

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2017.20170522

雷替曲塞联合 X 线照射对人喉癌细胞 Hep-2 的协同作用

王 抒, 李 轩, 乔田奎*

复旦大学附属金山医院肿瘤科, 上海 201508

[摘要] **目的:** 探讨雷替曲塞与 X 射线对人喉癌细胞 Hep-2 的协同作用及其潜在机制。**方法:** CCK-8 法检测不同浓度雷替曲塞对 Hep-2 细胞活力的影响。将 Hep-2 细胞随机分为对照组、雷替曲塞组、照射组、雷替曲塞+照射组。单击多靶模型绘制细胞存活曲线, 检测 4 组细胞存活情况及放射增敏比(sensitization enhancement ratio, SER); 流式细胞仪检测 4 组 Hep-2 细胞凋亡情况和周期改变。**结果:** 雷替曲塞能抑制 Hep-2 细胞活力, 且呈剂量依赖性($P<0.05$)。单击多靶模型显示, 雷替曲塞平均致死剂量下 SER 为 1.272。雷替曲塞能显著增加细胞凋亡和 G_2/M 期阻滞($P<0.05$)。**结论:** 雷替曲塞能协同 X 线对人喉癌细胞 Hep-2 的抑制作用, 其机制可能与诱导肿瘤细胞凋亡和增加细胞 G_2/M 期阻滞有关。

[关键词] 雷替曲塞; X 线; Hep-2 细胞; 凋亡; 细胞周期

[中图分类号] R 739.65 **[文献标志码]** A

The synergistic effect of raltitrexed combined with X-ray radiation on human laryngeal cancer Hep-2 cells

WANG Shu, LI Xuan, QIAO Tian-kui*

Department of Oncology, Jinshan Hospital, Fudan University, Shanghai 201508, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the synergistic effect of raltitrexed combined with radiotherapy on Hep-2 cells and its potential mechanism. **Methods:** CCK-8 assay was used to determine the cell viability after Hep-2 cells were treated with different concentrations of raltitrexed. Hep-2 cells were randomly divided into the control group, the raltitrexed group, the radiation group, and raltitrexed + radiation group. Cell survival curves were fitted with a single-hit multi-target model, cell viability and sensitization enhancement ratio(SNR) of the 4 groups were detected, and apoptosis and cycle changes of Hep-2 cells in 4 groups were detected by flow cytometry. **Results:** CCK-8 assay proved that raltitrexed could suppress cell viability in a dose-dependent manner. The single-hit multi-target model showed that the SER of mean death dose (D_0) was 1.272. Furthermore, the apoptosis rate and the number of Hep-2 cells at G_2/M phase were significantly increased in the group treated with the combination of raltitrexed and X-ray as compared to the group treated with X-ray alone ($P<0.05$). **Conclusions:** The inhibitory effect of raltitrexed combined with X-ray on human laryngeal cancer Hep-2 cells may be related to the induction of tumor cell apoptosis and the increase of G_2/M phase arrest.

[Key Words] raltitrexed; X-ray; Hep-2 cells; apoptosis; cell cycle

喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)是耳鼻喉科最常见的恶性肿瘤之一。LSCC 占头颈部上皮细胞来源恶性肿瘤的第 2 位, 具有高度侵袭性, 患者 5 年总生存率(overall survival, OS)约为 61%^[1-2]。近年来, 对于喉癌的治疗, 临床医师和患者越来越重视对喉部结构和功能的保护。放射治疗是治疗喉癌的重要手段之一。对于早期喉癌患者, 根治性放疗的效果与手术疗效相当^[3]。对于局部晚期喉癌患者, 放疗是手术后治

疗的重要手段^[4]。对于无法行手术切除的喉癌患者或患者有强烈保喉意愿时, 可采用放化疗联合治疗^[5-6]。然而, 由于喉癌细胞对射线的抵抗性, 往往导致放疗失败, 引起肿瘤复发和转移^[7]。因此, 寻找有效的放射增敏剂是多年来肿瘤领域的热点。

雷替曲塞是与噻唑啉叶酸化学结构相似的胸苷酸合酶(thymidylate synthase, TS)的特异性抑制剂, 近年应用于多种实体肿瘤。在体内, 雷替曲塞可以代谢成一系列多聚谷氨酸化合物, 这些代谢物

[收稿日期] 2017-06-17 **[接受日期]** 2017-08-21

[基金项目] 上海市金山区卫生和计划生育委员会青年项目(JSKJ-KTQN-2014-01). Supported by the Jinshan District Health and Family Planning Commission Project in Shanghai (JSKJ-KTQN-2014-01).

[作者简介] 王 抒, 硕士, 主治医师. E-mail: wshu830821@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-57039590, E-mail: qiaotk@163.com

具有更强的 TS 抑制作用^[8]。由于雷替曲塞与 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)具有相似的作用机制,因此雷替曲塞的应用范围较广,在结直肠癌^[9]、胃癌^[10]、食管癌^[11]、头颈部恶性肿瘤^[12]和恶性间皮瘤^[13]等的治疗中均取得了肯定疗效。但雷替曲塞联合放疗在喉癌治疗中的作用目前尚不明确。本研究通过体外实验,探讨雷替曲塞协同 X 线照射对喉癌细胞的抑制作用,为其临床联合应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂 人喉癌细胞系购自中国典型培养物保藏中心(Chinese Type Culture Collection, CTCC)。雷替曲塞由南京正大天晴制药有限公司提供。细胞培养基 MEM 和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 Gibco 公司。Annexin V 凋亡检测试剂盒、细胞周期试剂盒均购自美国 BD 公司。CCK-8 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司。

1.2 细胞培养 Hep-2 细胞用含 10% FBS、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 MEM 培养基中,置于 37℃、5% CO₂、95%湿度的培养箱中培养。常规消化传代,选取处于指数生长期的细胞进行实验。

1.3 细胞照射 应用美国 Varian 直线加速器,剂量率为 2 Gy/min。X 线能量为 6 MV,源皮距 100 cm。细胞克隆集落形成实验照射剂量依次为 2、4、6、8、10 Gy,其余实验照射剂量均为 10 Gy。

1.4 细胞增殖活力的测定 在 96 孔板中接种指数生长期的 Hep-2 细胞,每孔细胞数为 6×10^3 。加入终浓度分别为 0.1、0.25、0.5、1.0、2.0 μ g/mL 的雷替曲塞,均分别培养 24、48 h,每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,避光反应 3 h,振荡后用酶标仪于 450 nm 处检测光密度(optical density, D)值。实验独立重复 3 次。细胞活力(%)=(处理孔 D-空白对照 D)/(对照孔 D-空白对照 D)×100%。

1.5 细胞分组 将 Hep-2 细胞随机分为对照组、雷替曲塞组(RTX 组)、照射组(IR 组)和雷替曲塞加照射组(RTX+IR 组)。根据细胞活力的检测结果,RTX 组和 RTX+IR 组照射前加入不影响细胞活力浓度的雷替曲塞。

1.6 细胞克隆集落形成实验 IR 组、RTX+IR 组分别给予 0、2、4、6、8、10 Gy 的 X 线照射后,立即将

细胞用胰蛋白酶消化,并以 500~3 000 个/皿^[14]接种到 60 mm² 培养皿中。孵育 14 d 后,将菌落用甲醇固定,结晶紫染色。使用显微镜计数染色的集落数(每个集落不少于 50 个细胞)。实验独立重复 3 次。克隆形成率(plating efficiency, PE)=(克隆数/接种细胞数)×100%,细胞生存分数(survival fraction, SF)=(处理组 PE/对照组 PE)×100%。用单击多靶模型拟合细胞存活曲线计算各组平均致死剂量(mean death dose, D₀)、准阈剂量(quasi-threshold dose, Dq)及增敏比(sensitization enhancement ratio, SER)。

1.7 细胞凋亡检测 六孔板指数生长的 Hep-2 细胞分组处理同上,照射后的细胞继续培养 24、48 h,用胰酶消化并收集各组细胞(包括上清液中的细胞),冷 PBS 清洗 2 遍,加 100 μ L 缓冲液重悬,再加入 Annexin V 和碘化丙啶(PI)溶液各 5 μ L,混匀,室温避光孵育 15 min 后加入 300 μ L 缓冲液,用流式细胞仪(BD FACSCalibur)进行检测。实验独立重复 3 次。

1.8 细胞周期检测 Hep-2 细胞分组处理同上,照射后的细胞继续培养 24、48 h,用胰酶消化,收集各组细胞。将收集好的细胞用 70%冷乙醇在-20℃下固定过夜,避光将细胞加入含有 50 μ L/mL 的 RNase 酶和 50 μ L/mL PI 染色液,室温避光孵育 30 min 后,流式细胞仪检测细胞周期各时相所占比例。实验独立重复 3 次。

1.9 统计学处理 采用 GraphPad Prism v5.0 软件制图及进行统计学处理。单击多靶模型拟合细胞存活曲线,计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 雷替曲塞对 Hep-2 细胞增殖活力的影响 用不同浓度雷替曲塞(0.1、0.25、0.5、1.0、2.0 μ g/mL)处理 Hep-2 细胞后,细胞活力被抑制,并呈剂量依赖性($P < 0.05$);随着时间延长细胞活力进一步下降($P < 0.05$,图 1)。

2.2 雷替曲塞对 Hep-2 细胞克隆形成的影响 雷替曲塞(0.1 μ g/mL)联合 X 线(2、4、6、8、10 Gy)照射后,细胞存活分数明显低于相应剂量的接受单纯照射的细胞存活分数($P < 0.05$,图 2);RTX+IR 组存活曲线肩区较 IR 组变窄(图 2),SER_{D₀}为 1.272(表 1)。

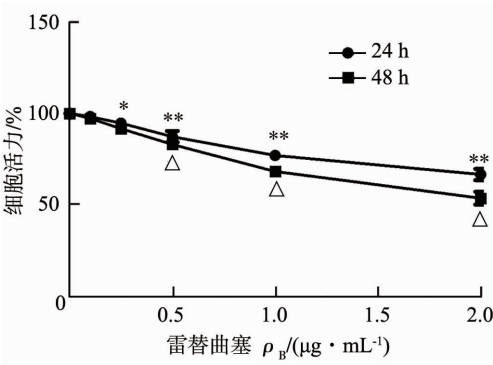


图1 雷替曲塞对 Hep-2 细胞活力的影响
* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与 0 $\mu\text{g/mL}$ 组相比; $\triangle P<0.05$ 与 24 h 时相比; $n=3, \bar{x} \pm s$

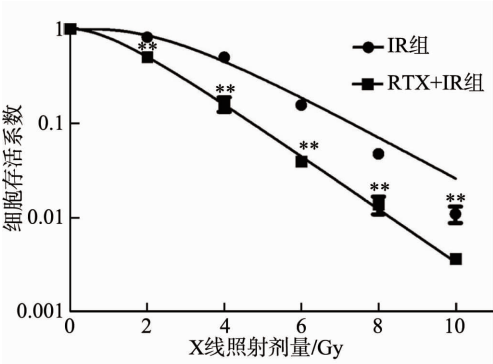


图2 雷替曲塞对 Hep-2 细胞克隆形成的影响
* $P<0.01$ 与 IR 组相比; $n=3, \bar{x} \pm s$

表1 雷替曲塞联合 X 线照射与单纯 X 线照射组
各放射参数值的比较

组 别	N^*	D_0/Gy	Dq/Gy	SER_{D_0}
IR 组	4.268	1.962	2.846	—
RTX+IR 组	2.193	1.542	1.211	1.272

* 外推值,细胞内关键靶的数目或1个靶所需击中的次数

2.3 细胞凋亡 处理 24 h 后,对照组、RTX 组、IR 组、RTX+IR 组细胞凋亡率逐渐升高 ($P<0.05$); 处理 48 h 后,对照组、RTX 组、IR 组、RTX+IR 组细胞凋亡率逐渐升高 ($P<0.05$)。其中,RTX+IR 组细胞凋亡率较对照组、IR 组升高 ($P<0.01$, 图 3)。

2.4 细胞周期 处理 24 h 后,对照组、RTX 组、IR 组、RTX+IR 组的细胞周期差异有统计学意义 ($P<0.05$); 处理 48 h 后,对照组、RTX 组、IR 组、RTX+IR 组的细胞周期差异有统计学意义 ($P<0.05$)。其中,RTX+IR 组与对照组、IR 组相比, G_2/M 期细胞比例明显增加 ($P<0.001$, 图 4)。

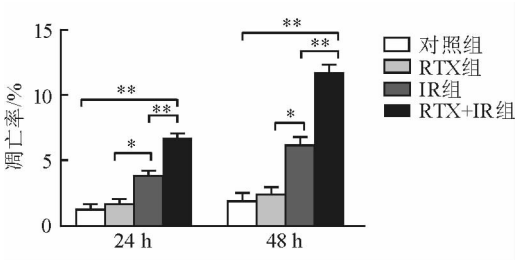


图3 不同组别细胞处理 24、48 h 后凋亡率比较
* $P<0.05$, ** $P<0.01$; $n=3, \bar{x} \pm s$

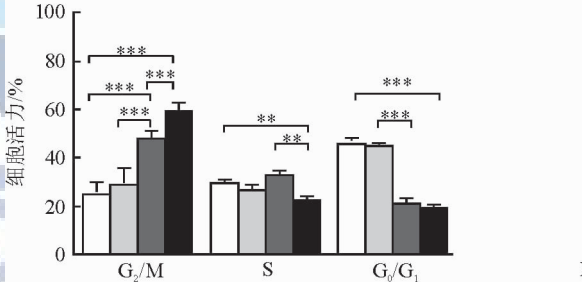
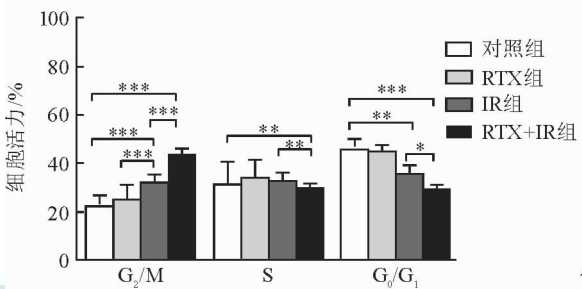


图4 不同组别细胞各细胞周期比例的比较

A:不同组别的细胞处理 24 h; B: 不同组别的细胞处理 48 h.
* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; $n=3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

雷替曲塞为新型水溶性 TS 特异性选择性抑制剂。其作用机制为:通过还原型叶酸载体(reduced folate carrier, RFC)转运至细胞内,被叶酰多聚谷氨酸合成酶(folypolyglutamate synthetase, FPGS)代谢为多聚谷氨酰化合物后,选择性抑制 TS,进而干扰 DNA 合成,导致 DNA 断裂和细胞死亡,从而产生抗肿瘤作用^[8]。

雷替曲塞问世早期主要用以治疗结直肠癌,目前研究显示其对多种实体肿瘤均具有抗肿瘤活性^[9-13]。雷替曲塞联合奥沙利铂在晚期结直肠癌中较 5-Fu 更具优势^[15];雷替曲塞联合奈达铂使晚期复发或转移性咽喉癌患者总生存时间延长^[12];雷替曲塞联合卡铂对转移或复发性头颈鳞癌患者有效

率约 53%^[16]。雷替曲塞不仅用于肿瘤化疗,还可联合靶向或放射治疗。James 等^[17]进行的 I 期临床研究显示,对于不可切除或复发性直肠癌,雷替曲塞联合放疗有显著疗效。在鼻咽癌^[18]及食管鳞癌^[19]中,雷替曲塞联合放疗不良反应较轻,治疗效果确切。本研究通过体外实验揭示了雷替曲塞能协同 X 线照射对人喉鳞癌细胞 Hep-2 的抑制作用。本研究中,CCK-8 法检测结果表明,随着药物浓度和作用时间的增加,细胞增殖活力不断下降。与对照组相比,雷替曲塞为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 时才对细胞增殖活力差异无统计学意义。故本实验 SER 研究中采用此浓度。

细胞克隆形成实验是公认的验证肿瘤细胞放射敏感性的“金标准”^[20]。本研究结果提示,雷替曲塞联合放疗能显著减少 Hep-2 细胞的克隆形成数目。单纯放疗及联合治疗时的 D_0 值分别为 1.962、1.542 Gy,联合治疗的 SER 为 1.272,提示在放疗之前使用雷替曲塞可提高 Hep-2 细胞株对放疗的敏感性。

细胞凋亡是放射杀死肿瘤细胞的一个重要途径。肿瘤细胞放射敏感性与细胞凋亡密切相关,凋亡率的增加提示细胞有更大的放射敏感性^[21]。本研究显示,低浓度的雷替曲塞对喉癌细胞凋亡率没有明显影响,但 RTX+IR 组较 IR 组凋亡率升高。

肿瘤细胞放射敏感性在细胞周期的不同时相有很大差别, G_2/M 期细胞放射敏感性较 G_1 或 S 期高;影响细胞周期检测点或周期蛋白表达均会改变肿瘤细胞的放射敏感性^[22]。因此,肿瘤细胞的 G_2/M 期阻滞也是提高放射敏感性的重要途径。本研究显示,RTX+IR 组较 IR 组 S 期细胞比例降低,并出现明显的 G_2/M 期停滞,提示雷替曲塞能提高喉癌细胞的放射敏感性。

放射抵抗是导致肿瘤放疗失败的关键因素之一,可能导致肿瘤转移和复发。本研究通过体外实验证明,雷替曲塞能协同 X 线对人喉鳞癌 Hep-2 细胞的抑制作用,其机制可能与诱导肿瘤细胞凋亡和增加 G_2/M 期阻滞有关,为雷替曲塞联合放射治疗在喉癌治疗中的应用提供了实验依据。但本研究只涉及了体外研究,相关体内试验及信号转导通路、基因调控机制有待进一步探讨。

参考文献

- [1] RUDOLPH E, DYCKHOFF G, BECHER H, et al. Effects of tumour stage, comorbidity and therapy on survival of laryngeal cancer patients: a systematic review and a meta-analysis[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2011, 268(2): 165-179.
- [2] HABBOUS S, HARLAND L T, LA DELFA A, et al. Comorbidity and prognosis in head and neck cancers: differences by subsite, stage, and human papillomavirus status[J]. *Head Neck*, 2014, 36(6): 802-810.
- [3] GREULICH M T, PARKER N P, LEE P, et al. Voice outcomes following radiation versus laser microsurgery for T₁ glottic carcinoma: systematic review and meta-analysis[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2015, 152(5): 811-819.
- [4] FORASTIERE A A, WEBER R S, TROTTI A. Organ preservation for advanced larynx cancer: issues and outcomes [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(29): 3262-3268.
- [5] POPOVTZER A, BURNSTEIN H, STEMMER S, et al. Phase II organ-preservation trial: Concurrent cisplatin and radiotherapy for advanced laryngeal cancer after response to docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil-based induction chemotherapy[J]. *Head Neck*, 2017, 39(2): 227-233.
- [6] BOEHM A, LINDNER F, WICHMANN G, et al. Impact of indication-shift of primary and adjuvant chemo radiation in advanced laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2015, 272(8): 2017-2025.
- [7] ORTH M, LAUBER K, NIYAZI M, et al. Current concepts in clinical radiation oncology [J]. *Radiat Environ Biophys*, 2014, 53(1): 1-29.
- [8] HAGNER N, JOERGER M. Cancer chemotherapy: targeting folic acid synthesis[J]. *Cancer Manag Res*, 2010, 2: 293-301.
- [9] CARAVATTA L, PICARDI V, TAMBARO R, et al. Neoadjuvant accelerated concomitant boost radiotherapy and multidrug chemotherapy in locally advanced rectal cancer: a dose-escalation study [J]. *Am J Clin Oncol*, 2012, 35(5): 424-431.
- [10] SHEN J, WANG H, WEI J, et al. Thymidylate synthase mRNA levels in plasma and tumor as potential predictive biomarkers for raltitrexed sensitivity in gastric cancer[J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(6): 938-945.
- [11] MACKAY H J, MCINNES A, PAUL J, et al. A phase II study of epirubicin, cisplatin and raltitrexed combination chemotherapy (ECT) in patients with advanced oesophageal and gastric adenocarcinoma [J]. *Ann Oncol*, 2001, 12(10): 1407-1410.

- [12] 迟洪亮. 奈达铂联合雷替曲塞治疗晚期喉咽癌 17 例分析[J]. 中国医药指南, 2014, 12(19):199-200.
- [13] SURMONT V F, VAN MEERBEECK J P. Raltitrexed in mesothelioma[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2011, 11(10): 1481-1490.
- [14] SHORT S C, GIAMPIERI S, WORKU M, et al. Rad51 inhibition is an effective means of targeting DNA repair in glioma models and CD133⁺ tumor-derived cells[J]. *Neuro Oncol*, 2011, 13(5): 487-499.
- [15] 胡 俊, 韦永明, 王 银, 等. 雷替曲塞在晚期结直肠癌治疗中的应用价值[J]. 吉林医学, 2011, 32(34):7281-7281.
- [16] GALETTA D, GIOTTA F, ROSATI G, et al. Carboplatin in combination with raltitrexed in recurrent and metastatic head and neck squamous cell carcinoma: a multicentre phase II study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale (G. O. I. M.) [J]. *Anticancer Res*, 2005, 25 (6C): 4445-4449.
- [17] JAMES R D, BOTWOOD N, VERNON C C, et al. Raltitrexed plus radiotherapy for the treatment of unresectable/recurrent rectal cancer: a phase I study[J]. *Ann Oncol*, 2003, 14(4): 570-573.
- [18] 丁 巍, 姜万荣, 孙向东, 等. 雷替曲塞联合奈达铂同步螺旋断层放疗治疗局部晚期鼻咽癌的临床研究[J]. 临床肿瘤学杂志, 2016, 21(8):727-731.
- [19] 夏铀铀, 王 磊, 宋大安, 等. 放疗联合雷替曲塞奥沙利铂同步治疗中晚期食管癌的 II 期临床研究[J]. 中国肿瘤临床, 2014, 41(11):716-719.
- [20] KIM H, LEE O H, XIN H W, et al. TRF2 functions as a protein hub and regulates telomere maintenance by recognizing specific peptide motifs[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16(4):372-379.
- [21] YUAN S, QIAO T, CHEN W. CpG oligodeoxynucleotide 1826 enhances the Lewis lung cancer response to radiotherapy in murine tumor[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2011, 26(26): 203-208.
- [22] 王宏梅, 陈龙华, 郑小康, 等. 抑制 ATM 表达致鼻咽癌细胞 CNE1 辐射增敏的细胞周期阻滞研究[J]. 癌症, 2008, 27(5): 466-470.

[本文编辑] 姬静芳

