

放射耐受性人小细胞肺癌亚株的建立

刘 静, 田海梅, 李艳芬, 李 茉, 王小兵, 张 伟

(中国医学科学院肿瘤医院生物检测中心, 北京 100021)

【摘要】 目的 建立肺癌 NCI-H446 细胞放射抗拒性亚株, 为小细胞肺癌放射抗拒和逆转研究提供配对的细胞研究工具。**方法** 通过梯度照射 NCI-H446 细胞株诱导其耐放射性(共 7500cGy), 并通过检测细胞总的 ATP 含量的方法来监测细胞倍增时间, 流式细胞仪检测细胞周期分布, 以及应用多靶单击模型 $SF = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$ 拟合细胞存活曲线分析其放射敏感参数的变化。**结果** 比较亲本与耐放射株的差异, 放射生物学参数值分别为 D_0 (1.9673, 2.2756)、 N (1.0016, 2.6008)、 D_q (0.6783, 1.6860)、 SF_2 (0.3623, 0.7134), 耐放射株 SF_2 值为亲本的 1.97 倍, G2/M 期细胞所占比由 18.52% 下降到 7.84%。耐放射株的细胞形态发生变化, 倍增时间比敏感株延长。**结论** 通过梯度照射建立了小细胞肺癌 NCI-H446 的耐放射亚株 NCI-H446-R, 与亲本细胞相比放射生物学参数有显著差异 ($P < 0.05$), 本研究结果为研究小细胞肺癌放射抗拒及耐放射逆转提供了新的细胞模型。

【关键词】 放射抗拒; 小细胞肺癌; NCI-H446 细胞株; 细胞周期

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 10-0051-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.010.012

The establishment of a radiation-resistant small cell lung cancer subline

LIU Jing, TIAN Hai-mei, LI Yan-fen, LI Mo, WANG Xiao-bing, ZHANG Wei

(Tumor Marker Research Center, Cancer Institute&Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish a radiation-resistant cell subline from a human small cell lung cancer (SCLC) cell line NCI-H446, providing a pairing research tool for investigating mechanism of radiation tolerance and the reverse strategy in lung cancer. **Methods** The NCI-H446 cell was radiated repeatedly by increased dose of radiation gradually (total 7500cGy) and a radiation-resistant cell substrain was induced and selected from the survival of cells. The doubling time and cell cycle distribution of the substrain were detected by ATP kit and flow cytometry Assay respectively; Radiation biology parameters were calculated and analyzed by cell survival curve fitting from multi-target model, $SF = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$. **Results** Comparing with the control, The resistant substrain radiobiology parameter values were D_0 (1.9673, 2.2756), N (1.0016, 2.6008), D_q (0.6783, 1.6860) and SF_2 (0.3623, 0.7134) respectively. Cell morphology is more slender and has more tentacles. The SF_2 value of radiation-resistant subline is 1.97 times more than that of wild cell line. The proportion of radiation-resistant cells in G2/M-phase was down to 7.84%, compared with the 18.52% of wild cells. **Conclusions** A radiation-resistant SCLC subline NCI-H446-R is established and may be a useful tool for studying resistant to radiation of SCLC in the future.

【Key words】 Radiation resistance; Small cell lung cancer; NCI-H446 cell line; Cell cycle

[作者简介] 刘静(1984-), 女, 研究实习员, 研究方向: 肿瘤细胞相关实验研究。E-mail: liujingcicams@163.com。

[通讯作者] 张伟(1964-), 男, 研究员, 研究方向: 主要从事转化医学研究。E-mail: zhangww1954@126.com。

由于环境污染日益加剧、吸烟等原因,肺癌已持续成为世界范围内最常见的恶性肿瘤,且发病率仍呈上升趋势,据《2012 中国肿瘤登记年报》发布,从全国来看,肺癌居恶性肿瘤发病的第一位,每 10 万人约有 54 人会患肺癌,占恶性发病率的 18.74%,男性为女性的 1.94 倍^[1],极大威胁着人类的健康和生命。肺癌的病理类型中小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 约占肺癌发病总数的 20%~25%。由于 SCLC 细胞倍增时间短、进展快,与其他肿瘤不同之处就是早期即倾向于远处转移,主要采取以放化疗为主的综合治疗^[2]。然而,部分 SCLC 患者对放疗不敏感,放疗后易出现复发,肿瘤细胞对放射线抗拒是影响 SCLC 放疗效果的主要因素。

SCLC 的放疗抗拒研究对提高肺癌的预后具有重要价值,国内已有分子和细胞水平的研究报道,但不足之处是细胞研究模型不统一且来源各不相同,尤为关键的是尚未稳定成株的肺癌细胞株并缺乏必要的参数鉴定。本研究选择来自 ATCC (american type culture collection) 的小细胞肺癌 NCI-H446 细胞株作为亲本细胞系,体外通过序贯辐射诱导的方法,诱导获得具有放射抗拒性的细胞亚株 NCI-H446-R 并稳定传代。同时,研究和摸索建立耐放射细胞系的实验方法,为其他耐放射细胞系的建立提供依据。

1 材料和方法

1.1 辐射诱导

应用医用电子直线加速器 (X 射线), 品牌: Clinac 600C/D (由中国医学科学院肿瘤医院加速器室提供使用), 由低剂量到高剂量按照 2Gy、5Gy、8Gy、10Gy 的顺序逐渐增加放射剂量, 一次照射完成细胞恢复状态后, 继续下一次照射。照射次数共 12 次, 照射总剂量 7500cGy, 分别为: (2Gy × 3 次, 5Gy × 3 次, 8Gy × 3 次, 10Gy × 3 次), 剂量率 300cGy/min, 射野大小: 10 cm × 10 cm, 细胞瓶表面覆有约 1.5 cm 厚的补偿膜, 照射后 4 h 换新鲜培养液。

1.2 细胞培养

NCI-H446 细胞株来自 ATCC, 由本中心常规保存。采用 10% FBS (Hyclone SH30084.03), RPMI1640 (Gibco 31800105) 培养基, 37℃、5% CO₂ 培养箱 (Forma Model3111) 中培养。照射后根据细胞密度传代, 细胞状态稳定后继续下一次照射, 照

射前冻存部分细胞保种。

1.3 单克隆筛选细胞亚株

按照计划的放射剂量完成照射后, 采用单克隆方法得到耐放射性及生长特性趋于统一的细胞, 从而纯化细胞株。取对数生长期的细胞, 0.25% 胰酶消化成单个细胞后接种到 96 孔板上。每日观察克隆的形成情况, 克隆形成后, 显微镜观察标记出单克隆的孔, 消化取出细胞并继续扩大培养, 分别标记其亚株名称。选择生长状况良好的一个亚株并稳定传代 30 次以上, 命名为 NCI-H446-R。

1.4 放射敏感参数测定

通过经典的克隆形成实验, 来检验 NCI-H446-R 的耐放射性。取对数生长期的 NCI-H446 与 NCI-H446-R 细胞, 胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞后, 将细胞悬浮在含 10% FBS 的 RPMI1640 培养液中备用。细胞悬液按倍数稀释后, 每种细胞设三个平行孔 2 mL/孔, 在标记为 (0Gy, 2Gy, 4Gy, 6Gy, 8Gy) 的不同 12 孔板中分别按 600 个/孔、1000 个/孔、4000 个/孔、8000 个/孔和 10000 个/孔接种细胞, 并轻轻转动使细胞分散均匀, 4 h 后按所标记剂量完成照射。照射后在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中静置培养 2 周左右。当形成克隆的面积足够大 (单克隆细胞数 > 50 个细胞) 且克隆间不相连时终止培养。弃上清并用 PBS 小心浸洗 2 次。加甲醇 2 mL, 固定 15 min, 去固定液, 加适量 Giemsa 染色 10 min, 用流水缓慢洗去染色液, 空气干燥。将 12 孔板置于显微镜下, 统计形成的克隆数并计算得出存活分数值, 实验重复一次。最后应用多靶单击模型绘制细胞存活曲线。

1.5 细胞周期测定

诱导的耐放射株经最后一次 10Gy 照射后, 调整细胞状态最终稳定传代成 NCI-H446-R 细胞株。取对数生长期的敏感株与耐放射株细胞, 胰酶消化制成单细胞悬液并计数, 每种取约 1×10^6 个细胞离心去培养基, 加 75% 冰乙醇固定, 置于 -20℃ 过夜。次日离心弃上清, PBS 洗 2 次后加 PI 染色, 经流式细胞仪 (flow cytometry, FCM) 检测两种细胞的细胞周期分部。最后, 通过 ModFit LT 软件绘制细胞周期分部图, 对比亲本株和耐放射株的细胞周期变化情况。

1.6 ATP 法绘制细胞生长曲线

取对数生长期的敏感株与耐放射细胞株, 消化细胞成单个后计数, 调整细胞密度为 2000 个/mL。

设 8 个平行孔,加 200 μ L/孔细胞悬液,每种细胞株分别接种 8 块 96 孔板,每块培养板分别标注对应的细胞株名称及第 1 天~第 8 天,置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。通过检测每个孔中总的细胞内三磷酸腺苷(ATP)含量的方法(试剂盒购于:北京金紫晶生物医药技术有限公司),来观察细胞的增殖情况。每 24 h 检测一对培养板,连续测 8 d,绘制细胞生长曲线。

1.7 统计学方法

实验结果采用 SPSS19.0 软件进行分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 放射生物学参数

统计两次重复实验获得的集落平均数,计算接种率(plating efficiency, PE) = $\frac{\text{OGy 照射组形成集落数}}{\text{接种细胞数}}$,存活分数(surviving fraction, SF) = $\frac{\text{形成的集落数}}{\text{接种的细胞数} \times \text{PE}}$ 。采用 sigmaplot12.0 软件根据多靶单击模型 $SF = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$ 拟合细胞剂量-存活曲线(图 1),结果显示随着放射剂量的增加,敏感株的存活分数较耐放射株明显下降,耐放射株显示更强的放射抗拒性。通过曲线计算敏感株与耐放射株相关的放射敏感性参数分别为:终斜率 D_0 值(1.9673, 2.2756)、准阈剂量 D_q 值(0.6783, 1.6860)、外推值 N (1.0016, 2.6008)和 SF_2 (0.3623, 0.7134),NCI-H446-R 的 SF_2 值是 NCI-H446 的 1.97 倍。此外,NCI-H446-R 的相关放射生物学参数 D_0 、 N 、 D_q 值也都明显高于 NCI-H446,提示 NCI-H446-R 在放射线照射下具有更强的存活能力。

2.2 细胞周期变化

通过流式细胞仪测得的数据显示,NCI-H446-R 与 NCI-H446 在细胞周期分布上存在显著差异(彩插 7 图 2)。对比两株细胞的细胞周期所占比例,NCI-H446-R 的 G1 期与 S 期细胞所占比例分别由 $63.52 \pm 8.25\%$ 和 $17.96 \pm 2.93\%$ 上升到 $67.94 \pm 6.02\%$ 和 $24.23 \pm 2.26\%$;G2/M 期细胞由 $18.52 \pm 3.14\%$ 下降到 $7.84 \pm 2.19\%$,结果显示耐放射细胞株 G1 期和 S 期比例增多,G2/M 期比例减少。

2.3 细胞生长差异

细胞在射线照射驯化过程中,会出现大片死亡

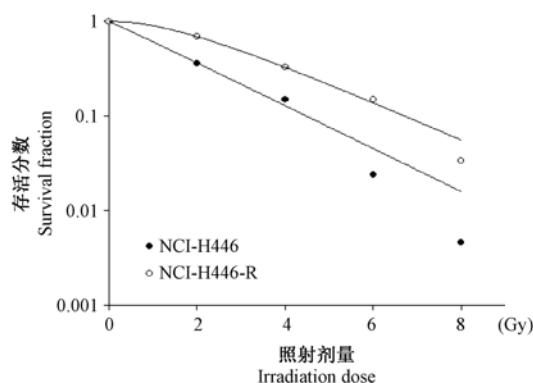


图 1 多靶单击拟合模型拟合的 NCI-H446&NCI-H446-R 细胞存活曲线

Fig. 1 The cell survival curve of NCI-H446&NCI-H446-R with the multi-target model

脱落,镜下观察可见不同程度的细胞变形增大、多伪足,细胞内外颗粒较多,细胞内出现大量空泡、核变大及多核等特征。随着照射剂量的不断加大,细胞恢复状态的时间也随之加长。通过 ATP 法检测并绘制细胞生长曲线(彩插 7 图 3),NCI-H446 约在第 2 天进入对数生长期,第 6 天进入平台期;NCI-H446-R 在第 3 天进入对数生长期,第 8 天进入平台期。耐放射株的倍增时间较敏感株延长。在相同的培养条件下,NCI-H446-R 的细胞形态较其亲本株也有所不同。

3 讨论

目前国内外相关研究者已经通过不同的诱导方法建立起多种不同组织来源的耐放射细胞亚株^[3-5],并对获得的耐放射细胞进行了系统的耐放射性分析。对于细胞耐放射性的产生机制主要有两种不同的观点。首先,有观点认为同一细胞群中即使是同一来源的细胞也存在着放射敏感性不同的细胞亚群。即使是同一细胞来源的肿瘤细胞,在内外环境的不断作用下,对放射线的敏感程度也存在差异,放射线选择性的杀死了放射敏感的细胞,使放射抗拒的细胞存活下来并不断增殖,并使其后代也具有了耐放射性;另外,有学者认为,在照射过程中虽然杀死了大部分的肿瘤细胞,但同时也诱导了部分细胞突变,使其具有耐放射性并不断增殖^[6]。总之,放射线照射后存活的细胞具有了辐射耐受性,它和亲本细胞是具有同一来源放射敏感性不同的细胞株。

本研究采用多次照射、逐步增加放射剂量的方法诱导出耐放射性较高的细胞亚株,总的照射剂量

为 7500cGy。从细胞株的初次诱导,到细胞稳定传代后完成耐放射性鉴定,历时 16 个月。设定的照射剂量完成后,通过亚克隆实验纯化出单克隆株,使其生物特性更趋于一致。最后通过经典的克隆形成实验来检测并计算其放射生物学参数:终斜率 D_0 值、准阈剂量 D_q 值、外推值 N 和 SF_2 。计算得出,NCI-H446-R 的 SF_2 值为其亲本株的 1.97 倍,有显著差异($P < 0.05$)。不同细胞周期对放射的敏感性也不同,一般 S 期的细胞最抗拒,G2/M 期对放射线最敏感^[7]。通过流式细胞仪检测,NCI-H446-R 的 G2/M 期所占比例为 7.84%,亲本株为 18.52%,存在显著差异($P < 0.05$)。辐射损伤主要表现为细胞再增值能力的丧失,细胞经放射线照射后的 1~2 代之内细胞并未有明显变化,待传至 2~3 代后细胞会出现大片死亡、脱落,发生有丝分裂性死亡,失去肿瘤的无限增值能力。存活的细胞在形态上会出现显著的变化,细胞核质比增大,双核;细胞内颗粒物增多,多空泡;生长速度变慢,代谢加快;细胞个体间形态差异较大,多伪足。传至 8~10 代以后,细胞形态逐渐恢复,趋于统一,增殖速度和代谢水平也逐渐恢复。最终诱导出的耐放射细胞株 NCI-H446-R,较敏感株在细胞形态和倍增时间上也有所不同,在某种程度上也验证了细胞周期的检测结果。

总之,本研究通过梯度照射法,模拟临床上耐放射细胞的形成过程,建立了小细胞肺癌细胞株 NCI-H446 的放射抗拒性细胞亚株 NCI-H446-R 并稳定传代,通过克隆形成等实验验证了其耐放射性^[9-10]。在未来的工作中,我们将进一步利用获得的放射抗拒细胞株,来开展有关小细胞肺癌放射抗拒及耐放射逆转等相关研究。

参考文献:

- [1] 赫捷,陈万青. 2012 中国肿瘤登记年报[M]. 北京:军事医学科学出版社,2012. 28.
- [2] 周道安,王绿化,傅小龙,等. 新编肺癌综合治疗学[M]. 上海:复旦大学出版社,2009. 168-184.
- [3] 骆志国,周福祥,周云峰,等. 辐射诱导辐射耐受鳞癌细胞株的建立及其生物学特性[J]. 中华放射肿瘤学杂志,2005,14(3): 208-212.
- [4] 金问森,孔肇路,张江虹,等. 放射耐受性肝癌细胞亚株的筛选与建立[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2009, 29(6): 575-579.
- [5] 吴巍巍,赵玉沛,廖泉,等. 人胰腺癌细胞株放射敏感性的体外研究[J]. 中华肝胆外科杂志,2004,10(12): 821-823.
- [6] Pelevina II, Gotlib Vla, Kndriashova OV, *et al.* Properties of progeny of irradiated cells[J]. Tsitologia, 1998, 40(5): 467-477.
- [7] 黄杰夫,孙燕,石远凯. 癌症医学[M]. 北京:人民卫生出版社,2014. 632-639.
- [8] Siles EI, Villalobos M, Valenzuela MT, *et al.* Relationship between p53 status and radiosensitivity in human tumour cell lines[J]. Br J Cancer, 1996, 73(5): 581-588.
- [9] Ogino H, Shibamoto Y, Sngle c, *et al.* Biological effects of intermittent radiation in cultured tumor cells: influence of fraction number and dose per fraction[J]. Radiat Res, 2005, 46(4): 401-406.
- [10] Lee YJ, Shon TJ, Kang PC, *et al.* Enhancement of radiosensitivity in H1299 cancer cells by actin-associated protein cofilin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 335(2): 286-291.
- [11] Raju UI, Nakata E, Yang P. In vitro enhancement of tumor cell radiosensitivity by a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 enzyme: mechanistic considerations. [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2002, 54(3): 886-894.

[修回日期]2015-08-18