

VPA-BSANPs 对胶质瘤细胞系放射生物效应

郭海娟 张伟 赵昕 侯华英 徐英 姜玉华

250033 济南, 山东大学第二医院肿瘤防治中心

通信作者: 姜玉华, Email: jiangyuhua@sdu.edu.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1004-4221.2017.04.019

【摘要】 目的 研究纳米 VPA-BSANPs 复合物对 C6、U87 胶质瘤细胞系的体外放射生物效应。方法 C6、U87 细胞分别经不同浓度 VPA、VPA-BSANPs 作用 12、24 h 后 MTT 法检测群体细胞存活率, 经不同浓度 VPA、VPA-BSANPs 联合 X 线 0、2、4、6、8 Gy 照射后克隆形成实验检测 PE 值, 经不同浓度 VPA、VPA-BSANPs 作用 12 h 后 X 线 0、4、8 Gy 照射应用 Annexin V-FITC/PI 双染法流式细胞术检测细胞凋亡情况。应用蛋白免疫印迹方法检测 VPA、VPA-BSANPs 对射线诱导细胞凋亡蛋白表达影响。多组均数检验方差齐性后用单因素方差分析, 两样本均数间进行 *t* 检验。结果 VPA、VPA-BSANPs 对 C6、U87 胶质瘤细胞并无明显增殖抑制作用 ($P=0.328, 0.920$); VPA-BSANP 联合照射的 PE 值明显低于 VPA 联合照射 ($P=0.000$)。C6、U87 细胞 VPA-BSANPs 联合照射的 p53、Bax 表达增加 (C6 细胞 $P=0.000, 0.000$ 和 U87 细胞 $P=0.010, 0.002$), Bcl-2 表达降低 (C6 细胞 $P=0.008, 0.000$), Caspase-3 激活片段仅见于 VPA-BSANPs+照射、VPA+照射, 且前者低于后者 ($P=0.004$)。PPAR 激活片段仅见于 VPA-BSANPs+照射。结论 VPA-BSANPs 可增加 C6、U87 胶质瘤细胞系放射生物效应, 其机制与定向促进 X 线诱导的肿瘤细胞凋亡有关。

【关键词】 组蛋白去乙酰化酶抑制剂; 丙戊酸钠; 细胞凋亡

基金项目: 山东省自然科学基金 (ZR2010HM080)

Radiobiological effects of VPA-BSANPs on C6 and U87 glioma cells Guo Haijuan, Zhang wei, Zhao Xin, Hou Huaying, Xu Ying, Jiang Yuhua

Cancer Prevention & Control Center, Second Hospital of Shandong University, Ji'nan 250033, China

Corresponding author: Jiang Yuhua, Email: Email: jiangyuhua@sdu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the radiobiological effects of VPA-BSANPs on C6 and U87 glioma cells *in vitro*. **Methods** C6 and U87 glioma cells were treated with different concentrations of VPA and VPA-BSANPs for 12 h and 24 h, and MTT assay was used to determine cell viability. C6 and U87 cells were treated with different concentrations of VPA and VPA-BSANPs combined with X-ray irradiation (0, 2, 4, 6, and 8 Gy), and colony formation assay was used to determine plating efficiency (PE). C6 and U87 glioma cells were treated with different concentrations of VPA and VPA-BSANPs for 12 h, followed by X-ray irradiation (0, 4, and 8 Gy), and flow cytometry using Annexin V-FITC/PI staining was used to examine cell apoptosis. Western blot was used to evaluate the effects of VPA and VPA-BSANPs on radiation-induced apoptosis protein expression. One-way ANOVA was used for comparison of means with homogeneity of variance between multiple groups, and the *t*-test was used for comparison of means between two groups. **Results** Without irradiation, VPA and VPA-BSANPs had no significant inhibitory effects on the proliferation of C6 and U87 cells ($P=0.328, 0.920$). The PE of cells treated with VPA-BSANPs combined with irradiation was significantly lower than that of cells treated with VPA combined with irradiation ($P=0.000$). In C6 and U87 cells, VPA-BSANPs combined with irradiation increased the expression of p53 and Bax ($P=0.000, 0.000$ and $P=0.010, 0.002$), but reduced the expression of Bcl-2 ($P=0.008, 0.000$). Active caspase-3 fragments were only found in the cells treated with VPA-BSANPs combined with irradiation and VPA combined with irradiation, but were less in the former cells than in the latter cells ($P=0.004$). The active fragments of peroxisome proliferator-activated receptor were only found in the cells treated with VPA-BSANPs combined with irradiation. **Conclusions** VPA-BSANPs can increase the radiosensitivity of C6 and U87 glioma cells *in vitro*, possibly by promoting the apoptosis of tumor cells induced by radiation.

【Key words】 Histone deacetylase inhibitors; Valproic acid; Apoptosis

Fund program: Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2010HM080)

研究表明组蛋白去乙酰化酶抑制剂能增强肿瘤细胞对放射的敏感性,其机制是诱导肿瘤细胞生长停滞和细胞凋亡^[1]。丙戊酸钠是一种很常见抗癫痫药,可以用来预防和治疗脑部肿瘤患者出现的癫痫症状,近年来发现丙戊酸钠是一种非常有效的组蛋白去乙酰化酶抑制剂^[2],可以增加结肠癌细胞对放射的敏感性^[3]。近年来,纳米技术成为肿瘤治疗的研究热点,由于其可定制性和多功能性^[4-6],纳米材料在肿瘤的靶向治疗中发挥着越来越重要的作用^[7-8]。叶酸是一种低分子量的维生素,在核苷酸生产所需的碳转移单元中起着重要的作用,由于其高稳定性,低免疫原性,无限的可用性,与有机和水溶剂的相容性,能够与许多分子共轭并且对载体尺寸的影响有限,我们选择叶酸作为功能性配体^[9]。此外叶酸受体是一种细胞增殖蛋白,在许多类型的肿瘤细胞中过度表达,包括乳腺癌、肾癌、头颈部肿瘤、肺癌、结直肠癌。既往研究证明 U87 来源于胶质母细胞恶性肿瘤,叶酸在此病理类型中属高度表达, C6 细胞属于星形细胞瘤,叶酸在此类型中属中度表达^[10]。所以本研究应用叶酸作为纳米材料将 VPA 包裹成复合物(VPA-BSANPs),观察丙戊酸钠与 VPA-BSANPs 对 C6、U87 胶质瘤细胞系体外放射敏感性的影响,为胶质瘤的放疗提供有力实验依据。

材料与方 法

1.材料:C6 大鼠胶质瘤细胞、U87 细胞(中国医学科学院协和细胞中心),丙戊酸钠、DMSO(购自美国 MP 生化公司),胎牛血清(美国 Hyclone 公司),DMEM 培养基、MTT(济南秀佰锐生物技术有限公司),胰蛋白酶(gibco 公司)、0.4% 台盼兰染液(日本 Takara 公司),兔抗大鼠 Caspase-3 抗体(美国 Bioworld 公司)。

2.VPA-BSANPs 制备:介孔二氧化硅纳米粒子是根据之前的研究制备的。制备过程包括获得介孔二氧化硅纳米粒子(MSNs)、苯并咪唑 MSNs 官能化、胺/苯并咪唑 MSNs 官能化合成、叶酸/苯并咪唑 MSNs 官能化合成、VPA 加载 FA/苯并咪唑 MSNs 制备,纳米粒子形态和介孔结构通过扫描电子显微镜和透射电子显微镜观察。具体制作见文献^[11]。

3.细胞培养和处理方法:使用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液在 37℃、5%CO₂、饱和湿度孵箱内培养 C6、U87 胶质瘤细胞,用 0.25%胰蛋白酶收集贴壁细胞。细胞培养瓶底放置 10 cm 固体水,用瑞典医科达公司直线加速器 6 MV X 线照射,源皮距

100 cm,机架角为 180°,剂量率为 3 Gy/min。

4.群体细胞 MTT 法测定:胰酶消化细胞后以每个孔(1~5)×10³ 细胞接种于 96 孔板,每孔加 200 μl 完全培养液;周边孔用等量 PBS 填充。置于孵箱中培养,待细胞贴壁后弃掉原培养液,分别加入含有 VPA、纳米材料(球)或 VPA-BSANPs 的新鲜培养液,分别设 12.5、25.0、50.0、100.0 mg/ml、pH=6 的 100.0 mg/ml 浓度,每个浓度分别设 6 个复孔,12、24 h 后每孔加 20 μl MTT (5 mg/ml)避光孵育 4 h,2500 r/min 离心 15 min 后弃培养液,每孔加 200 μl DMSO,充分混匀后置于摇床低速摇 10 min,使用酶联免疫检测仪 570 nm 测各孔吸光度(A 值),计算细胞抑制率[细胞抑制率(%)=(1-实验组 A 值/对照组 A 度值)×100%]。

5.克隆形成实验:根据实验处理因素将细胞分为 3 个:单纯照射、VPA-BSANPs (25、100 mg/ml、pH=6 的 100 mg/ml) 联合照射、VPA (50、100 mg/ml) 联合照射。每组根据放射剂量(0、2、4、6、8 Gy)不同分为 5 个组。对照组 100 个细胞/皿接种于 60 mm 培养皿,照射组及联合组分别接种 100、500、500、2000 个细胞于 60 mm 培养皿,用含 10%胎牛血清的完全培养基培养。24 h 后换不加药和加 VPA 或 VPA-BSANPs 的培养液继续培养 24 h,然后按剂量梯度给与照射,继续培养至培养皿中出现肉眼可见克隆时为止。经吉姆萨染色后显微镜下计数≥50 个细胞集落,计算 PE 值(PE=克隆数/接种细胞数×100%)。

6.流式细胞仪凋亡分析:将 C6、U87 细胞用胰酶消化后以 1×10⁶/ml 的浓度铺 6 孔板,每个孔加 2 ml,在 37℃、5%CO₂、饱和湿度孵箱内培养 24 h,贴壁后更换含 25、100 mg/ml 和 pH=6 的 100 mg/ml VPA-BSANPs 或 VPA 新鲜培养液,对照组加入 PBS,6 h 后照射 0、4、8 Gy,24 h 培养后胰酶消化收集细胞,1500 r/min 离心 10 min。PBS 冲洗 1 次,分别加入 5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI 溶液避光 4℃孵育 15 min。应用 Becton-Dickinson 流式细胞仪检测细胞凋亡,Modifit 软件分析数据。

7.蛋白免疫印迹法检测凋亡蛋白表达影响:将细胞用 PBS 洗两遍,加入 RIRP 裂解液在冰上 30 min,超声 3 次,≤5 s/次,12000 r/min 4℃离心 20 min。蛋白质用 BCA 量化分析后用 6%~15%聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白转移到硝化纤维膜上,5%牛奶 37℃封闭 2 h,将膜放入配好的一抗液中 4℃摇膜过夜。回收一抗,TBST 冲洗 3 次,每次 10 min,室温孵

育二抗 1 h, TBST 洗膜 3 次。配制一定量体积的 ECL 发光液, 加入到 PVDF 膜的表面, 然后放入到化学发光成像仪中。

8. 统计方法: 采用 SPSS 17.0 软件对多组均数检验方差齐性后用单因素方差分析, 两样本均数间进行双侧 *t* 检验。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. VPA、VPA-BSANPs 复合物对 C6、U87 胶质瘤细胞群体存活的影响: C6、U87 细胞分别经不同浓度 VPA、VPA-BSANPs 处理 12、24 h 后群体细胞存活率见图 1。从图 1 中可见药 VPA、VPA-BSANPs 对胶质瘤细胞 C6 和 U87 并无明显增殖抑制作用。

2. 克隆形成实验: 两种细胞不同剂量照射后的 PE 值见表 1。

3. 流式细胞术检测细胞凋亡率: C6、U87 胶质瘤细胞分别经 100 mg/L 的 VPA、VPA-BSANPs 作用 12 h 后, 经 0、4、8 Gy 的 X 线照射, VPA 药物组、VPA-BSANPs 药物组不照射, 应用 Annexin V-FITC/PI 双染法流式细胞术检测各组细胞凋亡情况; 右上和右下象限的总和代表细胞凋亡率。未经照射时 VPA、VPA-BSANPs 的细胞凋亡并不明显, 100 mg/L 的 VPA-BSANPs 的细胞凋亡率与对照组相比并无明显差异 (1.50% ± 0.16% : 1.20% ± 0.49%, *P* = 0.13)。当照射剂量为 4 Gy 时, 100 mg/L 纳米材料复合物组的细胞凋亡率与 VPA 组相比增加 [C6 细胞 (9.75% ± 0.26% : 0.68% ± 0.06%, *P* = 0.017)、U87

细胞 (8.71% ± 0.27% : 1.01% ± 0.10%, *P* = 0.017)]。

4. 蛋白免疫印迹检测 p53、Bax、Bcl-2、caspase-3 和 PPAR 表达: C6 细胞和 U87 细胞 VPA-BSANPs+照射 p53、Bax 表达增加 [C6 细胞 p53 1.072 ± 0.009 : 0.772 ± 0.009 (*P* = 0.000)、Bax 1.137 ± 0.018 : 0.823 ± 0.032 (*P* = 0.000) 和 U87 细胞 0.542 ± 0.035 : 0.438 ± 0.017 (*P* = 0.010)、0.686 ± 0.045 : 0.468 ± 0.02 (*P* = 0.002)], 而 Bcl-2 表达降低 [0.983 ± 0.034 : 1.22 ± 0.076 (*P* = 0.008) 和 0.562 ± 0.033 : 0.956 ± 0.007 (*P* = 0.000)]。VPA+照射与对照组相比细胞凋亡蛋白并无明显改变, 提示 VPA-BSANPs 与 VPA 相比具有更强的放射增敏作用。Caspase-3 的激活片段仅见于 VPA-BSANPs+照射、VPA+照射, 而且 VPA-BSANPs+照射表达量低于 VPA+照射 (0.018 ± 0.0009 : 0.066 ± 0.005, *P* = 0.004)。单独照射并未见 Caspase-3 的激活片段。PPAR 的激活片段仅见于 VPA-BSANPs 复合物+照射

讨 论

大量临床试验表明, VPA 可抑制双链 DNA 修复和诱导肿瘤细胞凋亡^[12], 进而增强中枢神经系统肿瘤对放射的敏感性。本研究用 FA-BSANPs 将 VPA 包裹成 VPA-BSANPs, 观察 VPA 与 VPA-BSANPs 对 C6、U87 胶质瘤细胞系的体外放射生物效应。药物浓度与细胞存活率的剂量反应曲线显示 VPA、VPA-BSANPs 对胶质瘤细胞 C6 和 U87 并无明显的增殖抑制作用; 克隆形成实验表明 VPA-

BSANPs 联合照射的 PE 比 VPA 联合照射低; 流式细胞术实验显示当照射剂量为 4 Gy 时 100 mg/L VPA-BSANPs 组的细胞凋亡率与 VPA 组相比增加; 蛋白免疫印迹实验显示 VPA-BSANPs 联合照射的 p53、Bax 表达增加, 而 Bcl-2 表达降低。通过以上研究证明 VPA-BSANPs 较 VPA 具有更强的放射生物效应。通过构建纳米体系, 可保证 VPA 在安全剂量下, 发挥对胶质瘤细胞的放射生物效应。

既往研究中通过调节 VPA 剂量来观察并验证了其对 C6 胶质瘤细胞放射增敏作用^[13], 虽然 VPA 是一种相对安全药物, 当浓度 > 100mg/L 时早期出现的神经

表 1 C6 和 U87 细胞 X 线不同剂量照射后的克隆形成率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

项目	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	<i>P</i> 值
C6 细胞						
单纯照射	58.2 ± 3.8	41.0 ± 2.7	26.2 ± 2.4	16.3 ± 2.1	9.3 ± 0.3	0.000
VPA-BSANPs+照射						
25 mg/ml	54.7 ± 1.3	39.4 ± 1.5	25.2 ± 2.5	15.2 ± 2.0	7.5 ± 0.6	0.000
100 mg/ml	52.8 ± 2.9	29.2 ± 1.5	12.8 ± 1.5	4.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1	0.000
pH=6 100 mg/ml	50.2 ± 3.6	25.4 ± 0.3	10.4 ± 0.4	4.8 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.000
VPA+照射						
50 mg/ml	55.1 ± 2.4	40.1 ± 1.9	26.3 ± 1.8	15.5 ± 1.9	7.8 ± 0.5	0.000
100 mg/ml	54.2 ± 4.3	37.8 ± 4.0	24.8 ± 2.4	14.4 ± 2.7	6.6 ± 0.5	0.000
U87 细胞						
单纯照射	60.2 ± 2.3	40.0 ± 2.1	27.6 ± 2.2	16.0 ± 1.0	9.2 ± 0.3	0.000
VPA-BSANPs+照射						
100 mg/ml	51.4 ± 2.1	29.2 ± 1.4	13.6 ± 2.2	7.7 ± 1.2	3.5 ± 0.8	0.000
pH=6 100 mg/ml	43.3 ± 3.0	19.8 ± 1.0	8.8 ± 0.5	3.1 ± 0.4	1.7 ± 0.3	0.000
VPA+照射						
50 mg/ml	56.2 ± 1.3	39.4 ± 1.5	25.8 ± 0.5	14.5 ± 0.5	7.69 ± 0.4	0.000
100 mg/ml	54.6 ± 1.1	34.7 ± 1.4	24.6 ± 0.9	12.8 ± 0.6	5.9 ± 0.2	0.000

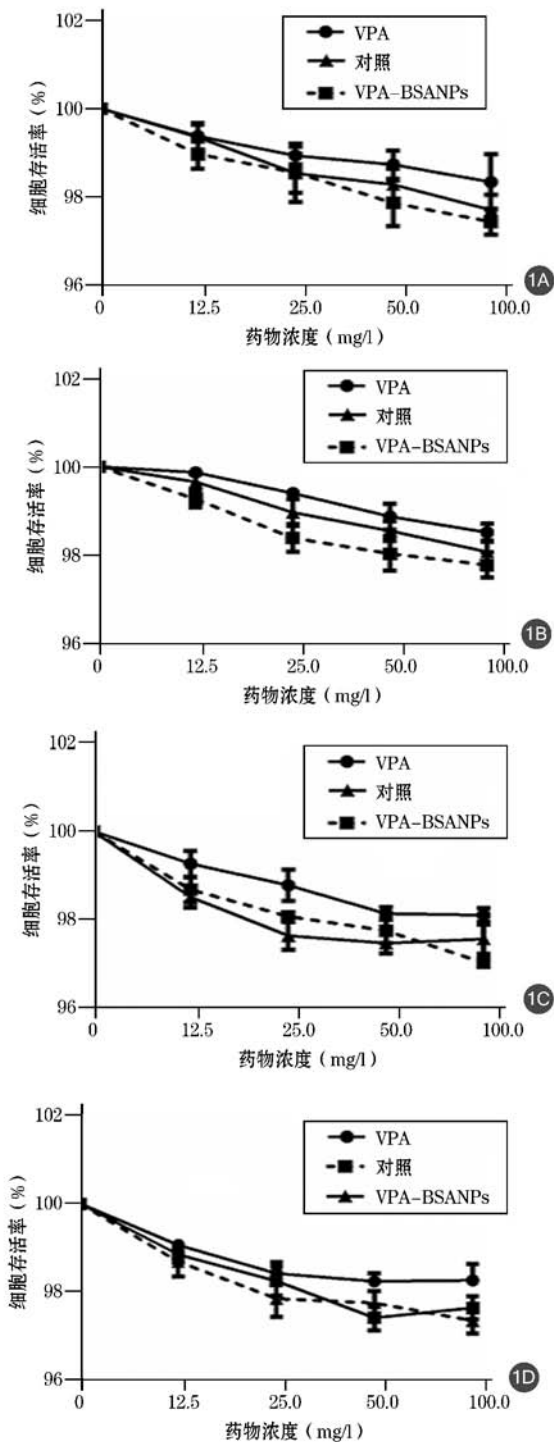


图 1 C6 细胞和 U87 细胞经不同浓度 VPA 和 VPA-BSANPs 处理 12 h 和 24 h 后的剂量反应曲线 (1A、1B、1C、1D 分别为 C6 细胞 12 h、U87 细胞 12 h、C6 细胞 24 h、U87 细胞 24 h)

毒性反应等严重限制了临床应用。本实验引入纳米技术,通过将纳米材料与 VPA 复合来提高其药物效果,并验证了纳米材料在辅助 VPA 对 C6、U87 胶质瘤细胞的积极作用。

总之,VPA-BSANPs 可增加 C6、U87 胶质瘤细

胞系放射生物效应,其机制与定向促进 X 线诱导的肿瘤细胞凋亡有关。

参 考 文 献

- [1] Hess-Stumpp H. Histone deacetylase inhibitors and cancer: from cell biology to the clinic [J]. *Eur J Cell Biol*, 2005, 84(2-3): 109-121. DOI: 10.1016/j.ejcb.2004.12.010.
- [2] Kostrouchová M, Kostrouch Z, Kostrouchová M. Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways [J]. *Folia Biol*, 2007, 53(2): 37-49.
- [3] Debeb BG, Xu W, Mok H, et al. Differential radiosensitizing effect of valproic acid in differentiation versus self-renewal promoting culture conditions [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010, 76(3): 889-895. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2009.09.052.
- [4] Luo Z, Ding XW, Hu Y, et al. Engineering a hollow nanocontainer platform with multifunctional molecular machines for tumor-targeted therapy *in vitro* and *in vivo* [J]. *ACS Nano*, 2013, 7(11): 10271-10284. DOI: 10.1021/nl404676w.
- [5] Kakuta T, Takashima Y, Nakahata M, et al. Preorganized hydrogel: self-healing properties of supramolecular hydrogels formed by polymerization of host-guest-monomers that contain cyclodextrins and hydrophobic guest groups [J]. *Adv Mater*, 2013, 25(20): 2849-2853. DOI: 10.1002/adma.201205321.
- [6] Peng LL, Peng X, Liu BR, et al. Ultrathin two-dimensional MnO₂/graphene hybrid nanostructures for high-performance, flexible planar supercapacitors [J]. *Nano Lett*, 2013, 13(5): 2151-2157. DOI: 10.1021/nl400600x.
- [7] Taratula O, Kuzmov A, Shah M, et al. Nanostructured lipid carriers as multifunctional nanomedicine platform for pulmonary co-delivery of anticancer drugs and siRNA [J]. *J Control Release*, 2013, 171(3): 349-357. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.04.018.
- [8] Park S, Kang S, Chen XY, et al. Tumor suppression via paclitaxel-loaded drug carriers that target inflammation marker upregulated in tumor vasculature and macrophages [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(2): 598-605. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.004.
- [9] Schroeder JE, Shweky I, Shmeeda H, et al. Folate-mediated tumor cell uptake of quantum dots entrapped in lipid nanoparticles [J]. *J Control Release*, 2007, 124(1-2): 28-34. DOI: 10.1016/j.jconrel.2007.08.028.
- [10] 吴海涛, 占益平, 曲彦明, 等. 叶酸受体 α 在人脑胶质瘤组织中表达及其临床意义 [J]. *中华外科杂志*, 2014, 52(3): 202-207. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5815.2014.03.011.
Wu HT, Zhan YP, Qu YM, et al. Changes of folate receptor- α protein expression in human gliomas and its clinical relevance [J]. *Chin J Surg*, 2014, 52(3): 202-207. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5815.2014.03.011.
- [11] Zhang HL, Jiang WH, Zhao SG, et al. Neuronal selective targeting, protection and signaling network analysis via dopamine-mediated mesoporous silica nanoparticles [J]. *Med Chem Comm*, 2015, 6(7): 1117-1129.
- [12] Chinnaiyan P, Cerna D, Burgan WE, et al. Postradiation sensitization of the histone deacetylase inhibitor valproic acid [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(17): 5410-5415. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0643.
- [13] 牛俊婕, 王晗, 徐英, 等. 丙戊酸钠增强大鼠胶质瘤 C6 细胞放射敏感性的体外实验 [J]. *山东大学学报 (医学版)*, 2013, 51(6): 15-19. DOI: 10.6040/j.issn.1671-7554.2013.06.004.
Niu JJ, Wang H, Xu Y, et al. Sodium valproate enhances *in vitro* radiosensitivity of C6 cell glioma in rats [J]. *J Shandong Univ (Health Sci)*, 2013, 51(6): 15-19. DOI: 10.6040/j.issn.1671-7554.2013.06.004.