

奈达铂对鼻咽癌 CNE-2 细胞放射增敏研究

Radiosensitization of Nedaplatin in Nasopharyngeal Carcinoma CNE-2 Cell

WANG De-jun, WU Jian-zhong, GUO Wen-jie, et al.

王德军, 吴建中, 郭文杰, 马蓉, 王雪, 宗丹, 何侠
(江苏省肿瘤医院 南京医科大学附属肿瘤医院, 江苏 南京 210009)

摘要: [目的] 观察奈达铂对鼻咽癌 CNE-2 细胞系放射敏感性的影响, 初步探讨其作用机制。[方法] 采用 CCK-8 法检测奈达铂对鼻咽癌 CNE-2 细胞存活率影响。克隆形成实验计算各处理组的细胞存活分数, 单靶多击模型拟合细胞存活曲线并求出放射敏感性参数及放射增敏比。流式细胞仪检测奈达铂用药前后的细胞周期分布及凋亡率。Western Blot 检测 p-AKT 和 bcl-2 蛋白表达。[结果] 奈达铂对鼻咽癌 CNE-2 细胞生长有抑制作用, 具有时间及浓度依赖性。在奈达铂为 0.25mg/L 时, $SERD_0$ 和 $SERD_q$ 分别为 1.16 和 1.32; 奈达铂 0.5mg/L 时, $SERD_0$ 和 $SERD_q$ 分别达 1.23 和 1.82。以 0、0.25、0.5mg/L 奈达铂作用 CNE-2 细胞 24h 时 G_2/M 期比例分别为 $(3.66 \pm 0.38)\%$ 、 $(13.84 \pm 0.45)\%$ 和 $(42.09 \pm 0.79)\%$, 凋亡率分别为 $(4.28 \pm 1.20)\%$ 、 $(6.60 \pm 1.15)\%$ 和 $(9.20 \pm 0.65)\%$, 组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。Western Blot 结果显示: 药物组、单纯照射组及联合照射组较对照组 p-AKT、bcl-2 蛋白表达减少, 且联合照射组 p-AKT、bcl-2 蛋白表达低于其它各组。[结论] 奈达铂对鼻咽癌 CNE-2 细胞系具有放射增敏作用, 其机制可能与改变细胞周期分布及增加凋亡等有关。

关键词: 鼻咽癌; 奈达铂; 放射增敏

中图分类号: R739.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)12-0935-05

鼻咽癌是发生于鼻咽部的肿瘤, 恶性程度较高, 早期即可出现颈部淋巴结转移。目前, 该病在中国的广东、广西、福建、湖南等地多发。单纯放疗对早期鼻咽癌有良好的控制, 对于局部晚期鼻咽癌, 近年来临床研究结果逐渐支持以同步放化疗作为标准治疗方式^[1-3]。奈达铂是第二代有机铂类抗癌药物, 多项研究发现其对食管癌及宫颈癌等肿瘤具有放疗协同增敏作用, 但是对鼻咽癌放疗增敏作用如何, 目前尚无确切评价。本实验将在体外通过奈达铂对鼻咽癌 CNE-2 细胞的增敏作用及机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

奈达铂由江苏奥赛康药业提供, CCK-8 购自日本同仁公司, RPMI-1640、胎牛血清及 0.25% 胰蛋白酶均购自美国 GIBCO 公司, p-AKT、bcl-2 一抗购自

美国 Cell Signaling 公司。

1.2 细胞培养与照射方法

人鼻咽癌 CNE-2 细胞系由中山大学肿瘤防治研究所提供。细胞接种于 75cm² 培养瓶中, 培养基为含 10% FBS、100U/ml 青霉素、0.1mg/ml 链霉素的 RPMI-1640, 置于 37℃、5%CO₂ 恒温培养箱中培养, 每 2d 换液 1 次, 用 0.25% 胰蛋白酶消化贴壁细胞。照射方法: 电子直线加速器 (Varian 美国) 6MV X 线、SSD=100cm、20×20cm 野、剂量率 200cGy/min, 培养皿下方垫 1cm 厚硅胶, 机头旋转 180°。

1.3 CCK-8 实验

取对数生长期 CNE-2 细胞, 以 0.25% 胰蛋白酶消化并制成单细胞悬液, 细胞浓度调整为 1×10^4 个/ml, 于 96 孔培养板中每孔接种悬液 100μl, 置 CO₂ 温箱中培养 24h, 更换含有奈达铂 (浓度分别为 0、0.25、0.5、1、2、4、8mg/L) 的 RPMI-1640 完全培养基, 继续培养 12h、24h、36h、48h 后, 更换含有 10% CCK-8 的 RPMI-1640 培养基, 温箱中孵育 30min, 酶联免疫检测仪 450nm 处测 OD 值。按以下公式计算存活率: 存

收稿日期: 2012-09-11; 修回日期: 2012-10-08

通讯作者: 何侠, E-mail: hexia2003@tom.com

活率(%)=(实验组细胞的 OD 值-空白组 OD 值/阴性对照组细胞的 OD 值-空白组 OD 值)×100%。

1.4 克隆形成实验

取对数生长期的 CNE-2 细胞,根据准备接种的细胞数将细胞接种于 65mm 培养皿中,CO₂ 温箱中培养 24h。将培养皿分 3 组(奈达铂 0mg/L+照射组、奈达铂 0.25mg/L+照射组、奈达铂 0.5mg/L+照射组),每组加入含相应浓度奈达铂的完全培养基,12h 后给予不同剂量照射,剂量点分别为 0、2、4、6、8 Gy,各组各个剂量点分别设 3 个样本。照射后立即弃除药物,更换为不含药物的培养基,温箱中继续培养 8d,Giemsa 染色后,倒置显微镜下计数各组克隆数,大于 50 个细胞的克隆计为有效克隆。克隆形成率=克隆数/接种细胞数,存活分数(SF)=受照射细胞的克隆形成率/对照组细胞克隆形成率×100%。

使用 Graphpad5.0 软件,以多靶单击模型 $S=1-(1-e^{-D/D_0})^N$ 拟合细胞存活曲线,计算细胞的放射敏感性参数 D_0 (平均致死剂量)、 D_q (准阈剂量)、 N 值(外推值), $D_q=D_0 \times \ln(N)$ 。放射增敏比 $SERD_0(SERD_q)=$ 对照组 $D_0(D_q)/$ 实验组 $D_0(D_q)$ 。

1.5 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡率

取对数生长期 CNE-2 细胞接种于 65mm 培养皿中,温箱中培养 24h 后,更换含有奈达铂浓度为 0、0.25、0.5mg/L 的 1640 培养液,继续培养 24h 后,收集各组细胞,75%冰乙醇固定细胞过夜,采用碘化丙啶染色法应用 EPICSXL 流式细胞仪测细胞周期,Multicycle 分析软件进行细胞周期的分析。碘化丙啶和锚定蛋白 V 双染法检测凋亡率。

1.6 免疫印迹法检测 P-AKT、bcl-2 蛋白的表达

CNE-2 细胞接种 65mm 培养皿中,24h 后随机分为 4 组:对照组、奈达铂组、单纯照射组、联合照射组,奈达铂组和联合组加入含 0.25mg/L 奈达铂的培养基,继续培养 12h 后,照射组行单次剂量为 15Gy X 线照射,照射方法同前。照射完毕立即更换新鲜培养基继续培养 24h,收集各组细胞,提取蛋白备用。聚丙烯酰胺凝胶 100V 电泳,恒流转膜 1~1.5h 不等,5%脱脂牛奶封闭 4h 左右,一抗封闭过夜,二抗孵育 1.5h,显影、定影、拍照;Quantity One 软件进行灰度分析。

1.7 统计学处理

用 Graphpad 5.0 及 SPSS 17.0 统计软件进行结

果分析,数据以平均数±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较用 LSD 和 SNK 法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 奈达铂对鼻咽癌 CNE-2 细胞存活率影响

6 种不同浓度的奈达铂(0.25、0.5、1、2、4、8mg/L)作用于鼻咽癌 CNE-2 细胞 12h、24h、36h、48h 后,随着药物浓度及作用时间的增加,细胞存活率逐渐下降,而下降趋势在 36h 之后较明显(见图 1)。药物作用 36h 细胞的存活率分别为 $(94.2 \pm 0.3)\%$ 、 $(89.0 \pm 1.0)\%$ 、 $(81.6 \pm 0.6)\%$ 、 $(79.3 \pm 0.9)\%$ 、 $(73.5 \pm 0.6)\%$ 和 $(46.7 \pm 0.3)\%$ ($P<0.001$),作用 48h 的存活率分别为 $(91.0 \pm 1.2)\%$ 、 $(85.5 \pm 0.8)\%$ 、 $(74.5 \pm 1.0)\%$ 、 $(56.1 \pm 0.9)\%$ 、 $(38.7 \pm 0.8)\%$ 和 $(13.7 \pm 1.3)\%$ ($P<0.001$)。筛选出对细胞抑制较小的浓度 0.25、0.5mg/L 作为后续实验用。

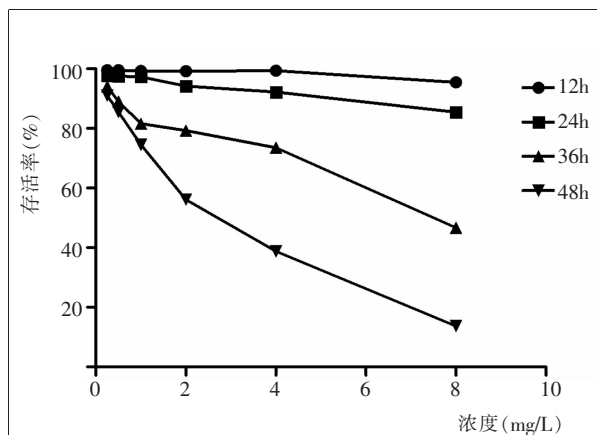


图 1 不同浓度奈达铂对 CNE-2 细胞存活率影响

2.2 克隆形成实验

我们用多靶单击模型拟合 CNE-2 细胞存活曲线,并计算各组的放射敏感性参数及增敏比。当奈达铂浓度为 0.25mg/L 和 0.5mg/L 时,细胞存活曲线的“肩区”变窄(见图 2),代表其“肩区”大小的 D_q 分别为 1.25、1.01 和 0.68,药物组的 $SERD_0$ 分别为 1.16 和 1.23, $SERD_q$ 分别为 1.32 和 1.82(见表 1),提示奈达铂有放射增敏作用。

2.3 细胞周期及凋亡变化

以 0、0.25、0.5mg/L 奈达铂作用 CNE-2 细胞 24h

后 G₂/M 期比例分别为 (3.66±0.38)%、(13.84±0.45)% 和 (42.09±0.79)% ($P<0.001$), 凋亡率分别为 (4.28±1.20)%、(6.60±1.15)% 和 (9.20±0.65)% ($P=0.003$), 见表 2。和对照组相比, 药物组有更高的 G₂/M 期比例及凋亡率, 并且 0.5mg/L 组的凋亡率高于 0.25mg/L

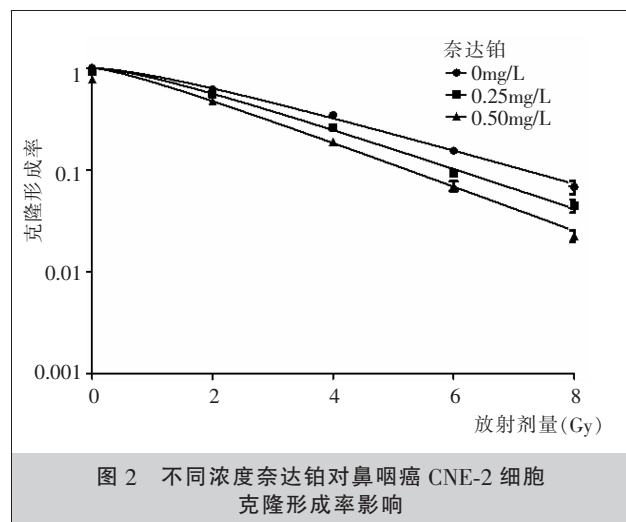


表 1 不同浓度奈达铂处理组放射增敏参数及增敏比

奈达铂	D ₀	D _q	SF2	SERD ₀	SERD _q	N 值
0mg/L	2.58	1.25	0.61	—	—	1.63
0.25mg/L	2.20	1.01	0.55	1.16	1.23	1.58
0.50mg/L	1.98	0.68	0.47	1.32	1.82	1.41

表 2 不同浓度奈达铂对鼻咽癌 CNE-2 细胞周期分布影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

奈达铂	G ₀ /G ₁ (%)	G ₂ /M(%)	S(%)	凋亡率(%)
0mg/L	47.80±1.4	3.66±0.38	48.74±1.21	4.28±1.20
0.25mg/L	34.79±1.12	13.84±0.45	51.37±0.34	6.60±1.15
0.50mg/L	15.04±1.20	42.09±0.79	42.88±0.61	9.20±0.65

组, 差异有统计学意义 ($P=0.021$)。

2.4 P-AKT、bcl-2 蛋白表达情况

各处理组 bcl-2、P-AKT 蛋白的表达较对照组均有所减少 (见图 3、4), 组间差异均有统计学意义 ($P<0.001$); 药物组和单纯照射组 bcl-2 表达有统计学差异 ($P=0.048$), 而 P-AKT 的表达无统计学差异 ($P=0.154$), 而联合照射组与药物组和单纯放射组比较各蛋白的表达均有统计学差异 ($P=0.002$)。

3 讨论

目前鼻咽癌的最主要治疗方式是放射治疗, 大部分患者对放射治疗敏感, 而少数患者出现放射抵抗, 以致疗效欠佳, 出现残灶、转移以及复发等。放射增敏剂是一类能提高肿瘤放射敏感性、增加射线对肿瘤的杀伤率的药物, 从最初的乏氧细胞增敏剂如甘氨酸双唑钠, 到现在已经涌现出很多不同作用机制的增敏药物。虽然顺铂的有效性和放射增敏效应得到了临床验证和证实, 但消化道反应和肾毒性限制了其广泛使用。奈达铂是一个新的顺铂结构类似物, 其抗癌作用机制与顺铂相同, 进入细胞后, 甘醇酸脂基上的醇性氧与铂之间的键断裂, 水与铂结合, 导致离子型物质(活性物质或水合物)的形成。然后, 断裂的甘醇酸脂基配基变得不稳定并被释放, 产生多种离子型物质, 与 DNA 结合而阻碍 DNA 复制。国内外多项研究表明, 在治疗肺癌、宫颈癌、食管癌中, 以奈达铂为主的化疗方案显示了较好的疗效 [4-7], Kamiura 等 [8] 报道奈达铂 20mg/m²/周合并放疗治疗

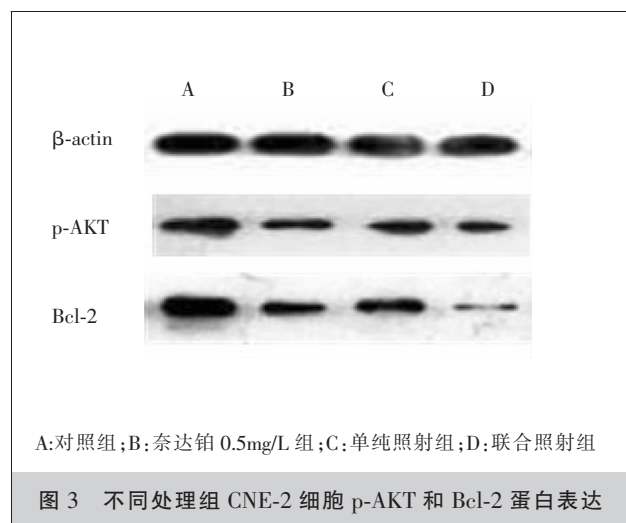


图 3 不同处理组 CNE-2 细胞 p-AKT 和 Bcl-2 蛋白表达

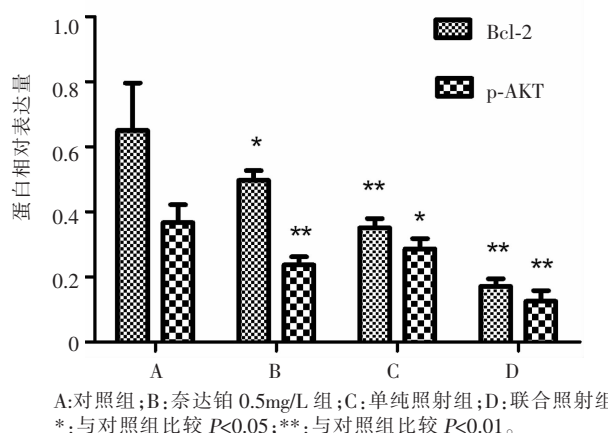


图 4 不同处理组 Bcl-2 和 p-AKT 蛋白相对表达量

宫颈癌,在10例可评价患者中,CR 7例,PR 3例。初步显示奈达铂在放射治疗中增敏作用肯定,且耐受性好。

克隆形成实验是放射增敏研究的金标准。本研究显示与对照组相比,奈达铂组 D_0 、 D_q 、 N 值逐渐降低。 D_0 值代表细胞存活下降63%所需剂量, D_0 值越小,放射敏感性越强; D_q 是细胞受损所需准阈剂量,代表细胞累积亚致死性损伤的能力,为克服“肩区”的剂量, D_q 越小,细胞存活曲线“肩区”越窄,放射敏感性越强; N 值又称外推值,反映细胞对放射引起损伤的修复能力。从图2中我们可以看到,随着奈达铂浓度的增加,细胞存活曲线的“肩区”愈窄,说明药物增加了细胞的亚致死性损伤,而 N 值随着药物浓度的增加不断减小,说明奈达铂减少了细胞对射线损伤的修复,这也可能是奈达铂对CNE-2细胞放射增敏的机制之一。本实验结果表明,奈达铂为0.5mg/L时的放射增敏效果优于其浓度为0.25mg/L时,说明奈达铂浓度增高,其放射增敏性越强,但是其毒性也呈剂量依耐性,药物浓度越高,毒性也越大。所以,药物增敏剂量的选定还有待进一步研究,以期在增敏疗效和毒性中间达到一个平衡点。

细胞周期中处于不同时相的细胞对放射线敏感性不同^[9], G_2/M 期细胞对放射线最敏感,而S期细胞表现对放射线抗拒。本研究显示,奈达铂组较对照组 G_2/M 期的比例增加,说明奈达铂可引起鼻咽癌CNE-2细胞 G_2/M 期阻滞,而 G_2/M 期细胞对放射线最敏感,这时候对细胞联合行外照射,细胞死亡率增加,从而达到放射增敏的效果。

肿瘤的发生与细胞的异常增殖和凋亡密切相关。细胞凋亡是基因控制的细胞自主的有序的死亡,一些药物还能诱导细胞凋亡^[10],凋亡的发生和过程受到精确的系统调控,各种刺激或药物产生的外界信号通过信号传导通路传至细胞内,激活相应的靶分子产生细胞效应,从而引起细胞凋亡。近年来大量研究表明信号通路的异常在肿瘤发生发展的过程中扮演重要的角色,其中磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶(PI_3K/AKT)信号转导途径在细胞增殖和存活中起着重要的作用^[11]。 AKT 因与 PKA 、 PKC 同源,又称 PKB ,即蛋白激酶B,具有丝氨酸苏氨酸激酶活性,处于 PI_3K/AKT 通路的中心环节,能介导多种生物学效应^[12],有抑制细胞凋亡的作用^[13]。

首先, PI_3K 激活产生第二信使 PIP_3 ,其与含有PH结构域的信号蛋白 AKT 和 PKD_1 结合,促使 AKT 蛋白的Ser308磷酸化导致 AKT 的活化,活化的 AKT 通过磷酸化作用形成 $p-AKT$ 作用于下游目标蛋白,发挥抑制/促进凋亡的作用。 $Bcl-2$ 基因(即B细胞淋巴瘤/白血病-2基因)是一种原癌基因,定位于线粒体膜上, PI_3K/AKT 的下游基因,它具有抑制凋亡的作用^[14]。目前多项研究结果表明,通过抑制 PI_3K/AKT 信号途径,可以提高多种肿瘤的治疗疗效^[15]。本研究显示药物组、单放组及联合照射组 $p-AKT$ 、 $bcl-2$ 蛋白表达较对照组低,联合照射组较其他组变化最明显,说明奈达铂和单纯照射均能下调 $p-AKT$ 及 $bcl-2$ 的表达,而两者联合作用最强。各处理组可能通过抑制 PI_3K/AKT 通路,降低了凋亡抑制蛋白 $bcl-2$ 的表达,从而促进细胞凋亡。同时 PI_3K/AKT 信号转导途径在细胞增殖和存活中起着重要的作用,通过抑制 PI_3K/AKT 通路,能够降低细胞增殖速度、加速细胞凋亡,本实验中的细胞毒性实验和克隆形成实验均支持这一推断。

综上所述,本研究发现奈达铂对鼻咽癌CNE-2细胞具有放射增敏作用,其机制尚不完全清楚,可能与改变细胞周期分布、抑制细胞增殖、减少细胞损伤修复以及促进凋亡等有关。本研究为体外细胞实验,我们下一步将要行动物荷瘤实验验证奈达铂的放射增敏性,并对其机制作进一步研究和阐述。

参考文献:

- [1] Wee J, Tan EH, Tai BC, et al. Randomized trial of radiotherapy versus concurrent chemoradiotherapy followed by adjuvant chemotherapy in patients with American Joint Committee on Cancer/International Union against cancer stage III and IV nasopharyngeal cancer of the endemic variety[J]. J Clin Oncol, 2005, 23 (27):6730-6738.
- [2] Lee AW, Tung SY, Chua DT, et al. Randomized trial of radiotherapy plus concurrent-adjuvant chemotherapy vs radiotherapy alone for regionally advanced nasopharyngeal carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst, 2010, 102(15):1188-1198.
- [3] Chen Y, Liu MZ, Liang SB, et al. Preliminary results of a prospective randomized trial comparing concurrent chemoradiotherapy plus adjuvant chemotherapy with radiotherapy alone in patients with locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma in endemic regions of china[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2008, 71(5): 1356-1364.

- [4] Kenmostu Y, Oshita F, Suqiura M, et al. Nedaplatin and irinotecan in patients with large-cell neuroendocrine carcinoma of the lung[J]. Anticancer Res, 2012, 32(4):1453-1456.
- [5] Natio Y, Kubota K, Ohmatsu H, et al. Phase II study of nedaplatin and docetaxel in patients with advanced squamous cell carcinoma of the lung [J]. Ann Oncol, 2011, 22(11):2471-2475.
- [6] Yin M, Zhang H, Li H, et al. The toxicity and long-term efficacy of nedaplatin and paclitaxel treatment as neoadjuvant chemotherapy for locally advanced cervical cancer[J]. J Surg Oncol, 2012, 105(2):206-211.
- [7] Takashi T, Hiroyuki I, Miyazaki A, et al. Prospective study of definitive chemoradiotherapy with S-1 and nedaplatin in patients with stage II/III (non-T4) esophageal cancer[J]. Esophagus, 2011, 8(1):45-51.
- [8] Kamiura S, Kobayashi K, Ohira H, et al. Concurrent chemoradiation therapy with nedaplatin for high-risk cervical cancer-clinical investigation of adverse events [J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2001, 28(7):979-986.
- [9] Biade S, Stobbe CC, Chapman JD. The intrinsic radiosensitivity of some human tumor cells throughout their cell cycles[J]. Radiat Res, 1997, 147(4):416-421.
- [10] Los M, Burek CJ, Stroh C, et al. Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as targets for drug design[J]. Drug Discov Today, 2003, 8(2):67-77.
- [11] Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-AKT pathway: its functions and alterations in human cancer [J]. Apoptosis, 2004, 9(6):667-676.
- [12] Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/AKT signaling pathway in human malignancy [J]. Cell Signal, 2002, 14(5):381-395.
- [13] Tokunaga E, Kimura Y, Mashino, et al. Activation of PI3K/AKT signaling and hormone resistance in breast cancer[J]. Breast Cancer, 2006, 13(2):137-144.
- [14] Kumar P, Ning Y, Polverini PJ. Endothelial cells expressing Bcl-2 promote tumor metastasis by enhancing tumor angiogenesis, blood vessel leakiness and tumor invasion [J]. Lab Invest, 2008, 88(7):740-749.
- [15] Thompson JE, Thompson CB. Putting the rap on AKT[J]. J Clin Oncol, 2004, 22(20):4217-4226.

第二届长三角肝癌介入与靶向治疗高峰论坛、第三届中华医学会长三角介入放射学高峰论坛暨肿瘤综合介入治疗新技术研讨会预告

由上海、安徽、浙江、江苏四省市介入学会共同主办的“第三届中华医学会长三角介入放射”和江苏、浙江、上海抗癌学会介入专业委员会主办的“第二届长三角肝癌介入与靶向治疗”高峰论坛暨“肿瘤综合介入治疗新技术”研讨会将于2013年3月29日~3月31日在浙江杭州举行。届时沪、苏、皖、浙介入同道及国内外其他知名介入放射学专家将齐聚一堂，为您呈现一场气势恢宏的学术盛宴。漫步西子湖畔，品闻龙井茶香，美丽的杭州将给您的会外生活增添别样情趣和色彩。杭州欢迎您的到来！



第二届 “长三角肝癌介入与靶向治疗高峰论坛” 专场

会议时间：2013.3.29 14:00-18:00
会议地点：杭州蓝天清水湾国际大酒店
共同主席：邵国良 陈世晔 杨业发
执行主席：邵国良
主办单位：浙江省肿瘤医院
江苏省肿瘤医院
上海东方肝胆外科医院
承办单位：浙江省肿瘤医院

第三届 中华医学会“长三角介入放射学高峰论坛” 暨“肿瘤综合介入治疗新技术研讨会”

会议组织机构

特邀嘉宾：徐克、肖湘生、李麟荪、程永德、田建明、王小林、王建华、许顺良、袁建华

大会主席：滕皋军、单鸿、毛伟敬

共同主席：倪才方、程英升、高斌、邵国良
执行主席：邵国良

征文内容：血管介入放射学、非血管介入放射学、肿瘤介入放射学、神经介入放射学、介入护理学、实验研究、介入学科建设等方面的论著、综述、临床经验、个案报道等。参会代表可获得2013年国家继续教育I类学分8分。欢迎相关学科及边缘学科的医师、护理和技术人员投稿参会。

投稿要求：论著需1000字以内的标准论文摘要，包括目的、方法、结果、结论四部分。经验交流、个案报道限500字以内。来稿请用word排版，通过E-mail发至会务组，E-mail的主题注明“杭州会议投稿”
E-mail: conference2013@126.com
截稿日期：2013年3月15日

报名方式：1.回执报名

2.短信报名：
编辑短信“姓名+单位+联系方式”发送至13600516570；或发送相同内容邮件至conference2013@126.com
3.现场报名

会议收费：会务费800元，护士及研究生400元（凭学生证）邀请的专家全免，其它介入学组委员免注册费。

会议时间：3月29日报到

3月30~31日学术会议

4月1日撤离

会议地点：杭州蓝天清水湾国际大酒店

会议联系人：郑家平：13600516570

罗君：13186976014

E-mail地址：conference2013@126.com

联系地址：浙江省肿瘤医院介入科

（杭州市半山桥广济路38号）

邮编：310022

注意事项：由于杭州为旅游城市，住宿较为紧张，为保证各位参会代表的住宿，请及时回复登记。

会议组委会
2012年11月8日