

网络出版时间: 2018-1-8 11:44 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180104.1310.012.html

阿帕替尼联合放疗对 HeLa 细胞周期和凋亡影响的体外研究

刘伟, 张建文

摘要 目的 体外观察阿帕替尼 (APA) 联合放疗对宫颈癌 HeLa 细胞周期和凋亡影响。方法 对数生长期 HeLa 细胞分为对照组、药物组、放疗组和联合组。流式细胞仪检测细胞周期和凋亡, 分析放疗后 HeLa 细胞周期和凋亡变化。结果 联合组 G₀/G₁ 期阻滞明显高于对照组和放疗组 ($P < 0.05$)。联合组 S 期比例最低, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与放疗组比较差异无统计学意义。联合组凋亡率高于对照组和药物组 ($P < 0.05$)。结论 APA 联合放疗有明显 G₀/G₁ 期细胞周期阻滞作用, 但无明显凋亡诱导作用。

关键词 阿帕替尼; 放疗; 细胞周期/凋亡; 宫颈癌/HeLa 细胞

中图分类号 R 349.53; R 737.33

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)01-0055-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.01.012

宫颈癌是女性常见肿瘤之一, 2010 和 2011 年宫颈癌在中国癌症中居第 7 和 10 位^[1-2]。按国际妇产科联盟分期, II B 期以后患者占 59.2% (45/76)^[3]。放疗是宫颈癌主要治疗措施, 单纯放疗具有较好疗效, 单纯放疗 20 年总生存率为 77% (123/171), 高于根治性手术 72% (123/172), 但仍有 27.4% (94/343) 出现复发^[4]。顺铂 (cisplatin, DDP) 是局部进展期宫颈癌同步放化疗常用的药物^[5], 但严重的胃肠道反应是限制其广泛应用的主要因素。抗血管生成是阿帕替尼 (apatinib, APA) 主要作用机制, 能有效、低毒地抑制肺癌、结肠癌、胃癌等移植瘤模型的生长^[6-7]。除抗血管生成外, APA 是否影响细胞周期和凋亡尚不清楚, 该研究主要体外观察 APA 联合放疗对宫颈癌细胞周期和凋亡影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料 APA (有效剂量 0.425 g/片, 江苏

恒瑞医药股份有限公司); DMEM 高糖培养基 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (美国 HyClone 公司); 细胞凋亡检测试剂盒 (美国 BD 公司); 细胞周期检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 人宫颈癌 HeLa 细胞株 (西南医科大学肿瘤科实验室提供); 直线加速器 (瑞典医科达公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人宫颈癌细胞株 (HeLa) 接种于 25 cm² 培养瓶中, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养, 倒置显微镜下每天观察细胞生长状态, 每 2~3 d 传代一次, 取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 实验分组和照射条件 实验分为对照组、药物组、放疗组和联合组。采用直线加速器照射, 源皮距 = 100 cm, 射野 40 cm × 40 cm, 照射剂量 2 Gy。

1.2.3 APA 药物工作浓度的选取 在前期体外实验研究中, 显示 APA 对 HeLa 的增殖抑制呈浓度依赖性, 半数抑制浓度为 27.16 μmol/L, 20% 半数抑制浓度为 11.46 μmol/L。选取 APA (20% 半数抑制浓度: 11.46 μmol/L) 作为实验药物浓度。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡 取对数生长期的 HeLa 细胞, 吸取 2 ml 浓度为 5 × 10⁴/ml 的 HeLa 细胞悬液加入 35 mm 培养皿中, DMEM 高糖培养基培养 12 h (即细胞贴壁生长) 后, 药物组和联合组加入 APA (11.46 μmol/L), 各组设 3 个平行样本。继续培养 24 h 后对放疗组和联合组行 2 Gy 照射, 照射后 24 h 终止培养。常规消化、离心、重悬, 预冷 PBS 洗涤重悬细胞后 70% 酒精 4 °C 固定过夜。次日再次离心沉淀细胞, 离心弃固定液, 每管细胞加入配制好的 0.5 ml 碘化吡啶染色液, 缓慢并充分重悬细胞沉淀, 37 °C 避光温浴 30 min, 流式细胞仪检测细胞周期。细胞凋亡检测采用常规消化、离心、PBS 重悬细胞后, 再次离心细胞, 吸去 PBS, 每管加入约 100 μl binding buffer 重悬细胞, 然后分别加入 7-AAD (5 μl) 和 PE (5 μl), 室温下避光孵育 15 min 后, 再加入 400 μl binding buffer, 轻轻吹打均匀, 行流式细胞仪检测细胞凋亡。以上实验均重复 3 次。

2017-09-20 接收

基金项目: CSCO-恒瑞肿瘤研究基金 (编号: Y-HR2016-046)

作者单位: 西南医科大学附属医院肿瘤科, 泸州 646000

作者简介: 刘伟, 男, 硕士研究生;

张建文, 男, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zhangjianwen66@126.com

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,定量检测结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行多组间均数比较,两组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞周期分布 联合组 (71.51 ± 1.65) % G0/G1 期比例高于对照组 (57.25 ± 0.92) % 和放疗组 (59.38 ± 2.24) % ($P < 0.05$),与药物组 (60.90 ± 1.27) % 相似,对照组和放疗组相似。联合组 (15.45 ± 2.77) % 与药物组 (13.37 ± 1.40) % G2/M 期相似,高于对照组 (10.24 ± 0.30) %,低于放疗组 (24.46 ± 2.59) % ($P < 0.05$)。联合组 (13.04 ± 1.41) % S 期比例最低,对照组 (32.50 ± 0.98) % 最高,其次为药物组 (25.74 ± 2.56) %。见表 1 和图 1。

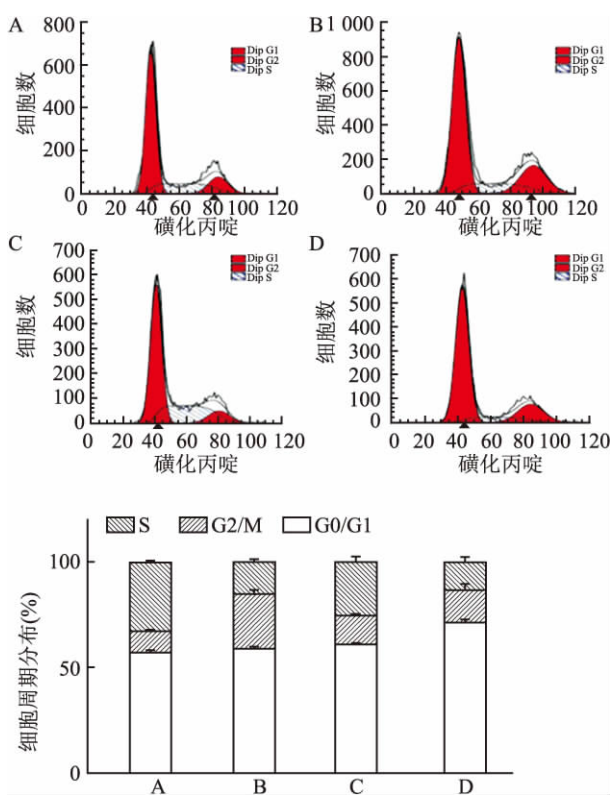


图1 HeLa 细胞周期分布

A: 对照组; B: 放疗组; C: 药物组; D: 联合组

2.2 细胞凋亡率 联合组凋亡率最高 (5.81 ± 0.21) %,其次为放疗组 (5.51 ± 0.15) %,与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),联合组和放疗组间差异无统计学意义。药物组凋亡率高于对照组,但差异无统计学意义。联合组和放疗组凋亡率

均高于药物组 ($P < 0.05$)。见表 2 和图 2。

表1 HeLa 细胞周期分布情况 ($\bar{x} \pm s$, %, $n = 3$)

细胞周期分布	对照组	放疗组	药物组	联合组
G0/G1	57.25 ± 0.92	59.38 ± 2.24	60.90 ± 1.27*	71.51 ± 1.65* #
P_1/P_2 值	-	0.20/-	0.02/0.36	0.00/0.00
t_1/t_2 值	-	1.52/-	4.03/1.02	13.07/7.55
G2/M	10.24 ± 0.30	24.46 ± 2.59*	13.37 ± 1.40* #	15.45 ± 2.77* #
P_1/P_2 值	-	0.00/-	0.02/0.00	0.03/0.01
t_1/t_2 值	-	9.45/-	3.79/4.33	3.24/4.12
S	32.50 ± 0.98	16.16 ± 1.70*	25.74 ± 2.56* #	13.04 ± 2.39* #
P_1/P_2 值	-	0.00/-	0.01/0.01	0.00/0.14
t_1/t_2 值	-	14.42/-	4.27/5.40	13.05/1.84

注: P_1/P_2 与 t_1/t_2 分别表示与对照组、放疗组比较的 P 值及 t 值; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与放疗组比较: # $P < 0.05$

表2 HeLa 细胞凋亡率 ($\bar{x} \pm s$, %, $n = 3$)

组别	对照组	药物组	放疗组	联合组
凋亡率	1.52 ± 0.74	3.14 ± 0.84*	5.51 ± 0.15* #	5.81 ± 0.21* #
P_1/t_1 值	-	0.07/2.5	0.00/9.15	0.00/9.66
P_2/t_2 值	-	-	0.01/4.81	0.01/5.34
P_3/t_3 值	-	-	-	0.11/2.01

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与药物组比较: # $P < 0.05$; 注: P_1/t_1 、 P_2/t_2 、 P_3/t_3 分别表示与对照组、药物组、放疗组比较的 P 值及 t 值

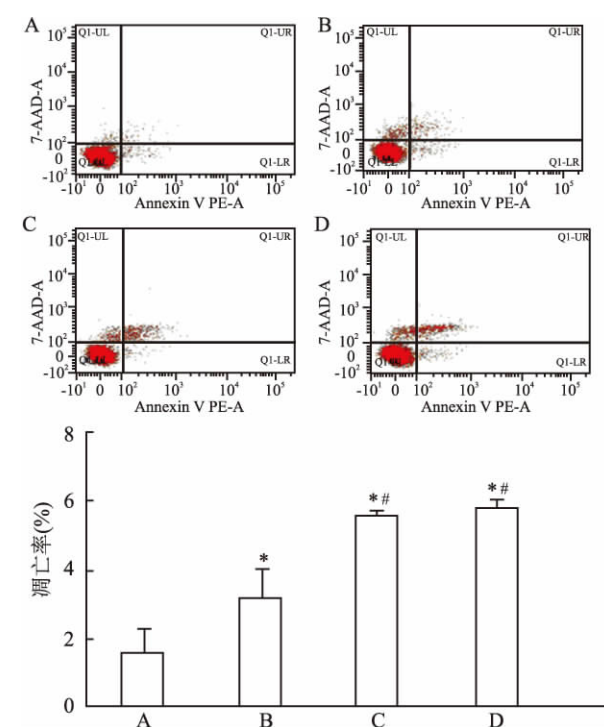


图2 HeLa 细胞凋亡率分布

A: 对照组; B: 药物组; C: 放疗组; D: 联合组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与药物组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

血管内皮生长因子与肿瘤发生发展有密切关

系,抗血管生成治疗是抗肿瘤治疗的重要环境^[8]。APA 是一种新型酪氨酸激酶抑制剂,高度选择作用于 VEGFR-2 的三磷酸腺苷酶结合位点,阻断下游信号通路,抑制肿瘤血管生成。临床应用表明 APA 在肝癌等肿瘤治疗中具有较好临床疗效,毒副作用发生率较低,无严重药物相关不良事件发生^[9]。除抗血管生成外,APA 有无其他作用,宫颈癌 APA 联合放疗是否影响细胞周期分布和凋亡,缺乏相关研究,本实验旨在体外研究 APA 联合放疗对宫颈癌 HeLa 细胞周期及凋亡的影响。

细胞周期中 G2/M 期对电离辐射最敏感,G1 期相对敏感,S 期呈放射抵抗^[10]。不同抗血管生成药物对细胞周期阻滞不同。在胃肠道肿瘤和肝癌中研究^[11-12]显示,索拉非尼、BD0801 或贝伐单抗有促进 G0/G1 期阻滞作用,在卵巢癌研究提示以 G2/M 期阻滞为主^[13]。本研究结果显示,APA 联合放疗或单药 APA 均以 G0/G1 期细胞阻滞为主(71.51 ± 1.65 %)和(60.90 ± 1.27 %),APA 联合放疗降低 S 期细胞比例(13.04 ± 1.41 %),低于单纯放疗(16.16 ± 1.70 %),单药 APA S 期细胞比例仍较高(25.74 ± 2.56 %)。研究^[11-12]显示 APA 促进放疗后 HeLa 细胞阻滞于 G0/G1 期,减少 S 期细胞比例。采用间断给药方式可能有增加 HeLa 细胞放射敏感性作用。

细胞凋亡是放疗导致细胞死亡方式,不同分子靶向药物联合放疗具有促凋亡作用。在乳腺癌及肺癌研究^[14-15]显示,吉非替尼联合放疗明显增加乳腺癌及肺癌凋亡率。本研究表明,APA 联合放疗明显促进 HeLa 细胞凋亡率发生(5.81 ± 0.21 %),比单纯放疗(5.51 ± 0.15 %)和单药 APA (3.14 ± 0.84 %)细胞凋亡率高,比单药 APA 高近 2 倍,比对照组(1.52 ± 0.74 %)高近 4 倍。APA 联合放疗与单纯放疗细胞凋亡率相似。上述结果提示单药 APA 具有促凋亡作用,但联合放疗促凋亡作用表现不明显,可能与 APA 作用机制有关,对调节凋亡相关蛋白影响可能较小。

综上所述,APA 联合放疗具有细胞周期阻滞作用,以 G0/G1 期阻滞为主,在促凋亡方面,具有一定促凋亡作用,但作用不明显,原因有待进一步研究。

参考文献

[1] Chen W, Zheng R, Zeng H, et al. Annual report on status of cancer in China, 2011 [J]. *Chin J Cancer Res*, 2015, 27(1): 2-12.

[2] Chen W, Zheng R, Zhang S, et al. Annual report on status of cancer in China, 2010 [J]. *Chin J Cancer Res*, 2014, 26(1): 48-58.

[3] Lee J, Lin J B, Sun F J, et al. Safety and efficacy of semiextended field intensity-modulated radiation therapy and concurrent cisplatin in locally advanced cervical cancer patients: An observational study of 10-year experience [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(10): e6158.

[4] Landoni F, Colombo A, Milani R, et al. Randomized study between radical surgery and radiotherapy for the treatment of stage IB-IIA cervical cancer: 20-year update [J]. *J Gynecol Oncol*, 2017, 28(3): e34.

[5] Lin J F, Berger J L, Krivak T C, et al. Impact of facility volume on therapy and survival for locally advanced cervical cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 132(2): 416-22.

[6] Tian S, Quan H, Xie C, et al. YN968D1 is a novel and selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase with potent activity *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(7): 1374-80.

[7] 梁树,童秀珍,符立悟.小分子酪氨酸激酶抑制剂 Apatinib 对白血病 HL-60 细胞株抑制增殖作用及机制[J].南方医科大学学报,2011,31(5):871-4.

[8] Zhao C, Su Y, Zhang J, et al. Fibrinogen-derived fibrinostatins inhibit tumor growth through anti-angiogenesis [J]. *Cancer Sci*, 2015, 106(11): 1596-606.

[9] Kou P, Zhang Y, Shao W, et al. Significant efficacy and well safety of apatinib in an advanced liver cancer patient: a case report and literature review [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(12): 20510-5.

[10] Hufnagl A, Herr L, Friedrich T, et al. The link between cell-cycle dependent radiosensitivity and repair pathways: a model based on the local, sister-chromatid conformation dependent switch between NHEJ and HR [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2015, 27: 28-39.

[11] Plastaras J P, Kim S H, Liu Y Y, et al. Cell cycle dependent and schedule-dependent antitumor effects of sorafenib combined with radiation [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(19): 9443-54.

[12] Liu L, Qin S, Zheng Y, et al. Molecular targeting of VEGF/VEGFR signaling by the anti-VEGF monoclonal antibody BD0801 inhibits the growth and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Biol Ther*, 2017, 18(3): 166-76.

[13] Momeny M, Sabourinejad Z, Zarrinrad G, et al. Anti-tumour activity of tivozanib, a pan-inhibitor of VEGF receptors, in therapy-resistant ovarian carcinoma cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 45954.

[14] Li P, Zhang Q, Torossian A, et al. Simultaneous inhibition of EGFR and PI3K enhances radiosensitivity in human breast cancer [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2012, 83(3): e391-7.

[15] Sato Y, Ebara T, Sunaga N, et al. Interaction of radiation and gefitinib on a human lung cancer cell line with mutant EGFR gene *in vitro* [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(11): 4877-81.

局灶性脑缺血再灌注损伤对小鼠脑组织平滑肌细胞 α -SMA 表达的影响

陈二峰, 谈启松, 马春春, 卞尔保, 赵兵

摘要 **目的** 探讨局灶性脑缺血再灌注损伤对小鼠脑组织平滑肌细胞 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达的影响。**方法** 采用 C57BL/6 小鼠模型,通过右侧大脑栓塞缺血方法建立局灶性脑缺血再灌注小鼠模型,使用 qRT-PCR、Western blot 及免疫组织化学等方法,对比观察脑缺血再灌注组小鼠脑缺血 2 h 再灌注 24 h(实验组)和假手术组及空白对照组大脑组织平滑肌细胞 α -SMA 的表达情况。**结果** 氯化三苯四氮唑(TTC)染色结果显示实验组小鼠脑梗死面积明显大于假手术组和空白对照组,实验组小鼠脑水肿明显。Western blot 及 qRT-PCR 结果显示局灶性脑缺血再灌注小鼠脑缺血 2 h 再灌注 24 h 后脑 α -SMA 的表达明显高于假手术组和空白对照组($P < 0.05$)。**结论** 局灶性脑缺血再灌注损伤能刺激小鼠脑组织平滑肌细胞 α -SMA 的表达。小鼠脑缺血 2 h 再灌注 24 h 后脑 α -SMA 的表达明显高于假手术组和空白对照组。

关键词 小鼠; MCAO 模型; 缺血再灌注损伤; α -平滑肌肌动

蛋白; 平滑肌细胞

中图分类号 R 743

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)01-0058-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.01.013

α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)是平滑肌最常用的标志物,对平滑肌有较高的特异性,敏感性也比较高。其主要功能包括:构成细胞支架,维持细胞形状;参与细胞及细胞内细胞质的运动;介导细胞内信号传递及参与蛋白质的合成等,并与胞内细胞器功能相关^[1]。可见, α -SMA 是血管平滑肌细胞中重要的功能蛋白,其表达的变化对于提示血管平滑肌细胞结构和功能的改变意义重大。已有文献^[2-5]报道各种致病因素导致的肾损伤、肝损伤、肺损伤、心肌损伤等组织损伤后 α -SMA 表达变化,但尚缺乏对脑损伤中平滑肌细胞 α -SMA 表达变化的研究。该研究通过对小鼠行右侧大脑栓塞的方法制备小鼠局灶性脑缺血再灌注模型,通过免疫组织化学、Western blot 及 qRT-PCR 等方法对比研究小鼠脑缺血 2 h 再灌注 24 h 后的小鼠(实验组)与假手术组和空白对照组的脑组织平滑肌细胞

2017-10-13 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:160805MH225)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院神经外科,合肥 230601

作者简介:陈二峰,男,硕士研究生;

赵兵,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: zhaopumcmd@yeah.net

Influence of apatinib combined radiotherapy on HeLa cell cycle and apoptosis *in vitro*

Liu Wei, Zhang Jianwen

(Dept of Oncology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000)

Abstract **Objective** To observe the effect of apatinib (APA) combined with radiotherapy on cell cycle and apoptosis of cervical cancer HeLa cells *in vitro*. **Methods** HeLa cells in logarithmic growth phase were divided into control group, drug group, radiotherapy group and joint group. Cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry, and the changes of HeLa cell cycle and apoptosis after radiotherapy were analyzed. **Results** Retardant of G0/G1 phase for joint group was obviously higher than control and radiotherapy group($P < 0.05$). S phase percentage of joint group was minimum when compared with control group($P < 0.05$), while there was no significant difference when compared with radiotherapy group. Apoptosis rate of joint group was higher than control group and drug group($P < 0.05$). **Conclusion** APA combined with radiotherapy shows significant G0/G1 phase cell cycle arrest, but no significant induction of apoptosis.

Key words apatinib; radiotherapy; cell cycle/apoptosis; cervical cancer/HeLa cell