

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.14.003
文章编号: 1005-8982 (2019) 14-0013-05

吉西他滨对人舌鳞癌 Tca8113 细胞的 放射增敏作用及其机制研究 *

刘星彦¹, 张斌¹, 马竞¹, 陈健²

(1. 锦州医科大学附属第一医院 口腔颌面外科, 辽宁 锦州 121000; 2. 葫芦岛市第二人民医院, 辽宁 葫芦岛 125000)

摘要: 目的 研究吉西他滨(GEM)对人舌鳞癌 Tca8113 细胞的放射增敏作用及其相关机制。**方法** 用不同浓度 GEM 处理人舌鳞癌 Tca8113 细胞 24 h, 测定细胞存活率并确定后续实验浓度。对 Tca8113 细胞进行单独放疗或联合 GEM 处理, MTT 法测定细胞存活率; 平板克隆形成实验研究各组细胞集落形成的能力; 流式细胞术验证 Tca8113 细胞对放射的敏感性变化。Western blotting 检测 Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase-3 及 Cleaved Caspase-9 蛋白的表达。**结果** 不同浓度 GEM 作用时的细胞存活率比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 $0.00 \mu\text{mol/L}$ 组比较, GEM 浓度为 0.01、0.02、0.03、0.10 及 $1.00 \mu\text{mol/L}$ 时细胞存活率降低 ($P < 0.05$)。照射剂量为 4 Gy 时, 与单纯放疗组比较, GEM 联合放疗组细胞存活率降低 ($P < 0.05$)。克隆形成实验显示, GEM 联合放疗组集落形成能力最弱 ($P < 0.05$); 流式细胞术进一步证实, GEM 联合放疗组较单纯放疗组凋亡率升高 ($P < 0.05$)。GEM 联合放疗组 Tca8113 细胞凋亡高于其他各组, 且 Tca8113 细胞中 Bax、Cleaved Caspase-3 及 Cleaved Caspase-9 蛋白表达水平高于其他组 ($P < 0.05$); 而 Bcl-2 蛋白表达则低于其他各组 ($P < 0.05$)。**结论** GEM 对舌鳞癌 Tca8113 细胞的增殖有抑制作用, 联合放射治疗能有效提高放射敏感性; 两者可能具有协同抗肿瘤作用。

关键词: 舌肿瘤; 细胞系, 肿瘤; 放射疗法

中图分类号: R739.86

文献标识码: A

Radiosensitizing effect of gemcitabine on human tongue squamous cell carcinoma Tca8113 cells and its mechanism*

Xing-yan Liu¹, Bin Zhang¹, Jing Ma¹, Jian Chen²

(1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China; 2. the Second People's Hospital of Huludao, Huludao, Liaoning 125000, China)

Abstract: Objective To study the radiosensitizing effect of gemcitabine on human tongue squamous cell carcinoma Tca8113 cells and its related mechanisms. **Methods** After 24 hours-treatment of human tongue squamous cell carcinoma Tca8113 cells with different concentrations of gemcitabine, cell viability and the concentration of subsequent experiments was determined. Tca8113 cells were treated with radiotherapy alone or combined with gemcitabine. MTT assay was used to determine cell viability. Plate colony formation assay was used to study cell colonies. Flow cytometry was used to verify the sensitivity of Tca8113 cells to radiation, and Western blotting was used to detect Bcl-2, Bax, Cleaved Caspase-3, Cleaved Caspase-9 protein expression. **Results** The cell viability of different concentrations of gemcitabine was analyzed by variance, and the difference was statistically

收稿日期: 2019-01-12

* 基金项目: 辽宁省自然科学基金 (No: 201500333-301)

[通信作者] 张斌, E-mail: 18004969456@qq.com; Tel: 13604968022

significant ($P < 0.05$). Compared with the blank control group, the cell viability of the 0.01, 0.02, 0.03, 0.1, and 1 $\mu\text{mol/L}$ gemcitabine concentrations were lower, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). When the irradiation dose was 4Gy, the cell survival rate of gemcitabine combined with radiotherapy group was lower than that of radiotherapy alone ($P < 0.05$). Cloning formation experiment showed the colony formation ability of gemcitabine combined with radiotherapy group was the weakest ($P < 0.05$); flow cytometry further confirmed that the apoptotic rate was higher in gemcitabine combined with radiotherapy group than that in radiotherapy alone group ($P < 0.05$); The apoptosis of Tca8113 cells in gemcitabine combined with radiotherapy group was higher than that in other groups, and the expression levels of Bax, Cleaved Caspase-3 and Cleaved Caspase-9 in gemcitabine combined with radiotherapy group were higher than those in other groups ($P < 0.05$), while Bcl-2 protein was opposite. ($P < 0.05$). **Conclusions** Gemcitabine has a proliferation-inhibiting effect on tongue squamous cell carcinoma Tca8113 cells, and combined radiotherapy can effectively improve radiosensitivity, and both may have synergistic anti-tumor effects.

Keywords: tongue neoplasms; cell line, tumor; radiotherapy

舌癌是最常见的口腔癌^[1], 有较强的局部浸润性和转移率高等特点, 可导致咀嚼、言语和吞咽等功能失常, 甚至有死亡的风险。舌癌对放射的敏感性不高, 临床上主要是手术治疗, 积极探讨放疗增敏的新方法成为研究热点之一^[2]。吉西他滨 (Gemcitabine, GEM) 是脱氧胞苷的水溶性类似物^[3], 具有放射增敏作用强, 毒副作用较小的特点^[4]。本研究以 GEM 联合放疗作用于舌鳞癌 Tca8113 细胞, 研究其对 Tca8113 细胞放射敏感性的影响及可能的作用机制, 为舌癌的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 舌鳞癌 Tca8113 细胞购于中国科学院上海细胞生物研究所。

1.1.2 试剂 GEM 购于美国 ApexBio 公司, DMEM 培养基、胰蛋白酶购于美国 HyClone 公司, 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购于北京索莱宝科技有限公司, 链霉素 / 青霉素 (双抗)、四甲基偶氮唑蓝 (thiazoly blue, MTT) 购于上海碧云天生物技术有限公司, 胎牛血清购于杭州四季青公司, 流式细胞凋亡检测试剂盒购于美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Tca8113 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中培养, 置于 37.0℃、5% 二氧化碳 CO₂ 恒温细胞培养箱中, 定期传代、换液, 取对数期 Tca8113 细胞进行实验。

1.2.2 MTT 法测定 取对数生长期的 Tca8113 细胞, 消化、重悬、计数后置于 96 孔板内, 5 × 10³ 个 / 孔细胞, 每组设 3 个复孔, 测量重复 3 次。细胞贴壁后, 加入

不同浓度 GEM (0.000、0.001、0.010、0.020、0.030、0.100 及 1.000 $\mu\text{mol/L}$) 完全培养基培养 24 h 后终止培养, 每孔加入质量浓度为 5 mg/ml 的 MTT 20 μl , 37℃ 条件下孵育 4 h。弃上清液, 每孔加入 150 μl DMSO。摇床上震荡 10 min, 使用多功能酶标仪在 490 nm 波长处测定光密度 (optical density, OD) 值。以 OD 值显示实验结果, 以浓度为横坐标, 细胞存活率为纵坐标, 绘制细胞的生长曲线。据此计算出 GEM 对 Tca8113 细胞增殖的影响, 选定最佳浓度进行后续实验。

取 Tca8113 细胞接种于 96 孔板内, 每孔细胞数为 5 × 10³ 个, 将其分为空白对照组、GEM 组 (0.02 $\mu\text{mol/L}$)、单纯放疗组 (4 Gy)、GEM (0.02 $\mu\text{mol/L}$) 联合放疗组 (4 Gy)。处理 24 h, 用 MTT 法明确最佳照射剂量。

1.2.3 平板克隆实验 将 1 × 10³ 个 Tca8113 细胞接种在 6 孔板中, 待细胞贴壁后弃培养液分为空白对照组、GEM 组、单纯放疗组、GEM 联合放疗组。加入 GEM 处理细胞 24 h, 暴露于 4 Gy 照射, 继续在孵箱中孵育 10 ~ 14 d, 弃培养液, 洗涤、固定及染色后, 计数各孔集落数 (≥ 50 个细胞为 1 个集落)。计算各组细胞克隆率。

1.2.4 流式细胞术 将 Tca8113 细胞用 0.02 $\mu\text{mol/L}$ GEM 处理 24 h 后, 4 Gy 照射或不予处理, 与空白对照组比较。5 min 离心 1 500 r/min 收集悬浮细胞。贴壁细胞用胰蛋白酶消化, 磷酸盐缓冲液漂洗细胞 2 次, 并进行细胞计数、离心, 收集 1 × 10⁵ ~ 3 × 10⁵ 个细胞, 将收集的细胞重悬于 150 μl 染色溶液中, 加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀后, 加入 10 μl Propidium Iodide 混匀, 室温避光反应 5 ~ 15 min。应用流式细胞仪测量细胞凋亡率。

1.2.5 Western blotting 0.02 $\mu\text{mol/L}$ GEM 处理 Tca8113 细胞 24 h 后, 吸出培养液, 放疗继续作用细胞 24 h, Western blotting 检测各组 Tca8113 细胞中 Bax、Bcl-2、Cleaved Caspase-3 及 Cleaved Caspase-9 蛋白的表达水平。收集空白对照组、GEM 组、单纯放疗组和 GEM 联合放疗组的细胞, 胰酶消化后将收集的细胞离心并重悬于裂解缓冲液中。冰上孵育 30 min 后, 提取澄清匀浆 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min。BCA 蛋白定量试剂盒检测各组蛋白浓度。10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 将凝胶中的蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 300 mA 湿转 90 min, 室温下使用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 加入相应稀释比例的一抗孵育过夜, 洗膜后室温下孵育二抗 1 h, 化学发光法显影、定影后扫描分析。采用 Image J 图像分析软件分析灰度值, 计算出样本蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析, 进一步两两比较用 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 测定结果

2.1.1 GEM 对 Tca8113 细胞活力的抑制作用 不同浓度 GEM (0.000、0.001、0.010、0.020、0.030、0.100 及 1.000 $\mu\text{mol/L}$) 作用时细胞存活率分别为 (100.00 \pm 0.00) %、(98.59 \pm 0.20) %、(95.46 \pm 0.08) %、(94.79 \pm 0.08) %、(93.95 \pm 0.24) %、(91.77 \pm 0.54) % 及 (73.90 \pm 2.98) %, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 171.025$, $P = 0.000$); 与 0.000 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, GEM 浓度为 0.010、0.020、0.030、0.100、1.000 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞存活率降低 ($P < 0.05$)。见图 1。

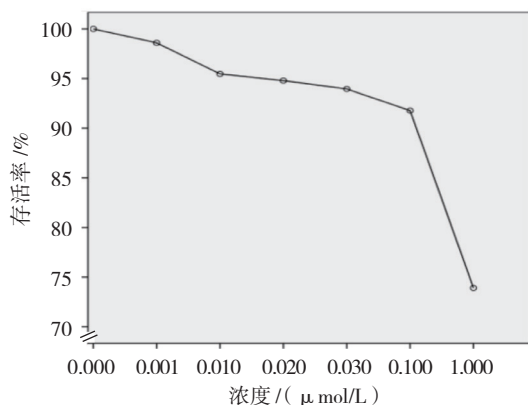
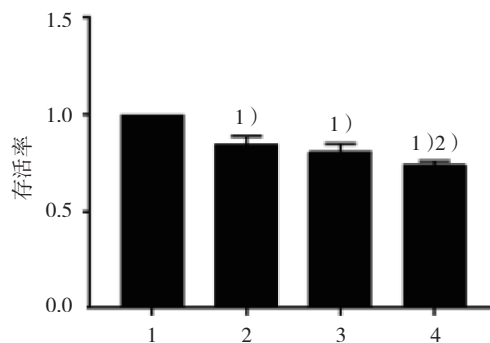


图 1 Tca8113 细胞在不同浓度时的细胞存活率曲线

2.1.2 GEM 对放疗的增敏作用 空白对照组、GEM 组、单纯放疗组和 GEM 联合放疗组细胞存活率分别为 (100.00 \pm 0.00) %、(84.83 \pm 1.78) %、(80.64 \pm 1.44) % 和 (73.95 \pm 1.24) %, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 214.368$, $P = 0.000$); 与空白对照组比较, 其他各组细胞存活率降低 ($P < 0.05$); 与单纯放疗组比较, GEM 联合放疗组细胞存活率降低 ($P < 0.05$)。见图 2。



1: 空白对照组, 2: GEM 组, 3: 单纯放疗组, 4: GEM 联合放疗组。
1) 与空白对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与单纯放疗组比较, $P < 0.05$

图 2 各组 Tca8113 细胞存活率比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.2 GEM 联合放疗对 Tca8113 细胞集落形成的影响

放射剂量选定 4 Gy, 空白对照组、GEM 组、单纯放疗组和 GEM 联合放疗组克隆形成率分别为 (33.83 \pm 1.15) %、(28.46 \pm 1.42) %、(15.50 \pm 1.10) % 和 (0.00 \pm .00) %, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 593.548$, $P = 0.000$); 与单纯放疗组比较, GEM 联合放疗组克隆形成率降低 ($P < 0.05$), 几乎处于静止期。见图 3。

2.3 GEM 增强射线诱导细胞的凋亡

流式细胞术检测发现, 空白对照组、GEM 组、单纯放疗组和 GEM 联合放疗组细胞凋亡率分别为 (0.03 \pm 0.01) %、(5.68 \pm 0.18) %、(6.54 \pm 0.23) % 和 (28.63 \pm 0.38) %, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 7959.927$, $P = 0.000$)。与空白对照组比较, GEM 组和单纯放疗组的 Tca8113 细胞发生凋亡 ($P < 0.05$); 两者联用后较单纯放疗组凋亡率升高 ($P < 0.05$), 说明 GEM 能增强放疗对 Tca8113 细胞的敏感性。见图 4。

2.4 Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase-9 及 Cleaved Caspase-3 蛋白的表达水平

各组细胞中 Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase-3 及 Cleaved Caspase-9 蛋白相对表达量比较, 经单因素

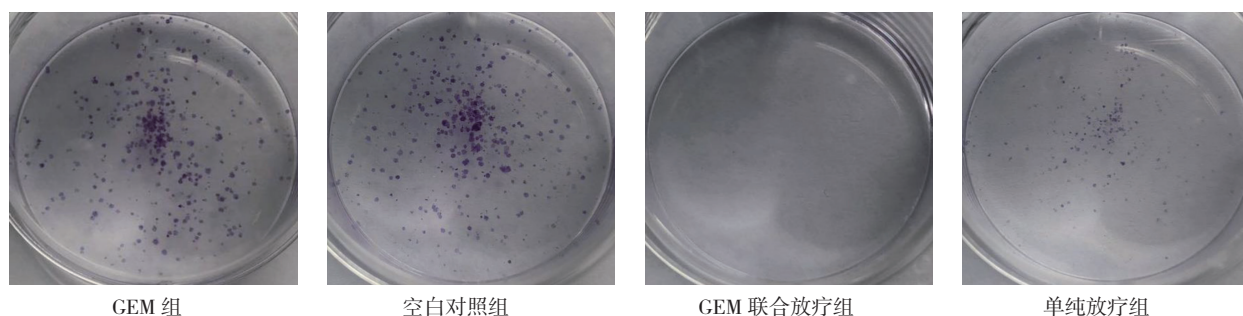


图 3 各组 Tca8113 细胞克隆实验细胞集落形成图

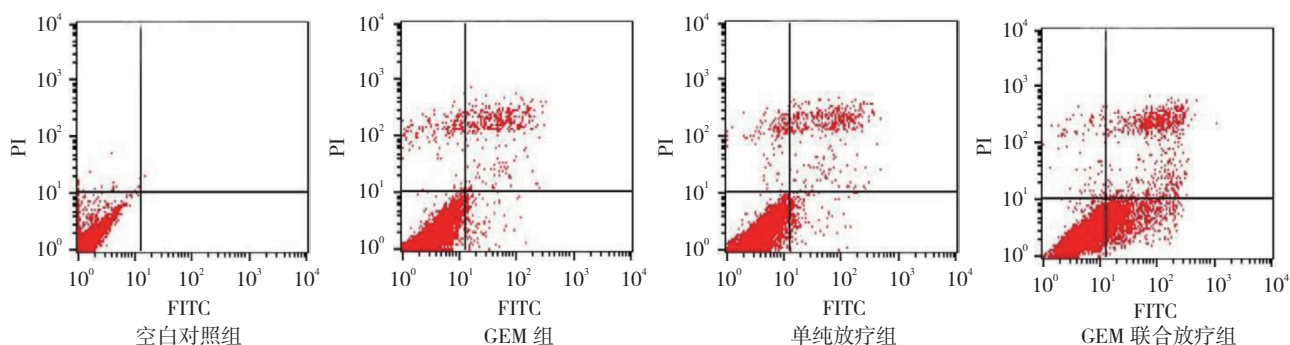


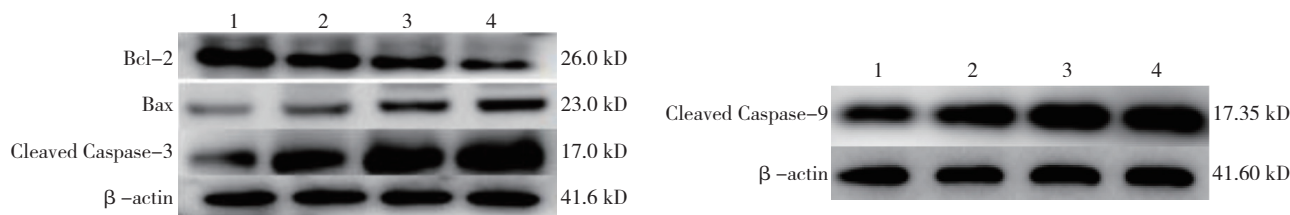
图 4 GEM 联合放疗对 Tca8113 细胞凋亡的影响

方差分析，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；与空白对照组比较，GEM 组、单纯放疗组和 GEM 联合放疗组中 Bcl-2 蛋白相对表达量降低 ($P < 0.05$)，Bax、Cleaved Caspase-3 及 Cleaved Caspase-9 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$)；GEM 联合放疗组中 Bcl-2 蛋白相对表达量较单纯放疗组和 GEM 组降低 ($P < 0.05$)；

GEM 联合放疗组中 Bax、Cleaved Caspase-3 及 Cleaved Caspase-9 蛋白相对表达量较单纯放疗组和 GEM 组升高 ($P < 0.05$)。线粒体凋亡途径相关蛋白 Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase-3 及 Cleaved Caspase-9 蛋白表达增强或减弱可能是 GEM 提高放疗诱导舌鳞癌 Tca8113 细胞凋亡作用的机制之一。见表 1 和图 5。

表 1 各组细胞中 Bax、Bcl-2、Cleaved Caspase-3 及 Cleaved Caspase-9 蛋白的表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | Bcl-2 | Bax | Cleaved Caspase-3 | Cleaved Caspase-9 |
|-----------|---------------|---------------|-------------------|-------------------|
| 空白对照组 | 0.949 ± 0.002 | 0.347 ± 0.037 | 0.597 ± 0.015 | 0.040 ± 0.007 |
| GEM 组 | 0.904 ± 0.000 | 0.591 ± 0.011 | 1.113 ± 0.074 | 0.125 ± 0.005 |
| 单纯放疗组 | 0.883 ± 0.003 | 0.802 ± 0.007 | 1.519 ± 0.030 | 0.147 ± 0.006 |
| GEM 联合放疗组 | 0.787 ± 0.004 | 0.892 ± 0.004 | 2.060 ± 0.053 | 0.523 ± 0.014 |
| F 值 | 1 549.012 | 437.764 | 479.014 | 1 651.308 |
| P 值 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |



1: 空白对照组, 2: GEM 组, 3: 单纯放疗组, 4: GEM 联合放疗组

图 5 Bax、Bcl-2、Cleaved Caspase-3 及 Cleaved Caspase-9 蛋白表达的变化

3 讨论

舌癌是恶性程度极高的口腔癌, 放疗是提高生存率的重要治疗手段之一。既往研究发现, GEM 能提高乏氧细胞对放射线的敏感性, 抑制 DNA 合成, 从而达到抗肿瘤作用^[5]。本实验旨在研究 GEM 联合放疗时, 提高对 Tca8113 细胞增殖的抑制、凋亡的能力, 从而起到放疗增敏作用的机制。

有研究表明, GEM 对胰腺癌细胞的增殖有抑制作用, 且呈浓度依赖性^[6]。本实验得出相类似的结果, 在此基础上将放疗与 GEM 联合作用于 Tca8113 细胞, 发现 GEM 联合放疗组比单纯放疗组细胞存活率低。克隆形成实验和流式细胞术的结果说明, GEM 对 Tca8113 细胞具有放射增敏作用。

线粒体介导的内源性途径为细胞凋亡早期的重要途径^[7-8]。本实验选取线粒体途径相关蛋白 Bax、Bcl-2、Cleaved Caspase-3 及 Cleaved Caspase-9 作为监测指标, 进一步探究 GEM 增强 Tca8113 细胞的放射敏感性。在线粒体介导的凋亡途径中^[9], Bax 为线粒体上的一种跨膜因子, 在凋亡信号的诱导下, Bax 转移到线粒体外膜处, 促进线粒体膜通透性的改变, 释放的细胞色素 C 能与 Caspase-9 形成凋亡小体, Caspase-9 自我活化后再激活 Caspase-3, 从而促进细胞凋亡。LI 等^[10]发现, GEM 作用于人胰腺癌 CFPAC-1 细胞系后, 抑制 Bcl-2 蛋白的表达, 即 Bax/Bcl-2 比率升高, 两者形成同二聚体, 降低线粒体跨膜电位。随着 Ca²⁺ 浓度升高, 激活启动因子 Caspase-9, 进一步诱导“死亡蛋白酶”、Caspase-3, 进而引起细胞走向凋亡。研究表明, 经 GEM 联合放疗处理的胰腺癌 BXPC-3 细胞出现 Bax 基因表达升高, Bcl-2 基因表达降低, 这些细胞表现出更高的放射敏感性^[11]。本实验研究 GEM 联合放疗作用于舌鳞癌 Tca8113 细胞得出类似结果, 与单纯放疗组比较, GEM 联合放疗组可通过诱导舌癌 Tca8113 细胞中 Bcl-2 蛋白, 使 Bcl-2 蛋白表达水平下降, Bax 蛋白表达则升高。Caspase-3 是 Caspase 级联反应中发挥凋亡作用的执行者, Caspase-3 通常以酶原的形式存在, 活化后形成 Cleaved Caspase-3 发挥凋亡作用^[12]。本实验中, GEM 联合放疗组中 Cleaved Caspase-9、Cleaved Caspase-3 蛋白表达比单纯放疗组更显著, 与 Bcl-2 表达变化相反。笔者推测, GEM 联合放疗可以通过线粒体介导内

源性途径诱导 Tca8113 细胞的凋亡, 增加放射敏感性, 这与 WOUTERS 等^[13] 研究结果一致。

综上所述, GEM 具有增强放疗诱导 Tca8113 细胞凋亡的能力, 可提高舌癌的放射敏感性。其主要机制可能是促进 Bax 基因的表达, 抑制 Bcl-2 进而激活 Caspase-9, 活化 Caspase-3, 下游底物剪切被激活, 进而诱导细胞凋亡。

参 考 文 献:

- [1] ZHENG G, JIA X, PENG C, et al. The miR-491-3p/mTORC2/FOXO1 regulatory loop modulates chemo-sensitivity in human tongue cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(9): 6931-6943.
- [2] 张玉莲, 周晓红, 何云, 等. 老年舌鳞状细胞癌的手术治疗及放疗治疗疗效分析[J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2014(6): 706-708.
- [3] CHOI Y, YUN M S, LIM S H, et al. Gemcitabine and docetaxel combination for advanced soft tissue sarcoma: a nationwide retrospective Study[J]. *Cancer Research & Treatment Official Journal of Korean Cancer Association*, 2018, 50(1): 175-182.
- [4] 李林均, 陈元. 吉西他滨对非小细胞肺癌细胞株 A-549 放疗增敏的机制[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2008, 29(1): 98-101.
- [5] XIE D, YANG Q, CHEN D, et al. Gemcitabine-based cytotoxic doublets chemotherapy for advanced pancreatic cancer: updated subgroup meta-analyses of overall survival[J]. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 2010, 40(5): 432-441.
- [6] 张帆, 谢贤和. 吉西他滨抑制人胰腺癌细胞增殖与诱导凋亡的研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015(7): 508-510.
- [7] 徐强, 李朝旭, 叶招明. 氯化两面针碱对人骨肉瘤细胞的诱导凋亡作用及其机制[J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31(2): 361-364.
- [8] YOUN J Y, KIM, HAE J H, et al. Anticancer effects of oligomeric proanthocyanidins on human colorectal cancer cell line, SNU-C4[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(30): 4674-4678.
- [9] 郑庆委, 高淑娟, 吕杰, 等. 虫草素对人舌癌细胞凋亡, 自噬的影响及其分子机制[J]. *南方医科大学学报*, 2018, 38(4): 390-394.
- [10] LI Z, ZOU X, ZHU H, et al. Inhibitory effect of baicalein combined with gemcitabine in human pancreatic cancer cell lines[J]. *Oncology Letters*, 2018, 15(4): 5459-5464.
- [11] 李显桃, 赵洪瑜, 王燕, 等. 吉西他滨对人胰腺癌细胞系 BXPC-3 的放射增敏作用及其机制探讨[J]. *山东医药*, 2011, 51(21): 62-63.
- [12] 方政. 沉默 EZH2 诱导舌癌 Tca-8113 细胞凋亡及其对放射敏感性的影响[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2018, 38(8): 561-566.
- [13] WOUTERS A, PAUWEL B, LARLOW F, et al. In vitro study on the schedule-dependency of the interaction between pemetrexed, gemcitabine and irradiation in non-small cell lung cancer and head and neck cancer cells[J]. *Bmc Cancer*, 2010, 10(1): 1-14.

(唐勇 编辑)