

鬼臼乙叉苷对人鼻咽癌细胞 CNE₂的细胞毒作用和对 DNA 的断裂作用*

刘宗潮 谢冰芬 王理开 苏秀容 梁永钜 潘启超

(肿瘤研究所抗癌药物研究室)

提 要 作者用噻唑蓝还原 (MTT) 法测定了鬼臼乙叉苷 (鬼臼乙叉甙, VP-16) 对人体鼻咽癌细胞 CNE₂ 的毒性作用, 在药物浓度为 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0 和 160.0 $\mu\text{g/ml}$ 的条件下, 连续 4 次实验, VP-16 对 CNE₂ 细胞的生长抑制率分别为 $3.3 \pm 3.7\%$, $15.2 \pm 3\%$, $36.1 \pm 10\%$, $54 \pm 17\%$, $68.4\% \pm 13\%$, $76.7 \pm 9\%$ 和 $84.2 \pm 8\%$, 其半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $17.0 \mu\text{g/ml}$ 。CNE₂ 细胞分别在含有 20.0, 100.0 和 200.0 $\mu\text{g/ml}$ VP-16 的培养液中孵育 24 h, 细胞的 DNA 发生了断裂。DNA 断裂量随药物浓度的增加而增加。将 CNE₂ 细胞放入含 200.0 $\mu\text{g/ml}$ VP-16 的培养液中孵育 6 h, 12 h 和 24 h, 发现各时间点的 DNA 均发生了断裂。断裂程度随时间的增长而增加, 未经药物处理的对照细胞的 DNA 未见断裂现象。经用 50.0, 100.0, 200.0 和 400.0 $\mu\text{g/ml}$ VP-16 处理的 CNE₂ 细胞的拓扑异构酶 I 能诱导超螺旋 pBR322 质粒 DNA 断裂成线状 DNA, 断裂程度与药物的浓度相平行。

关键词 鼻咽癌细胞株; 鬼臼乙叉苷; DNA 拓扑异构酶 I; 细胞毒作用; pBR322 质粒 DNA

中图分类号 R979.1; R739.63; Q751

鼻咽癌是华南各省, 特别是广东的常见恶性肿瘤, 为了更好地研究鼻咽癌的发生、发展转归和疗效, 人们已成功地将人鼻咽癌组织培养成细胞株。我国先后培养的鼻咽癌细胞株有 CNE₁, CNE₂, HNE₁, HNE₂, HNE₃, HONE₁; 我国台湾省培养出 CG-1, NPCTW 039, NPCTW 076; 香港培养出 HK1。这些细胞株均为鼻咽癌的上皮细胞株。鬼臼乙叉苷 (鬼臼乙叉甙, VP-16) 是 DNA 拓扑异构酶 II 的强力抑制剂^[1~4], 是临床上用来治疗肺癌、睾丸癌、恶性淋巴瘤等有效的药物, 但不常用于治疗鼻咽癌。为了为鼻咽癌的治疗提供科学依据, 本文用 VP-16 作用于 CNE₂ 细胞株来观察药物对 CNE₂ 细胞的细胞毒作用, 对细胞 DNA 的损伤作用以及对 CNE₂ 细胞拓扑异构酶 I 活力的抑制作用。

材 料 与 方 法

材料来源 CNE₂ 细胞由广东医学院提供, 由本实验室传代。鬼臼乙叉苷 (VP-16) 由江苏省连云港制药厂生产, 批号 920374。

鬼臼乙叉苷对 CNE₂ 细胞的毒性作用 本实验按照 Pieters 等人^[5]所描述的噻唑蓝还原法 (MTT 法) 的程序进行。

VP-16 对 CNE₂ 细胞的处理 取呈对数生长的 CNE₂ 细胞, 倾出培养液后加入胰酶消化。加入适量的 1640 培养液, 经镜下计算, 稀释成浓度为 1×10^6 个/ml 的细胞悬液, 分装若干小瓶, 每瓶 5 ml。对照组加入生理盐水, 其余 3 瓶加入 VP-16, 使其最终浓度为 20.0, 100.0 和 200.0 $\mu\text{g/ml}$, 在 37℃ 温箱培养 24 h; 若各瓶 VP-16 的浓度均为 200.0 $\mu\text{g/ml}$, 则在 37℃ 温箱分别孵育 6 h, 12 h 和 24 h。在各时间点同时取出对照瓶和药物处理瓶, 暂放入 4℃ 冰箱保存。

CNE₂ 细胞 DNA 的提取与观察 将上述经药物处理以及对照的细胞集中, 经离心, 用

* 本文由卫生部科学基金资助, 第 3 作者单位为
本校生物化学教研室

PBS(-)缓冲液^[6]洗涤,再离心得细胞团块。加入0.5ml TE 缓冲液重新悬浮细胞,加入7倍体积的细胞裂解液(含0.5mol/L EDTA-Na₂,0.5% SDS, 50mmol/L Tris-HCl, pH8),蛋白酶 K,充分摇匀,在50℃水浴中保温4h,离心取上清液,加入预冷的无水乙醇和乙酸钠溶液。置-20℃冰箱沉淀过夜。离心15 000 r/min 30min,去上清得含 DNA 的沉渣,用等量的 TE 缓冲液溶解 DNA。每份标本吸取 20 μl DNA 溶液,加入 5 μl BGS (含 0.05% BPS, 2% 甘油和 2% SDS)。标本点入预先浸没在 TBE 电泳液^[7]中的 0.7% 琼脂糖凝胶的储液槽中,电泳 5~6 h。将电泳后的琼脂糖凝胶放入溴乙锭溶液中染色后移至紫外线灯下观察 DNA 的电泳区带并摄影保存。

质粒 pBR 322 DNA 的制备 质粒 pBR322 DNA 是按照 Staudenbaur 所描述的方法^[8],从带有 pBR 322 DNA 质粒的 E.Coli HB101 大肠杆菌中提取。

DNA 拓扑异构酶 I 的提取 取呈对数生长的 CNE2 细胞,倾去培养液,用胰酶消化,离心 3 000 r/min 3 min,再用 BPS(-)缓冲液洗涤 2 次,离心得细胞团块,湿重约 0.3g,加入酶提取液(含 50 mol/L Tris-HCl, pH7.5, 1mmol/L EDTA, 1mmol/L PMSF, 10mmol/L β-巯基乙醇),用超声波破碎细胞,离心 15 000 r/min 15 min。取上清(含 DNA 拓扑异构酶 I),置 4℃ 冰箱待用。

拓扑异构酶 I 中介 DNA 断裂的测定 混

合反应液 20 μl (含 50mmol/L HEPES pH7, 50 mmol/L KCl, 100 mmol/L NaCl, 0.1 mmol/L EDTA, 10mmol/L MgCl₂, 1mmol/L ATP, 50 μg/ml BSA, 0.4 μg pBR 322 DNA, 不同浓度的 VP-16 和等量的酶液)。在 37℃ 水浴保温 20min 后加入 2 μl 4 mg/ml 蛋白的 K 溶液,混合后在 50℃ 水浴保温 30 min,加入 5 μl BGS 溶液终止反应。标本点入预先浸没在 TBE 电泳液的 1% 琼脂糖凝胶的小槽中,在 3.5 V/cm 的电压下电泳 14 h,用溴乙锭染色后在紫外线灯下观察 DNA 的电泳区带并摄影保存。

结 果

鬼臼乙叉苷对 CNE₂ 细胞的细胞毒作用 用药物浓度为 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0 和 160.0 μg/ml 的 VP-16 处理 CNE₂ 细胞 48 h,细胞生长受到不同程度的抑制,连续 4 批实验的平均抑制率分别为 3.3±3.7%, 15.2±3%, 36.1±10%, 54±17%, 68.4±13%, 76.7±9% 和 84.2±8% (附表)。抑制率随药物浓度的增大而增加;药物浓度大于 40.0 μg/ml 时,抑制率上升变慢。药物浓度增至 160.0 μg/ml,与 40 μg/ml 相比已增加 4 倍,仍未能完全抑制细胞的生长。将药物的浓度换算成对数,细胞生长抑制百分率换算成机率。用对数机率图解法测得 CNE₂ 细胞培养 48 h 的半数生长抑制浓度(IC₅₀)为 17.0 μg/ml。

附表 不同浓度 VP-16 对 CNE₂ 细胞生长的抑制率(%)

批 数	2.5	5.0	10.0	20.0	40.0	80.0	160.0
1	8.6	16.2	30.5	46.7	63.8	72.4	77.1
2	2.0	10.2	24.5	33.7	53.1	66.3	77.6
3	0	16.5	44.3	67.6	81.0	87.3	93.3
4	2.5	17.9	44.9	67.9	75.6	80.8	88.5
$\bar{x} \pm s$	3.3±3.7	15.2±3.0	36.1±10	54±17	68.4±13	76.7±9	84.2±8

VP-16 浓度单位为 μg/ml, IC₅₀ = 17 μg/ml

鬼臼乙叉苷对 CNE2 细胞 DNA 的损伤作用

将不同药物浓度处理的 CNE2 细胞, 分别提取其 DNA 并作琼脂糖凝胶电泳, 电泳结果见图 1。图 1 中, A 道用生理盐水处理作对照, B-D 道的药物浓度依次为 20.0, 100.0 和 200.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。从图中可以看出, 未受药物处理的对照细胞的 DNA 未受到损伤断裂, 保持大分子状态, 电泳以后部分 DNA 仍停留在原点, 部分 DNA 移动缓慢而停留在离原点不远处; 低浓度药物处理的 DNA 已出现轻微的损伤断裂, 大分子的 DNA 开始减少, 出现少量电泳时移动较快的小片段 DNA (B 道); 100.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理的 DNA 已受到严重的损伤, 大部分 DNA 链发生断裂成为小片段 DNA, 电泳时移动快离开了原点 (C 道); 200.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 药物处理的细胞, 不但 DNA 发生严重的断裂水解, RNA 也发生了断裂水解。电泳时小片段的 DNA 和 RNA 跑出了琼脂糖凝胶之外, 只留下少许的 DNA 碎片停留在琼脂糖凝胶内 (D 道)。3 次重复实验所得结果一致。

当用一个固定的药物浓度 (200.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 处理 CNE2 细胞, 但处理时间长短不同, 然后分别提取其 DNA 作琼脂糖凝胶电泳, 电泳结果见图 2。图 2 中, A-C 道为未经药物处理的对照, 细胞培养时间分别为 6 h, 12 h 和 24 h; D-F 道均用 200.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ VP-16 处理, 处理细胞时间分别为 6 h, 12 h 和 24 h。从图中可以看出, 未经药物处理的各时间点的 DNA 仍保留大分子状态, 电泳后仍停留在原点或只移动到离原点不远处 (A-C 道); 药物处理 6 h 的细胞, 有部分 DNA 已断裂成长短不一的小片状 DNA, 电泳后 DNA 碎片呈涂片状 (D 道); 药物处理 12 h 的 DNA 大部分发生了断裂水解, 处在原点的大分子 DNA 进一步减少, 移行速度较快的小片状 DNA 增加 (E 道); 药物处理 24 h 的 DNA 绝大部分发生了断裂, 并断裂成更小片状的 DNA, 致使 F 道残留的 DNA 片段更为减少。2 次重复得相同的结果。

拓扑异构酶 II 中介的 DNA 断裂 在 VP-

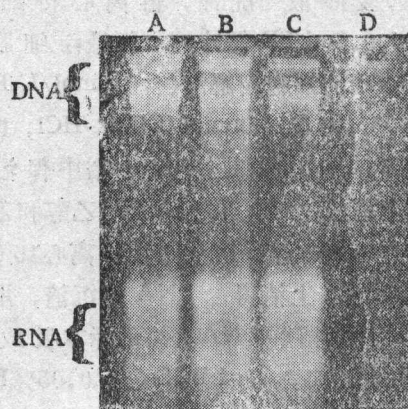


图 1 CNE2 细胞 DNA 的损伤作用
与药物浓度的关系

A 生理盐水处理作对照, B-D, VP-16
的浓度依次为 20.0, 100.0 和 200.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$

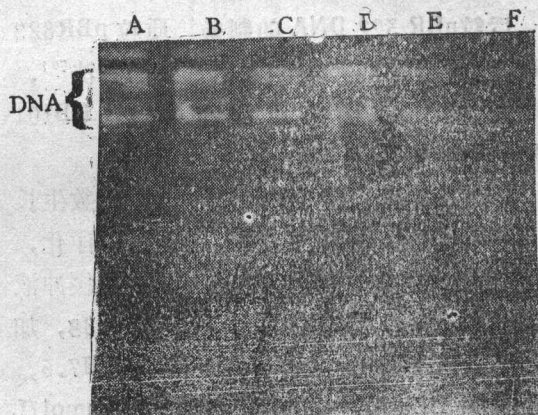


图 2 CNE2 细胞 DNA 的断裂
与药物作用时间的关系

A-C 分别为生理盐水对照, D-F 分别用
200.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 VP-16 处理, A 和 D 作用时
间为 6h, B 和 E 为 12h, C 和 F 为 24 h

16 的存在下, 测定了受 CNE2 细胞拓扑异构酶 II 所中介的 pBR322 DNA 的断裂作用。结果如图 3 所示。图 3 中 A 道为未经酶和药物作用的 pBR322 DNA, 有 3 种类型: ①Form I 为双链闭环超螺旋 DNA, 体积小, 在电泳中移动速度快而远离原点; ②Form II 为双链闭环松弛的 DNA, 体积大, 移动最慢, 离原点最近; ③Form III 为线状 DNA, 移动速度介于 Form I 和 Form II 之间。B 道有酶无药, Form

I DNA 受酶作用后绝大部分转变为 Form II, 小部分为 Form III。与其他道相比, B道的 Form II 含量最多。C-F 道除了含有和B道相同浓度的酶以外, 还分别含有 50.0, 100.0, 200.0 和 400.0 $\mu\text{g/ml}$ VP-16。结果 Form I 已全部消失, 或者转变成 Form II 或者转变为 Form III。后者是断裂的线状 DNA。随着药物浓度的增加, 在酶的中介作用下, 转变为 Form III 的量逐渐增加而转变为 Form II 的量相应减少。表明有越来越多的 DNA 被断裂成线状的 DNA。拓扑异构酶 II 具有断裂—重接 DNA 的活性。线状 DNA 的增加是药物对酶的连结活性产生不同程度抑制的结果。

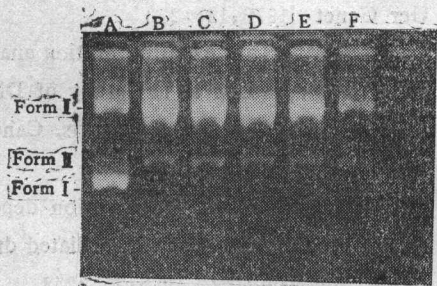


图3 不同药物浓度对拓扑异构酶 II 中介的 DNA 断裂作用

A 为无酶无药, B 有酶无药, C-F 除含有与 B 等量的酶外, 依次含有 50.0, 100.0, 200.0 和 400.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 VP-16

讨 论

鬼臼乙叉苷是近几年来很受临床重视的抗癌药物, 被用来治疗肺癌、睾丸癌、恶性淋巴瘤等人体肿瘤。有关治疗鼻咽癌的报道甚少。本实验测定了 VP-16 对人鼻咽癌细胞 CNE2 的毒性作用。实验表明 VP-16 对 CNE2 细胞有强力的毒性作用。IC₅₀ 为 17.0 $\mu\text{g/ml}$ 。当药物浓度增至 40.0 $\mu\text{g/ml}$ 以上时, 细胞生长抑制百分率上升较慢。药物浓度大至 160.0 $\mu\text{g/ml}$ (为 IC₅₀ 的 9.4 倍) 仍未能杀灭全部细胞。这种现象或是由于部分 CNE2 细胞处于 G₀ 期, 这些细胞对 VP-16 不敏感; 或是由于 CNE2 细胞株存有不同的细胞亚群, 对药物敏感的细胞被杀死, 而不敏感的细胞仍然活存。有待进一步探

讨。

Kohn 等人^[9]将受药物作用的细胞的 DNA 进行碱性洗脱, 使用液体闪烁计数器测定被同位素标记的滞留在滤膜上未断裂 DNA 及已断裂 DNA (可通过滤膜部分) 的 cpm 值, 以此估价 DNA 的断裂程度。这种方法的实验步骤繁琐, 需要同位素及高值的液体闪烁计数器。本实验从受药物作用的细胞中提取 DNA 作琼脂糖凝胶电泳。方法简便, 不必要求高值仪器, 从电泳区带中可看出 DNA 损伤和断裂的程度。实验显示 VP-16 的浓度为 20 $\mu\text{g/ml}$ 时, 只能导致 DNA 轻度损伤, 药物浓度增至 100.0 $\mu\text{g/ml}$ 时, DNA 发生严重断裂; 增至 200.0 $\mu\text{g/ml}$ 时, 几乎全部 DNA 和大部分 RNA 均发生断裂。提示细胞受到高浓度 VP-16 作用以后, 其 DNA 遭受到严重的损伤。当药物的浓度固定时, 药物作用时间越长, DNA 断裂越多。提示长时间保持肿瘤组织中高的药物浓度有可能提高临床疗效。

为什么在高剂量 VP-16 作用后, RNA 亦发生断裂损伤? 原因尚未清楚。或是高浓度的药物对 RNA 有直接的损伤作用; 或是细胞死亡后, RNA 受到 RNA 酶的分解所致。值得进行探讨。

本实验中 VP-16 对 CNE2 的 IC₅₀ 为 17.0 $\mu\text{g/ml}$ 。药物浓度为 20.0 $\mu\text{g/ml}$ 时, 细胞生长抑制率为 54%, 即受抑制的细胞已超过一半。在 VP-16 对细胞 DNA 损伤作用的实验中, 当药物浓度为 20.0 $\mu\text{g/ml}$, 只有少量的 DNA 发生断裂 (图 1)。出现这些不平行的情况是否可以说, 受药物抑制的细胞不一定就有 DNA 的断裂, 或某股 DNA 发生了少量断裂, 当药物除去或失效以后, DNA 的裂口经修复酶的修复, 细胞仍然可以活存。

Ross 等人^[12]用同位素 ³²P 标记的 DNA 来观察药物存在下, 拓扑异构酶 II 中介的 DNA 断裂作用。后来 Sullivan 和 Ross^[10]用未标记的超螺旋 pBR322 DNA 来观察药物存在下拓扑异构酶 II 中介的 DNA 断裂作用。前法实验步骤复杂, 但能读出 DNA 断裂的各个片段和

各片段的分子量;后法手续较简便,但只能看出单条线状 DNA 的电泳区带。本实验采用后一种方法,结果与 Sullivan 和 Ross 的实验结果一致。线状 DNA 的含量随 VP-16 浓度的增加而增加。

(本实验的照片由潘伟光主管技师协助摄影和放大,特表谢意)

参 考 文 献

1. Wozniak AJ, et al. Inhibition of etoposide-induced DNA damage and cytotoxicity in L1210 cells by dehydrogenase inhibitors and other agents. *Cancer Res* 1984;44: 626
2. Ross WE, et al. Role of topoisomerase II in mediating epipodophyllotoxin-induced DNA cleavage. *Cancer Res* 1984;44: 5857
3. Thurston LS, et al. Antitumor agents. 78. Inhibition of human DNA topoisomerase II by podophyllotoxin and α -peltatin analogues. *J Med Chem* 1986;29:1547
4. Lonr U, et al. Altered formation of DNA in human cells treated with inhibitors of DNA topoisomerase II (etoposide and teniposide). *Cancer Res* 1989;49:6202
5. Pieters R, et al. Adaptation of a rapid tetrazolium based(MTT) assay for chemosensitivity testing in childhood leukaemia. *Cancer Lett* 1988; 41:323
6. 大星章一, 菅野晴天 主编[日]. 吴政安, 王永潮(译). 人癌细胞培养. 北京:科学出版社, 1979:16~17
7. 刘宗潮, 等. 博来霉素、平阳霉素和匹莱霉素对pBR₃₂₂DNA的非特异性断裂作用. *癌症* 1989;8(6):446
8. Staudenbauer W. Replication of small plasmids in extracts of *Escherichia*. *Mol Ger Genet* 1976;145:273
9. Kohn KW, et al. Alkaline elution analysis, a new approach to the study of DNA single-strand interruption in cells. *Cancer Res* 1973;33:1849
10. Sullivan DM, et al. Proliferation dependence of topoisomerase II mediated drug action. *Biochemistry* 1986;25:2248

(1992-11-21收稿 1993-07-28修回)

· 简 讯 ·

海峡两岸第一届中西医癌症防治研讨会在广州召开

由泰山公德会、中山医科大学肿瘤防治中心主办的海峡两岸第一届中西医癌症防治研讨会于1993年5月29日至31日在广州广东大厦召开。中央卫生部为大会发了贺电,台湾社会名流陈立夫老先生为大会题送墨宝。出席本次会议的代表有大陆各地癌症专家48位,台湾癌症专家12位,香港地区8位,还有1位来自美国。此外,广东各地的肿瘤专业医师和研究者100多名也列席参会。会议共收到论文60篇,会上交流40篇,内容涉及海峡两岸和香港地区癌症发病及防治研究的概况以及肝癌、肺癌、胃癌、大肠癌、鼻咽癌、乳腺癌、食管癌、白血病、淋巴瘤及儿童期肿瘤的病因而流行病学和诊治经验。会上还着重讨论了应用现代科学方法整理和研究中医中药理论与临床的问题。两岸同道们对癌症的研究工作已经深入到细胞和分子水平,利用分子生物学技术检查高危人群和临床诊断。

(万德森)

CYTOTOXIC AND DNA BREAKAGE EFFECT OF ETOPOSIDE ON HUMAN NASOPHARYNGEAL CANCER CELL LINE CNE₂

Liu Zongchao Xie Bingfen Wang Likai
Su Xiurong Liang Yongju Pan Qichao

(Department of Anticancer Drug Research, Cancer Institute)

The cytotoxic effect of DNA topoisomerase II inhibitor, etoposide (VP-16), on human nasopharyngeal cancer cell line(CNE₂) was determined using MTT assay method. The average inhibition rates of CNE₂ cell growth in four experiments were 3.3 ± 3.7 , 15.2 ± 3.0 , 36.1 ± 10 , 54 ± 17 , 68.4 ± 13 , 76.7 ± 9 and $84.2 \pm 8\%$ under the concentrations of 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0 and 160.0 $\mu\text{g/ml}$ of VP-16, respectively. The fifty percent inhibition concentration(IC₅₀) was calculated to be 17 $\mu\text{g/ml}$. After CNE₂ cells were incubated in culture media containing 20, 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ of VP-16 for 24 hours at 37°C, the cell DNA was extracted and electrophoresed on 0.7% agarose gel. It was found that VP-16 could induce DNA breakage. The degree of DNA breakage increased with increasing concentrations of VP-16. After CNE₂ cells were incubated in medium containing 200 $\mu\text{g/ml}$ of VP-16 for 6, 12 and 24 hours, respectively, the cell DNA was extracted and electrophoresed on 0.7% agarose gel. It was found that the degree of DNA breakage increased with increasing time of VP-16 treatment. DNA breakage of control untreated cells in different time points did not occur. DNA topoisomerase II from CNE₂ cells could induce supercoiled pBR322 plasmid DNA cleavage under concentrations of 50, 100, 200 and 400 $\mu\text{g/ml}$ of VP-16. In the presence of VP-16, topoisomerase II can induce the change of Form I (double chain supercoiled DNA) to Form II (double closed chain open circular DNA) or Form III (linear DNA). The amount of linear (Form III) DNA increased with increasing concentrations of VP-16.

Key words nasopharyngeal cancer cell line; etoposide; DNA topoisomerase II; cytotoxic effect; pBR322 plasmid DNA