

化合物 UC2288 对 CNE-2R 细胞体外及裸鼠移植瘤放射敏感性影响

梁仁拔¹ 朱小东^{1,2}

¹广西医科大学附属武鸣医院肿瘤科, 南宁 530021; ²广西区域高发肿瘤早期防治重点实验室, 南宁 530021

通信作者: 朱小东, Email: zhuxdongxmu@126.com

【摘要】 目的 探讨化合物 UC2288 对 CNE-2R 细胞及裸鼠移植瘤放射敏感性影响。方法 化合物 UC2288 浓度参照以往实验结果 ($IC_{50} = 12.20 \mu\text{mol/L}$), 克隆形成实验检测 UC2288 联合 2、4、6、8 Gy X 线照射对 CNE-2R 细胞放射敏感性影响。CCK8 实验检测 UC2288 联合 X 线 2、4、6、8 Gy 照射对细胞增殖作用。构建 CNE-2R 细胞裸鼠移植瘤模型, 体内探讨 UC2288 联合 X 线 2 Gy/次连续 3 d 照射对移植瘤放射敏感性影响。结果 UC2288 实验浓度为 $8 \mu\text{mol/L}$ 。UC2288 联合 2、4、6、8 Gy X 线照射可降低细胞克隆形成能力, 放射增敏比为 1.60。UC2288 联合 X 线 2、4、6、8 Gy 照射明显抑制细胞增殖。UC2288 能抑制 CNE-2R 细胞裸鼠移植瘤生长, 且随观察时间延长作用增强, 16 d 时最明显 ($P < 0.01$), 放射增敏比为 4.33。结论 UC2288 对鼻咽癌放射抗拒细胞 CNE-2R 具有放射增敏作用。

【关键词】 化合物 UC2288; 放射敏感性; CNE-2R 细胞系; 裸鼠移植瘤

基金项目: 国家自然科学基金 (81760544); 广西重点研发计划项目 (桂科 AB18221007)

DOI: 10.3760/ema.j.cn113030-20210330-00129

Effect of compound UC2288 on radiosensitivity of CNE-2R cell line and nude mouse transplanted tumor

Liang Renba¹, Zhu Xiaodong^{1,2}

¹Department of Oncology, Wuming Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; ²Key Laboratory of Early Prevention and Treatment for Regional High-Incidence-Tumor, Guangxi Medical University, Ministry of Education, Nanning 530021, China

Corresponding author: Zhu Xiaodong, Email: zhuxdongxmu@126.com

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of compound UC2288 on the radiosensitivity of CNE-2R cell line and nude mouse transplanted tumor. **Methods** The UC2288 concentration was referenced to previous experimental results ($IC_{50} = 12.20 \mu\text{mol/L}$). The effect of UC2288 combined with 2, 4, 6, 8 Gy X-ray irradiation on the radiosensitivity of CNE-2R cell line was detected by clone formation experiment. The effect of UC2288 combined with 2, 4, 6, 8 Gy X-ray irradiation on the proliferation of CNE-2R cell line was determined by CCK8 assay. The nude mouse model of transplanted tumor was constructed with CNE-2R cell line. The radiosensitivity of transplanted tumor of UC2288 combined with 2 Gy/fraction X-ray irradiation for three consecutive days was evaluated. **Results** The experimental concentration of UC2288 was $8 \mu\text{mol/L}$. The clonality of CNE-2R cell line was reduced under UC2288 combined with X-ray 2, 4, 6, and 8 Gy irradiation, and the radiosensitization ratio was 1.60. The proliferation of CNE-2R cell line was significantly decreased under UC2288 combined with X-ray 2, 4, 6, and 8 Gy irradiation. UC2288 inhibited the growth of transplanted tumor in nude mice, and the inhibitory effect was strengthened with the extension of observation time, and the most obvious effect was observed at 16 d. ($P < 0.01$). The radiosensitization ratio was 4.33. The proliferation of CNE-2R cell line was decreased under UC2288 combined with X-ray irradiation. **Conclusion** UC2288 can increase the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma radioresistant cell line CNE-2R.

【Key words】 Compound UC2288; Radiosensitivity; CNE-2R cell line; Transplanted tumor of nude mouse

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81760544); Guangxi Key Research & Development Plan Project (GuiAB18221007)

DOI: 10.3760/ema.j.cn113030-20210330-00129

鼻咽癌是一种常见的头颈部肿瘤,常发生于咽隐窝,其主要分布于中国南方及东南亚地区^[1]。目前,放疗是鼻咽癌治疗的主要手段之一。调强放疗是当前放疗应用最广泛的技术,新诊断的非转移性鼻咽癌局部区域治疗失败的 5 年发生率为 7.4%^[2]。放射抵抗是导致放疗失败的主要原因之一,从而导致疾病复发或者出现转移,最终威胁患者长期生存。因此,提高患者放射敏感性,对改善患者预后和延长生存期有重要意义。

p21 是周期蛋白依赖性激酶抑制剂,参与细胞周期和细胞凋亡等过程^[3-4]。UC2288 为反-1-(4-氯-3-三氟甲基-苯)-3-[4-(5-三氟甲基-吡啶-2-烷氧基)-环己基]-脲,它是 p21 的抑制剂,通过转录和转录后途径抑制 p21 表达^[5]。UC2288 由索拉非尼(多种激酶抑制剂)衍生而来,其结构与索拉非尼的相似^[5]。然而,与索拉非尼不同的是,UC2288 对 RAF 激酶和血管内皮生长因子受体活性影响较小^[5]。研究报道 UC2288 可抑制人结肠癌 HCT116 细胞和肾癌细胞的生长^[5-6]。前期试验发现 UC2288 抑制鼻咽癌细胞增殖,诱导细胞凋亡,但其对鼻咽癌细胞放射敏感性的影响尚未明确^[7-8]。

本研究采用体内外实验探讨 UC2288 对鼻咽癌放射敏感性影响,为丰富鼻咽癌治疗提供实验依据。

材料与方法

1. 细胞与裸鼠:CNE-2R 细胞是广西医科大学附属肿瘤医院放疗科利用 CNE-2 细胞,通过反复多次照射,成功构建放射抗拒细胞株^[9-10]。4 周龄 BALB/C 裸鼠购买于广西医科大学动物实验中心,并在广西医科大学动物实验中心 SPF 级别动物房饲养。

2. 主要试剂与仪器:UC2288 购于英国 Abcam 公司;RPMI-1640 培养基和胎牛血清购于美国 Gibco 公司;青链霉素、二甲亚砷、4%多聚甲醛、吉姆萨染液、聚氧乙烯蓖麻油 EL、聚乙二醇购自中国索莱宝公司;0.25%胰蛋白酶消化液购于中国碧云天公司;CCK-8 试剂盒购自日本同仁公司;电子天平购于瑞士 Mettler Toledo 公司;电子游标卡尺购于日本 Mitutoyo 公司;全自动酶标仪购于美国 Thermo Fisher 公司;直线加速器购于瑞典医科达公司。

3. 实验方法

(1) 细胞培养:CNE-2R 细胞用含有 10%胎牛血清和 1%青链霉素的 1640 培养基,在 37℃、5%CO₂ 及饱和湿度恒温培养箱中培养。待细胞生长到融合

度为 90%左右时,胰酶消化传代。

(2) 药物配制:UC2288 用 DMSO 配成 5 mmol/L 的母液,置于-20℃冰箱保存。临用时用培养液配成所需的浓度。

(3) 克隆形成实验:取指数生长期的 CNE-2R 细胞,胰酶消化,按 200、200、400、600、1000 个细胞均匀种于含有 2 ml 完全培养基的 6 孔板中,每组 3 个复孔。24 h 后每孔加入 2 ml 含有不同浓度药物的培养基,即 DMSO 组(对照)、8 μmol/L UC2288,培养箱中孵育 1 h。弃去旧培养基,每孔加入 2 ml 新鲜的完全培养基,然后以 0、2、4、6、8 Gy 照射细胞,恒温培养箱中继续培养 12 d。弃去旧培养基,PBS 缓慢洗涤 2 次,4%多聚甲醛固定 30 min,PBS 缓慢洗涤 2 次;吉姆萨染色液染色 30 min,PBS 缓慢洗涤 2 次;自然晾干,拍照,计算克隆形成数目及各组不同照射剂量下细胞存活分数。根据单击多靶模型拟合细胞存活曲线,算出放射生物学参数 D₀ 和 2 Gy 照射时的存活分数。

(4) CCK8 实验:取指数生长期的 CNE-2R 细胞,胰酶消化,取 100 μl/孔(每孔 3500 个细胞)缓慢均匀种于 96 孔板中,每组 5 个复孔。24 h 后弃去旧培养基,每孔加入 100 μl 含有不同浓度药物的培养基,即 DMSO 组(对照)、8 μmol/L UC2288,置于恒温培养箱中孵育 1 h。弃去旧培养基,每孔加入 100 μl 新鲜的完全培养基,然后以 0、2、4、6、8 Gy 照射细胞,恒温培养箱中继续培养 48 h。弃去旧培养基,每孔加入 100 μl 完全培养基及 10 μl 的 CCK8 液,避免出现气泡,置于 37℃恒温培养箱中避光孵育 1 h。酶标仪检测 450 nm 波长下细胞的 A 值。利用 A 值计算各组不同照射剂量下细胞的存活率。

(5) 裸鼠移植瘤实验:备好 12 只裸鼠,耳标标记。取指数生长期的 CNE-2R 细胞,胰酶消化,离心,用 PBS 制成单细胞悬液。取 200 μl/管(6×10⁶ 个细胞)加入 1.5 ml 离心管中,每管接种于 1 只裸鼠。用棉球取 75%乙醇消毒液消毒右侧腹股沟区域皮肤,将含有细胞悬液的注射器从靠近右侧腹股沟处的右后肢皮肤进针,沿皮下水平缓慢推进,针尖到达腹股沟区域后回抽注射器,观察是否有回血。若没有回血则缓慢向前推注,旋转注射器并迅速拔出,用干净棉球轻轻压迫针孔处,以防出血和液体回漏。每 3 天观察移植瘤的生长情况及用电子游标卡尺测量瘤子的长径(L)和短径(W),体积=LW²/2。当体积约达到 100 mm³ 时,随机分成对照组、单纯照射组、UC2288 组和联合组,每组 3 只。对照组予溶

剂(Cremophor EL : PEG400 : saline = 2 : 2 : 4)灌胃处理,药物组予 UC2288 (15 mg/kg)灌胃 1 次/d。随后单纯照射组和联合组予 2 Gy/次照射连续 3D,照射前用铅块遮挡裸鼠的上半身。每 3 天用电子游标卡尺测量瘤子的大小及天平秤体重。照射开始后第 16 天运用颈椎脱臼法处理裸鼠并取出肿瘤拍照,并绘制移植瘤生长曲线。从生长曲线上以 100 mm³ 为起始体积计算体积倍增时间(Tv),并计算放射增敏比(Tv 值比)。

4. 统计方法:运用 SPSS 20.0 软件行成组 t 检验或单因素方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. UC2288 增加 CNE-2R 细胞的放射敏感性:在前期研究中,UC2288 作用 CNE-2R 细胞 24 h 后 IC₅₀ 为 12.20 μmol/L^[7];因此本研究中选取 8 μmol/L UC2288 为后续实验。克隆形成实验结果显示,在不同照射剂量下,UC2288 组克隆形成数目均比对照组的少(图 1);通过单击多靶模型拟合的存活曲线可看出 UC2288 组细胞的生存分数明显低于对照组(图 2A);两组放射生物学参数见表 1。为了进一步验证这一结果,采用了 CCK8 实验结果显示,在不同放射剂量照射后,UC228 组细胞群增殖明显受到抑制(图 2B)。

表 1 CNE-2R 细胞不同处理组单击多靶模型拟合曲线的放射生物学参数(̄x±s)

项目	D ₀ (Gy)	SF ₂	SER(D ₀ 比)
单纯照射	6.787±0.584	0.886±0.039	
8 μmol/L UC2288+照射	4.232±0.339	0.500±0.021	1.60
P 值	0.033	0.007	

注:D₀为平均致死剂量;SF₂为 2 Gy 照射时的存活分数;SER 为放射增敏比

2. UC2288 抑制移植瘤生长:CNE-2R 细胞接种后第 6 天出现可测量的小结节,每 3 天测量 1 次。当肿瘤体积达 100 mm³ 时给予处理。处理后第 16 天测量肿瘤体积及裸鼠体重,并处死裸鼠取出瘤体。结果显示 UC2288 联合照射组肿瘤体积明显小于单纯照射组或单纯 UC2288 组(图 3A),肿瘤生长速度明显慢于单纯照射组或单纯 UC2288 组(图 3B)。体积倍增时间分别为 3、3、8、13 d,放射增敏比为 4.33。

3. UC2288 对裸鼠的不良反应:裸鼠接受各种处理后定期检测体重变化,结果显示,与对照组相比,照射组裸鼠体重有下降趋势,但各组之间体重变化相近,详见图 4。

讨 论

鼻咽癌是发生于鼻咽部的恶性上皮性肿瘤。2020 年新发病约 133 354 例,仅占 2020 年确诊癌症总数的 0.7%;但其在全球地理分布极不平衡,70% 以上的新发病例分布在东亚和东南亚地区^[11]。鼻咽癌有 3 种病理亚型:角质化鳞状型、非角质化型、基底样鳞状型,非角化鼻咽癌又可分为分化型、未分化型^[12]。在中国南方等流行地区,>95% 病例为非角化亚型,主要与 EB 病毒感染相关^[12-14]。放疗是鼻咽癌的主要治疗方式及根治性治疗的一部分^[1,15]。基于放疗技术的发展,鼻咽癌患者生存期得到明显的改善^[2];但临床上约有 25% 患者经过标准治疗后仍会出现治疗失败,发生复发和(或)转移^[16-17]。因此,如何降低肿瘤细胞对放射线的抗拒性,是当前鼻咽癌研究的热点之一。

索拉非尼是多种激酶抑制剂,是肝癌和肾癌治疗的重要组成部分,可有效延长晚期患者的中位生

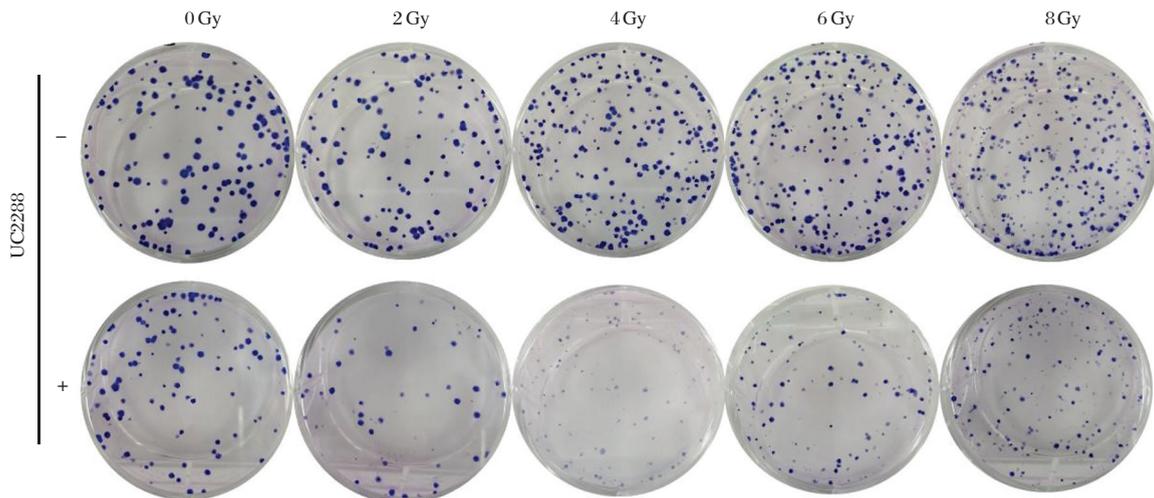


图 1 不同剂量照射 ±8 μmol/L 的化合物 UC2288 提高 CNE-2R 细胞的放射敏感性克隆形成情况

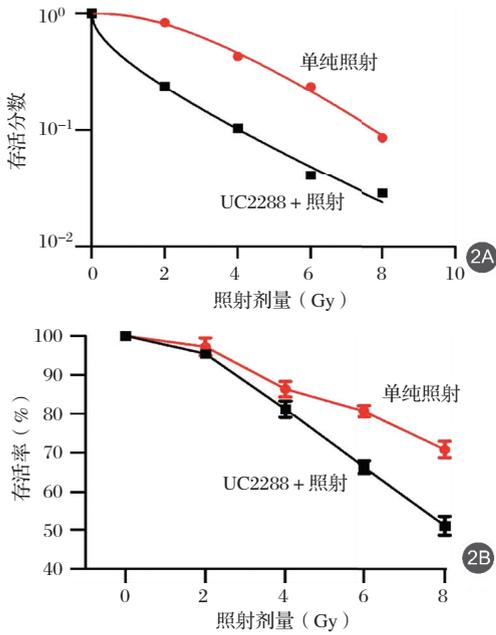


图2 化合物 UC2288 (8 $\mu\text{mol/L}$) 提高 CNE-2R 细胞的放射敏感性 (2A 单击多靶模型拟合的细胞存活曲线; 2B: CCK8 实验检测的细胞群体存活率)

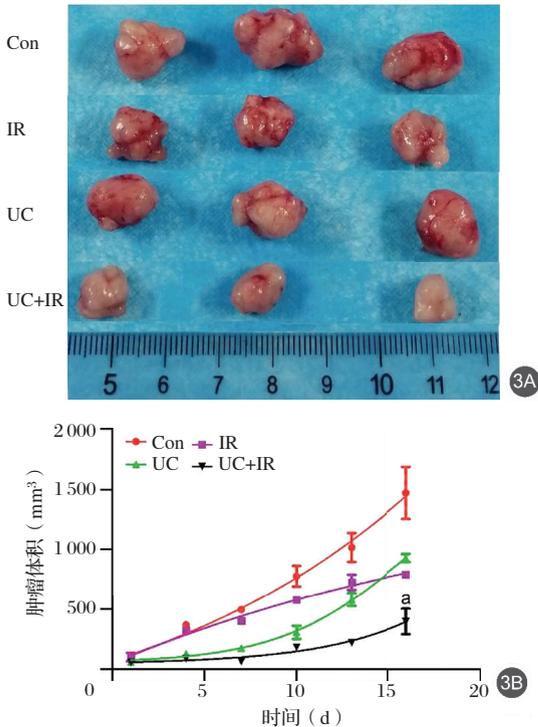


图3 化合物 UC2288 增加对 CNE-2R 细胞裸鼠移植瘤的放射敏感性 (3A: CNE-2R 细胞接种于裸鼠并经过各种处理, 生长至治疗开始后第 16 天时瘤子的大小; 3B: 裸鼠接受各种处理后瘤子的生长曲线; Con: 对照组; IR: 单纯照射组; UC: UC2288 组; UC+IR: UC2288 联合照射组。^a: 与 IR 组相比 $P < 0.01$)

存期^[18-19]。但是, 在治疗一段时间后, 许多肝癌患者会发生索拉非尼耐药, 进而出现进展和转移^[20-21]。对于复发和转移的鼻咽癌, 索拉非尼也具有一定的抗肿瘤作用, 但效果不明显^[22]。基于索拉非尼的结构, 有学者设计合成化合物 UC2288^[5]。研

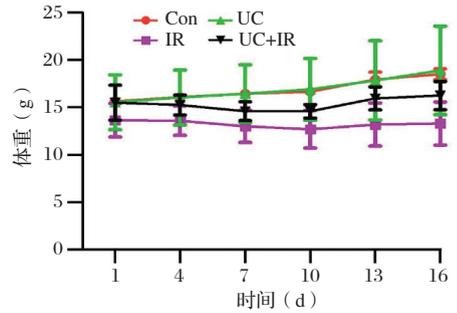


图4 化合物 UC2288 对 CNE-2R 细胞移植裸鼠体重的影响 (Con: 对照组; IR: 单纯照射组; UC: UC2288 组; UC+IR: UC2288 联合照射组)

究发现 UC2288 对肾癌、结肠癌和鼻咽癌有抗肿瘤效应, 但其在放射敏感性中的作用罕见报道。

本研究发现 UC2288 联合 X 线照射可明显抑制 CNE-2R 细胞克隆形成能力和细胞群增殖能力, 在裸鼠模型中 UC2288 抑制移植瘤生长, 然而 UC2288 增加放射敏感性的机制尚不清楚, 这需要进一步探索。

总之, 本实验表明 UC2288 可增加 CNE-2R 细胞放射敏感性, 抑制 CNE-2R 细胞裸鼠移植瘤生长, 为鼻咽癌的治疗提供了理论基础。

利益冲突 本研究由署名作者按以下贡献声明独立开展, 未因进行该研究接受任何不正当的职务或者财务利益, 再次对研究的独立性和科学性予以保证

作者贡献声明 梁仁拔负责设计研究方案、研究实施、文献查找、数据分析及论文撰写; 朱小东提出研究思路、技术指导及论文修改

参 考 文 献

- [1] Chen YP, Chan A, Le QT, et al. Nasopharyngeal carcinoma [J]. Lancet, 2019, 394 (10192): 64-80. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)30956-0.
- [2] Mao YP, Tang LL, Chen L, et al. Prognostic factors and failure patterns in non-metastatic nasopharyngeal carcinoma after intensity-modulated radiotherapy [J]. Chin J Cancer, 2016, 35(1): 103-112. DOI: 10.1186/s40880-016-0167-2.
- [3] Xiao BD, Zhao YJ, Jia XY, et al. Multifaceted p21 in carcinogenesis, stemness of tumor and tumor therapy [J]. World J Stem Cells, 2020, 12(6): 481-487. DOI: 10.4252/wjsc.v12.i6.481.
- [4] Zhang Q, Yang X, Luo L, et al. Targeted p21 activation by a new double stranded RNA suppresses human prostate cancer cells growth and metastasis [J]. Am J Transl Res, 2020, 12(8): 4175-4188.
- [5] Wettersten HI, Hee HwangS, Li C, et al. A novel p21 attenuator which is structurally related to sorafenib [J]. Cancer Biol Ther, 2013, 14(3): 278-285. DOI: 10.4161/cbt.23374.
- [6] Gupta R, Dong Y, Solomon PD, et al. Synergistic tumor suppression by combined inhibition of telomerase and CDKN1A [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111 (30): E3062-E3071. DOI: 10.1073/pnas.1411370111.
- [7] 梁仁拔, 李欣晓, 朱小东. P21 抑制剂 UC2288 诱导鼻咽癌放射抗拒细胞 CNE-2R 凋亡的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 16-22. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856. Liang RB, Li XX, Zhu XD. Study on UC2288-induced radiation resistance to CNE-2R apoptosis by P21 Inhibitor P21 [J]. Chin J Comparat Med, 2020, 30(8): 16-22. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.
- [8] Liang R, Zhu X. UC2288 induces cell apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells via inhibiting EGFR/ERK pathway [J]. J Cancer,

2021, 12(4): 988-995. DOI: 10. 7150/jca. 48282.

[9] 苏芳, 朱小东, 曲颂, 等. 人鼻咽癌放射抗拒细胞株建立及其细胞周期的观察 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(16): 1221-1224. DOI: 10. 16073/j. cnki. cjpt.

Su F, Zhu XD, Qu S, et al. The observation of its cell cycle [J]. Chin J Cancer Prevent Treat, 2009, 16(16): 1221-1224. DOI: 10. 16073/j. cnki. cjpt.

[10] Chen KH, Guo Y, Li L, et al. Cancer stem cell-like characteristics and telomerase activity of the nasopharyngeal carcinoma radioresistant cell line CNE-2R [J]. Cancer Med, 2018, 7(9): 4755-4764. DOI: 10. 1002/cam4. 1729.

[11] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. In press. DOI: 10. 3322/caac. 21660.

[12] Wang HY, Chang YL, To KF, et al. A new prognostic histopathologic classification of nasopharyngeal carcinoma [J]. Chin J Cancer, 2016, 35(1): 41-56. DOI: 10. 1186/s40880-016-0103-5.

[13] Pathmanathan R, Prasad U, Chandrika G, et al. Undifferentiated, nonkeratinizing, and squamous cell carcinoma of the nasopharynx. Variants of Epstein-Barr virus-infected neoplasia [J]. Am J Pathol, 1995, 146(6): 1355-1367.

[14] Young LS, Dawson CW. Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma [J]. Chin J Cancer, 2014, 33(12): 581-590. DOI: 10. 5732/cjc. 014. 10197.

[15] Peng G, Wang T, Yang KY, et al. A prospective, randomized study comparing outcomes and toxicities of intensity-modulated radiotherapy vs. conventional two-dimensional radiotherapy for the treatment of nasopharyngeal carcinoma [J]. Radiother Oncol, 2012, 104(3): 286-293. DOI: 10. 1016/j. radonc. 2012. 08. 013.

[16] Zhang MX, Li J, Shen GP, et al. Intensity-modulated radiotherapy prolongs the survival of patients with nasopharyngeal carcinoma compared with conventional two-dimensional radiotherapy: a 10-year experience with a large cohort and long follow-up [J]. Eur J Cancer, 2015, 51(17): 2587-2595. DOI: 10. 1016/j. ejca. 2015. 08. 006.

[17] Xiao WW, Huang SM, Han F, et al. Local control, survival, and late toxicities of locally advanced nasopharyngeal carcinoma treated by simultaneous modulated accelerated radiotherapy combined with cisplatin concurrent chemotherapy: long-term results of a phase 2 study [J]. Cancer, 2011, 117(9): 1874-1883. DOI: 10. 1002/cncr. 25754.

[18] Bruix J, Raoul JL, Sherman M, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: subanalyses of a phase III trial [J]. J Hepatol, 2012, 57(4): 821-829. DOI: 10. 1016/j. jhep. 2012. 06. 014.

[19] Pressiani T, Boni C, Rimassa L, et al. Sorafenib in patients with Child-Pugh class A and B advanced hepatocellular carcinoma: a prospective feasibility analysis [J]. Ann Oncol, 2013, 24(2): 406-411. DOI: 10. 1093/annonc/mds343.

[20] Niu L, Liu L, Yang S, et al. New insights into sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: Responsible mechanisms and promising strategies [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2017, 1868(2): 564-570. DOI: 10. 1016/j. bbcan. 2017. 10. 002.

[21] Tang W, Chen Z, Zhang W, et al. The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 87-101. DOI: 10. 1038/s41392-020-0187-x.

[22] Elser C, Siu LL, Winkvist E, et al. Phase II trial of sorafenib in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck or nasopharyngeal carcinoma [J]. J Clin Oncol, 2007, 25(24): 3766-3773. DOI: 10. 1200/JCO. 2006. 10. 2871.

(收稿日期: 2021-03-30)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

“做”与“作”的推荐用法

一、首字是 zuo 的动宾词组, 全用“做”: 做准备/做广告/做生意/做贡献/做事情/做手术/做检查/做父母/做宣传/做文章/做实验/做朋友/做斗争/做游戏/做动作/做试验/做报告/做研究/做调查/做处理/做运动/做努力/做调整/做后盾/做表率/做家教/做模范/做分析/做实事/做节目/做决定/做活动/做解释/做比较/做买卖/做设计/做衣服/做保证/做交易/做演员/做服务/做表演/做好事/做模特/做报道/做医生/做顾问/做记者/做奴隶/做皇帝/做介绍/做项目/做保障/做抵押/做美容/做企业/做担保/做示范/做事业/做临时工/做市场。

二、首字是 zuo 的双音节词, 按习惯用法: 做爱/做伴/做东/做法/做工/做功/做鬼/做活儿/做客/做媒/做梦/做派/做亲/做人/做事/做寿/做秀; 作案/作罢/作保/作别/作成/作对/作恶/作伐/作废/作法/作梗/作风/作古/作怪/作家/作假/作价/作件/作践/作客/作乐/作脸/作料/作乱/作美/作难/作孽/作弄/作呕/作陪/作品/作色/作势/作数/作死/作速/作祟/作态/作痛/作为/作伪/作文/作物/作息/作兴/作秀/作业/作揖/作俑/作用/作战/作者/作准/做作。

三、末字是 zuo 的双音节词或三音节词语, 全用“作”: 比作/变作/缠作/当作/读作/分作/改作/化作/换作/记作/叫作/看作/拼作/评作/切作/认作/算作/听作/弯作/写作/选作/用作/装作/分析作/化装作/解释作/理解作/称作/释作/视作。

四、成语或四字格等固定结构中, 有“做”或“作”的, 按习惯用法: 白日做梦/敢做敢当/假戏真做/做贼心虚/好吃懒做/亲上做亲/一不做, 二不休/不痴不聋, 不做家翁/做一天和尚撞一天钟/逢场作戏/胡作非为/回嗔作喜/认贼作父/始作俑者/述而不作/天作之合/为非作歹/为虎作伥/为人作嫁/无恶不作/五行八作/兴风作浪/一鼓作气/以身作则/装聋作哑/装模作样/装腔作势/自我作古/自作聪明/自作多情/自作自受。

五、在用“做”“作”两可的情况下, 要做到局部一致: 用作-用做/作诗-做诗/作秀-做秀。