

槲皮素对人宫颈癌 HeLa 细胞辐射敏感性的影响

梁晓芳 洪承皎 张保国

(苏州大学医学部放射医学与公共卫生学院 江苏省放射医学与防护重点实验室 苏州 215123)

摘要 为观察槲皮素对人宫颈癌细胞 HeLa 增殖及其放射敏感性的影响,以人宫颈癌细胞株 HeLa 为研究对象,以 MTT 比色法和克隆形成实验检测槲皮素对 HeLa 细胞生长的抑制作用,并以克隆形成实验观察槲皮素对 HeLa 细胞株放射敏感性的影响。结果表明槲皮素能明显抑制人宫颈癌 HeLa 细胞增殖,存在剂量依赖和时间依赖性。克隆形成实验显示槲皮素对 HeLa 细胞的作用可分为两部分,一部分抑制 HeLa 细胞增殖,另一部分为诱导 HeLa 细胞死亡。克隆形成实验也显示槲皮素联合 X 射线照射能显著降低照射后 HeLa 细胞的存活率。本实验研究认为槲皮素具有放射增敏作用,为临床开展放射线联合槲皮素治疗肿瘤的研究提供了实验依据。

关键词 槲皮素, 细胞增殖, 放射敏感性, HeLa 细胞

中图分类号 R811, R 811.5

槲皮素(Quercetin, Que)是自然界中含量丰富的黄酮类化合物之一,广泛存在于蔬菜、水果及中草药之中,具有扩张冠状动脉、降血脂、抗炎等多种生理及药理活性。近年来发现槲皮素可抑制多种肿瘤细胞的生长及肿瘤细胞 DNA 的生物合成^[1],可抑制热休克蛋白 HSP27 和 HSP70 的表达^[2],并且可以逆转肿瘤细胞的耐药性^[3],是颇具应用前景的抗癌药物之一。但目前国内外就槲皮素对肿瘤细胞放射敏感性影响的研究报道较少,本研究以人宫颈癌细胞 HeLa 为研究对象,观察 X 射线照射结合槲皮素对细胞放射敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

槲皮素(Sigma 公司产品),用二甲亚砜(DMSO)配成浓度为 200 mmol/L 的储备液,-20℃冰箱保存,使用时用 DMEM 培养基稀释备用。MTT 购自美国 Sigma 公司,以 PBS 配制成 5 g/L 浓度,抽滤除菌后避光备用。Giemsa 染剂及 DMSO 均购自美国 Sigma 公司。CO₂ 培养箱(Thermo Forma3111 水套式);使用酶联免疫检测仪(BIO-TEK 公司 powerwave xs),倒置显微镜(Olympus CK41)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人宫颈癌细胞株 HeLa 为本实验室保存,置于含有 10%的小牛血清的 DMEM 培养基中,在 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养,每 2 天传代一次。

1.2.2 辐照条件 采用西门子 PRIMUS 型电子直线加速器产生的 6 MV 高能 X 射线照射,照射剂量率为 2 Gy/min。

1.2.3 槲皮素对人宫颈癌细胞株 HeLa 的体外增殖的影响研究 噻唑蓝(MTT)比色实验 取对数生长期的 HeLa 细胞,用 0.25%胰酶消化后制成单细胞悬液,细胞浓度调整为 $3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$,接种于 96 孔板,每孔 100 μL 。细胞贴壁 24 h 后加入槲皮素,使其终浓度分别为 30、60、90、120、150 和 180 $\mu\text{mol/L}$,对照组为完全培养基,每组设 5 个平行样。分别继续培养 24、48、72 和 96 h 后,弃培养基,PBS 洗两次,每孔加入 DMEM 培养基 100 μL ,MTT(5 g/L) 10 μL 。4 h 后除去培养基,每孔加入 DMSO 100 μL 振荡后在酶标仪上 570 nm 波长处测定吸光度值。重复实验 3 次。分别计算 24、48、72 和 96 h 时间点检测不同浓度槲皮素对 HeLa 细胞增殖的抑制率。

细胞抑制率(%) = (1 - 实验组 OD 值 / 对照组 OD 值) × 100 %

国家自然科学基金(10275083)资助

第一作者:梁晓芳,女,1981年11月出生,2005年毕业于山西医科大学,临床专业,目前为苏州大学放射医学专业在读研究生

通讯联系人:张保国

收稿日期:初稿 2008-12-11,修回 2009-01-23

克隆形成抑制实验 取对数生长期细胞制成单细胞悬液,以 500 个/孔种入直径为 60 mm 培养皿中,贴壁 12 h 后,加入槲皮素使其终浓度分别为 0、30、90 和 150 μmol/L,分别在 24、48、72 和 96 h 后换为完全培养基,继续培养 10 d 后,甲醇固定,Giemsa 染色,镜下计算超过 50 个细胞的克隆,每组设 3 个平行样,实验重复 3 次,结果取平均值。

1.2.4 不同浓度槲皮素对 HeLa 细胞辐射敏感性的影响 克隆形成抑制实验 取对数生长期 HeLa 细胞制成单细胞悬液,随着照射剂量增高相应增加接种的细胞数。在照射剂量为 0、2、4、6 和 8 Gy 时分别以 500、500、2000、6000 和 10000 个/孔密度种入直径为 60 mm 培养皿中,每组每个剂量点设三个平行样,细胞贴壁 8 h 后加入不同浓度的槲皮素,对照组加入完全培养基,继续培养 16 h 后照射相应剂量,在含不同浓度的槲皮素的培养基中继续培养 8 h 后换为完全培养基继续培养 10 d。PBS 洗、甲醇固定、Gimsa 染色后显微镜下计数 50 个细胞以上的细胞集落。按下列公式计算细胞存活率 (Survival fraction, SF):

细胞存活率=某一剂量照射实验组的克隆数/ (该组细胞种植数×PE)

PE=未照射细胞克隆形成数/细胞种植数×100%

在单击多靶模型中:细胞存活率 S 与照射剂量 D 的关系为:

$$S = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$$

采用单击多靶模型拟合细胞存活曲线得出 D_0 和 N ,再由 D_0 和 N 计算出准阈剂量 $D_q : D_q = D_0 \ln N$ 。放射增敏比 SER 定义为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。根

据 D_0 和 D_q 值分别计算出 SER_{D_0} , SER_{D_q} 。放射增敏比 SER_{SF2} 定义为:照射剂量 2 Gy 时,对照组细胞存活率/药物处理加照射组细胞存活率。

1.2.5 统计学分析 实验时设三个平行样,实验重复三次。实验结果用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较采用方差分析。应用 SPSS13.0 统计软件包进行分析。

2 结果

2.1 槲皮素对人宫颈癌细胞株 HeLa 的体外增殖抑制效应

2.1.1 MTT 实验结果 表 1 为 MTT 实验得到的不同浓度的槲皮素、不同处理时间对人宫颈癌细胞株 HeLa 的抑制作用的实验结果。随着作用时间的延长和药物浓度的增加,槲皮素对细胞的增殖有明显抑制作用,存在剂量-效应关系和时间-效应关系。

(1) 剂量-效应关系:槲皮素 60 μmol/L 浓度组 24、48、72、96 h 的细胞抑制率分别为:5.1%、6.1%、11.2%、24.8%,而槲皮素浓度达到 150 μmol/L 和 180 μmol/L 时,其 24、48、72、96 h 抑制率分别为 17.2%、24.9%、37.2%、49.8%和 23.1%、38.8%、71.5%、86.4%,与细胞对照组相比,抑制作用与浓度呈明显正相关 ($P < 0.01$)。

(2) 时间-效应关系 槲皮素 30 μmol/L 浓度以上各组与 HeLa 细胞体外共孵育 24、48、72、96 h 后,如表 1 显示,随着作用时间的延长,抑制率显著增加,120 μmol/L 浓度组分别为 14.0%、15.4%、20.3%、38.6%,与细胞对照组相比,96 小时组存活率显著低于其他组 ($P < 0.01$),抑制作用与时间呈明显正相关。

Table 1 Effect of of Quercetin on HeLa cell proliferation ($\bar{x} \pm s$)

Quercetin /μmol·L ⁻¹		24 h (I)		48 h (II)		72 h (III)		96 h (IV)	
		OD	The inhibition rate/%	OD	The inhibition rate/%	OD	The inhibition rate/%	OD	The inhibition rate/%
V	0	0.310±0.001	0	0.482±0.001	0	0.875±0.002	0	1.43±0.003	0
VI	30	0.308±0.001	0.6±0.1	0.477±0.001	1.0±0.1 ^b	0.836±0.001	4.3±0.1 ^{bd}	1.22±0.025	14.3±1.9 ^{bd}
VII	60	0.294±0.003	5.1±0.7 ^c	0.452±0.002	6.1±0.3 ^{ad}	0.777±0.006	11.2±0.7 ^{bd}	1.17±0.057	24.8±4.2 ^{bd}
VIII	90	0.285±0.003	8.0±0.8 ^d	0.435±0.001	9.7±0.2 ^b	0.735±0.007	15.9±0.8 ^{bd}	1.13±0.040	30.8±2.6 ^{bd}
IX	120	0.279±0.007	14±1.4 ^d	0.407±0.010	15.4±0.2 ^b	0.697±0.018	20.3±2.0 ^{bd}	0.877±0.032	38.6±2.0 ^{bd}
X	150	0.256±0.018	17.2±5.0 ^d	0.362±0.008	24.9±1.6 ^{bd}	0.549±0.009	37.2±1.1 ^{bd}	0.716±0.017	49.8±1.2 ^{bd}
XI	180	0.238±0.015	23.1±4.7 ^d	0.295±0.015	38.8±3.1 ^{bd}	0.249±0.019	71.5±2.2 ^{bd}	0.194±0.045	86.4±3.1 ^{bd}

Note: Compared with I, (^a) $P < 0.05$, (^b) $P < 0.01$; Compared with V, (^c) $P < 0.05$, (^d) $P < 0.01$.

2.1.2 克隆形成实验结果 克隆形成实验结果如表 2 所示, 槲皮素 90 $\mu\text{mol/L}$ 和 150 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组 HeLa 在 24 h 和 96 h 细胞的死亡率分别从 8.4%。和 9.5% 增加为 16.2%和 25.8%, 而 MTT 结果显示在 24 h 和 96 h 细胞抑制率分别从 8.0%。和 17.2%增加为

30.8%和 49.8%, 结果表明槲皮素可以降低细胞的克隆形成率, 诱导细胞直接死亡, 但其死亡率明显低于抑制率, 提示槲皮素对 HeLa 细胞的作用分为两部分, 一部分为抑制细胞的增殖, 另一部分为直接诱导其死亡。

Table 2 Effect of Quercetin on colony formation ($\bar{x} \pm s$)

Group	Quercetin / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	The mortality rate / %			
		24 h (I)	48 h (II)	72 h (III)	96 h (IV)
V	0	0	0	0	0
VI	30	8.2 \pm 0.3*	8.7 \pm 0.5*	8.8 \pm 0.1*	12.4 \pm 2.7*
VII	90	8.4 \pm 0.8*	11.9 \pm 1.3*	12.0 \pm 1.1*	16.2 \pm 5.4*
VIII	150	9.5 \pm 1.9*	18.3 \pm 5.3*	20.0 \pm 2.5*	25.8 \pm 3.9*

Note: Compared with V, (*) $P < 0.01$.

2.2 槲皮素对人宫颈癌细胞株 HeLa 辐射敏感性的影响

辐照剂量-细胞存活曲线见图 1。用多靶单击模型拟合细胞存活曲线, 得出的 D_0 、 D_q 值见表 3。以 D_0 、 D_q 值和临床常用照射剂量 2 Gy 的存活分数 (SF2) 为标准计算放射增敏比, 结果显示经不同浓度槲皮素处理后 SF2、 D_0 、 D_q 均低于对照组 ($p < 0.01$), SER_{D_0} 、 SER_{D_q} 和 SER_{SF2} 随槲皮素浓度的增加而显著增加 (表 3), 槲皮素的浓度在 150 $\mu\text{mol/L}$ 时, 增敏比可以近似达到 2, 这表明槲皮素可以明显增加 HeLa 细胞的放射敏感性。

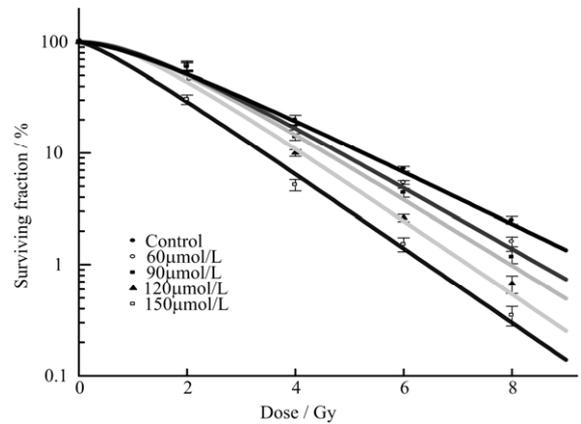


Fig.1 The effects of Quercetin on HeLa cell radiosensitivity

Table 3 Effect of Quercetin on radiosensitivity enhancement ratio

Group	D_0/Gy	D_q/Gy	SF2/%	SER_{D_0}	SER_{D_q}	SER_{SF2}
Control	1.91	1.87	59.7	—	—	—
60 $\mu\text{mol/L}$	1.40	1.75	56.8	1.36	1.07	1.05
90 $\mu\text{mol/L}$	1.18	1.85	54.9	1.61	1.02	1.09
120 $\mu\text{mol/L}$	1.04	1.55	46.2	1.84	1.21	1.29
150 $\mu\text{mol/L}$	0.96	0.96	27.1	1.99	1.95	2.18

3 讨论

宫颈癌是发展中国家妇女最常见的妇科肿瘤, 近年来在全球范围内宫颈癌发病率呈现增加和年轻化的趋势, 治疗主要以手术及放疗为主, II a 期以上多采用放疗。目前临床上提高肿瘤的放射敏感性

主要利用化疗药物如顺铂、泰素等, 但是由于化疗药物对正常细胞的毒性作用较大, 且与放疗的副反应有协同作用, 病人一般难以耐受, 因此研究宫颈癌的放射增敏剂有着重要的实际意义。槲皮素是一种天然的黄酮类化合物, 存在于多种植物的花、叶、果实中, 具有抗肿瘤、抗炎、消除自由基等多种生

物活性^[4]。近年来槲皮素抗肿瘤作用逐渐被人们所认识并引起广泛的重视。已有研究发现,槲皮素对胃癌细胞、白血病、肝癌细胞都具有抑制生长和诱导凋亡的作用^[5]。槲皮素的抗癌机制可能与抑制 c-fos、c-jun 和 ras 等原癌基因的表达,阻断肿瘤细胞信号传导^[6],下调热休克蛋白(HSP)^[7]、环氧合酶(COX-2)^[8]、Sp1 促进子的转录活性,减少 DNA 复制,阻滞细胞周期,诱导细胞凋亡等因素有关^[9]。

本研究发现槲皮素在体外能抑制人宫颈癌 HeLa 细胞的增殖,且其抑制作用存在一定的剂量和时间依赖关系,与之前的报道槲皮素对 HeLa 细胞增殖的实验研究结果一致^[10]。但 MTT 实验仅反映活细胞数目的变化,它的结果既受细胞增殖速率的影响,也受细胞存活率的影响。所以它并不能明确槲皮素对 HeLa 细胞的作用是抑制细胞增殖或是诱导其直接死亡。本实验进一步采用克隆形成抑制实验直接观察槲皮素对 HeLa 细胞死亡率的影响,结果证实槲皮素可以诱导细胞直接死亡,但在槲皮素浓度高达 150 $\mu\text{mol/L}$ 并且药物作用 96h 时,其死亡率仅为 25.8%,远低于相同条件 MTT 实验显示的 49.8%抑制率,这表面槲皮素对 HeLa 细胞的作用虽然可以诱导其直接死亡,但很大程度上还是抑制细胞增殖。同时 MTT 结果显示在一定范围(槲皮素浓度 $<150 \mu\text{mol/L}$),其 OD 值随着时间的增加而增加,表明 HeLa 细胞的绝对数目仍在增加,因此槲皮素单纯应用与肿瘤治疗的效果可能有限。若用于临床治疗最好能够配合对细胞杀伤作用较强的化疗药物或放射治疗,所以本实验进一步研究了槲皮素联合 X 射线对人宫颈癌 HeLa 细胞的影响。

槲皮素对细胞的毒性与处理时间有关,因此在本实验中采用了槲皮素对 HeLa 细胞毒性作用较小的 24 h。实验结果表明:槲皮素浓度高于 90 $\mu\text{mol/L}$ 时,槲皮素处理 24 h 后,细胞的 SF2、 D_0 、 D_q 均明显降低。 D_q 的大小反映了细胞存活曲线上肩区的大小, D_q 的减小表明细胞亚致死性放射损伤修复能力的减小,提示细胞亚致死性放射损伤修复能力受到抑制。 D_0 反映细胞平均致死剂量, D_0 减小表明细胞对辐射的敏感性增加。并且用 150 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的槲皮素处理 HeLa 细胞,放射增敏比可以达到 2.0。因此,我们的实验结果证明槲皮素对人宫颈癌细胞 HeLa 有明显的放射增敏作用。

现有研究表明,槲皮素可以抑制热休克蛋白 70。而热休克蛋白是一种原核和真核细胞在生理、病理、环境(高温、缺氧、及电离辐射等)下均可产生的一组高度保守的蛋白质分子家族,在体内许多不利于肿瘤生长的环境中对肿瘤细胞有保护作用,可能是导致细胞放疗失败的原因之一。而槲皮素对热休克蛋白的抑制可以促进肿瘤细胞的凋亡,这可能是其能够增加放射敏感性的机制之一,不过仍需要进一步实验的证实。我们认为槲皮素联合 X 射线可以提高 HeLa 细胞的放射敏感性,抑制肿瘤细胞的增殖潜能和修复能力,增强肿瘤放射治疗的效果,这为临床进一步研究放疗联合槲皮素治疗宫颈癌提供了实验依据。

参考文献

- 1 Ranelletti F O, Ricci R, Larocca L M, *et al.* Int J Cancer, 1992, **50**(3): 486-492
- 2 Yakoo T, Kitamura M. AM J Physiol, 1997, 273: F206-212
- 3 Kim S H, Yeo G S, Lim Ys, *et al.* Exp Mol Med, 1998, **30**: 87-95
- 4 王艳芳,王新华,朱宇同.天然产物研究与开发, 2003, **15**(2): 171-173
WANG Yanfang, WANG Xinhua, ZHU Yutong. Natural product research and development, 2003, **15**(2): 171-173
- 5 Kang T B, Liang N C. Biochem Pharmacol, 1997, **54**: 1013-1018
- 6 Ranelletti F O, Maggiano N, Serra F G, *et al.* International Journal of Cancer, 2000, **85**(3): 438-445
- 7 Piantelli M, Tatone D, Castrilli G, *et al.* Melanoma Res, 2001, **11**(5): 469-476
- 8 Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, *et al.* Carcinogenesis, 2000, **21**(5): 959-963
- 9 Choi J A, Kim J Y, Lee J Y, *et al.* Int J Oncol, 2001, **19**(4): 837-44
- 10 张杰,吕蔡,张平安,等.中国肿瘤临床, 2006, **35**(8): 436-438
ZHANG Jie, LÜ Cai, ZHANG Pinan, *et al.* Chinese Journal of Clinical Oncology, 2006, **35**(8): 436-438

Effect of Quercetin on radiosensitivity of human Uterine Cervix Cancer HeLa cells

LIANG Xiaofang HONG Chengjiao ZHANG Baoguo

*(School of Radiation Medicine and Public Health, Medical College of Suzhou University,
Jiangsu Provincial key Laboratory of Radiation Medicine and Protection, Suzhou 215123, China)*

ABSTRACT In order to investigate the effects of Quercetin on radiosensitivity of human Uterine Cervix Cancer HeLa cells, MTT assay and clonogenic assay were performed to evaluate the cytotoxicity of Quercetin on the cells. Clonogenic assay was used to observe its effects on the radiosensitivity of the cells. MTT result shows that the inhibition of Quercetin on the cells is in the dose-dependent and time-dependent. And the clonogenic assay result shows that the effect of Quercetin on HeLa cells can be divided into two parts, one for the inhibition of HeLa cells and another for the induction of HeLa cell death. The other clonogenic assay result also shows Quercetin can decrease clonogenic survival rate of HeLa cells exposed to X rays. The study shows Quercetin might enhance the radiosensitivity of the HeLa cell line. And it may provide a useful evaluation to combination of ionizing radiation and Quercetin for cancer patients.

KEYWORDS Quercetin, Cell proliferation, Radiosensitivity, HeLa cell

CLC R811, R 811.5