

CNIC-01605
SZU-0003

^{89}Sr 诱发肿瘤细胞 K₅₆₂ 凋亡及基因表达研究
THE CHARACTERISTICS AND MECHANISM OF
APOPTOSIS INDUCED BY INTERNAL IRRADIATION
(In Chinese)

中国核情报中心
China Nuclear Information Centre

CNIC-01605
SZU-0003

^{89}Sr 诱发肿瘤细胞 K_{562} 凋亡 及基因表达研究

洪承皎 张军宁 朱寿彭
(苏州大学, 苏州, 215006)

摘 要

采用分子病理和定量病理技术研究放射性核素 ^{89}Sr 内照射诱导的 K_{562} 癌细胞凋亡、剂量效应关系和重要相关基因 bcl-2 和 bax 在其中的表达。结果表明, K_{562} 细胞经 ^{89}Sr 内照射作用达 6 h 和 24 h, 提取 DNA, 琼脂糖凝胶电泳图谱上出现典型的“阶梯状”区带, 伴有“拖尾”, 而对照组未见“阶梯状”区带; 荧光双标记流式细胞仪法定量检测见 ^{89}Sr 内照射作用 6 h, 9 h, 12 h, 24 h, 48 h 后, K_{562} 细胞凋亡率、 K_{562} 细胞坏死率均较对照组有明显的升高 ($P<0.01$)。随着 ^{89}Sr 内照射作用时间的延长、累积剂量的提高, 细胞凋亡与细胞坏死均无显著变化 ($P>0.05$); 免疫组织化学染色显示, 对照组 K_{562} 细胞中 bcl-2 表达阳性细胞率 82.8%, bax 表达阳性细胞率 44.4%, bcl-2/bax 比值 1.86, ^{89}Sr 内照射作用 24 h 后的 K_{562} 细胞中, bcl-2 表达阳性细胞率 31.4%, bax 表达阳性细胞率 38.2%, bcl-2/bax 比值 0.82, 与对照组相比, 差异具有显著性 ($P<0.05$); 结果提示, 放射性核素 ^{89}Sr 内照射 K_{562} 细胞后, 细胞凋亡与细胞坏死并存, 且 ^{89}Sr 诱导 K_{562} 细胞的凋亡可能是通过 bcl-2mRNA 和 bcl-2 表达蛋白降低, bcl-2/bax 比值下降而调控的。

关键词: ^{89}Sr , 内照射, K_{562} 细胞, 凋亡

The Characteristics and Mechanism of Apoptosis Induced by Internal Irradiation

(In Chinese)

HONG Chengjiao ZHANG Junning ZHU Shoupeng
(Suzhou University, 215006)

ABSTRACT

Apoptosis in tumor cells induced by radionuclides is likely the most effective way to cure cancer. In order to explore the possibility in clinic application, the characteristics and mechanism of apoptosis induced by internal irradiation were investigated. The apoptosis and expressions of bcl-2mRNA, bcl-2 and bax of K₅₆₂ cells following internal exposure with different accumulated absorbed doses of strontium-89 were studied. 6 h after irradiation, the characteristics of apoptosis and necrosis appeared in K₅₆₂ cells. The apoptosis and necrosis enhanced with the prolongation of internally contaminated time at 6 h, 9 h, 12 h, 24 h and 48 h. The expressions of bcl-2mRNA decreased at 12 h, most remarkably at 24 h. The expressions of bcl-2 decreased after irradiation whereas bax had no obvious changes. The results suggest that the apoptosis induced by internal exposure may be regulated by lower expressions of bcl-2mRNA and bcl-2, lower bcl-2/bax value.

Keywords: Strontium-89, Internal irradiation, K₅₆₂ cells

引言

细胞凋亡是细胞的一种程序化死亡过程，是细胞针对所处环境因素的特定改变产生的应答，它严格地控制着细胞的死亡和增殖，在细胞更新和细胞增殖中承担着重要的调控作用。研究表明，肿瘤的发生发展是细胞丧失自发凋亡能力的最终结果，因此治疗肿瘤最有效的方法可能是诱发细胞的凋亡^[1]。许多外界因素如电离辐射、化学药物、细胞因子等均可触发细胞凋亡，这为肿瘤的治疗提出了新的策略。为了揭示和运用放射性核素内照射的作用特点，本研究采用分子病理和定量病理技术研究放射性核素 ⁸⁹Sr 内照射诱导的 K₅₆₂ 癌细胞凋亡、剂量效应关系和重要相关基因 bcl-2 和 bax 在其中的表达，探讨内照射放射性核素 ⁸⁹Sr 诱发 K₅₆₂ 癌细胞凋亡的放射毒理效应的分子机理，从而设想考虑将放射性核素与单克隆抗体或药物偶联用于临床治疗的可能性，并为临床应用放射性核素治疗肿瘤提供新的依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和药品

小鼠抗人 bcl-2 和 bax 单抗 (Santa Cruz), SABC 试剂盒 (华美生物工程公司), Annexin V-FITC (Sigma), 碘化丙啶 (prodidium iodide, PI) (Sigma), 总 RNA 分离试剂盒 (GibcoBRL), 反转录试剂盒 (MBI), TaqDNA 聚合酶 (Promega)。⁸⁹Sr 由中国原子能科学研究院同位素所提供，为无色透明液体，pH 值 8.0，放化纯 >98%。放射性比活度为 1 mCi/ml (1 Ci=3.7×10¹⁰ Bq)。

1.2 细胞培养

收集指数生长期 K₅₆₂ 细胞，用 RPMI-1640 全培养液调至细胞浓度 2×10⁶ /ml。取无菌 24 孔培养板，在每培养孔内放置 1 ml 细胞悬液，然后在每一培养孔中另加入 1 ml 用 RPMI-1640 全培养液稀释的 ⁸⁹Sr 工作液，使 ⁸⁹Sr 的最终放射性活度为 72.0 Bq/ml。对照组每孔中加入 1 ml RPMI-1640 全培养液，使实验孔和对照孔细胞最终浓度为 1×10⁶ /ml。将 24 孔培养板置于 37 °C，体积分数为 5%的 CO₂ 培养箱内培养，经不同时间收集细胞用于凋亡研究。选择的观察时间为 6, 9, 12, 24, 48 h。

1.3 电泳分析：按照文献方法^[2, 3]

取基因组 DNA，空气干燥后保存于 TE 缓冲液中。取 DNA 样品 10 μl，于 2%琼脂糖凝胶中 100 V 电泳 30~60 min，EB 染色，紫外仪下观察记录电泳情况。

1.4 荧光双标记流式细胞仪法定量检测细胞凋亡与坏死

用 Triton X-100 作用 1 h 作为细胞坏死的阳性对照，0.01% mmol/L 地塞米松作用 3 h 作为细胞凋亡的阳性对照，每份样品中加 Annexin V-FITC 5 μl (1 : 10)，PI 5 μl (250 μg/ml)，冰浴 30 min 后，用流式细胞仪收集 1×10⁴ 个细胞，并根据不同状态的细胞在激光的激发下所发出的荧光颜色的不同，即正常细胞呈现出绿色荧光，坏死细胞呈现出

红色荧光，而凋亡细胞呈现橙黄色荧光，采用 LYSIS 软件记录阳性细胞百分数^[4~6]。

1.5 bcl-2 和 bax 蛋白免疫组化检测

收集并洗涤细胞，悬浮于 pH 7.4 的 PBS，浓度为 2×10^5 ，玻片经多聚赖氨酸处理后，每片滴 100 μ l 细胞，干燥后，4%多聚甲醛固定， $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用；染色方法：3% H_2O_2 5 min，5%马血清 10 min，bcl-2 和 bax 单克隆抗体 (1 : 50) $4\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜，生物素化二抗 (1 : 300)， $37\text{ }^\circ\text{C}$ 30 min，ABC 试剂 (1 : 300)， $37\text{ }^\circ\text{C}$ 60 min，DAB 5 min；苏木素复染，梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树脂封片。

免疫组化染色，空白对照以 PBS 代替一抗，胞浆染成棕黄色或棕褐色为 bcl-2 或 bax 阳性细胞。随机计数高倍野 (10×40) 下 500 个细胞中阳性细胞所占的百分率。

1.6 RNA 提取

按照文献[7]方法提取 RNA。

1.7 bcl-2mRNA 逆转录 cDNA

反应总体积 20 μ l，含有 dNTP 各 1 mmol/L， Mg^{2+} 5 mmol/L，RNA 酶抑制剂 20 U，Mulv 逆转录酶 200 U，1 μ g。将上述混合物室温孵育 10 min， $42\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 15 min， $99\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 5 min， $5\text{ }^\circ\text{C}$ 冷却 5 min。

1.8 bcl-2 cDNA PCR 扩增

bcl-2 基因上、下游引物合成及反应体系条件参照 Rinaudo 报道的方法^[8]。上游引物序列为 5' -GGATCCAGGATAACGGAGGCTGG-3'，下游引物序列为 5' -CCACCAGGGCCAAACTGAGC-3'。扩增片段为 169 bp。最后取 PCR 产物 30 μ l，1%琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色，紫外透射检测电泳带并照相。

1.9 细胞受 ^{89}Sr 内照射的累积吸收剂量估算

对 K_{562} 细胞受 ^{89}Sr 内照射不同阶段的累积吸收剂量 D (mGy) 的估算，参照下式^[9]进行：

$$D=AE/m$$

式中： A —— ^{89}Sr 内照射的放射性活度 (kBq)；

E —— ^{89}Sr 的 β 射线平均能量；

m ——受照射细胞的质量。

1.10 统计分析

细胞凋亡率、坏死率比较采用 t 检验，bcl-2，bax 表达阳性率的组间比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 K_{562} 细胞受 ^{89}Sr 内照射的累积吸收剂量

表 1 K_{562} 细胞受 ^{89}Sr 内照射不同阶段的累积吸收剂量

时间/h	6	9	12	24	48
吸收剂量/mGy	0.0241	0.0362	0.0482	0.0964	0.1928

2.2 细胞凋亡的电泳特征

K_{562} 细胞经 ^{89}Sr 内照射作用达 6 h 和 24 h, 提取 DNA, 琼脂糖凝胶电泳图谱上出现典型的“阶梯状”区带, 伴有“拖尾”; 而对照组未见“阶梯状”区带。

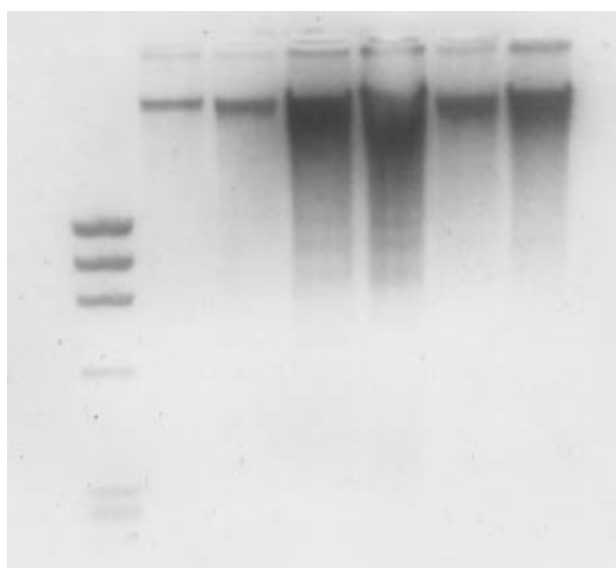


图 1 ^{89}Sr 内照射后 6, 24 h DNA 阶梯状电泳图谱

2.3 荧光双标记流式细胞仪分析结果

表 2 K_{562} 细胞 ^{89}Sr 内照射后不同时间点细胞凋亡率和细胞坏死率 ($\bar{X} \pm s\%$)

	K_{562} 细胞凋亡率	K_{562} 细胞坏死率
对照组	$2.5 \pm 0.64^{2)}$	$0.8 \pm 0.73^{2)}$
6 h	$10.9 \pm 2.34^{1)}$	$10.2 \pm 2.98^{1)}$
9 h	$9.6 \pm 0.70^{1)}$	$11.9 \pm 0.87^{1)}$
12 h	$10.1 \pm 2.47^{1)}$	$12.6 \pm 2.70^{1)}$
24 h	$10.4 \pm 0.68^{1)}$	$11.6 \pm 0.46^{1)}$
48 h	$8.4 \pm 3.13^{1)}$	$10.4 \pm 2.71^{1)}$

1) 与对照组比较, $P < 0.01$; 2) 组间比较, $P > 0.05$ 。

^{89}Sr 内照射作用 6 h, 9 h, 12 h, 24 h, 48 h 后, K_{562} 细胞凋亡率、 K_{562} 细胞坏死率均较对照组有明显的升高 ($P < 0.01$) ; 随着 ^{89}Sr 内照射作用时间的延长、累积剂量的提高, 细胞凋亡与细胞坏死均无显著变化 ($P > 0.05$) 。

2.4 bcl-2 和 bax 蛋白的免疫组织化学结果

表 3 K_{562} 细胞 ^{89}Sr 内照射作用 24 h 后 bcl-2 和 bax 阳性细胞率 %

	bcl-2 表达阳性细胞率	bax 表达阳性细胞率	bcl-2/bax
对照组	82.8 (411/500)	44.4 (222/500)	1.86
^{89}Sr 内照射组	31.4 (157/500) ¹⁾	38.2 (191/500)	0.82

1) 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

免疫组织化学染色显示, bcl-2 和 bax 阳性细胞胞浆被染成棕黄色或棕褐色。对照组 K_{562} 细胞中 bcl-2, bax 均有表达, bcl-2 表达阳性细胞率 82.8%, bax 表达阳性细胞率 44.4%, bcl-2/bax 比值 1.86; ^{89}Sr 内照射作用 24 h 后的 K_{562} 细胞中, bcl-2 表达阳性细胞率 31.4%, bax 表达阳性细胞率 38.2%, bcl-2/bax 比值 0.82, 与对照组相比, 差异具有显著性 ($P < 0.05$) 。

2.5 bcl-2mRNA 的表达

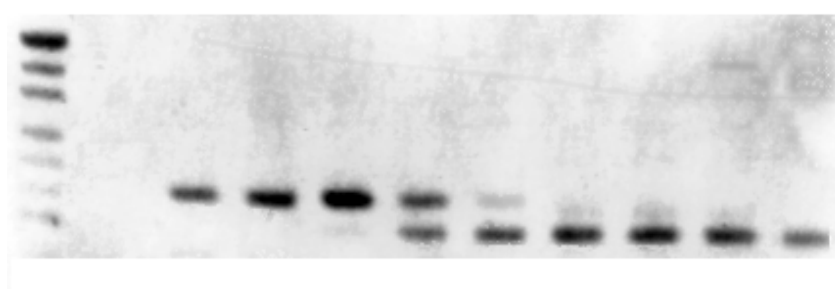


图 2 ^{89}Sr 内照射后不同时间点 K_{562} 细胞 bcl-2mRNA 的表达

如图 2 所见, bcl-2mRNA 在对照组 K_{562} 细胞中高表达, ^{89}Sr 内照射作用 12 h 后已有明显的下调, 24 h 后则尤其显著。

3 讨论

电离辐射可诱发细胞凋亡。已有实验证据表明, 许多重要生物学过程, 如 DNA 损伤和修复, 细胞周期调控及原癌基因和抑癌基因等都参与了细胞凋亡过程。细胞 DNA 是电离辐射作用的主要靶物质, 射线能量的直接沉积或在所产生的活性氧中介物的间接作用下, 导致 DNA 发生单链或双链断裂, DNA 修复机制的启动, 使大部分细胞可得到修复, 并且还可通过细胞凋亡, 使不能被修复的损伤细胞经凋亡途径死亡。至今有关辐射诱发

细胞凋亡的研究主要集中在外照射方面，而对放射性核素内照射诱发细胞凋亡的研究有待阐明。与外照射不同，由于放射性核素内照射具有作用部位的选择性和作用时间的持续性特点，以及存在着细胞对核素的吸附及吞噬作用。因此它们诱发的凋亡途径就更为复杂，涉及到的因素更多。探讨和揭示放射性核素诱发细胞凋亡的机理、作用途径、调节因素具有重要的生物学意义和实际意义。

3.1 ^{89}Sr 内照射可诱导 K_{562} 细胞凋亡

Forster 等观察到 ^{32}P 可诱导 Burkitt 淋巴瘤细胞凋亡，Vriesendorp 用低剂量 ^{90}Y 标记的单克隆抗体研究观察到 B 淋巴细胞的凋亡现象。朱寿彭等^[10, 11]也观察到 ^{153}Sm 可诱导 Molt-4 细胞和骨肿瘤细胞凋亡。至今尚未见 ^{89}Sr 诱导细胞凋亡的报道。

琼脂糖凝胶电泳图谱上出现典型的核小体（180~200 bp）整倍数的 DNA “阶梯状”区带，目前这是判断细胞发生凋亡的重要生化指标^[12]。本实验证实一定剂量的 ^{89}Sr 内照射可诱导 K_{562} 肿瘤细胞凋亡。

3.2 ^{89}Sr 内照射可诱导 K_{562} 细胞凋亡与坏死并存

探讨和揭示电离辐射作用后肿瘤细胞凋亡和坏死的发展规律，有助于更全面地了解电离辐射作用后细胞的死亡模式与死亡机理，并为某些肿瘤的放疗方案选择最佳的剂量提供一定的科学依据^[13]。至今同时研究电离辐射对肿瘤细胞凋亡和坏死的报道尚不多见。

单纯 PI 染色流式细胞仪检测 Ap 亚峰的方法存在一定的细胞周期局限性^[14]，而 Annexin V-FITC 和 PI 双荧光探针流式细胞术，不仅能够检测细胞核改变如 DNA 碎片，更早地辨别凋亡细胞，而且可区分凋亡细胞（Annexin V-FITC⁻/PI⁻）与坏死细胞（Annexin V-FITC⁺/PI⁺）^[15]。本研究采用后一种技术，发现 ^{89}Sr 内照射后 K_{562} 细胞坏死与细胞凋亡并存，且随着作用时间的延长、累积剂量的提高，并不引起细胞凋亡与细胞坏死的增加。有研究表明，当受照细胞在 0~2 Gy 剂量范围内，凋亡数随着照射剂量的增大而增加。Luchnik 指出大于 10 Gy 的辐照足以破坏基因的转录，并对细胞膜造成损伤，此时引起的细胞死亡实际上是坏死而非凋亡。Akgi 等^[16]报道 Molt-4 细胞在受照剂量 2~30 Gy 时，出现坏死与凋亡并存的情况。薛丽香等报道 50~200 mGy X 射线不引起 EL-4 细胞凋亡的增加，并可抑制 EL-4 细胞坏死的发生，和本研究结果基本一致。其详尽机理有待进一步深入研究。

3.3 bcl-2, bax 参与 ^{89}Sr 内照射诱导的 K_{562} 细胞凋亡

bcl-2 和 bax 是一对凋亡相关基因。bcl-2 能抑制细胞凋亡，而 bax 则促进细胞凋亡^[17]。Horvitz 认为组织自稳态是细胞增殖和细胞凋亡平衡的结果，凋亡太少同增殖太多一样，都会引起组织过度生长，产生肿瘤。因此，在正常组织中，bax 起着主导作用，促进细胞凋亡，维持组织的自稳状态；而在肿瘤组织中，bcl-2 则起着主导作用，抑制细胞凋亡，导致组织过度生长。本组发现 K_{562} 细胞中 bcl-2, bax 均有表达，但 bcl-2 高于 bax，提示 bcl-2 抑制细胞凋亡可能是 K_{562} 细胞癌性增殖的重要原因。

近年来研究发现，bcl-2 基因家族都是以二聚体的形式发挥调控作用的。bcl-2, bax 以同源二聚体或异源二聚体的形式调控细胞凋亡，二者之间的比例决定了是抑制细胞凋

亡还是促进细胞凋亡^[17, 18]。当细胞内 **bax** 高表达时形成同源二聚体 **bax/ bax**，可促进细胞凋亡；而当细胞内 **bcl-2** 高表达时形成异源二聚体 **bcl-2/ bax**，抑制细胞凋亡。电离辐射诱导的细胞凋亡都伴有 **bcl-2**，**bax** 表达水平的变化。目前尚未见有 ⁸⁹Sr 内照射诱导细胞凋亡 **bcl-2**，**bax** 表达水平的变化的报道。

本组研究采用分子和定量病理技术，发现 ⁸⁹Sr 内照射诱导 K₅₆₂ 细胞凋亡的同时，**bcl-2** 及 **bax** 的表达水平发生了相应变化，与对照组比较，**bcl-2**mRNA 和 **bcl-2** 表达蛋白降低，**bcl-2/ bax** 比值下降，表明 ⁸⁹Sr 诱导 K₅₆₂ 细胞凋亡也可能是通过 **bcl-2**，**bax** 而调控的。

参 考 文 献

- 1 Kerr J F R, Winterfor C M, Harmon B V, et al. Apoptosis: Its Significance in Cancer and Cancer Therapy. *Cancer*, 1994, 73: 2013
- 2 J. 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿提蒂斯等著. 分子克隆实验指南. 余冬雁,黎孟枫,译. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992: 304
- 3 彭秀玲, 袁汉英, 谢毅, 等编著. 基因工程实验技术. 第 2 版. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1997: 1
- 4 Afanasyev V N, Korol B A, Matylevich N P, et al. The Use of Flow Cytometry for the Investigation of Cell Death. *Cytometry*, 1993, 14: 603
- 5 Vitale M, Zamai L, Mazzotti G, et al. Differentiated Kinetics of Propidium Iodide Uptake in Apoptotic and Necrotic Thymocytes. *Histochemistry*,1993, 100: 223
- 6 Huschtscha L, Jeitner T M, Andersoin C E, et al. Identification of Apoptotic and Necrotic Human Leukemic Cells by Flow Cytometry. *Exp Cell Res*, 1994, 212: 161
- 7 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术. 第 1 版. 北京: 高等教育出版社, 1993, 141
- 8 Rinaudo M S, Su K, Falk L A, et al. Human Interleukin-3 Receptor Modulates bcl-2 mRNA and Protein Levels through Protein Kinase C in TF-1 Cells. *Blood*, 1995, 86: 80
- 9 朱寿彭. 浓缩铀的放射毒理 (第 1 版). 北京: 原子能出版社, 1998, 125
- 10 朱寿彭, 肖东, 韩晓枫. DNA 凝胶电泳和放射自显影研究 ¹⁵³Sm 诱发骨肉瘤细胞凋亡. *中华放射医学与防护杂志*, 1999, 19(5): 307
- 11 朱寿彭, 肖东, 韩晓枫. ¹⁵³Sm-EDTMP 诱发骨肉瘤细胞凋亡的荧光显微镜形态和增生抑制研究. *核技术*, 1999, 22(5): 309
- 12 Wyllie A H, Keer J F, Gurrie A R, et al. Cell death: The Significance of Apoptosis. *Int Rev Cytol*, 1980, 68: 251
- 13 赵卫红, 寿好长, 闫福岭. 细胞凋亡. 郑州: 河南医科大学出版社,1997
- 14 Darzynkiewicz Z, Bruno S, Bino G D, et al. Features of Apoptotic Cells Measured by Flow Cytometry. *Cytometry*, 1992, 13: 795
- 15 Vermes I, Haanen C, Steffens N H, et al. A Novel Assay for Apoptosis: Flow Cytometric Detection of Phosphatidyl Secine Expression on Early Apoptotic Cells Using Fluorescein Labeled Annexin V. *J Immunol Methods*, 1995, 184: 39
- 16 Akagi Y, Ito K, Sawada S. Radiation-induced Apoptosis and Necrosis in Mlot-4 cell: A Study of Dose-effect Relationships and Their Modification. *Int Radiat Biol*, 1993, 64: 47
- 17 Oltvai Z N, Milliman C L, Korsmeyer S J, et al. Bcl-2 Heterodimerizes in Vivo with a Conserved Homolog, Bax, That Accelerates Programmed Cell Death. *Cell*, 1993, 74: 609
- 18 Gazzaniga P, Gallucci M, Gradilone A, et al. Detection of bcl-2 RNA in Low-Grade Tumours of the Urinary Bladder. *Eur J Cancer*, 1995, 131A: 2119



洪承皎：苏州大学核医学院中心实验室主管技师。

HONG Chengjiao: Chief technician of Central Lab, School of Nuclear Medicine, Suzhou University.