

白藜芦醇对肺癌 A549 细胞的放射增敏作用及其机制研究

邢晓萌 王彦 杜利清 徐畅 林凯丽 樊赛军 刘强

(北京协和医学院 中国医学科学院放射医学研究所 天津 300192)

摘要 采用 MTT 法检测不同浓度白藜芦醇对肺癌 A549 细胞的毒性; 克隆形成实验测定白藜芦醇对 A549 细胞增殖抑制作用; 碱性单细胞凝胶电泳实验(彗星实验)检测细胞 DNA 受损情况; 采用 Western blot 法检测白藜芦醇与辐射联合作用对抑制凋亡蛋白 Survivin 的影响。结果表明, 白藜芦醇对肺癌 A549 细胞的抑制作用随着白藜芦醇浓度升高及时间延长而增加; 白藜芦醇与辐射联合作用可以明显增加辐射所致 A549 细胞的 DNA 损伤($p < 0.05$), 并降低克隆形成率及抑制凋亡蛋白 Survivin 的表达。表明白藜芦醇对 A549 细胞具有放射增敏作用, 且放射增敏作用可能是通过抑制 Survivin 蛋白的表达实现的。

关键词 白藜芦醇, 肺癌 A549 细胞, 辐射增敏, Survivin 蛋白

中图分类号 TL71

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2014.rj.32.060203

世界卫生组织调查发现, 肺癌在世界范围内发生率和死亡率均居于首位^[1]。肺癌对于传统的放疗敏感性较差, 开发既能使肺癌细胞对辐射敏感又能保护正常组织的药物显得尤为重要^[2]。白藜芦醇是一种在葡萄、花生和其他植物中发现的多酚类化合物, 具有抗炎、抗氧化和抗肿瘤等功能^[3-7]。许多研究表明, 白藜芦醇预处理可以增加化疗药物的敏感性以及辐射诱导的细胞凋亡和早衰^[8-10]。但白藜芦醇对肺癌 A549 细胞放射增敏作用及其机制尚不明确, 本研究旨在探讨白藜芦醇对肺癌 A549 细胞的辐射增敏作用及其机制, 为临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

肺癌 A549 细胞株由本实验室保存, 用含 10% 胎牛血清的 1640 (HyClone 公司) 培养基于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。Survivin 抗体(Abcam 公司)、 β -tublin (武汉博士德公司)、MTT (Sigma 公司)。

1.2 细胞照射

采用加拿大原子能有限公司的 Cs-137 (Gammacell-40) 辐射装置对肺癌 A549 细胞(置于无

菌的培养瓶/皿中)进行 γ -射线照射, 密封的培养瓶/皿平放于照射仓中心, 放射源为均匀照射, 剂量率为 1.02 Gy·min⁻¹。克隆形成实验的吸收剂量为 0、2、4、6 和 8 Gy; 单细胞凝胶电泳及 Western blot 实验所用的吸收剂量为 4 Gy。

1.3 MTT 实验

取对数生长期细胞, 用 0.25% 胰酶消化, 含 10% 胎牛血清的 1640 培养基制成细胞悬液, 调整细胞悬液浓度至 3×10^4 mL, 细胞悬液以每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。细胞贴壁后, 换为含 0、12.5、25、50、100 μ mol·L⁻¹ 白藜芦醇新鲜培养基, 每组设 6 个复孔, 分别培养 24、48、72 h。终止培养前 4 h 每孔加入 10 μ L MTT (5 mg·mL⁻¹), 继续培养 4 h 后弃上清, 每孔加入 150 μ L DMSO, 震荡混匀 5 min, 酶联免疫检测仪 492 nm 波长测定吸光度(A)值。肿瘤细胞存活率(%)=实验组 A 值/对照组 A 值 $\times 100\%$, 实验重复 3 次, 取平均值。

1.4 克隆形成实验

取对数生长期细胞, 胰酶消化后用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基制成细胞悬液, 在 0、2、4、6、

基金资助: 国家自然科学基金(31300695, 31170804)、天津市自然科学基金(13JCYBJC23500, 13JCQNJC11600)、协和青年基金和中央高校基本科研业务费专项资金(2012G01 和中国医学科学院放射医学研究所探索基金(ST1434)资助

第一作者: 邢晓萌, 男, 1988 年 12 月出生, 2008 年毕业于河北农业大学生物技术专业, 现为中国医学科学院放射医学研究所放射医学方向硕士研究生, E-mail: xxmpumc@163.com

通讯作者: 刘强, 博士, 教授, E-mail: liuqiang@irm-cams.ac.cn

收稿日期: 收稿 2014-09-03; 修回 2014-09-22

8 Gy 组各接种 500 个细胞于 60 mm 培养皿内, 每个剂量设 3 个重复。细胞贴壁后, 给予 $0.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的白藜芦醇处理, 2 h 后分别给予 0、2、4、6、8 Gy γ -射线照射, 继续培养 24 h 后更换为新鲜培养基, 置于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中继续培养 14 d, 每隔 3 天更换一次新鲜培养基。用 PBS 洗培养皿两遍, 甲醇固定 10 min, 吉姆萨染色 30 min, 自来水冲洗干净后晾干, 计数每个平皿中大于 50 个细胞的克隆数, 计算克隆形成率 (克隆形成率(%)=(处理组克隆数/对照组克隆数) $\times 100\%$)并绘制细胞存活曲线。实验重复 3 次, 取平均值。

1.5 单细胞凝胶电泳实验

实验分 4 组: 正常对照组(Control)、加药组(Res): 4 Gy γ -射线照射前 2 h 加入 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的白藜芦醇, 不照射、照射组(IR): 4 Gy γ -射线照射、联合组(Res+IR): $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白藜芦醇作用 2 h 后, 4 Gy γ -射线照射。取对数生长期细胞, 胰酶消化后用含 10%胎牛血清的 1 640 培养基制成细胞悬液, 按每孔 5×10^5 个细胞接种于 6 孔板, 细胞贴壁后, 对照组和照射组换为正常培养基, 加药组和联合组换为含白藜芦醇($25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)培养基。继续培养 2 h 后照射组和联合组给予 4 Gy 照射, 24 h 后收集细胞, 用含 10%胎牛血清的 1 640 培养基将细胞浓度调整为 $5\times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 。将 400 μL 正常熔点琼脂糖凝胶(7.5%)铺于玻片上, 4°C 20 min; 取 30 μL 细胞悬液($5\times 10^5 \text{ mL}^{-1}$)与 70 μL 低熔点琼脂糖凝胶(7.5%)混匀后铺于第一层凝胶上, 4°C 20 min; 配制碱性裂解液, 于 4°C 裂解 2.5 h; 用 PBS 漂洗后, 于 4°C 电泳液解旋 20 min; 20 V, 200 mA 电泳 20 min; PBS 漂洗后置于中和液中 4°C , 20 min; 溴化乙锭($2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)染色, 双蒸水漂洗后于荧光显微镜下观察, 并随机拍摄多于 100 个彗星图像, 用 CASP 软件进行图像分析。

1.6 Western blot 检测蛋白水平变化

取对数生长期细胞, 胰酶消化后用含 10%胎牛血清的 1 640 培养基制成 10^5 mL^{-1} 的细胞悬液, 接种于 60 mm 培养皿, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱。细胞贴壁后, 正常对照组及照射组更换为正常培养基, 加药组和联合组更换为含白藜芦醇($25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)培养基, 培养 2 h 后给予 4 Gy 照射, 37°C 、5% CO_2 培养箱中继续培养 24 h, 收集细胞, 提取总蛋白,

BCA 法测定总蛋白浓度后取 50 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 通过半干式转移电泳槽将凝胶上的蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)膜上, 5%脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗 4°C 过夜, TBST 洗膜 3 次每次 10 min, 二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 凝胶成像系统显影。

1.7 统计学分析

每个实验重复 3 次, 各组数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析, 多组数据比较采用单因素方差分析, 两组数据比较采用两独立样本 t 检验, $p<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 检测白藜芦醇对肺癌 A549 细胞的细胞毒性

不同浓度的白藜芦醇处理 24、48、72 h 后对肺癌 A549 细胞存活率的影响(见表 1)。 $0\sim 25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白藜芦醇在 72 h 内对 A549 细胞没有细胞毒性($p>0.05$), 而 $50\sim 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白藜芦醇从 24 h 开始会明显降低 A549 细胞的细胞活力($p<0.05$)。我们采用白藜芦醇作用 72 h 后无毒性剂量浓度 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为后续试验浓度。

表 1 白藜芦醇对肺癌 A549 细胞存活率的影响
Table 1 Effects of resveratrol on lung cancer A549 cell viability (% , $\bar{x}\pm s$)

白藜芦醇浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Resveratrol concentration	时间 / h Time	24	48	72
0		100.00	100.00	100.00
12.5		104.47 $\pm$ 1.06	101.03 $\pm$ 1.16	102.02 $\pm$ 2.32
25		96.95 $\pm$ 2.32	103.57 $\pm$ 3.45	98.63 $\pm$ 2.14
50		93.03 $\pm$ 1.54 ^a	78.52 $\pm$ 1.16 ^b	73.68 $\pm$ 3.46 ^c
100		88.07 $\pm$ 5.63 ^a	53.24 $\pm$ 4.65 ^b	30.77 $\pm$ 1.38 ^c

注: ^a与 24 h, $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 相比, $p<0.05$; ^b与 48 h, $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 相比, $p<0.05$; ^c与 72 h, $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 相比, $p<0.05$ 。

Note: ^acompare with 24 h, $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $p<0.05$; ^bcompare with 24 h, $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $p<0.05$; ^ccompare with 24 h, $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $p<0.05$ 。

2.2 白藜芦醇对肺癌 A549 细胞克隆形成的影响

照射组和联合组细胞存活曲线见图 1。相同白藜芦醇浓度处理后, 细胞克隆存活分数随照射剂量升高而降低; 同一照射剂量下, 联合组比照射组细胞克隆存活分数低。辐射增敏比为 1.40($p<0.05$)。表明, 白藜芦醇对肺癌 A549 细胞有明显辐射增敏作用。

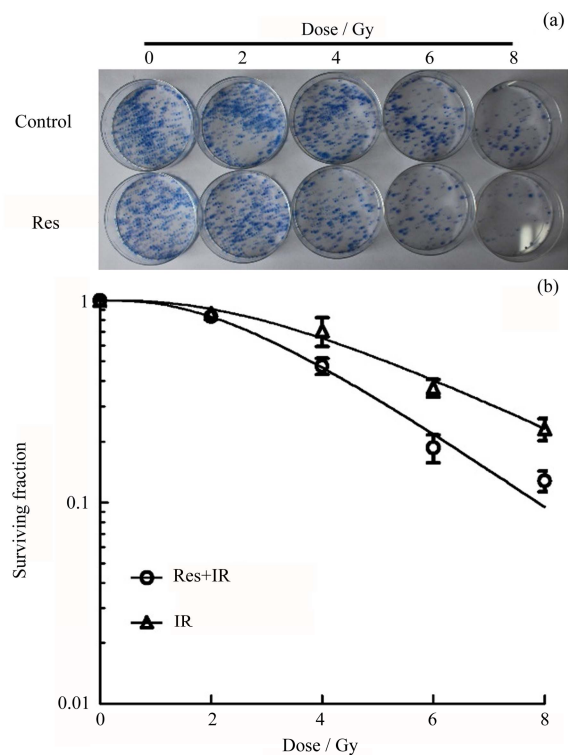


图 1 白藜芦醇对肺癌 A549 细胞克隆形成的影响
Fig.1 Effect of resveratrol on cloning of lung cancer A549 cells

2.3 白藜芦醇对肺癌 A549 细胞 DNA 断裂的影响

彗星实验中，未受损核的 DNA 部分为球形，

而受损的 DNA 电泳过程中离开核 DNA 向正极迁移形成“彗星”状图像，“彗星”的多少、“彗尾”的长短及尾距可作为评价 DNA 断裂的指标。本研究中，不同处理后彗星实验测定结果如图 2、表 2 所示。照射 24 h 后，加药组、照射组拖尾细胞数、尾长和尾距较对照组均明显增加($p<0.05$), 表明白藜芦醇和辐射均可造成肺癌 A549 细胞的 DNA 损伤；而联合组与照射组相比各项指标明显增加($p<0.05$), 说明白藜芦醇可显著增加辐射对肺癌 A549 细胞 DNA 损伤程度。

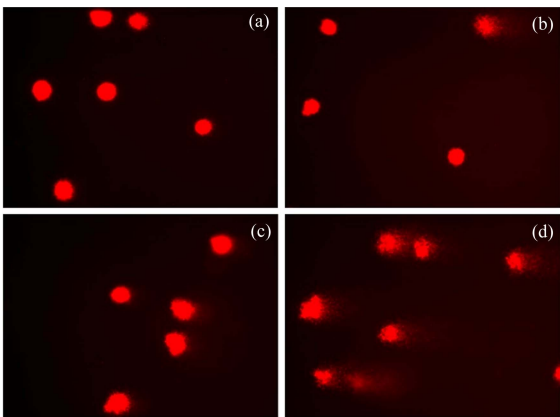


图 2 经不同方法处理后肺癌 A549 细胞的彗星图像
(a)对照组, (b)加药组, (c)照射组, (d)联合组
Fig.2 The comet images of lung cancer A549 cells after different treatment methods:
(a) Control, (b) Res, (c) IR, (d) Res+IR

表 2 白藜芦醇对辐射诱发 A549 细胞彗星细胞参数的影响
Table 2 Effect of resveratrol on comet cells of A549 cells induced by radiation ($\bar{x} \pm s, n=4$)

	计数细胞数 Counting cells	拖尾细胞数 Number of tail cell	尾长 / μm Tail length	尾距 Tail moment
对照组 Control group	200	23.46 $\pm$ 4.25	30.26 $\pm$ 3.52	3.37 $\pm$ 0.82
加药组 Resveratrol group	200	67.63 $\pm$ 14.35 a	37.39 $\pm$ 3.36 a	5.64 $\pm$ 1.26 a
照射组 Irradiation group	200	82.47 $\pm$ 12.61 a	44.43 $\pm$ 4.89 a	6.62 $\pm$ 1.15 a
联合组 Resveratrol+irradiation group	200	140.28 $\pm$ 16.29 b	73.86 $\pm$ 10.31 b	26.13 $\pm$ 6.60 b

注: ^a 与对照组相比较, $p<0.05$; ^b 与照射组相比较, $p<0.05$ 。
Note: ^a Compared with control group, $p<0.05$; ^b compared with irradiation group, $p<0.05$.

2.4 白藜芦醇降低肺癌 A549 细胞抑制凋亡蛋白 Survivin 的表达

用 Western 的方法检测对照组、加药组、照射组与联合组作用 24 h 后对抑制凋亡蛋白 Survivin 的影响见图 3。结果显示，白藜芦醇与辐射联合作用组与单纯处理组相比抑制凋亡蛋白 Survivin 表达水平明显降低。研究发现，采用 siRNA 方法敲除口腔鳞癌细胞的 Survivin 基因后，可以诱导细胞凋亡并

增加细胞辐射敏感性^[11]。因此，白藜芦醇可能是通过降低 Survivin 蛋白发挥辐射增敏作用的。

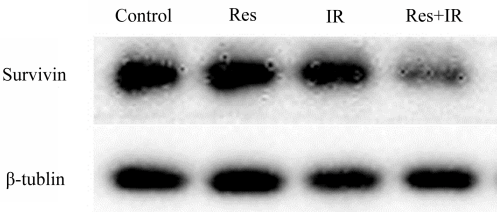


图 3 白藜芦醇抑制 A549 细胞 Survivin 蛋白表达
Fig.3 Resveratrol inhibits the expression of Survivin protein in A549 cells

3 讨论

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,单纯使用放射治疗疗效较低且对于正常组织损伤较大。因此使用辐射增敏剂增加肺癌细胞的辐射敏感性成为了肺癌放射治疗领域的研究热点。辐射增敏剂是一类可以增加肿瘤细胞放射敏感性、加大射线杀伤效果的药物,理想的辐射增敏剂应可以显著的提高放疗疗效,而对正常的组织没有或仅有很小的毒副作用^[12-13]。迄今为止,在临床上应用的、高效低毒而又廉价的辐射增敏剂十分短缺,大部分放疗增敏剂对正常组织都有不同程度的毒副作用。因此,开发新的、更有效的辐射增敏剂显得尤为重要。

白藜芦醇是从葡萄和花生中提取的小分子化合物,是一种潜在的抗癌和化学防癌剂^[14-17]。有趣的是,最近的研究发现,白藜芦醇还可以增加化疗药物的敏感性以及辐射诱导的细胞凋亡^[18-19]。因此,白藜芦醇很可能具有辐射增敏的作用。I 期临床研究发现每天口服 $\leq 5\text{ g}$ 白藜芦醇是安全的^[20]。这些研究支持进一步发展白藜芦醇作为一个安全有效辐射增敏剂。本研究发现,在 72 h 内,白藜芦醇对肺癌 A549 细胞的无毒性最高剂量为 $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本研究显示,白藜芦醇可明显降低辐射诱导的肺癌 A549 细胞的增殖能力,增加辐射诱导细胞的 DNA 损伤。表明白藜芦醇对肺癌 A549 细胞具有辐射增敏作用。

抑制凋亡蛋白(Inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族包括 8 个成员,通过结合 Caspase.3、7、9 并抑制其活性从而调控细胞凋亡,Survivin 是新发现的 IAP 家族中的一员,具有抑制细胞凋亡的作用,降低 Survivin 基因的表达可以增加肿瘤细胞的辐射敏感性^[21-23]。本研究发现,白藜芦醇通过抑制凋亡蛋白 Survivin 的表达,促进细胞凋亡进而增加肺癌 A549 细胞的辐射敏感性,但 Survivin 基因通过凋亡途径发挥辐射增敏的作用机制还需进一步研究。此研究结果将为临床进一步研究放疗联合白藜芦醇治疗肺癌提供实验基础。

参考文献

- 1 杨柯君. 全球癌症状况最新数据更新 [J]. 上海医药, 2014, **35**(2): 5.
YANG Kejun. The latest data update of global cancer condition [J]. Shanghai Medical & Pharmaceutical Journal. 2014, **35**(2): 5.
- 2 Dosoretz D E, Katin M J, Blitzer P H, *et al.* Medically

- inoperable lung carcinoma: the role of radiation therapy [J]. *Seminars in Radiation Oncology*, 1996, **6**(2): 98-104.
- 3 Jang M, Cai L, Udeani G O, *et al.* Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes [J]. *Science*, 1997, **275**(5297): 218-220.
- 4 John L, Ingham. 3, 5, 4'-trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnuts (*Arachis hypogaea*) [J]. *phytochemistry*, 1976, **15**(11): 1791-1973.
- 5 Song R, Li W Q, Dou J L, *et al.* Resveratrol reduces inflammatory cytokines *via* inhibiting nuclear factor- κ B and mitogen-activated protein kinase signal pathway in a rabbit atherosclerosis model [J]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, 2013, **41**(10): 866-869.
- 6 Lodovici M, Bigagli E, Luceri C, *et al.* Protective effect of resveratrol against oxidation stress induced by 2-nitropropane in rat liver [J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2011, **2**(03): 127-135.
- 7 He X, Wang Y, Zhu J, *et al.* Resveratrol enhances the anti-tumor activity of the mTOR inhibitor rapamycin in multiple breast cancer cell lines mainly by suppressing rapamycin-induced AKT signaling [J]. *Cancer Letters*, 2011, **301**(2): 168-176.
- 8 Scarlatti F, Sala G, Ricci C, *et al.* Resveratrol sensitization of DU145 prostate cancer cells to ionizing radiation is associated to ceramide increase [J]. *Cancer Letters*, 2007, **253**(1): 124-130.
- 9 Baatout S, Derradji H, Jacquet P, *et al.* Enhanced radiation-induced apoptosis of cancer Cell lines after treatment with resveratrol [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2004, **13**(6): 895-902.
- 10 Luo H, Wang L, Schulte B A, *et al.* Resveratrol enhances ionizing radiation-induced premature senescence in lung cancer cells [J]. *International Journal of Oncology*, 2013, **43**(6): 1999-2006.
- 11 Sun H B, Zheng H Y, Yan X. Survivin silencing enhances radiosensitivity in oral squamous cell carcinoma cell [J]. *European review for medical and pharmacological sciences*, 2014, **18**(18): 2678-2686.
- 12 叶娟平, 刘韬, 戴昆怡, 等. 放射增敏剂的临床研究进展 [J]. *医药导报*, 2009, **28**(7): 893-896
YE Juanping, LIU Tao, DAI Kunyi, *et al.* Clinical research progress of radiosensitizer [J]. *Herald of Medicine*, 2009, **28**(7): 893-896.
- 13 李卫红, 王浩, 周晓靓, 等. 肿瘤放射治疗增敏剂研究新进展 [J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2013, **37**(4):

- 233-238.
- LI Weihong, WANG Hao, ZHOU Xiaoliang, *et al.* New research progress of Radiotherapy sensitizer [J]. International Journal of Radiation Medicine and Nuclear Medicine, 2013, **37**(4): 233-238.
- 14 Gupta S C, Kannappan R, Reuter S, *et al.* Chemosensitization of tumors by resveratrol [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2011, **1215**(1): 150-160
- 15 Sale S, Tunstall R G, Ruparelia K C, *et al.* Comparison of the effects of the chemopreventive agent resveratrol and its synthetic analog trans 3, 4, 5, 4'-tetramethoxystilbene (DMU-212) on adenoma development in the ApcMin+ mouse and cyclooxygenase-2 in human-derived colon cancer cells [J]. International Journal of Cancer, 2005, **115**(2): 194-201.
- 16 Gullett N P, Ruhul Amin A R M, Bayraktar S, *et al.* Cancer prevention with natural compounds [J]. Seminars in Oncology, 2010, **37**(3): 258-281.
- 17 Bhat K P L, Lantvit D, Christov K, *et al.* Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models [J]. Cancer Reserach, 2001, **61**(20): 7456-7463.
- 18 Gupta S C, Kannappan R, Reuter S, *et al.* Chemosensitization of tumors by resveratrol [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2011, **1215**(1): 150-160.
- 19 Fang Y, DeMarco V G, Nicholl M B. Resveratrol enhances radiation sensitivity in prostate cancer by inhibiting cell proliferation and promoting cell senescence and apoptosis [J]. Cancer Science, 2012, **103**(6): 1090-1098.
- 20 Boocock D J, Faust G E S, Patel K R, *et al.* Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent [J]. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 2007, **16**(6): 1246-1252.
- 21 郭艳婷, 张鹏飞, 刘强. Smac 与肿瘤放射治疗 [J]. 国际放射医学核医学杂志, 2013, **37**(5): 309-313.
- GUO Yanting, ZHANG Pengfei, LIU Qiang. Effects of Smac on tumor radiotherapy [J]. International Journal of Radiation Medicine and Nuclear Medicine, 2013, **37**(5): 309-313
- 22 Jin X, Li Q, Wu Q, *et al.* Radiosensitization by inhibiting Survivin in human hepatoma HepG2 cells to high-LET radiation [J]. Journal of Radiation Research, 2011, **52**(3): 335-341.
- 23 Asanuma K, Moriai R, Yajima T, *et al.* Survivin as a radioresistance factor in pancreatic cancer [J]. Japanese Journal of Cancer Research, 2000, **91**(11): 1204-1209.

Study on radiosensitization effect and mechanism of resveratrol on lung A549 cells

XING Xiaomeng WANG Yan DU Liqing XU Chang LIN Kaili FAN Saijun LIU Qiang

(Institute of Radiation Medicine, Chinese of Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

ABSTRACT We aim to investigate the effect and mechanism of resveratrol on radiosensitivity of lung cancer A549 cells. MTT was used to detect the cell toxicity of different concentrations of resveratrol on lung cancer A549 cells; clonogenic assay was performed to determine the function of growth inhibition. The DNA damage was detected by the comet assay. Western blot was taken to detect the expression level of Survivin. The results showed that the inhibitory effect of resveratrol on A549 cells increased with resveratrol concentration and time; the combined effect of resveratrol and radiation significantly increased the DNA damage of A549 cells induced by radiation($p<0.05$), and reduced cloning efficiency as well as the expression level of Survivin. It can be concluded that resveratrol can enhance the radiation sensitivity of A549 cells, and maybe the radiosensitizing effect is achieved by suppressing the expression of Survivin protein.

KEYWORDS Resveratrol, Lung cancer A549 cells, Radiosensitization, Survivin protein

CLC TL71