

· 基础研究 ·

# 白藜芦醇对人咽鳞癌 FADU 细胞放射的增敏作用及其对细胞周期的影响

邵 渊 权 芳 李宏慧 姚小宝 赵 谦 赵瑞敏

**摘要** **目的** 应用白藜芦醇作用于咽鳞癌细胞株 FADU, 观察其放疗增敏作用。**方法** 体外培养咽鳞癌细胞株 FADU, 以细胞毒实验 (cytotoxicity test, MTT) 检测不同浓度白藜芦醇对细胞增殖抑制情况; 用克隆形成法绘制细胞存活曲线, 获得白藜芦醇的放射增敏比 (sensitive enhancement ratio, SER)。以流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 分析对照组、单纯照射组、白藜芦醇组和照射增敏组 (白藜芦醇联合照射组) 细胞周期变化和凋亡情况。**结果** MTT 结果显示白藜芦醇对 FADU 细胞生长抑制作用随药物浓度的增加而增强 ( $P < 0.05$ )。克隆形成实验提示单纯照射组在 2 Gy 时细胞存活分数 (surviving fraction at 2 Gy, SF2) 为  $0.717 \pm 0.062$ ; 照射增敏组 SF2 为  $0.426 \pm 0.035$ , SER 为  $1.684 \pm 0.178$ , 差异有统计学意义 ( $P = 0.007$ )。FCM 显示 FADU 细胞经 4 Gy 照射后,  $G_2/M$  期细胞比例增加,  $G_1$  期细胞比例减少; 经白藜芦醇作用 24 h 后,  $G_1$  期细胞比例减少,  $G_2/M$  期和 S 期细胞比例增加; 当白藜芦醇与 4 Gy 照射联合应用时,  $G_2/M$  期细胞比例显著增加,  $G_1$  期细胞比例显著减少。对照组、单纯照射组、白藜芦醇组和照射增敏组 FADU 细胞的凋亡率 (%) 分别为  $1.94 \pm 1.65$ 、 $4.56 \pm 0.92$ 、 $2.03 \pm 1.46$  及  $23.11 \pm 7.22$ , 照射增敏组凋亡率与其他各处理组比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** 白藜芦醇可增强咽鳞癌细胞株 FADU 放射敏感性, 其机制可能与改变细胞周期的分布、诱导细胞凋亡相关。

**关键词** 白藜芦醇; 放射增敏; 凋亡; 细胞周期; 咽鳞癌

The Radiosensitizing Effect of Resveratrol on Hypopharyngeal Carcinoma Cell Line FADU and Its Effect on the Cell Cycle SHAO Yuan, QUAN Fang, LI Hong-hui, YAO Xiao-bao, ZHAO Qian, and ZHAO Rui-min Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, First Affiliated Hospital, Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an (710061), China

**ABSTRACT** **Objective** To study the radiosensitizing effect of resveratrol on hypopharyngeal carcinoma cell line FADU *in vitro*. **Methods** Hypopharyngeal carcinoma cell line FADU was cultured in *in vitro* DMEM. Its inhibition on cell proliferation was detected using cytotoxicity test (MTT assay). The cell survival curve was drawn using clone formation to obtain sensitive enhancement ratio (SER). Changes of the cell cycle and cell apoptosis were analyzed using flow cytometry (FCM). **Results** Results of MTT showed the inhibition of resveratrol on FADU cells increased along with its concentrations ( $P < 0.05$ ). Results of clone formation indicated the surviving fraction at 2 Gy (SF2) was  $0.717 \pm 0.062$  in the irradiation group, and  $0.426 \pm 0.035$  in the resveratrol plus irradiation group (with SER ranged  $1.684 \pm 0.178$ ) with statistical difference ( $P = 0.007$ ). Results of FCM showed that after radiation of 4 Gy radiation, cells at  $G_2/M$  phase arrest increased, but cells at  $G_1$  decreased. After radiation of resveratrol for 24 h, cells at  $G_1$  decreased, but cells at  $G_2/M$  phase and S phase arrest increased. When 4 Gy radiation combined resveratrol was used, cells at  $G_2/M$  phase arrest significantly increased, but cells at  $G_1$  significantly decreased. The apoptosis rate was  $1.94\% \pm 1.65\%$  in the control group,  $4.56\% \pm 0.92\%$  in the irradiation group,  $2.03\% \pm 1.46\%$  in the resveratrol group, and  $23.11\% \pm 7.22\%$  in the resveratrol plus irradiation group.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30901946)

作者单位: 西安交通大学医学院第一附属医院耳鼻咽喉头颈外科 (西安 710061)

通讯作者: 权 芳, Tel: 029-85323965, E-mail: quanfang2013@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.06.0699

There was statistical difference between the resveratrol plus irradiation group and the rest 3 groups ( $P < 0.05$ ). Conclusion Resveratrol could enhance the radiosensitivity of hypopharyngeal carcinoma FADU cells *in vitro* possibly by inducing cell apoptosis and causing changes in the cell cycle distribution.

KEYWORDS resveratrol; radiosensitivity; apoptosis; cell cycle; hypopharyngeal carcinoma

咽鳞癌是我国耳鼻咽喉科常见的恶性肿瘤,生长浸润快,对放射线中度敏感,严重危害人民生命健康。放射治疗是目前咽鳞癌患者最主要的辅助治疗方式。但部分患者对射线不敏感或在取得疗效后出现放射抗拒性,严重制约咽鳞癌患者疗效<sup>[1]</sup>。如何提高肿瘤放射增敏成为目前研究热点。许多研究显示,中药在诱导肿瘤细胞凋亡、抗肿瘤细胞的侵袭及转移、诱导肿瘤细胞分化、抑制癌基因的表达、促进抑癌基因的表达等多个环节抑制肿瘤的发生、发展与转移<sup>[2]</sup>。本课题研究白藜芦醇对人咽鳞癌 FADU 细胞放射的增敏作用及其对细胞周期的影响,旨在阐明其部分放疗增敏机制,为其临床应用提供理论基础。

## 材料与方 法

### 1 材 料

1.1 细胞株 人咽鳞癌细胞株 FADU,由美国斯坦福大学肿瘤放射系 Martin Brown 教授惠赠。人咽鳞癌细胞株 FADU 在含 15% 小牛血清(青霉素 100 mg/L 及链霉素 100 mg/L)的 DMEM 培养基中,置入 37 °C 50 mL/L CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中常规培养。细胞经过 2.5 g/L 胰蛋白酶消化传代,每 2~3 天传代 1 次,取对数生长期细胞用于实验。

1.2 药物及试剂 白藜芦醇购自 Sigma 公司,纯度 99%;DMEM 培养基,胰蛋白酶购自美国 Invitrogen GIBCO 公司;极优新生小牛血清购自美国 Omega Scientific Inc 生物工程有限公司;MTT 和碘化丙啶(PI)购自美国 Sigma 公司。

1.3 仪器 流式细胞仪(型号:FACSCalibur,德国 BD 公司);全自动酶标仪(型号:ELX800,美国 Molecular Devices 公司);二氧化碳恒温培养箱(型号:3110,美国 Forma Scientific 公司);全自动细胞计数仪(型号:Z1,美国 Beckman Coulter Inc 公司);放射机(型号:Theratron T-1000,加拿大 Theratron 公司)。

### 2 方 法

2.1 MTT 法细胞毒性实验 即检测白藜芦醇对 FADU 细胞的毒性,选取对数生长期的 FADU 细胞接种于 96 孔板,经胰酶消化,调整细胞浓度  $1 \times 10^4$  /mL, 100  $\mu$ L 每孔,加入 96 孔培养板中培养 24 h,使细胞

贴壁良好。更换新鲜培养液,加入不同浓度白藜芦醇,使其终浓度为 0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8 mg/L。每个浓度设置 8 个复孔。同时设空白对照组和不含细胞的培养液作为调零孔。培养板放回培养箱中分别继续培养 48、72 h。取出培养板每孔加入 50  $\mu$ L MTT(5 g/L)培养 4 h 后。吸出上清液,加入 150  $\mu$ L 二甲基亚砷(DMSO)。在平板摇床摇 10 min 使甲磺完全溶解。用酶标仪测 490 nm 波长处的吸光度值(A),实验重复 3 次,取平均值。按照下式计算各个药物浓度的细胞存活抑制率。抑制率(%) =  $1 - (\text{药物组 A 值} - \text{空白对照组 A 值}) / (\text{阴性对照组 FADU} - \text{空白对照组 A 值}) \times 100\%$ 。以不同药物浓度为横坐标,细胞存活率为纵坐标绘制细胞生长曲线。

2.2 克隆形成实验 取对数生长期 FADU 细胞制成单细胞悬液,调整细胞浓度至  $1 \times 10^6$  /mL,照射剂量取 0.2、4、6、8 Gy 4 个放射剂量点,分单纯照射组和照射增敏组。选用抑制 20% 细胞生长(IC<sub>20</sub>)的药物浓度(3.2 mg/L)作放射增敏实验,照射前 2 h 对照射增敏组进行给药。照射后用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次,用胰酶消化制成细胞悬液。根据不同的照射剂量,按 500~10 000 个细胞的预置数将细胞悬液接种到直径 60 mm 的培养皿中(每组设 3 个平行)。在培养箱培养 14d 后经 PBS 漂洗、甲醇固定、Gimsa 染色,显微镜下计数 50 个细胞以上的细胞克隆集落数<sup>[3]</sup>。实验数据通过 SPSS 软件用多靶单击数学模型  $SF = 1 - (1 - e^{-kD})^N$  拟合并求出平均致死剂量(D0)、阈剂量(Dq)、在 2Gy 照射剂量下的存活分数(SF2)值,matlab 绘制细胞的存活曲线,同时计算放射增敏比(sensitive enhancement ratio, SER) = (对照组 SF2/实验组 SF2)  $\times 100\%$ 。全部实验中,各实验点均同时设置平行样本并重复 3 次。

2.3 FCM 检测细胞周期和凋亡率 取对数生长期 FADU 细胞制成单细胞悬液,调整细胞浓度至  $1 \times 10^6$  /mL,对照组不做处理,单纯照射组和照射增敏组均在照射前 2 h 给药(含药培养终浓度为 3.2 mg/L),然后单纯照射组与照射增敏组接收 4.0 Gy 照射剂量,照射后,以上各组分别在 24、48、72 h 收集细胞,离心弃上清,用冷 PBS-EDTA 洗涤 2 次,弃上清,将细胞重悬于 1 mL PBS-EDTA,缓慢加入 1 mL 100 %

的乙醇振荡混匀固定,后 4 ℃ 过夜。室温孵育 30 min,离心弃上清,将沉淀悬起于 0.5 mL PBS-EDTA,加入 20 μL RNasa A 混合,室温孵育 30 min,加入 25 μL PI (1 mg/mL) 染料,振荡混匀后室温避光染色 30 min,用流式细胞分析仪分析细胞周期和凋亡率。采用细胞周期拟合软件分析细胞周期。实验重复 3 次,取平均值。

**2.4 统计学方法** 采用 SPSS 13.0 统计软件处理数据,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间均数比较采用单因素方差分析,两个组间均数比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

**1 白藜芦醇不同浓度组对 FADU 细胞增殖率比较(图 1)** 相同时间内白藜芦醇对 FADU 细胞生长抑制作用随药物浓度的增加而加强,与 FADU 细胞对照组比较,差异均有统计学意义 ( $F = 5.578$ ,  $P < 0.05$ )。相同浓度的白藜芦醇对细胞生长抑制作用随作用时间的延长而加强 ( $F = 4.509$ ,  $P < 0.05$ )。

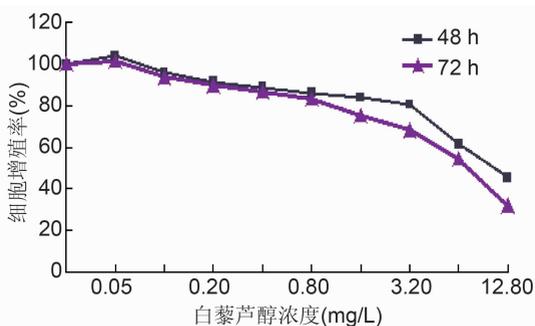


图 1 白藜芦醇不同浓度组 FADU 细胞增殖率比较

**2 单纯照射组与照射增敏组 FADU 细胞存活曲线比较(图 2)** 白藜芦醇联合放射时 FADU 细胞存活曲线显示两条曲线明显分开呈一定的距离,照射增敏组曲线低剂量区肩区与单纯照射组肩区比较缩小变窄,且照射增敏组各剂量点的存活分数均低于单纯照射组。单纯照射组  $D_0$  值为  $(1.761 \pm 0.212)$  Gy,  $D_q$  值为  $(3.981 \pm 0.450)$  Gy, SF2 为  $0.717 \pm 0.062$ ;照射加药组  $D_0$  值为  $(1.404 \pm 0.308)$  Gy,  $D_q$  值为  $(1.426 \pm 0.362)$  Gy, SF2 为  $0.426 \pm 0.035$ ; SER 为  $1.684 \pm 0.178$ ;差异有统计学意义 ( $P = 0.007$ )。

**3 流式细胞仪检测白藜芦醇对细胞周期的影响(图 3)** 与对照组比较,FADU 细胞经 4 Gy 照射后, $G_2/M$  期细胞比例增加, $G_1$  期细胞比例减少,72 h 时凋亡细胞增多;经白藜芦醇作用后, $G_1$  期细胞比例显著减少,S 期和  $G_2/M$  期细胞比例增加,24 h 以 S 期细

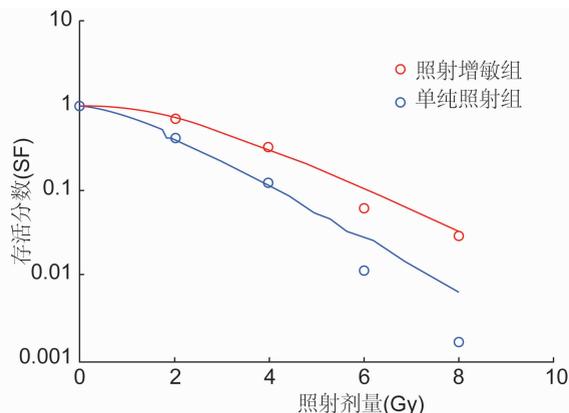


图 2 单纯照射组与照射增敏组 FADU 细胞存活曲线比较

胞增加最为显著,72 h 时以  $G_2/M$  期细胞增加显著;当白藜芦醇与 4 Gy 照射联合应用时, $G_1$  期细胞显著减少,S 期和  $G_2/M$  期细胞比例显著增加,凋亡细胞增加。照射增敏组 48 h  $G_2/M$  期细胞比例增加最显著,72 h 凋亡细胞增加最显著(图 3)。对照组、单纯照射组、白藜芦醇组和照射增敏组(白藜芦醇联合照射组) FADU 细胞 72 h 的凋亡率(%)分别为  $1.94 \pm 1.65$ 、 $4.56 \pm 0.92$ 、 $2.03 \pm 1.46$  和  $23.11 \pm 7.22$ ,照射增敏组凋亡率与其他各处理组比较,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

## 讨 论

下咽鳞癌是头颈肿瘤放射治疗中预后较差的一种恶性肿瘤,患者的 5 年生存率仅约 30% ~ 50%<sup>[4]</sup>,主要因为下咽鳞癌患者早期症状不明显,不易诊断,发现时多数为中晚期病例。单一的治疗手段疗效不佳<sup>[4]</sup>。放疗是目前最有效的辅助治疗手段,但放射后局部复发率及远处转移率是治疗失败的主要原因。因此,寻找高效低毒的放射增敏剂是当前研究的热点。要提高疗效,就应设法防止复发和远处转移,而防止复发和远处转移的关键在于提高肿瘤细胞对射线的敏感性。不少学者以传统的中医学理论和现代医学方法相结合进行了临床研究,颇有成效<sup>[5,6]</sup>。利用中药配合放疗既可以增加放射敏感性、增加放射肿瘤的致死效应,又能减轻放射反应,提高免疫功能,提高生活质量,防止复发及转移,从而提高远期生存率。

白藜芦醇是广泛存在于葡萄和传统中药如决明子、虎杖中的一种植物多酚化合物,化学结构 3,5,4'-三羟基二苯乙烯(3,5,4'-tri-hydroxystilbene),是植物为抵抗外界刺激如紫外线、真菌、病毒感染或机械损伤而产生的一种植物抗毒素。白藜芦醇是近年中西医结合领域的一个研究热点,具有降血脂、抗炎、抗氧化、

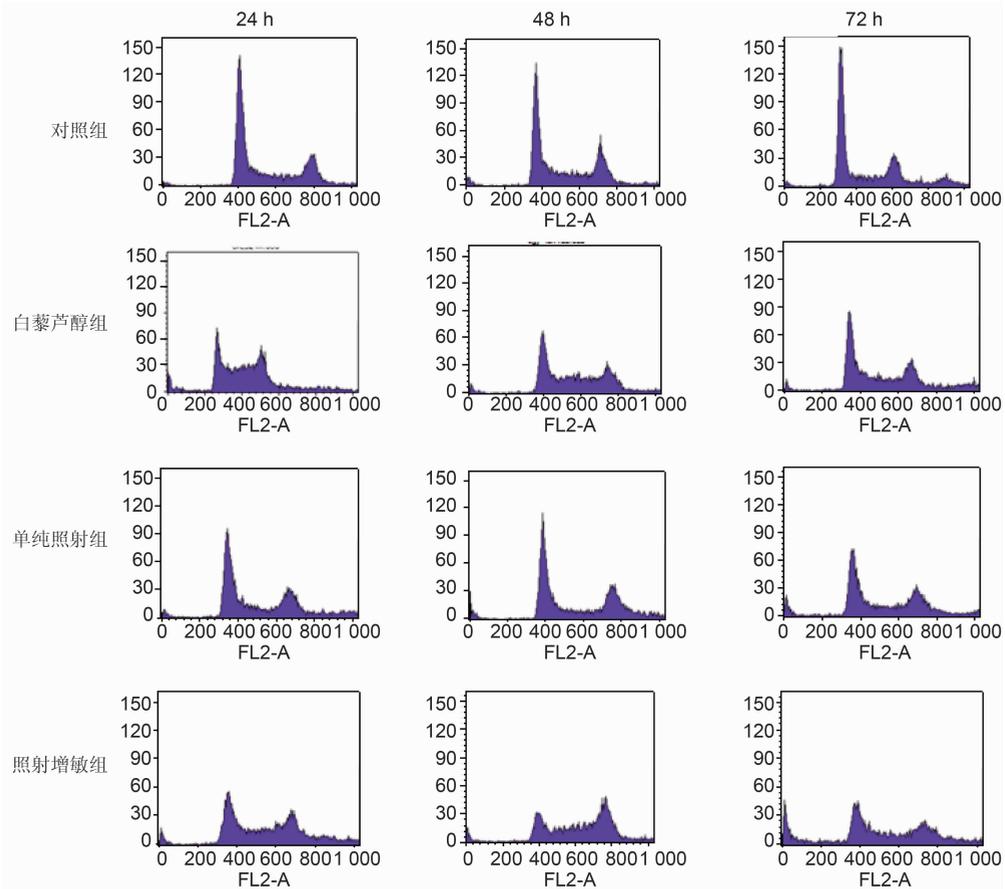


图3 流式细胞仪检测白藜芦醇对细胞周期的影响

调节免疫、抑制肿瘤细胞增殖、转移和促进凋亡等生物学功能。在对其抗癌机制研究中,已发现白藜芦醇可通过诱导多种肿瘤细胞株凋亡而抑制其增殖<sup>[7,8]</sup>。

本实验 MTT 及集落形成实验结果表明,白藜芦醇对 FADU 细胞具有生长抑制及照射增敏作用。射线对增殖期细胞杀伤力远大于静止期细胞,对 G<sub>2</sub>/M 期更为敏感,调动 S 期或 G<sub>1</sub> 期进入对放疗相对敏感的 G<sub>2</sub>/M 期,是放疗敏感性研究的一个重要方向<sup>[9]</sup>。De Maria S 等<sup>[10]</sup>研究发现白藜芦醇可以调节细胞周期。本研究通过流式细胞仪检测白藜芦醇联合放疗, FADU 细胞 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例增加, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 及 S 期细胞比例均减少,而且 S 期比例显著低于单纯加药组或放疗组。说明白藜芦醇可以使细胞阻滞于对射线相对敏感的 G<sub>2</sub>/M 期,提高 FADU 细胞对射线的敏感性。大量研究表明细胞放射敏感性与细胞凋亡密切相关<sup>[11]</sup>。Harada T<sup>[12]</sup> 和 Fang Y 等<sup>[13]</sup> 分别在前列腺癌和口腔鳞状细胞癌中发现白藜芦醇可诱导细胞凋亡,提高肿瘤对放射线的敏感性。本实验照射组、白藜芦醇组和白藜芦醇联合照射组 FADU 细胞的凋亡率 (%) 分别为  $1.94 \pm 1.65$ 、 $4.56 \pm 0.92$ 、 $2.03 \pm 1.46$

和  $23.11 \pm 7.22$ 。显示白藜芦醇能诱导 FADU 细胞的 G<sub>2</sub>/M 期阻滞,诱导凋亡,提高 FADU 细胞对放射线的敏感性。

综上所述,白藜芦醇对 FADU 细胞具有放射增敏作用,其增敏机制可能与其改变细胞周期及促进细胞凋亡有关,这将为临床提高咽喉癌放射敏感性提供新的治疗选择和实验依据。本研究结果是以体外培养 FADU 细胞为实验对象获得的,但并未考虑机体内环境、药体内代谢、药物作用时间差等因素,进一步的验证尚需进行体内试验。

#### 参 考 文 献

- [1] Nishimura H, Sasaki R, Yoshida K, et al. Radiotherapy for stage I or II hypopharyngeal carcinoma[J]. J Radiat Res, 2012, 53(6): 892-899.
- [2] 韦保和. 中药配合放射治疗鼻咽癌的研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(6): 477-479.
- [3] Ning S, Knox SJ. G/M-phase arrest and death by apoptosis of HL60 cells irradiated with exponentially decreasing low-dose-rate gamma radiation [J]. Radiat Res, 1999, 151(6): 659-669.

- [4] 张宗敏,唐平章,徐震纲,等. 下咽鳞癌不同治疗方案的临床分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2005, 21(1): 48-51.
- [5] 沈瑜,董秀. 肿瘤放射增敏剂临床应用现状[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2005, 14(4): 373-374.
- [6] Garg AK, Buchholz TA, Aggarwal BB. Chemosensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols [J]. Antioxid Redox Signal, 2005, 7(11-12): 1630-1647.
- [7] Tyagi A, Gu M, Takahata T, et al. Resveratrol selectively induces DNA damage, independent of Smad4 expression, in its efficacy against human head and neck squamous cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(16): 5402-5411.
- [8] Kao CL, Huang PI, Tsai PH, et al. Resveratrol induced apoptosis and increased radiosensitivity in CD133-positive cells derived from a typical teratoid/rhabdoid tumor [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2009, 74(1): 219-228.
- [9] Dunne AL, Mothersill C, Robson T, et al. Radiosensitization of colon cancer cell lines by docetaxel: mechanisms of action [J]. Oncol Res, 2004, 14(9): 447-454.
- [10] De Maria S, Scognamiglio I, Lombardi A, et al. Polydatin, a natural precursor of resveratrol, induces cell cycle arrest and differentiation of human colorectal CaCO<sub>3</sub> cell [J]. J Transl Med, 2013, 11(1): 264.
- [11] Delmas D, Solary E, Latruffe N. Resveratrol, a phyto-chemical inducer of multiple cell death pathways: apoptosis, autophagy and mitotic catastrophe [J]. Curr Med Chem, 2011, 18(8): 1100-1121.
- [12] Harada T, Harada K, Ueyama Y. The enhancement of tumor radioresponse by combined treatment with cepharanthine is accompanied by the inhibition of DNA damage repair and the induction of apoptosis in oral squamous cell carcinoma [J]. Int J Oncol, 2012, 41(2): 565-572.
- [13] Fang Y, DeMarco VG, Nicholl MB. Resveratrol enhances radiation sensitivity in prostate cancer by inhibiting cell proliferation and promoting cell senescence and apoptosis [J]. Cancer Sci, 2012, 103(6): 1090-1098.

(收稿:2013-12-02 修回:2015-03-14)

## 第十三届全国中西医结合风湿病学术会议征文通知

中国中西医结合学会风湿类疾病专业委员会定于2015年10月中旬在浙江省杭州市召开第十三届全国中西医结合风湿病学术会议,现将会议征文事项通知如下。

**征文内容** (1) 常见风湿病的中西医结合基础与诊疗方案研究:重点征文领域为类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎、骨关节炎、系统性硬化症、干燥综合症、痛风性关节炎、白塞病、血管炎、多发性肌炎和皮肌炎等风湿病的中西医结合治疗研究;(2) 疑难风湿病中西医结合治疗进展;(3) 治疗风湿病药物(中成药、中药各类制剂)作用机制的实验研究、临床试验(疗效性、安全性评价)与临床应用研究。

**征文要求** (1) 稿件应为未公开发表的论文,要求论点鲜明,具有较强的科学性和先进性;(2) 稿件全文应在4000字以内,并附400字以内的结构式摘要(目的、方法、结果、结论)及关键词;全文4000字以上,又无摘要者,汇编时作题录刊登;请提交两种形式文稿(纸质打印稿和电子文稿),电子版请发到 btdy168@163.com 邮箱;纸质文稿与电子版要一致,不受理手抄及复印文稿;(3) 稿件一律用 Word 文档排印,标准 A4 版面,标题用 3 号宋体字,作者及单位用小 4 号楷体字,注明单位科室、通讯地址、邮编、电子邮箱、联系电话。摘要与关键词用小 5 号宋体字;(4) 纸质文稿须加盖单位公章,属省、部级以上科研基金课题者,请注明;(5) 论文经审评录用后,将收入“会议学术论文集”,组委会将给作者发送会议报到通知;参加会议者可获得医学继续教育学分;大会发言论文,将由资深专家组成评委会,评选出 15 篇优秀论文,并给予奖励;(6) 希望风湿类疾病专业委员会委员、青年委员投稿 1 篇以上;欢迎相关专业的专家、学者积极参与,踊跃投稿。

**截稿日期** 2015 年 9 月 20 日(以邮戳日期或电子邮件发送时间为准)。

**联系方式** (1) 联系人及电话:中国中西医结合学会风湿类疾病专业委员会,电话:020-61648765,传真:020-61647683,电子邮箱:btdy168@163.com;接红宇:13580508674,杨少锋:13802911355,吴启富:13609038769;(2) 投稿地址与收件人:广东省广州市广州大道北 1838 号(邮编 510515)南方医科大学中医药学院内 接红宇(收)。