

Tamoxifen 联合 γ 线照射对脑胶质瘤细胞的增殖抑制 及凋亡诱导作用

宁萍^{1,2} 刘芬菊^{1,2} 薛景¹

¹ (苏州大学放射医学与公共卫生学院 江苏苏州 215123)

² (江苏省放射医学与防护重点实验室 江苏苏州 215123)

摘要 研究三苯氧胺 (Tamoxifen, TAM) 对人脑胶质瘤细胞辐射增敏作用及诱导细胞凋亡。用 ³H-TdR 掺入法、免疫组织化学法、流式细胞术和激光共聚焦显微镜扫描技术检测细胞 DNA 合成、雌激素受体表达、细胞凋亡及凋亡的形态学特征。结果表明, TAM 能抑制细胞 DNA 合成, 与 ⁶⁰Co γ 线联用抑制作用增强, 表现出协同作用。TAM 能诱导细胞凋亡, 其凋亡率随 TAM 浓度的升高而增高, 凋亡细胞核固缩和核碎裂, 可见凋亡小体。而免疫组化结果显示 SHG-44 细胞不表达雌激素受体。以上结果表明 TAM 可能通过诱导细胞凋亡途径来增加细胞的辐射敏感性, 而与雌激素受体途径无关。

关键词 三苯氧胺, 脑胶质瘤细胞, 辐射增敏, 凋亡

中图分类号 R811.5, R730.5, R739.4

雌激素受体 (Estrogen receptor, ER) 在体内的分布已远远超出经典靶组织的范围, 在端脑、下丘脑、垂体、脊髓均有雌激素受体的表达, 且 ER β 在脑内包室旁核、视上核和海马区等部位均有较高表达^[1]。研究资料表明, 在脑胶质瘤中, 有部分细胞可表达雌激素受体^[2]。TAM 是一种非类固醇类抗雌激素药物, 临床上主要用于治疗乳腺癌。近年来国外研究发现 TAM 还可治疗脑胶质瘤, 增加胶质瘤细胞的辐射敏感性, 但机理尚不清楚。本工作从细胞凋亡途径和雌激素受体途径研究了 TAM 对脑胶质瘤细胞的增殖抑制作用和辐射增敏作用, 初步探讨了 TAM 增加细胞辐射敏感性的机理。

1 材料和方法

1.1 材料

人脑胶质瘤细胞株 (SHG-44), 由苏州大学附属第一人民医院脑研室提供; TAM (分子量 371.5)、吖啶橙 (Acridineorange, AO) 染料、溴乙锭 (Ethidiumromide, EB) 染料: 购自 sigma 公司; 1640 培养基 (Roswell park memorial institute, RPMI) 购自 Gibcolc 公司; 小牛血清购自杭州四季青生物工程公司; ³H-TdR 购自中国科学院上海应用物理研究

所; 雌激素受体检测试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司; Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自 BD Biosciences 公司; 液体闪烁计数器 (瑞典法码西亚公司); 流式细胞仪 (美国贝克曼公司); 激光共聚焦显微镜 (德国莱卡公司)。

1.2 方法

1.2.1 ³H-TdR 掺入法检测脑胶质瘤细胞 DNA 合成 取对数生长期细胞, 常规消化制备成单细胞悬液, 接受 2Gy 的 ⁶⁰Co γ 线照射, 剂量率 1Gy/min。照射结束后, 加入 TAM 使终浓度为 2、5、10 μ mol/L。隔日换液, 每孔加入 ³H-TdR 10 μ L (2.4×10^4 Bq)。72h 后消化细胞, 将细胞收集到 49 型玻璃纤维滤膜上, 烘干滤膜片, 在液体闪烁计数器上测量每个样品的每分钟计数 (Counts/min) 值。计算 DNA 合成抑制率 = (对照组 Counts/min 值 - 实验组 Counts/min 值) \times 100% / 对照组 Counts/min 值。

1.2.2 免疫组化测定 SHG-44 细胞雌激素受体 将细胞接种于置有载玻片的培养皿内, 72h 后取出玻片, 依据雌激素受体检测试剂盒说明书操作: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffered saline, PBS) 冲洗, 加入过氧化物酶, 一抗, PBS 冲洗, 加入二抗, 链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液, 二氨基联苯胺 (Diaminobenzidine, DAB) 溶液, 苏木青复染, 脱

苏州大学医学发展基金重点项目 (EE126031)、江苏省放射医学重中之重学科 (FY2004) 资助

第一作者: 宁萍, 女, 1973 年 4 月出生, 1997 年毕业于苏州医学院药理学系, 硕士, 从事放射生物学研究, 实验师
通讯联系人: 刘芬菊

收稿日期: 初稿 2005-12-21, 修回 2006-02-24

水,透明,树胶封固。阳性细胞判断标准:ER均以肿瘤细胞核内出现棕黄色至深棕色颗粒为阳性细胞,以每张切片中阳性细胞率 $\geq 20\%$ 作为阳性。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率 将细胞接种于50mL培养瓶中,24h后照射组 ^{60}Co γ 线照射2Gy,剂量率1Gy/min, TAM处理组加入TAM工作液使终浓度为2、10 $\mu\text{mol/L}$ 。继续培养48h,常规消化制备成单细胞悬液;用预冷的PBS离心洗涤2次,然后重悬在1 \times 结合缓冲液中,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$;取0.1mL细胞悬液于流式管中,分别加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI;混匀,避光室温放置15min;加入400 μL 1 \times 结合缓冲液,检测细胞的凋亡率。

1.2.4 激光共聚焦显微镜观察 将细胞接种于置有载玻片的培养皿内,培养24h后照射,加TAM处理同1.2.3,48h后将载玻片上的细胞用PBS漂洗1遍,加入AO/EB染液,37 $^{\circ}\text{C}$ 染色10min,取出载玻片,在激光共聚焦显微镜下观察细胞形态。

1.2.5 统计分析 实验结果采用社会科学统计软件包(Statistical package for social science, SPSS)检验分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 TAM对脑胶质瘤细胞DNA合成抑制的影响

从图1可见,2 $\mu\text{mol/L}$ 的TAM处理组,DNA合成抑制率为5.5%,2Gy照射组,细胞DNA合成

抑制率为7.7%,TAM+照射组,细胞DNA合成抑制率为34.1%,高于单独照射组和TAM处理组,且显著大于两者单用之和($p < 0.01$)。5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的TAM分别和2Gy照射联用,其DNA合成抑制率也高于单独照射组和TAM处理组,且大于两者单用之和($p < 0.01$)。说明TAM显著增加了 ^{60}Co γ 线对脑胶质瘤细胞杀伤作用,增强了细胞的辐射敏感性。

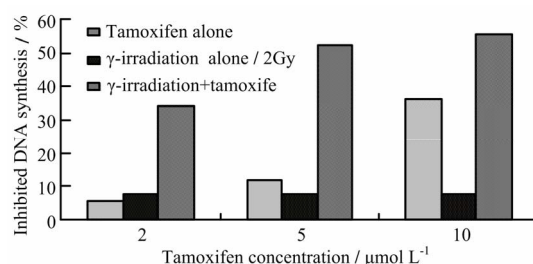


Fig.1 The radiosensitizing effect of tamoxifen on SHG-44 cells

2.2 SHG-44细胞雌激素受体免疫组化染色结果

图2a可见雌激素受体阳性的乳腺癌细胞核呈棕黄色或深棕色,图2b可见,SHG-44细胞染色与阳性对照结果相反,SHG-44细胞核无棕黄色或深棕色染色。随机计数200个细胞($\times 1000$),发现SHG-44细胞核均无阳性染色,说明SHG-44细胞不表达雌激素受体。

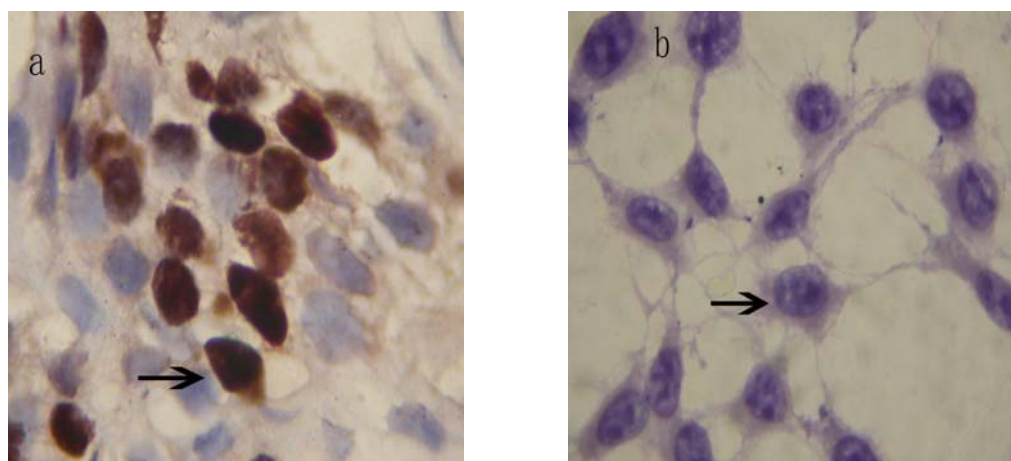


Fig.2 Immunohistochemistry of the estrogen receptor (a: Breast cancer cells showed intense brown staining of the nuclei and were stained brown or black brown, b: SHG-44 cells showed no positive reaction in the nuclei and plasma. $\times 1000$)

2.3 TAM、 ^{60}Co γ 线照射对SHG-44细胞凋亡率的影响

由表1和图3可见,对照组细胞凋亡率很低,只有2.05%,经TAM处理后,随着TAM浓度的增

加,细胞的凋亡率也增高。当10 $\mu\text{mol/L}$ 的TAM处理时凋亡率为19.00%,2Gy的 ^{60}Co γ 线照射凋亡率为9.38%,两者联用,凋亡率为34.40%,大于两者单独应用时凋亡率的相加,表现出明显协同作用($p < 0.01$)。

Table 1 Effect of apoptosis rate on SHG-44 cells treated with tamoxifen alone or combined with ^{60}Co γ -irradiation ($\bar{x} \pm s$)

Number	Group	Group	Apoptosis rate / %
I Tamoxifen	Tamoxifen	0 $\mu\text{mol/L}$	2.05 \pm 0.28
II Tamoxifen	Tamoxifen	2 $\mu\text{mol/L}$	7.66 \pm 0.52 ⁽¹⁾
III Tamoxifen	Tamoxifen	10 $\mu\text{mol/L}$	19.00 \pm 0.77 ⁽¹⁾
VI γ -irradiation	γ - irradiation	2Gy	9.38 \pm 0.57 ⁽¹⁾
V γ -irradiation +tamoxifen	γ - irradiation +tamoxifen	2Gy + 2 $\mu\text{mol/L}$	10.50 \pm 0.60 ⁽¹⁾
VI γ -irradiation +tamoxifen	γ - irradiation +tamoxifen	2Gy + 10 $\mu\text{mol/L}$	34.40 \pm 0.93 ⁽¹⁾⁽²⁾

Compared with I, ⁽¹⁾ $p < 0.01$, Compared with III and IV ⁽²⁾ $p < 0.01$

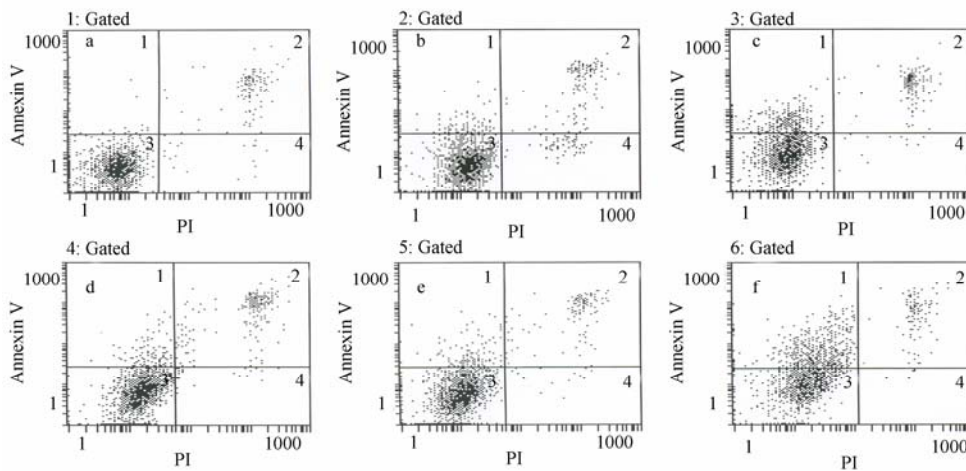


Fig.3 The rate of SHG-44 cells apoptosis detected by flow cytometry. (a: tamoxifen 0 $\mu\text{mol/L}$, b: tamoxifen 2 $\mu\text{mol/L}$, c: tamoxifen 10 $\mu\text{mol/L}$, d: 2Gy, e: 2Gy+tamoxifen 2 $\mu\text{mol/L}$, f: 2Gy+tamoxifen 10 $\mu\text{mol/L}$)

2.4 激光共聚焦显微镜观察 TAM 和 ^{60}Co γ 线诱导 SHG-44 细胞凋亡的形态学特征:

从图 4a 可见,细胞经吖啶橙和溴乙锭染色后对照组细胞形态完整,伸出典型的细小突起,细胞核被染成明亮的绿色。图 4b 显示,SHG-44 细胞经 2Gy

照射联合 10 $\mu\text{mol/L}$ TAM 处理后可见凋亡细胞,凋亡细胞呈黄绿色或橙红色,死亡细胞核固缩呈红色。随着 TAM 浓度的增高,在激光共聚焦显微镜下观察到的凋亡细胞和死亡细胞增多。凋亡细胞核染色质聚集在核膜下呈半月形或指环状,核固缩或核碎裂。

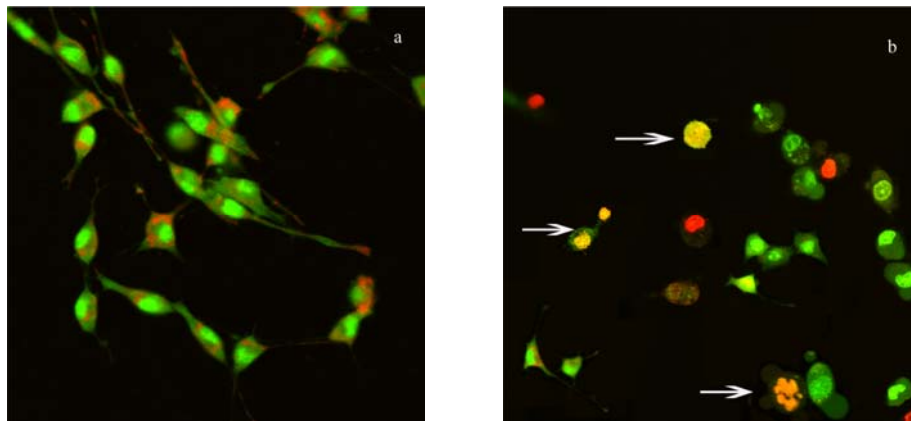


Fig.4 Morphological changes of SHG-44 cells (a: tamoxifen 0 $\mu\text{mol/L}$,the shape of SHG-44 Cell was intact and showed no signs of apoptosis , cellular nucleus was stained bright green. b: irradiation 2Gy + tamoxifen 10 $\mu\text{mol/L}$, cells became round and apoptotic cell was stained flavo-green or salmon color,and karyopyknosis, nuclear fragmentation and apoptotic body were observed . $\times 630$)

3 讨论

TAM 是临床上广泛用于治疗乳腺肿瘤的非类固醇类抗雌激素药物,近年来国外研究发现 TAM 还可治疗脑胶质瘤。本实验表明, TAM 在体外确实能抑制脑胶质瘤细胞 DNA 合成,且抑制作用呈浓度依赖性。当 TAM 和照射联用,其 DNA 合成抑制率均大于单独照射组与 TAM 处理组,且显著大于两者单用时 DNA 合成抑制率之和 ($p < 0.01$),说明 TAM 显著提高了脑胶质瘤细胞 SHG-44 对 ^{60}Co γ 线的辐射敏感性。Brondan 等^[3]曾发现在脑胶质瘤细胞 U-373, U-87 中, $15\mu\text{mol/L}$ 的 TAM 和 γ 射线联合作用能使两种细胞的 D_0 值分别下降 5 和 4 倍。文献[4]报道 $15\mu\text{mol/L}$ 的 TAM 无论在照射前、照射后,照射时给药,均能提高小鼠脑胶质瘤细胞 C_6 的放射敏感性, D_0 值由 $(3.79 \pm 0.25)\text{Gy}$ 下降到 $(2.64 \pm 0.04)\text{Gy}$ 。TAM 的药理性质是抗雌激素,与雌二醇竞争结合雌激素受体,从而抑制肿瘤细胞的生长。然而,实验表明 SHG-44 细胞不表达雌激素受体,说明 TAM 抑制 SHG-44 细胞生长可能不是通过抗雌激素作用介导的。

细胞凋亡是维持机体平衡,控制细胞数量,对抗异常细胞增殖的机制之一。凋亡细胞和正常细胞在跨膜的通透性上有很大的不同, AO 能进入胞膜完整的细胞,与 DNA 结合后使核发出明亮的绿色荧光; EB 能渗入胞膜受损的细胞,与 DNA 结合发出橙红色的荧光。细胞凋亡有其独特的形态学特征:细胞皱缩,染色质浓聚且位于核膜的边缘,细胞质膜的发疱现象,特异的凋亡小体形成。本实验观察到 $10\mu\text{mol/L}$ 的 TAM 作用于胶质瘤细胞 48h 后,经 AO/EB 染色,在激光共聚焦显微镜下就能观察到 SHG-44 细胞形态学特异性改变。当细胞经 2Gy 照射联合 $10\mu\text{mol/L}$ TAM 处理后凋亡细胞增多,凋亡细胞核染色质浓聚,聚集在核膜下呈半月形或指环状,核固缩或核碎裂,可见凋亡小体形成。早期凋亡细胞核染色质呈黄绿色,晚期凋亡细胞与死亡细胞核染色质分别呈橙红色和红色。

在细胞凋亡过程中,既有细胞核 DNA 裂解等生物化学变化,又有细胞膜中磷脂酰丝氨酸残基暴露到细胞外等细胞膜表面分子结构改变。因此,本实验根据细胞发生凋亡时,细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻,可与发绿色荧光的 Annexin V-FITC 结合的原理,以 Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I 来检测细胞凋亡率。实验证实, TAM 处理胶质瘤细胞 48h,能明显诱导细胞凋亡,其凋亡率随着 TAM 剂量的增大而增加。当 $10\mu\text{mol/L}$ 的 TAM 和 2Gy 的

^{60}Co γ 线照射联用时,其凋亡率大于两者单独应用时凋亡率的相加,表现出协同作用 ($p < 0.01$)。这表明 TAM 增加了射线对脑胶质瘤细胞的凋亡诱导作用。已有许多研究结果显示^[5,6],凋亡反应的增加,提示细胞具有更大的辐射敏感性。曹锐峰等^[7]比较了两种胶质瘤细胞系 SHG-44 和 C_6 的凋亡率与辐射敏感性的关系,发现 γ 射线诱导 SHG-44 细胞的凋亡率高于 C_6 细胞,相应地 SHG-44 细胞的辐射敏感性也高于 C_6 细胞。此外,凋亡反应的速率也与辐射敏感性有关,快速凋亡的细胞具有高的辐射敏感性。Olive 等^[8]研究了两种细胞株 TK6 和 WI-L2-NS 的凋亡速率与辐射敏感性的关系,发现 TK6 细胞的辐射敏感性高于 WI-L2-NS 细胞,这是因为 TK6 细胞在照射后 24h 内凋亡,而 WI-L2-NS 细胞在照射后几天内才发生凋亡。

本实验证实 TAM 在体外能抑制胶质瘤细胞 DNA 合成,提高脑胶质瘤细胞的放射敏感性;且 TAM 在低浓度 $2\mu\text{mol/L}$ 时就能引起 SHG-44 细胞凋亡,且凋亡率随着 TAM 浓度的增加而增高;而脑胶质瘤细胞不表达雌激素受体。这说明了 TAM 抑制细胞 DNA 合成,增加细胞的辐射敏感性可能与其诱导细胞凋亡有关。TAM 是一种能透过血脑屏障且对人体毒副作用较小的药物,阐明 TAM 和照射产生协同作用,增加肿瘤细胞的辐射敏感性的机理,对于开发 TAM 药物新用途和临床脑胶质瘤的放射治疗具有重要意义。

致谢 本研究得到放医公卫学院中心实验室李冰燕老师的大力帮助,在此表示感谢。

参考文献

- 1 李艳,张平安. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2002, **23**(4): 214-215
LI Yang, ZHANG Pingan. Foreign Med Sci, 2002, **23**(4): 214-215
- 2 Leslie K K, Keefe D, Powell S, et al. J Soc Gynecol Investig, 1994, **1**(3): 238-244
- 3 Brondan da Rocha A, Mans D R, Bernard E A, et al. Eur J Cancer, 1999, **35**(5): 833-839
- 4 Zhang W, Yamada H, Sakai N, et al. Neurosurgery, 1992, **31**(4): 725-729; discussion 729-730
- 5 Hoffmann W, Schiebe M, Hirmler P, et al. Int J Cancer, 1997, **70** (4): 475-477
- 6 Lang F F, Yung W K, Raju U, et al. J Neurosurg, 1998, **89**(1): 125-132
- 7 曹锐峰,章翔,曹云新,等. 第四军医大学学报, 2003,

24(22): 2051-2055

8 Olive P L, Banh J P, Durand R E. Radiat Res, 1996,

CAO Ruifeng, ZHANG Xiang, CAO Yunxin, *et al.* J

146(6): 595-602

Fourth Mil Med Univ, 2003, 24(22): 2051-2055

Effect of tamoxifen combined with ^{60}Co γ -irradiation on proliferation inhibition and apoptosis induction in human glioma SHG-44 cells

NING Ping^{1,2} LIU Fenju^{1,2} XUE Jing¹

¹(School of Radiation Medicine and Public Health, Suzhou University, Suzhou 215123)

²(The Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection of Jiangsu Province, Suzhou University, Suzhou 215123)

ABSTRACT To study radiosensitizing effect and apoptosis induction of tamoxifen on human glioma cells, $^3\text{H-TdR}$ incorporation assay, flow cytometry, laser confocal microscope and Immunohistochemistry were used to investigate the inhibition effect on DNA synthesis, apoptosis and estrogen receptor expression. Experiment results suggested that tamoxifen could inhibit DNA synthesis in SHG-44 cells, the combination of tamoxifen and ^{60}Co γ -irradiation showed a synergistic action on it. Tamoxifen could also induce the apoptosis, and the apoptosis rate increased along with tamoxifen concentration was elevated, so morphological changes, such as karyopyknosis, nuclear fragmentation and apoptotic body were observed. However, SHG-44 cells did not express estrogen receptor. The above results revealed that tamoxifen can sensitize SHG-44 cells to gamma radiation, which might be related with apoptosis pathway instead of the estrogen receptor-mediated process.

KEYWORDS Tamoxifen, Glioma, Radiosensitivity, Apoptosis

CLC R811.5, R730.5, R739.4