

青蒿琥酯对人宫颈癌 HeLa 和 Siha 细胞辐照后 DNA 损伤水平的影响

周媛媛¹ 封阳¹ 张旭光² 朱巍¹ 倪倩影¹ 耿冲¹
陈光烈¹ 罗居东¹ 樊赛军¹ 曹建平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 (徐州市肿瘤医院 徐州 221002)

摘要 为研究青蒿琥酯联合照射对人宫颈癌 HeLa 和 Siha 细胞 DNA 损伤的影响, 取对数生长期细胞, 通过 MTT 比色法测定不同浓度青蒿琥酯作用 24 h 对 HeLa 和 Siha 细胞生长的抑制效应, 将细胞分为单纯照射组和联合治疗组, 每组分别给予 0、2、4、6 Gy 四个剂量的 ⁶⁰Co γ 射线照射, 应用单细胞凝胶电泳(SCGE)法检测青蒿琥酯对 HeLa 和 Siha 细胞照射后 DNA 损伤的影响。MTT 结果表明, 青蒿琥酯对宫颈癌 HeLa 和 Siha 细胞的生长抑制呈剂量依赖性。单细胞凝胶电泳法检测发现: 联合治疗组 HeLa 细胞经 0、2、4 和 6 Gy ⁶⁰Co γ 射线辐照后彗星细胞的尾部 DNA 百分数及 Olive 尾矩明显大于单纯照射组, 差别有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 Siha 细胞联合治疗组与单纯辐照组相比, 无明显差异。实验结果表明, 青蒿琥酯对 p53 突变型子宫颈癌 HeLa 细胞具有明显的放射增敏作用, 而对 p53 野生型子宫颈癌 Siha 细胞没有明显的放射增敏作用。

关键词 青蒿琥酯, 放射增敏, DNA 损伤, 宫颈癌 HeLa 细胞

中图分类号 Q691, R114, R737

宫颈癌是全世界妇女中最常见的恶性肿瘤之一, 中国每年约有 13.5 万宫颈癌新发病例, 死亡率占中国女性癌症的第 2 位。放射治疗是宫颈癌治疗的重要手段之一, 但放疗后的复发率高达 40%, 因此有必要寻找高效低毒的放射增敏剂。青蒿素是从菊科植物黄花蒿中提取的有效抗疟成分, 为我国传统抗疟药, 其衍生物有青蒿琥酯、二氢青蒿素、蒿甲醚和蒿乙醚等。近年来, 国内外研究表明, 青蒿素及其衍生物具有抗肿瘤作用^[1,2]及放射增敏作用^[3], 本课题组^[4,5]也研究了青蒿素及其衍生物对多种肿瘤细胞的放射增敏作用, 本文采用人宫颈癌 HeLa 和 Siha 细胞株, 应用单细胞凝胶电泳法检测青蒿素衍生物之一青蒿琥酯对 HeLa 和 Siha 细胞辐照后 DNA 损伤水平的影响, 旨在进一步阐明青蒿琥酯的放射增敏机制。

1 实验材料和方法

1.1 细胞株、试剂和仪器

人宫颈癌 HeLa 和 Siha 细胞株购于中国科学院

上海细胞库; 青蒿琥酯购于美国 Sigma 公司; DMEM 培养基购于 Gibco 公司; 小牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司。倒置显微镜: Olympus 公司 CK40 型, 日本; 酶标仪: BIO-TEK 公司 Powerwave xs 型。

1.2 实验方法

1.2.1 电离辐射 于室温下, 在苏州大学辐照中心, 应用 GWXJ80 型 ⁶⁰Co 远距离治疗机 (剂量率为 0.635 Gy/min) 辐照细胞, 辐照剂量为 0、2、4 和 6 Gy。

1.2.2 细胞复苏及培养 从 -80℃ 冰箱中取出 HeLa 和 Siha 细胞冻存管, 立刻在 37—38℃ 温水中融化, 吸出细胞悬液, 加入 10 倍体积的 DMEM 培养基 (含 10% 新生牛血清和青、链霉素各 100 U/mL), 混合后 1000 r/min, 离心 3 min, 弃上清, 用上述 DMEM 培养基重复洗涤一次, 加入 5 mL 上述 DMEM 培养液, 于 37℃, 5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.2.3 MTT 法测青蒿琥酯对 HeLa 细胞的抑制效应 取浓度为 2×10^4 /mL 的 HeLa 和 Siha 细胞, 分别于

国家自然科学基金资助项目 (30670632) 和长江学者和创新团队发展计划 (IRT0849) 资助

第一作者: 周媛媛, 女, 1984 年 8 月出生, 2008 年毕业于苏州大学, 现为在读硕士研究生, 放射医学专业

通讯作者: 曹建平, Email: jpcap@suda.edu.cn

收稿日期: 初稿 2010-10-18, 修回 2010-11-08

对数生长期接种于 96 孔板上, 每孔加 200 μL 细胞悬液, 培养 24 h, 分别加入终浓度为 0、0.5、1、2、4、8、10、20、40 和 80 $\mu\text{g/mL}$ 的含药培养基, 各浓度点设置 5 个平行样, 继续培养 20 h, 每孔加 MTT 20 μL (5 mg/mL), 孵育 4 h 后弃上清, 每孔加入 100 μL DMSO 充分振荡 5 min, 用全自动酶标仪 (背景波长 570 nm, 参考波长 630 nm) 测定各孔吸光度值(A 值), 按公式计算细胞存活率。

细胞存活率(%)=实验组平均 A 值/对照组平均 A 值 $\times 100\%$ 。

1.2.4 单细胞凝胶电泳法检测 HeLa 和 Siha 细胞 DNA 损伤 按照 Singh^[6]报道方法, 并参照所在教研室建立的方法略作改进。取对数生长期的 HeLa 和 Siha 细胞, 分别以 $1\times 10^6/\text{mL}$ 浓度接种于 25 mL 细胞培养瓶中, 将细胞分为单纯照射组和联合治疗组, 两组细胞分别在室温下给予 0、2、4 和 6 Gy 四个剂量的 ^{60}Co γ 射线照射, 照后立即收集细胞, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取 57 $^{\circ}\text{C}$ 、0.6% 正常熔点琼脂糖 100 μL 滴于洁净的载玻片上, 立即盖上盖玻片, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min 待琼脂糖冷却变硬, 取下盖玻片, 取 10^4 个细胞与 100 μL 0.8% 的低熔点琼脂糖(LMA)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下混匀, 迅速滴在第一层琼脂糖上, 盖上盖玻片, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min 待 LMA 硬化, 取下盖玻片, 将载玻片立即浸入预冷的裂解液中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下裂解 90 min。取出载玻片, 蒸馏水洗 2 次, 放置在水平电泳槽中, 加入电泳液 (1 mmol/L Na_2EDTA , 300 mmol/L NaOH), 液面高出载玻片 0.25 cm, 解旋 20 min 后, 25 V、300 mA 电泳 30 min。电泳结束后, 取出载玻片置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 0.4 mol/L Tris(pH7.4)中洗涤 3 次, 每次 5 min, 再以 25 $\mu\text{g/mL}$ 的溴化乙锭(EB)20 μL 染色, 盖上盖玻片, 随机选择 100 个细胞用 CASP 彗星分析软件^[7] 在 200 倍下逐个分析, 计算各组细胞彗尾 DNA%和 Olive 尾矩。

1.2.5 统计学处理 采用 SAS 8.0 统计软件进行分析。所有计量资料均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间均数比较时先进行正态性检验和方差齐性检验, 如结果呈正态分布且方差齐, 则采用成组 t 检验; 如结果方差不齐, 则采用秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 青蒿琥酯对 HeLa 和 Siha 细胞的生长抑制效应

青蒿琥酯对 HeLa 和 Siha 细胞的生长抑制效应见表 1 和表 2。由表 1 和表 2 可见, HeLa 和 Siha

细胞分别经终浓度为 0、0.5、1、2、4、8、10、20、40 和 80 $\mu\text{g/mL}$ 的青蒿琥酯作用 24 h 后, 细胞的存活率随着药物浓度的增大而减小 ($P<0.01$)。当青蒿琥酯对 HeLa 和 Siha 细胞作用浓度分别为 2 $\mu\text{g/mL}$ 和 4 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对细胞生长的抑制作用较小, HeLa 细胞及 Siha 细胞存活率分别为 89.79%和 89.90%, 相同浓度的青蒿琥酯对 HeLa 和 Siha 细胞的抑制率不同, 对 HeLa 细胞的抑制作用强于 Siha 细胞。为了减小青蒿琥酯本身对细胞生长的抑制作用对增敏实验结果的影响, 消除药物本身对两种细胞抑制作用的差异性, 同时最大限度的增加对肿瘤细胞的放射增敏作用, 因此我们采用 2 $\mu\text{g/mL}$ 和 4 $\mu\text{g/mL}$ 药物浓度对 HeLa、Siha 细胞进行单细胞凝胶电泳实验的研究。

Table 1 The effect of artesunate additive on HeLa cell survival rate
($\bar{X}\pm s$, $n=5$)

Drug / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Absorbance /A	Cell survival rate / %
0	0.8110 $\pm$ 0.0243	100.00
0.5	0.7950 $\pm$ 0.0161	98.03
1	0.7854 $\pm$ 0.0172	96.84
2	0.7282 $\pm$ 0.0443	89.79 ^a
4	0.6924 $\pm$ 0.0285	85.38 ^a
8	0.6454 $\pm$ 0.0166	79.58 ^a
10	0.6122 $\pm$ 0.0461	75.49 ^a
20	0.5406 $\pm$ 0.0474	66.66 ^a
40	0.4400 $\pm$ 0.0303	54.25 ^a
80	0.2962 $\pm$ 0.0174	36.52 ^a

Note: Compared with control group, ^a $P<0.05$.

Table 2 The effect of artesunate additive on Siha cell survival rate
($\bar{X}\pm s$, $n=5$)

Drug / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Absorbance /A	Cell survival rate / %
0	0.5246 $\pm$ 0.0071	100.00
0.5	0.5054 $\pm$ 0.0111	96.34
1	0.4942 $\pm$ 0.0182	94.21
2	0.4822 $\pm$ 0.0235	91.92 ^a
4	0.4716 $\pm$ 0.0050	89.90 ^a
8	0.4538 $\pm$ 0.0243	86.50 ^a
10	0.4420 $\pm$ 0.0150	84.25 ^a
20	0.4296 $\pm$ 0.0281	81.89 ^a
40	0.4010 $\pm$ 0.0156	76.44 ^a
80	0.3002 $\pm$ 0.0065	59.40 ^a

Note: Compared with control group, ^a $P<0.05$.

2.2 青蒿琥酯联合不同剂量 ^{60}Co γ 射线对 HeLa 细胞 DNA 损伤的影响

青蒿琥酯联合不同剂量 ^{60}Co γ 射线对 HeLa 细

胞 DNA 损伤的影响见表 3。由表 3 可见照射后 HeLa 细胞彗星尾部 DNA%和 OTM 均随照射剂量增加而增加,表明 γ 射线对 HeLa 细胞 DNA 损伤随照射剂量增加而增加,且相同照射剂量下,联合治疗组

HeLa 细胞彗星尾部 DNA%和 OTM 均高于单纯照射组 ($P<0.05$),表明青蒿琥酯能明显加重 γ 射线对 HeLa 细胞 DNA 的损伤,具有放射增敏作用。

Table 3 The effect of artesunate combined with different doses irradiation on DNA damage of HeLa cell ($\bar{x} \pm s, n=100$)

Dose/Gy	Tail DNA/%		OTM	
	Irradiated group	Union group	Irradiated group	Union group
0	0.6553±0.4853	0.7978±0.3347	0.3029±0.2021	0.3782±0.1563
2	2.3920±1.1001 ^a	5.2896±2.6917 ^{ab}	1.0223±0.4535 ^a	2.5725±0.9042 ^{ab}
4	3.6748±1.7887 ^a	6.7949±1.4945 ^{ab}	1.6894±0.6382 ^a	4.0113±0.6763 ^{ab}
6	3.7397±1.6840 ^a	14.1758±4.0183 ^{ab}	1.8484±0.7051 ^a	9.0945±2.2488 ^{ab}

Note: Compared with control group, ^a $P<0.05$; Compared with irradiated group, ^b $P<0.05$.

2.3 青蒿琥酯联合不同剂量 ⁶⁰Co γ 射线对 Siha 细胞 DNA 损伤的影响

青蒿琥酯联合不同剂量 ⁶⁰Co γ 射线对 Siha 细胞 DNA 损伤的影响见表 4。由表 4 可见照射后 Siha 细胞彗星尾部 DNA%和 OTM 均随照射剂量增加而

增加,表明 γ 射线对 Siha 细胞 DNA 损伤随照射剂量增加而增加,相同照射剂量下,联合治疗组 Siha 细胞彗星尾部 DNA%和 OTM 较单纯照射组无明显变化,表明青蒿琥酯未能加重 γ 射线对 Siha 细胞 DNA 的损伤,对 Siha 细胞无放射增敏作用。

Table 4 The effect of artesunate combined with different doses irradiation on DNA damage of Siha cell ($\bar{x} \pm s, n=100$)

Dose/Gy	Tail DNA%		OTM	
	Irradiated group	Union group	Irradiated group	Union group
0	0.7924±0.3671	0.7967±0.4044	0.3803±0.1397	0.3846±0.1580
2	2.6683±1.0701 ^a	3.1046±1.7122 ^a	1.4517±0.5759 ^a	1.4114±0.6529 ^a
4	3.5532±1.6697 ^a	3.8097±0.7912 ^a	1.4904±0.5405 ^a	1.6005±0.2405 ^a
6	4.0867±1.1966 ^a	4.0966±1.5303 ^a	1.9401±0.9056 ^a	2.1300±0.9840 ^a

Note: Compared with control group, ^a $P<0.05$.

3 讨论

青蒿琥酯是具有倍半萜结构的抗疟药青蒿素的衍生物之一,近年来国内外研究证实其具有辐射增敏作用。单细胞凝胶电泳(Single cell gelelectrophoresis, SCGE)是近年来发展起来的一种检测 DNA 单链断裂的有效方法,该法具有敏感、简便、迅速和标本采集量少等优点,广泛应用于 DNA 损伤研究中。张军宁等^[8]采用碱性单细胞凝胶电泳检测辐射诱导的人红白血病细胞株 K562 DNA 单链断裂数及单链断裂后的修复与细胞内在放射敏感性之间的关系,结果显示辐射诱导的 DNA 单链断裂及修复与细胞内在放射敏感性有很好的相关性,可用于人体肿瘤细胞内在放射敏感性的预测。本实验通过 MTT 实验检测到 HeLa 和 Siha 细胞的生存率均随青蒿琥酯浓度的增加而降低,当药物浓度分别为 2 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 时,对细胞生长的抑制作用较小,因此采用 2 $\mu\text{g/mL}$ 和 4 $\mu\text{g/mL}$ 的青蒿琥酯浓度作为 HeLa

和 Siha 细胞单细胞凝胶电泳实验浓度。

HeLa 是一种 p53 突变型子宫颈癌细胞, Siha 是一种 p53 野生型子宫颈癌细胞^[9],遭受放射性 DNA 损伤的细胞通过 G₁ 期检测点和 G₂ 期检测点分别阻滞在 G₁ 期和 G₂ 期,以提供充足的时间来修复受损的 DNA, p53 突变型 HeLa 细胞由于丧失功能 p53 蛋白对 G₁/S 期检测点的调控功能,只能依靠 G₂ 期检测点的功能阻止细胞在进入有丝分裂前期修复受损的 DNA^[10]。本实验采用单细胞凝胶电泳法检测了青蒿琥酯对放射诱导的 DNA 损伤的影响,结果显示,照射后 HeLa 细胞彗星尾部 DNA%和 OTM 均随照射剂量的增加而增加,且相同照射剂量下,联合治疗组 HeLa 细胞彗星尾部 DNA%和 OTM 均高于单纯照射组 ($P<0.05$)。照射后 Siha 细胞彗星尾部 DNA%和 OTM 随照射剂量的增加而增加,相同照射剂量下,联合治疗组 Siha 细胞彗星尾部 DNA%和 OTM 与单纯照射组无明显差别。以上结果表明青蒿琥酯对 p53 突变型宫颈癌 HeLa 细胞具有明显的放射增敏作用,而对 p53 野生型宫颈癌

Siha 细胞没有明显的放射增敏作用, 有关增敏作用的具体机制仍需进一步探讨。

参考文献

- 1 Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, *et al.* International Journal of Oncology, 2001, **18**(4): 767-73
- 2 Singh N P, Lai H. Life Sciences, 2001, **70**(1): 49-56
- 3 Kim S J, Kim M S, Lee J W, *et al.* J Cancer Res Clin Oncol, 2006, **132**(2): 129-135
- 4 陈遐林, 曹建平, 纪蓉, 等. 中华放射医学与防护杂志, 2009, **29**(4): 360-363
CHEN Xialin, CAO Jianping, JI Rong, *et al.* Chin J Radiol Med Prot, 2009, **29**(4): 360-363
- 5 刘杨, 曹建平, 樊赛军, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2009, **27**(6): 365-368
LIU Yang, CAO Jianping, FAN Saijun, *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2009, **27**(6): 365-368
- 6 Singh N P. Mutation Research, 2000, **455**(1-2): 111-122
- 7 Konca K, Lankof A, Banasik A, *et al.* Murat Res, 2003, **534**(1-2): 15-20
- 8 张军宁, 洪承皎, 朱寿彭, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2003, **21**(2): 106-109
ZHANG Junning, HONG Chengjiao, ZHU Shoupeng, *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2003, **21**(2): 106-109
- 9 Kniazhanski T, Jackman A, Heyfets A, *et al.* Cancer Lett, 2008, **271**(1): 34-36
- 10 Hartwell L H, Kastan M B. Science, 1994, **266**(5192): 1821-1828

Study on the effect of artesunate combined with irradiation on DNA damage of HeLa and Siha cells of human cervical cancer

ZHOU Yuanyuan¹ FENG Yang¹ ZHANG Xuguang² ZHU Wei¹ NI Qianying¹ GENG Chong¹
CHEN Guanglie¹ LUO Judong¹ FAN Saijun¹ CAO Jianping¹

¹(College of Radiological Medicine and Public Health, Soochow University, Suzhou 215123, China)

²(The Tumor Hospital of Xuzhou, Xuzhou 221002, China)

ABSTRACT In order to investigate the effect of artesunate combined with irradiation on DNA damage of HeLa and Siha cells of human cervical cancer, HeLa and Siha cells were cultured in vitro and exposed to different concentration of artesunate for 24 h and MTT assay was used to observe the inhibitory effect of different concentrations of artesunate on the proliferation of HeLa and Siha cells. The cells were divided into 2 groups as the irradiated group and the union treatment group. Here it was set up four absorbed doses of ⁶⁰Co γ -irradiation in each group with 0, 2, 4, and 6Gy, and the DNA damage were detected by single cell gel electrophoresis assay. MTT analysis showed that the inhibition of artesunate on HeLa and Siha cells of cervical cancer was in concentration-dependent manners. Single cell gel electrophoresis showed that the DNA damage of HeLa cells treated with artesunate was more serious than that treated only with irradiation ($P < 0.05$), but had no such effect on Siha cells. Artesunate can increase the radio-sensitivity of HeLa cells of cervical cancer with p53 mutant, but has no such effect on wide type p53 Siha cells.

KEYWORDS Artesunate, Radiosensitivity, DNA damage, Cervical cancer HeLa cell

CLC Q691, R114, R737