

顺铂诱导人鼻咽癌细胞 CNE1、CNE2 后的 辐射敏感性

孙海 刘发全¹ 温居一 曹漫明 李鹏 张积仁*

(南方医科大学珠江医院肿瘤中心, 广州 510280; ¹广东省第二人民医院肿瘤科, 广州 510317)

摘要 为研究鼻咽癌细胞 CNE1、CNE2 多药耐药与辐射敏感性的关系, 通过体外逐渐增加顺铂浓度的方法诱导鼻咽癌细胞 CNE1、CNE2, MTT 法分析环孢霉素 A、IFN 单药及联合应用对多药耐药的逆转倍数, 克隆形成实验分析顺铂诱导鼻咽癌细胞 CNE1、CNE2 多药耐药前后辐射敏感性的改变, 同时研究环孢霉素 A、IFN 逆转耐药处理对辐射敏感性的影响。结果显示, 环孢霉素 A、IFN 联合应用逆转倍数明显高于单药应用, 鼻咽癌 CNE1 细胞经顺铂诱导后辐射敏感性无明显改变, 鼻咽癌 CNE2 细胞经顺铂诱导后辐射敏感性下调, 环孢霉素 A、IFN 逆转耐药处理可以部分恢复其辐射敏感性。

关键词 鼻咽癌; 多药耐药; 辐射敏感性; 环孢霉素 A; 干扰素

鼻咽癌是中国南部和东南亚地区常见恶性肿瘤之一, 放疗是其主要的治疗手段。然而, 鼻咽癌发现时大部分为中晚期, 化疗已经成为主要的辅助治疗手段。化疗后诱导的肿瘤多药耐药表达对其辐射敏感性的影响成为一个值得关注的问题。本文通过克隆形成试验研究人鼻咽癌细胞系 CNE1、CNE2 体外经顺铂(cisplatin, DDP)诱导耐药前后辐射敏感性的变化以及耐药逆转剂环孢霉素 A(cyclosporin A, CsA)、IFN 逆转耐药后辐射敏感性的变化, 探讨多药耐药对鼻咽癌细胞系 CNE1、CNE2 辐射敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人鼻咽癌 CNE1、CNE2 细胞株购自中山大学附属肿瘤医院, 体外培养于含 10% 新生牛血清 RPMI-1640 培养液中, 置 37 °C、5%CO₂ 饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养。

1.2 试剂

DDP(齐鲁制药厂)用 RPMI-1640 培养液配成 1 mg/ml 的母液 -20 °C 保存备用, RPMI-1640 为德国 Gibco 公司产品, 新生牛血清为美国 Hyclone 公司产品, 环孢霉素 A 注射液为 Pharmaceutica 公司产品, IFN 为浙江汉生制药有限公司产品, 胰蛋白酶、EDTA 为美国 Sigma 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 顺铂诱导人鼻咽癌细胞 CNE1、CNE2 的处理 MTT 法测定 CNE1、CNE2 细胞的 DDP IC₅₀ 值。用逐渐增加 DDP 浓度的方法刺激 CNE1、CNE2 细胞株, 初始浓度分别为 CNE1、CNE2 细胞的 IC₅₀ 值浓度, 根据细胞增殖情况来增加药物的浓度, CNE1、CNE2 细胞 DDP 的终浓度分别为 3.0、1.5 μmol/L, 诱导 16 周后用无药物培养基培养 2 周, 分别命名为 CNE1/DDP、CNE2/DDP。

1.3.2 MTT 法分析 CsA、IFN 单独及联合应用逆转倍数比较 CsA 单药、联合用药的浓度均为 3.0 μmol/L, IFN 单药、联合用药的浓度均为 500 U/ml。

逆转倍数 = 不加逆转剂时的 IC₅₀ / 加逆转剂时的 IC₅₀

1.3.3 克隆形成实验分析 CNE1、CNE2 诱导耐药及逆转耐药前后放射敏感性的差异 CNE1 细胞分为 CNE1、CNE1/DDP 和 CNE1/DDP-C(CNE1/DDP 经 CsA +IFN 逆转耐药处理); CNE2 细胞分为 CNE2、CNE2/DDP 和 CNE2/DDP-C(CNE2/DDP 经 CsA +IFN 逆转耐药处理)。每组细胞分成 7 亚组, 接种于直径 6 cm 的培养皿上, 细胞生长 12 h 后, 分别按

收稿日期: 2005-06-27 接受日期: 2005-09-16

2003 年广东省自然科学基金资助项目(No.33915)

* 通讯作者。Tel: 020-61643200, Fax: 020-61643200, E-mail:

zjr2006@163.com

表1 CNE1和CNE2不同照射剂量下的细胞接种数

	不同剂量细胞接种数						
	0 Gy	0.5 Gy	1.0 Gy	2.0 Gy	4.0 Gy	6.0 Gy	8.0 Gy
CNE1	100	105	120	140	400	1000	4000
CNE2	100	110	150	200	600	1500	5000

CNE1/DDP、CNE1/DDP-C同CNE1, CNE2/DDP、CNE2/DDP-C同CNE2。

0、0.5、1、2、4、6、8 Gy 7个剂量组给予X线照射,照射源为VARIAN2300C/D型双光子直线加速器,剂量率为200 cGy/min,距靶源100 cm,射野大小为15 cm×15 cm,把培养皿置于照射野中心,照射结束后进行常规细胞培养。12天后克隆形成,1%结晶紫染液染色1 min,生理盐水充分冲洗后晾干,计数50个细胞以上的克隆数。为消除不同剂量之间存活率的实验误差,应尽量保持各剂量点培养皿内克隆形成环境相似,即随剂量加大而增多细胞接种数(表1)。计数各亚组细胞的集落及各细胞系空白对照组的克隆形成率(PE),再分别计算其不同剂量的存活率。实验重复3次,取其不同剂量存活率均值按单击多靶模型进行拟合,绘制出剂量存活曲线,根据单击多靶模型求出各组的 D_q 、 D_0 、 N 、 SF_2 ,分析比较各组的放射敏感性。

1.3.4 统计学分析 采用SPSS11.0统计软件分析。

2 结果

2.1 不同逆转方法逆转耐药作用比较

CNE1和CNE2细胞的DDP IC_{50} 值分别为0.64、0.23 $\mu\text{mol/L}$,符合CNE1和CNE2细胞分别为高分化、低分化鳞癌的特点。

CNE1/DDP、CNE2/DDP细胞株的DDP IC_{50} 值分别为6.72、4.16 $\mu\text{mol/L}$,可见经过逐渐增加浓度的DDP诱导后,CNE1和CNE2细胞均出现了耐药现象。

从表2可以看出,CsA对CNE1/DDP和CNE2/

表2 CNE1/DDP、CNE2/DDP三种逆转方法逆转耐药作用的比较

药物	CNE1/DDP		CNE2/DDP	
	IC_{50} (mmol/L)	逆转倍数	IC_{50} (mmol/L)	逆转倍数
CsA	1.34	5.01	0.43	9.67
IFN	3.45	1.95	1.78	2.34
CsA+IFN	1.06	6.34	0.35	11.89

DDP细胞的逆转倍数分别为5.01和9.67倍,IFN对CNE1/DDP和CNE2/DDP细胞的逆转倍数分别为1.95和2.34倍,CsA+IFN对CNE1/DDP和CNE2/DDP细胞的逆转倍数分别为6.34和11.89倍。可见,CsA、IFN对CNE1/DDP和CNE2/DDP细胞均有逆转耐药作用,CsA对CNE1/DDP和CNE2/DDP细胞的逆转作用明显优于IFN($P<0.01$),且CsA和IFN联用的逆转作用优于CsA、IFN单药应用的逆转效果($P<0.01$)。

2.2 克隆形成实验检测并比较CNE1、CNE2诱导耐药及逆转耐药后放射敏感性的差异

克隆形成试验各组细胞存活率见表3,所得数据经单击多靶模型软件拟合得到各组细胞存活率曲线(图1)及放射生物学参数(表4)。从表4可以看出,克隆形成实验拟合单击多靶模型计算出的CNE1细胞的 SF_2 为0.641,CNE1/DDP的 SF_2 为0.686,CNE1/DDP-C的 SF_2 为0.619;CNE2细胞的 SF_2 为0.187,CNE2/DDP细胞的 SF_2 为0.355,CNE2/DDP-C的 SF_2 为0.277。可见,CNE1细胞经DDP诱导耐药后,放疗敏感性无明显改变($P>0.05$),给与CsA+IFN逆转耐药处理后放疗敏感性亦无明显改变($P>0.05$);CNE2细胞经DDP诱导耐药后放疗敏感性下降($P<0.01$),给与CsA+IFN逆转耐药处理后放疗敏感性有所上升($P<0.01$),但是仍然低于亲本细胞株。

3 讨论

多药耐药一直是困扰肿瘤化疗取得更好疗效的

表3 克隆形成实验各组细胞存活率

剂量 (Gy)	存活率(%)					
	CNE1	CNE1/DDP	CNE1/DDP-C	CNE2	CNE2/DDP	CNE2/DDP-C
0	100	100	100	100	100	100
0.5	91.75	93.90	91.80	89.66	88.61	88.58
1.0	84.35	84.51	79.32	49.32	69.20	57.26
2.0	79.27	81.49	74.87	21.92	37.97	30.13
4.0	26.52	31.34	27.71	1.37	6.33	3.42
6.0	8.78	14.23	9.28	0.27	1.27	0.77
8.0	1.86	3.17	2.17	0	0.08	0.03

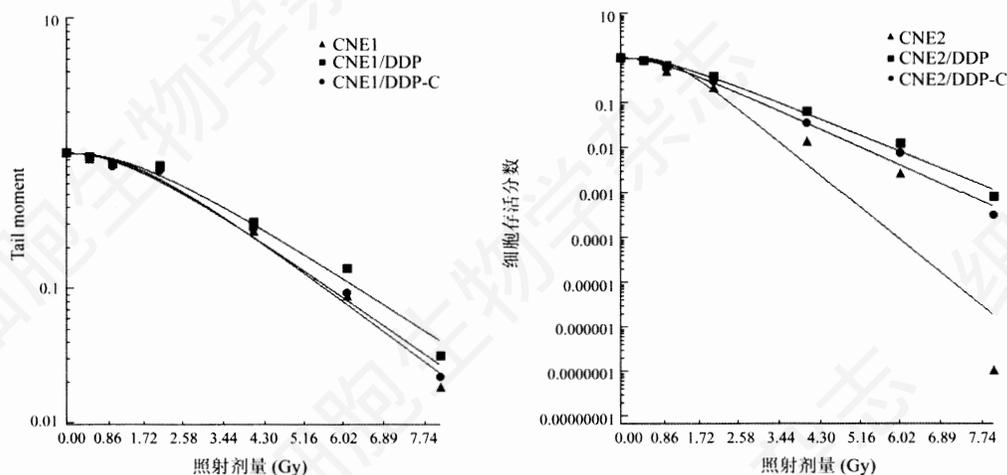


图1 单击多靶模型拟合的 CNE1、CNE2 各组细胞存活曲线图

表4 单击多靶模型计算出的各组放射生物学参数

	D_q	SF_2	D_0	N
CNE1	1.754	0.641	1.663	2.87
CNE1/DDP	1.878	0.686	1.919	2.66
CNE1/DDP-C	1.603	0.619	1.773	2.47
CNE2	1.185	0.187	0.515	9.99
CNE2/DDP	1.075	0.355	1.026	2.85
CNE2/DDP-C	0.898	0.277	0.928	2.63

主要因素之一。既往对于多药耐药的研究很少涉及肿瘤耐药后对进一步放疗敏感性影响的研究，然而临床上很多肿瘤病人在综合治疗的方案中均涉及化疗结合放疗的综合治疗，研究化疗诱导肿瘤多药耐药后放疗敏感性的改变对临床上化疗后需要进一步放疗的病人的治疗具有一定的指导意义。

姜润德等^[1]通过顺铂诱导鼻咽癌CNE2细胞建立CNE2/DDP耐药株后，MTT实验结果显示CNE2/DDP耐药株对DDP、5-氟脲嘧啶、长春新碱均有耐药现象，可见DDP诱导鼻咽癌细胞株可以建立多药耐药的细胞株。本研究就是采取了逐步增加DDP浓度的方法诱导鼻咽癌CNE1、CNE2细胞的多药耐药。

本研究对于鼻咽癌CNE1、CNE2细胞化疗诱导耐药前后的放疗敏感性的研究证实，鼻咽癌CNE1、CNE2细胞的 SF_2 分别为0.641、0.187。 SF_2 是用来评价恶性肿瘤放射敏感性的指标之一，临床放射敏感性较低的肿瘤 SF_2 较高，如非小细胞肺癌 SF_2 为0.56~0.58，临床放射敏感性较高的肿瘤 SF_2 较低，如小细胞肺癌 SF_2 为0.07~0.38。本研究的结果符合鼻咽癌CNE1、CNE2细胞分别为高分化鳞癌和低分化鳞癌的特点，与李志强等^[2]和夏云飞等^[3]

报道的CNE1和CNE2的 SF_2 值较一致。研究发现，化疗诱导耐药后鼻咽癌CNE1/DDP、CNE2/DDP细胞的 SF_2 分别为0.686、0.355，可见，不同鼻咽癌细胞株在化疗诱导耐药后放疗敏感性的改变并不相同。经CsA+IFN逆转耐药处理后，鼻咽癌CNE1/DDP-C、CNE2/DDP-C细胞的 SF_2 分别为0.619、0.277，可见逆转耐药对不同鼻咽癌耐药株的放疗敏感性改变不同，而且CsA+IFN并不能完全逆转其耐药性，可见鼻咽癌的多药耐药除了和P-gp相关外，还与其他因素相关。以上结果提示我们，在临床上不同分化程度的鼻咽癌病人化疗后放疗敏感性的改变不一致，尤其对于低分化的鼻咽癌在化疗后放疗敏感性会出现下调现象，高分化的鼻咽癌病人化疗后的放疗敏感性无明显改变，这就使得低分化的鼻咽癌病人在化疗后应用逆转耐药药物成为必要。

在所有的逆转耐药研究中，CsA一直被认为是疗效肯定、作用较强的ATP依赖的泵阻滞剂，其作用机制为竞争性结合细胞膜上的P-gp，从而使细胞毒药物泵出减少，达到逆转耐药的目的^[4]。 α -干扰素作为生物调节剂已广泛应用于治疗多种肿瘤，近年来的研究发现它能增强耐药及敏感细胞株对结构和功能不同的化疗药物的敏感性。Stein等^[5]研究了多种细胞因子(TNF α 、IL-2、IFN γ)对HCT15和HCT116结肠癌细胞的逆转作用发现，TNF α 、IL-2、IFN γ 均有逆转耐药作用，均表现为肿瘤细胞的P-gp和mdr1表达下调，且于药物作用后48~72h达最低值。本研究比较了CsA、IFN单独和联合用药对鼻咽癌CNE1/DDP、CNE2/DDP逆转耐药的作用，发现CsA、IFN单独和联合用药对鼻咽癌CNE1/

DDP、CNE2/DDP 均有逆转耐药作用, 以 CsA 和 IFN 联合用药对鼻咽癌 CNE1/DDP、CNE2/DDP 逆转作用最强。但是 CsA+IFN 还不足以达到满意的逆转效果, 尚需其他逆转耐药方法的配合或有更好疗效的逆转方法。进一步研究肿瘤的多药耐药机制及进一步开发和研究新的逆转耐药药物仍将是肿瘤研

究的一个重点。

参考文献(References)

- [1] 姜润德等。癌症, 2003, 22: 337
- [2] 李志强等。实用医学杂志, 2001, 17: 802
- [3] 夏云飞等。癌症, 1999, 18: 86
- [4] Tan B *et al.* *Curr Opin Oncol*, 2000, 12: 450
- [5] Stein U *et al.* *Br J Cancer*, 1996, 74: 1384

Radiosensitivity of CNE1 and CNE2 Cell Lines Induced by Cisplatin

Hai Sun, Fa-Quan Liu¹, Ju-Yi Wen, Man-Ming Cao, Peng Li, Ji-Ren Zhang*

(Oncology Center, Zhujiang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510280, China;

¹Oncology Department, the Second People's Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510317, China)

Abstract To study the relationship between radiosensitivity and multidrug resistance expression of CNE1 and CNE2 cell lines, CNE1 and CNE2 cell lines were induced by gradually enhanced density cisplatin, and reversal multiple of cyclosporine A and interferon using alone or together were analysed with MTT colorimetric assay, and the radiosensitivity differentiation of multidrug resistance cell lines before and after reversed with cyclosporine A and interferon were analysed with clone formation experiment, and the effect of cyclosporine A and interferon on radiosensitivity were analysed at the same time. The results showed that reversal multiple of cyclosporine A united with interferon was stronger obviously than that of cyclosporine A or interferon applied alone. Radiosensitivity of CNE1 cell line showed no change after induced with cisplatin, and that of CNE2 cell line was downregulated after induced with cisplatin, and cyclosporine A and interferon could reverse its radiosensitivity partly.

Key words nasopharyngeal carcinoma; multidrug resistance; radiosensitivity; cyclosporine A; interferon

Received: June 27, 2005 Accepted: September 16, 2005

This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No.33915)

*Corresponding author. Tel: 86-20-61643200, Fax: 86-20-61643200, E-mail: zjr2006@163.com