

# 一氧化氮对肿瘤细胞辐射敏感性的影响研究

孔肇路<sup>1</sup> 金一尊<sup>1</sup> Chinje E C<sup>2</sup> Stratford I J<sup>2</sup>

<sup>1</sup> (复旦大学放射医学研究所 上海 200032)

<sup>2</sup> (英国曼彻斯特药学院 英国 M13 9PL)

**摘要** 调节肿瘤细胞中一氧化氮(Nitrogen monoxide, NO)的合成量,观察NO对细胞辐射敏感性的影响。结果显示乏氧和L-甲基盐酸精氨酸(L-N<sup>G</sup>-Monomethylarginine hydrochloride, L-NMMA)作用均可显著抑制NO的合成,但对一氧化氮合酶(Inducible nitrogen monoxide synthase, iNOS)活性无显著影响;NO可以增强肿瘤细胞对射线的敏感性也增强,但两者变化并非线性相关;乏氧和L-NMMA作用抑制肿瘤细胞中NO的合成,会降低细胞对射线的敏感性;同母本细胞相比,基因转染建立NO含量较高的肿瘤细胞,氧增比(Oxygen Enhancement Ratio, ORE)下降,提示NO参与射线引起的细胞损伤。

**关键词** 一氧化氮, 一氧化氮合酶, L-甲基盐酸精氨酸, 基因转染, 辐射敏感性

**中图分类号** R730.53, R730.55

肿瘤生物学研究显示,实体肿瘤中不同程度的存在乏氧细胞<sup>[1]</sup>,这些乏氧区域远离血管,氧张力较低,细胞处于低pH、低营养状态,细胞分裂不活跃,以G<sub>0</sub>期细胞为主,放射敏感性只是有氧细胞的三分之一;由于存在药理学和药代动力学方面的影响因素,乏氧细胞对抗癌药物敏感性差,因而成为肿瘤复发、再生长的根源。随着分子生物学技术的广泛应用,20世纪90年代大量资料显示,乏氧条件下,肿瘤细胞中乏氧诱导因子HIF-1活化,触发一系列功能基因表达,从而对放射治疗和化学药物治疗产生耐受性<sup>[2]</sup>。一氧化氮合酶(Nitrogen monoxide synthase, NOS)广泛分布于多种肿瘤组织,近期研究表明它也是HIF-1下游的功能蛋白之一,其合成产物NO是机体重要的生物小分子,在细胞信号传导,血管形成过程中起重要的作用<sup>[3,4]</sup>。因此,本文报道从细胞水平对NO与肿瘤细胞辐射敏感性的相关性进行研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

NO合成抑制剂L-NMMA(MW 248.5),购于Welcome Foundation Ltd,生理盐水配成50mmol/L储备液,使用时稀释到0.5mmol/L。NO测定试剂盒购于R and D systems公司,细胞培养用改良的

Eagle氏培养液(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)购于GIBCO公司,胎牛血清(Fetal cattle serum, FCS)购于英国药理分析研究所,其它试剂均购于SIGMA公司。

### 1.2 照射条件

<sup>60</sup>Co γ射线辐射装置一次均匀照射,照射剂量为1、2、3、4、5Gy,剂量率为255cGy/min。

### 1.3 实验设计

1.3.1 高表达NOSII基因的细胞模型构建 肿瘤细胞和其基因转染的细胞克隆:高表达iNOS基因的三个细胞克隆(iNOS9, iNOS12, iNOS13)和对照组母本细胞HT1080(人纤维肉瘤细胞株)均由英国曼彻斯特大学药学院Chinje等<sup>[5]</sup>馈赠,对照组细胞生长于含10%FCS和DMEM中,NOS转染的各克隆细胞长于含5ng/mL的Puromycin的上述培养液,实验用对数生长期细胞。

1.3.2 实验分组 (1)对照组:有氧+正常培养液。(2)乏氧组:乏氧+正常培养液。(3)含抑制剂的对照组:有氧+含500μmol/L的L-NMMA的培养液。

(4)含抑制剂的乏氧组:乏氧+含500μmol/L的L-NMMA的培养液。

1.3.3 测定指标 (1)NO含量和iNOS活性:上述各组细胞长至75mL培养瓶,70%—80%融合时

国家自然科学基金(30500143)、国家863计划(2002AA2Z3104)资助

第一作者:孔肇路,女,1978年2月出生,2004年毕业于复旦大学放射医学专业,博士,助理研究员

通讯联系人:金一尊

收稿日期:初稿 2005-12-09,修回 2006-01-20

分别收集细胞上清液和细胞,前者用于 Griess 法测定 NO 含量,后者以液闪方法测定 iNOS 的活性。(2) 辐射敏感性检测:集落形成法检测 HT1080 细胞和其 NOS 基因转染细胞株上述分组条件下,在 1、2、3、4、5Gy  $\gamma$  射线照射后存活率的差异,以 90% 细胞死亡时的照射剂量 (Inhibitory dosage 90%, ID<sub>90</sub>) 评价不同各组细胞对射线敏感性的差异。(3) 回归分析肿瘤细胞中 NO 含量与放射敏感性的相关性。

(4) 以 Radiomed 软件拟合放射-细胞存活曲线,按照  $S=1-[1-e^{(-D/D_0)}]^N$  的数据模型计算  $D_0$ ,  $D_q$ ,  $N$  值, ID<sub>50</sub>, 计算 OER, 分析 NO 对细胞放射敏感性的影响。其中,  $D_0$  为细胞存活曲线斜率的倒数,  $D_q$  为曲

线的肩区,  $N$  为外推值,  $OER = D_0$  (乏氧照射) /  $D_0$  (有氧照射), 50% 细胞死亡时的照射剂量 (ID<sub>50</sub>), 上述参数均由软件自行计算生成。

## 2 结果

### 2.1 不同实验组肿瘤细胞 NO 含量和 NOS 活性

表 1 列出各种细胞株不同实验条件下的 NO 含量和 NOS 活性,实验结果表明乏氧和 L-NMMA 作用均可引起 NOS 转染的细胞 NO 合成的急剧下降,而对 NOS 活性影响不大。

Table 1 Intracellular iNOS activity and NO under different conditions

(n=3)

Cell line		O <sub>2</sub>	L-NMMA	NO(10 <sup>-5</sup> $\mu$ mol/L/cell)	iNOS(pmol citrulline/min mg <sup>-1</sup> )
HT1080	Wt	+	-	2.63±0.19	/
		-	-	2.31±0.05	/
		+	+	2.08±0.34	/
		-	+	2.37±0.40	/
	iNOS9	+	-	8.35±1.46 <sup>(1)</sup>	27.1±10.1
		-	-	3.86±0.84 <sup>#</sup>	41.9±7.4
		+	+	2.29±0.10 <sup>#</sup>	34.9±7.0
		-	+	2.13±0.50 <sup>#</sup>	32.9±11.5
	iNOS12	+	-	34.60±2.40 <sup>(2)</sup>	63.3±15.2
		-	-	5.63±0.12 <sup>§</sup>	60.0±6.9
		+	+	3.46±1.10 <sup>§</sup>	49.3±7.2
		-	+	2.21±1.00 <sup>§</sup>	56.9±4.8

Note: t test, <sup>#</sup>  $p < 0.05$  vs control (1); <sup>§</sup>  $p < 0.05$  vs control (2); / Indicates enzyme activity too low to detect

### 2.2 不同实验组肿瘤细胞对射线的敏感性

有氧条件下,随着 NO 合成的增加,细胞对射线的敏感性显著增强,而乏氧和有抑制剂存在均会降低细胞对射线的敏感性 (见表 2)。

### 2.3 NO 含量同细胞辐射敏感性的相关性

回归分析 (见图 1) 表明,NO 含量和细胞对射线敏感性间并无线性关系。

### 2.4 模型拟合分析 NO 对细胞辐射敏感性的影响

表 3 为对照组和乏氧组细胞在不同剂量  $\gamma$  射线照射后存活曲线经 radiomed 单靶多击模型拟合后

(见图 2) 计算得到的相关参数。表中数据显示,转染了 iNOS 的细胞 OER 和理论 ID<sub>50</sub> 值均小于母本细胞 HT1080,同时尽管有更高的 NO 合成量,iNOS12 细胞株的 OER 和 ID<sub>50</sub> 却比 iNOS9 细胞高。

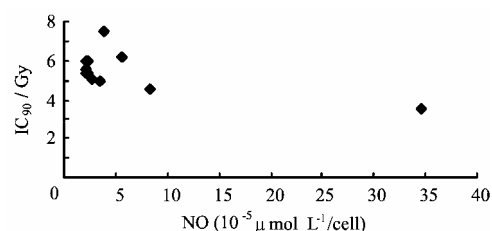
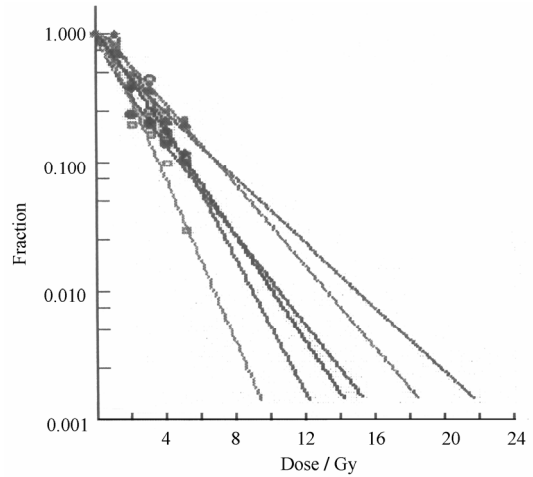


Fig.1 The correlation analysis of NO contents and cells adiosensitivity

**Table 2 Cells sensitivity to irradiation under different condition (n=3)**

Cell line	O <sub>2</sub>	L-NMMA	IC <sub>90</sub> /Gy
HT1080	+	-	5.1±0.5 <sup>(1)</sup>
	-	-	6.0±0.4
	+	+	5.6±0.3
	-	+	6.0±0.8
iNOS9	+	-	4.6±0.1 <sup>#</sup>
	-	-	7.5±2.3
	+	+	5.4±0.2
	-	+	6.0±0.5
iNOS12	+	-	3.5±0.11 <sup>#</sup>
	-	-	6.2±0.9
	+	+	5.0±1.0
	-	+	5.4±0.2

Note: t test, <sup>#</sup> p<0.05 versus control (1)



**Fig.2** Cell survival curves after  $\gamma$ -ray irradiation in air or under hypoxia.  $\circ$ HT1080(air),  $\bullet$  HT1080(hypoxia),  $\square$  iNOS9(air),  $\blacksquare$  iNOS9(hypoxia),  $\blacktriangle$  iNOS12(air),  $\blacklozenge$  iNOS12(hypoxia)

**Table 3 The parameters of cells survival curve of different groups**

Groups		D <sub>0</sub>	D <sub>q</sub>	N	IC <sub>50</sub>	OER
HT1080	O <sub>2</sub>	1.6391	1.3662	2.3014	2.29±0.11 <sup>(1)</sup>	
	N <sub>2</sub>	2.7119	0.6846	0.6656	2.82±0.10 <sup>(2)</sup>	1.65
iNOS9	O <sub>2</sub>	2.4869	-1.0122	1.4013	1.41±0.13*	
	N <sub>2</sub>	3.4680	-1.0387	1.2872	1.79±0.18 <sup>#</sup>	1.39
iNOS12	O <sub>2</sub>	1.3598	0.4588	0.7412	1.58±0.10*	
	N <sub>2</sub>	2.1039	0.3501	1.1809	1.87±0.09 <sup>#</sup>	1.55

Note: t test, <sup>#</sup> p<0.05 versus<sup>(1)</sup> \* p<0.05 versus<sup>(2)</sup>

### 3 讨论

NO 作为细胞的信息传递因子，在机体生物学过程中具有重要的生理功能。肿瘤组织中广泛分布着可诱导性一氧化氮合酶 (iNOS)，使人们开始关注 NO 在肿瘤发生发展中的作用，近年来研究发现乏氧肿瘤组织中 iNOS 表达显著增强，考虑到乏氧的肿瘤组织对射线敏感性差，是放射治疗产生耐受的重要原因，实验设计观察了 NO 和 iNOS 对细胞放射敏感性的影响。目前对 NO 影响肿瘤细胞的放射损伤尚无统一的认识，研究手段的差异是实验结果大相径庭的重要原因。本实验主要是通过 NOS 基因转染的方法建立了可供分析的不同 NO 含量的细胞模型，其它调节细胞中 NO 含量的方法还包括细胞因子 (IL-1,  $\gamma$  干扰素等) 刺激 NO 合成，使用 NO 合成抑制剂和 NO 合成前体等<sup>[6,7]</sup>；细胞因子是通过刺激 NOS 高表达而促进 NO 合成，NO 合成前体和 NO 合成抑制剂调节 NO 合成则需要考虑研究

对象自身 NO 合成的情况；比较而言，本实验直接将 NO 合成酶基因引入肿瘤细胞获得 NO 含量不同的细胞克隆，并可以进一步运用 NO 抑制剂调节 NO 含量，从而可以从多种 NO 水平观察肿瘤细胞对射线和抗癌药物的敏感性，是较为理想的 NO 调节手段。但是由于各细胞克隆 NOS 活性不同，这也可能干扰细胞射线敏感性的因素，增加了数据分析的难度。

本实验还观察到不同照射剂量下，NO 对细胞辐射敏感性的影响不尽相同：低剂量 (1Gy) 照射时，高 NO 合成的细胞克隆对射线不及对照组敏感，而在较高剂量照射 (2—5Gy) 时，肿瘤细胞对射线的敏感性却随着 NO 含量的增加而迅速增强，我们推测引起上述现象的原因可能是：NO 参与对肿瘤细胞的作用继发于射线引起细胞中相关分子的损伤，只有当照射引起细胞中自由基 (或自由电子) 的浓度达到一定阈值时，NO 才以电子受体的形式

参与对细胞的损伤过程,而对 HT1080 细胞而言,为启动 NO 参与射线引起的细胞损伤,这一域值对于的照射剂量应该大于 1Gy。由于上述在不同剂量照射下,细胞各株所体现的相对放射敏感性并不相同,我们没有采用常规离体实验指标—SF<sub>2</sub> (2Gy 时细胞的存活分数)来评价细胞的放射敏感性,同时由于本实验室 (Oncology lab, Manchester university) 在进行放射增敏药物研制时,集落形成实验常规采用 ID<sub>90</sub> 进行来评价细胞敏感性,并积累有大量 ID<sub>90</sub> 数据来进行实验数据组间组内误差和条件的监测,因此本实验中我们仍然采用了 ID<sub>90</sub> 进行细胞的放射敏感性评价。

本实验只设计了 1—5Gy 剂量范围的照射,主要是依据文献[8]报道和我们前期的预实验结果,HT1080 是 P53 野生型的细胞株,对射线较为敏感,在上述剂量范围内,细胞的存活分数落在 100%—5%之间,可以有效的进行 IC<sub>90</sub> 等相关指标的计算;但在运用 radiomed 软件进行单靶多击模型的数据拟合时,由于缺乏大剂量照射的数据资料,部分实验组 (iNOS9) 模型参数 (D<sub>q</sub>) 出现了负值,有待今后进一步研究。

实验中并未观察到 iNOS 本身影响细胞的放射敏感性,因此合理利用肿瘤组织缺氧区域的高 iNOS 活性,设计其靶向的化合物同 NO 一起,增强射线

对肿瘤细胞尤其是乏氧细胞的作用,将很大程度上提高放射治疗的疗效,目前国外已有 AQ4N 进入了临床研究阶段,iNOS 参与其代谢活化的作用研究也在同步开展,随着对肿瘤组织 iNOS 和 NO 功能的深入研究,相信将有更多的 iNOS 靶向的化合物可以进入抗肿瘤药物和放射增敏剂的行列。

#### 参考文献:

- 1 Louis Harrison, Kimberly Blackwell. *Oncologist*, 2004, **9** (Suppl 5): 31-40
- 2 Patrick Maxwell, Konstantin Salnikow. *Cancer Biol Ther*, 2004, **3**(1): 29-35
- 3 Louis B, Harrisona, Manjeet Chadhaa, *et al.* *Oncologist*, 2002, **7**(6): 492-508
- 4 Chinje E C, Cowen E L, Feng J, *et al.* *Mol Pharmacol*, 2003, **63**: 1248-1255
- 5 Chinje E C, Williams K J, Telfer B A, *et al.* *Br J Cancer*, 2002, **86**: 136-142
- 6 Tendler D S, Bao C, Wang T H, *et al.* *Cancer Res*, 2001, **61**: 3682-3688
- 7 Berge D L V, Ridder M D, Verovski V N, *et al.* *Br J Cancer*, 2001, **84**(8): 1122-1125
- 8 Eric J Bernhard, Eric J Stanbridge, Swati Gupta, *et al.* *Cancer Res*, 2000, **60**: 6597-6600

### Effects of NO on tumour cells radiosensitivity to $\gamma$ -rays in vitro

KONG Zhaolu<sup>1</sup> JIN Yizun<sup>1</sup> Chinje E C<sup>2</sup> Stratford I J<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(The institute of Radiation Medicine, Fudan university, Shanghai 200032

<sup>2</sup>(Oncology Lab, the Pharmacy School of Manchest University, UK, M13 9PL)

**ABSTRACT** To examine the effect of nitric oxide (NO) on tumour cells radiosensitivity, human sarcoma cells (HT1080) and its inducible nitrogen monoxide synthase (iNOS) gene transfected clones (iNOS9, iNOS12) were exposed to 1—5Gy <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -ray irradiation alone or combined with 500 $\mu$ mol/L L-NMMA, a NO synthesis inhibitor, in air or under hypoxia. It showed that both hypoxia and L-NMMA decreased the production of NO, but had no obvious effect on iNOS activity. With more NO formation, gene-tranfered cells showed higher sensitivity to irradiation and lower OER than HT1080, but there was no obvious correlation between NO and cells sensitivity to irradiation. The results indicated that NO could take part in irradiation-induced cells damage and enhance cells radiosensitivity.

**KEYWORDS** Nitrogen monoxide (NO), Nitrogen monoxide synthase (NOS), L-N<sup>G</sup>-Monomethylarginine hydrochloride (L-NMMA), Gene-transfer, Radiosensitivity

**CLC** R730.53, R730.55