

# 低温等离子体联合辐射对三种癌细胞系放射增敏效应的研究

胡超 钱丹琪 秦颂兵 叶超 周菊英

**【摘要】 目的** 探讨低温等离子体对人肝癌细胞系 HepG2、非小细胞肺癌细胞系 A549 及人宫颈癌细胞系 HeLa 的放射增敏作用及其机制。**方法** 应用克隆形成实验观察低温等离子体对 3 种细胞的放射增敏作用;流式细胞仪分析 3 种细胞周期分布、凋亡率及活性氧含量;Western blot 法检测单纯照射(R 组)、单纯等离子体作用(P 组)及其联合辐射(P + R 组)对 3 种细胞中 Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达的影响。**结果** 低温等离子体对 HepG2、A549 及 HeLa 细胞均有放射增敏作用,放射增敏比( $SER_{D_{01}}$ )分别为 1.28、1.32、1.29。HepG2、A549 及 HeLa 细胞 P + R 组  $G_2/M$  期比例、凋亡率及活性氧含量与 R 组比较均明显增高( $t_{G_2/M}$  = 9.52、8.24、9.53,  $P < 0.05$ ;  $t_{凋亡率}$  = 10.67、38.56、6.74,  $P < 0.05$ ;  $t_{活性氧含量}$  = 9.41、15.42、13.53,  $P < 0.05$ )。HepG2 和 A549 细胞 P + R 组  $G_2/M$  期比例、凋亡率及活性氧含量与 P 组比较均明显升高( $t_{G_2/M}$  = 8.75、20.37,  $P < 0.05$ ;  $t_{凋亡率}$  = 8.43、9.99,  $P < 0.05$ ;  $t_{活性氧含量}$  = 4.82、5.27,  $P < 0.05$ )。3 种癌细胞中 P + R 组 Bcl-2 蛋白表达较 R 组降低,而 Caspase-3 蛋白表达升高。**结论** 低温等离子体可提高 HepG2、A549 及 HeLa 细胞系的放射敏感性,其对 HepG2 及 A549 细胞系的放射增敏机制可能与抑制亚致死损伤修复,使细胞周期阻滞在  $G_2/M$  期,以及提高细胞内 ROS 水平诱导细胞凋亡有关。

**【关键词】** 放射增敏; 低温等离子体; HepG2 细胞; HeLa 细胞; A549 细胞

**Radiosensitization effect of low-temperature plasma on human malignant cells** Hu Chao\*, Qian Danqi, Qin Songbing, Ye Chao, Zhou Juying. \*Department of Radiation Oncology, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China

Corresponding author: Zhou Juying, Email: zhjuying@sohu.com

**【Abstract】 Objective** To evaluate the radiosensitization effect of low-temperature plasma on HepG2, A549, and HeLa cells. **Methods** Cells were divided into three groups, radiation group (R), plasma treatment group (P), and plasma plus radiation group (P + R). After radiation, cell survival was detected by a cloning assay. Cell cycle distribution, apoptosis and ROS content were tested by flow cytometry. Western blot was used to measure the expressions of Caspase-3 and Bcl-2. **Results** Low-temperature plasma showed radiosensitization effects on three different human malignant cell lines with a sensitivity enhancement ratio ( $SER_{D_{01}}$ ) of 1.28, 1.32 and 1.29, respectively. In these three different human malignant cell lines, compared with radiation alone group (R), the  $G_2/M$  arrest, apoptosis rate and ROS level in the group P + R were enhanced (the prolongation of  $G_2/M$  arrest:  $t = 9.52, 8.24, 9.53, P < 0.05$ ; the apoptosis rate:  $t = 10.67, 38.56, 6.74, P < 0.05$ ; ROS content:  $t = 9.41, 15.42, 13.53, P < 0.05$ ). In HepG2 cells and A549 cells, compared with group P, the prolongation of  $G_2/M$  arrest, the apoptosis rate and ROS content of group P + R were enhanced (the prolongation of  $G_2/M$  arrest:  $t = 8.75, 20.37, P < 0.05$ ; the apoptosis rate:  $t = 8.43, 9.99, P < 0.05$ ; ROS content:  $t = 4.82, 5.27, P < 0.05$ ). The expression level of Bcl-2 protein was downregulated in group P + R; by contrast, the expression level of Caspase-3 protein in group P + R was upregulated. **Conclusions** Low-temperature plasma can increase the radiosensitization of HepG2, A549 and HeLa cells with the enhancement of  $G_2/M$  phase arrest, apoptosis induction and ROS generation.

**【Key words】** Radiosensitization; Low-temperature plasma; HepG2 cells; HeLa cells; A549 cells

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-5098.2015.11.005

作者单位: 215006 苏州大学附属第一医院[胡超(现在丹阳市人民医院放疗科)、秦颂兵、周菊英];江南大学附属医院(钱丹琪);苏州大学物理学院(叶超)

通信作者: 周菊英, Email: zhjuying@sohu.com

等离子体医学是近几年兴起的,且具有重大研究前景。目前,国内外已在多个应用领域取得了成果,如血液凝固、灭菌、口腔治疗、皮肤病治疗、杀灭癌细胞等<sup>[1-4]</sup>。等离子体对肿瘤细胞杀伤的研究刚刚起步,它能够诱导癌细胞凋亡<sup>[5-9]</sup>,促使肿瘤细胞从基底脱落,抑制肿瘤的浸润和转移<sup>[10-11]</sup>。然而,关于等离子体放射增敏作用的研究少见报道。本实验初步探讨低温等离子体对 HepG2 细胞、A549 细胞及 HeLa 细胞放射敏感性的影响及其可能的机制。

## 材料与方 法

1. 细胞、试剂、仪器:人非小细胞肺癌细胞系 A549、人肝癌细胞系 HepG2、人宫颈癌细胞系 HeLa 均由苏州大学樊赛军教授长江学者实验室惠赠,购自美国细胞收藏中心(American Type Culture Collection, ATCC),由该实验室培养和保存。DMEM 培养基干粉、胎牛血清(FBS)、二甲基亚砷(DMSO)、胰酶粉末购自美国 GIBCO 公司,标准蛋白质分子量、RIPA 蛋白裂解液、30% 丙烯酰胺凝胶液(Acary-Bis)、Tris-HCl、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(APS)、吐温-20(Tween-20)、甘氨酸(Glycine)、十二烷基磺酸钠(SDS)、碘化丙啶(PI)、Annexin-V FITC、活性氧检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。高纯氩气(Ar)(99.999%)和高纯氧气(O<sub>2</sub>)(99.999%)购自上海五钢气体有限公司。气体质量流量控制器(D08-1F)购自北京七星华创电子有限公司,AvaSpec-2048 型八通道光纤光谱仪购自荷兰 Avantes 公司。

2. 低温等离子体产生的条件:放电电压 3 kV,放电电流 40 mA,高纯氩气体流量为 3 L/min,高纯氧流量为 20 ml/min,产生的低温等离子体束约为 1~2 cm。低温等离子体射流装置的基本原理为高纯氩气和高纯氧气混合进入石英玻璃管,由内外电极产生的高电压对混合气体进行电离,产生等离子体射流。

3. 光谱仪测定等离子体放电的光谱:采用 AvaSpec-2048 型八通道光纤光谱仪测定 Ar/O<sub>2</sub> 微等离子体放电的发射光谱(OES),测量波长范围为 200~1 000 nm,从而确定等离子体中的成分。微等离子体放电的发射光谱结果波长在 777.2、794.8 nm 处出现氧的谱线,在 409.4 和 500.6 nm 处出现氮的谱线,在 222.5、246.1 和 272.9 nm 处出

现一氧化碳(CO)的谱线,并出现许多 Ar 的谱线。因此,放电等离子体中存在活性 Ar、活性氧(ROS)、活性氮(RNS)和 CO。

4. 细胞培养与照射:用含 10% 胎牛血清、10 000 U/ml 青霉素、1% 非必需氨基酸、10 g/ml 链霉素的 DMEM 全培养基培养 HepG2、A549 及 HeLa 细胞系;37℃,5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱,每 2~3 天传代 1 次,取对数期生长细胞用于实验。照射时,使用 6 MV X 射线照射(德国西门子公司 Primus 医用直线加速器),细胞表面覆盖 1.5 cm 厚补偿膜,吸收剂量率为 2 Gy/min,机架角为 180°,源靶距为 1 m,照射野为 10 cm×10 cm。

5. 克隆形成率观察低温等离子体对 3 种细胞的放射增敏作用:将细胞分为单纯照射组(R)和等离子体加照射组(P+R)。取对数生长期的 A549、HepG2、HeLa 细胞,经胰酶消化后制成单细胞悬液,接种于 6 孔培养板内,每个剂量点接种的细胞数分别为 100、100、200、300、400、600 和 800,每组 3 个复孔。等离子体处理时间分别为 HepG2 细胞 18 s, HeLa 细胞 20 s, A549 细胞 21 s,处理后将 DMEM 细胞培养液加至 3 ml,将两组细胞用 6 MV X 射线给予不同剂量(0、0.5、1、2、4、6 和 8 Gy)照射。照射后在培养箱中继续培养 12~14 d,弃培养基,PBS 洗两次,无水甲醇固定约 30 min,弃无水甲醇,PBS 洗两次,晾干,姬姆萨染色,计数肉眼观察到的集落细胞数。细胞存活分数(SF) = 照射组细胞的克隆形成率(PE)/对照组细胞的克隆形成率(PE),PE 为 > 50 个细胞的克隆细胞数/接种细胞个数,SF<sub>2</sub> 为照射 2 Gy 时的存活分数。使用 Graphpad Prism 5 软件,按单击多靶模型  $SF = 1 - (1 - e^{D/D_0})^N$ ,拟合存活曲线,计算反映细胞敏感性的参数 D<sub>0</sub>、D<sub>q</sub>、N、SER<sub>D<sub>0</sub></sub> 值。

6. 细胞周期分析:将每种细胞分为空白对照组(C)、等离子体处理组(P)、单纯照射组(R)和等离子体加照射组(P+R)。取对数期生长的细胞以 1×10<sup>5</sup>/孔接种至 6 孔板内,培养至细胞生长贴壁融合 70%~80%。将 6 孔板置于喷嘴下方照射等离子体,处理时间为 HepG2 细胞 18 s, HeLa 细胞 20 s, A549 细胞 21 s,每组照射 3 孔癌细胞后,将 P 组细胞放在培养箱中继续培养 24 h。R 和 P+R 两组细胞置于直线加速器下,用 6 MV X 射线照射,细胞的吸收剂量为 4 Gy,照射后在培养箱中继续培养 24 h。后用胰酶消化,离心半径 6 cm,1 000 r/min,离心

5 min。用 PBS 洗两次后,加 4 ml 4℃ 预冷的 70% 冰乙醇固定过夜,检测之前离心去上清,PBS 洗两次,加入 500  $\mu$ l PI 溶液中,避光放置 30 min 后用流式细胞仪检测。

7. 磷脂酰丝氨酸外翻法(Annexin-V 和 PI 双染法)检测细胞凋亡:分组和处理方法同细胞周期实验,各种方法处理后培养 24 h,然后用胰酶消化,离心半径 6 cm,3 500 r/min,离心 5 min。离心后去上清,加入 500  $\mu$ l 的 Annexin-V 结合液悬浮细胞,加入 5  $\mu$ l 的 PI 和 Annexin-V FITC,吹打均匀,避光孵育 10 min 后,用流式细胞仪检测。

8. 细胞内活性氧(ROS)含量的检测:分组和处理方法同细胞周期实验,各种方法处理完培养 24 h,后将细胞消化、离心、去上清,加入 1 ml 不含血清的 DMEM 培养基,加入 1  $\mu$ l DCFH-DA,使其浓度为 10  $\mu$ mol/L,混匀,使 DCFH-DA 充分与细胞接触,置于培养箱中孵育 30 min,离心半径 6 cm,2 500 r/min,离心 5 min,用 PBS 洗 3 次,用流式细胞仪检测。

9. Western blot 检测相关蛋白表达:收集细胞并转至于 1.5 ml 的 Eppendorf 管中,离心半径 3 cm,2 500 r/min,离心 5 min,弃上清,并加入适量细胞裂解液,吹打混合均匀,置冰上 1~2 h 后,于 4℃ 环境下,离心半径 3 cm,13 000 r/min 离心 5 min,取上清液至新的 Eppendorf 管,采用分光光度计检测样品蛋白含量。加入适量蛋白上样缓冲液(5 $\times$ )混匀,放置在恒温混匀器上,100℃ 5 min,将蛋白电泳后转至醋酸纤维膜上,置于封闭液[5%脱脂奶粉,1 $\times$ 磷酸盐吐温(PBST)缓冲液]中封闭 1 h。加入一抗封闭液封闭 1 h,PBST 洗 3 次,置于水平摇床上摇晃,每次间隔 15 min;加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗孵育 1 h。PBST 洗膜 3 次,每次间隔 15 min;取等体积 EZ-ECL A 液、B 液,混匀,将 PVDF 膜浸入混合液中约 5 min,显影、定影,扫描分析。

10. 统计学处理:采用 SPSS 19.0 软件包分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间相关性采用相关与回归分析,组间比较采用  $t$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 低温等离子体对不同剂量照射的 3 种细胞系的放射敏感性的影响:存活曲线参数列于表 1,存活曲线示于图 1。

2. 不同处理因素对 3 种细胞细胞周期的影响:

结果如表 2 所示。在 4 Gy 剂量下,3 种细胞系 P + R 组  $G_2/M$  期比例与 R 组比较明显增高( $t = 9.52$ 、 $8.24$ 、 $9.53$ , $P < 0.05$ );HeG2 细胞和 A549 细胞 P + R 组  $G_2/M$  期比例与 P 组比较明显升高( $t = 8.75$ 、 $20.37$ , $P < 0.05$ )。HeLa 细胞中 P + R 组  $G_2/M$  期比例与 P 组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 1 低温等离子体对 HepG2、A549 及 HeLa 细胞系的放射增敏效应

细胞系	组别	$D_0$ (Gy)	$D_q$ (Gy)	$N$	$SF_2$	SER
HepG2	R	2.86	2.50	2.37	82	-
	P + R	2.22	1.02	1.59	60	1.28
A549	R	2.94	2.21	2.12	76	-
	P + R	2.22	1.13	1.67	57	1.32
HeLa	R	2.94	2.56	2.39	81	-
	P + R	2.27	1.07	1.60	62	1.29

注:R. 单纯照射组;P + R. 等离子体加照射组; $SF_2$ . 存活分数;SER. 放射增敏比。“-”为无数据

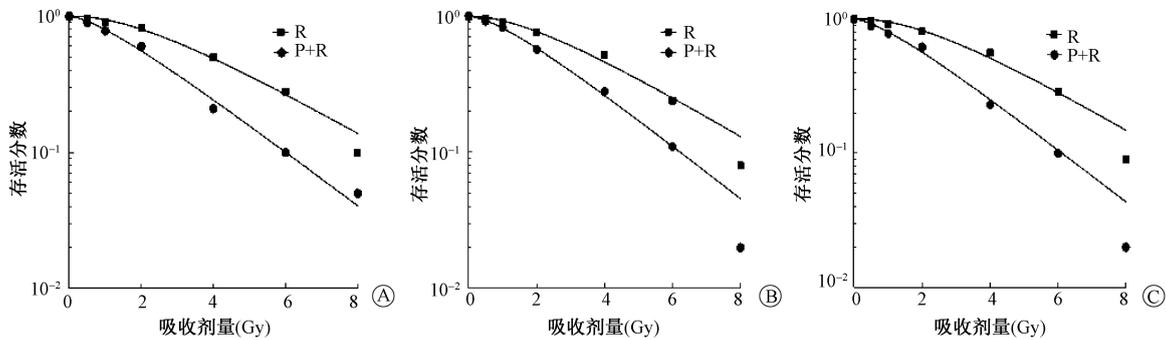
表 2 不同处理因素对 HepG2、A549 及 HeLa 细胞周期的影响( $\%$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

细胞系	组别	样本数	$G_0/G_1$	S	$G_2/M$
HepG2	C	3	57.19 $\pm$ 0.54	23.54 $\pm$ 0.71	18.06 $\pm$ 2.39
	P	3	37.60 $\pm$ 3.38	26.87 $\pm$ 2.11	35.58 $\pm$ 2.96 <sup>a</sup>
	R	3	51.82 $\pm$ 3.38	16.58 $\pm$ 1.38	31.60 $\pm$ 2.01 <sup>a</sup>
	P + R	3	25.87 $\pm$ 2.45	18.75 $\pm$ 3.65	55.37 $\pm$ 2.54 <sup>abc</sup>
A549	C	3	57.64 $\pm$ 3.08	25.34 $\pm$ 1.24	17.02 $\pm$ 2.46
	P	3	35.97 $\pm$ 3.68	32.37 $\pm$ 4.75	31.65 $\pm$ 3.05 <sup>a</sup>
	R	3	51.61 $\pm$ 3.01	20.68 $\pm$ 2.95	27.71 $\pm$ 2.51 <sup>a</sup>
	P + R	3	18.12 $\pm$ 1.92	30.60 $\pm$ 1.34	51.28 $\pm$ 2.44 <sup>abc</sup>
HeLa	C	3	51.56 $\pm$ 7.41	33.19 $\pm$ 3.45	15.27 $\pm$ 4.00
	P	3	33.23 $\pm$ 2.43	27.02 $\pm$ 2.08	39.76 $\pm$ 4.51 <sup>a</sup>
	R	3	47.68 $\pm$ 1.32	25.36 $\pm$ 1.03	26.93 $\pm$ 2.39 <sup>a</sup>
	P + R	3	24.24 $\pm$ 2.43	28.26 $\pm$ 2.34	47.51 $\pm$ 2.17 <sup>ab</sup>

注:C. 空白对照组;P. 等离子体处理组;R. 单纯照射组;P + R 组. 等离子体加照射组。<sup>a</sup>与相应细胞 C 组  $G_2/M$  期比较, $t = 5.67$ 、 $6.12$ 、 $17.68$ 、 $7.33$ 、 $4.61$ 、 $32.46$ 、 $10.27$ 、 $6.63$ 、 $9.20$ , $P < 0.05$ ;<sup>b</sup>与相应细胞 R 组  $G_2/M$  期比较, $t = 9.52$ 、 $8.24$ 、 $9.53$ , $P < 0.05$ ;<sup>c</sup>与相应细胞 P 组  $G_2/M$  期比较, $t = 8.75$ 、 $20.37$ , $P < 0.05$

3. 不同处理因素对 3 种细胞凋亡的影响:结果列于表 3。由表 3 可知,3 种细胞系中 P + R 组早期凋亡比例与 R 组比较明显升高( $t = 10.67$ 、 $38.56$ 、 $6.74$ , $P < 0.05$ ),HeG2 和 A549 细胞 P + R 组早期凋亡比例与 P 组比较明显升高( $t = 8.43$ 、 $9.99$ , $P < 0.05$ ),HeLa 细胞中 P + R 组早期凋亡比例与 P 组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

4. 不同处理因素对癌细胞内 ROS 含量的影响:结果列于表 4。由表 4 可知,3 种细胞系中 P + R 组与 R 组比较,ROS 明显升高( $t = 9.41$ 、 $15.42$ 、 $13.53$ , $P < 0.05$ )。HeG2 和 A549 细胞 P + R 组与 P 组比较 ROS 明显升高( $t = 4.82$ 、 $5.27$ , $P < 0.05$ ),HeLa 细胞中



注: R. 单纯照射组; P + R. 等离子体加照射组

图 1 低温等离子体对 HepG2 (A)、A549 (B) 及 HeLa (C) 细胞系的放射敏感性的影响

表 3 不同处理因素对 HepG2、A549 及 HeLa 细胞凋亡的影响 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

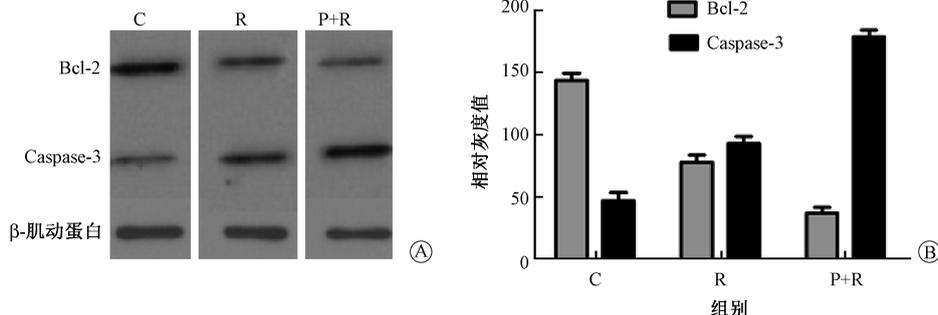
细胞系	组别	样本数	正常细胞	早期凋亡细胞	晚期凋亡细胞	坏死细胞
HepG2	C	3	95.07 ± 0.23	4.33 ± 0.21	0.48 ± 0.01	0.12 ± 0.01
	P	3	23.16 ± 5.51	53.22 ± 2.84 <sup>a</sup>	17.34 ± 7.00	5.75 ± 4.01
	R	3	81.55 ± 3.60	14.63 ± 2.91 <sup>a</sup>	3.23 ± 0.68	0.60 ± 0.10
	P + R	3	8.00 ± 2.14	69.64 ± 6.16 <sup>abc</sup>	19.57 ± 3.80	2.78 ± 0.41
A549	C	3	95.67 ± 0.64	3.87 ± 0.45	0.16 ± 0.16	0.14 ± 0.10
	P	3	53.01 ± 3.09	33.16 ± 3.11 <sup>a</sup>	10.52 ± 0.83	3.32 ± 0.34
	R	3	75.98 ± 2.50	21.14 ± 2.81 <sup>a</sup>	2.63 ± 0.44	0.25 ± 0.08
	P + R	3	28.83 ± 1.52	57.15 ± 3.03 <sup>abc</sup>	13.44 ± 2.02	0.58 ± 0.07
HeLa	C	3	7.75 ± 0.18	2.07 ± 0.06	0.12 ± 0.09	0.06 ± 0.04
	P	3	80.20 ± 3.68	16.94 ± 3.72 <sup>a</sup>	2.33 ± 0.81	0.66 ± 0.09
	R	3	89.83 ± 1.42	9.26 ± 1.98 <sup>a</sup>	0.43 ± 0.42	0.12 ± 0.04
	P + R	3	70.04 ± 1.55	27.13 ± 1.41 <sup>ab</sup>	2.24 ± 0.22	0.59 ± 0.09

注: C. 空白对照组; P. 等离子体处理组; R. 单纯照射组; P + R 组. 等离子体加照射组。<sup>a</sup>与相应细胞 C 组早期凋亡比较,  $t = 30.80, 6.15, 18.06, 17.23, 11.67, 35.61, 6.83, 6.14, 18.03, P < 0.05$ ; <sup>b</sup>与相应细胞 R 组早期凋亡比较,  $t = 10.67, 38.56, 6.74, P < 0.05$ ; <sup>c</sup>与相应细胞 P 组早期凋亡比较,  $t = 8.43, 9.99, P < 0.05$

表 4 不同处理因素对 3 种不同癌细胞内活性氧含量的影响 (个,  $\bar{x} \pm s$ )

细胞系	样本数	C	P	R	P + R
HepG2	3	16.80 ± 1.30	54.00 ± 1.50 <sup>a</sup>	26.50 ± 3.72 <sup>a</sup>	79.1 ± 8.28 <sup>abc</sup>
A549	3	10.47 ± 2.64	25.00 ± 2.00 <sup>a</sup>	7.37 ± 1.25 <sup>a</sup>	33.82 ± 3.51 <sup>abc</sup>
HeLa	3	25.27 ± 1.32	57.70 ± 8.17 <sup>a</sup>	33.37 ± 3.19 <sup>a</sup>	74.67 ± 2.51 <sup>ab</sup>

注: C. 空白对照组; P. 等离子体处理组; R. 单纯照射组; P + R 组. 等离子体加照射组。<sup>a</sup>与相应细胞 C 组比较,  $t = 33.50, 8.62, 11.34, 10.86, 8.52, 6.72, 8.19, 7.51, 23.81, P < 0.05$ ; <sup>b</sup>与相应细胞 R 组比较,  $t = 9.41, 15.42, 13.53, P < 0.05$ ; <sup>c</sup>与 P 组比较,  $t = 4.82, 5.27, P < 0.05$



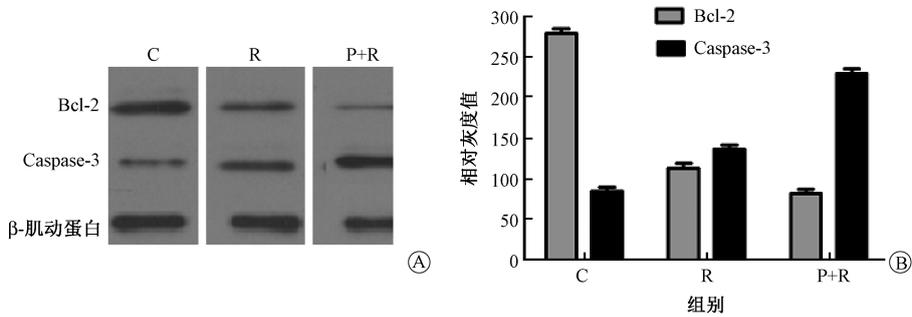
注: C. 空白对照组; R. 单纯照射组; P + R 组. 等离子体加照射组

图 2 不同处理后 HepG2 细胞 Bcl-2 和 Caspase-3 的蛋白表达 A. 电泳图; B. 相对灰度

P + R 组与 P 组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

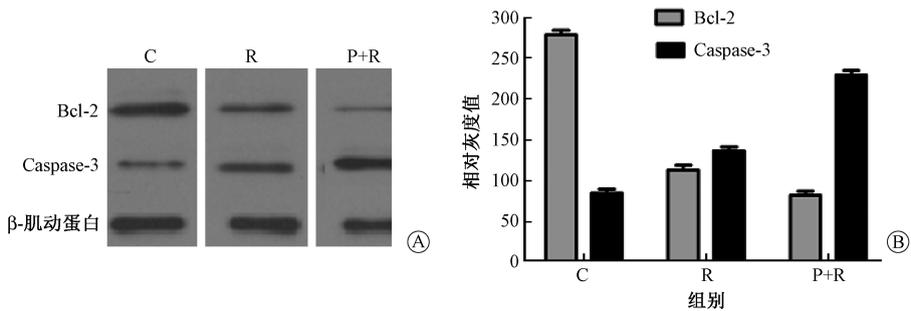
5. Western blot 法检测低温等离子联合辐射对

3 种细胞中 Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达的影响: 结果示于图 2 ~ 4。由图 2 ~ 4 可见, 3 种细胞中, R 组



注: C. 空白对照组; R. 单纯照射组; P+R 组. 等离子体加照射组

图 3 不同处理后 A549 细胞 Bcl-2 和 Caspase-3 的蛋白表达 A. 电泳图; B. 相对灰度



注: C. 空白对照组; R. 单纯照射组; P+R 组. 等离子体加照射组

图 4 不同处理后 HeLa 细胞 Bcl-2 和 Caspase-3 的蛋白表达 A. 电泳图; B. 相对灰度

Bcl-2 蛋白条带较 P+R 组条带灰度更深, 面积更大, 提示前者 Bcl-2 蛋白表达更高; 而 Caspase-3 蛋白表达则相反, P+R 组细胞 Caspase-3 蛋白表达较 R 组更高。

## 讨 论

低温等离子体是为了区别于受控热核聚变产生的高温等离子体, 高温等离子体的温度要达到 10 MeV 以上, 如此高温度的物质, 在通常条件下无法应用<sup>[12]</sup>。低温等离子体中含有多种不同的活性成分, 如紫外线 (UV)、带电粒子 (电子、正负离子等)、化学活性粒子 (活性氧和活性氮等) 等, 依其使用的工作气体及等离子体源的不同, 其成分和含量也各不相同<sup>[13-19]</sup>, 这些成分可能与抗肿瘤作用有关。

目前, 有关低温等离子体用于放射增敏剂的研究尚未见报道, 本研究将 HePG2 细胞、A549 细胞及 HeLa 细胞作为研究对象, 阐明了低温等离子体对人体不同部位不同来源的恶性肿瘤具有放射增敏作用, 其机制可能为:

(1) 抑制照射后亚致死损伤修复: 亚致死损伤修复主要反映在细胞存活曲线的肩段上。结合集落形成实验结果, 3 种癌细胞 P+R 组中  $D_0$ 、 $D_q$ 、 $N$

值均明显降低, 曲线左移, 且曲线较为平直, “肩区”不明显, 提示细胞亚致死损伤修复能力受到抑制, 由此推测, 低温等离子体对肿瘤细胞亚致死性损伤的修复抑制可能是其放射增敏机制之一。

(2) 细胞周期阻滞: 在细胞周期中,  $G_2/M$  期细胞对放射最敏感, 其次为  $G_1$  期细胞, S 期细胞最不敏感, 本研究运用流式细胞仪经不同因素处理两种癌细胞的周期分布, 结果表明, 与 C 组比较, P 组和 R 组细胞周期阻滞在  $G_2/M$  期, 其原因在于辐射可使癌细胞再分布, 使肿瘤细胞增殖周期加快, 增殖比例提高, 使更多的细胞进入放射敏感时相; 同样, 癌细胞经低温等离子体处理后, 也发生了细胞周期再分布, 更多的细胞进入放射敏感时相  $G_2/M$  期; 而 P+R 组  $G_2/M$  期比例较 R 组和 P 组明显升高, 提示低温等离子体联合辐射可以通过改变细胞再分布, 诱导  $G_2/M$  期阻滞, 进而提高了电离辐射对肿瘤细胞的敏感性, 提高其杀伤效果。

(3) ROS 介导的细胞凋亡: Yan 等<sup>[20]</sup>发现肝癌细胞 HepG2 经等离子体处理后, 肝癌细胞增殖受到明显抑制, 细胞内凋亡通路被激活, 细胞内 NO 和 ROS 水平增高, Caspase-3、9 的活性明显变强, 下调了 Bcl-2 水平, 而上调了 Bax 水平, 最终导致肿瘤细胞凋亡。本实验也证实了低温等离子体可以诱导

Caspase-3 表达,下调 Bcl-2 的表达;联合辐射可以使这种作用加强。因此,低温等离子体联合辐射可以通过 Bax/Bcl-2 和 Caspase-3 途径诱导肿瘤细胞凋亡。为了进一步证实上述结果,本研究采用 DCFH-DA 作为荧光探针测定细胞内 ROS 水平和磷脂酰丝氨酸外翻法检测细胞凋亡,结果显示,在低温等离子体处理 HePG2 细胞和 A549 细胞后,3 种癌细胞内 P+R 组 ROS 含量较 R 组明显增加,凋亡率与 R 组相比也明显升高,R 组和 P 组的 ROS 含量均较 C 组显著提高。综上结果,提示电离辐射、低温等离子体单独和联合使用均可以诱导细胞内 ROS 水平和细胞凋亡率增加,二者联合的效果更加明显。因此,推测低温等离子体联合辐射可以提高细胞内 ROS 水平,通过 Bax/Bcl-2 和 Caspase-3 途径进一步诱导肿瘤细胞凋亡是低温等离子体的放射增敏机制之一。

本实验首次证实了低温等离子体对上述 HepG2 细胞、A549 细胞及 HeLa 细胞具有放射增敏作用,并具有一定的毒性作用,为临床肝癌、非小细胞肺癌及宫颈癌等不同部位、不同器官来源恶性肿瘤的治疗提供了新的思路,但低温等离子体确切的抗肿瘤机制还需要进一步研究。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Morfill GE, Kong MG, Zimmermann JL. Focus on plasma medicine[J]. *New J Phys*, 2009, 11(11):115011.
- [ 2 ] Stoffels E, Sakiyama Y, Graves DB. Cold atmospheric plasma: charged species and their interactions with cells and tissues[J]. *IEEE Trans Plasma Sci*, 2008, 36(4):1441.
- [ 3 ] Georgescu N, Lupu AR. Tumoral and normal cells treatment with high-voltage pulsed cold atmospheric plasma jets [J]. *IEEE Trans Plasma Sci*, 2010, 38(8):1949-1955.
- [ 4 ] Zirnheld JL, Zucker SN, DiSanto TM, et al. Nonthermal plasma needle: development and targeting of melanomacells [J]. *IEEE Trans Plasma Sci*, 2010, 38(4):948-952.
- [ 5 ] Sensenig R, Kalghatgi S, Cerchar E, et al. Non-thermal plasma induces apoptosis in melanoma cells via production of intracellular reactive oxygen species [J]. *Ann Biomed Eng*, 2011, 39(2): 674-687.
- [ 6 ] Hall EH, Schoenbach KH, Beebe SJ. Nanosecond pulsed electric fields induce apoptosis in p53-wildtype and p53-null HCT116 colon carcinoma cells [J]. *Apoptosis*, 2007, 12(9): 1721-1731.
- [ 7 ] Kim CH, Bahn JH, Lee SH, et al. Induction of cell growth arrest by atmospheric non-thermal plasma in colorectal cancer cells [J]. *J Biotech*, 2010, 150(4):530-538.
- [ 8 ] Zucker SN, Zirnheld J, Bagati A, et al. Preferential induction of apoptotic cell death in melanoma cells as compared with normal keratinocytes using a non-thermal plasma torch [J]. *Cancer Biol Therap*, 2012, 13(13):1299-1306.
- [ 9 ] Sensenig R, Kalghatgi S, Cerchar E, et al. Non-thermal plasma induces apoptosis in melanoma cells via production of intracellular reactive oxygen species [J]. *Ann Biomed Eng*, 2011, 39(2): 674-687.
- [ 10 ] Kalghatgi S, Kelly CM, Cerchar E, et al. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e16270.
- [ 11 ] Huang J, Li H, Chen W, et al. Dielectric barrier discharge plasma in Ar/O<sub>2</sub> promoting apoptosis behavior in A549 cancer cells [J]. *Appl Phys Lett*, 2011, 99(2): e253701.
- [ 12 ] 杜世刚. 等离子体物理 [M]. 北京:原子能出版社,1998: 1-20.
- [ 13 ] Ayan H, Fridman G, Staack D. Heating effect of dielectric barrier discharges for direct medical treatment [J]. *IEEE Trans Plasma Sci*, 2009, 37(1):113-120.
- [ 14 ] Erofeev MV, Kieft IE, Sosnin EA. UV excimer lamp irradiation of fibroblasts: the influence on antioxidant homeostasis [J]. *IEEE Trans Plasma Sci*, 2006, 34(4): 1359-1364.
- [ 15 ] Lerouge S, Wertheimer MR, Yahia LH. Plasma sterilization; a review of parameters, mechanisms, and limitations [J]. *Plasmas Polym*, 2001, 6(3): 175-188.
- [ 16 ] Soloshenko IA, Tsiolko VV, Khomich VA, et al. Sterilization of medical products in low-pressure glow discharges [J]. *Plasma Phys Rep*, 2000, 26(9):792-800.
- [ 17 ] Birmingham JG. Mechanisms of bacterial spore deactivation using ambient pressure nonthermal discharges [J]. *IEEE Trans Plasma Sci*, 2004, 32(4):1526-1531.
- [ 18 ] Wang S, Schulz-von der Gathen V, Dobelev HF. Discharge comparison of nonequilibrium atmospheric pressure Ar/O<sub>2</sub> and He/O<sub>2</sub> plasmajets [J]. *Appl Phys Lett*, 2003, 83(16): 3272-3274.
- [ 19 ] Hury S, Vidal DR, Desor F, et al. A parametric study of the destruction of Bacillus spores in low pressure oxygen-based plasmas [J]. *Lett Appl Microbiol*, 1998, 26(6): 417-421.
- [ 20 ] Yan X, Zou F, Zhao SS. On the mechanism of plasma inducing cell apoptosis [J]. *IEEE Trans Plasma Sci*, 2010, 38(9): 2451-2457.

(收稿日期:2014-12-31)