

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.01.007

· 基础研究 ·

## 低氧下三氧化二砷对食管癌 Eca109 细胞放射敏感性的影响

景绍武<sup>1</sup>, 王雅棣<sup>2</sup>, 王军<sup>1</sup>, 孙国贵<sup>3</sup>, 刘青<sup>1</sup>, 程云杰<sup>1</sup>, 杨从容<sup>1</sup>(1. 河北医科大学第四医院 放疗科, 河北 石家庄 050011; 2. 北京军区总医院 放疗科, 北京 100700; 3. 河北联合大学附属人民医院 放化疗科, 河北 唐山 063000)

**[摘要]** **目的:** 观察三氧化二砷( $As_2O_3$ )在低氧条件下对食管癌 Eca109 细胞增殖、细胞周期及凋亡的影响, 探讨其发挥放射增敏作用的可能机制。 **方法:**  $CoCl_2$  处理模拟肿瘤细胞模拟低氧微环境, MTT 法分别检测常氧和低氧条件下不同浓度  $As_2O_3$  及不同剂量放射线对食管癌 Eca109 细胞增殖的抑制作用, 流式细胞术检测低氧下  $As_2O_3$ 、放射线单独及两者联合对细胞周期及凋亡的影响, Western blotting 检测经  $As_2O_3$ 、放射线单独及两者联合作用后 Eca109 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、p27 蛋白的表达情况。 **结果:** 在常氧和低氧两种条件下,  $As_2O_3$  均呈时间和剂量依赖方式抑制 Eca109 细胞增殖, 相同时间和相同剂量条件下, 其抑制水平相当 ( $P > 0.05$ ); 而低氧下放射线对 Eca109 细胞增殖的抑制作用较常氧下明显减弱 ( $P < 0.05$ )。低氧下 Eca109 细胞周期出现  $G_0/G_1$  期阻滞、 $G_2/M$  期细胞比例明显减少 ( $P < 0.05$ ),  $As_2O_3$  在低氧条件下可诱导  $G_2/M$  期阻滞、 $G_0/G_1$  期细胞比例减少。  $As_2O_3$  与放射线联合作用时, Eca109 细胞的凋亡率大于两者单独作用之和。低氧条件下, Eca109 细胞 HIF-1 $\alpha$ 、p27 蛋白表达均明显增强,  $As_2O_3$  可逆转 HIF-1 $\alpha$ 、p27 表达水平的升高。 **结论:** 低氧条件下,  $As_2O_3$  对食管癌 Eca109 细胞有放射增敏作用, 其机制可能与下调 HIF-1 $\alpha$  进而降低 p27 表达水平、解除  $G_0/G_1$  期细胞周期阻滞和促进细胞凋亡有关。

**[关键词]** 低氧; 三氧化二砷; 食管肿瘤; Eca109 细胞; 细胞周期; 放射敏感性

**[中图分类号]** R735.1; R730.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2015)01-0041-06

## Effect of arsenic trioxide on radiosensitivity of esophageal carcinoma Eca109 cells under hypoxia

Jing Shaowu<sup>1</sup>, Wang Yadi<sup>2</sup>, Wang Jun<sup>1</sup>, Sun Guogui<sup>3</sup>, Liu Qing<sup>1</sup>, Cheng Yunjie<sup>1</sup>, Yang Congrong<sup>1</sup>(1. Department of Radiotherapy, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Department of Radiotherapy, Military General Hospital of Beijing Military Region, Beijing 100700, China; 3. Department of Chemoradiotherapy, People's Hospital of Hebei Union University, Tangshan 063000, Hebei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of arsenic trioxide ( $As_2O_3$ ) on proliferation, cycle progression, apoptosis and radio-sensitivity of esophageal carcinoma cells under hypoxia. **Methods:** Human esophageal carcinoma Eca109 cells were treated with different concentrations of  $As_2O_3$  or doses of radiation under a hypoxic condition mimicked cobalt chloride ( $CoCl_2$ ). At different time points after treatment, cell viability was determined by MTT assay, cell cycle progression and apoptosis by flow cytometry (FCM), and expression of HIF-1 $\alpha$  and p27 at the protein level by Western blotting. **Results:** In time- and dose-dependent manners,  $As_2O_3$  inhibited Eca109 cell proliferation similarly under both normoxic and hypoxic conditions ( $P > 0.05$ ). However, radiation-mediated inhibition of Eca109 cell proliferation was significantly less strong under hypoxia than under normoxia ( $P < 0.05$ ). Compared with normoxia, hypoxia increased cell cycle arrest at the  $G_0/G_1$  phase and decreased the proportion of cells at the  $G_2/M$  phase ( $P < 0.05$ ).  $As_2O_3$  induced cell cycle arrest at the  $G_2/M$  phase and reduced the proportion of cells at the  $G_0/G_1$  phase under hypoxia. The combination of  $As_2O_3$  and irradiation resulted in more significant apoptosis in Eca109 cells as compared with the use of  $As_2O_3$  and irradiation each alone ( $P < 0.05$ ). Under hypoxia, HIF-1 $\alpha$  and p27 protein contents were significantly increased as compared with normoxia ( $P < 0.05$ ), but the increase was significantly attenuated by  $As_2O_3$  ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** Under hypoxia,

**[基金项目]** 高等院校博士学科点专项科研基金资助(No. 20091323110011)。Project supported by the Specialized Research Foundation of the Doctoral Program of Higher Schools (No. 20091323110011)

**[作者简介]** 景绍武(1982-),男,河北省石家庄市人,博士,主治医师,主要从事胸部恶性肿瘤的综合治疗, E-mail: jsw20062132@163.com

**[通信作者]** 王军(Wang Jun, corresponding author), E-mail: wangjun90@aliyun.com

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> may increase the sensitivity esophageal carcinoma cells to radiation, possibly through down-regulating the expression of HIF-1 $\alpha$  and its down-stream target p27, thus releasing G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase arrest and inducing G<sub>2</sub>/M phase arrest.

[ **Key words** ] hypoxia; As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; esophageal carcinoma; Eca109 cell; cell cycle; radiosensitivity

[ Chin J Cancer Biother, 2015, 22(1): 41-46 ]

当肿瘤体积大于 1 mm<sup>3</sup> 时, 自身的血液供应就不能满足肿瘤细胞快速生长的需要, 肿瘤内部处在相对低氧的环境中<sup>[1]</sup>。低氧时, 肿瘤细胞作出应激反应, 许多基因的转录和表达发生适应性改变<sup>[2]</sup>。低氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 是低氧状态下存在于人体内的一种异源二聚体核转录因子, 由  $\alpha$  和  $\beta$  两个亚单位组成, 其中 HIF-1 $\alpha$  是唯一的氧调节亚单位。作为调节肿瘤细胞适应低氧的核心转录因子, HIF-1 $\alpha$  参与多种基因的转录调控, 在肿瘤一系列生物学行为的改变包括对放射治疗抗拒等方面发挥着重要作用<sup>[3]</sup>。

我国是食管癌高发国家, 多数食管癌患者确诊时已属晚期而失去手术机会, 放射治疗是其有效治疗方式之一<sup>[4]</sup>。但由于 HIF-1 $\alpha$  的过表达及其对其下游因子的调控等不利因素的存在, 严重影响食管癌的放疗疗效<sup>[5]</sup>。前期研究<sup>[6]</sup>表明, 通过 RNA 干扰技术下调 HIF-1 $\alpha$  表达可显著降低食管癌的生长及侵袭转移能力。已有研究<sup>[7]</sup>发现, 三氧化二砷 (arsenic trioxide, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 在低氧下可下调 HIF-1 $\alpha$  表达, 抑制肿瘤细胞增殖及促进凋亡, 其作用较常氧下并无减弱<sup>[8]</sup>。As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 在低氧下对食管癌有无放疗增敏作用目前还未见报道。为此, 本实验以化学低氧剂 CoCl<sub>2</sub> 处理肿瘤细胞模拟肿瘤低氧微环境, 检测 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 和放射线在低氧下对食管癌 Eca109 细胞增殖、细胞周期及凋亡的影响, 并进一步探讨其放射增敏机制, 为 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 在食管癌的临床应用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株和主要试剂

人食管癌细胞株 Eca109 由我院科研中心提供。As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (1 mg/ml) 购自哈尔滨伊达药业公司, RPMI 1640 粉购自 Gibco BRL 公司, 小牛血清购自杭州四季青公司, 兔抗人 HIF-1 $\alpha$  单克隆抗体及兔抗人 p27 单克隆抗体购自 Epitomics 公司。

### 1.2 人食管癌 Eca109 细胞的培养与放射线照射

常规培养: 取对数生长期的人食管癌细胞株 Eca109 常规培养于含 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素和 100  $\mu$ g/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液中, 置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。

低氧培养: 在常氧培养待细胞贴壁后, 加入化学

低氧剂 CoCl<sub>2</sub>, 使其终浓度为 150  $\mu$ mol/L, 用于模拟肿瘤组织内低氧微环境<sup>[9]</sup>。

细胞照射: 制备单细胞悬液, 待细胞贴壁后, 采用直线加速器 6 MV X 线室温下单次照射, 剂量率 200 cGy/min, 面积 20 cm  $\times$  20 cm, 源轴距 100 cm, 机架角 180 $^{\circ}$ 。

### 1.3 MTT 法检测 Eca109 细胞的增殖

实验分 6 组: ① As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 常氧组, 将 5  $\times$  10<sup>3</sup> 个细胞接种于 96 孔板, 待细胞融合至 70% ~ 80% 时加入 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 终浓度分别为 0.5、1.0、2.0、4.0  $\mu$ mol/L, 培养 24、48 h 进行检测; ② As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 低氧组, 低氧培养 24 h 后, 给予 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 处理, 同①; ③ 照射-常氧组, 待 96 孔板中细胞融合至 70% ~ 80% 时, 以剂量分别为 2、4、8 Gy 的放射线照射, 培养 24、48 h; ④ 照射-低氧组, 低氧培养 24 h 后, 给予放射线照射, 同③; ⑤ 对照-常氧组, 细胞在常氧下正常生长; ⑥ 对照-低氧组, 低氧培养, 无其他干预。每组均 6 个复孔。以上 6 组在检测前 4 h, 各加入 20  $\mu$ l MTT (5 mg/ml), 培养 4 h 后弃掉培养液, 加入 150  $\mu$ l 二甲基亚砷, 震荡 10 min 后上酶标仪检测, 在 492 nm 波长下测定各孔光密度 (*D*) 值。细胞抑制率 (%) = (1 - 实验组 *D* 值 / 对照组 *D* 值)  $\times$  100%。实验重复 3 次。

### 1.4 流式细胞术检测 Eca109 细胞周期

实验分 5 组: ① 常氧 - 对照组; ② 低氧 - 对照组; ③ As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组, 低氧预处理 24 h, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 浓度选择 2.0  $\mu$ mol/L, 继续培养 24 h; ④ 照射组, 低氧预处理 24 h, 放射线剂量选择 4 Gy, 继续培养 24 h; ⑤ As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + 照射组, 低氧预处理 24 h, 加入 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 2 h 后照射细胞, 继续培养 24 h。各组细胞在 -20 $^{\circ}$ C 条件下用乙醇固定 24 h 以上, 离心弃上清液后, 加入 200  $\mu$ l 碘化丙啶 (PI) 混合液 (含 100 mg/L 的 PI 和 500 mg/L 的 RNase 酶), 室温下避光培养 30 min 后检测。

### 1.5 流式细胞术检测 Eca109 细胞凋亡

分组同 1.4。将各组细胞消化后离心, 用预冷的 PBS 液洗涤 2 次, 用 300 目滤膜过滤细胞后, 取 100  $\mu$ l 细胞悬液, 加 5  $\mu$ l Annexin V、2.5  $\mu$ l PI 溶液, 混匀后冰浴下暗盒内培养 10 min, 加 150  $\mu$ l 缓冲液后进行检测。

### 1.6 Western blotting 检测 Eca109 细胞 HIF-1 $\alpha$ 、p27 蛋白的表达

分组同 1.4。各组细胞加入适量的细胞裂解液

收集细胞总蛋白,按照考马斯亮蓝试剂盒使用说明进行蛋白浓度检测。每孔加入 60  $\mu\text{g}$  蛋白,10  $\mu\text{l}$  4  $\times$  上样缓冲液后煮沸 5 min,用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白,然后通过转膜将蛋白转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入 HIF-1 $\alpha$  一抗(1:200 稀释)、p27 一抗(1:200 稀释)和鼠抗人 GAPDH(1:300 稀释),4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,分别加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 或羊抗鼠 IgG(1:500 稀释),37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。采用 ECL 检测,Gel pro4.0 凝胶成像系统分析条带灰度值,以目的条带与 GAPDH 条带的比值代表目的蛋白的相对表达水平。

### 1.7 统计学处理

采用 SPSS 11.5 统计软件,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 常氧和低氧条件下 $\text{As}_2\text{O}_3$ 及放射线对 Eca109 细胞增殖的抑制作用

MTT 法检测结果(表 1)显示,不同浓度的  $\text{As}_2\text{O}_3$  在常氧和低氧两种条件下,均呈时间和浓度

依赖方式抑制 Eca109 细胞的增殖,随着时间的延长或浓度的增加,抑制率不断升高( $P < 0.05$ )。相同作用时间、相同浓度下,抑制率在常氧和低氧条件下的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。不同剂量放射线在常氧条件下呈时间和剂量依赖方式抑制 Eca109 细胞的增殖。但在低氧条件下,2 Gy 的放射线在低氧处理 48 h 后对 Eca109 细胞的增殖抑制率反较 24 h 时降低,出现加速增殖。相同作用时间、相同照射剂量,低氧下条件下的 Eca109 细胞的抑制率明显低于常氧( $P < 0.05$ )。

### 2.2 低氧条件下 $\text{As}_2\text{O}_3$ 、放射线及两者联合对 Eca109 细胞周期的影响

流式细胞术检测结果(表 2)显示,低氧-对照组细胞周期出现了明显的  $G_0/G_1$  期阻滞, $G_0/G_1$  期细胞比例明显升高,而  $G_2/M$  期降低,与常氧-对照组的差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与低氧-对照组相比, $\text{As}_2\text{O}_3$  组细胞  $G_0/G_1$  期比例降低, $G_2/M$  期又复升高,S 期无明显变化,其细胞周期分布与常氧-对照组近似。照射组细胞周期分布与低氧-对照组相近。 $\text{As}_2\text{O}_3$  + 照射组细胞  $G_2/M$  期阻滞最明显,所占比例达到(37.5  $\pm$  3.5)%。

表 1 常氧或低氧条件下  $\text{As}_2\text{O}_3$  及放射线对 Eca109 细胞增殖的抑制作用( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Tab. 1 Inhibitory effect of  $\text{As}_2\text{O}_3$  and radiation on Eca109 under normoxia or hypoxia( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Group	Inhibitory rate at 24 h		Inhibitory rate at 48 h	
	Normoxia	Hypoxia	Normoxia	Hypoxia
Control				
$\text{As}_2\text{O}_3$ ( $c_B/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )				
0.5	1.31 $\pm$ 0.24	1.58 $\pm$ 0.20	1.26 $\pm$ 0.17	1.62 $\pm$ 0.25
1.0	4.05 $\pm$ 0.33	5.12 $\pm$ 0.29	7.52 $\pm$ 0.42*	9.38 $\pm$ 0.77*
2.0	6.36 $\pm$ 0.54 $\Delta$	7.55 $\pm$ 1.04 $\Delta$	11.73 $\pm$ 0.85* $\Delta$	13.92 $\pm$ 1.43* $\Delta$
4.0	10.26 $\pm$ 1.71 $\Delta$	13.11 $\pm$ 1.62 $\Delta$	24.64 $\pm$ 2.15* $\Delta$	20.57 $\pm$ 2.18* $\Delta$
8.0	17.25 $\pm$ 1.23 $\Delta$	18.72 $\pm$ 2.24 $\Delta$	31.88 $\pm$ 2.07* $\Delta$	34.15 $\pm$ 2.58* $\Delta$
Radiation (D/Gy)				
2	3.79 $\pm$ 0.26	2.10 $\pm$ 0.21 $\blacktriangle$	5.65 $\pm$ 0.14*	1.83 $\pm$ 0.11 $\blacktriangle$
4	7.22 $\pm$ 0.85 $\Delta$	4.37 $\pm$ 0.51 $\Delta\blacktriangle$	16.96 $\pm$ 1.66* $\Delta$	8.79 $\pm$ 0.82* $\Delta\blacktriangle$
8	16.58 $\pm$ 0.49 $\Delta$	10.04 $\pm$ 1.32 $\Delta\blacktriangle$	33.13 $\pm$ 1.06* $\Delta$	18.55 $\pm$ 2.10* $\Delta\blacktriangle$

\*  $P < 0.05$  vs groups that at 24 h under the same condition;  $\Delta P < 0.05$  vs groups that prior concentration of  $\text{As}_2\text{O}_3$  or dose of radiation;  $\blacktriangle P < 0.05$  vs groups that with normoxia group under the same condition

### 2.3 低氧条件下 $\text{As}_2\text{O}_3$ 、放射线及两者联合对 Eca109 细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果(图 1)显示,低氧-对照组凋亡率与常氧-对照组相近; $\text{As}_2\text{O}_3$  在低氧下可诱导 Eca109 细胞凋亡,凋亡率为(5.79  $\pm$  0.44)%; $\text{As}_2\text{O}_3$

与放射线联合作用凋亡率增至(12.26  $\pm$  0.61)% ,大于两者单独作用之和。

### 2.4 低氧条件下 $\text{As}_2\text{O}_3$ 、放射线及两者联合对 Eca109 细胞 HIF-1 $\alpha$ 、p27 蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果(图 2)显示,常氧条

表 2 低氧下 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 与放射线单独或两者联合对 Eca109 细胞周期的影响(  $\bar{x} \pm s, \%$  )

Tab. 2 Effects of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> combined with radiation or single on Eca109 cell cycle under hypoxia (  $\bar{x} \pm s, \%$  )

Group	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
Normoxia-control	19.3 ± 2.1*	52.6 ± 3.6	28.1 ± 3.3*
Hypoxia-control	34.4 ± 2.5	51.7 ± 3.2	13.9 ± 1.8
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	23.9 ± 2.2*	49.7 ± 3.8	26.4 ± 1.9*
Radiation	33.3 ± 2.6	51.6 ± 4.3	15.1 ± 1.4
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + Radiation	23.2 ± 1.8*	39.3 ± 2.7*	37.5 ± 3.5*

\* P < 0.05 vs groups that in hypoxia-control group

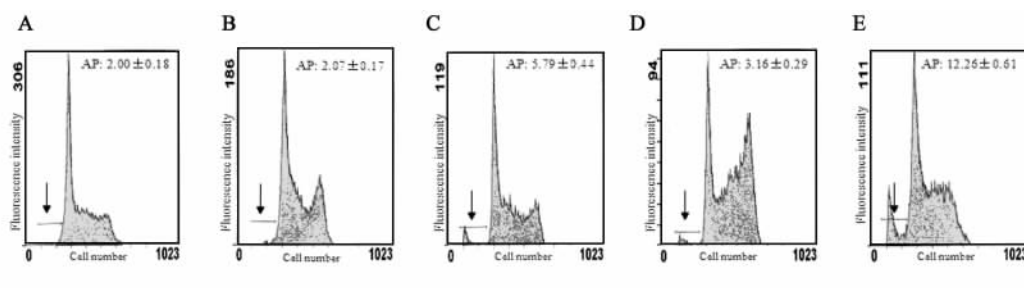


图 1 低氧下 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 与放射线单独或两者联合对 Eca109 细胞凋亡的影响(  $\bar{x} \pm s, \%$  )

Fig. 1 Effects of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> combined with radiation or single on Eca109 cell apoptosis under hypoxia (  $\bar{x} \pm s, \%$  )

A: Normoxia-control group; B: Hypoxia-control group; C: As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> group; D: Radiation group; E: As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + Radiation group

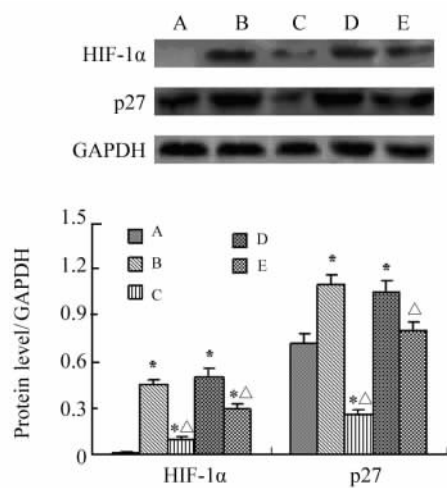


图 2 缺氧条件下 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 与放射线单独或两者联合对 Eca109 细胞中 HIF-1α、p27 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> combined with radiation or single on expression of HIF-1α, p27 proteins in Eca109 cells under hypoxia

A: Normoxia-control group; B: Hypoxia-control group;

C: As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> group; D: Radiation group;

E: As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + Radiation group. \* P < 0.05 vs A( normoxia-

control )group; Δ P < 0.05 vs B( hypoxia-control )group

件下, HIF-1α 蛋白表达极其微弱, 而在低氧-对照组中表达迅速增加( P < 0.05 )。低氧条件下, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组及 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + 照射组中 HIF-1α 表达水平又复降低, 而 HIF-1α 表达水平在照射组与低氧-对照组中相近, 差异无统计学意义( P > 0.05 )。p27 蛋白在常氧-对照组中即有表达, 低氧处理后表达明显增加( P < 0.05 )。p27 蛋白在 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + 照射组中较低氧-对照组明显降低( P < 0.05 ), 而在照射组与低氧-对照组差异无统计学意义( P > 0.05 )。经相关性分析, Eca109 细胞 HIF-1α 与 p27 蛋白表达呈正相关( r = 0.825, P < 0.05 )。

### 3 讨论

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 是中药砒霜的主要成分, 在急性早幼粒细胞白血病的治疗上取得了非常好的效果。近年来研究<sup>[10-11]</sup>表明, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对宫颈癌、肺癌等实体瘤也有明显的抑制作用。低氧是多种实体性肿瘤包括食管癌在内的共同特征, 是恶性肿瘤治疗特别是放射治疗的不利因素。目前有关 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 在低氧下对食管癌细胞的作用及放疗增敏方面的研究很少见。

本研究首先在常氧和低氧两种条件下观察了不同浓度 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 及不同剂量放射线对 Eca109 细胞增殖的影响。MTT 结果显示: 在常氧和低氧两种条件

下,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 均呈剂量和时间依赖性地抑制 Eca109 细胞增殖,抑制率在常氧和低氧下差异无统计学意义。而放射线在低氧下对 Eca109 细胞增殖的抑制作用明显减弱。说明低氧可降低放射线对肿瘤细胞的抑制作用,而对 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用的发挥无影响。

肿瘤放射敏感性与其所处的细胞周期时相密切相关,G<sub>2</sub>/M 期显著高于 S 期和 G<sub>0</sub> 期<sup>[12]</sup>。因此,促使肿瘤 G<sub>0</sub> 与 S 期细胞进入并停留在 G<sub>2</sub>/M 期,是提高肿瘤放射敏感性的一个重要途径。本研究前期实验已经证实,常氧下 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 通过诱导细胞 G<sub>2</sub>/M 期阻滞来实现其放射增敏作用<sup>[13]</sup>,那么在低氧下作用又如何呢? 本实验采用流式细胞术检测了低氧条件下 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、放射线及两者联合对食管癌 Eca109 细胞周期的影响,发现 Eca109 细胞在低氧-对照组中 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例较常氧-对照组明显减少,而 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期明显增加,提示低氧通过影响 G<sub>2</sub>/M 期阻滞降低了食管癌 Eca109 细胞的放射敏感性,与陈延治等<sup>[14]</sup>的结论相符。但低氧下经 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用后,G<sub>2</sub>/M 期细胞比例又复增加,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期减少,细胞周期分布与常氧-对照组近似,证实低氧的存在不影响 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 发挥对 Eca109 细胞 G<sub>2</sub>/M 期阻滞的作用。G<sub>2</sub>/M 期阻滞在 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + 照射组中最为明显,G<sub>2</sub>/M 期细胞比例达到(37.5 ± 3.5)%,提示低氧下 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 也能诱导食管癌 Eca109 细胞发生 G<sub>2</sub>/M 期阻滞。

在放射肿瘤学领域,凋亡被认为是一项重要的放射敏感性指标,检测照射后凋亡率可间接反映放射敏感性,凋亡发生率越高,即认为该肿瘤的放射敏感性越高。本研究通过流式细胞术检测了低氧下 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、放射线及两者联合对食管癌 Eca109 细胞凋亡的影响,结果显示,低氧条件下 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 可诱导 Eca109 细胞凋亡,与放射线联合应用,其凋亡率大于两者单独作用之和。以上结果提示,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 在低氧条件下可通过诱导 G<sub>2</sub>/M 期阻滞来提高食管癌 Eca109 细胞的放射敏感性,与 Yih 等<sup>[15]</sup>在宫颈癌研究中的结论一致。低氧可促进 HIF-1 $\alpha$  高表达,而 HIF-1 $\alpha$  是低氧诱导细胞周期阻滞的必须元件<sup>[16]</sup>。细胞周期素(cyclins)依赖性激酶抑制蛋白(cyclin dependent kinase inhibitors, CKIs)p27 可广泛抑制各种细胞周期蛋白(cyclin-dependent kinases, CDKs)和 CDKs 的活性,使细胞不能通过 G<sub>1</sub>/S 期转换关键点,对细胞周期进行负调控<sup>[17]</sup>。有报道<sup>[18]</sup>认为,HIF-1 $\alpha$  在低氧环境中通过 p27 引起 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 阻滞,但 p27 本身无低氧反应元件,其调节可能与 HIF-1 $\beta$  的活动有关<sup>[17]</sup>。本研究首次检测了 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、放射线对 HIF-1 $\alpha$  及 p27 蛋白表达的影响,结果显示,低氧条

件下,Eca109 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、p27 表达明显增强,而经 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用后,HIF-1 $\alpha$ 、p27 表达又复降低,HIF-1 $\alpha$  与 p27 呈正相关。而放射线对 HIF-1 $\alpha$ 、p27 的表达无影响。综上所述,低氧条件下,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 有可能通过下调 HIF-1 $\alpha$  而降低 p27 表达水平,从而解除 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期阻滞,诱导 G<sub>2</sub>/M 期阻滞,以此来发挥对食管癌 Eca109 细胞的放射增敏作用。

细胞周期是由三类因子进行精密调节的,它们分别是 Cyclins、CDKs 和 CKIs<sup>[19]</sup>。除 p27 外可能还有其他一些基因参与 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 在低氧下的作用过程,具体到不同的肿瘤,作用机制可能也不同,还需要进一步深入研究。目前,如何改善低氧及调控细胞周期以增加放射敏感性已成为一个研究热点。此外,体外实验毕竟不同于体内,为此,下一步拟通过建立移植瘤动物模型,检测以上结论在动物体内是否也成立,为临床应用提供进一步的实验依据。

## [参考文献]

- [1] Dewhirst MW, Cao Y, Moeller B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(6): 425-437.
- [2] Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(10): 721-732.
- [3] Ellis L, Hammers H, Pili R. Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors [J]. *Cancer Lett*, 2009, 280(2): 145-153.
- [4] Daly JM, Fry WA, Little AG, et al. Esophageal cancer: Results of an American college of surgeons patient care evaluation study [J]. *J Am Coll Surg*, 2000, 190(5): 562-573.
- [5] 张洪珍, 祝淑钗, 段昕波, 等. 食管鳞癌组织中 HIF-1 $\alpha$  和 survivin 的表达及其对放射治疗预后的影响 [J]. *肿瘤*, 2007, 27(2): 139-141.
- [6] Jing SW, Wang YD, Chen LQ, et al. Hypoxia suppresses E-cadherin and enhances matrix metalloproteinase-2 expression favoring esophageal carcinoma migration and invasion via hypoxia inducible factor-1 alpha activation [J]. *Dis Esophagus*, 2013, 26(1): 75-83.
- [7] Yan H, Peng ZG, Wu YL, et al. Hypoxia-simulating agents and selective stimulation of arsenic trioxide-induced growth arrest and cell differentiation in acute promyelocytic leukemic cells [J]. *Haematologica*, 2005, 90(12): 1607-1616.
- [8] 曲歌平, 李兵, 修清玉, 等. 低氧条件下三氧化二砷对人肺腺癌 A549 细胞增殖的影响 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(3): 273-277.
- [9] 吴强, 杨述华, 叶树楠, 等. RNA 干扰沉默缺氧诱导因子-1 $\alpha$  治疗骨肉瘤的实验研究 [J]. *中华医学杂志*, 2005, 85(6): 409-413.
- [10] Wang H, Gao P, Zheng J. Arsenic trioxide inhibits cell proliferation and human papillomavirus oncogene expression in cervical cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 451(4):

- 556-561.
- [ 11 ] Yang MH, Zang YS, Huang H, et al. Arsenic trioxide exerts anti-lung cancer activity by inhibiting angiogenesis [ J ]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2014, 14( 6 ): 557-566.
- [ 12 ] Vital-Reyes V, Rodriguez-Burford C, Chhieng DC, et al. Celecoxib inhibits cellular growth, decreases Ki-67 expression and modifies apoptosis in ovarian cancer cell lines [ J ]. *Arch Med Res*, 2006, 37( 6 ): 689-695.
- [ 13 ] 景绍武, 王雅棣, 吴凤鹏, 等. 三氧化二砷对食管癌细胞株 Eca109 的放射增敏作用及机制 [ J ]. *肿瘤防治研究*, 2011, 38( 6 ): 620-623.
- [ 14 ] 陈延治, 李建军, 顾菲, 等. 缺氧对肝癌 BEL7402 细胞周期及放射敏感性的影响 [ J ]. *中华肿瘤防治杂志*, 2006, 13( 10 ): 737-739.
- [ 15 ] Yih LH, Hsueh SW, Luu WS, et al. Arsenite induces prominent mitotic arrest via inhibition of G2 checkpoint activation in CGL-2 cells [ J ]. *Carcinogenesis*, 2005, 26( 1 ): 53-63.
- [ 16 ] Goda N, Ryam HE, Khadivi B, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia [ J ]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23( 1 ): 359-369.
- [ 17 ] Wang G, Reisdorph R, Clark RE Jr, et al. Cyclin dependent kinase inhibitor p27 ( Kip1 ) is upregulated by hypoxia via an ARNT dependent pathway [ J ]. *J Cell Biochem*, 2003, 90( 3 ): 548-560.
- [ 18 ] Green SL, Freiberg RA, Giaccia AJ. p21 ( Cip1 ) and p27 ( Kip1 ) regulate cell cycle reentry after hypoxic stress but are not necessary for hypoxia-induced arrest [ J ]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21( 4 ): 1196-1206.
- [ 19 ] Hermeking H, Benzinger A. 14-3-3 proteins in cell cycle regulation [ J ]. *Semin Cancer Biol*, 2006, 16( 3 ): 183-192.
- [ 收稿日期 ] 2014 - 10 - 22 [ 修回日期 ] 2014 - 12 - 28
- [ 本文编辑 ] 阮芳铭

## · 科技动态 ·

## 干扰素下游分子 25-羟基胆固醇抑制 IL-1 诱导产生的炎症

美国加州大学圣弗朗西斯科分校的微生物与免疫学系的 Jason 教授和他的研究团队发现, 干扰素( interferon, IFN )诱导基因 25-胆固醇羟化酶( cholesterol 25-hydroxylase, Ch25h )通过代谢产生的 25 羟基胆固醇( oxysterol 25-hydroxycholesterol, 25HC )负向调节 IL-1 诱导发生的炎症反应, 该研究成果发表在 2014 年 8 月 8 日的 *Science* 杂志上。

IFN 在抗病毒反应中发挥着重要的作用, 并且越来越多的研究表明 IFN 具有抑制免疫应答过度活化的功能, 临床上 IFN 也可以应用于治疗一些自身免疫性疾病, 如多发性硬化( multiple sclerosis, MS )等。而 IFN 调节炎症反映的具体机制需要进一步研究。

Jason 教授的研究团队发现, Ch25h 基因敲除( Ch25<sup>h-/-</sup> )小鼠脾脏和淋巴结中的天然免疫的 T 细胞和 CD4<sup>+</sup> T 细胞分泌 IL-17A 的比例显著高于野生型小鼠。进一步用 LPS 处理过的 Ch25<sup>h-/-</sup> 小鼠和野生型小鼠的骨髓来源巨噬细胞( bone marrow-derived macrophage, BMDM )上清分别刺激 CD4<sup>+</sup> T 细胞, 发现 Ch25h 缺陷的 BMDM 上清能够诱导 CD4<sup>+</sup> T 细胞分泌更多的 IL-17, 提示 Ch25h 缺陷的 BMDM 在 LPS 刺激下, 细胞分泌的某种成份发生了改变从而促进 T 细胞分泌 IL-17。而诱导 CD4<sup>+</sup> T 细胞分泌 IL-17 的细胞因子有 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-23, 研究人员通过定量 PCR 分析发现, Ch25h 缺陷的巨噬细胞 IL-1 $\beta$  的 mRNA 水平较野生型显著上调, 从而确定 Ch25h 是通过影响 IL-1 $\beta$  的表达而抑制 IL-17 的分泌。

深入研究发现, LPS 是通过 IFN 信号依赖的方式诱导 BMDM 中 Ch25h 表达上调进而催化胆固醇发生氧化反应生成 25HC, 从而抑制了 IL-1 $\beta$  的表达以及炎性复合体的活化。

研究进一步揭示了 Ch25h 抑制过度炎症反应的分子机制。LPS 刺激 Ch25<sup>h-/-</sup> 小鼠和野生型小鼠 BMDM, 通过 RNA-seq 技术分析基因的表达谱差异发现, LPS 处理 Ch25<sup>h-/-</sup> 缺陷的巨噬细胞中, 有大量的固醇调节元件结合蛋白( sterol regulatory element binding protein, SREBP )下游基因表达上调。SREBP 是一种膜结合的转录因子, 当胞内固醇类含量降低时, SREBP 转位到高尔基体中经过加工剪切后形成具有活性的转录因子, 诱导大量下游基因表达上调, 从而促进机体合成胆固醇。将 SREBP 沉默后, 在 LPS 刺激下细胞内 IL-1 $\beta$  和 caspase-1 表达上调, 提示 LPS 诱导 Ch25h 表达上调, 后者催化胆固醇形成 25HC, 继而通过诱导 SREBP 信号活化, 从而下调 IL-1 $\beta$  的表达和抑制炎性小体活化。

Jason 教授的研究揭示了 IFN 在抑制炎症反应的新机制, 当机体感染病毒后一方面通过 IFN 清除病毒的感染, 另一方面 IFN 通过下游信号分子 Ch25h 及其代谢产物 25HC 减弱机体的炎症反应, 使得机体更易于发生细菌的再次感染。同时揭示了代谢调节网络在炎性小体活化中的重要作用, 提示代谢与免疫应答之间的 crosstalk 对于免疫应答具有重要的调节作用。

[ 陈坤 摘译, 刘书逊 审阅. Andrea R, Dang EV, Jeffrey G, et al. *Science*, 2014, 345( 6197 ): 679-684. ]