

# 放射性核素 $^{89}\text{Sr}$ 诱发 $\text{K}_{562}$ 癌细胞凋亡的 放射毒理效应的分子机理研究

张军宁 洪承皎 朱寿彭

(苏州大学附属第一医院 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  $^{89}\text{Sr}$  诱导的  $\text{K}_{562}$  癌细胞凋亡、剂量效应关系和重要相关基因  $\text{bcl-2}$  和  $\text{bax}$  在其中的表达。结果表明,  $\text{K}_{562}$  细胞经  $^{89}\text{Sr}$  作用达 6h 和 24h, 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  $^{89}\text{Sr}$  作用 6、9、12、24 和 48h 后,  $\text{K}_{562}$  细胞凋亡率、 $\text{K}_{562}$  细胞坏死率均较对照组有明显的升高 ( $p < 0.01$ )。免疫组织化学染色显示, 对照组  $\text{K}_{562}$  细胞中  $\text{bcl-2}$ 、 $\text{bax}$  均有表达,  $\text{bcl-2}$  表达阳性细胞率 82.8%,  $\text{bax}$  表达阳性细胞率 44.4%,  $\text{bcl-2}/\text{bax}$  比值 1.86,  $^{89}\text{Sr}$  作用 24h 后的  $\text{K}_{562}$  细胞中,  $\text{bcl-2}$  表达阳性细胞率 31.4%,  $\text{bax}$  表达阳性细胞率 38.2%,  $\text{bcl-2}/\text{bax}$  比值 0.82, 与对照组相比, 差异具有显著性 ( $p < 0.05$ ); 结果显示, 放射性核素  $^{89}\text{Sr}$  照射  $\text{K}_{562}$  细胞后, 细胞凋亡与细胞坏死并存, 且  $^{89}\text{Sr}$  诱导  $\text{K}_{562}$  细胞的凋亡可能是通过  $\text{bcl-2}$  表达蛋白降低,  $\text{bcl-2}/\text{bax}$  比值下降而调控的。

**关键词**  $^{89}\text{Sr}$ ,  $\text{K}_{562}$  细胞, 凋亡,  $\text{bcl-2}$ ,  $\text{Bax}$

**中图分类号** R 811.5

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<sup>[1]</sup>。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  $^{89}\text{Sr}$  诱导的  $\text{K}_{562}$  癌细胞凋亡、剂量效应关系和重要相关基因  $\text{bcl-2}$  和  $\text{bax}$  在其中的表达, 探讨内照射放射性核素  $^{89}\text{Sr}$  诱发  $\text{K}_{562}$  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  $\text{bcl-2}$  和  $\text{bax}$  单抗(Santa Cruz), SABC 试剂盒(华美生物工程公司), Annexin V-FITC (Sigma), 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) (Sigma)。 $^{89}\text{Sr}$  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  $> 98\%$ 。

### 1.2 细胞培养

收集指数生长期  $\text{K}_{562}$  细胞, 用 RPMI-1640 全培养

液调至细胞浓度  $2 \times 10^6/\text{mL}$ 。取无菌 24 孔培养板, 在每培养孔内放置 1mL 细胞悬液。然后在每一培养孔中另加入 1mL 用 RPMI-1640 全培养液稀释的  $^{89}\text{Sr}$  工作液, 使  $^{89}\text{Sr}$  的最终放射性活度为  $72.0\text{Bq}/\text{mL}$ 。对照组每孔中加入 1mL RPMI-1640 全培养液, 使实验孔和对照孔细胞最终浓度为  $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。将 24 孔培养板置于  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  的培养箱内培养, 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 和 48h。

### 1.3 电泳分析: 按照文献[2, 3]方法

提取细胞基因组 DNA, 空气干燥后保存于 TE 缓冲液中。取 DNA 样品  $10 \mu\text{L}$ , 于 2% 琼脂糖凝胶中 100V 电泳 30—60min, 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 1h 作为细胞坏死的阳性对照,  $0.01\% \text{mol/L}$  地塞米松作用 3h 作为细胞凋亡的阳性对照, 每份样品中加 Annexin V-FITC  $5 \mu\text{L}$  (1:10), PI  $5 \mu\text{L}$  ( $250 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), 冰浴 30min 后, 用流式细胞仪收集  $1 \times 10^4$  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

苏州大学附属第一临床学院资助课题

第一作者:张军宁,男,1966年12月出生,2001年毕业于苏州大学,放射医学博士,苏州大学附属第一临床学院副主任医师

收稿日期:初稿 2001-11-13,修回 2002-04-25

色荧光,采用LYSIS软件记录阳性细胞百分数<sup>[4-6]</sup>。

### 1.5 bcl-2 和 bax 蛋白免疫组化检测

收集并洗涤细胞,悬浮于pH7.4的PBS中,浓度为 $2 \times 10^5$  /mL,玻片经多聚赖氨酸处理后,每片滴100  $\mu$  L细胞,干燥后,4%多聚甲醛固定,-20℃保存备用;染色方法按下述顺序操作:3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5min,5%马血清 10min;bcl-2 和 bax 单克隆抗体 (1:50)4℃过夜;生物素化二抗(1:300),37℃ 30min;ABC试剂(1:300),37℃ 60min;DAB 5min。最后以苏木素复染,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 细胞受<sup>89</sup>Sr照射的累积吸收剂量估算

对K<sub>562</sub>细胞受<sup>89</sup>Sr照射不同阶段的累积吸收剂量D(mGy)的估算,参照下式进行<sup>[7]</sup>

$$D=AE/m$$

式中,A为<sup>89</sup>Sr的放射性活度(kBq),E为<sup>89</sup>Sr的 $\beta$ 射线平均能量,m为受照射细胞的质量。

### 1.7 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 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 K<sub>562</sub>细胞受<sup>89</sup>Sr照射的累积吸收剂量

K<sub>562</sub>细胞受不同时间的<sup>89</sup>Sr照射后的累积吸收剂量估算值见表1。

Tab.1 Accumulative absorbed dose of K<sub>562</sub> cells<sup>89</sup>Sr irradiated for different time

Time/h	6	9	12	24	48
Absorbed dose/mGy	0.0241	0.0362	0.0482	0.0964	0.1928

### 2.2 细胞凋亡的电泳特征

K<sub>562</sub>细胞经<sup>89</sup>Sr作用达6h和24h,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”区带见图1。

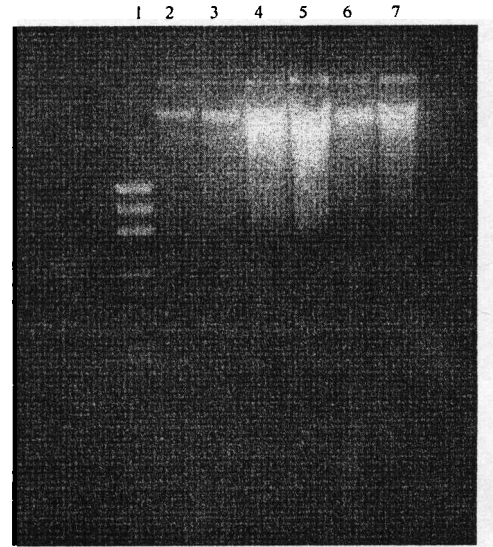


Fig.1 The DNA ladder of K<sub>562</sub> cells<sup>89</sup>Sr irradiated for 6 and 24h. Band 1::marker; Band 2-3:unirradiated control; Band 4-5: irradiated for 6h; Band 6-7: irradiated for 24h.

### 2.3 荧光双标记流式细胞仪分析结果

<sup>89</sup>Sr作用6、9、12、24和48h后,K<sub>562</sub>细胞凋亡率、K<sub>562</sub>细胞坏死率均较对照组有明显的升高( $p<0.01$ );另一方面随着<sup>89</sup>Sr作用时间的延长,细胞的累积剂量提高,但在照射后不同时间观察组之间细胞凋亡与细胞坏死均无显著变化( $p>0.05$ )见表2。

Tab.2 Apoptosis and necrosis rates of K<sub>562</sub> cells<sup>89</sup>Sr irradiated for different time ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Irradiation time	Apoptosis rate of K <sub>562</sub> cells	Necrosis rate of K <sub>562</sub> cells
Control/h	2.5±0.64	0.8±0.73
6	10.9±2.34 <sup>(1)(2)</sup>	10.2±2.98 <sup>(1)(2)</sup>
9	9.6±0.70 <sup>(1)(2)</sup>	11.9±0.87 <sup>(1)(2)</sup>
12	10.1±2.47 <sup>(1)(2)</sup>	12.6±2.70 <sup>(1)(2)</sup>
24	10.4±0.68 <sup>(1)(2)</sup>	11.6±0.46 <sup>(1)(2)</sup>
48	8.4±3.13 <sup>(1)(2)</sup>	10.4±2.71 <sup>(1)(2)</sup>

<sup>(1)</sup> $p<0.01$  vs control group, <sup>(2)</sup> $p>0.05$  vs other group except control

### 2.4 bcl-2 和 bax 蛋白的免疫组织化学结果

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<sub>562</sub>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;  $^{89}\text{Sr}$  作用 24h 后的  $\text{K}_{562}$  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 ( $p < 0.05$ ) 见表 3。

Tab. 3 Percentage of bcl-2 and bax positive  $\text{K}_{562}$  cells 24h after  $^{89}\text{Sr}$  exposure/%

	Percentage of bcl-2 positive cells/%	Percentage of bax positive cells/%	bcl-2/bax
Control	82.8 (411/500)	44.4 (222/500)	1.86
$^{89}\text{Sr}$ exposure	31.4 (157/500) <sup>(1)</sup>	38.2 (191/500)	0.82

<sup>(1)</sup>  $p < 0.05$  vs control

### 3 讨论

辐射诱发细胞凋亡的研究目前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报道较少。由于放射性核素具有作用部位的选择性和作用时间的持续性等特点, 以及细胞对核素的吸附及吞噬作用, 因此放射性核素诱发的凋亡途径就更为复杂, 涉及到的因素更多。

#### 3.1 $^{89}\text{Sr}$ 照射可诱导 $\text{K}_{562}$ 细胞凋亡

Forster 等<sup>[8]</sup>观察到  $^{32}\text{P}$  可诱导 Burkitt 淋巴瘤细胞凋亡, 文献[9,10]报道也观察到  $^{153}\text{Sm}$  可诱导 Molt-4 细胞和骨肿瘤细胞的凋亡现象。但至今尚未见  $^{89}\text{Sr}$  诱导细胞凋亡的报道。

本实验从琼脂糖凝胶电泳图谱上出现典型的核小体 (180—200bp) 整倍数的 DNA “阶梯状” 区带, 证实一定剂量的  $^{89}\text{Sr}$  内照射可诱导  $\text{K}_{562}$  肿瘤细胞凋亡。

#### 3.2 $^{89}\text{Sr}$ 照射可诱导 $\text{K}_{562}$ 细胞凋亡与坏死并存

日前对电离辐射诱导肿瘤细胞凋亡和坏死的同时研究报道尚不多见。

本研究采用 Annexin V-FITC 和 PI 双荧光探针流式细胞术, 发现  $^{89}\text{Sr}$  内照射后  $\text{K}_{562}$  细胞坏死与细胞凋亡并存, 但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<sup>[11]</sup>, 受照射细胞在 0—2Gy 剂量范围内, 凋亡率随着照射剂量的增大而增加; 另有研究表明<sup>[12]</sup> >10Gy 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<sup>[13]</sup>也报道 Molt-4 细胞在受照剂量 2—30Gy 时, 出现坏死与凋亡并存的情况。文献[14]报道 50—200mGy 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。

#### 3.3 bcl-2、bax 参与 $^{89}\text{Sr}$ 照射诱导的 $\text{K}_{562}$ 细胞凋亡

bcl-2 和 bax 是两个凋亡相关基因, bcl-2 能抑制细胞凋亡, 而 bax 则促进细胞凋亡<sup>[15]</sup>。本研究发现,  $\text{K}_{562}$  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  $\text{K}_{562}$  细胞癌性增殖的重要原因。

近年研究发现, 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, 两者之间的比例决定了是抑制细胞凋亡还是促进细胞凋亡<sup>[15,16]</sup>。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  $^{89}\text{Sr}$  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  $^{89}\text{Sr}$  内照射诱导  $\text{K}_{562}$  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 表达蛋白降低, bcl-2/bax 比值下降, 表明  $^{89}\text{Sr}$  诱导  $\text{K}_{562}$  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.* Cancer, 1994, 73:2013-2015
- 2 分子克隆实验指南.北京:科学出版社,1992, 304
- 3 Molecular Cloning Laboratory Manual.Beijing:Science and Techniques Publisher, 1992, 304
- 4 基因工程实验技术.长沙:湖南科学技术出版社,1997, 1
- 5 Gene Engineering Laboratory Techniques,Changsha:Hunan Science and Techniques Publisher, 1997:1
- 6 Afanasyev V N, Korol B A, Matylevich N P *et al.* Cytometry,1993, 14:603-608
- 7 Vitale M, Zamai L, Mazzotti G *et al.* Histochemistry, 1993, 100:223-226
- 8 Huschtscha L, Jeitner T M, Andersoin C E *et al.* Exp Cell Res, 1994, 212:161-164
- 9 浓缩铀的放射毒理.北京:原子能出版社, 1998, 125
- 10 Radiotoxicology of Enriched Uranium. Beijing: Atomic Energy Publisher, 1998,125
- 11 Forster T H, Allan D J, Gobe G C *et al.* Int J Radiat Biol, 1992, 61(3):365-367
- 12 朱寿彭, 肖东, 韩晓枫. 中华放射医学与防护杂志, 1999, 19(5):307-310
- 13 ZHU S P, XIAO D, HAN X F. Chin J Radiol Med Prot,

- 1999, **19**(5):307-310
- 10 朱寿彭, 肖东, 韩晓枫. 核技术, 1999, **22**(5):309-312  
ZHU S P, XIAO D, HAN X F. Nucl Sci Tech, 1999, **22**(5):309-312
- 11 苏旭, 万虹, 刘树铮. 辐射研究与辐射工艺学报, 1997, **15**(2):119-122  
SU X, WANG H, LIU S Z. J Radiat Res Radiat Process, 1997, **15**(2):119-122
- 12 Luchnik A N, Hisamutdinov T A, Georgiev G P. Nucleic Acids Res, 1988, **16**(11):5175-5190
- 13 Akagi Y, Ito K, Sawada S. Int Radiat Biol, 1993, **64**:47-50
- 14 薛丽香, 金光辉, 付士波等. 中华放射医学与防护杂志, 2001, **21**(1):24-26  
XUE L X, JIN G H, FU S B *et al.* Chin J Radiol Med Prot, 2001, **21**(1):24-26
- 15 Oltvai Z N, Milliman C L, Korsmeyer S J *et al.* Cell, 1993, **74**:609-613
- 16 Gazzaniga P, Gallucci M, Gradilone A *et al.* Eur J Cancer, 1995, **131A**:2119-2123

## THE CHARACTERISTICS AND MECHANISM OF APOPTOSIS IN $K_{562}$ CELLS INDUCED BY RADIONUCLIDES STRONTIUM-89

ZHANG Junning HONG Chengjiao ZHU Shoupeng

(No1 Affiliated Hospital, Suzhou University, Suzhou 215006)

**ABSTRACT** In this paper, apoptosis and expressions of bcl-2 and bax protein in  $K_{562}$  cells exposed to different doses of strontium-89 were studied. Six hours after the irradiation, characteristics of apoptosis and necrosis appeared in the  $K_{562}$  cells. The apoptosis and necrosis in the cells irradiated for 6, 9, 12, 24 and 48h were significantly higher than the control. The expression of bcl-2 decreased after the irradiation, whereas bax had no obvious changes. The results suggested that the apoptosis of  $K_{562}$  cells induced by exposure to  $^{89}\text{Sr}$  might be regulated by reduced expression of bcl-2 and bcl-2/bax ratio.

**KEYWORDS** Strontium-89,  $K_{562}$  cells, Apoptosis, Bcl-2, Bax

**CLC** R811.5