

青蒿素与蒿甲醚对人鼻咽癌 CNE-1 细胞 放射增敏作用的比较研究

潘麓羽¹ 曹建平¹ 陈光烈¹ 纪蓉¹ 封阳¹ 周媛媛¹ 彭晓梅²
崔丹¹ 朱巍¹ 樊赛军¹

¹ (苏州大学放射医学与公共卫生学院放射医学与防护重点实验室 苏州 215123)

² (江苏省吴江市疾病预防控制中心 吴江 215200)

摘要 为了比较青蒿素 (Artemisinin) 和蒿甲醚 (Artemether) 对人鼻咽癌 CNE-1 细胞放射增敏作用的差异, 取指数生长期的人鼻咽癌 CNE-1 细胞, 采用细胞克隆形成法分别检测青蒿素和蒿甲醚对 CNE-1 细胞生长的抑制效应, 比较两种药物抑制效应的差异性, 并确定实验的药物浓度; 将人鼻咽癌细胞分为对照组、单纯药物组、单纯照射组及联合治疗组。单纯药物组、联合治疗组分别分为青蒿素组和蒿甲醚亚组, 射线照射剂量为 0、2、4、6 和 8 Gy, 采用多靶单击数学模型拟合细胞存活曲线, 取放射增敏比 (SER) 为达到相同生物效应时, 单纯照射的剂量与联合治疗组的剂量之比。实验结果表明, 两种药物对细胞的抑制作用均随着药物浓度的提高而增强, 存在剂量依赖关系。青蒿素对 CNE-1 细胞的抑制作用高于蒿甲醚, 测得青蒿素放射增敏比 (SER) 为 1.272, 蒿甲醚 SER 为 1.481, 表明蒿甲醚较青蒿素对人鼻咽癌 CNE-1 细胞具有更强的放射增敏作用。

关键词 鼻咽癌细胞株, 放射增敏, 青蒿素, 蒿甲醚

中图分类号 Q691, R114

青蒿素是从菊科植物黄花蒿叶中提取分离到的一种倍半萜内酯类化合物。蒿甲醚是青蒿素的衍生物之一, 具有青蒿素类物质特有的内过氧桥结构。青蒿素类药物除抗疟作用外, 还有抗肿瘤作用, 可抑制肿瘤细胞生长和诱导肿瘤细胞凋亡。新近又发现其具有辐射增敏作用。青蒿琥酯对 HeLa 细胞有辐射增敏作用^[1], 青蒿素衍生物中双氢青蒿素、青蒿琥酯对 A549 细胞有一定的放射增敏作用^[2]。本研究采用人鼻咽癌 CNE-1 细胞为研究对象, 用克隆法分别检测青蒿素和蒿甲醚对 CNE-1 细胞生长的抑制作用; 结合 ⁶⁰Co γ 射线照射应用克隆形成法分别检测青蒿素和蒿甲醚对 CNE-1 细胞的放射增敏作用, 比较两种药物放射增敏作用的差异性。

1 实验材料和方法

1.1 实验材料

人鼻咽癌 CNE-1 细胞株购于中国科学院上海细胞库; 青蒿素、蒿甲醚购于美国 Sigma 公司; 二

甲基亚砷 (DMSO) 购于 Cxbio 生物技术有限公司; DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) 培养基购于美国 Gibco 公司; 新生牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 CNE-1 细胞接种于 DMEM 培养液 (含 10% 新生牛血清及青霉素、链霉素各 100U/mL), 37°C、5% CO₂ 条件下单层传代培养, 取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 药物处理 取对数生长期的细胞接种 24 h 后, 给予青蒿素、蒿甲醚至相应实验浓度。对照组为 DMSO, 其浓度为与最高药物浓度组的 DMSO 浓度一致, 继续培养 24 h。

1.2.3 照射条件 电离辐射 ⁶⁰Co γ 源源强为 1.48×10^{15} Bq, 剂量率为 1 Gy/min; 照射剂量为 0、2、4、6 和 8 Gy, 于室温下照射 CNE-1 细胞。照射在苏州大学辐照室进行。

1.2.4 克隆形成实验 取对数生长期细胞制备细胞悬液, 取 1500 个细胞接种于 60 mm 培养皿中, 于

国家自然科学基金项目 (30670632) 资助

第一作者: 潘麓羽, 女, 1981 年 3 月出生, 2006 年毕业于苏州大学基础医学系, 现为在读硕士研究生, 放射医学专业

通讯作者: 曹建平, E-mail: jpcap@suda.edu.cn

收稿日期: 初稿 2009-03-23, 修回 2009-05-04

含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基中培养 24 h, 分别给予青蒿素与蒿甲醚使最终浓度为 0、1、5、10、15、20、40、60 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 。作用 24 h 后弃去药液, 用 PBS 洗涤 2 次, 继续培养 10—12 d 后染色计数, 测定两种药物对细胞的抑制效应, 确定实验药物浓度。

1.2.5 分析方法 采用细胞克隆形成法分析青蒿素和蒿甲醚对鼻咽癌细胞的放射增敏作用。取对数生长期细胞制备细胞悬液, 将 1500 个细胞接种于 60 mm 培养皿中, 在含有 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基中培养。根据实验设计, 于照射前给予浓度为 5、20 $\mu\text{mol/L}$ 的青蒿素和蒿甲醚作用, 24 h 后换液进行不同剂量的照射。照射剂量分别为 0、2、4、6 和 8 Gy, 每个药物浓度与剂量点设 3 个平行样, 照后立即更换 DMEM 培养液, 培养 10 d 后, 甲醇固定, Giemsa 染色, 计数含 50 个细胞以上的细胞集落, 按下式计算克隆存活率: 克隆存活率 (%) = (处理组克隆数/对照组克隆数) $\times 100\%$ 。实验重复 3 次, 取平均值, 并绘制细胞存活曲线。

实验数据采用“多靶单击”数学模型拟合 $SF=1-[1-\exp(-D/D_0)]^N$, $D_q = D_0 \lg N$, 求出 D_0 (细胞存活曲线的直线部分使细胞存活从 0.1 下降到 0.037 所需要的剂量)、 D_q (将细胞存活曲线的直线部分延长, 与通过存活率为 1.0 处横轴的平行线相交处所示剂量)、 SF_2 (单次照射 2 Gy 的存活分数和 N (外推数)), 计算放射增敏比 (Sensitivity enhancement ratio, SER) (SER 的定义为在达到相同生物效应时, 单纯照射的剂量与药物加照射组的剂量之比)。

1.2.6 统计学处理 数据以均数 \pm 标准差表示; 使用 SPSS17.0 分析数据, 细胞存活率及克隆形成率采用方差分析, 组间两两比较采用 LSD- t 检验以 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 青蒿素和蒿甲醚对 CNE-1 细胞生长的抑制效应

青蒿素和蒿甲醚对 CNE-1 细胞生长的抑制效应实验结果见图 1。从图 1 可知, CNE-1 细胞的存活率随着青蒿素和蒿甲醚药物浓度的增加而降低, 存在剂量相关性; 青蒿素和蒿甲醚对鼻咽癌 CNE-1 细胞的作用浓度分别为 5 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, CNE-1 细胞存活率分别为 91.00% 和 90.00%, 为了避免青

蒿素和蒿甲醚本身对 CNE-1 细胞的毒性作用, 消除药物毒性对两种细胞影响的差异, 在随后的实验中我们将分别采用 5 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 的药物浓度对 CNE-1 细胞进行辐射增敏实验的研究。

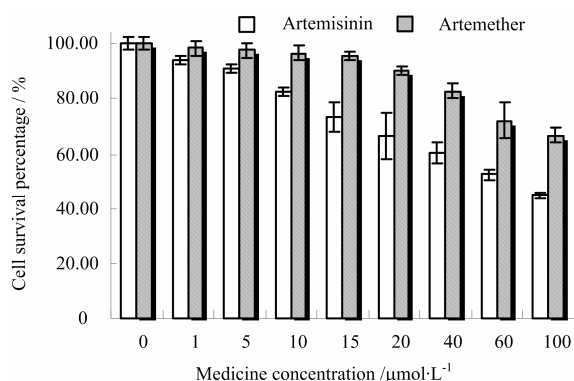


Fig.1 Survival rate of CNE-1 cells treated with variable concentrations of artemisinin and artemether

2.2 青蒿素和蒿甲醚对 CNE-1 细胞的辐射增敏作用

青蒿素和蒿甲醚对 CNE-1 细胞的辐射增敏作用结果见表 1 和表 2。表中数据显示, 单纯照射组、照射 + 青蒿素组和照射 + 蒿甲醚组的 CNE-1 细胞存活率均随着照射剂量的增加而降低 ($p < 0.01$); 在 2 Gy 剂量时, 并未见到青蒿素, 蒿甲醚有增敏作用, 在 4 至 8 Gy 剂量组, 照射 + 青蒿素组和照射 + 蒿甲醚组的 CNE-1 细胞存活率明显低于单纯照射组 ($p < 0.01$), 表明青蒿素和蒿甲醚对 CNE-1 细胞均具有辐射增敏作用; 同时, 照射 + 蒿甲醚组的 CNE-1 细胞存活率明显低于照射 + 青蒿素组 ($p < 0.01$), 表明蒿甲醚较青蒿素对人鼻咽癌 CNE-1 细胞具有更强的辐射增敏作用。

青蒿素和蒿甲醚联合照射 CNE-1 细胞的存活曲线参数 (见表 2) 结果显示, 在青蒿素和蒿甲醚的浓度分别为 5 和 20 $\mu\text{mol/L}$, 照射前作用 CNE-1 细胞 24 h 的情况下, 照射 + 青蒿素组和照射 + 蒿甲醚组的 D_q 值、 SF_2 值和 D_0 值均低于单纯照射组, 同样表明青蒿素和蒿甲醚对 CNE-1 细胞有明显的放射增敏作用。以 D_0 为标准计算放射增敏比, 青蒿素的 SER 为 1.272, 蒿甲醚的 SER 为 1.481, 进一步表明蒿甲醚较青蒿素对人鼻咽癌 CNE-1 细胞具有更强的辐射增敏作用。

Table 1 The influence of combination of artemisinin, artemether and radiation on clone survival of CNE-1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

	Radiation dose / Gy				
	Control	2	4	6	8
Pure radiation	100±3.12	75.54±2.21 ^a	49.04±1.56 ^a	29.33±0.91 ^a	9.89±2.25 ^a
Radiation+artemisinin	90.77±1.09	72.85±3.67 ^{a,b}	39.59±2.12 ^{a,b}	14.95±1.35 ^{a,b}	6.76±0.79 ^{a,b}
Radiation+artemether	90.26±2.45	70.11±1.83 ^{a,b,c}	34.78±1.17 ^{a,b,c}	12.48±2.33 ^{a,b,c}	3.26±3.06 ^{a,b,c}

Note: Compared with the control group, ^a $p<0.01$; Under same radiation dose, Compares with the pure radiation group, ^b $p<0.01$; Under same radiation dose, Compares with artemisinin and artemether, ^c $p<0.01$.

Table 2 Parameters of survival curve of CNE-1 cells treated with artemisinin and artemether in combination with radiation

Group	D_q / Gy	SF2	D_0 / Gy	SER
Pure radiation	1.33	0.785	5.6	—
Radiation+artemisinin	0.285	0.72	4.4	1.272
Radiation+artemether	0.25	0.69	3.7	1.481

3 讨论

鼻咽癌(Nasopharyngeal carcinoma, NPC)是我国常见的恶性肿瘤之一,年发病率为10—25/10万,放射治疗被认为是鼻咽癌首选治疗方法。在鼻咽癌的放疗中经常会遇到放疗后肿瘤复发、放射抗拒等问题,而X射线或 γ 射线等在杀死癌细胞的同时也对肿瘤组织附近的正常细胞造成杀伤,放射剂量大副作用也大。目前各期鼻咽癌放射治疗的5年生存率仅为50%左右。因此,减弱肿瘤细胞的放射抗性,提高放疗敏感性,成为近年来研究的热点。青蒿素及其衍生物具有抗疟疾,抗血吸虫等多种药理活性^[3],近年来不断发现其抗肿瘤方面的新活性,青蒿素及其衍生物有着抗癌作用如提高对肺癌、乳腺癌、前列腺癌、中枢神经系统肿瘤的杀伤力^[4-6]及放射增敏作用,其中蒿甲醚对胃癌细胞株SGC-7901和MKN.45以及胰腺癌细胞株BXP-3和SW-1990均具有体外杀伤作用^[7],Kim等^[8]发现,对神经胶质瘤细胞(U373MG)同时进行双氢青蒿素和 γ 射线处理,其存活分数远比单独使用双氢青蒿素或单独 γ 射线处理低,表明双氢青蒿素有一定的放射增敏作用,这些研究表明青蒿素及其衍生物可提高肿瘤细胞对射线的敏感性。本实验以人鼻咽癌CNE-1细胞为研究对象,发现青蒿素与蒿甲醚对CNE-1细胞有抑制作用,两种药物对细胞的抑制作用均随着药物浓度的提高而增强。高浓度的剂量对细胞有毒性作用,因此,本实验通过克隆法选择了CNE-1细胞抑制作用较小的浓度做放射增敏实验。

放射增敏试验初步表明了,青蒿素与蒿甲醚联合照射时细胞克隆存活率低于单独照射组或单纯药

物处理组,说明青蒿素与蒿甲醚提高了鼻咽癌细胞CNE-1对射线的辐射敏感性。同时青蒿素的放射增敏比为1.272,蒿甲醚放射增敏比为1.481,证明其对于人鼻咽癌细胞CNE-1细胞的放射增敏作用较青蒿素高。利用“单击多靶模型”adiomed软件包拟合经典的细胞存活曲线,并求出 D_0 、 D_q 及SER值。在本实验中,蒿甲醚组 D_0 值明显的小于青蒿素组,说明蒿甲醚增加了细胞对射线敏感性,其放射增敏比为1.481。准阈剂量 D_q 是测量生存曲线肩宽的参数,它是存活曲线的直线部分向上延伸与通过存活率等于1的横轴相交点的剂量。它表明细胞亚致死损伤修复能力的大小。 D_q 值越小,表明细胞对亚致死损伤修复能力较弱,很小剂量便可使细胞进入致死损伤,从细胞存活曲线参数也显示蒿甲醚和青蒿素都使细胞存活曲线的 D_q 值明显小于青蒿素组值,表明蒿甲醚较青蒿素能更有效地抑制细胞亚致死性损伤修复,这也可能是其放射增敏作用的原因之一。本实验结果显示蒿甲醚比青蒿素对体外培养的人鼻咽癌细胞具有更明显的放射增敏作用,为蒿甲醚在临床的合理应用提供了实验室参考依据。

参考文献

- 张居馨,王士贤,张富庚,等. 癌症, 2001, 20(12): 1363-1366
ZHANG Juxin, WANG Shixian, ZHANG Fugeng, et al. J Cancer, 2001, 20(12): 1363-1366
- 赵妍妍,周红. 中国药理学报, 2009, 26(2): 11-11
ZHAO Yanyan, ZHOU Hong. J Acta Pharmacologica Sinica, 2009, 26(2): 11-11
- 刘喜朝,王玉眷,欧阳藩,等. 化学进展, 1999, 1(1): 41-46

- LIU Xichao, WANG Yujuan, OUYAN Fan. *et al.* J Acta Chimica Clinica, 1999, **1**(1): 41-46
- 4 Lai H, Singh N P. Cancer Letters, 1995, **91**(1):41-46
- 5 Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, *et al.* International Journal of Oncology. 2001, **18**(4):767-773
- 6 Singh N P, Lai H. Life Sciences, 2001, **70**(1): 49-56
- 7 谢茹燕, 乔敏敏, 章永平. 上海交通大学学报, 2008(3): 302-306
- XIE Ruyan, QIAO Minmin, ZHANG Yongpin. Journal of Shanghai Jiaotong University, 2008(3): 302-306
- 8 Kim S J, Kim M S, Lee J W, *et al.* J Cancer Res Clin Oncol, 2006, **132**(2): 129-135

Comparison of the radio-sensitizing effect between artemisinin and artemether on human nasopharyngeal carcinoma CNE-1 cell line

PAN Luyu¹ CAO Jianping¹ CHEN Guanglie¹ JI Rong¹ FENG Yang¹ ZHOU Yuanyuan¹
PENG Xiaomei² CUI Dan¹ ZHU Wei¹ FAN Saijun¹

¹(School of Radiation Medicine and Public Health, Soochow University, Suzhou 215123, China)

²(Jiangsu Provincial Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection, Wujiang 215200, China)

ABSTRACT In order to compare the radiation sensitizing effect of artemisinin and artemether to human nasopharyngeal carcinoma CNE-1 cell, the human nasopharyngeal carcinoma CNE-1 cell in index vegetal period was selected as experimental sample, and the cells clone-forming method was used to test growth inhibition of artemisinin and artemether to the CNE-1 cell, to estimate the difference of inhibitory effect between the two drugs, and to determine suitable drug concentration. The experimental samples were divided into control group, simple drug group, irradiated group and union treatment group with human nasopharyngeal carcinoma cells. The simple drug and union treatment group were also divided into artemisinin and artemether group, respectively. The exposed doses were set up as 0, 2, 4, 6, and 8 Gy. The cell survival curve was fitted by an multi-target one-shot mathematic model and taking the radiation sensitizing enhancement ratio/SER (SER) equal to the dosage ratio of irradiated group and union treatment group when the same biological effect was achieved. It has been found that both drugs can enhance the inhibitory effect with the increment of medicine concentration. The radiation sensitizing enhancement ratio/SER (SER) has been determined to be 1.272 and 1.481 for artemisinin and artemether, respectively, which suggests that artemether has stronger radiation sensitizing effect compared with artemisinin in human nasopharyngeal carcinoma CNE-1 cells.

KEYWORDS CNE-1 cell line, Radiosensitive enhancement effect, Artemisinin, Artemether

CLC Q691, R114