

氯化钴诱导缺氧对脑胶质瘤 T98G 细胞株放射敏感性的影响

邓瑾, 叶家才, 廖志伟, 黄赖机

(广州医科大学附属肿瘤医院, 广东 广州 510095)

摘要: [目的] 观察氯化钴诱导的缺氧对脑胶质瘤细胞周期的改变及放射敏感性的影响。[方法] 用氯化钴诱导胶质瘤 T98G 细胞缺氧, 细胞克隆形成实验观察细胞放射敏感性。流式细胞仪检测细胞周期的变化。[结果] T98G 细胞在缺氧状态下放射敏感性较常氧下明显降低, 差异有统计学意义。氯化钴诱导细胞缺氧后, 与常氧状态相比, S 期细胞比例由 4.7% 提高至 24.0%, G₁ 期细胞比例由 90.4% 降至 66.7%。[结论] 氯化钴诱导的缺氧能改变胶质瘤 T98G 细胞株的细胞周期, 降低细胞的放射敏感性。

关键词: 胶质瘤; 缺氧; 钴; 细胞周期; 放射敏感性

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)07-0563-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.07.B007

Radiosensitivity of Glioma Cell Lines T98G Inhibited by Hypoxia Induced by Cobalt Chloride

DENG Jin, YE Jia-cai, LIAO Zhi-wei, et al.

(Cancer center of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510095, China.)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of hypoxia induced by the cobalt chloride (CoCl₂) on the cell cycle and the radiosensitivity of glioma cell lines T98G. [Methods] Hypoxia of human glioma cell lines T98G was induced by CoCl₂, and radiosensitivity of cells was detected by colony formation assay. The cell cycle was examined using the flow cytometry. [Results] The radiosensitivity of glioma cell lines T98G in hypoxia was decreased significantly than that in normoxic state. Results of flow cytometry showed that after treatment by CoCl₂, the percentage of S phase increased from 4.7% to 24.0%; the percentage of G₁ phase decreased from 90.4% to 66.7%. [Conclusion] Hypoxia induced by CoCl₂ might change the cell cycle and contribute to the reduction of radiosensitivity of glioma cell lines T98G

Subject words: glioma; hypoxia; Cobalt; cell cycle; radiosensitivity

脑胶质瘤是常见的脑原发恶性肿瘤, 恶性程度高, 手术切除为首选治疗方法, 放疗是提高脑胶质瘤生存期的重要手段, 但放疗效果并不理想。放射敏感性的影响因素及其机制研究以及增敏剂的开发是放射肿瘤学的研究热点之一。有研究认为实体瘤中普遍存在的缺氧是影响放射敏感性的主要原因之一。微环境缺氧在肿瘤侵袭和进展中扮演重要角色^[1,2]。化学性缺氧模型是在细胞或组织液中加入铁的螯合剂或者氯化钴(cobalt chloride, CoCl₂), 通过钴离子与 Fe²⁺置换使缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible

factor-1, HIF-1) 的降解受阻, 提高 HIF-1 的蛋白水平和转录活性来模拟缺氧反应。本研究拟通过氯化钴模拟肿瘤缺氧环境, 分析缺氧与胶质瘤细胞放射敏感性的关系, 为胶质瘤治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及分组

人脑胶质瘤细胞株 T98G 购自中国科学院上海细胞库, 含 10% 胎牛血清 (澳大利亚 PAA 公司)、100U/ml 青霉素及 100μg/ml 链霉素的 High Glucose DMEM (美国 Invitrogen 公司) 培养基中进行培养, 处于对数生长期状态良好的细胞用 0.05% 胰酶消化

基金项目: 广东省医学科研基金(A2013291)

通讯作者: 廖志伟, 副主任医师, 硕士; 广州医科大学附属肿瘤医院放疗科, 广东省广州市横枝岗路 78 号(510095); E-mail: vigo310@126.com

收稿日期: 2015-03-22; **修回日期:** 2015-04-22

传代,取指数生长期细胞进行实验。

课题组前期研究发现 100μmol/L CoCl₂(美国 Sigma 公司)处理 T98G 细胞可明显升高 HIF-1 蛋白水平,有效诱导缺氧环境^[3]。因此,本实验采用 100μmol/L CoCl₂ 诱导缺氧。接种至 1×10⁵ 细胞至 60mm 培养皿,待细胞 80%左右融合时,其中一皿加入 DMSO 作为对照组,另外一皿加入浓度为 100μmol/L 的 CoCl₂ 诱导细胞缺氧。

1.2 细胞克隆形成实验

取对数生长期的细胞消化成单细胞悬液后计数,按照表 1(Table 1)细胞数接种细胞。待细胞接种后 24h,将相同照射剂量的两皿细胞分别加入 DM-SO 及 CoCl₂(终浓度 100μmol/L),继续培养细胞 8h 后将细胞按照表 1(Table 1)中的不同照射剂量分别进行放射线照射。照射方法:采用 6MV X 射线(广州医科大学附属肿瘤医院放疗中心西门子 PRIMUS 直线加速器)照射,源皮距 100cm,剂量率为 300cGy/min,机架角 180 度,照射野 10cm×6cm,下加 1cm 厚等效有机玻璃板。照射后常氧培养 14d 后,细胞用甲醇固定,Giemsa 染色后计算细胞的克隆数(50 个细胞计数为 1 个存活集落)。接种率(plating efficiency,PE)=克隆形成数/接种细胞数×100%。存活分数(survival fraction,SF)=克隆形成数/(接种细胞数×PE)。

Table 1 Plated cells for colony formation assay

Irradiation dose(Gy)	Cell seeding count
0	200
2	2000
4	4000
8	20000

根据线性二次模型公式: $y=\exp[-(ax+bx^2)]$,拟合得到各细胞的 SF 值。

1.3 流式细胞仪检测细胞周期

用胰酶消化收集细胞,加入 70%预冷的乙醇中,4℃固定 12h 以上。PBS 洗涤去乙醇,所得细胞加入碘化丙啶(PI)和 RNaseA,37℃温浴 30min。用流式细胞仪检测细胞周期。染色细胞的 DNA 含量数据以流式细胞仪进行采集并以 LYSYS II 软件进行分析处理。

1.4 统计学处理

使用 SPSS15.0 统计软件进行分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间的比较采用方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CoCl₂ 诱导缺氧对 T98G 细胞放射敏感性的影响

与常氧培养组相比,T98G 细胞株在缺氧状态下,放射线照射后细胞克隆形成能力显著提高(Figure 1A),接种细胞后培养 14d 后,在相同剂量放射线照射后,缺氧状态下细胞克隆形成数量多于常氧状态组。用 GraphPad 公司 Prism 5.0 软件按线性二次模型拟合细胞存活曲线。结果显示:加入 CoCl₂ 后细胞存活曲线的肩区变宽,放射敏感性下降(Figure 1B,Table 2)。

2.2 CoCl₂ 诱导缺氧对 T98G 细胞细胞周期的影响

与对照组相比,单独射线照射使 S 期细胞比例

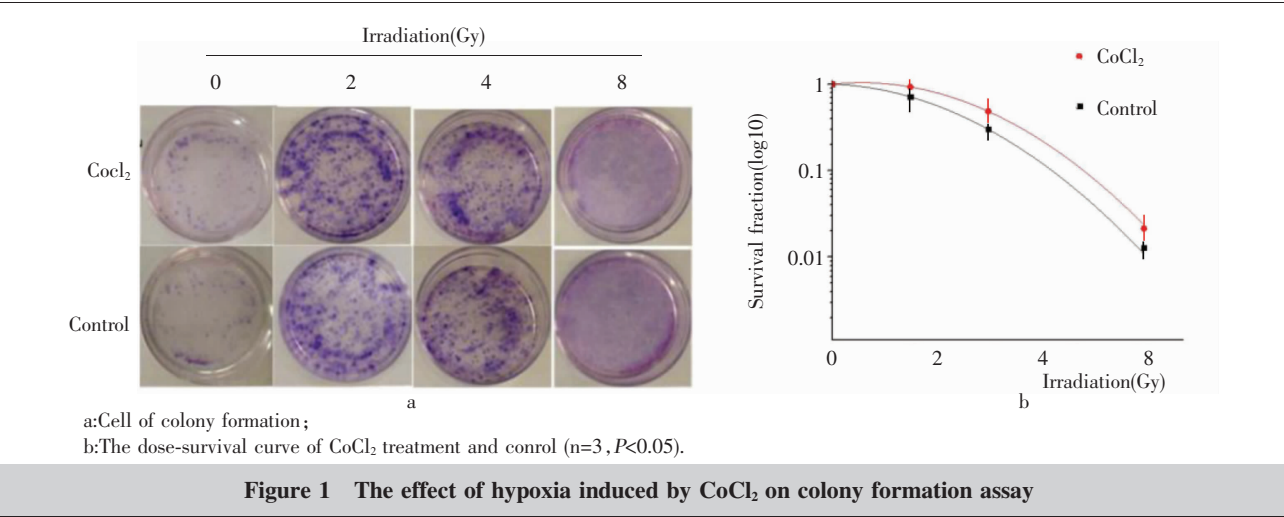


Figure 1 The effect of hypoxia induced by CoCl₂ on colony formation assay

Table 2 Parameters used by the single-hit multi-target theory formula

Parameters	0 Gy		2 Gy		4 Gy		8 Gy	
	Control	CoCl ₂	Control	CoCl ₂	Control	CoCl ₂	Control	CoCl ₂
Number of plated cells	200	200	2000	2000	4000	4000	20000	20000
Colonies	7	7	50	65	42	68	9	15
PE	0.03500	0.03500	0.02500	0.03250	0.01050	0.01700	0.00045	0.00075
SF	1.00000	1.00000	0.71429	0.92857	0.30000	0.48571	0.01286	0.02143

由 $29.5\% \pm 2.6\%$ 降至 $4.7\% \pm 1.3\%$ ($t=12.56, P<0.01$), 使 G_1 期细胞比例由 $65.1\% \pm 3.1\%$ 升至 $90.4\% \pm 3.2\%$ ($t=-9.83, P<0.01$), 两者比较差异具有统计学意义 ($P<0.05$), 提示射线照射使胶质瘤细胞 G_1 期比例提高。然而, 氯化钴预处理细胞后, 射线照射仅使 S 期细胞由对照组 $29.5\% \pm 2.6\%$ 降至 $24.0\% \pm 2.1\%$ ($t=0.12, P=0.71$), 使 G_1 期细胞比例变化不明显 ($t=0.53, P=0.62$)。氯化钴预处理与射线单独照射相比, S 期细胞比例升高 (4.7% vs 24.0% , $t=-7.26, P<0.01$) 提示氯化钴诱导缺氧可减弱射线对胶质瘤细胞 G_1 期的阻滞, 同时增加射线对 S 期的阻滞作用。

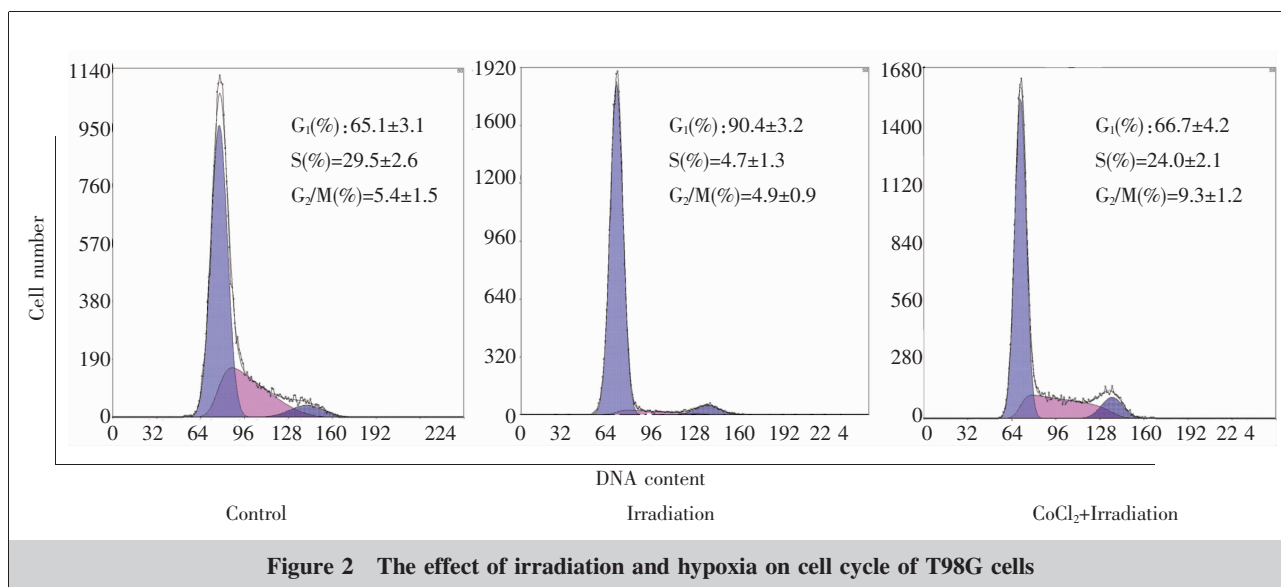
3 讨论

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤, 国内统计约占神经系统肿瘤的 $35\% \sim 61\%$, 其中高度恶性的占 $70\% \sim 80\%$ 。脑胶质瘤生长迅速, 侵袭性强, 早期即向周围正常组织浸润性生长, 恶性程度高, 疗效差, 因而一直是肿瘤治疗的难点。放疗是脑胶质瘤术后最重要的治疗手段, 术后放疗能够延长部分患

者的生存时间^[4]。但是, 脑胶质瘤放射敏感性存在很大差异, 部分脑胶质瘤患者放疗效果并不理想, 肿瘤细胞耐受放射线的机制尚未能完全阐明。

射线对肿瘤细胞的损伤分为直接作用和间接作用, 直接作用主要由射线直接作用于有机分子产生自由基引起 DNA 分子断裂、交叉, 从而造成细胞 DNA 复制困难, 无法继续分裂, 甚至造成细胞坏死或凋亡。间接损伤主要由射线对人体组织内水发生电离, 产生自由基, 这些自由基再和生物大分子发生作用, 影响细胞内生物大分子的功能, 导致不可逆损伤。氧在射线产生自由基的过程中扮演重要角色, 局部细胞的供氧状态对射线杀伤作用有很大影响^[5]。肿瘤组织内, 氧分压明显低于正常组织, 研究认为实体瘤中普遍存在的缺氧状态可能与肿瘤放射抵抗有关。Kessler 等^[6]发现, 缺氧可以降低胶质瘤细胞的放射敏感性。Kato 等^[7]研究也发现细胞放射敏感性在常氧条件下明显较缺氧环境下高。

本研究中, 通过加入 $100\mu\text{mol/L}$ CoCl₂ 建立了化学性缺氧模型^[3]。诱导细胞缺氧研究发现, CoCl₂ 诱导 T98G 细胞缺氧后, 细胞存活曲线的肩区变宽; 照射



不同剂量后, 缺氧组细胞存活分数均分别高于同剂量对照组。提示缺氧状态下 T98G 细胞放射敏感性降低。如何增加缺氧细胞的放射敏感性是近年来研究的热点。有研究表明 YC-1^[8]、Saikosaponin-d(SSd)^[9]、非诺贝特(Fenofibrate)^[10]等药物可以通过抑制 HIF-1 α 的表达, 逆转缺氧所致的放射抵抗。此外改善细胞缺氧环境亦是提高细胞放射敏感性的方法, Peng 等^[11]认为肿瘤细胞的增殖和转移依赖于血管生长。快速增长的肿瘤细胞会引起乏氧, 从而上调肿瘤细胞生长因子, 如 HIF-1 α 和血管内皮生长因子(VEGF), 刺激更多肿瘤细胞的增殖、血管再生及增加放疗的辐射抵抗。因此, 作用于肿瘤血管网和新血管形成的药物能够调节肿瘤微环境(MVD), 改善肿瘤血流量和氧合水平, 从而增加放射敏感性。

肿瘤细胞周期阻滞与细胞放射敏感性关系密切, 在放疗过程中, G₂/M 期最敏感, S 期对放疗较为抗拒^[11]。我们的结果显示, 单独射线照射使 S 期细胞比例明显下降; CoCl₂ 诱导缺氧后, S 期细胞比例较单独射线照射时明显上升。缺氧可能通过影响射线对 S 期细胞阻滞降低了胶质瘤 T98G 细胞株对射线的敏感性。G₁ 期细胞及照射后能停滞于 G₁ 期的细胞与放射敏感性相关^[12]。研究结果发现, CoCl₂ 诱导缺氧后照射细胞, 细胞 G₁ 期比例较单独射线照射时明显下调。提示 CoCl₂ 诱导缺氧后细胞放射敏感性下调。

缺氧所致的肿瘤细胞放疗抵抗一直是困扰脑胶质瘤治疗的难题。CoCl₂ 是广泛使用的化学性缺氧模型, 既往研究提示缺氧诱导的关键性分子事件是 HIF-1 的激活^[3, 13]。我们研究提示 CoCl₂ 诱导细胞缺氧后, G₁ 期细胞比例明显下降, S 期细胞比例明显升高, 细胞放射敏感性下降。本研究为缺氧诱导细胞放疗抵抗的机制研究和放疗增敏剂的开发提供了新的线索。

参考文献:

- [1] Tsai Y P, Wu K J. Hypoxia-regulated target genes implicated in tumor metastasis [J]. J Biomed Sci, 2012, 19(1): 102-109.
- [2] Ruan J, Zhang L, Yan L, et al. Inhibition of hypoxia-induced epithelial mesenchymal transition by luteolin in non-small cell lung cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2012, 6(1): 232-238.
- [3] Deng J, Tian Q, Cheng GH, et al. Hypoxia inducible factor-1 causes radioresistance in human glioma cell line T98G [J]. Journal of Cancer Control and Treatment, 2010, 23(2): 103-106. [邓瑾, 田琪, 程国华, 等. 缺氧诱导因子-1 对人脑胶质瘤细胞株 T98G 放射线敏感性的影响[J]. 肿瘤预防与治疗, 2010, 23(2): 103-106.]
- [4] Wu SX, Deng ML, Li QQ, et al. [Prognostic analysis of patients with cerebral glioma treated with radiotherapy [J]. Chinese Journal of Cancer, 2004, 23(11 Suppl): 1561-1566. [吴少雄, 邓美玲, 李巧巧, 等. 脑胶质瘤放疗治疗的预后因素分析[J]. 癌症, 2004, 23(11 Suppl): 1561-1566.]
- [5] Baatout S, Jacquet P, Derradji H, et al. Study of the combined effect of X-irradiation and epigallocatechin-gallate (a tea component) on the growth inhibition and induction of apoptosis in human cancer cell lines [J]. Oncol Rep, 2004, 12(1): 159-167.
- [6] Kessler J, Hahnel A, Wichmann H, et al. HIF-1 α inhibition by siRNA or chetomin in human malignant glioma cells: effects on hypoxic radioresistance and monitoring via CA9 expression[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 605-616.
- [7] Kato Y, Yashiro M, Fuyuhiko Y, et al. Effects of acute and chronic hypoxia on the radiosensitivity of gastric and esophageal cancer cells [J]. Anticancer Res, 2011, 31(10): 3369-3375.
- [8] Moon SY, Chang HW, Roh JL, et al. Using YC-1 to overcome the radioresistance of hypoxic cancer cells [J]. Oral Oncol, 2009, 45(10): 915-919.
- [9] Wang BF, Wang XJ, Kang HF, et al. Saikosaponin-D enhances radiosensitivity of hepatoma cells under hypoxic conditions by inhibiting hypoxia-inducible factor-1 α [J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 33(1): 37-51.
- [10] Ge Y, Liu J, Yang X, et al. Fenofibrate enhances radiosensitivity of esophageal squamous cell carcinoma by suppressing hypoxia-inducible factor-1 α expression [J]. Tumour Biol, 2014, 35(11): 10765-10771.
- [11] Peng F, Chen M. Antiangiogenic therapy: a novel approach to overcome tumor hypoxia[J]. Chin J Cancer, 2010, 29(8): 715-720.
- [12] Yao K C, Komata T, Kondo Y, et al. Molecular response of human glioblastoma multiforme cells to ionizing radiation: cell cycle arrest, modulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, and autophagy [J]. J Neurosurg, 2003, 98(2): 378-384.
- [13] Zhang J, Shi RH, Xiao B, et al. The effect of cobalt chloride on HIF-1 α expression and function in HIF-1 α silenced esophageal squamous cancer cells [J]. Chinese Journal of Digestive Endoscopy, 2007, 24(1): 49-52. [张捷, 施瑞华, 肖斌, 等. 氯化钴对 RNA 干扰食管鳞癌细胞 HIF-1 α 基因表达及功能的影响[J]. 中华消化内镜杂志, 2007, 24(1): 49-52.]