

电离辐射对 HeLaS₃ 细胞凋亡与 细胞周期的影响

金光辉 薛丽香 付士波 苏旭

(白求恩医科大学卫生部放射生物学重点实验室 长春 130021)

摘要 研究了电离辐射对 HeLaS₃细胞凋亡和细胞周期的影响,进一步探讨细胞凋亡与细胞周期的关系,为肿瘤化疗方案的制定提供基础资料。采用 PI、Hoechst 33342 双染和 PI 单染,用流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期。结果表明,给予 0.5—4.0Gy X 射线照射后 8h 细胞凋亡开始增加,12h 达最大值,12—24h 有下降趋势,但 24h 开始又逐渐增加,到 72h 时又接近 12h 水平。S 期和 G₂/M 期细胞均明显增加,并呈剂量依赖性,G₀/G₁ 期细胞则呈剂量依赖性减少,且这种变化在受照射后 24h 最明显。说明一定剂量电离辐射可以诱导明显的 G₂/M 阻滞和 S 期阻滞,并可诱导 HeLaS₃ 细胞凋亡的产生,两者之间有一定的关系。

关键词 电离辐射, 细胞凋亡, 细胞周期, HeLaS₃

中图分类号 R811.5

细胞凋亡(apoptosis)是基因调控下的一种特定死亡方式,是机体维持自身稳定的重要生理机制。细胞凋亡可以清除机体内陈旧的、衰老的、癌变的及不需要的细胞。并与细胞有丝分裂共同作用,使组织中细胞的数量处于动态平衡,维持机体内环境的稳定。机体中很多疾病的发生与这种平衡的破坏有关,如肿瘤的发生是由增殖过多、凋亡不足或两者共同作用引起。近年来的研究表明,增殖细胞与凋亡细胞在形态和生化方面有某些相似之处,在发生上密切相关,阻断细胞增殖周期过程可引起凋亡,而凋亡常伴随有生长阻滞,细胞增殖周期和细胞凋亡关系密切^[1,2]。把细胞周期阻滞和细胞凋亡结合起来研究,将为癌症的病因学和抗肿瘤治疗研究开辟新的领域。

1 材料和方法

1.1 细胞系

HeLaS₃(子宫绒毛膜癌细胞)由卫生部放射生物重点实验室提供,在含 10%小牛血清 RPMI1640 培养基中培养。细胞培养至指数生长期后,接种于 24 孔培养基中,每孔接种 5×10^5 个细胞,设正常对照组和不同剂量 X 射线照射组,照射后于不同时间收集细胞,每组 5 个样品。

1.2 照射条件

用 X 射线深部治疗机对培养板进行照射。电压 200kV,电流 10mA,过滤板 0.5mmCu 和 1.0mmAl,靶皮距 50cm,剂量率 0.287mGy/min,剂量 0.5—4.0Gy,靶皮距 50cm,剂量分组为 0、0.5、1.0、2.0、4.0Gy 组,时间点分组为 0、8、12、24、48、72h 组。

1.3 细胞凋亡检测

卫生部科学研究基金(98—1—202)资助

第一作者:金光辉,男,1975 年出生,现白求恩医科大学放射生物学硕士研究生

收稿日期:初稿 2000—10—20, 修回 2001—02—05

每份样品中加 Hoechst 33342 (Sigma) 100 μ L (100 μ g/mL), PI (碘化丙啶, Sigma) 300 μ L (50 μ g/mL), 冰浴 30min 后用流式细胞仪收集 1×10^4 个细胞, 采用 LYSYS 软件分析记录阳性细胞百分数^[3,4]。

1.4 细胞周期检测

每份样品加 RNase 100 μ L (100 μ g/mL)、PI (含 0.1% Triton-X100) 300 μ L (50 μ g/mL) 单染, 30min, 37 $^{\circ}$ C 避光保存, 用流式细胞仪检测, Cellfit 软件收集 10×10^4 个细胞。

1.5 统计学处理

采用 *t* 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 用 PI 荧光探针流式细胞术对 HeLaS₃ 细胞周期的研究

0.5—4.0Gy X 射线照射 12h, HeLaS₃ 细胞出现明显的 S 期和 G₂ 期阻滞, 表现为 0.5、1.0、2.0、4.0Gy X 射线照射后, S 期和 G₂/M 期细胞均明显增多 (*p* 值均小于 0.01), 并呈剂量依赖性增加。由于其照射后出现明显的 S 期和 G₂/M 期阻滞, 导致有丝分裂延迟, 使细胞经有丝分裂进入 G₀/G₁ 期的细胞减少 (见表 1)。本研究结果表明: G₀/G₁ 期细胞呈剂量依赖性减少。4.0Gy X 射线照射 HeLaS₃ 细胞后 0—12h, S 期细胞数呈时间依赖性增加, 12h 达峰值, 此时 S 期细胞数为对照的 233.66%, 随后有所下降, 48h S 期细胞数仍为对照组的 179.18%, 呈现出明显的 S 期阻滞。G₂/M 期细胞数在 2—24h 呈时间依赖性增加, 24h 达峰值, 细胞数为对照组的 291.24%, 48h G₂/M 期细胞数仍维持较高水平, 为对照组的 228.48%, 呈现出明显的 G₂/M 期阻滞 (见表 2)。该结果与文献报道的 EL-4 细胞的实验结果有所不同, 文献[5]的研究表明, EL-4 在接受 0.5—4Gy X 射线照射后, 出现明显的 G₁ 和 G₂ 期阻滞, 表现为 G₁ 和 G₂ 期细胞数明显增多, 而 S 期细胞数明显减少。这一现象提示: 不同的肿瘤细胞在接受同样的辐射作用后, 细胞内的分子表达及其调控过程可能不同, 有待于进一步研究。

Tab. 1 Changes in cell cycle progression of HeLaS₃ cells after X rays irradiation with different doses

	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	72.08±0.59	15.17±0.71	12.78±0.66
0.5Gy	60.88±1.35 ⁽¹⁾	23.55±0.93 ⁽¹⁾	15.58±0.98 ⁽¹⁾
1.0Gy	55.08±1.07 ⁽¹⁾	25.98±0.57 ⁽¹⁾	18.92±1.10 ⁽¹⁾
2.0Gy	45.05±1.95 ⁽¹⁾	30.70±1.74 ⁽¹⁾	24.25±1.94 ⁽¹⁾
4.0Gy	35.55±1.33 ⁽¹⁾	35.47±1.34 ⁽¹⁾	28.79±1.35 ⁽¹⁾

n=5, ⁽¹⁾*p*<0.01 compared with control

Tab. 2 Changes in cell cycle progression of HeLaS₃ cells after irradiation with 4.0Gy X ray

	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	72.08±0.59	15.18±0.71	12.78±0.66
8h	63.20±1.36 ⁽²⁾	18.67±1.58 ⁽¹⁾	18.13±1.47 ⁽²⁾
12h	35.55±1.33 ⁽²⁾	35.47±1.34 ⁽²⁾	28.97±1.35 ⁽²⁾
24h	42.70±2.43 ⁽²⁾	20.08±1.24 ⁽²⁾	37.22±3.47 ⁽²⁾
48h	43.55±1.64 ⁽²⁾	27.20±0.54 ⁽²⁾	29.20±1.10 ⁽²⁾
72h	46.80±2.18 ⁽²⁾	38.90±5.00 ⁽²⁾	14.30±3.26

n=5, ⁽¹⁾*p*<0.05, ⁽²⁾*p*<0.01 compared with control

2.2 PI 和 Hoechst33342 双染流式细胞术对 HeLaS₃ 细胞凋亡的研究

细胞凋亡在 4.0Gy X 射线照射后 8h 无显著变化, 12h 细胞凋亡呈现增加, 细胞凋亡率达到对照组的 372.21%, 12—24h 有所下降, 然后又有所回升, 72h 细胞凋亡发生率增至对照组的 350.08%, 与 12h 水平相近 (见图 1)。从细胞凋亡的剂量效应的关系曲线中可以看出: 0.5Gy X 射线照射后 12h 细胞凋亡增加, 在此时间点上, 随剂量的变化, 细胞凋亡发生率无明显改变 (见图 2)。

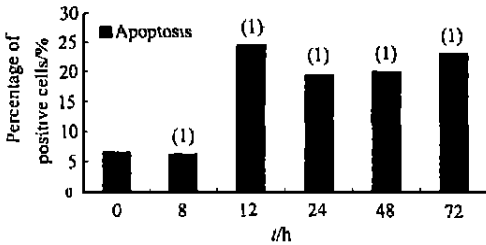


Fig. 1 Changes in apoptosis of HeLaS₃ cells after irradiation with 4.0Gy X ray
n = 5, ⁽¹⁾p < 0.01 compared with control

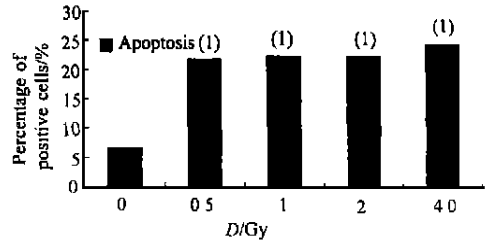


Fig. 2 Changes in apoptosis of HeLaS₃ cells 12h after X rays irradiation with different dose
n = 5, ⁽¹⁾p < 0.01 compared with control

3 讨论

细胞对外界刺激的反应是多方面的, 涉及细胞增殖、分化和死亡及其相互间的协调。以往的研究多是将这些方面分开研究^[6,7], 但近来的很多研究表明细胞增殖与细胞凋亡密切相关。同时研究电离辐射作用后, 肿瘤细胞凋亡和细胞周期的时程及剂量依赖性变化规律, 对肿瘤的发生及治疗具有重要的生物学意义和实际意义。

本实验结果表明, HeLaS₃ 细胞受中、高剂量电离辐射作用后, 立即发生明显的 G₂/M 期和 S 期阻滞, 但两者的时程变化规律有所不同。照射后 8h 观察到细胞凋亡数增多, 12h 达峰值, 随后有所减少, 但 24h 后又开始回升, 呈现出继续升高的趋势。本实验中细胞周期阻滞与细胞凋亡密切相关, 电离辐射作用后 12h, G₂/M 期阻滞与细胞凋亡发生的相关系数 $r = 0.925$, S 期阻滞与凋亡发生的相关系数 $r = 0.930$ 。文献^[6]研究表明, G₂/M 期阻滞与细胞凋亡在发生时间上有一定的连续性。在小鼠淋巴瘤细胞中, 8Gy γ 射线照射后 24h G₂/M 期阻滞达高峰, 而细胞凋亡在照射后 24—48h 才开始增多。在照射前加入能缩短 G₂/M 期阻滞时间的 CAF (咖啡碱)、可可碱或 2-氨基嘌呤, G₂/M 期比例减少, 细胞凋亡增加比较明显; 加入能延长 G₂/M 期阻滞的 TPA、IBMX (3-异丁基-1-甲基黄嘌呤) 等, 结果则相反, G₂/M 期比例增加, 细胞凋亡比例下降^[7]。研究表明, 细胞受照射后首先发生 G₂/M 期阻滞, 然后在从 G₂/M 阻滞退出的过程中或之后发生细胞凋亡^[5]。本研究结果与上述理论相似, 但凋亡高峰出现在照射后 12h, 而 G₂/M 期阻滞高峰却出现在照射后 24h 附近。出现此现象可能与本实验中未观察 72h 以后时间点有关, HeLaS₃ 细胞凋亡在受照射后 24h 开始又呈现升高趋势, 72h 的凋亡比例又恢复到与 12h 凋亡水平相近。由此推测, 细胞凋亡高峰很可能出现在受照射后 72h 以后。也有可能与 G₂/M 阻滞和 S 阻滞共同作用有关, 这有待于进一步研究。此外, 作者用相同方法观察了辐射耐受性很强的 B16 细胞 (黑色素瘤细胞) 受电离辐射作用后细胞周期与细胞凋亡的变化, 发现 4Gy X 射线照射后发生明显的 G₂/M 阻滞, 受照射后 48h, G₂/M 期细胞也在

继续增多,而细胞凋亡则无明显改变。说明 G_2/M 期阻滞的长短可能与细胞的辐射敏感性有关,阻滞时间长,细胞对辐射耐受,反之,细胞对辐射敏感^[8]。

实验结果还表明,0.5Gy X 射线照射后 12h, HeLaS₃ 细胞凋亡增加,在此时间点上,即呈不同剂量导致的凋亡细胞数差异不大。已证实仅 90mGy 电离辐射就可使 HeLaS₃ 细胞产生明显 G_2/M 期阻滞^[9]。这一结果对设计合理的肿瘤放疗方案,以提高射线对肿瘤的杀伤作用,减轻正常组织的损伤,从而提高肿瘤放疗的效率有一定的实际意义。

虽然目前对细胞周期与细胞凋亡的关系还不十分清楚,但现已明确两者是密切相关的,特别是 G_2/M 阻滞与细胞凋亡的关系。通过改变 G_2/M 阻滞调控细胞凋亡,不仅对探索细胞周期阻滞及细胞凋亡发生的分子机制有着重要理论意义,而且对提高肿瘤的放化疗效果也有着重要的实际意义。

参 考 文 献

- 1 KING K L, Cidlowski J A. *J Cell Biochem*, 1995, **58**(2):175—180
- 2 赵卫红,陈家佩. 国外医学,放射医学与核医学分册,1998, **22**(2):88—90
ZHAO W H, CHEN J P. *Foreign Med Sci Sect Radiat Nucl Med*, 1998, **22**(2):88—90
- 3 Afanasyev V N, Korel B A, Matylevich N P. *Cytometry*, 1993, **14**:603—609
- 4 Huschtscha Li, Jeitner T M, Andersson C E. *Exp cell Res*, 1994, **212**:161—163
- 5 苏 旭,张迎春,刘建香等. 实用肿瘤学杂志,1995, **9**(2):14—15
SU X, ZHANG Y C, LIU J X *et al.* *J Pract Oncol*, 1995, **9**(2):14—15
- 6 赵卫红,寿好长. 国外医学·肿瘤学分册,1999, **26**(2):76—78
ZHAO W H, SHOU H C. *Foreign Med Sci Cancer Sec*, 1999, **26**(2):76—78
- 7 Palayoor S T, Keng P, Harley R *et al.* *Radiat Res*, 1995, **141**:235—243
- 8 Nagasawa H, Macklis R M, Bump E A *et al.* *Int J Radiat Biol*, 1994, **66**:373—379
- 9 叶 飞,刘树铮. 中华放射医学与防护杂志,1999, **19**(6):381—384
YE F, LIU S Z. *Chin J Radiol Med Prot*, 1999, **19**(6):381—384

INFLUENCES OF IONIZING RADIATION ON APOPTOSIS AND CELL CYCLE OF HeLaS₃ CELL LINES

JIN Guanghui XUE Lixiang FU Shibo SU Xu

(*MH Radiobiology Research Unit, Normen Bathune University of Medical Sciences, Changchun 130021*)

ABSTRACT Changes of apoptosis and cell cycle progression of HeLaS₃ cells following irradiation with different doses of X rays were observed. The percentages of apoptotic cells were examined by flow cytometry (FCM) after the cells had been stained with propidium iodide (PI) and Hoechst 33342 (HO), and the cell cycle was detected by FCM stained with only PI. It was found that the percentages of apoptotic cells and the cells in S phase and G_2/M phase increased after irradiation with 0.5—4.0Gy X rays. So irradiation may induce apoptosis and cell cycle block for HeLaS₃ cell lines.

KEYWORDS Ionizing radiation, Apoptosis, Cell cycle, HeLaS₃

CLC R811.5