

α 粒子照射致人支气管上皮细胞恶性转化中的线粒体改变

顾超 聂继华 陈志海 刘星 李建祥 曹毅 童建

(苏州大学医学部公共卫生学院 苏州 215123)

摘要 研究 α 粒子照射致人支气管上皮细胞(BEAS-2B)恶性转化中线粒体的变化。以至不同吸收剂量(0.1 Gy、0.25 Gy、0.5 Gy、1 Gy α 粒子照射 BEAS-2B 细胞), 剂量率为 0.223 Gy/min。照射后 48 h 检测细胞存活率, 并以 LD_{50} 剂量对每传 10 代细胞进行 2 次及 4 次照射, 分别培养至 40 代。用软琼脂克隆检测不同照射次数细胞克隆增殖情况, 用透射电镜观察超微结构改变, 用 Q-PCR 检测线粒体 DNA (mtDNA) 拷贝数变化, 用流式细胞仪检测线粒体 ROS 产生及线粒体膜电位改变。细胞经 α 粒子照射 0.25 Gy 后, 线粒体超微结构显著改变, 软琼脂克隆形成率、mtDNA 拷贝数及 ROS 水平随照射次数的增加而增加, 线粒体膜电位则相应下降。结果显示线粒体拷贝数及 ROS 水平改变可作为反映细胞恶性转化程度的观察指标。

关键词 α 粒子, BEAS-2B, 线粒体

中图分类号 TL77

作为第二位的肺癌致病因子, 国际癌症研究机构(IARC)已将氡及其子体归为 I 类致癌因素。人类生活环境中天然本底辐射的人均年有效剂量当量为 2.4 mSv, 其中由于吸入氡及其子体所产生的辐射剂量约占全部天然辐射剂量的 54%(1.3 mSv)^[1]。氡的危害主要是其子体衰变时不断发射出的高能 α 粒子。氡气进入呼吸道后, 通过释放 α 粒子, 使局部受照细胞发生损伤甚至恶性转化, 最终诱发肺癌。本研究用 α 粒子照射人支气管上皮细胞(BEAS-2B), 在体外培养的环境下, 高度模拟氡在体内致癌的作用方式, 并依据已有的细胞恶性转化鉴定指标^[2], 对细胞恶性转化过程进行判断, 并检测其侵袭能力及线粒体的相关改变, 分析这些改变与细胞恶性转化之间的关系, 为氡致肺癌过程中的细胞恶性转化提供观察指标。

1 实验材料和方法

1.1 试剂

JC-1(Invitrogene, 美国), ROS 探针(Invitrogene, 美国), SYBR(Invitrogene, 美国), 引物(Invitrogene, 美国), DNA 提取试剂盒(Qigene, 美国)。

1.2 仪器

细胞培养箱(Thermo Forma, 美国), 倒置显微镜(IX41, 日本), α 粒子辐射源(上海放射医

学研究所, 中国), ABI7000(ABI, 美国), 紫外分光光度计(721, 中国), 酶标仪(BECKMAN, 德国)。

1.3 细胞培养与照射

将人支气管上皮细胞(BEAS-2B)培养于完全培养基 LHC-8 中。 α 粒子照射前 1 d, 将细胞接种在特制的 6 μ m 厚的 mylar 膜上用于照射(Mylar 膜用皮筋套在 60 mm 不锈钢环上, 75%酒精消毒, 紫外灯照射 2 h)。为便于细胞贴壁, 在种细胞前 Mylar 膜表面用 100 μ g/mL 多聚赖氨酸包被 4 h, 使用前用 PBS 清洗 3 次。 α 粒子源剂量率为 0.223 Gy/min, 每皿照射细胞数为 1×10^6 ; 分 4 个剂量组, 0.1 Gy、0.25 Gy、0.5 Gy、1.0 Gy 组。照射后立即消化, 取约 10^5 个细胞培养 48 h 后胎盼蓝染色, 计算存活率, 确定 LD_{50} 剂量, 并长期培养。单次照射细胞培养至 20 代及 40 代, 记为 P20、P40。2 次照射为单次照射后培养至 20 代, 再进行照射后培养至 40 代, 记为 D-P40。4 次照射为在传代至 10、20、30 代时分别照射 1 次, 共照射 4 次、培养至 40 代, 记为 F-P40。

1.4 细胞软琼脂锚着独立生长能力

细胞恶性转化指标采用软琼脂克隆形成实验。细胞 60 mm 培养皿, 底层铺置 0.7%的低熔点琼脂糖(含 20%血清的 LHC-9 培养基配置), 待凝固后备用。取单次照射和二次 40 代细胞, 与 0.7%琼脂

国家自然科学基金(81020108028, 81172707)、江苏省高校自然科学基金(12KJB330005)资助

第一作者: 顾超, 男, 1987 年 7 月出生, 2010 年于河北医科大学公共卫生学院获得学士学位, 2011 年于苏州大学在读硕士学位, 卫生毒理学专业

通讯作者: 童建, E-mail: tongjian@suda.edu.cn

收稿日期: 初稿 2013-03-04, 修回 2013-04-07

糖 1:1 混匀, 加至 0.7%琼脂糖上层, 每皿接种细胞数为 2000 个/皿, 37℃培养箱中培养, 培养至 21 d 时显微镜下计数>50 个细胞的克隆数。

1.5 细胞 mtDNA 检测

取各组对数生长期细胞。(1) DNA 提取。按照细胞 DNA 提取试剂盒操作指南提取细胞 DNA, 紫外分光光度计测定 A_{260} 、 A_{280} 比值, 经检测各样品表明均在 1.8–2.0 之间, DNA 提纯效果好, 含量高, 样品放 -20℃ 贮存备用。(2) PCR 扩增。采用 real-time PCR 方法分别扩增 18S rRNA、12S rRNA 和 GAPDH。引物序列见表 1。扩增条件: PCR 反应体系 (25 μ L): Sybr 12.5 μ L, 引物 R、F 各 1 μ L, 10 ng mtDNA 模板, 加 ddH₂O 至 25 μ L。(3) PCR 反应条件。循环条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s; 55℃ 退火 30 s; 72℃ 延伸 60 s; 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。反应结束, 取 5 μ L PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

表 1 线粒体 DNA 引物序列
Table 1 Mitochondrial DNA primer sequence

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence
12S rRNA	5'-AGAACACTACGAGCCACAGC-3 5'-ACTTGCGCTTACTTTGTAGCC-3
18S rRNA	5'-GGAGTATGGTTGCAAAGCTG-3 5'-CGCTCCACCAACTAAGAACG-3
GAPDH	5'-TACTGGTGTCTTCACCACCA-3 5'-CAGGATGCATTGCTGACAATC-3

1.6 细胞超微结构观察

取单次照射对数生长期组细胞, 消化离心, PBS 洗 2 遍; 0.2 mol/L 戊二醛固定细胞。送电镜室制作电镜切片。透射电镜下观察细胞超微结构。

1.7 细胞线粒体膜电位测定

取对数生长期各照射组细胞, 消化离心, PBS 洗 2 遍; 加入 JC-1 工作液 500 μ L, 37℃ 孵育 20 min 或室温孵育 30 min 后, 用流式细胞仪检测 ($E_x=488$ nm; $E_m=530$ nm) 细胞膜电位, 绿色荧光通过 FITC 通道通以 FL1 检测; 红色荧光通过 PI 通道通常以 FL2 检测, 检测结果取 FL2/FL1 比值。

1.8 细胞线粒体 ROS 测定

取对数生长期各照射组细胞, 消化离心, PBS

洗 2 遍; 加入 ROS 工作液 300 μ L, 37℃ 孵育 20 min 或室温孵育 30 min 后, 用流式细胞仪检测。

1.9 统计分析

用统计分析软件 SAS8.1 进行数据的方差分析。

2 结果

2.1 α 粒子照射后存活百分率

照射后 48 h 检测各组细胞存活率见表 2。从表 2 中可以看出, 随着吸收剂量的增加, 细胞死亡率逐渐增高。由于 0.25 Gy 剂量照射时细胞的死亡率接近 50%, 故选择该剂量进行后续照射。

表 2 α 粒子照射 24 h 后细胞存活率
Table 2 Survival percentage of α particle after 24 h irradiation

吸收剂量 / Gy Absorbed dose	存活率 / % Survival percentage
0	99
0.1	87
0.25	55
0.5	45
1.0	12

2.2 细胞软琼脂锚着独立生长能力改变

从表 3 中可以看出, 各处理组软琼脂克隆形成数明显增加, 并随着照射次数的增多, 克隆形成数不断上升。

表 3 软琼脂克隆形成数
Table 3 Colony formation in soft agar ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	形成数 Number
Control	0.30 $\pm$ 0.05
P40	26.63 $\pm$ 0.43*
D-P40	37.51 $\pm$ 0.47* Δ
F-P40	51.29 $\pm$ 0.62* Δ

注: 与对照组相比, * $p<0.05$; 与 P40 对比, $\Delta p<0.05$ 。
Note: * $p<0.05$: Compared with control, $\Delta p<0.05$: Compared with P40.

2.3 线粒体 mtDNA 拷贝数改变

从表 4 中可以看出, 随着培养代数的延长和照射次数的增加, mtDNA 拷贝数相应增多, 其中以 F-P40 组细胞增加最多。

表 4 线粒体拷贝数的改变
Table 4 Mitochondrial copy number change in transformed cells (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	拷贝数改变 Copy number change	
	12S/18S	16S/GAPDH
Control	1	1
P20	4.02±0.59*	2.65±0.07*
P40	10.50±0.22*	9.48±0.28*
D-P40	16.09±0.15* [△]	13.96±0.38* [△]
F-P40	19.79±3.31* [△]	15.70±0.58* [△]

注: 与对照组相比, * $p<0.05$; 与 P40 对比, [△] $p<0.05$ 。
Note: * $p<0.05$: Compared with control, [△] $p<0.05$: Compared with P40.

2.4 线粒体超微结构的改变

经 α 粒子照射后, 细胞线粒体超微结构发生了明显改变(见图 1)。图 1 中黑色箭头指向为线粒体, 白色箭头指向为细胞核。正常对照组低倍镜图中, 细胞线粒体存在于胞浆中, 并围绕于细胞核周, 呈短棒状结构; 高倍镜下可观察到细胞线粒体内膜、外膜以及内膜向线粒体腔突出形成的嵴。低倍镜下照射组细胞线粒体数量明显增多, 高倍镜下线粒体变小变短, 线粒体内外膜模糊, 线粒体嵴不整齐, 不清晰。

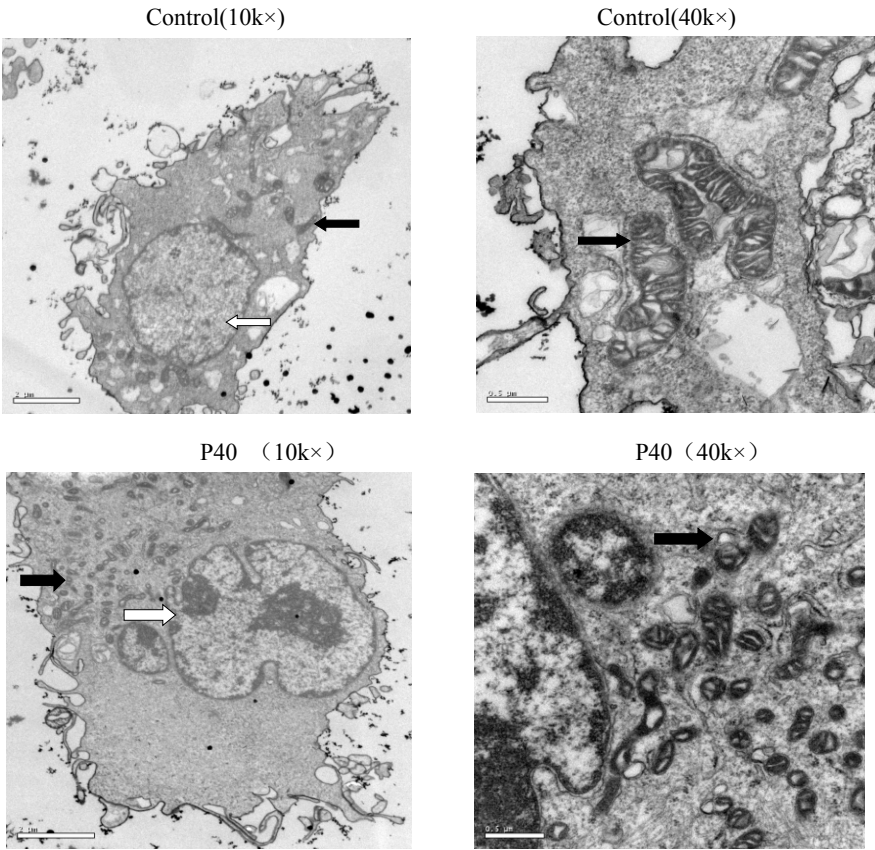


图 1 透射电镜检测下线粒体超微结构
Fig.1 Mitochondrial morphological structure in transmission electron microscope

2.5 线粒体膜电位改变

从表 5 中可以看出, 随着照射次数的增加, 线粒体膜电位水平与正常对照组相比明显降低, 但各处理组间无显著性差异。ROS 水平与正常对照组相比明显升高, 处理组间存在差异, 并且随着照射次数的增加而显著增加。

表 5 线粒体膜电位的改变
Table 5 Mitochondrial membrane potential change in transformed cells (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	聚合线粒体 DNA 荧光强度 Fluorence of aggregated mtDNA	
	MMP	ROS
Control	0.55±0.03	1.86±0.02
P40	0.36±0.01*	2.08±0.01*
D-P40	0.41±0.01*	3.28±0.04* [△]
F-P40	0.43±0.05*	3.74±0.15* [△]

注: 与对照组相比, * $p<0.05$; 与 P40 对比, [△] $p<0.05$ 。
* $p<0.05$: Compared with control, [△] $p<0.05$: Compared with P40.

3 讨论

活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 指较 O_2 的化学性质更为活泼的 O_2 代谢产物及其衍生的含氧物质的统称, 细胞在正常状态下, 线粒体产生的 ROS (如单线态氧、超氧阴离子、过氧离子和自由基等) 与体内的抗氧化系统间存在动态平衡, 参与增殖、分化、凋亡相关的信号传导途径, 发挥着重要的功能且不致引起细胞的损伤。在受到外源性有害因素刺激后, 线粒体可产生过量的 ROS, 破坏线粒体膜的完整性并使膜电位缺失^[3,4], 对机体造成可逆/不可逆的损伤。本实验中, α 粒子照射后, 细胞内 ROS 水平明显升高, 而线粒体膜电位显著降低, 提示 α 粒子照射产生了氧化损伤, 使细胞处于氧化应激的状态。

JC-1 是一种阳离子脂质荧光染料, 可作为检测线粒体跨膜电位指示剂。细胞 JC-1 染色后, 流式细胞仪检测细胞中聚合物红色荧光的变化来反应细胞膜电位的高低。Li 等^[5]认为线粒体膜电位的下降是细胞凋亡早期的标志性事件之一。同时, Zhang 等^[6]发现人类小气道上皮细胞经由 α 粒子照射引起线粒体膜电位下降、COX 活性降低及耗氧量减少。但在本实验中, 转化细胞的膜电位反而因照射次数的增加而升高, 但总体均低于对照组, 其原因尚不明确, 可能与细胞恶性转化的不同阶段有关。

人类基因组包括细胞核内的核基因组及细胞质内的线粒体基因组。线粒体是除了细胞核之外唯一含有 DNA (mtDNA) 的细胞器。在肿瘤的发生发展过程中, mtDNA 的异常改变与其密切相关, 已在多种癌细胞中, 如肝癌、消化系统肿瘤、肾癌、肺癌、乳腺癌等^[7-10]得到验证。线粒体是真核细胞内一种重要的半自主性细胞器, 其功能活动受自身 DNA 和核 DNA 的双向调控。mtDNA 呈双链环状, 哺乳动物中大小在 15 kb—18 kb 之间, 人类细胞中长度为 16569 bp。一个细胞可有多条线粒体, 一个线粒体中可含多个 DNA 分子。已知 mtDNA 可编码核糖体中 2 种 rRNA (12S 及 16S), 22 种 tRNA 和 13 种多肽 (每种约含 50 个氨基酸残基)。除此之外, 组成线粒体各部分的蛋白质, 绝大部分都是由核 DNA 编码并在细胞质核糖体上合成后, 再运送到线粒体各自的功能位点上。因此, 线粒体的遗传系统仍然要依赖于细胞核的遗传系统, 线粒体是半自主性细胞器, 其复制也是以半保留方式进行。本实验发现照射后线粒体拷贝数显著增加, 线粒体数量也相应增多, 与在肿瘤细胞中的情况相似, 提示 α 粒子照射的损伤效应和细胞的恶性转化过程可能有共

同的效应途径。通过同位素标记实验证实 mtDNA 复制的时间主要在细胞周期的 S 期和 G2 期^[11-14]。

近年来, 有研究表明 mtDNA 和核 DNA 形成复合物可能在肿瘤的发生中起着重要的作用^[15]。环境有害因素的暴露致线粒体 DNA 在短期内裂解, 产生大量游离的 mtDNA。这些 mtDNA 可经核膜上的核孔进入核内, 在 DNA 连接酶作用下, 随机整合到核基因组内, 发挥类似致癌病毒样作用。mtDNA 在肿瘤细胞核内的整合可能是肿瘤发生的基础之一, 值得今后进一步深入研究。

本次研究的结果中, mtDNA 拷贝数随照射次数的增加而增加, 且随着细胞恶性程度的增加而增加。结果提示线粒体拷贝数改变, 可作为细胞受到 α 粒子照射后, 观察细胞发生恶性转化的补充指标。

参考文献

- 1 Zhang Z L, Sun J, Dong J Y, *et al.* Residential radon and lung cancer risk: an updated meta-analysis of case-control studies [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, **13**(6): 2459-2465
- 2 李申德. 细胞培养中正常细胞恶性转化的鉴定指标[J]. *细胞生物学杂志*, 1985, **7**(2): 95-96
LI Shende. Index for malignant transformation identification in cell culture [J]. *Chin J Cell Biol*, 1985, **7**(2): 95-96
- 3 Scibior-Bentkowska D, Czebot H. Cancer cells and oxidative stress [J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2009, **63**: 58-72
- 4 Yamamori T, Yasui H, Yamazumi M, *et al.* Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, **53**(2): 260-270
- 5 Li Y Y, Zhang Z, Wang Z H. rBTI induces apoptosis in human solid tumor cell lines by loss in mitochondrial transmembrane potential and caspase activation [J]. *Toxicol Lett*, 2009, **189**(2): 166-175
- 6 Zhang S, Wen G, Huang S X, *et al.* Mitochondrial alteration in malignantly transformed human small airway epithelial cells induced by α -particles [J]. *Int J Cancer*, 2013, **132**(1): 19-28
- 7 Lee H C, Li S H, Lin J C, *et al.* Somatic mutations in the D-loop and decrease in the copy number of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma [J]. *Mutat Res*, 2004, **547**(1-2): 71-78

- 8 Yu M, Zhou Y, Shi Y, *et al.* Reduced mitochondrial DNA copy number is correlated with tumor progression and prognosis in Chinese breast cancer patients [J]. *IUBMB Life*, 2007, **59**(7): 450-457
- 9 Wu C W, Yin P H, Hung W Y, *et al.* Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in gastric cancer [J]. *Gene Chromosome Cancer*, 2005, **44**(1): 19-28
- 10 Fliss M S, Usadel H, Caballero O L, *et al.* Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids [J]. *Science*, 2000, **287**(5460): 2017-2019
- 11 Chen S, Liu D, Finley R L Jr, *et al.* Loss of mitochondrial DNA in the yeast cardiolipin synthase *Crd1* mutant leads to up-regulation of the protein kinase *Swe1p* that regulates the G_2/M transition [J]. *J Biol Chem*, 2010, **285**(14): 10397-10407
- 12 Li B Y, Sun J, Wei H, Cheng YZ *et al.* Radon-induced reduced apoptosis in human bronchial epithelial cells with knockdown of mitochondria DNA [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2012, **75**(18): 1111-1119
- 13 Selvanayagam P, Rajaraman S. Detection of mitochondrial genome depletion by a novel cDNA in renal cell carcinoma [J]. *Lab Invest*, 1996, **74**(3): 592-599
- 14 Kim M M, Clinger J D, Masayesva B G, *et al.* Mitochondrial DNA quantity increases with histopathologic grade in premalignant and malignant head and neck lesions [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, **10**(24): 8512-8515
- 15 Lazarou M, McKenzie M, Ohtake A, *et al.* Analysis of the assembly profiles for mitochondrial-and nuclear-DNA-encoded subunits into complex I [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, **27**(12): 4228-4237

Changes of malignant transforming mitochondria in human bronchial epithelial cells induced by α -particle radiation

GU Chao NIE Jihua CHEN Zhihai LIU Xing LI Jianxiang CAO Yi TONG Jian

(School of Public Health, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT To explore the role of mitochondria in the malignant transformation of immortalized human bronchial epithelial cells (BEAS-2B), BEAS-2B cells were treated with α particles at different doses of 0.1 Gy, 0.25 Gy, 0.5 Gy and 1 Gy. And the exposure rate was 0.223 Gy/min. After the second and fourth irradiation, the cells were cultured for 40 generations. Proliferative capacity of the cells was measured by a soft agar clone test, and changes of mitochondrial morphological structure were observed by a transmission electron microscope. Mitochondrial DNA (mtDNA) copy number was detected by Q-PCR, and alterations in ROS production and mitochondrial membrane potential were analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS). After the irradiation of α particles at dose of 0.25 Gy, mitochondrial morphological structure altered significantly. Soft agar clone formation rate, mtDNA copy number and ROS production increase, while the mitochondrial membrane potential decreased with the irradiation times. The results indicated that these changes may be used as indexes reflecting the phenotype of cell transformation.

KEYWORDS α particles, BEAS-2B, Mitochondrion

CLC TL77