

放射耐受性结肠癌细胞亚株的建立及其生物学特性

冯景璟 肖然 卢仁泉 郭林

复旦大学附属肿瘤医院检验科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032

[摘要] **背景与目的:** 结肠癌是消化系统的常见肿瘤, 放疗是其重要的治疗手段之一。诱导并筛选具有放射耐受性的结肠癌细胞亚株, 为研究结肠癌放射耐受的机制提供实验模型。**方法:** 应用梯度递增剂量的 γ 射线对SW620细胞株进行诱导照射, 筛选得到放射耐受细胞亚株SW620/R。观察细胞的形态变化和生长情况, 通过CCK8法测定细胞增殖情况, 流式细胞仪检测细胞照射的周期及凋亡的变化, 克隆形成实验检测细胞克隆形成率和放射敏感性。**结果:** 通过照射剂量梯度递增的诱导方法, 成功建立了SW620/R细胞亚株。SW620/R细胞亚株形态与亲本细胞明显不同, 并且在高剂量射线照射后仍能继续生长; 鉴定实验显示SW620/R细胞亚株与亲本细胞相比倍增时间明显延长, 克隆形成率显著下降; 在细胞周期上S期的比例显著上升, 并且在照射后未出现周期的阻滞现象, 同时发现其自发凋亡率显著下降; 克隆形成实验显示其放射耐受性明显升高。**结论:** 成功建立了放射耐受的细胞亚株SW620/R, 经鉴定其放射敏感性显著降低, 且两者在增殖、克隆形成率、细胞周期和自发凋亡上差异有统计学意义($P < 0.05$)。

[关键词] 结肠肿瘤; 放射耐受; 细胞周期; 细胞凋亡

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.12.002

中图分类号: R735.3+5 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)12-0889-06

Establishment of radioresistant colorectal cancer cell-subline and its biological characteristics FENG Jing-jing, XIAO Ran, LU Ren-quan, GUO Lin (Department of Clinical Laboratory, Fudan University Shanghai Cancer Center; Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: GUO Lin E-mail: guolin500@hotmail.com

[Abstract] **Background and purpose:** Colorectal cancer is a common tumor of digestive system, radiation therapy is one of the important means of treatment. To explore the mechanism of colorectal cancer cell tolerated to radiation, radioresistant colorectal cancer cell-subline was induced and screened. **Methods:** Colorectal cancer SW620 cells were repeatedly given individual doses of γ -rays to induce radiation resistance. After monoclonal cells being selected and extensively cultured, the cell subline was named SW620/R. Morphological changes and growth of the cells before and after illumination were observed. Cell proliferation was tested by CCK8 assay. The distribution of cells in different stages of the cell cycle and apoptosis were investigated by flow cytometry. The relative radiosensitivities of tumor cells were assessed by standard colony formation assays. **Results:** SW620/R cells were established by gradient of increasing radiation dose induction method. SW620/R showed significant morphological changes compared with the parent strain SW620. Proliferation experiments showed SW620/R cell line doubling time was longer than SW620, clonogenic capacity decreased significantly. The resistant cells showed a higher percentage of cells in S phase and didn't appear cell cycle retardation, and the apoptosis rates were also found large differences between two cell lines after irradiation. SW620/R showed lower radiosensitivity by colony-forming assay. **Conclusion:** Radioresistant colorectal cancer cell subline SW620/R was established and it has lower radiosensitivity than the parental cell line. Two cell lines also have significant differences in proliferation, the rate of colony formation, cell cycle and spontaneous apoptosis ($P < 0.05$).

[Key words] Colorectal cancer; Radiation resistance; Cell cycle; Apoptosis

结肠癌是人类最常见的恶性肿瘤之一, 2014年癌症统计报告显示其发病率位居全球恶性肿瘤第3位^[1]。其发病率在40岁开始上升, 60~75岁时达到高峰, 并且发病率呈逐年上升趋势。因此, 其早期诊断、综合治疗和预后判断一直是近年来的研究热点。外科手术是治疗结肠癌的主要手段, 但术后复发率高。最近几年来发现借助术前放疗可提高根治性切除率, 显著降低局部复发率, 可延长患者的生存时间^[2]。本研究通过建立相关的放射耐受细胞亚株SW620/R, 并且对其生物学特性进行研究, 不但可以为研究结肠癌放射耐受发生机制提供理想的细胞模型, 而且还能为结肠癌个体化放射治疗奠定基础^[3]。

1 材料和方法

1.1 材料

人结肠癌SW620细胞株购自ATCC, 异硫氰酸荧光素(FITC)和碘化丙啶(PI)染色试剂盒购自美国BD公司, CCK8试剂盒购自东仁化学科技(上海)有限公司, RPMI-1640、胎牛血清、胰蛋白酶及双抗购自美国Gibco公司, 流式细胞仪购自美国Beckman Coulter公司, SARRP放疗仪购自美国Gulmay公司, 剂量率为350 cGy/min。

1.2 细胞培养及放射诱导

培养亲本SW620细胞株, 待对数生长期的细胞汇合度达到70%~80%, 给予初次3 Gy剂量射线的照射, 待细胞生长至70%~80%汇合度, 胰酶消化传代进入对数生长期后(一般为3周)再次给予射线照射, 同一剂量照射2次且每2次提高2 Gy照射剂量。

1.3 SW620/R与SW620细胞生长性状的比较

培养对数生长期的2组细胞SW620和SW620/R, 观察2组细胞在显微镜下形态学上的差异。分别给予2组细胞一定剂量的照射, 每隔一定时间镜下观察它们在形态学上的差异。

1.4 平板克隆形成实验测定细胞克隆形成率

取对数生长期的SW620和SW620/R细胞,

每孔接种100个细胞于6孔板上, 10~14 d后终止培养。固定、染色后, 显微镜下计数有效克隆数(超过50个细胞数的克隆为有效克隆)并计算克隆形成率。克隆形成率(%)=克隆数/实际接种细胞数×100%, 每组设3个复孔。

1.5 CCK8法绘制细胞生长曲线

取对数生长期的SW620和SW620/R细胞, 接种于96孔板上, 每隔12 h加入10 μL CCK8作用3 h, 于酶标仪以450nm波长测定吸光度(A)值, 根据Patterson公式计算细胞的群体倍增时间(population doubling time, PDT): $PDT=(t-t_0)\lg 2/\lg N-\lg N_0$ 。

1.6 流式细胞术测定照射前、后细胞的周期和凋亡

取对数生长期的SW620和SW620/R细胞, 待细胞汇合度达到50%~60%, 给予9 Gy剂量射线的照射, 在照射前和照射后24、72 h, 分别消化离心收集2组细胞, 用PBS洗涤。周期的测定: 70%冷乙醇固定以及PI染色后, 在流式细胞仪上分析并比较2组细胞照射前后的周期分布; 自发凋亡率的测定: Annexin V-FITC和PI染色后, 在流式细胞仪上分析并比较2组细胞照射前后的自发凋亡率。

1.7 平板克隆形成实验比较细胞放射敏感性

取对数生长期的SW620和SW620/R细胞, 倍比稀释后接种于6孔板上, 根据细胞数目给予相应的照射剂量, 其后常规培养直至形成肉眼可见的克隆细胞。固定、染色后, 显微镜下观察克隆并计数。细胞的克隆形成率(plating efficiency, PE)和存活分数(surviving fraction, SF)分别按以下公式计算: $PE=\text{每孔克隆数}/\text{每孔细胞接种数} \times 100\%$; $SF=\text{实验组克隆形成率}/\text{对照组克隆形成率} \times 100\%$ 。采用多靶单击模型曲线 [$SF=1-(1-e^{-D/D_0})^N$] 拟合2组细胞的剂量存活曲线, 并求出相关的放射生物学参数。

1.8 统计学处理

采用SPSS 19.0统计软件进行统计分析, 细胞生长及存活曲线用Sigmaplot 10.0统计软件拟合, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 放射耐受SW620/R细胞亚株的建立

放射耐受SW620/R细胞亚株通过梯度递增照射剂量的诱导方法建立，分别在3、5、7和9 Gy剂量下各照射了2次，累计照射48 Gy的剂量。细胞株建立后继续传代培养4周，进行相关研究实验。

2.2 SW620/R细胞亚株的形态学改变

观察发现，SW620细胞株其细胞外形呈扁平梭形，细胞核圆形，位于细胞中央，细胞彼此间紧密相连；而SW620/R细胞亚株的形态学改变明显，部分细胞呈不规则形态，细胞体积增大，细胞膜边界不清，细胞内的颗粒和空泡增多，偶见一些多核细胞(图1)。

2.3 照射后SW620/R细胞亚株与亲本细胞的生长情况

在9 Gy剂量的射线照射下，亲本细胞SW620几乎完全死亡，而SW620/R则能存活下

来。照射2周后镜下几乎找不到贴壁的SW620细胞，而SW620/R仅出现了一定程度的凋亡和生长抑制，3周后镜下仅能观察到SW620的细胞碎片，而SW620/R则形成大量克隆分布在培养瓶中且已恢复生长状态(图2)。因此，可见相比亲本细胞SW620/R对射线的敏感性明显降低。

2.4 细胞克隆形成率的差异

SW620和SW620/R的克隆形成率分别为(73.33±4.16)%和(31.33±5.86)%，差异有统计学意义($t=8.51$, $P<0.05$)，表明亲本细胞的克隆形成能力明显高于放射耐受细胞(图3)。

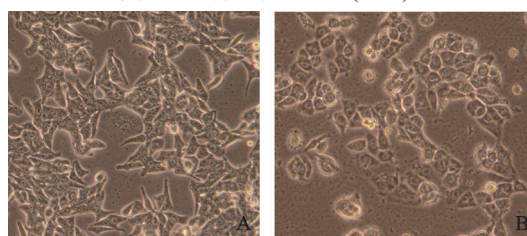


图1 SW620/R建立前、后的形态改变

Fig. 1 Morphological changes of SW620/R before and after establishment

A: SW620; B: SW620/R.

(×100)

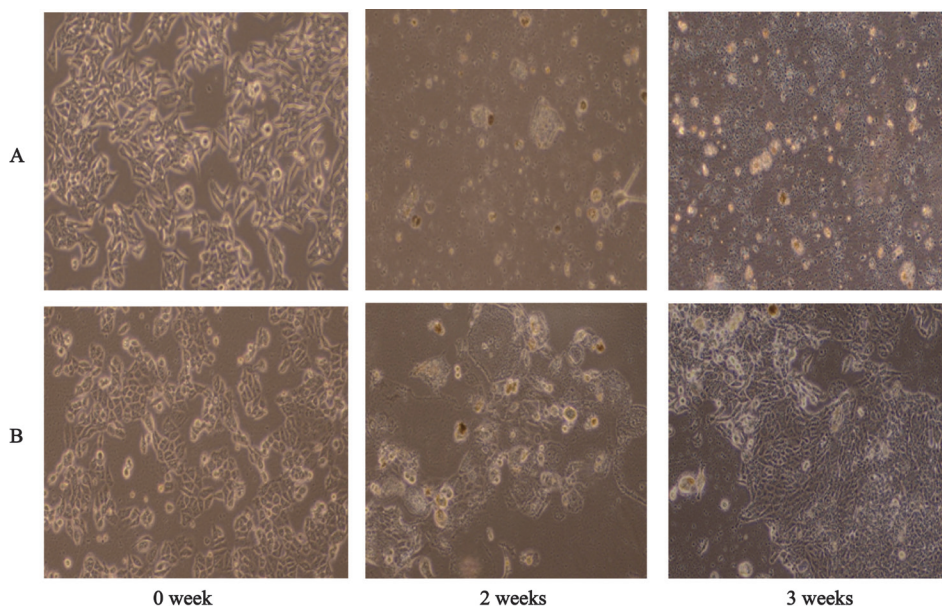


图2 SW620/R和SW620照射后的生长情况

Fig. 2 Growth of SW620/R and SW620 after illumination

A: SW620; B: SW620/R.

(×100)

2.5 细胞增殖能力比较

根据Patterson公式计算得到SW620和SW620/R的PDT分别为(28.08±0.82)h和(39.37±1.78)h，

延长约11.29 h，差异有统计学意义($t=12.78$, $P<0.05$, 图4)。说明亲本细胞SW620在增殖速度上明显快于放射耐受细胞株。

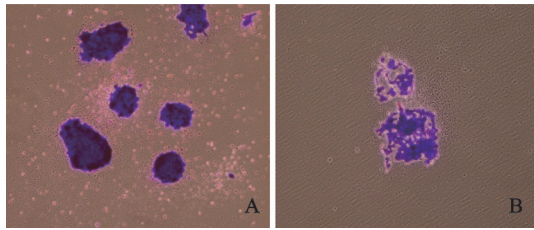


图3 SW620和SW620/R细胞染色后的镜下克隆
Fig. 3 Microscopic colony of SW620 and SW620/R after coloring

A: SW620; B: SW620/R.

2.6 照射前、后SW620与SW620/R细胞的周期分布

经检测发现, 与照射前SW620相比, SW620/R细胞G₀/G₁期比例不变, S期比例增加,

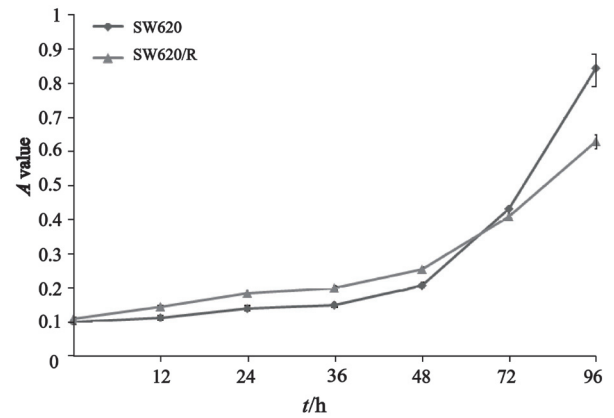


图4 SW620和SW620/R细胞生长曲线

Fig. 4 Cell growth curve of SW620 and SW620/R

G₂/M期比例减少($\chi^2=12.00, P<0.05$)。照射72 h后收集的2组细胞检测周期可见, 亲本细胞周期在G₀/G₁期出现了明显的周期阻滞, 而SW620/R未出现明显的细胞周期阻滞现象(图5)。

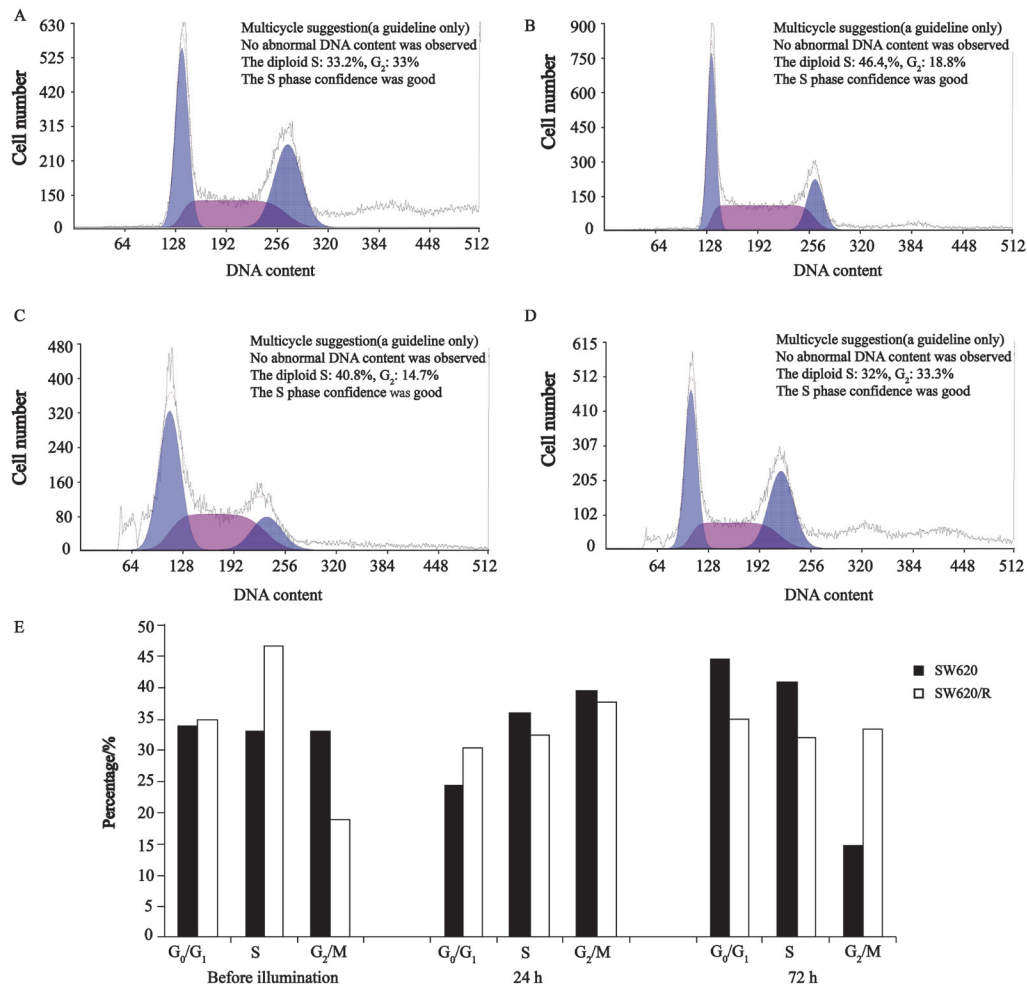


图5 SW620和SW620/R照射前、后细胞周期分布

Fig. 5 Cell cycle distribution of SW620 and SW620/R before and after illumination

A: SW620 (before illumination); B: SW620/R (before illumination); C: SW620 (72 h); D: SW620/R (72 h); E: Cell cycle chart (%).

2.7 照射前、后SW620与SW620/R细胞的凋亡情况比较

经统计比较发现，正常状态下SW620与SW620/R的凋亡率差异无统计学意义(7.3% vs 2.4%, $P>0.05$), 而照射9 Gy剂量射线72 h后检测结果显示SW620的凋亡率明显高于SW620/R(24.8% vs 8.3%), 可见照射一定剂量射线后, 亲本细胞的凋亡率显著升高, 放射耐受能力明显不如耐受细胞株(图6)。

2.8 平板克隆形成实验检测细胞放射敏感性

经不同剂量的射线照射后, 计算2组细胞的存活分数, 观察发现照射剂量达到7 Gy时, 与亲本细胞相比, SW620/R的放射敏感性显著降低($t=22.44$, $P<0.01$), 2组细胞的存活分数采用单击多靶模型进行拟合, 剂量-效应拟合曲线见图7。SW620细胞拟合公式: $SF=1-(1-e^{-D/1.06})^{18.15}$ ($R^2=0.9992$, $P<0.05$); $D_0=1.06$; $N=18.15$; $D_q=1.33$; SW620/R细胞拟合公式: $SF=1-(1-e^{-D/1.19})^{22.62}$ ($R^2=0.999$, $P<0.05$); $D_0=1.19$; $N=22.62$; $D_q=1.61$ 。

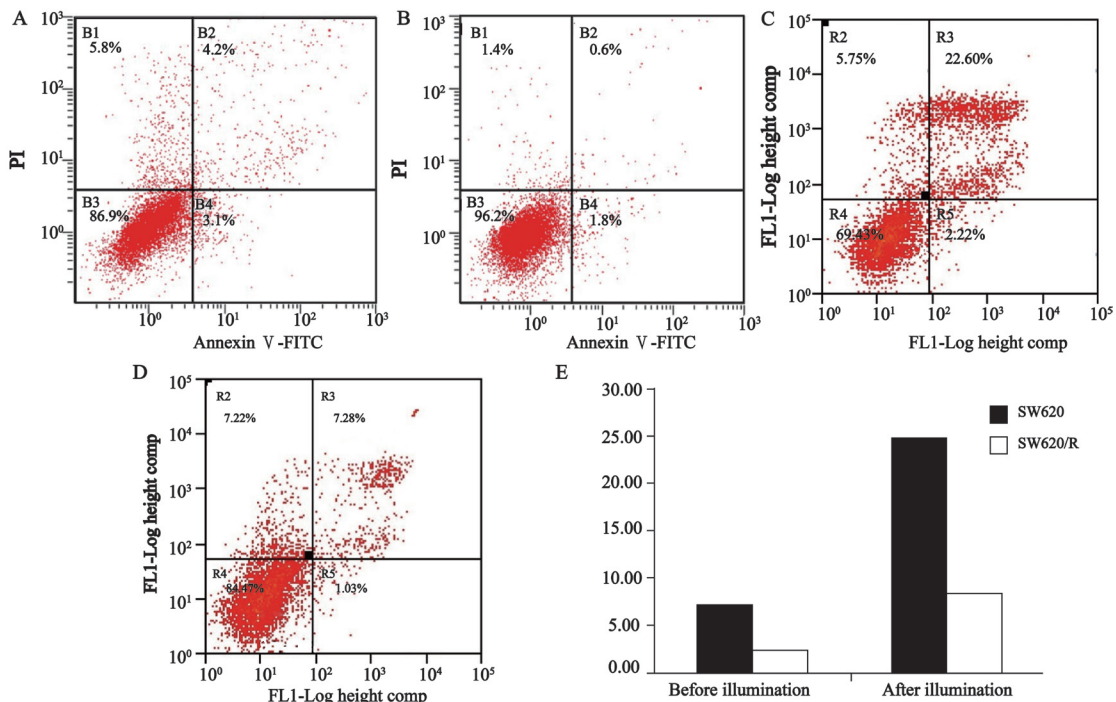


图6 照射前、后SW620和SW620/R细胞的自发凋亡率

Fig. 6 Spontaneous apoptosis of SW620 and SW620/R before and after illumination

A: SW620 (before illumination); B: SW620/R (before illumination); C: SW620 (after illumination); D: SW620/R (after illumination); E: Cell Spontaneous apoptosis chart(%).

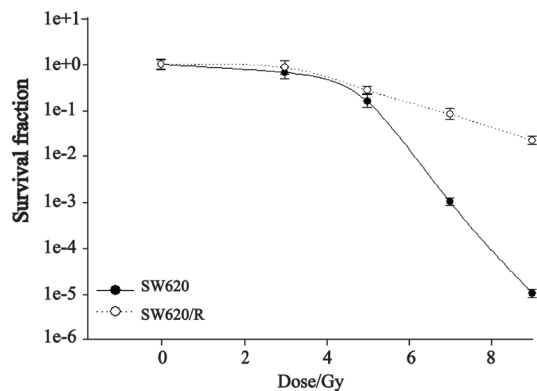


图7 SW620和SW620/R细胞存活曲线

Fig. 7 Cell survival curve of SW620 and SW620/R

3 讨论

放疗与手术切除的联合治疗在结直肠癌的治疗中越来越受到重视, 由于肿瘤细胞内存在放射敏感性的差异, 往往在同一放射治疗条件下会产生不同的治疗效果^[4]。如果能够阐明放射耐受形成的机制及放射耐受形成与照射剂量的关系, 就能设计出相应的解决方案, 提高肿瘤治疗的疗效^[5]。国内、外已经建立了多株放射耐受对比细胞模型^[6-7], 并对其放射耐受机

制做了初步的研究。本研究通过梯度递增照射剂量的诱导方法成功建立了具有稳定放射耐受能力的细胞亚株SW620/R, 从而为进一步研究结肠癌放射耐受机制提供了实验模型。

已建立的放射耐受细胞亚株SW620/R进行传代培养^[8], 经历时间约为4周, 此时生物学性状基本稳定。本研究结果显示, SW620/R与其亲本细胞SW620无论在细胞形态上, 还是克隆形成能力以及细胞倍增时间上都存在显著差异。通常情况下, 增殖速度较快的细胞株具有更高的放射敏感性, 反之, 增殖速度较慢的细胞群体对射线相对不敏感^[9], 这与实验所得到的SW620在克隆形成和增殖能力方面明显强于SW620/R的结论是一致的。

本研究采用多靶单击模型进行细胞放射敏感性的分析^[10], 从拟合2组细胞的生存曲线得到的放射学参数可以发现, 相比其亲本细胞, SW620/R的放射敏感性显著降低, 这与2组细胞在相同剂量射线照射后观察细胞生长情况所得的结果(亲本细胞几乎完全死亡, 放射耐受细胞继续生长)也是一致的, 从而进一步说明了所构建的细胞株是具有一定放射抗拒性的^[11], 并且该抗拒性能够稳定传代。

已有研究表明, G₂/M期细胞对射线最敏感, G₁期细胞次之, S期细胞对射线最抗拒, 如果不敏感期的细胞比例增加, 那么细胞在射线照射时更有可能表现出抗拒性。本研究检测2组细胞的周期后可以发现, 在射线照射前, 与亲本细胞相比放射耐受细胞SW620/R的S期细胞比例明显增加, 而G₂/M期细胞比例明显减少, 这与细胞凋亡实验检测得到的结果(亲本细胞的自发凋亡率显著高于耐受细胞)是一致的。因此, 可以大胆推测放射耐受细胞株细胞S期细胞比例增加可能是其增强自身放射抗拒能力的一种途径之一^[12]。此外, G₁期阻滞是p53表达阳性的细胞辐射后细胞周期的主要反应, 在本研究中, 在射线照射后, p53表达阳性的亲本细胞SW620出现了明显的G₁期阻滞现象, 而放射耐受细胞SW620/R则未出现明显的周期阻滞, 这可能是两者在p53的表达上有差异而引起的, 因

此, 推测p53的表达可能与SW620/R的放射耐受机制相关, 可以对其进行进一步的研究。

综上所述, 本研究通过梯度递增照射剂量的诱导方法成功构建了一株放射耐受细胞亚株SW620/R, 该细胞亚株传代4周后所进行的相关研究表明该细胞的放射抗拒能力是可以稳定传代的, 并且推测该细胞S期细胞比例的增加可能是其产生放射抗拒能力的诱因之一, 但是详细的放射耐受产生机制需要进一步的研究。

[参 考 文 献]

- [1] REBECCA S, JIEMIN M, ZHAOHUI Z, et al. Cancer Statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin, 2014: 1-21.
- [2] BRAENDENGEN M, TVEIT K M, BERGLUND A, et al. Randomized phase III study comparing preoperative radiotherapy with chemoradiotherapy in non-resectable rectal cancer [J]. J Clin Oncol, 2008, 26(22): 3687-3694.
- [3] YANG L, LU Z, MA X, et al. A therapeutic approach to nasopharyngeal carcinomas by DNazymes targeting EBV LMP-1 gene [J]. Molecules, 2010, 15(9): 6127-6139.
- [4] GERWECK L E, VIJAYAPPA S, KURIMASA A, et al. Tumor cell radiosensitivity is a major determinant of tumor response to radiation [J]. Cancer Res, 2006, 66(17): 8352-8355.
- [5] DE B F, LURAQHI P, MEDICO E, et al. Induction of MET by ionizing radiation and its role in radio resistance and invasive growth of cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 2011, 103(8): 645-661.
- [6] 孙明辉, 肖胜英, 刘爱群, 等. 人结肠癌放射抗拒性细胞株的建立 [J]. 中国癌症防治杂志, 2013, 5(1): 24-27.
- [7] 金问森, 孔肇路, 张江虹, 等. 放射耐受性肝癌细胞亚株的筛选与建立 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 2009, 29(6): 575-579.
- [8] MIHATSCH J, TOULANY M, BAREISS P M, et al. Selection of radioresistant tumor cells and presence of ALDH1 activity in vitro [J]. Radiother Oncol, 2011, 99(3): 300-306.
- [9] 万德森. 临床肿瘤学2版 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 134-146.
- [10] YIN W, YU Z H, XU G Z, et al. Radiation oncology (4th edition) [M]. Beijing: Peking Union Medical College Press, 2008: 235-237.
- [11] LIU Z Z, HUANG W Y, LIN J S, et al. Cell cycle and radio sensitivity of progeny of irradiated primary cultured human hepatocarcinoma cells [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(44): 7033-7035.
- [12] 柳友清, 刑辉, 韩晓兵, 等. 顺铂诱导宫颈癌SiHa细胞周期阻滞及凋亡的研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2006, 13(4): 248-251.

(收稿日期: 2014-08-06 修回日期: 2014-09-08)