

收稿日期: 初稿 2011-08-23, 修回 2011-11-01

细胞培养液中。细胞照射为 P-M 型西门子直线加速器 6 MV 的 X 射线, 剂量率为 200 cGy/min, 源皮距为 1.5 cm。

1.2.3 MTT 比色法测细胞存活率 将 HeLa 细胞用 0.25% 的胰酶消化, 制备成单细胞悬液, 以 8×10^4 个 / mL 密度接种到 96 孔培养板, 每孔 100 μ L, 培养 24 h 后, 更换培养液, 加入 0–70 μ mol/L 的 CMT-8 细胞培养液 200 μ L。每一浓度设 6 个复孔, 加药后的细胞继续培养 24 h、48 h 或 72 h。于实验终止前 4 h, 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μ L, 继续培养 4 h。然后吸去上清, 加入 DMSO, 混匀后测值。各组细胞存活率 = (各浓度组吸光值 / 对照组吸光值) $\times 100\%$ 。测定放射敏感性, 取无毒副作用浓度 (0–5 μ mol/L) CMT-8 处理 HeLa 细胞 24 h 后, 细胞接受照射, 照射后继续培养另外 24 h, 完成 MTT 法。

1.2.4 倒置显微镜观察细胞形态 将各处理组的细胞按实验条件培养 24 h 后, 终止培养, 观察细胞形态变化并拍照记录。

1.2.5 伤口愈合实验测细胞迁移能力 将 HeLa 细胞用胰酶消化, 以 5×10^5 个 / mL 接种于 6 孔板中, 待细胞长满板底时用无菌 200 μ L 的枪头垂直划出一无细胞的细痕, 用 1 $\times$ PBS 小心清洗去除悬浮细胞 (此时作为划痕后 0 h), 各孔再加入不同浓度的 CMT-8 继续培养 24 h 或 48 h, 在显微镜下观察相同部位划痕宽度。

1.2.6 细胞粘附实验测细胞粘附能力 将 HeLa 细胞接种于 24 孔板内, 加入 CMT-8 处理, 置于培养箱中培养, 取不同时间段 (如 0.5 h、1 h、3 h、5 h) 进行观察, 弃掉上层漂浮的细胞, 再用 PBS 清洗三次后进行细胞计数。细胞粘壁率 = (粘壁细胞数 / 每格总细胞数) $\times 100\%$ 。

1.2.7 流式细胞技术测细胞周期 将贴壁好的 HeLa 细胞换用无血清的培养液同步化处理 12 h 后, 给予不同浓度的 CMT-8 或 X 射线处理细胞, 24 h 后收集细胞并用 75% 的酒精 (4 $^{\circ}$ C 预冷) 固定。将细胞离心洗涤, 再加 PI 染液 (100 g/L) 避光染色, 30 min 后, 上机检测。

1.2.8 Western blot 法测细胞蛋白表达 将收集的细胞用 IP 裂解液 4 $^{\circ}$ C 充分裂解, SDS-PAGE 电泳, 转膜, 5% 脱脂牛奶封闭过夜, 加入一抗, 室温孵育 1 h, 用 Tween PBS 洗三次, 特异性二抗孵育 1 h, 洗膜三次后用 ECL 法显色于暗室中曝光、显影、定影、成像。

1.2.9 统计学处理 以上实验均重复三次以上, 所得的数据结果以 “均数 $\pm$ 标准差” ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用

SPSS16.0 统计软件进行 t 检验以及方差分析, $P < 0.05$ 视为有统计学意义。

2 结果

2.1 CMT-8 的抗肿瘤作用

2.1.1 CMT-8 对 HeLa 细胞的生长的影响 图 2 显示不同浓度 CMT-8 对 HeLa 细胞的生长抑制呈现浓度-依赖和时间-依赖关系。由此图也可以看出当 10 μ mol/L CMT-8 处理细胞 24 h、48 h、72 h 后的存活率分别 77%、28%、10%, 组间相比均有统计学差异 ($P < 0.05$)。形态学观察结果发现 CMT-8 明显改变了 HeLa 细胞形态。未处理过的细胞数量多, 贴壁生长, 细胞完整, 而 CMT-8 处理过的细胞数量减少, 间隙增大, 部分细胞皱缩、漂浮。这些结果表明 CMT-8 可以明显抑制 HeLa 细胞的生长, 并呈时间-和浓度-效应关系。

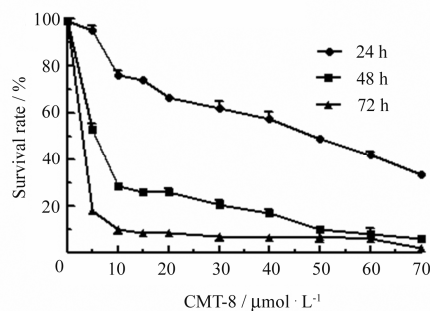


Fig.2 Effect of CMT-8 on HeLa cell growth

2.1.2 CMT-8 对 HeLa 细胞粘附能力的影响 3 或 5 μ mol/L CMT-8 直接加到胰酶消化后的悬浮 HeLa 细胞培养液中, 并转移至培养皿中不同时间 (0.5 h、1 h、3 h、5 h) 观察细胞贴壁情况。如图 3 所示, 与对照组相比, 培养基中含有 CMT-8 的细胞在 1 h、3 h、5 h 时在培养皿的贴壁能力明显低于未处理组, $P < 0.05$, 有统计学差异。并随着 CMT-8 浓度增加, 细胞贴壁能力更加减弱。

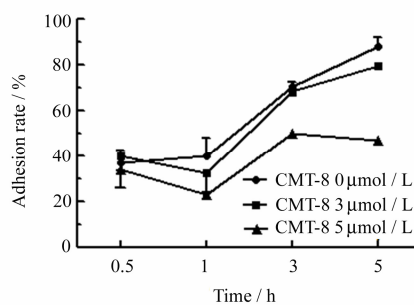


Fig.3 Effect of CMT-8 on the adhesion of HeLa cells

2.1.3 CMT-8 对 HeLa 细胞迁移能力的影响 如图 4 所示为无毒副作用浓度 CMT-8 (5 $\mu\text{mol/L}$) 处理 HeLa 细胞 24 h、48 h 后的伤口愈合实验结果。从中可以看出,随着处理时间的延长,细胞向划痕区域迁移,5 $\mu\text{mol/L}$ CMT-8 处理过的细胞迁移速度慢,在实验结束时其划痕间隙明显大于无 CMT-8 处理组的细胞。

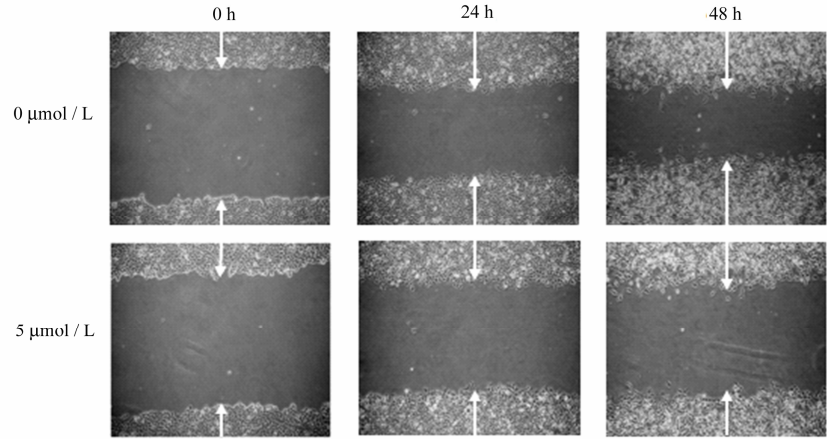


Fig.4 Effect of CMT-8 on the migration of HeLa cells

Table 1 Effect of CMT-8 on cell cycle distribution of HeLa cells

CMT-8 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Percentage of cell cycle ($\bar{x}\pm s$) / %		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0	45.38 $\pm$ 1.12	38.78 $\pm$ 5.43	15.84 $\pm$ 6.55
10	54.38 $\pm$ 6.14	26.59 $\pm$ 2.24	19.03 $\pm$ 3.90
40	74.59 $\pm$ 1.28*	18.45 $\pm$ 1.93*	6.96 $\pm$ 3.21*
70	76.78 $\pm$ 1.91*	15.96 $\pm$ 0.51*	7.25 $\pm$ 1.40*

Note: * $p<0.05$

2.1.5 CMT-8 对蛋白表达的影响 如图 5 所示,采用 Western blot 法检测发现经 40 $\mu\text{mol/L}$ CMT-8 处理后的 HeLa 细胞周期相关蛋白 Cyclin D 和 Cyclin E 表达水平下降,而采用 70 $\mu\text{mol/L}$ CMT-8 处理后 Cyclin D 和 Cyclin E 表达水平则进一步下降。这些结果说明 CMT-8 对 Cyclin D 和 Cyclin E 蛋白表达的影响有一定的剂量依赖性。

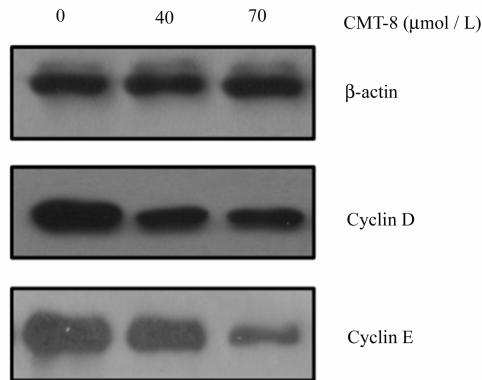


Fig.5 Effect of CMT-8 on protein expression of HeLa cells

2.1.4 CMT-8 对 HeLa 细胞周期分布的影响 如表 1 所示,与无 CMT-8 药物处理的对照组细胞相比,不同浓度 CMT-8 处理 HeLa 细胞 24 h 后的 G₀/G₁ 期细胞数量有不同程度的增多,而 S 期和 G₂/M 期细胞数量有所减少,并呈浓度依赖关系。这些结果表明 CMT-8 诱导 HeLa 细胞 G₀/G₁ 期阻滞。

2.2 CMT-8 的放射增敏作用

2.2.1 CMT-8 联合 X 射线对 HeLa 细胞生长的影响 图 6-A 显示 $\leq 5 \mu\text{mol/L}$ 的 CMT-8 处理 HeLa 细胞 24h 后,存活率均在 85%以上 ($P<0.05$) 有统计学意义,因此可以说 $\leq 5 \mu\text{mol/L}$ 的 CMT-8 对 HeLa 细胞的生长和增殖并不产生明显的抑制作用。而将 0–5 $\mu\text{mol/L}$ CMT-8 处理 HeLa 细胞 24 h 后,再给予细胞 6 Gy X 射线照射,继续培养 24 h 后观察细胞生长和增殖。从图 6-B 中我们可以看出,在同一剂量照射下,用 CMT-8 处理后的 HeLa 细胞较未处理的细胞,存活率均明显降低 ($P<0.05$),均有统计学差异,并呈浓度依赖关系。例如,与单纯接受 6 Gy X 射线照射的细胞相比,5 $\mu\text{mol/L}$ CMT-8 联合 6Gy X 射线照射后的 HeLa 细胞存活率降低至 38%,表明无毒副作用浓度的 CMT-8 ($\leq 5 \mu\text{mol/L}$) 处理可以提高 HeLa 细胞的放射治疗敏感性(图 6-B)。相对于 6 Gy X 射线单纯处理组,联合组的细胞数量减少,间隙增宽,漂浮细胞明显增多(图 7)。这

些结果说明在我们实验条件下, $\leq 5 \mu\text{mol/L}$ CMT-8 可以提高 HeLa 细胞的放射敏感性。

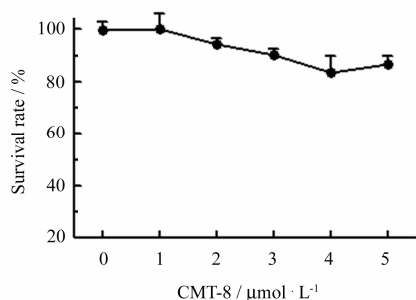


Fig.6-A Effects of CMT-8 at low doses on HeLa cell growth

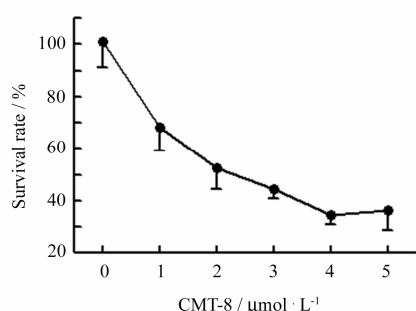


Fig.6-B Combinational effects of CMT-8 and X-rays on HeLa cell growth

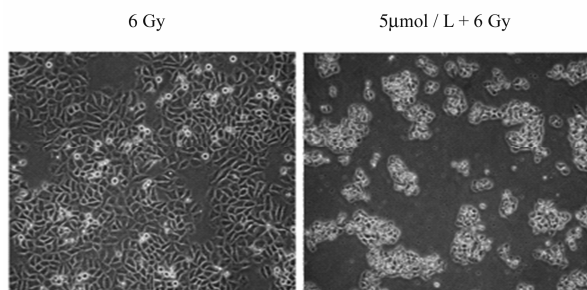


Fig.7 Morphological alteration of cells treated with CMT-8 and X-rays

2.2.2 CMT-8 联合 X 射线对 HeLa 细胞周期分布的影响 流式细胞仪检测结果显示, 与无 CMT-8 处理的对照组相比, 经 $5 \mu\text{mol/L}$ CMT-8 处理后的 HeLa 细胞, 其周期改变并不明显 ($P>0.05$)。而与无 CMT-8 处理和照射的对照组细胞 (16%) 相比, 6 Gy X 射线照射和 CMT-8 联合 X 射线处理的细胞 G2/M 期比例分别为 51% 和 60% ($P<0.05$)。但 CMT-8 联合 X 射线处理的细胞周期与单独 X 射线照射组的细胞周期相比, G2/M 期比例有所增加, 但无统计学差异 ($P>0.05$)。

2.2.3 CMT-8 联合 X 射线对 HeLa 细胞蛋白表达的影响 如图 8 所示, 在 HeLa 细胞中, $5 \mu\text{mol/L}$

CMT-8 处理组与对照组相比, DNA 损伤修复相关蛋白 Ku70 和 DNA-PKcs 表达水平变化不明显。但 $5 \mu\text{mol/L}$ CMT-8 联合 X 射线处理组相对于单纯 X 射线照射组, Ku70 和 DNA-PKcs 蛋白表达均明显降低。

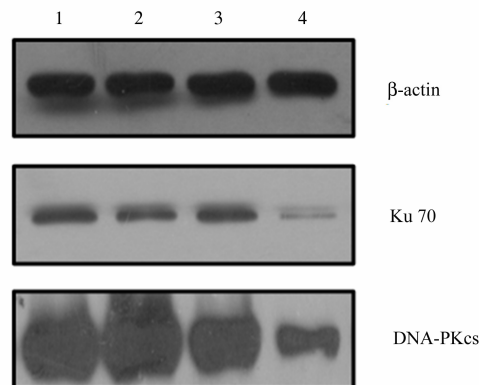


Fig.8 Alteration of protein levels in HeLa cells treated with CMT-8 and/or X-rays: 1, un-treated control; 2, $5 \mu\text{mol/L}$ CMT-8; 3, 6 Gy X-rays; 4, CMT-8+X-rays

3 讨论

宫颈癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 占女性生殖系统恶性肿瘤的 50% 以上。化学治疗是治疗宫颈癌的重要手段之一。目前的化疗药物毒副作用和耐药性都很强, 因此研究新的抗肿瘤药物是当前的热点。由于 CMT-8 保留了它四环素抗胶原酶活性, 且胶原酶与蛋白酶和肿瘤的产生机制是相关的, 因此 CMT-8 可作为一种新的化疗药物应用于肿瘤治疗中。研究者在前期研究中采用巨噬细胞 J774 筛选不同类型的 CMT 抑制细胞生长的能力, 发现不同类型的 CMT 均可导致细胞的生长抑制, 其中 CMT-8 是非常有效抑制剂之一, 且呈剂量-依赖关系^[2]。另外, Manlio 等研究人员的研究结果也发现 CMT-8 在导致白血病细胞凋亡优于其它类型的 CMT, 这可能是由于其 C5 位置上的羟基所致^[3]。本实验结果发现将一定浓度的 CMT-8 处理 HeLa 细胞, 细胞生长受到了明显的抑制, 抑制程度显现出时间-效应和浓度-效应关系。另外, CMT-8 也明显地抑制 HeLa 细胞的迁移能力, 这和我们早期报道的乳腺癌细胞实验结果是一致的, 可能是通过增加 E-钙粘蛋白/连环蛋白复合体的表达所致^[4]。总结已报道的现有研究结果, CMT-8 的抗肿瘤作用可能是通过影响 Bcl-2、C-myc、BRCA1 的表达, 并参加 Caspase 家族调节从而诱导了细胞凋亡以及抑制肿瘤细胞的转移和迁移能力而发挥作用的^[1-6]。另外, 本实验研究也揭示 CMT-8 能引起 HeLa 细胞 G₀/G₁

期阻滞,这也说明 CMT 家族可以通过对肿瘤细胞周期干预或导致细胞周期停滞,也是 CMT 抑制细胞增殖的作用机制之一^[5]。周期相关蛋白 Cyclin D 与 G₁ 期密切相关,其在细胞周期中起正性调控作用,是细胞周期 G₁/S 期转换的限速因子。Cyclin E 是另一种 G₁ 期细胞周期蛋白,其含量减少或活性降低都能抑制细胞从 G₁ 期向 S 期转换^[7]。因此 CMT-8 对 HeLa 细胞周期的调节可能是通过下调 Cyclin D 和 Cyclin E 的表达水平实现的,正如图 5 的实验结果所证实。

放射治疗也是宫颈癌的重要治疗手段之一。但由于高分化鳞癌、腺癌、粘液腺癌等宫颈腺癌对放射治疗不敏感,因此,提高宫颈癌细胞放射治疗敏感性的增敏药研究是当今宫颈癌放射治疗的研究方向之一。本实验中 MTT 结果提示,CMT-8 在无毒副作用的剂量预处理可明显提高 HeLa 细胞的放射敏感性。目前已知影响肿瘤细胞辐射效应的因素主要有 6 个方面:氧效应、谷胱甘肽含量、放射损伤修复能力、细胞周期不同时期、再氧合以及照射剂量^[8]。从细胞周期实验结果可以看出,经过 5 μmol/L CMT-8 预处理 24 h 后再接受 X 线照射的 HeLa 细胞,细胞周期相对于单纯照射细胞相比并没出现明显的差异,显然细胞周期的调节可能不是 CMT-8 放射增敏的主要机制。电离辐射引起细胞死亡的主要原因是 DNA 双链断裂(DNA double-strand break, DSB),对 DSB 的强修复是一些肿瘤细胞放射敏感性低的重要原因。非同源末端连接(Non-homology end joining, NHEJ)是 DSB 最重要的修复方式。DNA-PKcs 是 DNA-PK 重要组成部分,在 NHEJ 过程中起着重要作用。Ku 蛋白对 DNA 末端具有高度的亲和性,能保护游离的 DNA 末端,避免被核酸酶分解,同时 ku 蛋白与 DNA-PKcs 结合形成 DNA-PK 全酶,进而完成 NHEJ 修复过程。因此 Ku 70 和 DNA-PKcs 表达水平与肿瘤细胞对放射线敏感性之间存在显著的负相关关系^[9-11]。本实验的 Western blot 结果(图 8)显示,与单纯照射组相比,CMT-8 明显下调 Ku70 和 DNA-PKcs 的表达水平,因此 CMT-8 的放射增敏作用可能是通过下调细胞的 Ku70 和 DNA-PKcs 的表达水平有关,也就是说 CMT-8 调节 DNA 损伤修复可能是 CMT-8 影响肿瘤细胞放射敏感性的重要机制之一。

综上所述,虽然明确的作用机制还需进一步深入研究,CMT-8 对人宫颈癌 HeLa 细胞生长有明显的抑制作用,可能是通过下调 Cyclin D 和 Cyclin E 的表达水平诱导 G₀/G₁ 期阻滞和抑制细胞转移而实现的。同时,CMT-8 预处理可以提高人宫颈癌细胞

HeLa 的放射敏感性,可能与下调 Ku70 和 DNA-PKcs 的表达水平,抑制辐射引起的细胞 DNA 损伤修复有关。

参考文献

- 1 Liu Y, Ramamurthy N, Marecek J, *et al.* The lipophilicity, pharmacokinetics, and cellular uptake of different chemically-modified tetracyclines (CMTs). *Current Medicinal Chemistry*, 2001, **3**(8): 243-252
- 2 Pietro D' A, Viviana F, Salvatore M, *et al.* Chemically modified tetracyclines induce cytotoxic effects against J774 tumour cell line by activating the apoptotic pathway. *International Immunopharmacology*, 2003, **1**(3): 63-73
- 3 Manlio T, Stefania G, Salvatore M, *et al.* Effects of chemically modified tetracyclines (CMTs) in sensitive, multidrug resistant and apoptosis resistant leukaemia cell lines. *British Journal of Pharmacology*, 2001, **133**: 306-314
- 4 MENG Qinghui, XU Jingwen, Itzhak D, *et al.* Influence of chemically modified tetracyclines on proliferation, invasion and migration properties of MDA-MB-468 human breast cancer cells. *Clinical and Experimental Metastasis*, 2000, **2**(18): 139-146
- 5 Bal L. Lokeshwar. Chemically modified non- antimicrobial tetracyclines are multifunctional drugs against advanced cancers. *Pharmacological Research*, 2011, **63**(2): 146-150
- 6 Charlotta S, Katariina N, Ken A, *et al.* Chemically modified tetracyclines induce apoptosis in cultured mast cells. *Lindstedt International Immunopharmacology*, 2005, **5**: 1611- 1621
- 7 张玉霞, 喻伦银, 刘铭球. 细胞周期调控研究进展. 国外医学遗传学分册, 2001, **5**(24): 262-266
ZHANG Yuxia, YU Lunyin, LIU Mingqiu. Cell cycle regulation research progress. *Foreign Medical Genetics Volume*, 2001, **5**(24): 262-266
- 8 周厚清. 肿瘤放射增敏剂及增敏机制研究进展. 国外医学肿瘤学分册, 2001, **28**(6): 432-435
ZHOU Houqing. Cancer radiotherapy sensitization agent and sensitization mechanism research progress. *Foreign Medical Oncology Volume*, 2001, **28**(6): 432-435
- 9 郭传玲, 王菊芳, 李文建. Ku 蛋白与肿瘤细胞辐射敏感性. 中华实用医药杂志, 1995, **16**(5): 1-5
GUO Chuanling, WANG Jufang, LI Wenjian. Ku protein and tumor cells sensitivity radiation. *Practical Medical Journal*, 1995, **16**(5): 1-5

- 10 Fattah F, Lee E H, Weisensel N, *et al.* Ku regulates the non-homologous end joining pathway choice of DNA double-strand break repair in human somatic cells. *PLoS Genet*, 2010, **6**(2): 1-12
- 11 Katheryn M, Van D, Susan P, *et al.* Chapter 2 DNA-PK: The Means to Justify the Ends. *Advances in Immunology*, 2008, **99**: 33-58

Anticancer activity and radiosensitization of CMT-8 in human cervical cancer HeLa cells

SHEN Linling ZHAO Lin MA Liang YANG Jiangtao

JIAO Yang XU Jiaying FAN Saijun

(*School of Radiation Medicine and protection, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China*)

ABSTRACT To investigate the effects of chemically modified tetracycline 8 (CMT-8) on cell growth, migration and radio-sensitivity in human cervical cancer HeLa cells, MTT assay was used to determine cell viability and radio-sensitivity; wound healing and adhesive assays were used to measure cell migration and adhesion; flow cytometry and Western blot assay were performed to analyze cell cycle alteration and protein expression. The results showed that CMT-8 inhibited HeLa cell growth, migration and adhesion in a dose-and time dependent fashion. Furthermore, CMT-8 caused a G₀/G₁ arrest, in accompany with a dose-dependent down-regulation of Cyclin D and Cyclin E protein expression. Finally, HeLa cells pre-treated with CMT-8 at non-cytotoxic concentrations became more sensitive to subsequent irradiation of X-rays, which was related to a decreased expression of Ku70 and DNA-PKcs protein. Taken together, these findings indicate that CMT-8 is a new anti-cervical cancer compound via inhibiting cell growth and migration as well as mediating radio-sensitivity.

KEYWORDS CMT-8, HeLa cell, X-rays, Radiosensitivity

CLC R737.33