

· 基础研究 ·

三氧化二砷对人脑胶质瘤 SHG44 细胞放射增敏作用的研究

黄 辉¹, 刘芬菊², 蒋宏玲³, 张荣君¹, 赵 博¹, 刘美莲^{1△}

(1. 桂林医学院附属医院放疗科, 广西桂林 541001; 2. 苏州大学放射医学与公共卫生学院, 江苏苏州 215007; 3. 桂林医学院附属医院康复科, 广西桂林 541001)

摘要:目的 研究三氧化二砷(As_2O_3)对人脑胶质瘤 SHG44 细胞的放射增敏作用。方法 以 SHG44 细胞为实验对象,³H-TdR 掺入法检测 SHG44 细胞 DNA 的合成率;流式细胞法检测细胞的周期分布。结果 As_2O_3 与照射联合作用于 SHG44 细胞,表现为剂量-生存曲线左移,2 Gy 剂量照射下的存活分数(SF2)下降,平均致死剂量(D_0)减低,准阈剂量(D_q)变小,细胞的放射敏感性明显增强; As_2O_3 影响细胞周期再分布,对射线敏感的 G_2/M 期细胞比例增加,对射线抗拒的 S 期细胞比例减少。结论 As_2O_3 能增加 SHG44 细胞的放射敏感性,其机制可能与诱导细胞凋亡、影响细胞周期再分布有关。

关键词:神经胶质瘤;砷剂;辐射增敏药;细胞周期;辐射损伤,实验性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.34.018

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)34-3477-03

A study on arsenic trioxide radiosensitization in human glioma cell line SHG44

Huang Hui¹, Liu Fenju², Jiang Hongling³, Zhang Rongjun¹, Zhao Bo¹, Liu Meilian^{1△}

(1. Department of Radiotherapy, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541001, China;

2. School of Radiation Medicine & Public Health, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215007, China;

3. Department of Rehabilitation, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541001, China)

Abstract: Objective To study the radiosensitization effect of arsenic trioxide (As_2O_3) on human glioma cell line SHG44.

Methods SHG44 cells served as experimental subject. ³H-TdR incorporation assay was adopted to detect the DNA synthesis rate of SHG44 cells, and flow cytometry was used to analyse the cell cycle distribution after As_2O_3 treatment. **Results** SH44 cells demonstrated left-shift dose-survival curve with a decline in survival fraction at 2 Gy(SF2), mean lethal dose(D_0) and quasi-threshold dose(D_q) which indicating an enhancement in cell radiosensitivity. Cell cycle re-distribution was affected by As_2O_3 . Ratios of radiation-sensitive cells in G_2/M phase increased and ratios of radiation-resistant cells in S phase decreased. **Conclusion** As_2O_3 may enhance radiosensitivity of SH44 cells via the mechanism of inducing cellular apoptosis and influencing cell cycle re-distribution.

Key words: glioma; arsenicals; radiation-sensitizing agents; cell cycle; radiation injuries, experimental

放射治疗是脑胶质瘤术后治疗的重要手段,但胶质瘤细胞有较强的辐射抗性,放射治疗效果不理想。三氧化二砷(As_2O_3)临床上已成功用于治疗急性早幼粒细胞白血病(APL)^[1]。能否将 As_2O_3 与电离辐射联合用于治疗恶性胶质瘤,至今国内外尚未见相关文献报道,本课题研究 As_2O_3 对 SHG44 细胞的放射增敏作用及其辐射剂量效应关系,探讨照射与药物联合作用的杀伤能力。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器 ⁶⁰Co γ 射线辐照装置;数码型液体闪烁测量仪; As_2O_3 , 亚砷酸注射液; ³H-TdR;放射性浓度为 2.4×10^6 Bq/mL。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 SHG44 细胞培养在含 10% 新生小牛血清的 RPMI1640 培养基、37℃、5%CO₂ 饱和湿度孵箱中。

1.2.2 ³H-TdR 掺入法^[2] 检测⁶⁰Co γ 射线联合 As_2O_3 对 SHG44 细胞 DNA 合成的影响 (1)实验分组:对照组,单独 2、5、8、11、14 Gy ⁶⁰Co γ 射线照射组,单独 $2 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 组及 $2 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 与上述各剂量 ⁶⁰Co γ 射线照射联合组,每组设 9 个平行样品。(2)取对数生长期细胞加胰酶消化,用含 RPMI1640 培养基,配成 5×10^4 /mL 细胞悬液,接种于细胞培

养瓶中,孵箱中培养 12 h 使贴壁生长。对照组、单独⁶⁰Co γ 射线照射组分别用 RPMI1640 培养基换液,单独 $2 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 、 $2 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 与⁶⁰Co γ 射线照射联合组分别换成含 $2 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 完全培养基,各组细胞继续培养 6 h。各组分别接受相应剂量⁶⁰Co γ 射线照射。孵箱中培养 72 h,培养终止前 24 h 分别加入 10 mL ³H-TdR(2.4×10^4 Bq),培养至结束。(3)弃上层培养液,加入胰酶消化成悬浮细胞,加入蒸馏水毛吸管吹均,于 49 型玻璃纤维滤膜上抽滤,三氯醋酸固定,无水乙醇洗涤滤膜,烘干滤膜。将滤膜置于闪烁瓶中,每瓶加入闪烁液 3 mL,用液闪烁计数器测定放射性,结果以每分钟计数(CPM)值表示。细胞增殖率=实验组 CPM 值/对照组 CPM 值 $\times 100\%$ 。

1.2.3 $2 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 作用于 SHG44 细胞后细胞周期检测 细胞周期的检测采用流式细胞仪(FCM)分析,对照组和 $2 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 处理 72 h 的 SHG44 细胞,用胰酶消化,收集细胞,冷 PBS 洗 2 次,冷乙醇固定,次日用 PBS 洗 2 次,加终浓度为 $20 \mu\text{g/mL}$ 的 RNase,孵育 30 min 后,加 PI($10 \mu\text{g/mL}$)⁴℃避光染色 30 min,用 FCM 测定 DNA 含量,采用 CELLQest 软件进行细胞周期分析。

1.3 统计学处理 所有数据采用 SPSS13.0 统计软件进行分

△ 通讯作者, Tel:(0773)2882906; Email:liu.meilian@163.com。

析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因变量多因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线联合 As_2O_3 对 SHG44 细胞增殖率的影响 $2 \mu\text{mol/L As}_2\text{O}_3$ 与照射联合,观察 As_2O_3 对 SHG44 细胞放射敏感性的影响(表 1~3)。随照射剂量升高,细胞增殖率降低,其差异具有显著性,照射和 As_2O_3 联合组出现同样的变化趋势。 As_2O_3 作用于 SHG44 细胞后再行照射,其作用效果分别大于二者单独作用之和,具有协同作用,细胞的放射敏感性增强。同时以细胞增值率代表细胞的存活分数,绘制剂量存活曲线(图 1)显示, As_2O_3 和 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线联合作用组细胞剂量存活曲线左移。依据“多靶单击”模型,通过曲线估计和曲线拟合计算出主要参数,以 SF2 为 2 Gy 时细胞存活分数,D0 代表细胞的平均致死剂量或平均灭活剂量,Dq 为阈剂量,存活曲线肩部(Dq)的大小代表细胞积累亚致死性损伤的修复能力。结果显示 As_2O_3 对 SHG44 细胞作用后细胞 SF2 下降,D0 减低,Dq 变小,细胞的放射敏感性明显增强。见表 4。

表 1 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射对 SHG44 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	CPM 值	增殖率(%)
0 Gy 组	105 081.9 ± 4 960.4	100.00 ± 4.72
2 Gy 组	85 116.4 ± 3 857.6 [#]	81.00 ± 3.67 [#]
5 Gy 组	54 807.7 ± 4 063.6 [▽]	52.16 ± 3.87 [▽]
8 Gy 组	26 689.3 ± 4 155.3 [▼]	25.40 ± 3.95 [▼]
11 Gy 组	11 891.2 ± 1 811.8 [△]	11.32 ± 1.72 [△]
14 Gy 组	6 433.6 ± 253.8 [*]	6.12 ± 0.24 [*]

*: $P < 0.05$, 与 11 Gy 组比较; Δ : $P < 0.01$, 与 8 Gy 组比较; ∇ : $P < 0.01$, 与 5 Gy 组比较; ∇ : $P < 0.01$, 与 2 Gy 组比较; [#]: $P < 0.01$, 与 0 Gy 组比较。

表 2 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线联合 $2 \mu\text{mol/L As}_2\text{O}_3$ 对 SHG44 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	CPM 值	增殖率(%)
0 Gy 组	93 706.1 ± 3 704.4	89.17 ± 3.53
2 Gy 组	69 002.0 ± 3 054.0 [#]	65.67 ± 2.91 [#]
5 Gy 组	37 988.3 ± 4 905.7 [▽]	36.15 ± 4.67 [▽]
8 Gy 组	16 323.9 ± 2 751.5 [▼]	15.53 ± 2.62 [▼]
11 Gy 组	7 189.8 ± 357.4 [△]	6.84 ± 0.34 [△]
14 Gy 组	3 279.7 ± 767.0 [*]	3.12 ± 0.73 [*]

*: $P < 0.01$, 与 11 Gy 组比较; Δ : $P < 0.05$, 与 8 Gy 组比较; ∇ : $P < 0.01$, 与 5 Gy 组比较; ∇ : $P < 0.01$, 与 2 Gy 组比较; [#]: $P < 0.01$, 与 0 Gy 组比较。

表 3 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线、 As_2O_3 及其联合作用单因变量多因素方差分析结果(因变量:增值率)

偏差来源	偏差平方和	自由度	均方	均方差比	P 值
校正模型	6.875 ^a	11	0.625	627.291	0.000
截距	10.106	1	10.106	10 143.445	0.000
As_2O_3	0.148	1	0.148	148.090	0.000
照射	6.691	5	1.338	1 343.160	0.000

续表 3 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线、 As_2O_3 及其联合作用单因变量多因素方差分析结果(因变量:增值率)

偏差来源	偏差平方和	自由度	均方	均方差比	P 值
As_2O_3 联合照射	0.036	5	0.007	7.263	0.000
残差	0.048	48	0.001	—	—
偏差平方总和	17.028	60	—	—	—
校正总和	6.922	59	—	—	—

^a: 确定系数 = 0.993(调整后的确定系数 = 0.992); —: 此项无数据。

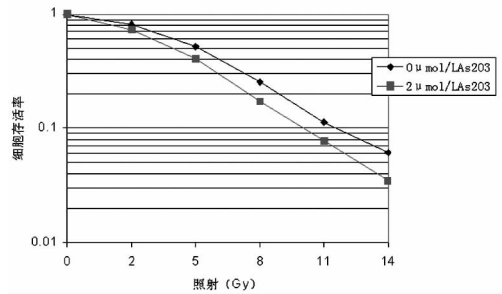


图 1 SHG44 细胞剂量效应曲线

表 4 SHG44 细胞照射后存活曲线的主要参数

药物剂量	SF2	D0(Gy)	Dq(Gy)
0 $\mu\text{mol/L As}_2\text{O}_3$	0.810 ± 0.037 [*]	4.108	2.258
2 $\mu\text{mol/L As}_2\text{O}_3$	0.736 ± 0.033	3.655	1.625

*: $P = 0.01$, 与 $2 \mu\text{mol/L As}_2\text{O}_3$ 比较

2.2 As_2O_3 对细胞周期的影响 As_2O_3 处理后放射敏感时相(G_2/M 期)细胞数明显高于对照组($P < 0.01$),放射抗拒时相(S期)细胞数目减少($P < 0.01$), $G_0 \sim G_1$ 期细胞数目较对照组无明显变化,见表 5。

表 5 As_2O_3 对 SHG44 细胞增殖周期的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	$G_0 \sim G_1$	S	G_2/M
对照组	0.692 ± 0.003	0.276 ± 0.007	0.031 ± 0.013
As_2O_3 处理组	0.689 ± 0.005 [*]	0.170 ± 0.006 [*]	0.144 ± 0.007 [*]

*: $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨 论

As_2O_3 与蛋白质氨基酸中的巯基具有强效的亲性和,可直接影响细胞内许多蛋白质的功能。 As_2O_3 注射液已成功用于治疗急性早幼粒细胞白血病^[3]。体外实验表明 As_2O_3 同时对多种实体瘤细胞均有杀伤作用,主要机制为诱导肿瘤细胞凋亡^[4-8]。同时国内外的流行病学调查和实验研究均表明, As_2O_3 对胃癌、结肠癌、肝癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌、白血病等多种肿瘤也均有明显抑制作用^[9-14]。也有研究表明 As_2O_3 对人宫颈癌 HeLa 细胞、口腔鳞状细胞癌等有明显的放射增敏作用^[15-16]。

本研究在前期 As_2O_3 对人脑胶质瘤 SHG44 细胞增殖的抑制作用研究的基础上,研究 As_2O_3 对人脑胶质瘤 SHG44 细胞放射增敏作用。实验表明, As_2O_3 与照射联合作用后,SHG44 细胞 D0 4.108 Gy 降低到 3.655 Gy,2 Gy 时细胞存活分数 SF2 自 0.810 降至 0.736,显示 $2 \mu\text{mol/L As}_2\text{O}_3$ 对人脑胶

质瘤 SHG44 细胞有明显的放射增敏效果。从图 1 可以看出, As_2O_3 能使细胞 Dq 变小, Dq 值下降, 由于 Dq 值代表细胞对射线亚致死损伤的修复能力, 故上述结果提示 As_2O_3 可能通过抑制 SHG44 细胞的修复能力而起放射增敏效应。从表 5 可见 As_2O_3 明显影响细胞周期再分布, $2 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 作用 72 h 后对射线敏感的 G_2/M 期细胞比例增加, 对射线抗拒的 S 期细胞比例减少, 表明细胞生长受阻于 G_2/M 期, 该期的细胞由于处在 RNA 合成和染色质螺旋化状态, 对外界刺激较敏感, 易受各种因素干扰, 提示诱导细胞周期再分布也可能是 As_2O_3 放射增敏作用机制。影响肿瘤细胞放射敏感性的因素主要有: (1)DNA 损伤修复水平; (2) 细胞周期不同时期; (3) 细胞放射敏感性相关的基因, 如 DNA 修复基因、p53 抑癌基因、bax 和 bcl-2 基因等^[17-18]; (4) 氧效应; (5) 谷胱甘肽含量, 谷胱甘肽是修复受损 DNA 所必需的巯基化合物^[19], 与肿瘤放射敏感性呈负相关, 可以直接清除由电离辐射引起的自由基, 减轻射线对肿瘤细胞的间接损伤。

本研究实验初步证明 As_2O_3 具有放射增敏作用, 其作用机制可能是: As_2O_3 本身即诱导细胞凋亡; As_2O_3 增高细胞内活性氧的水平, 促进了电离辐射的损伤效应。这将在以后的实验中继续研究。

参考文献:

[1] 张鹏, 王树叶, 胡龙虎, 等. 三氧化二砷注射液治疗 72 例急性早幼粒细胞白血病[J]. 中华血液学杂志, 1996, 17(2): 58-62.

[2] 楚建军, 苏燎原, 许昌韶, 等. SHG44 胶质瘤细胞放射敏感性的测定与实验方法的筛选研究[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2003, 23(4): 255-257.

[3] Zhang P, Wang S, Hu L, et al. Seven years' summary report on the treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide—an analysis of 242 cases[J]. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi, 2000, 21(2): 67-70.

[4] 曹娟, 郑杰. As_2O_3 诱导肿瘤细胞凋亡依赖 H_2O_2 途径[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(6): 1185-1190.

[5] Li Y, Qu X, Qu J, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis and G_2/M phase arrest by inducing Cbl to inhibit PI3K/Akt signaling and thereby regulate p53 activation [J]. Cancer Lett, 2009, 284(2): 208-215.

[6] 聂林, 余卫, 何冬梅, 等. 三氧化二砷对肝癌细胞 survivin 基因和端粒酶活性的影响[J]. 肿瘤, 2006, 26(12): 1064-1068.

[7] Doudican NA, Bowling B, Orlow SJ. Enhancement of arsenic trioxide cytotoxicity by dietary isothiocyanates in hu-

man leukemic cells via a reactive oxygen species-dependent mechanism[J]. Leuk Res, 2010, 34(2): 229-234.

[8] Cha Y, Park DW, Lee CH, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis in human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells through ROS[J]. Cancer Res Treat, 2006, 38(1): 54-60.

[9] 赵园园, 金锋, 梁军, 等. 三氧化二砷对人胃癌耐药细胞系 SGC7901/ADM 耐药逆转及凋亡诱导作用的探讨[J]. 中国肿瘤临床, 2005, 32(11): 611-613.

[10] 王南瑶, 刘琳, 邱少敏, 等. 三氧化二砷对人结肠癌裸鼠移植瘤端粒酶活性及其催化亚单位表达的影响[J]. 东南大学学报: 医学版, 2005, 24(3): 168-170.

[11] 阳东荣, 陈昭典, 单玉喜. 三氧化二砷对前列腺癌 PC-3 细胞生长及 survivin 基因表达的影响[J]. 实用肿瘤杂志, 2006, 21(1): 56-59.

[12] Endoh T, Tsuji N, Asanuma K, et al. Survivin enhances telomerase activity via up-regulation of specificity protein 1- and c-Myc-mediated human telomerase reverse transcriptase gene transcription[J]. Exp Cell Res, 2005, 305(2): 300-311.

[13] 姚茂金, 李洁, 方建珍, 等. 三氧化二砷诱导人膀胱癌 T24 细胞凋亡的实验研究[J]. 实用肿瘤杂志, 2007, 22(4): 332-335.

[14] 王涛, 马梁明, 张华屏, 等. 三氧化二砷联合丁硫氨酸亚砷胺诱导人白血病 K562/ADM 细胞凋亡[J]. 中华肿瘤杂志, 2008, 30(3): 188-190.

[15] 郭红, 吴荣, 迟峰, 等. 三氧化二砷对人宫颈癌 Hela 细胞系的放射增敏作用[J]. 实用肿瘤学杂志, 2007, 21(1): 21-22.

[16] Kumar P, Gao Q, Ning Y, et al. Arsenic trioxide enhances the therapeutic efficacy of radiation treatment of oral squamous carcinoma while protecting bone[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(7): 2060-2069.

[17] Ai Z, Lu W, Qin X. Arsenic trioxide induces gallbladder carcinoma cell apoptosis via downregulation of Bcl-2[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 348(3): 1075-1081.

[18] 张亚莉, 魏虎来, 孙利军. 三氧化二砷诱导 K562 /ADM 细胞凋亡过程中对 bcl-2, survivin, ROS 表达的影响[J]. 中国肿瘤, 2008, 17(6): 495-498.

[19] 王颖超, 曹励之, 张朝霞, 等. 三氧化二砷诱导 K562 细胞凋亡机制的研究[J]. 肿瘤防治杂志, 2005, 12(14): 1069-1071.

(收稿日期: 2011-06-09 修回日期: 2011-08-18)

(上接第 3476 页)

[10] Gunji H, Kurisaki E, Suto M, et al. Nitric oxide synthase expressions in mice skeletal muscle subjected to ischemia/reperfusion injury[J]. Leg Med (Tokyo), 2003, 5 Suppl 1: S217-220.

[11] Tremblay J, Chen H, Peng J, et al. Renal ischemia-reper-

fusion injury in the rat is prevented by a novel immune modulation therapy[J]. Transplantation, 2002, 74(10): 1425-1433.

(收稿日期: 2011-03-09 修回日期: 2011-07-12)