

文章编号: 1007-4627(2014)03-0416-07

## 甲基化抑制剂 5-氮杂 2'-脱氧胞苷对三维培养 A549 细胞辐射敏感性的影响

潘冬<sup>1, 2, 3</sup>, 陈亚雄<sup>1, 2</sup>, 薛刚<sup>1, 2, 3</sup>, 李小满<sup>1, 2, 3</sup>, 任振新<sup>1, 2</sup>, 杜亚蓉<sup>1, 2</sup>, 胡步荣<sup>1, 2</sup>

(1. 中国科学院近代物理研究所, 兰州 730000;

2. 中国科学院重离子束辐射生物医学重点实验室, 兰州 730000;

3. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 为探讨 DNA 去甲基化试剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷 (5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR) 对三维 (3D) 培养模式下的肺腺癌细胞 A549 辐射敏感性的作用, 开展了系列实验。使用不同浓度 5-Aza-CdR 处理单层 (2D) A549 细胞 72 h 后, MTT 法检测其对 A549 细胞的增殖抑制作用。选取低浓度 (2, 5  $\mu\text{mol/L}$ ) 5-Aza-CdR 预处理 2D 和 3D 培养的 A549 细胞 72 h, X 射线分别辐照 1, 2, 4, 6 Gy, 检测微核形成率和克隆存活。实验结果显示, 不同浓度的 5-Aza-CdR 均能抑制 2D 的 A549 细胞增殖, 且呈剂量依赖性。5  $\mu\text{mol/L}$  药物预处理 2D 与 3D 细胞并联合辐照后诱导的细胞微核形成率均显著高于相应的对照组, 并且细胞存活率显著降低。不过, 较低浓度 5-Aza-CdR (2  $\mu\text{mol/L}$ ) 预处理的 3D 培养 A549 细胞 4, 6 Gy 辐照后微核数目较未用药处理组显著增加, 克隆存活率较未用药组显著降低 ( $P < 0.05$ ), 而在 2D 培养 A549 细胞中未观测到上述现象。研究结果表明, 5-Aza-CdR 能抑制 A549 细胞增殖, 3D 培养 A549 细胞药物预处理更能增加其辐射敏感性。结果暗示, 为减少对正常细胞的毒性作用, 在临床放疗中, 可低剂量使用 5-Aza-CdR, 实现肿瘤的有效靶向治疗。

**关键词:** 5-氮杂-2'-脱氧胞苷 (5-Aza-CdR); 甲基化; 三维培养细胞; 辐射敏感性

**中图分类号:** R931      **文献标志码:** A      **DOI:** 10.11804/NuclPhysRev.31.03.416

### 1 引言

利用单层 (2D) 培养细胞系统进行的生命科学研究极大地促进了对生命现象的认识和临床医学的发展, 但 2D 细胞培养系统与生命有机体细胞生长环境相比还有较大的差别。细胞在体内时同它的三维 (3D) 生长环境, 例如相互接触的周围细胞、细胞外基质 (extra cellular matrix, ECM)、可溶性的化学分子以及作用在细胞上的机械力之间都有相互作用, 直接影响着细胞的应激反应行为。而细胞进行 2D 培养时, 细胞之间以及细胞与胞外基质间的相互作用, 与真实的 3D 生理环境相比, 存在较大差异<sup>[1-4]</sup>。使

用动物模型进行的生命科学基础研究, 是一种生理状态下的体内实验, 促进了生命医学科学的发展。不过, 由于人类生理与动物生理常有显著的区别, 使利用动物模型得到的实验结论有时不能适用到人体上。例如人类的肿瘤发生、药物生理效应、自身免疫性疾病及干细胞分化等与动物模型的体内过程均具有差别<sup>[5-6]</sup>。

人工提取合成的凝胶状蛋白混合物目前已商品化, 且广泛应用于 3D 细胞模型的构建。作为一种新型的细胞体外实验平台, 3D 细胞培养模式能够很好地克服细胞单层培养与实验动物模型的缺点, 为细胞

收稿日期: 2013-08-25; 修改日期: 2013-10-11

基金项目: 中国科学院百人计划项目 (Y163100BRO); 国家自然科学基金项目 (31170803); 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (2010CB834201)

作者简介: 潘冬 (1988-), 男, 山东高密人, 硕士研究生, 从事生物工程研究; E-mail: pandong@impcas.ac.cn

通信作者: 胡步荣, E-mail: hubr@impcas.ac.cn

<http://www.npr.ac.cn>

生理研究及药物筛选提供更可靠和便捷的研究工具。

5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)为一种嘧啶核苷类似物,在DNA复制过程中能够与甲基转移酶(DNMTs)结合成共价复合物,不影响DNMTs表达但能够明显抑制该酶的甲基转移活性,从而去甲基化,使多种因甲基化而失活的抑癌基因重新表达,抑制肿瘤细胞的生长<sup>[7]</sup>。在临床上5-Aza-CdR目前主要应用在治疗复发性和顽固性急性白血病和慢性髓性白血病危象,但由于缺乏特异的细胞杀伤靶向性及大剂量5-Aza-CdR诱发的细胞毒副反应,使其作为抗癌药物的应用受限<sup>[8]</sup>。因此探究具有相对靶向性的放射治疗和该药物的协同作用效果,期望实现在临床上同时降低放射和药物使用剂量,具有很重要的指导意义。

我们的实验旨在观察与人体生理环境近似的3D培养人肺腺癌细胞(A549),经受5-Aza-CdR处理并联合X射线辐照后诱导的损伤情况,比较与2D培养细胞的药物的敏感差异性,为5-Aza-CdR预处理联合辐射进行肿瘤临床治疗提供进一步的借鉴。

## 2 实验材料和方法

### 2.1 试剂及仪器

A549细胞为中国科学院近代物理研究所空间辐射生物实验室保存,胎牛血清、RPMI1640培养基购自美国Hyclone公司。3D培养基质胶溶液购自美国BD公司。5-氮杂-2'-脱氧胞、四唑氮蓝(MTT)购自美国Sigma公司。Infinite M200多功能酶标仪购自于瑞士Tecan公司,细胞遗传学显微镜购自德国Carl Zeiss公司,X射线照射采用Faxitron RX-650型X-ray生物辐照系统。

### 2.2 单层细胞培养

A549细胞用含有10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素的RPMI1640培养液,置于37℃、CO<sub>2</sub>体积分数为5%的饱和湿度培养箱中培养,每2 d进行传代培养,传代前D-Hanks平衡液漂洗,0.25%胰酶消化。

### 2.3 三维细胞培养

取对数生长期A549细胞,调整细胞密度至 $3 \times 10^6$ ,每孔20 μmol/L细胞悬液与250 μL基质胶混合接种于12孔板中,置于37℃培养箱30 min,使胶体

固化后,添加含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素的RPMI1640培养液,置于37℃、CO<sub>2</sub>体积分数为5%的饱和湿度培养箱中培养,每2 d更换培养基。

### 2.4 药物对2D培养A549细胞增值的影响

取对数生长期A549细胞,调整细胞密度后接种于96孔无菌培养板中,每孔 $5 \times 10^3$ 个细胞,培养24 h后,分别加入含有不同浓度(0, 1, 2, 5, 10, 20 μmol/L)的5-Aza-CdR(DMSO溶解)的RPMI1640培养基至100 μL,每24 h后PBS洗涤并更换新鲜药物和培养基,共处理72 h,0 μmol/L药物组加入含有0.2% DMSO的等体积培养基(最大药物浓度含有的DMSO量)作为对照。每个浓度设5个平行孔(重复2次),每孔加入终浓度为5 mg/ml的MTT溶液10 μL,37℃避光作用4 h,弃上清液,加入150 μL DMSO,振荡10 min至结晶紫完全溶解后上机检测。酶标检测仪570 nm波长检测吸光度(OD)。计算细胞生长抑制率[细胞抑制率(%)=(1-实验组OD值/空白组OD值)×100%]。最后以抑制率为纵坐标,以药物浓度(μmol/L)为横坐标,绘制生长曲线。

### 2.5 微核形成率检测

2D细胞培养取对数生长期A549细胞,按实验方法1.2所述培养, $1 \times 10^5$ 细胞/皿接种于60 mm培养皿24 h。3D细胞培养取对数生长期A549细胞,按方法1.3所述培养4 d。两种培养模式细胞经2 μmol/L和5 μmol/L的5-Aza-CdR处理,0 μmol/L药物组加入含有0.05% DMSO的等体积培养基(5 μmol/L药物浓度含有的DMSO量)作为对照,每24 h更换含新鲜药物的培养基,作用72 h后更换成常规培养液。按照实验分组接受1, 2, 4, 6 Gy的X射线照射(100 kV),剂量率为1.2 Gy/min。接受辐照2 h后,2D细胞常规消化制成单细胞悬液。接种于基质胶中的3D细胞与基质胶液化恢复液(Recovery solution)混合,冰浴处理30 min使胶体液化,离心弃上清,加培养液制成单细胞悬液,按 $1 \times 10^5$ 接种于35 mm培养皿中,每个实验组设置3个平行。培养48 h后,用PBS轻轻洗细胞1次,用甲醇:冰乙酸=3:1的固定液固定20 min,吸除固定液后空气干燥,用0.1 μg/mL吖啶橙染色1 min。参照Fenech等<sup>[9]</sup>对微核的判定标准(小于等于主核的三分之一),荧光显微镜下至少镜

检 1000 个细胞, 统计其中含有微核的细胞数量, 计算微核形成率。微核形成率(%)=(含微核细胞数/总细胞数) $\times$ 100%。实验共进行 3 次独立重复。

## 2.6 克隆形成实验

2D 和 3D 细胞按 2.5 节所述方法经前期药物处理和 X 射线辐照 2 h 后, 2D 细胞常规消化制成单细胞悬液, 3D 细胞由 recovery solution 液化后经常规消化制成单细胞悬液, 按一定数量接种于 100 mm 培养皿中(200 ~ 2000 个细胞/皿, 根据剂量大小决定), 连续培养 10 d, 结晶紫溶液染色, 计数大于或等于 50 个细胞的克隆。每个实验组设置 3 个平行。植板率(plating efficiency, PE)=(克隆数/接种细胞数) $\times$ 100%。细胞存活分数(survival fraction, SF) = 照射组 PE/对照组 PE。实验共进行 3 次独立重复。通过 Origin 分析软件拟合存活曲线。

## 2.7 统计学方法

多个样本均数间的比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  认为统计学上具有显著性差异,  $P < 0.01$  认为统计学上具有极显著差异。

## 3 实验结果

### 3.1 药物对 2D 培养 A549 细胞的增值的影响

在实验组细胞的培养液中加入不同浓度的 5-Aza-CdR(1, 2, 5, 10, 20  $\mu\text{mol/L}$ ), 培养 72 h 后采用 MTT 法检测 570 nm 的吸光度。结果发现, 5-Aza-CdR 可以抑制细胞生长, 在低剂量组, 表现为浓度依赖性, 与阴性对照相比均具有显著性差异( $P < 0.05$ )。当 5-Aza-CdR 浓度增加到 10  $\mu\text{mol/L}$  以上时, 对细胞的增殖抑制效应有钝化现象(图 1)。相关文献报道显示, 2  $\mu\text{mol/L}$  浓度 5-Aza-CdR 单独处理卵巢癌细胞和人早幼粒白血病细胞即可引起细胞增殖明显下降, 部分基因甲基化程度及蛋白表达发生明显改变<sup>[10-11]</sup>, 5  $\mu\text{mol/L}$  以上浓度 5-Aza-CdR 对多发性骨髓瘤细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用与 5  $\mu\text{mol/L}$  处理组相比已无明显增加<sup>[12]</sup>。为探讨低剂量药物处理是否能够增强 2D 与 3D 细胞的辐射敏感性, 为临床放疗结合化疗提供借鉴, 结合文献报道和当前的细

胞增殖抑制实验, 我们选择较低细胞毒性剂量(2 和 5  $\mu\text{mol/L}$ ) 作为后续辐照实验的药物干预浓度。

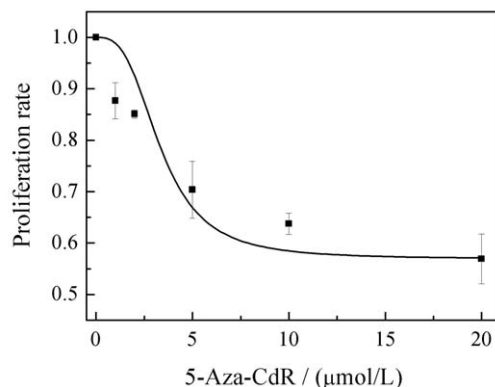


图 1 5-Aza-CdR 处理对 2D 细胞增殖的影响

不同浓度的 5-Aza-CdR 处理细胞 72 h 后发现, 均可不同程度地抑制 A549 细胞增殖, 与阴性对照相比存在显著性差异( $P < 0.05$ )。

### 3.2 药物预处理联合辐照对 2D 和 3D 培养细胞微核形成的影响

2D 和 3D 培养的实验组细胞分别以 2, 5  $\mu\text{mol/L}$  浓度的 5-Aza-CdR 预处理 72 h 后, 进行 X 射线照射(1, 2, 4, 6 Gy), 培养 48 h 后固定染色并镜下检测微核形成。结果发现, 单纯 5-Aza-CdR 药物处理即能导致 2D 与 3D 细胞的微核率显著增加( $P < 0.05$ , 图 2(a), 2(b))。5-Aza-CdR 预处理联合 X 射线辐照后发现, 5  $\mu\text{mol/L}$  药物预处理 2D 与 3D 培养 A549 细胞 72 h 并联合辐照后诱导的细胞微核形成率均显著高于相应的对照组( $P < 0.05$ , 图 2(a) 与 2(b)), 较低浓度 5-Aza-CdR(2  $\mu\text{mol/L}$ ) 预处理的 3D 培养 A549 细胞 4, 6 Gy 辐照后微核数目较未用药处理组显著增加( $P < 0.05$ , 图 2(b)), 而在 2D 培养 A549 细胞中未观测到上述现象(图 2(a))。我们的结果表明, 一定浓度的 5-Aza-CdR 预处理增加了辐照的敏感性, 低浓度(2  $\mu\text{mol/L}$ ) 5-Aza-CdR 预处理结合较高剂量辐照即可显著增加 3D 培养 A549 的微核形成率, 诱导更多的 DNA 损伤, 2D 培养 A549 细胞达到同样辐射增敏效果对药物的需求浓度要高一些(5  $\mu\text{mol/L}$ )。

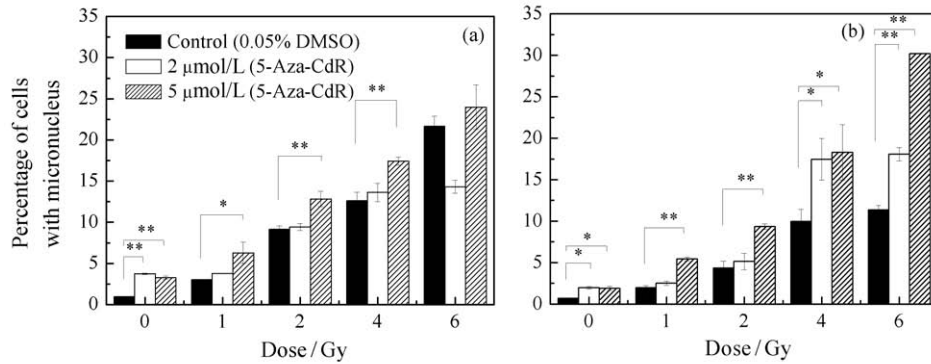


图 2 5-Aza-CdR 预处理联合辐照对 2D(a) 与 3D(b) 细胞微核形成率的影响

5 μmol/L 药物预处理 2D 与 3D 培养 A549 细胞 72 h 并联合辐照后诱导的细胞微核形成率均显著高于相应的对照组 ( $P < 0.05$ , (a), (b)), 较低浓度 5-Aza-CdR(2 μmol/L) 预处理的 3D 培养 A549 细胞 4, 6 Gy 辐照后微核数目较未用药处理组显著增加 ( $P < 0.05$ , (b)), 而在 2D 培养 A549 细胞中未观测到上述现象 (a)。

### 3.3 药物预处理联合辐照对 2D 和 3D 培养细胞克隆存活的影响

2D 和 3D 培养的 A549 细胞分别以 2, 5 μmol/L 浓度 5-Aza-CdR 预处理 72 h 后, 进行 X 射线照射 (0, 1, 2, 4, 6 Gy), 照射后 2 h, 酶解细胞进行克隆形成实验。计数克隆细胞发现, 2, 5 μmol/L 浓度 5-Aza-CdR 预处理对 2D 与 3D 细胞植板率无明显影响, 不过, 2D 培养细胞植板率明显高于 3D 培养细胞 ( $P < 0.05$ , 图 3)。我们的结果表明, 低浓度 (2, 5 μmol/L) 5-Aza-CdR 对细胞的杀伤作用有限, 仅能抑制细胞的增殖 (图 1), 当 5-Aza-CdR 预处理后酶解进行后面的克隆培养时, 因无持续的药物作用, 细胞的增殖活力逐步恢复, 依然能够形成克隆, 体现在植板率上为低浓度 5-Aza-CdR 预处理 2D 与 3D 细胞对植板率无明显影响。3D 细胞的植板率低, 这可能与文献

中报道的 3D 细胞群体中处于细胞周期静息期的比例高于 2D 细胞群体, 细胞贴壁能力较差有关<sup>[13]</sup>。

2, 5 μmol/L 浓度 5-Aza-CdR 预处理的两种培养模式细胞存活率随照射剂量的增加而减少, 呈照射剂量依赖性(图 4(a)、4(b))。其中, 3D 培养细胞非药物

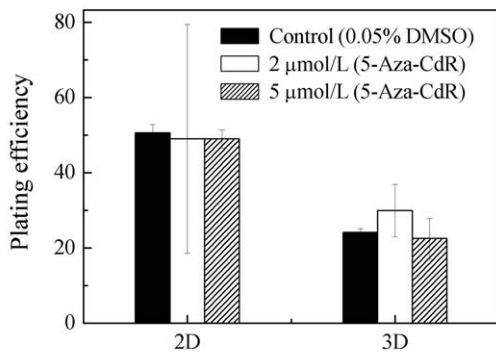


图 3 5-Aza-CdR 预处理对 2D 和 3D 培养 A549 细胞植板率的影响

5-Aza-CdR 预处理对 2D 与 3D 细胞植板率无明显影响, 但是 2D 培养细胞植板率明显高于 3D 培养细胞。

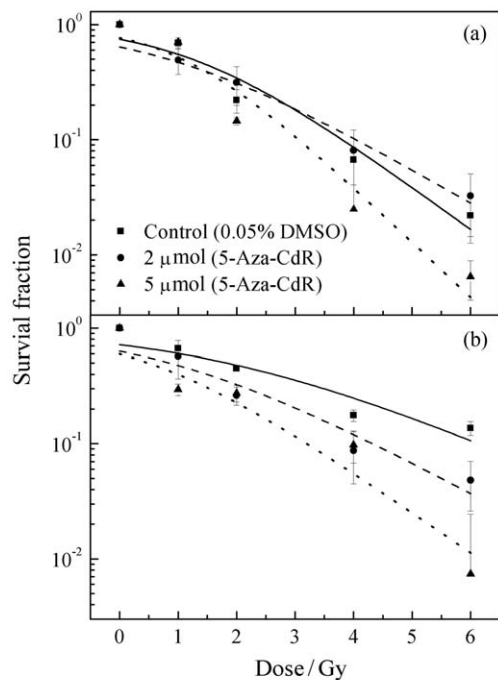


图 4 5-Aza-CdR 预处理联合辐照对 2D 和 3D 培养细胞存活的影响

5 μmol/L 药物预处理 2D 与 3D 培养 A549 细胞 72 h 并联合辐照后细胞克隆存活率均显著低于相应的对照组 ((a), (b)), 且较低浓度 5-Aza-CdR(2 μmol/L) 预处理的 3D 培养 A549 细胞 2, 4, 6 Gy 辐照后克隆存活率较未用药处理组显著降低 (b), 而在 2D 培养 A549 细胞中未观测到上述现象 (a)。

处理组 1 ~4 Gy 照射后, 细胞存活呈剂量依赖性减少, 单独 4 Gy 辐照的 3D 培养 A549 细胞存活 (17.61%) 与 2 Gy 辐照的 2D 培养 A549 细胞存活 (约 22.13%) 相当, 6 Gy 辐照的 3D 培养 A549 细胞存活 (13.61%) 显著高于 6 Gy 辐照的 2D 培养 A549 细胞存活 (0.021%), 且 4 Gy 与 6 Gy 辐照的 3D 培养 A549 细胞存活无明显差异性 (4 Gy: 17.66%, 6 Gy: 13.61%), 此与 Storch 等<sup>[14]</sup>报道的 3D 细胞相对于 2D 细胞具有较高辐射抗性相一致 (图 4(b))。5  $\mu\text{mol/L}$  5-Aza-CdR 预处理联合 X 射线辐照后发现, 其诱导的 2D 与 3D 培养 A549 细胞克隆存活率, 均显著低于相应的对照组 ( $P < 0.05$ , 图 4(a), 4(b)), 较低浓度 5-Aza-CdR (2  $\mu\text{mol/L}$ ) 预处理的 3D 培养 A549 细胞 2, 4, 6 Gy 辐照后细胞克隆存活率较未用药处理组显著降低 ( $P < 0.05$ , 图 4(b)), 而在 2D 培养 A549 细胞中未观测到上述现象 (图 4(a))。我们的结果表明, 2  $\mu\text{mol/L}$  浓度 5-Aza-CdR 能够显著降低 3D 培养 A549 细胞辐照后克隆存活率, 增加辐射敏感性 (图 4(b)), 此为肿瘤临床治疗提供了借鉴意义。

## 4 讨论

体外培养细胞在具备支持材料和细胞分化培养液生长的微环境情况下, 以空间立体方式生长, 可形成类似有机体内组织结构。比起 2D 培养细胞模型, 体外人体细胞的 3D 培养是一个更理想的用来研究人体内基因功能及药物筛选的模型系统<sup>[15]</sup>。三维细胞培养技术既能保留体内细胞微环境的物质及结构基础, 又能展现细胞培养的直观性及条件可控性的优势, 填补了单层细胞培养和动物实验的鸿沟。美国 BD 公司生产的一种由鼠肉瘤细胞分泌物提取的凝胶状蛋白混合物 Engelbreth Holm Swarm (EHS) 的 Matrigel (商品名), 目前已广泛应用于 3D 的构建, 其主要含有的 ECM 成分, 不仅给细胞提供了向空间发展的支架, 而且其含有的 ECM, 在调控细胞的形态, 发育、迁移和代谢功能方面也发挥着作用。因此, 越来越多的研究者将这种三维细胞培养模型作为自己进一步研究基因功能或药物生理学作用的研究平台<sup>[16]</sup>。

目前已经有多篇文献报道, 5-Aza-CdR 并不影响 DNMTs 表达, 但能够通过和 DNMTs 结合成共价复合物抑制该酶的活性, 降低某些抑癌基因启

动子的甲基化程度从而使基因激活, 能够增加结肠癌、乳腺癌及鳞状细胞癌等单层培养细胞系的辐射敏感性<sup>[17-19]</sup>。为更好地促进 5-Aza-CdR 在临床上的应用, 我们比较了 5-Aza-CdR 对 2D 与 3D 培养 A549 细胞的辐射增敏作用, 观测到相较于 2D 培养 A549 细胞, 低浓度的 5-Aza-CdR (2  $\mu\text{mol/L}$ ) 对 3D 培养 A549 细胞有更为明显的辐射增敏作用。

我们近期的以及其他研究者的研究表明, 人胚肺细胞接种于基质胶中, 经一定培养时间成熟分化后, 形成具有人肺囊器官样结构的 3D 组织模型, 其接受离子辐射后引起的残留未修复 DNA 损伤高于具有相同遗传背景的同型 2D 培养细胞<sup>[13]</sup>, 辐照后的 3D 培养 A549、Utscc15 细胞存活也高于相同遗传背景的同型 2D 培养细胞<sup>[14]</sup>, 具体由何种机制导致的这种辐射损伤差异性目前还不完全清楚。我们的初步蛋白表达检测发现, 3D 结构细胞的 DNMT3b (DNA 甲基转移酶 3b 亚型) 表达总是明显高于 2D 培养细胞 (未发表的结果)。DNMT3b 是甲基转移酶家族中的一种, 它具有使 DNA 的胞嘧啶甲基化的功能<sup>[20]</sup>。因此我们推断, 3D 细胞中 DNMT3b 表达量较高可能引起两种培养模式的细胞在甲基化调控机制存在差异性, 从而导致低浓度 5-Aza-CdR 对两种培养模式下的细胞的辐射敏感性影响不同。甲基化某些抑癌基因启动子可导致抑癌基因表达受到抑制, 在肿瘤发生等过程当中发挥重要作用<sup>[21]</sup>, 也有大量文献证明 DNA 甲基化对细胞辐射后 DNA 损伤修复及存活存在重要的影响<sup>[22]</sup>。因此, 我们希望以 5-Aza-CdR 作为 DNA 甲基化抑制手段, 研究某些基因启动子甲基化在 2D 和 3D 细胞辐射损伤差异性中是否发挥重要作用。

Kim 等<sup>[23]</sup>在肺癌细胞系中检测了多种 DNMTs 抑制剂对细胞的辐射敏感性影响, 发现 Psammaplin A, 5-Aza-CdR, Zebularine 都对细胞具有辐射增敏作用, 并且低浓度 5-Aza-CdR (0.3  $\mu\text{mol/L}$ ) 已对 A549 细胞达到半数抑制作用。但是我们的实验结果及已发表文献<sup>[12, 24-26]</sup>均没有发现其具有如此高的细胞增殖抑制作用, 因此对于其仅 0.3  $\mu\text{mol/L}$  浓度就能够促进肿瘤细胞辐射敏感性我们持保留态度。但可以确信的是, 5-Aza-CdR 对 3D 培养 A549 细胞的辐射增敏作用更明显, 暗示在人体中, 低剂量的药物浓度即可达到干预抑制效果, 结合放疗的相对靶向性, 可以有效降低对正常组织细胞的毒性。

## 5 结论与展望

我们的研究表明, 相对于2D培养肺癌细胞, 低剂量5-Aza-CdR更能够降低3D培养肺癌细胞的辐射抗性, 其在癌症临床治疗方法学上具有一定的指导意义, 暗示低剂量的5-Aza-CdR预处理结合放疗的靶向针对性, 可以更好地杀伤肿瘤细胞, 同时可避免高剂量药物对正常体细胞的毒性作用。而作为一种更接近人体生理环境的研究模型, 以3D细胞培养平台进行的体外细胞信号通路研究可以更好地反映人体内生理反应特征, 是一个可以更好地筛选适合人体使用的新型药物的理想模型。

同时, 我们的实验结果也从侧面表明, 关键基因的甲基化可能是导致3D细胞辐射抗性较高的重要原因之一, 这种表观遗传调控机制在3D与2D细胞之间的辐射损伤差异性中扮演重要角色。因此, 我们今后的工作将从基因启动子甲基化角度, 研究多个基因功能失活或激活后对DNA损伤的影响, 及2D和3D细胞中相关信号通路的调控机制差异性, 以期发现导致2D与3D细胞辐射损伤差异的内在机理。

### 参考文献:

- [1] YAMADA K M, PANKOV R, CUKIERMAN E. *Braz J Med Biol Res*, 2003, **36**: 959.
- [2] BIRGERSDOTTER A, SANDBERG R, ERNBERG I. *Semin Cancer Biol*, 2005, **15**: 405.
- [3] GRIFFITH L G, SWARTZ M A. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, **7**: 211.
- [4] NELSON C M, BISSELL M J. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006, **22**: 287.
- [5] KNIGHT Z A, SHOKAT K M. *Cell*, 2007, **128**: 425.
- [6] GRIFFITH L G, SWARTZ M A. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, **7**: 211.
- [7] ISSA J. *Clin Cancer Res*. 2007, **13**(6): 1634.
- [8] HU Zhili, LI Hanxian, LIU Liang. *Chin J Cancer Prev Treat*, 2008, **15**(6): 415. (in Chinese)  
(胡志立, 李汉贤, 刘亮. *中华肿瘤防治杂志*, 2008, **15**(6): 415.)
- [9] FENECH M. *Mutat Res*, 1993, **285**(1): 35.
- [10] LI Min, ZENG Biao. *Tumor*, 2012, **32**: 413. (in Chinese)  
(李敏, 曾彪. *肿瘤*, 2012, **32**: 413.)
- [11] QIAO Shukai, XU Shirong, GUO Xiaonan. *Chinese Journal of Hematology*, 2004, **25**(8): 486. (in Chinese)  
(乔淑凯, 徐世荣, 郭晓楠. *中华血液学杂志*, 2004, **25**(8): 486.)
- [12] QU Lulu, FENG Xianqi, ZHAO Hongguo, *et al.* *Progress in Modern Biomedicine*, 2013, **13**(13): 2437. (in Chinese)  
(曲露露, 冯献启, 赵洪国, 等. *现代生物医学进展*, 2013, **13**(13): 2437.)
- [13] ASAITHAMBY A, HU B, DELGADO O, *et al.* *Nucleic Acids Res*, 2011, **39**(13): 5474.
- [14] STORCH K, EKE I, BORGMANN K, *et al.* *Cancer Res*, 2010, **70**(10): 3925.
- [15] YAMADA K M, CUKIERMAN E. *Cell*, 2007, **130**: 601.
- [16] WU Ruqun, XU An, WU Lijun, *et al.* *Nucl Phys Rev*, 2012, **29**(1): 97. (in Chinese)  
(吴汝群, 许安, 吴李君, 等. *原子核物理评论*, 2012, **29**(1): 97.)
- [17] CHO H J, KIM S Y, KIM K H, *et al.* *World Journal of Surgical Oncology*, 2009, **7**: 49.
- [18] HOFSTETTER B, NIEMIERKO A, FORRER C, *et al.* *Int J Radiat Oncol*, 2010, **76**(5): 1512.
- [19] DE S H, KIMPE M, ISEBAERT S, *et al.* *Int J Radiat Oncol*, 2009, **73**(3): 904.
- [20] OKANO M, BELL D W, HABER D A, *et al.* *Cell*, 1999, **99**: 247.
- [21] BAYLIN S B, ESTELLER M R, ROUNTREE M R, *et al.* *Human Molecular Genetics*, 2001, **10**(7): 687.
- [22] GRØNBÆK K, HOTHER C, JONES P B. *Acta Pathol Micro Immun Scand*, 2007, **115**: 1039.
- [23] KIM H J, KIM J H, CHIE E K, *et al.* *Radiat Oncol*, 2012, **7**: 39.
- [24] LI Hongli, LI Wentong, ZHANG Weidong, *et al.* *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2009, **25**(10): 1399. (in Chinese)  
(李洪利, 李文通, 张伟栋, 等. *中国药理学通报*, 2009, **25**(10): 1399.)
- [25] ZHAO Ying, SUN Lihua, YANG Zhenhua, *et al.* *Acta Universitatis Medicinalis Nanjing(Natural Science)*, 2009, **29**(6): 767. (in Chinese)  
(赵莹, 孙丽华, 杨振华, 等. *南京医科大学学报*, 2009, **29**(6): 767.)
- [26] XIONG Huihua, ZHUNG Liang, XIONG Hua, *et al.* *Chin J Exp Surg*, 2009, **26**(3): 324. (in Chinese)  
(熊慧华, 庄亮, 熊华, 等. *中华实验外科杂志*, 2009, **26**(3): 324.)

# Effect of DNA Methyltransferase Inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine on Radiosensitivity of the Human Lung Cancer Cells in Three-dimensional Culture

PAN Dong<sup>1, 2, 3</sup>, CHEN Yaxiong<sup>1, 2</sup>, XUE Gang<sup>1, 2, 3</sup>, LI Xiaoman<sup>1, 2, 3</sup>,  
REN Zhenxin<sup>1, 2</sup>, DU Yarong<sup>1, 2</sup>, HU Burong<sup>1, 2</sup>

(1. *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

2. *Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Biology and Medicine of Chinese  
Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

3. *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

**Abstract:** 5-Aza-CdR is a specific inhibitor of DNMTs which could suppress tumor growth by demethylation of genomic DNA. There have only few studies thus far concerning it as radiosensitizers in three-dimensional (3D) cells. The principal aim of this study is to evaluate the effects of 5-Aza-CdR on the radiosensitivity of A549 cells in monolayer (2D) and 3D cultures in an attempt to find out a new combination treatments with radiotherapy. The cell proliferation was detected by MTT assay after pretreated with different doses of 5-Aza-CdR for 72 h. A549 cells were treated with or without 5-Aza-CdR (2, 5  $\mu\text{mol/L}$ ) for 72 h before be exposed to X-rays of 1, 2, 4, 6 Gy, respectively. The DNA damage was evaluated by micronucleus assay and clonogenic assays. Pretreatment with 5-Aza-CdR inhibited the A549 cell proliferation significantly. More micronucleus were observed after irradiation in 3D cells pretreated with 2 and 5  $\mu\text{mol/L}$  concentration of drug than those without treatment. The survival fractions of cells pretreated by both 2 and 5  $\mu\text{mol/L}$  drug reduced significantly in 3D cultures after irradiation. These significances, however, were found in 2D cells pretreated by only 5  $\mu\text{mol/L}$  drug. Our results suggest that 5-Aza-CdR can inhibit the A549 cells proliferation and apparently enhance the radiosensitivity of cells in 3D cultures. Using of the low dose 5-Aza-CdR in clinical radiotherapy may reduce side effects and enhance effectively the cancer target therapy.

**Key words:** 5-aza-2'-deoxycytidine; methylation; three-dimensional cell culture; radiosensitivity

---

**Received date:** 25 Aug. 2013; **Revised date:** 11 Oct. 2013

**Foundation item:** Hundred Talents Program of Chinese Academy of Sciences(Y163100BRO); National Science Foundation of China(31170803); National Basic Research Program of China(973 Program)(2010CB834201)

**Corresponding author:** HU Burong, E-mail: hubr@impcas.ac.cn.

<http://www.npr.ac.cn>