

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.04.004
文章编号: 1005-8982(2020)04-0021-08

小牛脾提取物注射液对人肺癌细胞增殖及放射敏感性的影响

顾宏韬¹, 赵远红², 高国青¹, 李琪¹

(1. 天津市中医药研究院附属医院 肿瘤科, 天津 300120; 2. 天津市中医药大学第一附属医院 肿瘤科, 天津 300073)

摘要: 目的 探讨小牛脾提取物注射液(CSEI)对人肺癌细胞A549增殖及放射敏感性的影响。**方法** 分别采用不同浓度的CSEI及不同放射剂量处理A549细胞48 h后,用MTT法和平板克隆实验检测细胞增殖抑制率、增敏比(SER)及细胞集落形成率;PI单染和Annexin V-FITC/PI双染法检测CSEI和放射线对细胞周期和凋亡的影响;彗星实验检测细胞核DNA双链损伤;Western blotting检测Bcl-2、Bax、MDR1及Survivin的表达。**结果** 经MTT法检测,1.0 mg/ml是CSEI的无毒最高剂量。1.0 mg/ml CSEI预处理后,可增加不同剂量(2、4、6、8及10 Gy)放射线对A549细胞增殖的抑制作用($P < 0.05$),SER为 (1.42 ± 0.06) 。克隆形成实验显示,放射线(5 Gy)+CSEI(1.0 mg/ml)组集落形成能力最弱($P < 0.05$)。彗星实验和流式细胞术结果显示,放射线(5 Gy)+CSEI(1.0 mg/ml)组细胞核拖尾细胞数、尾长、尾距及凋亡率多于空白对照组、放射线组及CSEI组细胞($P < 0.05$),而且与空白对照组比较,放射线(5 Gy)+CSEI(1.0 mg/ml)组G1期细胞和S期细胞减少,而G2/M期细胞增多;同时放射线(5 Gy)+CSEI(1.0 mg/ml)组Bcl-2和Survivin蛋白表达下降,Bax蛋白表达升高($P < 0.05$)。**结论** 1.0 mg/ml CSEI可增强人肺腺癌细胞系A549对放射线的敏感性,其作用机制可能与影响肿瘤细胞周期、促进肿瘤细胞凋亡及细胞核DNA双链损伤等有关。

关键词: 肺肿瘤;放射治疗;辐射耐受性;细胞增殖;细胞凋亡

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Effect of calf spleen extraction injection on proliferation and radiosensitivity in lung cancer cell

Hong-tao Gu¹, Yuan-hong Zhao², Guo-qing Gao¹, Qi Li¹

(1. Department of Oncology, Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Tianjin 300120, China; 2. Department of Oncology, The First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300073, China)

Abstract: Objective To discuss the effect of calf spleen extraction injection (CSEI) on proliferation and radiosensitivity in lung cancer cell A549. **Methods** A549 cells were treated with different concentrations of CSEI or different radiation doses for 48h. Cell proliferation inhibition rate, sensitivity enhancement ratio (SER) and colony formation rate were accessed by MTT assay and plate colony formation assay. Propidium iodide (PI) staining and Annexin V-FITC/PI staining were respectively used for cell cycle and apoptosis of A549 cells. Comet assay was to detected the DNA damage. The B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), bcl-2-associated X protein (Bax), multi-drug resistance1 (MDR1) and Survivin proteins levels of A549 cells were detected by western blot. **Results** By MTT assay, 1.0 mg/mL would be the highest non-toxic dose of CSEI. CSEI (1.0 mg/mL) pretreatment might increase the inhibition rate of

收稿日期: 2019-08-24

[通信作者] 赵远红, E-mail: piao28628@163.com; Tel: 15522852908

radiation (2, 4, 6, 8, 10 Gy) on A549 cells ($P < 0.05$). And sensitivity enhancement ratio (SER) was (1.42±0.06). Cloning formation experiment showed the colony formation ability of CSEI (1.0 mg/mL) + radiation (5 Gy) group was the least ($P < 0.05$). As the results of comet assay and flow cytometry, the tailing cell amount, tail length, tail distance and apoptosis rate of A549 cells in CSEI (1.0 mg/mL) + radiation (5 Gy) group were more than those in control group, radiation group and CSEI group ($P < 0.05$). Meanwhile, compared with control group, radiation group and CSEI group, cell amount in G1 stage and S stage were less, but in G2/M stages was more; and Bcl-2 and Survivin proteins levels were lower, Bax protein level was higher ($P < 0.05$). **Conclusions** There are significant evidences that 1.0 mg/mL of CSEI would enhance the sensitivity of A549 cells to radiation, which could be related with tumor cell cycle, apoptosis, nucleus DNA double-strand damage, etc.

Keywords: lung neoplasms; radiotherapy; radiation tolerance; proliferation; apoptosis

放射治疗是临床治疗肺癌的主要手段之一,因存在较大的个体差异性,尤其是部分低分化癌对放射线敏感性较低^[1],需要提高局部放射剂量以期获得良好的控制率及预后,可能导致毒副反应加重,影响患者生活质量。寻找高效低毒的放射治疗增敏剂一直是肿瘤领域的研究热点。小牛脾提取物注射液(calf spleen extraction injection, CSEI)是提取出生 24 h 内乳牛脾脏的一类无菌注射水溶液,主要成分为多肽与核糖^[2]。赵岩玲等^[3]学者证实,CSEI可以降低晚期非小细胞肺癌患者血清肿瘤标志物水平,提高机体免疫力,进而延长患者带瘤生存期。有学者提出,CSEI可以降低乳腺癌、鼻咽癌等放射治疗后出现皮肤损伤或口腔黏膜炎症等不良反应的风险^[4]。但其是否对放射线具有增敏作用,文献研究报道较少。多数放射治疗增敏剂的作用机制为改善肿瘤细胞缺氧状态、诱导肿瘤细胞凋亡、调节细胞周期等^[5]。我国一直十分重视放射增敏剂的研究,虽然已投入大量时间和精力,但是研发成果并不理想,因此寻找新的放射增敏剂对抗癌治疗具有深远意义。本文首先从细胞层面探讨 CSEI 对肺癌细胞放射治疗增敏的可能;其次进一步从蛋白分子层面分析 CSEI 放射治疗增敏可能的作用机制,从而为寻找新的放射治疗增敏剂及开发 CSEI 新的临床应用提供一定的理论支持,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

CSEI(吉林敖东洮南药业股份有限公司,国药准字 H22026121,规格:2 ml/5 mg,多肽:380 μg 核糖),RPMI 1640 培养基、D' Hank's 液及胎牛血清(法国 Biowest 公司),链-青(P/S)双抗(美国 Gibco 公司),MTT(美国 Sigma 公司),彗星检测试剂盒和 Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒(上海碧云天生物技术有限

公司),Bcl-2 抗体、Bax 抗体及 MDR1(美国 Santa-Cruz 公司),Survivin 抗体(美国 Abcam 公司),JEM-100CX II 型透射电镜(日本电子公司)。FACS Canto II 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 方法

人肺腺癌细胞系 A549 购自中国科学院上海生命科学研究所细胞库,细胞培养体系:10% 胎牛血清,100 u/ml P/S 双抗,90% RPMI 1640 培养液。调整细胞计数 1×10^7 个/ml,培养条件:37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 细胞培养箱。细胞毒性实验分组:空白对照组和 CSEI 组(0.01、0.10、1.00、10.00 及 100.00 mg/ml)。细胞增殖实验分组:待细胞贴壁后,分为空白对照组、放射线组(2、4、6、8 及 10 Gy)及放射线(2、4、6、8 及 10 Gy)+CSEI(1.0 mg/ml)组。彗星实验和凋亡实验分组:待细胞贴壁后,分为空白对照组、放射线组(5 Gy)及 CSEI 组(1.0 mg/ml)和放射线组(5 Gy)+CSEI(1.0 mg/ml)组。空白对照组细胞不接受任何特殊处理。放射条件:采用医用 6MeV X 射线,照射剂量为 5 Gy,剂量率为 200 cGy/min,源靶距为 100 cm,照射视野为 20 cm × 20 cm。

1.3 MTT 法

将对数期生长的 A549 细胞按 1×10^3 个/孔单层接种至 96 孔板中,分为空白对照组、CSEI(0.01、0.10、1.00、10.00 及 100.00 mg/ml)组,每组设置 8 个平行孔,培养 22 ~ 24 h 后,CSEI 组细胞分别接受不同梯度 CSEI;继续培养 48 h 后,按照 MTT 法检测 490 nm 波长处的光密度(optical density, OD)值。计算细胞增殖抑制率:增殖抑制率(%)=1-OD 值(受试孔)/OD 值(对照孔) × 100%;另外采用相同方法检测 CSEI 对 A549 细胞放射线的增敏作用。将接种细胞分为空白对照组、放射线组(2、4、6、8 及 10 Gy)和放射线(2、4、6、8 及 10 Gy)+CSEI(1.0 mg/ml)组,

每组设置8个平行孔,培养22~24 h后,放射线组+CSEI组细胞加入1.0 mg/ml CSEI;2 h后,放射线组和放射线+CSEI组细胞分别接受不同梯度照射剂量,继续培养48 h后,按照MTT法检测OD值,计算细胞增殖抑制率和增敏比(sensitivity enhancement ratio, SER)。SER=放射线组 D_0 /放射线+CSEI组 D_0 。 D_0 为细胞增殖活性下降50%时的放射剂量,即半数致死剂量。

1.4 平板克隆实验

将对数期生长的A549细胞按 1×10^3 个/孔单层接种至6孔板中,待细胞贴壁后分为空白对照组、放射线组(5 Gy)、CSEI组(1.0 mg/ml)和放射线(5 Gy)+CSEI(1.0 mg/ml)组,处理方式同MTT法测定。培养10~14 d后,加入4%多聚甲醛固定,吉姆萨染色,统计各组细胞集落(≥ 50 个细胞)形成数。

1.5 中性彗星实验检测DNA双链断裂损伤

取对数期生长的A549细胞,分为空白对照组、放射线组(5 Gy)、CSEI组(1.0 mg/ml)和放射线组(5 Gy)+CSEI(1.0 mg/ml)组,处理方式同MTT法。收集细胞,调整细胞浓度为 1×10^7 个/ml,采用彗星检测试剂盒检测DNA修复。用溴化乙啶染色后,置于荧光显微镜下观察细胞核拖尾情况,并采用CASP软件进行分析。尾距越长,说明DNA双链断裂情况越严重。双链断裂程度(%)=受试组彗星拖尾长度/空白对照组彗星拖尾长度 $\times 100\%$ 。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡

取对数期生长的A549细胞,分为空白对照组、放射线组(5 Gy)、CSEI(1.0 mg/ml)组和放射线组(5 Gy)+CSEI(1.0 mg/ml)组,处理方式同MTT法。每组分别收集2管细胞,调整细胞浓度为 1×10^7 个/ml,第1管加入20 μ l RNase A溶液,37 $^{\circ}$ C水浴30 min,加入400 μ l PI染色,上机检测细胞周期变化;第2管加入500 μ l Binding Buffer、5 μ l Annexin V-FITC,混匀,室温避光孵育4 h,上机前20 min加入5 μ l PI,上机检测细胞凋亡情况。

1.7 Western blotting 检测相关蛋白

收集空白对照组、放射线组(5 Gy)、CSEI组(1.0 mg/ml)和放射线(5 Gy)+CSEI(1.0 mg/ml)组,加入PMSF细胞裂解液,提取蛋白。采用BCA蛋白测定试剂盒检测蛋白浓度。加热煮沸,使蛋白变性,10% SDS-PAGE电泳分离,转膜,脱脂牛奶密闭,分

别加入Bcl-2抗体(1:500稀释)、Bax抗体(1:500稀释)、Survivin抗体(1:1000稀释)及MDR1抗体(1:1000稀释),置于4 $^{\circ}$ C摇床上过夜。采用TBST反复冲洗,加入二抗(1:5000稀释)。ECL试剂显影,拍照。

1.8 统计学方法

数据分析采用SPSS 17.0统计软件和Graph Pad Prism7.0软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用独立样本 t 检验或单因素方差分析或析因设计的方差分析,进一步两两比较用SNK- q 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CSEI对A549细胞的毒性作用

MTT法检测显示,不同浓度CSEI(0.01、0.10、1.00、10.00及100.00 mg/ml)处理后,细胞增殖活性受到抑制,分别为(0.56 \pm 0.43)%、(0.88 \pm 0.74)%、(1.25 \pm 0.85)%、(23.42 \pm 4.75)%及(44.89 \pm 9.82)%。0.01、0.10及1.00 mg/ml CSEI对A549细胞增殖抑制作用基本一致,经单因素方差分析,差异无统计学意义($F=1.967, P=0.165$)。1.00、10.00及100.00 mg/ml CSEI对A549细胞增殖抑制率比较,经单因素方差分析,差异有统计学意义($F=95.455, P=0.000$),且进一步两两比较,均差异有统计学意义($P < 0.05$)。1.0 mg/ml是CSEI无毒的最高剂量。见图1。

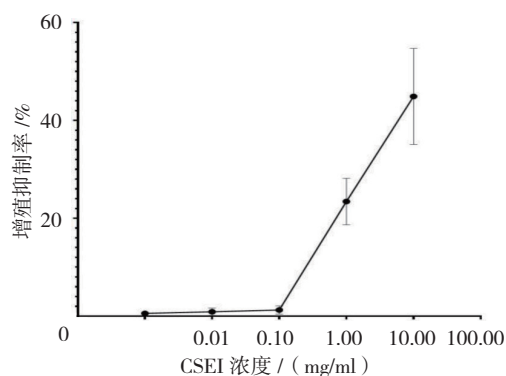


图1 CSEI对A549细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

2.2 CSEI对A549细胞照射后增殖活性的影响

MTT法检测显示,不同放射剂量(2、4、6、8及10 Gy)照射后,细胞增殖活性受到抑制, D_0 为5.997 Gy。而不同放射组细胞给予CSEI(1.0 mg/ml)预处理后,各组细胞增殖抑制率比较,经析因设计的方差分析,处理因素CSEI的主效应比较,差异有

统计学意义 ($F = 136.124, P = 0.000$)；处理因素放射线的主效应比较，差异有统计学意义 ($F = 89.675, P = 0.000$)。两者交互作用比较，差异无统计学意义 ($F = 2.145, P = 0.196$)。因而无论是否进行 CSEI 处理，经不同放射剂量 (2、4、6、8 及 10 Gy) 照射后，

细胞增殖活性均受到抑制；而给予 CSEI (1.0 mg/ml) 预处理后，能够增强放射线对 A549 细胞增殖活性的抑制作用。放射线组 D_0 为 5.997 Gy，放射线 + CSEI (1.0 mg/ml) 组 D_0 为 4.216 Gy。SER 为 (1.42 ± 0.06) 。见表 1 和图 2。

表 1 两组 A549 细胞经不同放射剂量照射后增殖抑制率的变化 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 2 Gy | 4 Gy | 6 Gy | 8 Gy | 10 Gy |
|--------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 放射线组 | 11.43 ± 2.57 | 16.38 ± 3.79 | 50.74 ± 5.93 | 69.35 ± 6.47 | 73.62 ± 6.58 |
| 放射线 + CSEI (1.0 mg/ml) 组 | 24.85 ± 3.16 | 43.24 ± 4.41 | 69.53 ± 6.28 | 82.92 ± 7.63 | 86.45 ± 7.98 |

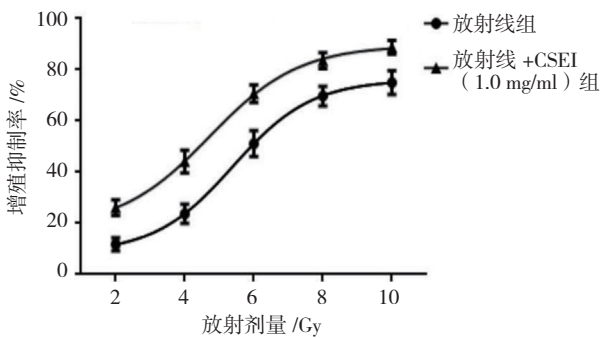
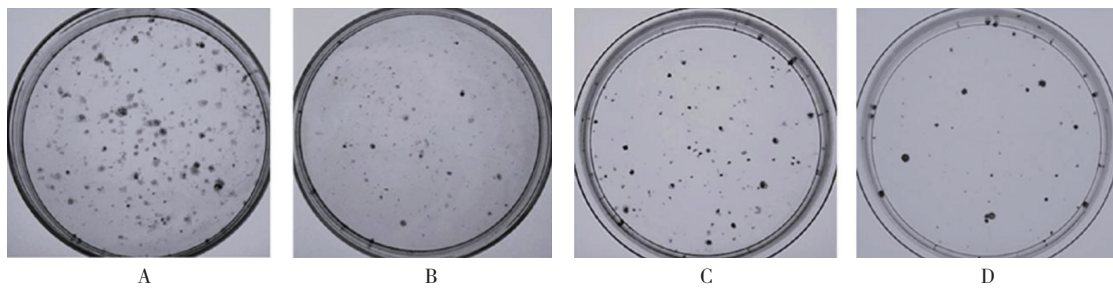


图 2 两组 A549 细胞增殖率的变化趋势 ($\bar{x} \pm s$)

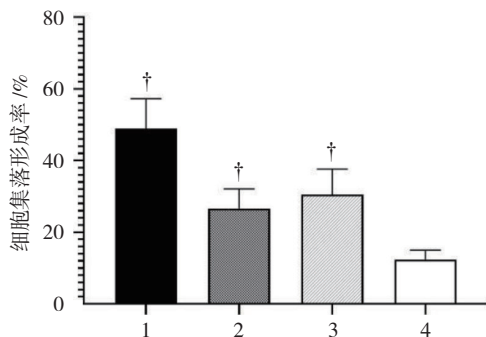
2.3 CSEI 对 A549 细胞照射后集落形成的影响

平板克隆试验结果显示，空白对照组、放射线组 (5 Gy)、CSEI 组 (1.0 mg/ml) 及放射线 (5 Gy) + CSEI (1.0 mg/ml) 组细胞集落形成率分别为 $(48.88 \pm 8.37)\%$ 、 $(26.63 \pm 5.46)\%$ 、 $(30.50 \pm 7.12)\%$ 及 $(12.38 \pm 2.64)\%$ ，经单因素方差分析，差异有统计学意义 ($F = 45.897, P = 0.000$)，放射线 (5 Gy) + CSEI (1.0 mg/ml) 组细胞集落形成率低于空白对照组、放射线组 (5 Gy) 及 CSEI 组 (1.0 mg/ml) ($P < 0.05$)。见图 3、4。



A: 空白对照组; B: 放射线组 (5 Gy); C: CSEI 组 (1.0 mg/ml); D: 放射线 (5 Gy) + CSEI (1.0 mg/ml) 组。

图 3 各组 A549 细胞克隆实验细胞集落



1: 空白对照组; 2: 放射线组 (5 Gy); 3: CSEI 组 (1.0 mg/ml); 4: 放射线组 (5 Gy) + CSEI (1.0 mg/ml) 组。† 与放射线 (5 Gy) + CSEI (1.0 mg/ml) 组比较, $P < 0.05$ 。

图 4 各组 A549 细胞集落形成率比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.4 CSEI 对 A549 细胞照射后 DNA 双链断裂损伤的影响

中性彗星实验结果显示，空白对照组、放射线组 (5 Gy)、CSEI 组 (1.0 mg/ml) 及放射线 (5 Gy) + CSEI (1.0 mg/ml) 组细胞核拖尾细胞数、尾长及尾距，经单因素方差分析，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，放射线 (5 Gy) + CSEI (1.0 mg/ml) 组细胞核拖尾细胞数、尾长、尾距多于其他组 ($P < 0.05$)。见表 2 和图 5。

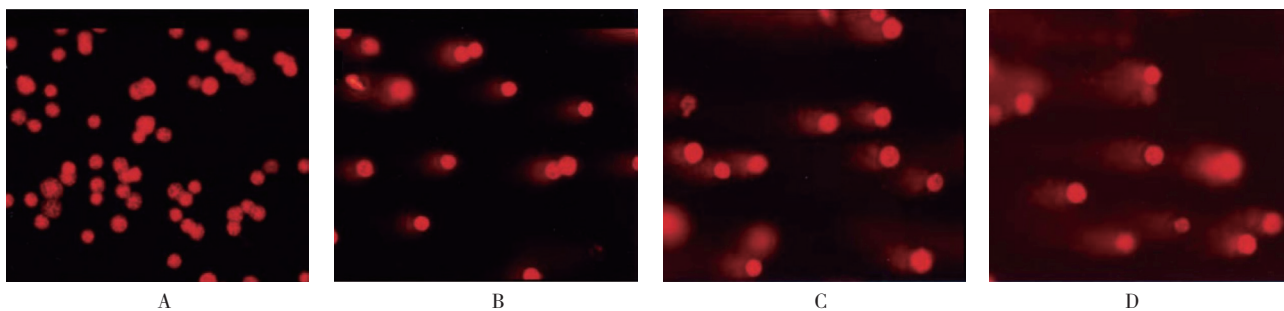
2.5 CSEI 对 A549 细胞照射后凋亡活性的影响

流式细胞术结果显示，空白对照组、放射线组 (5 Gy)、CSEI 组 (1.0 mg/ml)、放射线 (5 Gy) + CSEI (1.0 mg/ml) 组细胞凋亡率分别为 $(4.85 \pm 1.32)\%$ 、

表 2 各组 A549 细胞的拖尾细胞数、尾长、尾距比较 (n=200, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 拖尾细胞数 | 尾长 / μm | 尾距 / μm |
|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 空白对照组 | 23.38 \pm 4.12 | 30.25 \pm 2.77 | 3.41 \pm 0.68 |
| 放射线组 (5 Gy) | 67.75 \pm 12.31 | 45.73 \pm 4.26 | 6.62 \pm 0.95 |
| CSEI 组 (1.0 mg/ml) | 44.50 \pm 9.87 | 38.97 \pm 4.10 | 5.57 \pm 0.82 |
| 放射线 (5 Gy) + CSEI (1.0 mg/ml) 组 | 120.63 \pm 27.65 ^{①②③} | 72.58 \pm 4.73 ^{①②③} | 26.34 \pm 1.76 ^{①②③} |
| F 值 | 54.359 | 164.159 | 715.423 |
| P 值 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

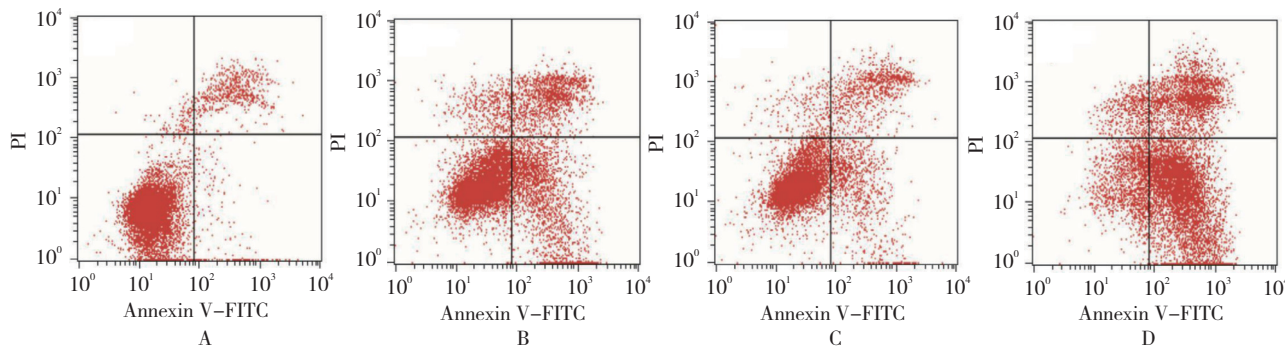
注: ①与空白对照组比较, $P < 0.05$; ②与放射线组 (5 Gy) 比较, $P < 0.05$; ③与 CSEI (1.0 mg/ml) 组比较, $P < 0.05$ 。



A: 空白对照组; B: 放射线组 (5 Gy); C: CSEI 组 (1.0 mg/ml); D: 放射线 (5 Gy) + CSEI (1.0 mg/ml) 组。

图 5 各组 A549 细胞的彗星图像 ($\times 400$)

(38.76 \pm 6.53) %、(28.70 \pm 5.43) %、(56.74 \pm 8.79) %, $P = 0.000$); 放射线 (5 Gy) + CSEI (1.0 mg/ml) 组细胞凋亡率高于其他组 ($P < 0.05$)。见图 6、7。



A: 空白对照组; B: 放射线组 (5 Gy); C: CSEI 组 (1.0 mg/ml); D: 放射线 (5 Gy) + CSEI (1.0 mg/ml) 组。

图 6 CSEI 和放射线对 A549 细胞凋亡活性的影响

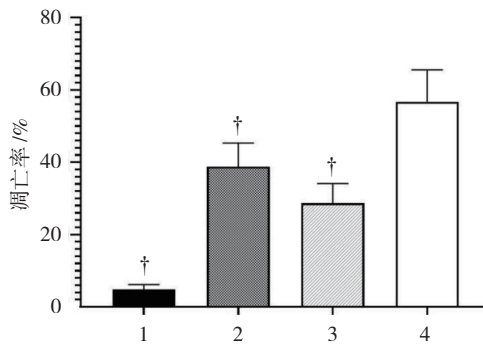
2.6 CSEI 对 A549 细胞照射后细胞周期的影响

流式细胞术结果显示, 空白对照组、放射线组 (5 Gy)、CSEI 组 (1.0 mg/ml) 及放射线 (5 Gy) + CSEI (1.0 mg/ml) 组 G1 期、G2/M 期和 S 期细胞比例比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与空白对照组比较, 放射线 (5 Gy) + CSEI (1.0 mg/ml) 组 G1 期细胞和 S 期细胞减少 ($P < 0.05$); 而 G2/M 期细胞增多 ($P < 0.05$)。见

表 3。

2.7 CSEI 和放射线对 A549 细胞 Bcl-2、Bax、Survivin 及 MDR1 蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果显示, 空白对照组、放射线组 (5 Gy)、CSEI 组 (1.0 mg/ml) 及放射线 (5 Gy) + CSEI (1.0 mg/ml) 组细胞 Bcl-2、Bax 及 Survivin 蛋白相对表达量比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 放射线 (5 Gy) + CSEI



1: 空白对照组; 2: 放射线组 (5 Gy); 3: CSEI 组 (1.0 mg/ml); 4: 放射线 (5 Gy) +CSEI (1.0 mg/ml) 组。†与放射线 (5 Gy) +CSEI (1.0 mg/ml) 组比较, $P < 0.05$ 。

图 7 各组 A549 细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

(1.0 mg/ml) 组细胞 Bcl-2 和 Survivin 蛋白相对表达量低于其他组 ($P < 0.05$); 而 Bax 蛋白相对表达量高于其他组 ($P < 0.05$)。空白对照组、放射线组 (5 Gy)、CSEI 组

表 3 CSEI 和放射线对 A549 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | G1 期 | G2/M 期 | S 期 |
|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 空白对照组 | 74.83 ± 2.92 | 18.46 ± 1.27 | 7.65 ± 1.33 |
| 放射线组 (5 Gy) | 63.51 ± 2.75 | 24.67 ± 1.78 | 5.08 ± 1.56 |
| CSEI 组 (1.0 mg/ml) | 79.16 ± 2.93 | 16.53 ± 1.96 | 3.82 ± 1.25 |
| 放射线 (5 Gy) +CSEI (1.0 mg/ml) 组 | 65.49 ± 3.16 ^{①②③} | 32.69 ± 1.84 ^{①②③} | 1.84 ± 0.59 ^{①②③} |
| F 值 | 53.168 | 141.286 | 30.987 |
| P 值 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

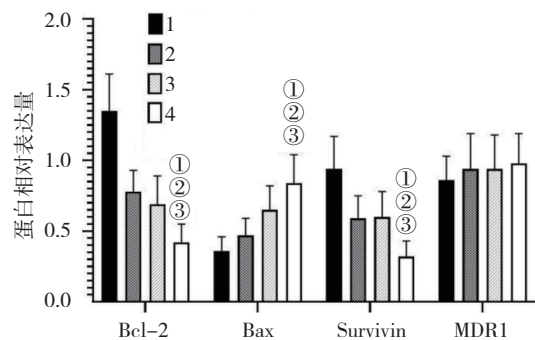
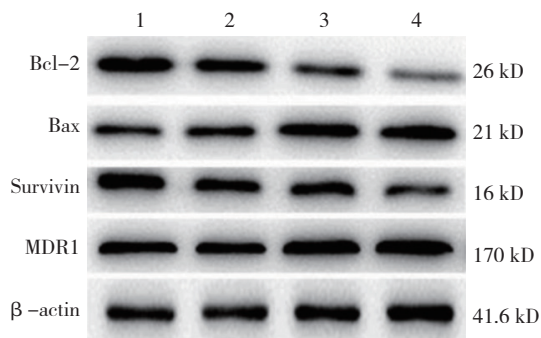
注: ①与空白对照组比较, $P < 0.05$; ②与放射线组 (5 Gy) 比较, $P < 0.05$; ③与 CSEI 组 (1.0 mg/ml) 比较, $P < 0.05$ 。

(1.0 mg/ml) 及放射线 (5 Gy) +CSEI (1.0 mg/ml) 组细胞 MDR1 蛋白相对表达量比较, 经单因素方差分析, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4 和图 8。

表 4 各组 A549 细胞 Bcl-2、Bax、Survivin 及 MDR1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | Bcl-2 | Bax | Survivin | MDR1 |
|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------|
| 空白对照组 | 1.35 ± 0.26 | 0.36 ± 0.10 | 0.94 ± 0.23 | 0.86 ± 0.17 |
| 放射线组 (5 Gy) | 0.78 ± 0.15 | 0.47 ± 0.12 | 0.59 ± 0.16 | 0.94 ± 0.25 |
| CSEI 组 (1.0 mg/ml) | 0.69 ± 0.20 | 0.65 ± 0.17 | 0.60 ± 0.18 | 0.94 ± 0.24 |
| 放射线 (5 Gy) +CSEI (1.0 mg/ml) 组 | 0.42 ± 0.13 ^{①②③} | 0.84 ± 0.20 ^{①②③} | 0.32 ± 0.11 ^{①②③} | 0.98 ± 0.21 |
| F 值 | 33.308 | 15.211 | 16.783 | 0.420 |
| P 值 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.740 |

注: ①与空白对照组比较, $P < 0.05$; ②与放射线组 (5 Gy) 比较, $P < 0.05$; ③与 CSEI 组 (1.0 mg/ml) 比较, $P < 0.05$ 。



1: 空白对照组; 2: 放射线组 (5 Gy); 3: CSEI 组 (1.0 mg/ml); 4: 放射线 (5 Gy) +CSEI (1.0 mg/ml) 组。①与空白对照组比较, $P < 0.05$; ②与放射线组 (5 Gy) 比较, $P < 0.05$; ③与 CSEI 组 (1.0 mg/ml) 比较, $P < 0.05$ 。

图 8 各组细胞 Bcl-2、Bax、Survivin 及 MDR1 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

放射治疗是肺癌最常用的治疗手段之一, 基本原理是通过电离辐射诱导细胞核 DNA 损伤, 从而促进凋亡。多年临床实践证实, 不同患者放射敏感性和耐

受性差异较大, 是影响患者预后, 导致治疗失败的主要原因^[6]。有学者提出放射治疗增敏剂的概念, 主要为硝基咪唑类化合物及其衍生物^[7]。但是由于化学合成制剂本身具有严重的毒副作用, 从而限制其在临床

的大力推广。CSEI 在临床主要用于提高机体免疫力,同时可作为放射不良反应的辅助治疗用药。但是尚未有研究分析 CSEI 可作为放射治疗增敏剂的可能。

理想的放射治疗增敏剂应该具有性质稳定、细胞毒性低、增敏作用可逆转等特点^[8]。本研究中,首先通过 MTT 法确定 CSEI 最高无毒剂量为 1.0 mg/ml。因此,笔者在后续实验中初步选定 1.0 mg/ml 作为 CSEI 的用药剂量。进一步采用 MTT 法,在放射线照射前 2 h 先给予 1.0 mg/ml CSEI 预处理,证实 1.0 mg/ml CSEI 可增加不同照射剂量对 A549 细胞增殖的抑制作用,辐射增敏比为 (1.42 ± 0.06); 另外,放射线 (5 Gy) + CSEI (1.0 mg/ml) 组细胞集落形成率低于空白对照组、放射线组 (5 Gy) 及 CSEI 组 (1.0 mg/ml), 从而推断 1.0 mg/ml CSEI 对 A549 细胞具有放射增敏作用。

目前,关于放射增敏剂作用机制的研究主要集中在影响细胞周期、促进肿瘤细胞凋亡、靶向提高信号转导通路的敏感性及增加放射线对肿瘤细胞的原发性损伤等方面^[9]。钱鹏飞等^[10]学者通过临床研究证实,小牛脾提取物可提高晚期乳腺癌患者化学治疗的疗效,改善生活质量,减轻化学治疗相关的骨髓抑制毒副反应,增强机体的免疫功能,对晚期肿瘤患者临床化学治疗有积极地推进作用。程惠华等^[11]学者也证实,CSEI 对接受同步放射治疗、化学治疗的宫颈癌患者在保护骨髓和提高生活质量等方面具有很好的作用。但是目前关于 CSEI 对放射治疗的增敏作用研究尚少。本研究中,关于 CSEI 放射增敏机制的研究,首先通过中性彗星实验结果证实,放射线 (5 Gy) + CSEI (1.0 mg/ml) 组细胞核拖尾细胞数、尾长及尾距较空白对照组、放射线组 (5 Gy) 及 CSEI 组 (1.0 mg/ml) 增加,说明 1.0 mg/ml CSEI 增加 A549 细胞对放射线敏感性的机制可能与增加放射线诱导肿瘤细胞 DNA 损伤有关。其次,通过流式细胞术检测还发现,放射线 (5 Gy) + CSEI (1.0 mg/ml) 组细胞凋亡率高于空白对照组、放射线组 (5 Gy) 或 CSEI 组 (1.0 mg/ml), 从而推断促进肿瘤细胞凋亡可能也是 CSEI 放射治疗的增敏作用机制之一。另外有研究显示,处于不同细胞周期时相的细胞对放射线的敏感性不同,放射线主要是将细胞周期阻滞于 M 期和 G1 末期,而对 G0 期细胞影响较小^[12]。但是在本研究中,笔者发现 CSEI 组 (1.0 mg/ml) G1 期细胞增多, S 期细胞数减少,说明 CSEI 可特异性阻碍肿瘤细胞由 G1/G0 期向 G2 期和 S 期转化,而且放射线 (5 Gy) + CSEI (1.0 mg/ml) 组 G1 期细胞和 S 期细胞减少,

G2/M 期细胞增多,说明 CSEI 可能与放射治疗产生协同作用,阻止肿瘤细胞向 DNA 合成期 (S 期) 转化,从而提高放射治疗的疗效。

笔者还进一步从蛋白分子水平分析 CSEI 对 A549 细胞放射治疗增敏作用的主要机制。Bcl-2 家族蛋白和 Survivin 都属于重要的细胞凋亡相关蛋白, Bcl-2 属于抗凋亡因子,主要通过调节细胞色素 C 的释放来促进 Bax 或抑制 Bcl-2 诱导细胞凋亡^[13]。当抗凋亡基因 *Bcl-2* 表达上调时, Bcl-2 与 Bax 形成异源二聚体,从而抑制细胞凋亡^[14]。而 Survivin 也属于凋亡抑制蛋白^[15],在多数肺癌组织中呈高表达,是目前肿瘤治疗最重要的分子靶标之一^[16]。余江涛等^[17]学者证实, Survivin 和 Bcl-2 蛋白在肿瘤组织中的表达呈正相关。沉默 *Survivin* 基因表达后,可诱导肿瘤细胞凋亡和 Bcl-2 蛋白表达下调。本研究中, CSEI 与放射线联合作用,可抑制 Bcl-2 和 Survivin 蛋白表达;同时上调 Bax 蛋白表达水平。黎喜梅等^[18]学者证实,放射治疗可诱导肿瘤组织中 MDR1 蛋白表达上调,从而降低肿瘤细胞对放射线的敏感性。本研究中,通过 Western blotting 并未发现 CSEI 对 MDR1 蛋白表达的影响,但是并不能说明 MDR1 蛋白分子未参与 CSEI 和放射线对肿瘤细胞增殖的抑制作用。

综上所述, 1.0 mg/ml CSEI 可增加人肺腺癌细胞系 A549 对放射线的敏感性,其作用机制可能与影响肿瘤细胞周期、促进肿瘤细胞凋亡及细胞核 DNA 双链损伤等有关。从而为 CSEI 用于放射治疗增敏提供一定的实验依据,但是是否可以作为放射治疗增敏剂用于临床,尚需要更全面、更系统的实验研究。

参 考 文 献:

- [1] 宋帅,赫丽杰,韩彧佳,等.非小细胞肺癌放疗抵抗研究进展[J].现代肿瘤医学,2019,27(19):3520-3523.
- [2] WU Y P, DENG J, OUYANG S H, et al. Immune regulation effect of lialen polypeptides extract in lewis lung carcinoma-bearing mice treated with cyclophosphamide[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2018, 243(1): 66-77.
- [3] 赵岩玲,王秀丽,刘萍.小牛脾提取物注射液联合吉非替尼治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究[J].现代药物与临床,2018,33(8):2060-2064.
- [4] 陶婵娜,张四喜,柯巍,等.小牛脾提取物注射液临床应用分析[J].实用药物与临床,2016,19(2):231-234.
- [5] CARDILIN T, ALMQUIST J, JIRSTRAND M, et al. Model-based evaluation of radiation and radiosensitizing agents in oncology[J]. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol, 2018, 7(1): 51-58.
- [6] HU Z G, LI W X, RUAN Y S, et al. Incidence trends and risk prediction nomogram of metachronous second primary lung cancer

- in lung cancer survivors[J]. *PLoS One*, 2018, DOI: 10.1371/journal.pone.0209002.
- [7] 冉晨曦,何人可,汤小玲,等. 肿瘤放射治疗中辐射增敏剂的应用进展 [J]. *山东医药*, 2015, 55(3): 86-88.
- [8] LI Y E, CHOI S A, KWACK P A, et al. Repositioning disulfiram as a radiosensitizer against atypical teratoid/rhabdoid tumor[J]. *Neuro Oncol*, 2017, 19(8): 1079-1087.
- [9] 赖祥丽,郭红云,冯国生. 非小细胞肺癌放射增敏的研究进展 [J]. *中国临床新医学*, 2017, 24(3): 290-293.
- [10] 钱朋飞,邹燕鹏,黎冠宏,等. 小牛脾提取物对晚期乳腺癌化疗性贫血及免疫功能的影响 [J]. *中国临床医生杂志*, 2017, 45(2): 66-70.
- [11] 程惠话,傅志超,李东石,等. 小牛脾提取物在中晚期宫颈癌同步放化疗中的作用 [J]. *临床军医*, 2011, 39(4): 698-700.
- [12] 刘伟,张建文. 阿帕替尼联合放疗对 HeLa 细胞周期和凋亡影响的体外研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 54(1): 55-58.
- [13] THOMAS S, QUINN B A, DAS S K, et al. Targeting the Bcl-2 Family for Cancer Therapy[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2013, 17(1): 61-75.
- [14] 陈涛,杜维. 非小细胞肺癌患者热休克蛋白 90 α 、凋亡促进因子 Bax、凋亡抑制因子 Bcl-2 表达水平变化及与病理学特征的相关性 [J]. *中国医学工程*, 2019, 18(8): 9-13.
- [15] SHI C T, MA J, SHI Q F, et al. High survivin and low zinc finger of the cerebellum 1 expression indicates poor prognosis in triple-negative breast carcinoma[J]. *J Breast Cancer*, 2019, 22(2): 248-259.
- [16] 黄妙灵,蔡兴东,黄志宏,等. VEGF 和 Survivin 在肺腺癌中的表达及意义 [J]. *广东医学*, 2018, 49(12): 1800-1805.
- [17] 余江涛,孙德利. 沉默 survivin 表达对甲状腺癌细胞凋亡的影响及其机制研究 [J]. *癌症进展*, 2019, 16(1): 213-216,222.
- [18] 黎喜梅,周志忠,吴超涛,等. 放疗对食管鳞癌 P-gp 和 MDR-1 表达的影响研究 [J]. *中国体视学与图像分析*, 2017, 22(3): 366-370.

(唐勇 编辑)

本文引用格式: 顾宏韬,赵远红,高国青,等. 小牛脾提取物注射液对人肺癌细胞增殖及放射敏感性的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(4): 21-28.