

鹤草酚对人肺腺癌 A549 细胞株放射增敏作用的实验研究

Radiosensitizing Effect of Agrimophol on Lung Adenocarcinoma Cell Line A549
LIU Xiao-bin, BAI Shu-zhi, JIANG Xiao-shu, et al.

刘晓滨¹, 白淑芝², 姜晓姝³, 徐 军¹

(1. 哈尔滨医科大学附属第二医院, 黑龙江 哈尔滨 150086;

2. 哈尔滨医科大学病理生理学教研室, 黑龙江 哈尔滨 150081;

3. 哈尔滨医科大学机能学实验教学中心, 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要: [目的] 探讨鹤草酚对人肺腺癌 A549 细胞株的放射增敏作用。[方法] MTT 法测定 0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 和 32.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度鹤草酚对人肺腺癌 A549 细胞株的生长抑制率。实验分 4 组: 常氧照射组、乏氧照射组、0.887 $\mu\text{mol/L}$ 鹤草酚+乏氧照射组和 1.774 $\mu\text{mol/L}$ 鹤草酚+乏氧照射组, 测定各组存活分数 (SF), 计算细胞生存率, 拟合细胞生存曲线并计算放射增敏比。[结果] MTT 结果表明, 鹤草酚对人肺腺癌 A549 细胞有生长抑制作用, 不同浓度鹤草酚作用组间细胞抑制率有显著性差异 ($F=26.818, P=0.002$)。鹤草酚作用 A549 细胞的 IC_{50} 为 8.87 $\mu\text{mol/L}$ 。0.887、1.774 $\mu\text{mol/L}$ 鹤草酚联合乏氧照射组的 D_0 、 D_{10} 和 2Gy 时的细胞存活分数 (SF₂) 均小于单纯乏氧照射组。0.887 $\mu\text{mol/L}$ 和 1.774 $\mu\text{mol/L}$ 鹤草酚联合乏氧照射组的放射增敏比 (SER) 分别为 1.484 和 1.525。[结论] 鹤草酚对人肺腺癌 A549 细胞株有抑制增殖作用, 其常氧培养 IC_{50} 值为 8.87 $\mu\text{mol/L}$ 。鹤草酚对乏氧培养的人肺腺癌 A549 细胞株有放射增敏作用, 随着鹤草酚浓度的增加其放射增敏作用增强。

关键词: 放射敏感性; 鹤草酚; 肺腺癌

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)11-0848-04

乏氧细胞普遍存在恶性肿瘤发生发展过程中^[1]。研究表明, 乏氧肿瘤细胞通过血管生成、糖酵解和细胞迁移等机制促进自身的生存、侵袭和对放疗的抵抗^[2,3]。目前还没有令人满意的用于临床的放疗增敏药物^[4]。鹤草酚 (Agrimophol) 经放射线照射后可迅速氧化, 并释放出 H_2O_2 、 O_2 和 $\text{OH}^\cdot$ 等物质, 从而增加了肿瘤细胞尤其是肿瘤乏氧细胞对放射线照射的敏感性。

本实验以人肺腺癌 A549 细胞株为研究对象, 通过常氧和乏氧培养分析鹤草酚对 A549 细胞株的放射增敏作用。

1 材料与方法

1.1 材 料

RPMI1640 培养基购自美国 Hyclone 公司。胎牛

血清购自中国医学科学院生物工程研究所。0.25%

胰酶购自美国 Invitrogen 公司。溴化四甲基偶氮唑蓝

(MTT) 购自美国 Sigma 公司。二甲基亚砜 (DMSO) 购自

美国 Amresco 公司。鹤草酚为哈尔滨医科大学机能

学实验教学中心实验室自制 (经归一化法测定纯度为 99.2%)。Varian2300C/D 医用直线加速器购自美国 Varian 公司。

1.2 细胞常氧和乏氧培养

人肺腺癌 A549 细胞株购自哈尔滨医科大学肿瘤研究所, 哈尔滨医科大学病理生理学教研室传代保存。A549 细胞株用含 10% 的胎牛血清的 RPMI1640 培养液培养, 细胞融合达 80% 以上用于实验。常氧培养: 在 37℃、5% CO_2 和 95% O_2 的饱和湿度的培养箱中培养。乏氧培养: 将 DY-2 型培养箱中的培养罐用 75% 乙醇消毒后, 将培养瓶放入培养罐中密闭, 然后缓慢抽成真空, 充入 1% O_2 、5% CO_2 和 94% N_2 的混合气体, 约在 1h 内平衡至 1% 氧浓度; 将乏氧起始时间定为 0, 分别收集乏氧 24h 细胞^[5]。

1.3 MTT 实验

取处于对数生长期的人肺腺癌 A549 细胞,胰酶消化后以 3.5×10^3 个/ml 的浓度将细胞接种于 96 孔板,每组设 6 个复孔。常氧培养至细胞贴壁后,弃培养基,加入含鹤草酚浓度分别是 0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 和 $32.0 \mu\text{mol/L}$ 的培养液。培养 48h 后每孔加入 MTT (0.5mg/ml)继续培养 4h 后终止培养,弃培养液,每孔加 DMSO 150 μl ,震荡 10min,使 MTT 还原物完全溶解。用酶标仪在 540~570nm 处测定各孔吸光度值 (optical density, OD)。用 SPSS17.0 的 Probit 程序计算细胞增殖半数抑制浓度 (50% inhibiting concentration, IC_{50}),实验重复 3 次,计算 IC_{50} 平均值,选择 IC_{50} 值的 1/5 及 1/10 浓度,即接近无毒药物浓度应用于以后的实验。

细胞抑制率=(1-实验组吸光度值/对照组吸光度值) $\times 100\%$ 。

1.4 克隆形成率观察鹤草酚对 A549 细胞株的放射增敏效应

取对数生长期的人肺腺癌 A549 细胞分别接种不同细胞数于培养皿中,并加入含 10%灭活胎牛血清的 RPMI1640 培养液 4~5ml,预期以 50~100 个克隆/培养皿的密度生长,常氧或乏氧培养。每孔细胞数约 50~15 个,每板分 4 组:(1)常氧照射组:在常氧环境下对细胞行射线照射;(2)乏氧照射组:在乏氧环境下对细胞行射线照射;(3) $0.887 \mu\text{mol/L}$ 鹤草酚+乏氧照射组;(4) $1.774 \mu\text{mol/L}$ 鹤草酚+乏氧照射组:鹤草酚作用 24h 后在乏氧环境下对细胞进行射线照射。细胞贴壁后分别加入含以上 2 种药物浓度的培养液 4ml,24h 后换培养液,5 块 6 孔培养板置于 6 MV 直线加速器下,照射剂量分别为 0、2、4、6 和 8 Gy 单次吸收剂量照射。照射野大小为 $20\text{cm} \times 20\text{cm}$,将培养板置于照射野内,距照射野边缘 2 cm。采用 6 MV X 线照射,剂量率 3Gy/min。照射后于 37°C ,常氧或乏氧条件下培养 12~14d,弃掉培养液,PBS 漂洗后,用醋酸甲醇(1:4)溶液固定细胞,0.1%结晶紫溶液染色,在培养瓶底面画线后,于低倍显微镜下计数 ≥ 50 个细胞的克隆数。以 0Gy 组计算种植率 (plating efficiency, PE), $\text{PE} = \text{克隆数} / \text{接种的细胞数} \times 100\%$; 计算存活分数 (survival fraction, SF), $\text{SF} = \text{受照射细胞的 PE} / \text{对照细胞的 PE} \times 100\%$; 根据多靶单击模型 $\text{SF} = 1 - [1 - e^{-D/D_0}]^N$ 拟合细胞存活曲线,计算

平均致死剂量(mean lethal dose, D_0)、外推数 N、准阈剂量(quasi-threshold, D_q)及照射 2Gy 时的细胞存活分数 (SF_2), SF_2 反映肿瘤细胞对放射线的敏感程度; 计算放射增益比(sensitivity enhancement ratio, SER), $\text{SER} = \text{乏氧照射组 } D_0 / \text{鹤草酚联合乏氧照射组 } D_0$; 氧增比 (oxygen enhancement ratio, OER) = 乏氧照射组 D_0 / 常氧照射组 D_0 。

1.5 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件包,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同处理组间比较采用单因素方差分析,各组间细胞抑制率比较采用定量数据直线回归-方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。细胞存活曲线采用多靶单击方程拟合。

2 结 果

2.1 鹤草酚作用人肺腺癌 A549 细胞株 24h 后的 OD 值及抑制率

不同浓度鹤草酚对人肺腺癌 A549 细胞株增殖的抑制作用见表 1。不同药物浓度处理组间细胞抑制率有显著性差异($F=26.818$, $P=0.002$),随着药物浓度提高,对细胞抑制作用增强。鹤草酚对 A549 细胞增殖 IC_{50} 为 $8.87 \mu\text{mol/L}$ 。

表 1 不同浓度鹤草酚对人肺腺癌 A549 细胞株的 OD 值及抑制率

鹤草酚浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	OD 值	抑制率 (%)
0	0.843 ± 0.026	—
0.5	0.819 ± 0.071	2.85
1.0	0.738 ± 0.064	12.46
2.0	0.691 ± 0.015	18.03
4.0	0.557 ± 0.048	33.93
8.0	0.436 ± 0.025	48.28
16.0	0.313 ± 0.012	62.87
32.0	0.206 ± 0.005	75.56

2.2 鹤草酚与不同剂量照射对 A549 细胞 SF 的影响

选择鹤草酚 IC_{50} 的 1/5 ($1.774 \mu\text{mol/L}$) 及 1/10 ($0.887 \mu\text{mol/L}$) 浓度,用于克隆形成实验。 $0.887 \mu\text{mol/L}$ 和 $1.774 \mu\text{mol/L}$ 两个浓度的鹤草酚对 A549 细胞集落形成能力和 SF 的影响不同(表 2 和图 1)。无论单纯照射组还是乏氧加药联合照射组,随着照射剂量逐渐增大, SF 逐渐降低,但在同一照射剂量点,联合鹤草酚组细胞存活率较单纯照射组更低,联合 $1.774 \mu\text{mol/L}$ 鹤草酚与同一照射剂量点单纯乏氧照

射对 A549 乏氧细胞杀灭效应更强, 有显著性差异 ($P=0.001$)。高, 提示乏氧 A549 细胞放射敏感性降低。见表 3。

表 2 鹤草酚与不同照射剂量作用 A549 细胞株 24h 的存活分数

照射剂量 (Gy)	SF			
	常氧照射组	乏氧照射组	0.887 μ mol/L 鹤草 酚+乏氧照射组	1.774 μ mol/L 鹤草 酚+乏氧照射组
0	1.000 $\pm$ 0.000	0.987 $\pm$ 0.009	0.968 $\pm$ 0.035	0.939 $\pm$ 0.041
2	0.758 $\pm$ 0.025	0.959 $\pm$ 0.023	0.878 $\pm$ 0.027	0.832 $\pm$ 0.036
4	0.279 $\pm$ 0.026	0.759 $\pm$ 0.025	0.417 $\pm$ 0.023	0.367 $\pm$ 0.029
6	0.121 $\pm$ 0.017	0.435 $\pm$ 0.021	0.176 $\pm$ 0.032	0.158 $\pm$ 0.025
8	0.057 $\pm$ 0.008	0.269 $\pm$ 0.018	0.101 $\pm$ 0.039	0.076 $\pm$ 0.016

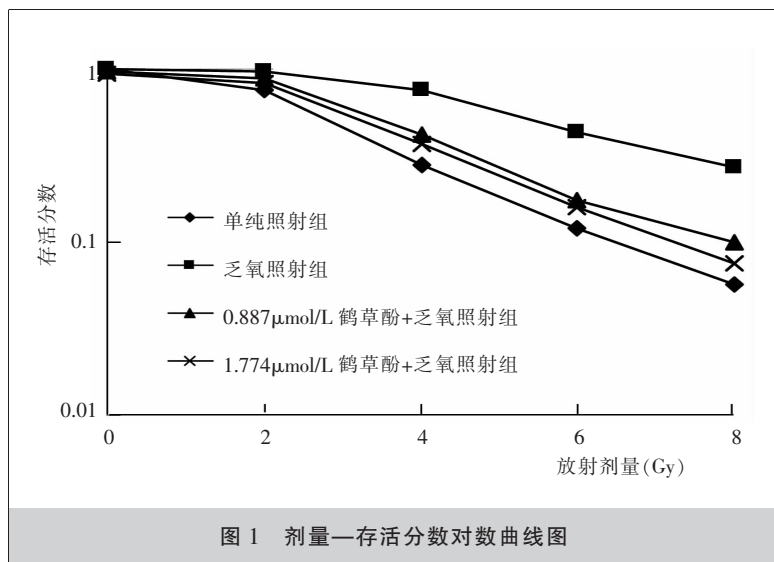


图 1 剂量—存活分数对数曲线图

2.3 鹤草酚对乏氧 A549 细胞的放射增敏作用

乏氧照射组的 D_0 值为 2.770Gy, 而常氧照射组 D_0 值为 1.661Gy, 两者相比得出 OER 为 1.668, 说明细胞处于乏氧状态。鹤草酚联合照射组 D_0 值均小于乏氧照射组, 说明鹤草酚增加了乏氧 A549 细胞对放射线的敏感性。0.887 μ mol/L 和 1.774 μ mol/L 鹤草酚联合照射组的 SER 分别为 1.484 和 1.525, 呈剂量效应关系, 高浓度鹤草酚联合照射组的增敏效果较好, 两组比较有显著性差异 ($P=0.001$)。乏氧照射组 A549 细胞 SF_2 值为 0.96, 而常氧照射组为 0.76。乏氧组照射组 D_0 、 D_q 、 N 及 SF_2 值均较常氧照射组

3 讨论

放疗是治疗肺癌的主要方法。但已有大量研究证实乏氧肿瘤细胞的存在使肿瘤放射敏感性下降, 这是肿瘤治疗失败的主要原因之一。乏氧介导的肺腺癌 A549 细胞放疗抵抗也在本研究中得到证实。 SF_2 值是目前公认的衡量放射敏感性标准之一, SF_2 值升高, 提示放射敏感性下降。本研究应用克隆形成实验发现乏氧 A549 细胞 SF_2 值为 0.96, 而常氧为 0.76, 说明乏氧 A549 细胞放射敏感性明显降低。

肿瘤放疗增敏剂是指本身无毒性, 但能够选择性地增强放射线对肿瘤细胞, 尤其是肿瘤组织中乏氧细胞的致死效应, 而对受照射的正常细胞影响不大的一些化学物质。它属于化学修饰剂的一种, 即在肿瘤治疗中, 主要通过其对肿瘤及正常组织的放射及药物的修饰效应, 而不是依靠其细胞毒作用起效的一类药物。因此, 我们进行体外实验测定药物对细胞的放射增

敏作用时, 选用低细胞毒性的药物浓度 (0.887 μ mol/L 和 1.774 μ mol/L), 即小于药物 IC_{50} 的 1/5 的浓度进行放射增敏实验^[6]。

研究表明, D_0 和 D_q 两个参数能反映出细胞的放射敏感性变化^[7]。 D_q 为准域剂量值, 表示肩宽, 是曲线直线部分向上的延长线与存活率等于 1 的横轴相交点的剂量, 它表明细胞亚致死损伤修复能力的大小, D_q 值小, 表明细胞对亚致死损伤修复能力弱, 很小剂量便可使细胞进入致死损伤的指数性存活曲线部分。本实验中采用单击多靶模型 $SF=1-[1-e^{-D/D_0}]^N$

表 3 多靶单击模型拟合曲线计算相关参数及放射增益比

组 别	D_q (Gy)	D_0 (Gy)	N	SF_2	OER	SER
常氧照射组	4.73	1.661	3.85	0.76	—	—
乏氧照射组	11.22	2.770	5.05	0.96	1.668	—
0.887 μ mol/L 鹤草酚+乏氧照射组	6.85	1.866	4.67	0.88	—	1.484
1.774 μ mol/L 鹤草酚+乏氧照射组	5.84	1.818	4.21	0.83	—	1.525

拟合经典的 SF 曲线, 细胞存活曲线的参数 D_0 值, 由多次事件的细胞杀灭所致, 是一次照射能杀灭 63% 的细胞或 37% 的细胞存活的剂量。本研究发现, 不同浓度鹤草酚联合照射组和乏氧照射组相比较, D_0 、 D_q 、 SF_2 值均变小, SER 为 1.484、1.525, 表明鹤草酚对乏氧 A549 细胞有放射增敏作用。同时发现, 0.887 $\mu\text{mol/L}$ 和 1.774 $\mu\text{mol/L}$ 鹤草酚+照射均能使细胞存活曲线的肩区变小, 提示鹤草酚可能通过抑制人肺腺癌 A549 细胞的亚致死性损伤修复能力而起放射增敏效应。

放射增敏的效果, 通常是通过 SER 来衡量的。国际上 SER 的定义是单纯照射时达到一特定的生物效应所需的剂量与照射联合放射增敏剂后达到同样生物效应所需的照射剂量的比值^[8]。如果 $SER > 1.0$, 则表示有一定增敏效果, SER 值越大, 增敏效能就越高。本研究根据 D_0 值分别计算出 1.774 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.887 $\mu\text{mol/L}$ 鹤草酚组的放射 SER 分别为 1.525 和 1.484, SER 均大于 1, 表明无细胞毒浓度的鹤草酚对 A549 细胞具有放射增敏效能, 且增敏效能与药物浓度呈正相关。深入研究鹤草酚放射增敏机制

可能为肿瘤治疗带来突破性进展。

参考文献:

- [1] 苏州, 吴敬波. 肿瘤乏氧放疗增敏剂研究进展[J]. 西南军医, 2010, 12(3): 528-530.
- [2] Harrison LB, Chadha M, Hill RJ, et al. Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes [J]. *Oncologist*, 2002, 7(6): 492-508.
- [3] Dang CV. Links between metabolism and cancer [J]. *Genes Dev*, 2012, 26(9): 877-890.
- [4] Begg AC. Predicting recurrence after radiotherapy in head and neck cancer [J]. *Semin Radiat Oncol*, 2012, 22 (2): 108-118.
- [5] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 1784-1791.
- [6] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 第 2 版. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998. 952-953.
- [7] 殷蔚伯. 肿瘤放射治疗学[M]. 第 4 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2008. 235-236.
- [8] 秦颂兵, 周乐源, 徐晓婷, 等. 塞来昔布对脑胶质瘤细胞放射增敏效应的研究[J]. 肿瘤学杂志, 2008, 14(5): 370-373.