

鼻咽癌细胞 6-10B 和 HNE2 放疗敏感性的分析

闵肖丽,黄芳玲,陈主初,陈永恒

(中南大学湘雅医院 国家卫生计生委肿瘤蛋白质组学重点实验室,湖南 长沙 410008)

摘要: **目的** 通过对比鼻咽癌细胞 6-10B 和 HNE2 的放疗敏感性,为临床鼻咽癌不同分期放射治疗提供依据。**方法** 鼻咽癌细胞 6-10B 和 HNE2 用于放疗敏感性实验检测,通过集落形成实验检测细胞对放疗的敏感程度、流式细胞术检测细胞周期、流式细胞术与 Western blot 检测细胞凋亡、免疫荧光结合 Western blot 检测 DNA 损伤标志物 γ -H2AX 表达水平。**结果** 集落形成实验结果初步看出 HNE2 (IC50 约 3.5 Gy) 对放疗的敏感性强于 6-10B (IC50 约 5 Gy);细胞周期结果可以发现放疗后,两株细胞均出现 G2M 期周期阻滞;HNE2 细胞放疗引起的 DNA 损伤和凋亡水平均高于 6-10B。**结论** 鼻咽癌细胞 HNE2 对放疗的敏感性强于 6-10B,为鼻咽癌的不同分期治疗提供临床参考。

关键词:鼻咽癌;6-10B;HNE2;放疗敏感性
中图分类号:R739. 63 **文献标识码:**A [中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2018,24(3):208-212]

Analysis of radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells 6-10B and HNE2

MIN Xiao-li, HUANG Fang-ling, CHEN Zhu-chu, CHEN Yong-heng

(Key Laboratory of Cancer Proteomics of Chinese Ministry of Health, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To provide basis for radiotherapy of nasopharyngeal carcinoma (NPC) in different stages via comparing the radiosensitivity of NPC cells 6-10B and HNE2. **Methods** NPC cells 6-10B and HNE2 were used for radiosensitivity test. Their sensitivities to radiotherapy were detected by colony formation test. Cell cycle was monitored by flow cytometry. Apoptosis in different groups was inspected by flow cytometry and Western blot. Immunofluorescence combined with Western blot was used to measure the phosphorylated histone γ -H2AX reflecting the level of double-strand DNA damage induced by radiotherapy. **Results** The results of colony forming experiment showed that HNE2 (IC50 $\approx$ 3.5 Gy) was more sensitive to radiotherapy than 6-10B (IC50 $\approx$ 5 Gy). The results of cell cycle showed that both cells showed G2M-phase cycle arrest after radiotherapy. DNA damage and cell apoptosis. **Conclusion** HNE2 is more sensitive to radiotherapy than 6-10B, which provides reference for the treatment of NPC at different stages.

Key words: Nasopharyngeal neoplasm;6-10B;HNE2;Radiosensitivity
[Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery,2018,24(3):208-212]

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma,NPC)是我国高发恶性肿瘤之一,发病率为耳鼻咽喉恶性肿瘤之首。鼻咽癌以种族易感性及地域集中性为特点,主要见于黄种人,少见于白种人^[1-3]。鼻咽癌在我国南部的广东、广西、福建、湖南、江西等省份高发^[4]。我国 2012 年鼻咽癌患者有 33 000 例,占全世界总

患者人数的 38%,同年,我国鼻咽癌患者的死亡率超过 60%^[1,5]。放射治疗(radiation therapy,RT)是鼻咽癌的主要治疗手段,对于早期患者的疗效满意,5 年生存率可达 80% 以上,而对于中后期患者,放疗疗效欠佳,肿瘤产生放疗抵抗的机制之一则是肿瘤异质性^[6-8]。

放疗对细胞引起的最严重的后果即双链 DNA 损伤,放疗引起的 DNA 损伤应激反应的标志物为 γ -H2AX, γ -H2AX 的水平反映了 DNA 损伤水平。有研究显示放疗后,H2AX 蛋白的 139 位即开始发

基金项目:国家自然科学基金(81570537)。
作者简介:闵肖丽,女,在读硕士研究生。
通信作者:陈永恒,Email:yonghenc@163.com.

生磷酸化,0.5h 达到巅峰^[9-11]。放疗引起的 DNA 分子损伤,可使细胞周期停滞,肿瘤细胞在周期停滞中,若可及时修复损伤的 DNA,则可继续进入下一个周期阶段^[8-11];若损伤的 DNA 未得到及时的修复,则细胞将从周期停滞发展为细胞死亡^[12-15]。本实验通过集落形成实验检测鼻咽癌细胞放疗敏感性,在通过对细胞周期、凋亡以及 DNA 损伤情况的检测,最后发现鼻咽癌细胞 HN2 放疗敏感性强于 6-10B,为临床鼻咽癌放射治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人鼻咽癌细胞 6-10B 和 HNE2 源自本实验室(中南大学湘雅医院国家卫计委肿瘤蛋白质组学重点实验室),RPMI 1640 购自美国 ThermoFisher scientific 公司;胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司;SDS-PAGE 凝胶试剂盒购自碧云天生物技术公司;c-PARP 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; γ -H2AX 购自英国 Abcam 公司; β -actin 购自武汉三鹰 proteintech;Cocktail 抑制剂购自德国 Sigma 公司;流式周期/凋亡试剂盒购自美国 BD 公司。

恒温培养箱购自美国 Thermo 公司;化学发光成像仪购自美国 GE Amersham 公司;荧光显微镜购自美国 LEICA 公司;流式细胞仪美国 BD 公司;电泳仪购自美国 BIO-RAD 公司。

1.2 方法

1.2.1 集落形成实验 将对数生长期的细胞消化下来制成单个悬浮细胞,并进行计数,通过细胞计数仪计算稀释比例。6-10B 和 HNE2 集落形成实验种板细胞数目见表 1。

表 1 集落形成实验种板数及其放疗剂量

放疗剂量	种板细胞数目(个)
0 Gy	400
2 Gy	400
4 Gy	700
6 Gy	1500
8 Gy	3000

0 Gy 组为对照组,其他放疗剂量组为实验组。每个处理组重复 3 个复孔,放疗后,于 37℃ 恒温培养箱中培养,继续培养 7~10 d。当肉眼可见克隆集落时,显微镜下观察集落,单个集落中细胞数目大于 50 个,即可终止培养。甲醇固定,0.1% 结晶紫染

色,计集落数。

细胞存活分数 = (实验组集落数/种板数)/(对照组集落数/种板数) × 100%。

1.2.2 流式细胞术 结合集落形成实验结果,两株细胞放疗引起的 IC50 在 3~5 Gy,周期与凋亡实验采用的放疗剂量为 4 Gy。周期:对照组不做处理,实验组放疗采用 400 cGy/min,持续放疗 1 min,累积放疗剂量为 4 Gy。放疗后两组继续培养 24 h,将细胞消化下来,离心收集,预冷的 PBS 洗 2 次。75% 的乙醇固定细胞,4℃ 过夜。将固定好的细胞,4℃,2 000 rpm 离心 5 min, PBS 洗 1 次,加 PI 染色液,37℃ 孵育 15 min,置冰上停止孵育,1 h 内上机。凋亡:处理方法和周期一致,放疗后培养 48 h,收集细胞,加 Annexin V 和 PI 避光染色 15 min,冰上停止孵育,1 h 内上机。

1.2.3 蛋白质免疫印迹(Western blot) 提取细胞总蛋白,然后进行 SDS-PAGE 电泳。用 5% 牛奶封闭液(c-PARP 用)或 5% BSA(γ -H2AX 用)封闭 2 h。封闭结束后,一抗(γ -H2AX, Abcam, 1: 800; c-PARP, CST, 1: 1000)孵育 4℃ 过夜,二抗室温孵育 1 h,然后进行化学发光。

1.2.4 免疫荧光 细胞爬片,对照组不做处理,实验组放疗采用 400 cGy/min,持续放疗 1 min,累积放疗剂量为 4 Gy。放疗后 0.5 h,弃去培养基, PBS 洗 3 次。4% 的多聚甲醛固定,0.3% Triton-100 破膜。山羊血清(与一抗同源),室温封闭。一抗体(γ -H2AX, 1: 200, Abcam) 4℃ 孵育过夜。避光加入二抗,室温孵育 1 h, DAPI 溶液进行核染。荧光倒置显微镜下,分别在不同波长下检测 FITC 和 DAPI。

2 结果

2.1 鼻咽癌细胞 6-10B 和 HNE2 对放疗敏感性的初步评估

通过不同放疗剂量的集落形成实验,初步评估鼻咽癌细胞 6-10B 和 HNE2 对放疗的敏感性。放剂量为 0、2、4、6、8 Gy,由图 1 细胞生存曲线可看出随着放疗剂量的增加,鼻咽癌细胞 6-10B 和 HNE2 生存分数逐渐降低,且 HNE2 生存分数在 2~8 Gy 之间下降趋势比 6-10B 明显,由 6-10B 和 HNE2 的生存分数曲线得鼻咽癌 6-10B 细胞放疗的 IC50 ≈ 5 Gy, HNE2 细胞 IC50 ≈ 3.5 Gy,初步得出 HNE2 比 6-10B 放疗敏感性高。

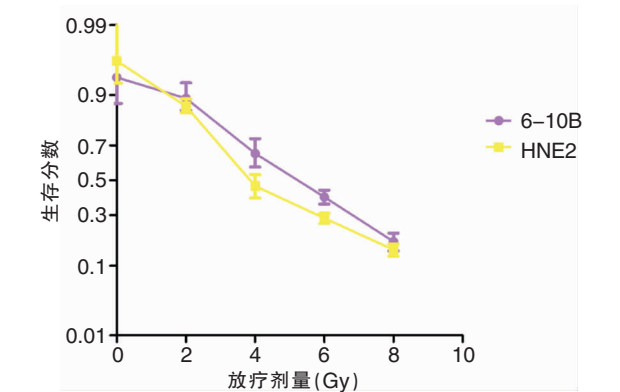


图1 鼻咽癌细胞 6-10B 和 HNE2 不同的放疗剂量下,细胞集落形成实验结果

2.2 放疗对鼻咽癌细胞周期的影响

鼻咽癌细胞 6-10B 和 HNE2 经放疗处理后,在 24 h 检测细胞周期分布,由图 2 可以看出,鼻咽癌细

胞 6-10B 和 HNE2 放疗组和对对照组相比,G2M 期明显增加,S 期明显降低,表明放疗致使细胞周期停滞。两细胞株周期变化去势和程度相近,无明显差异。

2.3 放疗引起的 DNA 损伤水平的检测

本研究通过免疫荧光实验和蛋白质免疫印迹 Western blot 检测 γ -H2AX 的水平,探究鼻咽癌细胞 6-10B 和 HNE2 对放疗敏感性的差异。图 3 为鼻咽癌细胞 6-10B 和 HNE2 放疗后 0.5 h, γ -H2AX 表达水平检测结果。A、B 为不同细胞株放疗引起的 γ -H2AX 的免疫荧光结果,6-10B 的阳性率为 68%,HNE2 阳性率约为 98%,HNE2 细胞株放疗组 γ -H2AX 荧光信号比 6-10B 信号强。C 为 Western blot 实验检测 γ -H2AX 表达水平,验证免疫荧光实验的结果,实验结果与免疫荧光一致。

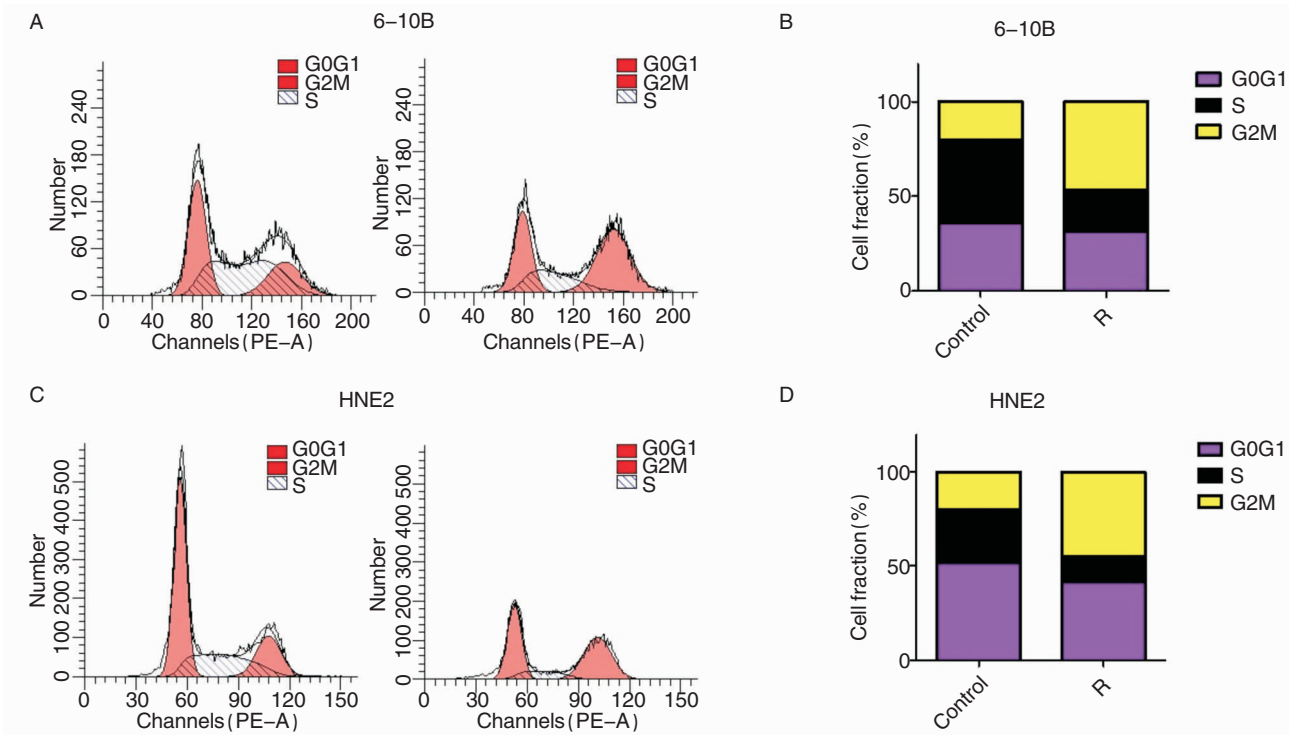


图2 放疗对鼻咽癌细胞 6-10B 和 HNE2 周期的影响 A、B:鼻咽癌细胞 6-10B 对照组和放疗组周期分布;C、D:鼻咽癌细胞 HNE2 对照组和放疗组周期分布;由图可发现两株细胞 G2M 期明显增加,表明放疗致使细胞周期停滞 (control = 对照组, R = 放疗组)

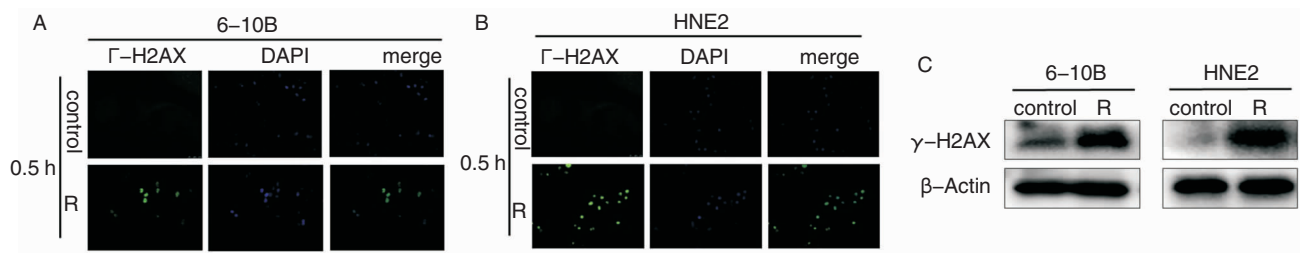


图 3 鼻咽癌细胞 6-10B 和 HNE2 放疗后 0.5 h, γ -H2AX 表达水平检测结果 A、B:不同细胞株放疗引起的 γ -H2AX 的免疫荧光结果,6-10B 的阳性率为 68%, HNE2 阳性率约为 98%, HNE2 细胞株放疗组 γ -H2AX 荧光信号比 6-10B 信号强; C: Western blot 实验检测 γ -H2AX 表达水平(control = 对照组, R = 放疗组)

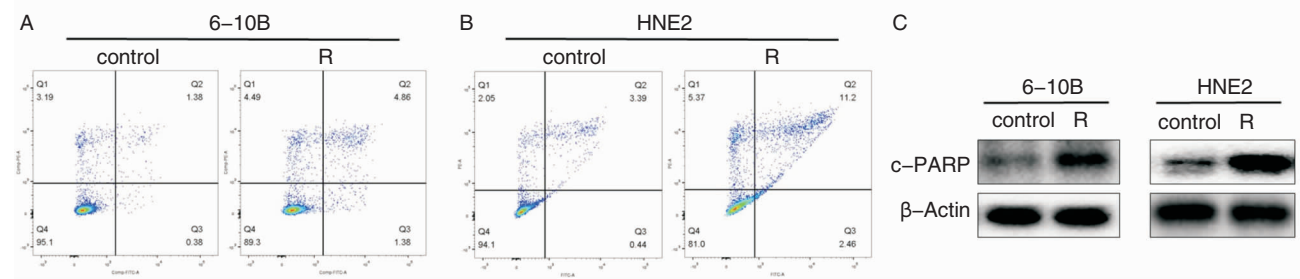


图 4 放疗对鼻咽癌细胞 6-10B 和 HNE2 凋亡的影响 A、B:6-10B 和 HNE2 流式检测 Annexin V 凋亡结果,可以发现放疗可促进鼻咽癌细胞 6-10B 和 HNE2 的凋亡; C: Western blot 检测 c-PARP 水平(control = 对照组, R = 放疗组)

2.4 放疗对鼻咽癌细胞 6-10B 和 HNE2 凋亡的影响

为了进一步验证鼻咽癌细胞 6-10B 和 HNE2 对放疗敏感性差异,采用流式细胞术检测凋亡、Western blot 法检测凋亡蛋白 c-PARP 表达水平。放疗剂量为 4 Gy,放疗后 48 h 检测。结果发现放疗可促进鼻咽癌细胞 6-10B 和 HNE2 的凋亡,6-10B 放疗组相对于对照组凋亡细胞增加 4.78%, HNE2 放疗组相对于对照组凋亡细胞增加 11.13%。且 HNE2 放疗组凋亡水平高于 6-10B 放疗组,再次证实鼻咽癌细胞 HNE2 放疗敏感性高于 6-10B。具体见图 4。

3 讨论

鼻咽癌是我国常见的恶性肿瘤,以低分化的鳞状细胞癌和未分化癌最为常见,对放射治疗敏感性较高。由于受鼻咽结构局限,鼻咽癌不宜手术治疗,且鼻咽癌对常规药物不敏感,放疗是鼻咽癌临床上最主要和最有效的治疗方法。尽管鼻咽癌放疗敏感性较高,但鼻咽癌放疗抵抗屡见不鲜,特别是中晚期鼻咽癌患者放疗抵抗较为常见,从而导致鼻咽癌放疗失败。鼻咽癌产生放疗抵抗的因素很多,其中肿瘤组织异质性是放疗抵抗的机制之一,而更进一步

的分子机制可能与放疗引起的 DNA 损伤以及肿瘤细胞 DNA 损伤修复能力相关,以及放疗引起的周期分布改变等相关^[12]。我们设计针对鼻咽癌 6-10B 和 HNE2 两株细胞,检测两株细胞放疗后 DNA 损伤水平和周期分布情况,从而评估两株细胞对鼻咽癌放疗敏感性的差异,再通过细胞凋亡水平验证其差异。本实验首先通过集落形成实验检测鼻咽癌细胞 6-10B 和 HNE2 对放疗的敏感性,结果显示 6-10B 放疗的 IC₅₀ 约 5 Gy, HNE2 的 IC₅₀ 约 3.5 Gy,初步显示 HNE2 放疗敏感性高于 6-10B,结合两株细胞 IC₅₀,后期实验采用 4 Gy。为了进一步验证 6-10B 和 HNE2 放疗敏感性差异,我们再对比两株细胞放疗后的周期分布、DNA 损伤水平、凋亡水平等差异。结果发现放疗可引起鼻咽癌细胞 6-10B 和 HNE2 周期阻滞, G₂M 期增多;放疗后 0.5 h,检测 DNA 损伤水平,免疫荧光和 Western blot 实验结果显示放疗可增加鼻咽癌细胞 6-10B 和 HNE2 DNA 损伤,且 HNE2 细胞 DNA 损伤水平高于 6-10B;放疗后 48h 检测细胞凋亡水平,流式细胞术检测 Annexin V、Western blot 检测 c-PARP,可以发现放疗可促进鼻咽癌细胞 6-10B 和 HNE2 的凋亡,6-10B 放疗组相对于对照组凋亡细胞增加 4.78%, HNE2 放疗组相对于对照组凋亡细胞增加 11.13%, Western blot 结果

与流式结果一致,表明放疗可引起鼻咽癌 6-10B 和 HNE2 细胞的凋亡,且 HNE2 放疗组凋亡水平高于 6-10B 放疗组。由周期分布、DNA 损伤水平、凋亡水平情况,可发现 HNE2 细胞放疗引起的 DNA 损伤水平以及放疗导致的细胞凋亡水平均高于 6-10B。放疗引起的 DNA 分子损伤,可使细胞周期停滞,肿瘤细胞周期停滞中,损伤的 DNA 得到及时修复,可进入下一个周期阶段;损伤的 DNA 未得到及时的修复,则细胞将进入凋亡阶段^[13-16],放疗引起 HNE2 细胞 DNA 损伤水平和细胞凋亡水平均高于 6-10B,而周期 G2M 期阻滞和 6-10B 细胞相差不大,我们猜测 HNE2 对放疗的敏感性高于 6-10B,可引起更高水平的 DNA 损伤,而 6-10B 细胞的 DNA 损伤修复能力可能强于 HNE2,综合因素导致 HNE2 细胞凋亡水平高于 6-10B。这些结果证实鼻咽癌细胞 HNE2 放疗敏感性高于 6-10B,这一发现为临床鼻咽癌放射治疗提供参考。

参考文献:

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No 11 [EB/OL]. 2012, <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.
- [2] Wee JT, Ha TC, Loong SL, et al. Is nasopharyngeal cancer really a “Cantonese cancer”[J]. Chinese Journal of Cancer, 2010, 29(5):517–526.
- [3] Wang Y, Zhang Y, Ma S. Racial differences in nasopharyngeal carcinoma in the United States[J]. Cancer Epidemiol, 2013, 37(6):793–802.
- [4] 黄光武. 鼻咽癌研究现状与进展[J]. 广西医学, 2004, 26(1): 3–5.
Huang GW. Research status and progress of nasopharyngeal carcinoma[J]. Guangxi Medical Journal, 2004, 26(1): 3–5.
- [5] 邱元正,刘超,李果. 鼻咽癌放射治疗的现状与对策[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2015, 21(6):435–437.
Qiu YZ, Liu C, Li G. Current situation and countermeasures of radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma[J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2015, 21(6): 435–437.
- [6] Chua MLK, Wee JTS, Hui EP, et al. Nasopharyngeal carcinoma [J]. Lancet, 2016, 387(10022): 1012–1024.
- [7] Chan AT, Grégoire V, Lefebvre JL, et al. Nasopharyngeal cancer: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. Ann Onco, 2012, 23(7): 83–85.
- [8] Chan AT, Felip E. Nasopharyngeal cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up[J]. Ann Onco, 2009, 20(4): 123–125.
- [9] Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139[J]. J BiolChem, 1998, 273(10):5858–5868.
- [10] Rastogi RP, Kumar A, Tyagi MB, et al. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair[J]. J Nucleic Acids, 2010, 2010:592980.
- [11] Jun S, Jung YS, Suh HN, et al. LIG4 mediates Wnt signalling-induced radioresistance[J]. Nat Commun, 2016, 7:10994.
- [12] 曾谷清,黄丽芳,廖力. 鼻咽癌放疗抵抗的分子机制研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(3):82–86.
Zeng GQ, Huang LF, Liao L. Research progress on molecular mechanism of nasopharyngeal carcinoma radioresistance[J]. China Journal of Modern Medicine, 2016, 26(3):82–86.
- [13] Huang SM, Harari PM. Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(6):2166–2174.
- [14] Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease[J]. Nature, 2009, 461(7267):1071–1078.
- [15] 苏怡,谢景华,孟庆翔,等. 紫草萘醌衍生物联合放射线照射抑制人鼻咽癌细胞增殖和诱导凋亡[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2017, 23(3):207–211.
Su Y, Xie JH, Meng QX, et al. Sensibilization and apoptosis induction of radix arnebiaenaphthoquinone derivative combined with radiotherapy on human nasopharyngeal carcinoma cell lines[J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2017, 23(3):207–211.
- [16] 邹亚超,李国亮,张忠山. 细胞增殖和凋亡在鼻咽癌放疗中的预后价值[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2001, 7(4):264–265.
Zou YC, Li GL, Zhang ZS. Prognostic value of cell proliferation and apoptosis in radiotherapy of nasopharyngeal carcinoma[J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2001, 7(4):264–265.

(收稿日期:2018-02-10)