

gainst carbon tetrachloride-induced hepatic injury in mice[J]. Pharm Biol,2010,48(2):231-233.

6 沈钦海,马臻,陈国民. 木芙蓉对四氯化碳大鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 现代医药卫生,2006,22(5):636-637.

7 Yang W,Wang X,Wang M. Protective effect of baicalin against carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in mice[J]. J Pharmacol Sci,2008,106(1):136-143.

8 许金鹏,张慧慧,李朝品,等. 原叶啉钠对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用及其机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):169-172.

9 顾新,董丽萍,刘宇宸. 异甘草酸镁对急性四氯化碳肝损伤小鼠保护作用的研究[J]. 中国药师,2009,12(1):37-39.

[收稿日期 2012-08-10][本文编辑 刘京虹 吕文娟]

课题研究·论著

采用反复照射方法建立放射抗拒性鼻咽癌细胞系亚株

彭露杏, 陈甲信, 程金建, 刘斐, 焦伟, 庞强, 冯国生, 李善观, 莫晓云, 伍欣星

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(编号:桂科青 0542041)

作者单位: 530021 南宁,广西壮族自治区人民医院临床肿瘤中心放疗科(彭露杏,陈甲信,程金建,庞强,冯国生,李善观),科研实验中心(刘斐,焦伟,莫晓云); 430071 湖北,武汉大学医学院病毒学研究所分子病毒学研究室(伍欣星)

作者简介: 彭露杏(1975-),女,在职研究生,医学学士,主治医师,研究方向:肿瘤放射敏感性。E-mailluxingpeng@yahoo.com.cn

[摘要] 目的 为成功建立放射抗拒性鼻咽癌细胞系亚株,并探讨鼻咽癌放射抗拒机理。方法 采用类似临床放疗的照射模式反复照射从人鼻咽癌细胞系 CNE-3 中分离出具有放射抗拒性的新细胞系亚株。结果 采用类似临床放疗的照射模式反复照射分离出具有放射抗拒性的新细胞系亚株 CNE-3R,,其在传代 3 个月 后仍表现出较稳定的放射抗拒性,其 SF₂ 值均 >0.5。结论 采用该研究方法能成功建立放射抗拒性鼻咽癌细胞系亚株,为研究鼻咽癌放射抗拒机理提供了必要的工具。

[关键词] 反复照射; 鼻咽癌; 放射抗拒性; 细胞系亚株

[中图分类号] R 739.62 [文献标识码] A [文章编号] 1674-3806(2012)12-1107-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2012.12.03

Establishment of radioresistant subline from human nasopharyngeal carcinoma cell line by repeating irradiation PENG Lu-xing, CHEN Jia-xin, CHENG Jin-jian, et al. Department of Radiotherapy, Center of Clinical Oncology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To establish radioresistant cell subline from a human nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-3 and investigate the mechanism of radioresistance. **Methods** Radioresistant cell subline were established from a human nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-3 by repeating X-ray irradiation as radiotherapy. The radiosensitivity of this subline, together with its parent CNE-3 cell line, were measured. **Results** This subline, named CNE-3R could be subcultured steadily three months, and kept SF₂ > 0.5. **Conclusion** Radioresistant cell subline from a human nasopharyngeal carcinoma cell line successfully was established by using the method of research, which providing the tools for the study of the mechanism of radioresistance.

[Key words] Repeating irradiation; Nasopharyngeal carcinoma; Radioresistance; Cell subline

放疗是治疗鼻咽癌的主要手段。近年来鼻咽癌放疗方法和手段虽然已有较大的发展,但仍有不少患者放疗效果不理想,这可能与肿瘤中存在或放疗过程中出现对射线抗拒的细胞成分有关^[1]。我们用类似临床放疗模式反复照射的方法从人鼻咽癌细胞系 CNE-3 中获得稳定的具有放射抗拒性的新细胞系亚株,为今后研究鼻咽癌放射抗拒机理,寻找预测个体肿瘤放射敏感性的方法提供了实验样品。

1 材料与方法

1.1 仪器(试剂) 10% 小牛血清、链霉素、青霉素

培养基、CO₂ 孵化箱、生长期的标本 CNE-3 细胞、流式细胞仪。

1.2 方法

1.2.1 常规细胞培养 采用含 10% 小牛血清、100 g/ml 链霉素、100 IU/ml 青霉素的 1640 培养基,在 37 ℃ 饱和湿度为 5% 的 CO₂ 孵化箱中培养。

1.2.2 照射方法 采用 Siemens 直线加速器,6 MV X 射线照射,照射野 10 cm × 10 cm,源皮距 100 cm,吸收剂量率为 200 cGy/min,培养瓶上覆盖 1.5 cm 厚的补偿块。

1.2.3 CNE-3 放射抗拒细胞系亚株的建立 取指数生长期的亲本 CNE-3 细胞 15 瓶,分成 5 个照射组,每个照射组 3 瓶,各照射组总剂量分别为 14、16、18、20、22 Gy。每次照射 3 个培养瓶,把培养瓶置于照射野中心,每天照射 1 次,2 Gy/次,照射后再传代 20 d,照射剂量最高者为照射存活后代细胞。将该照射存活后代细胞继续照射,每天照射 1 次,2 Gy/次。最终照射剂量为 30 Gy,照射后再稳定传代 20 d,将该放射抗拒细胞命名为 CNE-3R。

1.2.4 CNE-3R 放射抗拒亚株的验证 将照射存活的后代细胞 CNE-3R 和亲本的 CNE-3 细胞各分为 6 组,每组有 3 个样品,其中 1 组为对照组,其余 5 组分别照射 1、2、4、6、8 Gy 共 5 个剂量后,计算各组的细胞存活分数,按多靶单击模型在电脑上拟合,绘制出剂量存活关系曲线,求出 D₀、Dq、N 和 SF₂ 值,进行放射敏感性差异分析。N 为外推数,大小与存活曲线的肩区宽窄有关;D₀ 是曲线终斜率的倒数,它是在每个细胞引起一次致死事件所需的平均致死量;Dq 是准阈值量,也是代表存活曲线肩宽的另一参数;SF₂ 为照射 2 Gy 后的存活分数,SF₂ > 0.5 提示具有放射抗拒性^[2]。

1.2.5 放射抗拒的稳定性验证 将放射抗拒亚株细胞在不再照射的情况下连续传代 3 个月,取 3 瓶指数生长期细胞再用原方法照射,检测其是否保持放射抗拒性。

1.2.6 细胞周期测定 取对数生长期的 CNE-3、CNE-3R 细胞各 10 瓶,其中每种细胞 2 瓶作为对照,另 8 瓶照射 2 Gy,分别于照射后 8、12、24、48 h 收集细胞,经消化、吹打成单个细胞悬液,PBS 溶液洗涤

2 次,乙醇固定,RNA 酶消化,PI (Sigma) 染液 4 ℃ 避光染色 30 min 后,用流式细胞仪 (BD FACS Calibur 型) 进行细胞周期检测。

1.3 统计学方法 应用 SigmaPlot 10.0 软件进行多靶单击模型拟合细胞存活曲线绘制,计算细胞放射生物学参数 N、D₀、Dq、SF₂ 值并进行曲线拟合优度比较和拟合曲线的统计学分析,P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 放射抗拒细胞亚株 CNE-3R 与 CNE-3 形态学差异 在 5 ×、10 × 低倍相差显微镜下可见 CNE-3R 与 CNE-3 两种细胞形态相似,呈单层、多边形贴壁生长。但在 20 × 倍以上镜下观察 CNE-3R 细胞核小,细胞质颗粒密集;而 CNE-3 细胞质透明,核中染色体折光性强。

2.2 放射抗拒细胞亚株 CNE-3R 与 CNE-3 放射敏感性差异 CNE-3R 细胞经 1、2、4、6、8 Gy 照射的存活分数分别为 0.895、0.772、0.374、0.194、0.089;CNE-3 细胞的分数分别为 0.798、0.302、0.188、0.028、0.018;传代 3 个月后 CNE-3R 细胞经 1、2、4、6、8 Gy 照射的存活分数分别为 0.787、0.558、0.335、0.184、0.072。其分别拟合的细胞存活曲线见图 1,从曲线模型计算的放射生物学参数见表 1。结果表明 CNE-3R 及传代 3 个月后细胞照射后的 SF₂ 值均 > 0.5,说明该细胞株具有较稳定的放射抗拒性。

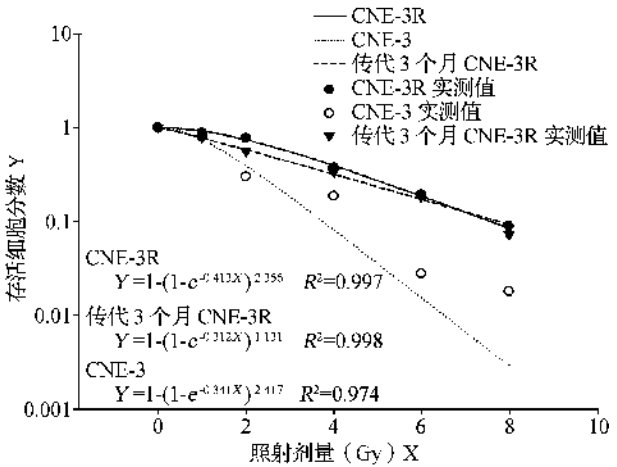


图 1 CNE-3R 及 CNE-3 的多靶单击模型细胞存活曲线

表 1 CNE-3 与 CNE-3R 细胞存活曲线多靶单击模型参数

菌 珠	k	N	D ₀	Dq	SF ₂	R ²	F	P
CNE-3R	0.413	2.356	2.421	2.074	0.742	0.997	1411.39	<0.0001
传代 3 个月后 CNE-3R	0.312	1.131	3.205	0.395	0.580	0.998	1708.15	<0.0001
CNE-3	0.841	2.417	1.189	1.049	0.391	0.974	147.15	<0.001

注:K 为曲线的斜率,R² 为决定系数

2.3 CNE-3R 细胞周期分布情况 CNE-3R 细胞 G_1 、S 和 G_2/M 期比例分别为 50.3%、42.3% 和 7.4%；CNE-3 细胞 G_1 、S 和 G_2/M 期比例分别为 58.7%、36.1% 和 5.2%。CNE-3R 细胞 S 期比例略高于 CNE-3。CNE-3 及 CNE-3R 细胞经 2 Gy X 线照射后 8~12 h 均表现为 G_2 期阻滞,24~48 h 后都有明显 G_1 期阻滞,但 CNE-3R 细胞 G_1 期阻滞时间较长,恢复较慢。放射抗拒亚系与其亲本照射后细胞周期变化的趋势大体一致,但程度上有些差别。

3 讨论

在鼻咽癌放疗中放射抗拒是影响治疗效果的重要因素,阐明其机制就能设计出有针对性的治疗方案,提高治疗效果。目前认为导致肿瘤细胞内在放射敏感性差异的主要原因可分为以下两种情况:一是肿瘤存在明显放射敏感异质性,也就是说,肿瘤放疗治疗前便存在放射抗拒的亚群,造成放射抗拒;二是肿瘤细胞在放射治疗中发生遗传物质的改变,如基因突变等造成错配修复系统,DNA 双连断裂修复系统等的改变,形成放射适应,产生放射抗拒^[3]。有研究表明辐射可诱发遗传不稳定性,这种不稳定性可以由父代传递给其子代,并在子代表现出来,其表型涉及到放射敏感性等领域^[4~6]。亦有研究认为鼻咽癌放射敏感性是多基因参与表达改变的结果,肿瘤放射敏感性与多种因素相关^[7]。本研究通过类似临床的大剂量 X 线间歇性反复照射人鼻咽癌细胞系 CNE-3 的方法,诱导出放射抗拒的 CNE-3R 细胞株,并且在常规传代 3 个月后仍保持较高的放射抗拒性,说明一部分癌细胞在放疗过程中会形成放射适应,产生放射抗拒。然而,既然在接触射线前肿瘤细胞中有可能就已存在放射抗拒亚群,那么用类似临床放疗的大剂量 X 线照射的方法建立的放射抗拒细胞系亚株究竟是肿瘤细胞在放疗过程中由于基因突变所形成新的具有放射抗拒性细胞亚株,还是在放射前就已存在放疗中对放射敏感的细胞被杀灭后所剩余的具有放射抗拒的细胞株,这还需要从形态学及分子生物学进一步研究才能加以区分。关于癌细胞放射敏感性与细胞周期时相效应的关系,有研究发现鼻咽癌细胞照射后,无明显 G_1 期阻滞,照射剂量为 2 Gy 时,未发现 S 期阻滞,而在 4 Gy 12 h、8 Gy 6 h 和 12 Gy 6 h 出现短暂 S 期阻滞,有明显的 G_2/M 期阻滞,具有照射剂量和时间依赖性,认

为 G_2/M 期阻滞可作为预测鼻咽癌细胞放射敏感性的指标^[8]。但本次研究通过实验-对照研究发现放射抗拒亚系及其亲本照射后细胞周期变化的趋势大体一致,仅是程度上有些差别而已,未能证明细胞放射敏感性与细胞周期时相效应的关系。因此认为要把 G_2/M 期阻滞作为预测鼻咽癌细胞放射敏感性的指标,还需更多的研究才能加以确定。由于鼻咽癌放射抗拒的形成机理相当复杂,本研究通过类似临床放疗的大剂量 X 线间歇性反复照射的方法分离出具有放射抗拒性的鼻咽癌细胞亚株,将为放射敏感性预测及放疗增敏等研究提供有用的依据。本研究采用多靶单击模型来进行细胞存活分数曲线的拟合,三条曲线的决定系数 R^2 均很大,而且三个曲线模型方差分析结果显示,差异均有统计学意义($P < 0.001 \sim < 0.0001$),说明该数学模型非常适用于鼻咽癌细胞照射后细胞存活曲线的研究。

参考文献

- 1 Pearce AG, Segum TM, Rintala AC, et al. The generation and characterization of a radiation-resistant model system to study radioresistance in human breast cancer cells[J]. *Radiat Res*, 2001, 156(6): 739 - 750.
- 2 谷铎之名誉主编;殷蔚伯,余子豪,徐国镇,等主编. 肿瘤放射治疗学[M]. 第 4 版. 北京:中国协和医科大学出版社,2007:235 - 237.
- 3 Wouters BG, Skarsgard LD. Low-dose radiation sensitivity and induced radioresistance to cell killing in HT-29 cells is distinct from the "adaptive response" and can not be explained by a subpopulation of sensitive cells[J]. *Radiat Res*, 1997, 148(5): 435 - 442.
- 4 石卫民,范义湘,陈龙华. 两株人肝癌细胞放射敏感性的体外研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2001, 11(9): 6 - 7.
- 5 Joiner MC, Lambin P, Malaise EP, et al. Hypersensitivity to very-low single radiation doses: its relationship to the adaptive response and induced radioresistance[J]. *Mutat Res*, 1996, 358(2): 171 - 183.
- 6 Venkat S, Chaubey RC, Chauhan PS. Radio-adaptive response in human lymphocytes in vitro[J]. *Indian J Exp Biol*, 1996, 34(9): 909 - 912.
- 7 王亚利,王西京,王中卫,等. 放射抗拒性鼻咽癌细胞系的建立及差异表达基因[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2009, 30(6): 741 - 745.
- 8 胡国清,孙银萍. 放射线对体外培养鼻咽癌细胞细胞周期阻滞、凋亡和抑癌基因 p57^{kip2}表达的影响[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2005, 34(6): 741 - 743.

[收稿日期 2012-04-25][本文编辑 宋卓孙 蓝斯琪]