

三氧化二砷对人肺腺癌 A549 细胞的放射增敏作用

The Radiosensitizing Effect of As_2O_3 on Lung Adenocarcinoma Cell Line A549
GUO Hong, YU Hong, WANG Tian-lu

郭红, 于洪, 王天禄 (辽宁省肿瘤医院, 辽宁 沈阳 110042)

摘要: [目的] 探讨三氧化二砷(As_2O_3)对人肺腺癌 A549 细胞的放射增敏作用。[方法] MTT 法确定 As_2O_3 对 A549 细胞的半数致死浓度(LD_{50}), 采用集落形成法观察 20% LD_{50} 的 As_2O_3 对 A549 细胞的放射增敏作用。[结果] 细胞生长抑制随 As_2O_3 浓度的增加而增强。 As_2O_3 +照射组的细胞存活率低于单纯照射组, D_0 值小于单纯照射组 (1.46Gy vs 2.03 Gy), D_q 值也小于单纯照射组 (0.49 Gy vs 1.35Gy), 存活曲线肩区(D_q)变小, 放射增敏比(SER)为 1.39。[结论] As_2O_3 对肺腺癌 A549 细胞有明显的放射增敏作用, 抑制 A549 细胞的修复能力使照射后细胞存活分数降低是其放射增敏的可能机制。

关键词: 肺肿瘤; A549 细胞; 三氧化二砷; 放射增敏剂

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)10-0784-03

肺腺癌是常见的恶性肿瘤, 很多患者发病时已是中晚期, 失去了手术机会, 放射治疗成为重要的局部治疗手段。但肺腺癌对射线相对不敏感, 如果能提高肺腺癌对射线的敏感性, 放射治疗的疗效将得到改善。研究表明: As_2O_3 可诱导相关基因的表达, 调整肿瘤细胞周期, 诱导细胞分化, 诱导肿瘤细胞凋亡, 并多靶点抑制肿瘤发生和肿瘤转移, 抑制肿瘤新生血管的生成^[1-3]。上述因素与放射敏感性相关, 故笔者观察 As_2O_3 能否增强放射对肺腺癌细胞的杀灭作用。

1 材料与方法

1.1 实验用药

亚砷酸注射液购自哈尔滨伊达制药厂, 用生理盐水配制成 1mmol/L 的储存液, 储于 4℃冰箱备用, 使用前用培养液稀释至所需浓度。

1.2 细胞培养

肺腺癌 A549 细胞株购自中国医科大学肿瘤研究所, 培养于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中, 并置于含 5% CO_2 的 37℃温箱中培养。

1.3 A549 细胞对 As_2O_3 药物敏感性的测定

96 孔培养板接种细胞, MTT 法测定细胞抑制率。选择 0.05、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0 $\mu\text{mol/L}$ 8 个浓度, 每个浓度 6 孔。取指数生长期细胞, 经 2.5g/L 胰蛋白酶消化后制成单细胞悬液, 每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔培养板, 加入 200 μl 含 10%胎牛血清 RPMI1640 培养液培养 24h。每孔加 20 μl MTT (5g/L) 继续孵育 4h 终止培养, 吸去培养液, 每孔加 200 μl 二甲基亚砷(DMSO), 振荡 10min 后紫外分光光度计检测, 检测波长为 492nm。细胞抑制率 = 1 - (实验组吸光度值/对照组吸光度值) $\times 100\%$, 绘图后求半数致死剂量(LD_{50})值。

1.4 集落形成法观察 As_2O_3 对 A549 细胞的放射增敏作用

按放疗剂量 0、1、2、3、4、6、8Gy 分 7 个组, 于

收稿日期: 2012-06-12; 修回日期: 2012-08-23

通讯作者: 郭红, E-mail: ghyjh2004@126.com

60mm 培养皿中分别接种不同数量的细胞,每组设 3 个平行样本,每个剂量组分别设单纯照射和照射+ $5\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 (20%LD₅₀)。给药后 24h 弃掉含药物的培养液,换含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液,分别接受不同剂量的照射,继续培养 14d 后染色、固定,计数含 50 个细胞以上的克隆数。存活分数的计算方法为:处理组克隆形成率/对照组克隆形成率,采用“多靶单击模型”^[4]拟合细胞存活曲线,计算放射增敏比(SER)。“多靶单击模型”方程: $SF=1-(1-e^{-D/D_0})^N$, $Dq=D_0 \cdot \ln N$, 其中 SF 为细胞存活分数, D 为放射剂量(Gy), D_0 代表平均致死剂量, Dq 代表准域剂量, N 为外推数。

1.5 照射方法

所有照射均为室温下照射,6MV-X 线,剂量率 250cGy/min,源皮距 100cm,表面覆盖 1.5cm 填充物。

2 结 果

2.1 A549 细胞对 As_2O_3 药物敏感性

As_2O_3 浓度为 0.05、0.1、0.5、1.0、5.0、10、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 时的细胞抑制率分别为 0.13%、0.54%、3.47%、5.52%、14.71%、28.79%、69.09%、80.62% (图 1)。半数致死剂量(LD₅₀)为 25.06 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2 As_2O_3 对 A549 细胞的放射增敏作用

集落形成法剂量—细胞存活曲线见图 2,多靶模型主要参数见表 1。结果显示放射组与放射+ As_2O_3 组 D_0 值分别为 2.03 Gy、1.46 Gy, Dq 值分别为

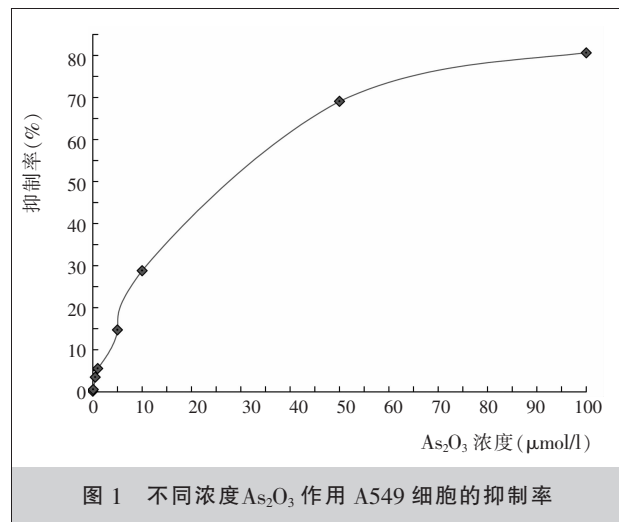


图 1 不同浓度 As_2O_3 作用 A549 细胞的抑制率

1.35 Gy、0.49 Gy。说明加用 As_2O_3 处理后平均致死剂量(D_0)降低,存活曲线肩区(Dq)变小。放射增敏比(SER)为 1.39,表明 As_2O_3 对 A549 细胞有放射增敏作用。

表 1 细 A549 胞照射后存活曲线的主要参数

组别	D_0 (Gy)	Dq (Gy)	N	SER
放射组	2.03	1.35	1.96	1.39
放射+ As_2O_3	1.46	0.49	1.48	—

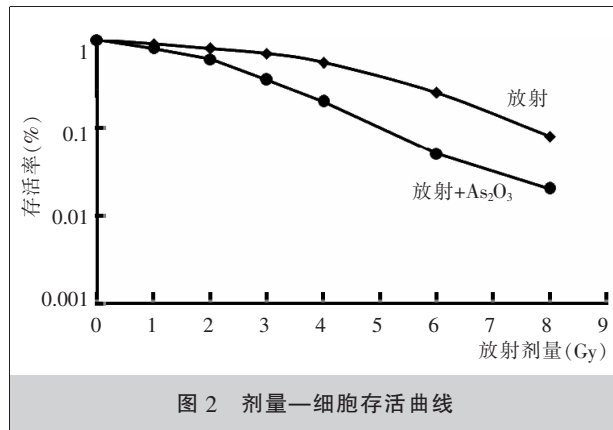


图 2 剂量—细胞存活曲线

3 讨 论

20 世纪 70 年代 As_2O_3 首先用于治疗急性早幼粒细胞白血病 (APL),目前的临床适应证不局限于白血病的治疗,国内外正在进行实体瘤的临床应用。本实验应用 MTT 法测定药物半数致死剂量(LD₅₀)为 25.06 $\mu\text{mol/L}$,为了避免药物对细胞的毒性作用通常采用药物半数致死剂量(LD₅₀)的 20%浓度,因此在增敏实验中采用 5 $\mu\text{mol/L}$ (即 20%LD₅₀)的浓度。采用“多靶单击模型”拟合经典的细胞存活曲线,细胞存活曲线的参数 D_0 值为平均致死剂量,是一次照射能杀灭 63%的细胞或 37%细胞存活的剂量; Dq 值是细胞存活曲线上测量肩宽的参数,它表明细胞亚致死损伤的修复能力的大小, Dq 值小,表明细胞对亚致死损伤的修复能力较弱。由表 1 存活曲线的参数可以看出,照射+5 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 能使细胞存活曲线的肩区变小, Dq 值及 D_0 值小于单纯照射组。由于 Dq 值代表细胞对射线亚致死损伤的修复力,提示 As_2O_3 通过抑制 A549 细胞的修复能力使照射后细胞存活分数降低可能是其放射增敏作用机制之一。

本实验照射+5 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 组放射增敏比

(SER)为 1.39,证实了 As_2O_3 对离体肺癌细胞的放射增敏作用。 As_2O_3 对其他一些离体肿瘤细胞的放射增敏作用已被证实:张大昕等^[5]用 As_2O_3 作用于卵巢癌细胞系 SKOV-3,放射增敏比在 1.53~2.07 之间,说明 As_2O_3 对卵巢癌细胞有明显的放射增敏作用;谢良喜等^[6]用 As_2O_3 作用于鼻咽癌 CNE-1 细胞,放射增敏比在 1.33~1.57 之间,说明 As_2O_3 对鼻咽癌细胞有放射增敏作用。本实验结果显示 As_2O_3 能改变肺腺癌细胞对放射线的敏感性,提示我们 As_2O_3 可能可作为新型放射增敏剂作用于临床提高放疗疗效。目前研究还是以解决乏氧细胞的放射抗拒为主,对正常有氧细胞没有或只有很少影响。文献表明 As_2O_3 作用于卵巢癌、鼻咽癌、结肠癌等多种细胞体外实验,可以使多种实体瘤细胞凋亡^[7],并使细胞阻滞在 G₂/M 期^[8],降低内源性谷胱甘肽的含量^[9],上调 p53 和下调 bcl-2 的表达^[10,11]。根据放射生物学理论,这些改变都有可能增加肿瘤的放射敏感性,为 As_2O_3 作为新型放射增敏剂提供了理论依据。

总之, As_2O_3 对人肺腺癌 A549 细胞系有放射增敏作用,通过抑制 A549 细胞的修复能力使照射后细胞存活分数降低可能是其射增敏作用的机制之一,为 As_2O_3 进一步应用于临床肺癌患者提供了实验依据。但本实验为离体实验,有关动物实验及其它放射增敏作用的机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Han YH, Kim SZ, Kim SH, et al. Induction of apoptosis in arsenic trioxide-treated lung cancer A549 cells by buthionine sulfoximine[J]. *Mol Cells*, 2008, 26(2):163-164.
- [2] Kim JH, Kim JH, Yu YS, et al. Antitumor activity of arsenic trioxide on retinoblastoma: cell differentiation and apoptosis depending on arsenic trioxide concentration[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(4):1821-1823.
- [3] 宋铁芳, 刘冰熔. 砷剂对肿瘤细胞的诱导凋亡作用[J]. *中国肿瘤*, 2002, 11(12):714-716.
- [4] 沈瑜. 肿瘤放射生物学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002.63-64.
- [5] 张大昕, 王兵, 胡雷光, 等. 三氧化二砷对卵巢癌细胞的放射增强作用[J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2003, 12(1):46-49.
- [6] 谢良喜, 李德锐, 林英成, 等. 三氧化二砷对鼻咽癌离体细胞的放射增敏作用 [J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2004, 24(3):240-242.
- [7] 黄守国, 孔北华, 江森. 三氧化二砷对不同种类人卵巢癌细胞株的体外作用[J]. *中国肿瘤*, 2001, 11(4):244-246.
- [8] Li Y, Qu X, Qu J, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis and G2/M phase arrest by inducing Cbl to inhibit PI3K/Akt signaling and thereby regulate p53 activation[J]. *Cancer Lett*, 2009, 284(2):213-215.
- [9] Xiao G, Tang X, Yao C, et al. Potentiation of arsenic trioxide-induced apoptosis by 8-bromo-7-methoxychrysin in human leukemia cells involves depletion of intracellular reduced glutathione [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2011, 43(9):719-721.
- [10] Park WH, Kim SH. Arsenic trioxide induces human pulmonary fibroblast cell death via the regulation of Bcl-2 family and caspase-8[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(4):4311-4318.
- [11] Yedjou CG, Tchounwou PB. Modulation of p53, c-fos, RARE, cyclin A, and cyclin D1 expression in human leukemia (HL-60) cells exposed to arsenic trioxide [J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 331(1-2):207-214.