

热疗联合放化疗对人肺腺癌耐药细胞株 A549/DDP 的协同杀伤作用

陈雪琴 马胜林 牟翰舟 冯建国 潘月龙

【摘要】 目的 观察热疗联合放化疗对人肺腺癌耐药细胞株 A549/DDP 的协同杀伤作用,为临床上应用热放疗和热化放疗联合治疗非小细胞肺癌提供实验依据。方法 采用 CCK-8 法和克隆形成实验检测热放疗或热放化疗对 A549/DDP 细胞抑制率和克隆形成率的影响;采用流式细胞仪检测热放疗或热放化疗联合作用后 A549/DDP 细胞的凋亡现象;采用光镜和透射电镜观察细胞形态学改变。结果 热放疗尤其是热放化疗联合对 A549/DDP 细胞有明显抑制作用($P < 0.01$);流式细胞仪显示热放疗或热放化疗有诱导 A549/DDP 细胞凋亡作用($P < 0.01$);电子显微镜观察到细胞核固缩、变形,染色质浓聚、边集等凋亡现象。结论 热放疗或热放化疗能诱导 A549/DDP 细胞凋亡。

【关键词】 高温; 放射疗法; 肺肿瘤; 抗药性

The synergistic effects of hyperthermia combined with radiochemotherapy on multidrug-resistant human lung adenocarcinoma cell line A549/DDP CHEN Xue-qin*, MA Sheng-lin, MOU Han-zhou, FENG Jian-guo, PAN Yue-long. * Department of Oncology, Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou 310066, China
Corresponding author: MA Sheng-lin, Email: mashenglin@medmail.com.cn

【Abstract】 Objective To observe the synergistic effects of hyperthermia and radiochemotherapy on multidrug-resistant human lung adenocarcinoma cell line A549/DDP. **Methods** The multidrug-resistant human lung adenocarcinoma cell line A549/DDP was cultivated and then subject to thermoradiotherapy or thermoradiotherapy in combination with chemotherapy. The A549/DDP cell inhibition ratio and clone formation rate were monitored with CCK-8 assay and clone formation experiment. Flow cytometry was used to detect the A549/DDP apoptosis phenomenon. Light microscope and transmission electron microscope were used for morphologic observation of the cells. **Results** Thermoradiotherapy especially hyperthermo-chemo-radiotherapy inhibited A549/DDP cell proliferation. Flow cytometry showed thermoradiotherapy combining with or without chemotherapy could induce A549/DDP apoptosis. Electron microscopy demonstrated features of apoptosis, such as karyopyknosis, deformation, karyorrhexis and chromatin accumulation and aggregation. **Conclusion** Thermoradiotherapy and hyperthermo-chemo-radiotherapy could induce A549/DDP apoptosis.

【Key words】 Hyperthermia; Radiotherapy; Lung neoplasms; Drug resistance

肺癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,其发病隐匿,约有 2/3 患者确诊时已失去手术机会,故全身化疗和局部放疗是目前大多数肺癌患者的主要治疗手段。即使采用最佳的综合治疗,非小细胞肺癌(nonsmall-cell lung cancer, NSCLC)5 年生存率也只有 15% 左右,75% 晚期 NSCLC 患者的中位生存期只有 10 个月,故如何提高治疗效果仍是我们的研究目标。近年来热疗因其安全有效而逐渐成为继手术、放疗、化疗、生物治疗后的又一种抗肿瘤手段,而且正逐渐应用于肿瘤患者的综合治疗中。热疗可以通过直接细胞毒作用、细胞凋亡效应、激发免疫反应、改变肿瘤内微循环等多方面机制起杀伤

肿瘤细胞的作用^[1]。我们以人肺腺癌耐药细胞株 A549/DDP^[2]为对象,观察热疗联合放化疗对该耐药细胞株的协同杀伤作用,为临床综合治疗提供依据。

材料与方 法

一、材料

人肺腺癌耐药细胞株 A549/DDP,重庆第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所建立^[2];人肺腺癌亲代细胞株 A549,浙江省肿瘤医院肿瘤研究所保存。顺铂(cisplatin, DDP)为云南个旧生物制药有限公司产品(批号:050101),CCK-8 试剂为日本同仁化研究所产品。上海精宏实验设备有限公司产电热恒温水槽,美国 BD 公司产 FACS 流式细胞仪,Olympus 倒置显微镜,TECNA10 透射电子显微镜,加拿大 Theratron 780C 型⁶⁰Co 远距离治疗机。

基金项目:2007 年杭州市医药卫生科技计划重点项目(2007Z002)

作者单位:310066 杭州,浙江省杭州市第一人民医院肿瘤科(陈雪琴、潘月龙);浙江省肿瘤医院肿瘤研究所(马胜林、牟翰舟、冯建国)

通讯作者:马胜林,Email:mashenglin@medmail.com.cn

二、方法

(一) 细胞培养及热疗、放疗方法

将 A549/DDP 细胞置于含 15% 无支原体灭活小牛血清 RPMI-1640 培养液中, 在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度孵育箱中培养, 用 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% 二乙烯四乙酸二钠 (EDTA) 消化传代。热疗采用水浴加热法, 将电热恒温水槽温度调至 42℃ 稳定 1 昼夜, 次日将细胞培养瓶瓶口密封后浸没于水中; 放疗采用 ⁶⁰Co γ 射线, 剂量为 400 cGy, 照射野为 20 cm × 20 cm, 剂量率为 15.57 cGy/min, 时间为 3.46 min。

(二) 实验分组

取对数生长期细胞, 接种 7.5×10^4 (对照组) 或 15×10^4 (治疗组) 个细胞于 25 ml 的培养瓶中, 培养 24 h, 待细胞贴壁后再分为 4 组。对照组 (C 组): 未经处理的 A549/DDP 细胞; 放疗组 (R 组): 经 400 cGy ⁶⁰Co γ 射线照射的 A549/DDP 细胞; 热疗 + 放疗组 (H + R 组): 经 42℃ 作用 1 h, 37℃ 培养 12 ~ 24 h 后, 用 400 cGy ⁶⁰Co γ 射线照射的 A549/DDP 细胞; 热疗 + 顺铂 + 放疗组 (H + P + R 组): 1.5 μg/ml 的顺铂作用 24 h, 药物作用 23 ~ 24 h 同时给予 42℃ 热疗, 再 37℃ 培养 12 ~ 24 h 后, 用 400 cGy ⁶⁰Co γ 射线照射的 A549/DDP 细胞。经上述处理的细胞继续培养 48 h 或 72 h 备用。

(三) CCK-8 法检测细胞抑制率

收集上述处理过的各组细胞, 用 5 ml 新鲜培养液稀释并充分吹打混匀, 吸取 100 μl 细胞悬液至 96 空板, 每组重复 6 个孔, 并设无细胞空白对照孔, 培养 72 h 后, 加入 CCK-8 溶液 10 μl, 3 h 后采用全自动酶标仪 (450 nm 波长) 测各孔吸光度 OD 值, 抑制率 = (对照孔 OD 值 - 实验孔 OD 值) / 对照孔 OD 值 × 100%。

(四) 克隆形成实验

收集上述处理过的各组细胞, 用新鲜 RPMI-1640 培养液稀释, 充分吹打混匀并计数, 对照组取 100 个细胞, 治疗组取 1000 个细胞, 接种 6 空板, 重复 4 个孔, CO₂ 孵育箱中培养 10 d 后, PBS 洗 2 遍后, 每孔用 2 ml 甲醇固定 15 min, 弃去固定液, 加适量结晶紫染色, 半小时后用 PBS 洗 2 遍, 空气中自然干燥, 次日光镜下计克隆数, 计算克隆形成率。克隆形成率 = (克隆数 / 接种的细胞数) × 100%。

(五) 用流式细胞仪 (flow cytometry, FCM) 分析各组 A549/DDP 细胞周期分布及凋亡比例 (apoptotic rate)

将上述处理过的各组细胞分别取 6 ~ 8 瓶再培养 48 h 或 72 h 后, 收集细胞, 用 PBS 缓冲液清洗 3 遍, 用 75% 预冷酒精固定, 并充分振荡混匀, 置 4℃ 冰箱中过夜, 常规 PI 染色, FCM 测定细胞 DNA 含量, 采用专用软件计算各期细胞百分比及细胞凋亡比例。

(六) 光学显微镜和透射电子显微镜观察细胞形

态改变

将上述处理过的各组细胞再培养 72 h 后, 光镜观察形态改变。收集每组细胞各 2 瓶, PBS 冲洗后, 依次用 2.5% 戊二醛固定过夜, 1% 锇酸固定 1 h, 再 PBS 冲洗 15 min 3 次, 4% 醋酸铀水溶液染色 30 min, 50%、70% 和 90% 乙醇依次脱水, 各 15 min, 100% 乙醇脱水 20 min, 100% 丙酮脱水 20 min 2 次, 再用无水丙酮与包埋剂按 1:1 体积混合渗透细胞, 并振荡 2 h, 然后用纯包埋剂渗透, 振荡 2 h, 包埋, 并置于烘箱内聚合, 37℃ 24 h, 45℃ 24 h, 60℃ 48 h。超薄切片 (约 120 nm), 4% 醋酸铀染色 20 min, 枸橼酸铅染色 5 min。再高压 80 kV 透射电镜下观察。

三、统计学分析

应用 SPSS 11.0 版统计软件, 计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 在检验方差齐性的条件下, 多个治疗组间采用方差分析法 (F 检验), 均数间两两比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、CCK-8 法检测细胞抑制率

H + P + R 组和 H + R 组 A549/DDP 细胞 OD 值明显低于 C 组和 R 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); H + P + R 组细胞 OD 值也明显低于 H + R 组, 差异也有统计学意义 ($P < 0.01$); R 组、H + R 组和 H + P + R 组细胞抑制率分别为 54.23%、68.92% 和 77.24% (表 1)。

二、各组细胞克隆形成率比较

H + R 组和 H + P + R 组克隆形成率明显低于 C 组和 R 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 但 H + R 组和 H + P + R 组之间差异无统计学意义 (表 1)。

表 1 各组 A549/DDP 细胞抑制率及克隆形成率比较

组 别	OD 值 ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)	克隆形成率 ($\bar{x} \pm s, \%$)
C 组	1.652 ± 0.168	-	25.33 ± 2.16
R 组	0.756 ± 0.053	54.26	4.85 ± 0.30
H + R 组	0.513 ± 0.020 ^a	68.92	1.85 ± 0.24 ^a
H + P + R 组	0.376 ± 0.034 ^{ab}	77.24	0.48 ± 0.13 ^a

注: 与 C 组、R 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 H + R 组比较, ^b $P < 0.01$

三、FCM 分析各组细胞周期分布及凋亡比例

FCM 检测发现 R 组 A549/DDP 细胞与 C 组相比, G₁ 期细胞有增高趋势, 且伴随 S 期、G₂/M 期细胞下降, 并随着时间延长也无明显改变, 只有少量细胞凋亡。H + R 组和 H + P + R 组与 C 组相比, 细胞周期改变并不明显, 但细胞凋亡明显; 48 h 后 H + R 组和 H + P + R 组细胞凋亡率明显高于 C 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (表 2 和图 1)。72 h 后 H + R 组和 H + P + R 组细胞凋亡率又继续升高, 也明显高于 C 组和 R 组, 差异也有统计学意义 ($P < 0.01$) (表 3 和图 2)。且 48、72 h 后

H + P + R 组凋亡率也高于 H + R 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。可见, 热疗或热化疗能明显增强人肺腺癌耐药细胞 A549/DDP 对放射的敏感性。

表 2 各组细胞处理后 48 h 细胞周期分布及凋亡比例 (%) , $\bar{x} \pm s$

组别	细胞周期分布			凋亡比例
	G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期	
C 组	70.77 ± 2.16	22.88 ± 1.37	6.35 ± 0.91	0.16 ± 0.10
R 组	89.42 ± 1.46	7.94 ± 1.66	2.65 ± 0.20	3.18 ± 0.80
H + R 组	79.99 ± 2.02	15.25 ± 1.98	4.76 ± 0.93	15.55 ± 1.38 ^a
P + H + R 组	73.36 ± 7.80	17.18 ± 2.06	9.46 ± 4.82	24.70 ± 5.49 ^{ab}

注: 与 C 组、R 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 H + R 组比较, ^b $P < 0.01$

表 3 各组细胞处理后 72 h 细胞周期分布及凋亡比例 (%) , $\bar{x} \pm s$

组别	细胞周期分布			凋亡比例
	G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期	
C 组	84.40 ± 1.45	12.45 ± 1.12	3.15 ± 0.49	1.00 ± 0.79
R 组	89.98 ± 2.19	8.70 ± 1.90	1.32 ± 0.33	3.11 ± 1.93
H + R 组	81.24 ± 3.61	16.05 ± 3.56	2.71 ± 0.75	19.85 ± 2.07 ^a
P + H + R 组	72.61 ± 3.86	17.38 ± 5.48	9.90 ± 6.58	35.36 ± 9.14 ^{ab}

注: 与 C 组、R 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 H + R 组比较, ^b $P < 0.01$

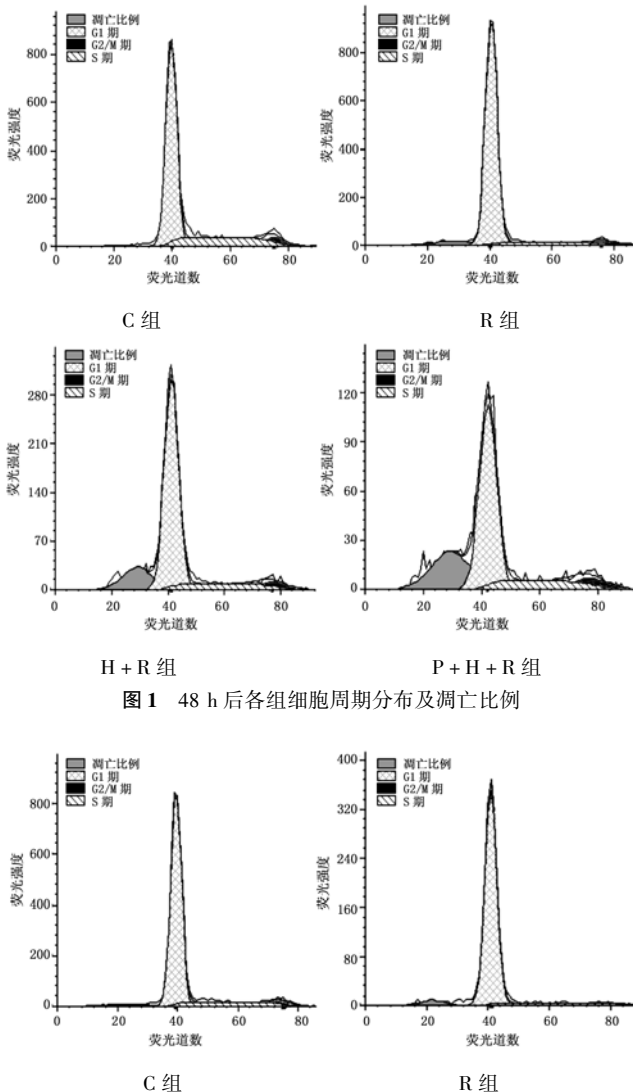


图 1 48 h 后各组细胞周期分布及凋亡比例

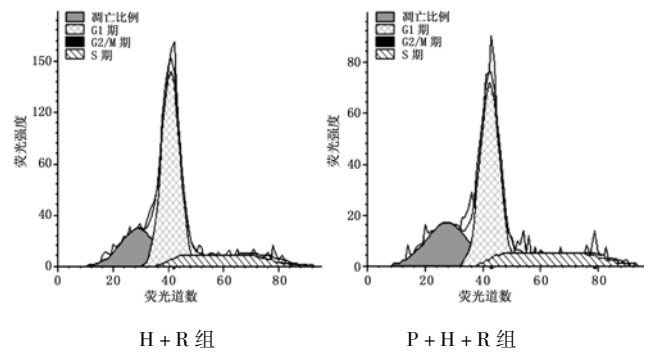


图 2 72 h 后各组细胞周期分布及凋亡比例

四、光学显微镜和透射电子显微镜观察细胞形态改变

细胞经处理后 72 h, 倒置显微镜观察到 C 组细胞贴壁, 呈圆形、三角形或多边形, 透亮; R 组细胞稍肿胀, 胞浆可见少量颗粒; H + R 组和 P + H + R 组细胞肿胀更为明显, 细胞生长慢, 甚至脱落悬浮, 贴壁明显减少, 细胞形态改变, 呈梭形, 胞浆浑浊, 颗粒多。透射电镜显示 C 组细胞形态较大, 胞核大, 细胞器少, 染色质无浓缩和边集, 无明显空泡化; R 组细胞肿胀明显, 胞膜结构保持完整, 细胞器、胞核固缩; H + R 组细胞肿胀更明显, 胞膜结构保持完整, 胞浆空泡化明显, 胞核固缩、变形, 染色质浓缩边集; P + H + R 组细胞肿胀, 胞核固缩、碎裂表现为新月形胞核, 染色质浓缩边集, 细胞表面有较多浓缩的胞质突起, 细胞即将裂解 (图 3)。

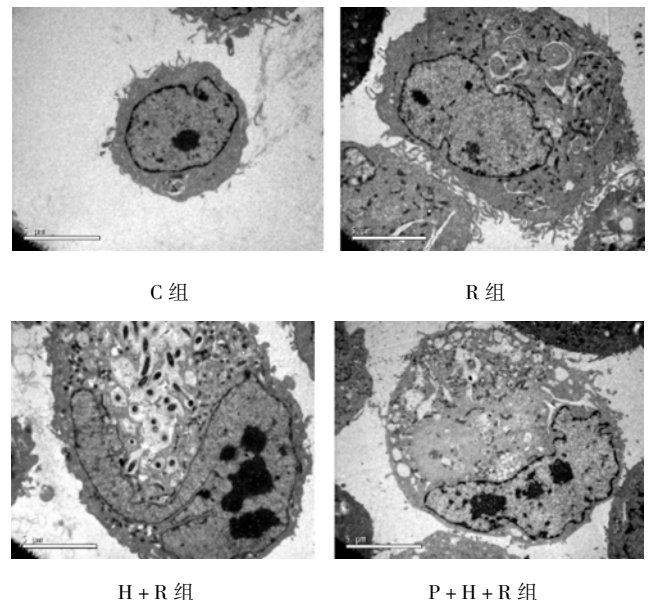


图 3 透射电镜观察各组细胞形态学改变 (锇酸醋酸铀双染色, ×3 700)

讨 论

放疗是治疗 NSCLC 的主要手段之一, 对于不能手

术切除的局部晚期(Ⅲ期)NSCLC 和已经播散的Ⅳ期 NSCLC 患者,应用放射治疗加或不加化学治疗均可达到一定的预期疗效。如何提高 NSCLC 放射治疗的效果,仍成为人们研究的重要目标。

许多基础实验和临床试验都证实,热放疗联合可以明显提高细胞毒作用,但其作用机制复杂,目前仍不太清楚。热疗可以杀伤对放疗不敏感的处在缺氧、营养缺乏、低 pH 值和 S 期环境中的细胞,阻止细胞损伤后的修复。加热可以改变血流,增强血管通透性和肿瘤新陈代谢及氧合作用,从而提高放疗的有效性^[3]。热疗还通过改变细胞信号传导途径,调节细胞周期关卡、DNA 复制点,激活转录因子等,从而降低肿瘤对放射线的抵抗^[4]。激活蛋白-1(activator protein, AP-1)和核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是细胞内的重要转录因子,其信号转导通路的活化参与细胞癌变、增殖、凋亡等多种生物学效应,在肿瘤细胞的运动、异常黏附及转移灶新生血管生长等多个侵袭转移的环节中也发挥重要作用。热休克可以诱导转录因子 AP-1 改变 DNA 黏合活性,抑制放射线引起的凋亡拮抗因子 NF- κ B 的活性,调节细胞内氧化还原反应而发挥两者协同作用^[5]。

细胞周期中有两个主要的调控点,一个位于 $G_1 \rightarrow S$ 转折点,控制细胞从生长前期(G_1 期)进入 DNA 合成期(S 期);另一个位于 $G_2 \rightarrow M$ 期转折点,是决定细胞一分为二的控制点。细胞正常通过 G_2/M 期时需要 Cdc2(脊椎动物中的 Cdk1)与 cyclin B 构成复合体,任何影响 Cdc2 与 cyclin B 的因素都将干扰 G_2/M 期的正常转换。在外界应激条件下,常诱导 DNA 损伤而出现 G_2/M 期阻滞,以利于一部分 DNA 得到修复;若产生不可逆的细胞周期阻滞,细胞即走向凋亡或坏死。热疗能使 Bax 从细胞浆移向细胞核,使胞浆 Bax/Bcl-2 异二聚体减少,从而诱导 G_2/M 期细胞短暂的积聚^[6]。Zolzer 等^[7]报道加热或联合放疗可以诱导细胞 G_2/M 期阻滞,而且长达 48 h。Lim 等^[8]报道,5~15 min 的 45℃ 热疗能引起人早幼粒白血病细胞 HL-60 G_2/M 期聚集,而且热疗后 5~20 min 即出现 G_2/M 期阻滞,若长时间高温作用反而这种现象不明显。本实验前期部分^[9]已证实热疗尤其是热化疗能诱导 A549/DDP 细胞停滞于 G_2/M 期,而且预实验也表明热疗结束后

12~24 h 阻滞作用最明显, G_2/M 期细胞最多,而 G_2 、M 期细胞对放射线最敏感。故笔者在热疗后对处于修复期间停滞于 G_2/M 期的细胞 4Gy 的照射,即导致细胞凋亡,降低细胞存活率,增加杀伤效果。细胞抑制实验表明热放化疗、热放疗对细胞的抑制率明显高于单独放疗组。克隆形成实验也证实 H+R 组和 H+P+R 组克隆形成率明显低于 C 组和 R 组,具有显著性差异($P < 0.01$)。流式细胞仪分析表明 H+R 组和 H+P+R 组在 G_1 峰前有 sub- G_1 峰,即由带有 DNA 降解的凋亡细胞组成;电子显微镜也观察到细胞核固缩、变形,染色质浓聚、边集等凋亡现象。通过本实验已证实热放疗联合有诱导细胞凋亡作用,而且热放化疗三者联合更明显。热疗或热化疗诱导细胞停滞于对放射线敏感的 G_2/M 期,从而增加放疗的敏感性;但相关的分子机制复杂,有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 陈雪琴,马胜林. 肿瘤热疗作用机制研究进展. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27: 562-564.
- [2] 陈杰,白春学,钱桂生,等. A549/DDP 多药耐药细胞系的建立. 中国癌症杂志, 2003, 13: 186-187.
- [3] Vujaskovic Z, Song CW. Physiological mechanisms underlying heat-induced radiosensitization. Int J Hyperthermia, 2004, 20: 163-174.
- [4] Roti JL. Introduction; radiosensitization by hyperthermia. Int J Hyperthermia, 2002, 20: 109-114.
- [5] Mattson D, Bradbury CM, Brisht KS, et al. Heat shock and the activation of AP-1 and inhibition of NF- κ B DNA-binding activity: possible role of intracellular redox status. Int J Radiat Biol, 2004, 20: 224-233.
- [6] Salah-Eldin AE, Inoue S, Tsukamoto S, et al. An association of Bcl-2 phosphorylation and Bax localization with their functions after hyperthermia and paclitaxel treatment. Int J Cancer, 2003, 103: 53-60.
- [7] Zolzer F, Streffer C. G_2 -phase delays after irradiation and/or heat treatment as assessed by two-parameter flow cytometry. Radiat Res, 2001, 155: 50-56.
- [8] Lim CU, Zhang Y, Fox MH. Cell cycle dependent apoptosis and cell cycle blocks induced by hyperthermia in HL-60 cells. Int J Hyperthermia, 2006, 22: 77-91.
- [9] 陈雪琴,马胜林,牟翰舟,等. 热化疗联合对人肺腺癌耐药细胞株 A549/DDP 作用及其机制的实验研究. 浙江临床医学, 2007, 9: 157-158.

(修回日期:2007-12-12)

(本文编辑:熊芝兰)

欢迎订阅《中华物理医学与康复杂志》