉瘤细胞 MG-63 的 IC_{50} 为: 4.14 mg/ml。

3) IC_{50} 多西紫杉醇、 IC_{50} 卡铂、 $1/2 IC_{50}$ 多西紫杉醇 + $1/2 IC_{50}$ 卡铂分别于骨肉瘤细胞株 MG-63 作用 24 H、48 H、72 H 后的 A 值及 CI 值见表 3~5。

将表 3~5 中各项对应数据进行统计分析得出: 0.25 mg/ml 多西紫杉醇组各数据之间比较, $P < 0.05$ 差异有统计学意义; 4 mg/ml 卡铂组各数据之间比较, 24 H 组合 48 H 组 $P > 0.05$ 差异无统计学意义, 其余各组 $P < 0.05$ 差异有统计学意义; 联用组各组数据之间比较, $P < 0.05$, 差异有统计学意义。

Table 3. The A value and CI of IC_{50} docetaxel IC_{50} carboplatin and $1/2 IC_{50}$ docetaxel + $1/2 IC_{50}$ carboplatin for osteosarcoma cell line for 24 h
表 3. IC_{50} 多西紫杉醇、 IC_{50} 卡铂、 $1/2 IC_{50}$ 多西紫杉醇 + $1/2 IC_{50}$ 卡铂与骨肉瘤细胞株 MG-63 作用 24 H 后的 A 值及 CI 值

多西紫杉醇(mg/ml)	卡铂(mg/ml)	A 值	CI
0	0	0.815 ± 0.010	
0.25	0	0.500 ± 0.024	38.6%
0	4.0	0.418 ± 0.052	48.7%
0.125	2.0	0.326 ± 0.012	60.0%

注: 各组比较 $P < 0.05$, 差异有统计学意义。

Table 4. The A value and CI of IC_{50} docetaxel IC_{50} carboplatin and $1/2 IC_{50}$ docetaxel + $1/2 IC_{50}$ carboplatin for osteosarcoma cell line for 48 h
表 4. IC_{50} 多西紫杉醇、 IC_{50} 卡铂、 $1/2 IC_{50}$ 多西紫杉醇 + $1/2 IC_{50}$ 卡铂与骨肉瘤细胞株 MG-63 作用 48 h 后的 A 值及 CI 值

多西紫杉醇(mg/ml)	卡铂(mg/ml)	A 值	CI
0	0	0.792 ± 0.025	
0.25	0	0.441 ± 0.014	44.3%
0	4.0	0.402 ± 0.005	49.2%
0.125	2	0.210 ± 0.011	73%

注: 各组比较 $P < 0.05$, 差异有统计学意义。

Table 5. The A value and CI of IC_{50} docetaxel IC_{50} carboplatin and $1/2 IC_{50}$ docetaxel + $1/2 IC_{50}$ carboplatin for osteosarcoma cell line for 72 h
表 5. IC_{50} 多西紫杉醇、 IC_{50} 卡铂、 $1/2 IC_{50}$ 多西紫杉醇 + $1/2 IC_{50}$ 卡铂与骨肉瘤细胞株 MG-63 作用 72 h 后的 A 值及 CI 值

多西紫杉醇(mg/ml)	卡铂(mg/ml)	A 值	CI
0	0	0.802 ± 0.017	
0.25	0	0.326 ± 0.009	59.3%
0	4.0	0.332 ± 0.018	58.6%
0.125	2.0	0.161 ± 0.050	79.9%

注: 0.25 mg/ml 多西组与 4.0 mg/ml 卡铂组比较 $P > 0.05$ 差异无统计学意义, 其余各组比较 $P < 0.05$, 差异有统计学意义。

4. 讨论

近年来由于各种因素的影响,骨肉瘤的发病率呈逐年上升态势,而针对骨肉瘤又没有一个具有明确疗效且对人体伤害较小的治疗方案,所以目前针对骨肉瘤的治疗逐渐受到广大医务工作者的高度关注和重视。目前以铂族化合物为主导的恶性肿瘤化疗方案,被广泛的应用于骨肉瘤的新辅助化疗方案中。而铂类药物的毒副作用较为严重,使其在临床的应用受到限制。卡铂作为第二代铂类抗肿瘤药物,因其消化系统副反应及肾毒性较轻,目前是被临床广泛接受的铂类制剂,其疗效也在近年来得到了肯定。但同时也有大量的文献报道卡铂容易引起骨髓抑制,所以如何控制卡铂的用量及尽量减轻其毒副作用,同时保证其对骨肉瘤细胞的有效细胞毒性一直是临床和实验研究的热点。

多西紫杉醇是一种新型抗肿瘤药物,是以紫杉树中化学物质为基础而合成出来的一种药物,药物作用机制与紫杉醇类似,即抑制微管(microtubules)的解聚,从而使游离的微管数量显著减少,抑制纺锤体向两极分离,阻滞细胞 G2 和 M 期,从而抑制肿瘤细胞的有丝分裂和增殖[4]以达到抑制肿瘤细胞增殖的。其在细胞内浓度比紫杉醇高 3 倍,并且多西紫杉醇在细胞内的滞留时间更长。因其抗癌谱较广,且临床疗效较好,目前多西紫杉醇已用于多种恶性肿瘤的临床治疗。而目前将多西紫杉醇单独应用于骨肉瘤的研究已有报道,其抗肿瘤活性也已得到充分的肯定。

尽管目前两种药物单独应用于骨肉瘤治疗的研究较多,且二者的联用,现已用于多种恶性肿瘤的联合治疗中[5] [6]。但是,单独大剂量应用单一药物较容易引起骨肉瘤的多药耐药,关于二者联合应用于骨肉瘤的临床和基础研究目前较少。

本实验细胞处理一采用 MTT 法,对多西紫杉醇和卡铂对骨肉瘤细胞的细胞毒性进行研究,其结果表明,两药物单用组均较对照组细胞凋亡率高,这说明了两药物单用于骨肉瘤细胞 MG-63 时,其疗效是肯定的;而多西紫杉醇及卡铂在单独应用于骨肉瘤细胞时,随着浓度的增加,其抗肿瘤活性也逐渐增加,说明两药物单用于骨肉瘤细胞 MG-63 时其具有浓度依赖性。根据生长曲线,多西紫杉醇及卡铂的 IC50 分别是: 0.25 mg/ml 和 4.14 mg/ml。这个数据说明多西紫杉醇的抗肿瘤活性药远高于卡铂,约需 17 倍左右浓度的卡铂才与多西紫杉醇的抗肿瘤活性相当。

而细胞处理二,其根据处理一所得的多西紫杉醇及卡铂的 IC50 值,构建新的单用及联合应用组,并同样用 MTT 法检测各组的 A 值,进而对各组之间对骨肉瘤细胞的细胞毒性进行研究。其结果表明,当处理时间一致时联用组均较各单用组的细胞毒性更强($P < 0.05$),而随着处理时间增加,联用组对骨肉瘤细胞的细胞毒性也相应增加($P < 0.05$)。本结果说明,两药联用组对骨肉瘤细胞的细胞毒性均较两药单用组更强,且其细胞毒性随时间增加而更强,说明两药物联用存在时间依赖性。

综上所述,本实验通过对体外成人骨肉瘤细胞 MG-63 进行研究,说明了多西紫杉醇联合卡铂应用于骨肉瘤细胞 MG-63 时,其细胞毒性较两药单用更强。但由于本实验为体外细胞实验,无法很好的模拟体内环境,不能准确的反应药物-人体-肿瘤的复杂关系。只是从体外实验的角度证明了联用的可行性,为今后的临床应用或实验研究提供实验依据,但进一步的结果上需要更加深入的研究。

参考文献 (References)

- [1] Link, M.P., Coorin, A.M., Miser, A.W., et al. (1986) The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osseous sarcoma of the extremity. *New England Journal of Medicine*, **314**, 1600.
- [2] 陈伟, 董乐乐 (2009) 骨肉瘤治疗进展. *包头医学院学报*, **5**, 108-110.
- [3] 彭磊, 王臻等 (2001) 多西紫杉醇诱导骨肉瘤凋亡的实验研究. *中华肿瘤杂志*, **3**, 14-16.
- [4] Fabbri, F., Carloni, S., Brigladori, G., et al. (2006) Sequential events of apoptosis involving docetaxel, a microtubule-inhibiting agent: A cytometric study. *BMC Cell Biology*, **7**, 6.

- [5] 曾洵 (2008) 多西紫杉醇及联合卡铂对人视网膜母细胞瘤株 SO-RB50 的增殖抑制. 昆明医学院, 昆明.
- [6] 吕星, 郭翔, 洪明晃, 陈秋燕, 曾奇, 向燕群 (2010) 多西紫杉醇联合卡铂与氟尿嘧啶联合卡铂治疗局部晚期鼻咽癌近期疗效的比较. *癌症*, **2**, 148-152.