

WORT 增强 γ 射线对 SHG44 细胞周期及凋亡的影响

薛景^{1,2} 刘芬菊¹ 俞家华¹ 李冰燕¹ 杨学琴¹ 孙志强¹

¹ (苏州大学放射医学与公共卫生学院 苏州 215123)

² (苏州市立医院 苏州 215004)

摘要 研究渥曼青霉素 (Wortmannin, WORT) 对人脑胶质瘤细胞辐射增敏作用及诱导细胞凋亡。用克隆法、流式细胞术和激光共聚焦显微镜扫描技术检测细胞克隆形成、细胞周期和凋亡以及凋亡的形态学特征。结果表明: WORT 能抑制细胞克隆形成, 和 ^{60}Co γ 射线联用抑制作用增强, 表现出协同作用。WORT 和 ^{60}Co γ 射线联用能引起 SHG-44 细胞 G_1 期阻滞, WORT 能增强 ^{60}Co γ 射线诱导的细胞凋亡, 凋亡细胞核固缩和核碎裂, 可见凋亡小体。以上结果表明, WORT 可能通过诱导细胞 G_1 期阻滞和凋亡途径来增加细胞的辐射敏感性。

关键词 渥曼青霉素, 脑胶质瘤细胞, 辐射增敏, 凋亡

中图分类号 R811.5, R730.5, R739.4

细胞内基因突变或缺失是影响细胞辐射敏感性的原因之一。SHG44 细胞存在 PTEN 缺失^[1](PTEN, 即磷酸酶和细胞骨架张力蛋白同源物从 10 号染色体缺失, Phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10)。研究表明^[2], 由于 PTEN 所下调的磷脂酰肌醇-3-激酶 (Phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 通路失衡, PTEN 缺失的胶质瘤细胞与正常人的星形胶质细胞相比, 内源性蛋白激酶 B (Protein kinase B, PKB) 活性高, 从而对辐射更耐受。

放疗后肿瘤细胞再增殖现象提示辐射可能激活细胞内的相关基因抵抗辐射损伤。研究表明, 辐射可通过自由基途径和 DNA 损伤途径激活 PKB, Semenza^[3]报道辐射产生的活性氧簇 (Reactive oxygen species, ROS) 诱导了乏氧诱导因子-1 (Hypoxia inductive factor-1, HIF-1) 的激活、血管表皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 基因的转录, 还可诱导产生碱性成纤维细胞生长因子 (Basic fibroblast growth factor, bFGF), 从而通过 PI3K 激活 PKB。资料证明, DNA 依赖的蛋白激酶^[4] (DNA protein kinase, DNA-PK)、ATM (Ataxia telangiectasia mutated, ATM)^[5]能激活 PKB S473 位点的磷酸化, 而 DNA-PK、ATM 均与 DNA 损伤后修复有关, 而且 2Gy ^{60}Co γ 射线即可激活 ATM^[6]。PKB 能通过抑制 P27 和多种凋亡相关蛋白调控细胞周期和抗细胞凋亡^[7]。

渥曼青霉素 (Wortmannin, WORT) 是 PI3K 的相对特异性抑制剂, 文献[8]报道低浓度 WORT ($<1\mu\text{mol/L}$) 可抑制 PI3K 活性, 而高浓度 WORT ($>10\mu\text{mol/L}$) 可抑制 PI3K 家族的其他成员包括 ATM、DNA-PK 等 DNA 损伤修复相关酶的活性, 从而可恢复 PTEN 基因的 PI3K/PKB 抑制功能, 同时阻滞 PKB 激活的可能途径。因此本实验观察了 WORT 联合 γ 射线对 SHG44 细胞周期、增殖、凋亡的影响, 从而探讨 PKB 与胶质瘤细胞 SHG44 辐射抗性的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料

人脑胶质瘤细胞 SHG44 由苏州大学附属第一人民医院脑研室提供。WORT (分子量 428.4)、吖啶橙 (Acridine orange, AO) 染料、溴乙锭 (Ethidium bromide, EB)、碘化丙啶 (Propidium iodide, PI) 染料: 购自 sigma 公司; RPMI 1640 培养基 (Roswell Park Memorial Institute) 购自 Gibco 公司; 小牛血清购自杭州四季青生物工程公司; TCS-SP2 型激光共聚焦显微镜 (Laser Confocal Scanning Microscope, LCSM, Leica Co, Germany), COULTER EPICS X1 型流式细胞仪 (Beckman Coulter, USA)。

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: 薛景, 男, 1980 年 3 月出生, 2006 年毕业于苏州大学放射医学与公共卫生学院, 硕士, 现工作于苏州市立医院东区放疗科

通讯联系人: 刘芬菊

收稿日期: 初稿 2006-07-18, 修回 2006-09-25

1.2 方法

1.2.1 工作液的配制 WORT 10mmol/L 溶于 DMSO, 4℃避光保存; 100μg/mL 的 PI 染液, 临用前 PBS 配制 5μg/mL AO/EB 染液。

1.2.2 WORT 处理 对数生长期的细胞接种 24h 贴壁后, 无血清培养 16—24h, 加 WORT 至相应实验浓度, 对照组加 DMSO, 6h 后加小牛血清至 10%。

1.2.3 辐照方式 WORT 处理或 DMSO 处理后 5.5h, 经 ^{60}Co γ 射线以 1Gy/min 辐照, 照射场由苏州大学辐照中心提供。

1.2.4 克隆法测定 SHG44 细胞存活率 以对数生长期细胞制备单细胞悬液, 调整细胞浓度至 $10^6/\text{mL}$, 1mL/瓶接种三瓶, 培养 24h, 换无血清培养基培养 24h, 加 WORT 分别至 0、0.5、20μmol/L, 6h 后三组细胞均用胰蛋白酶消化制备单细胞悬液, 调整细胞浓度至 $10^5/\text{mL}$, 1mL/管加至 1.5mL 离心管, 照射 0、2、5、10Gy, 再以 500 个细胞/皿 (0、2、5Gy)、1000 个细胞/皿 (10Gy) 接种至 60mm 培养皿, 每组每个剂量点设三个平行样, 培养 11d 后经 PBS 洗、甲醇固定、Gimsa 染色于显微镜下计数 50 个细胞以上的细胞集落。

1.2.5 流式细胞术测定 SHG-44 细胞周期和凋亡 细胞经 WORT 处理后经 ^{60}Co γ 射线照射, 剂量为 10Gy, 设 0μmol/L-0Gy、0μmol/L-10Gy、0.5μmol/L-0Gy 三组对照, 培养 48h 后检测细胞周期: 各组细胞用胰酶消化, 制备单细胞悬液, 计数并调整浓度

为 $10^5/\text{mL}$ 。离心 (1,000r/min, 5min), 弃上清, 0.01mol/L 的 PBS 洗 2 次以去除细胞碎片, 缓慢加入 70%冷乙醇 1mL, 吹打均匀, 4℃固定过夜 (可保存 2 周)。PBS 洗 1 遍, 细胞重悬于 0.5mL PBS, 加 0.5mL PI 染色液, 置 4℃避光染 30min, 上机检测。

1.2.6 LGSM 观察 SHG-44 细胞凋亡的形态学特征 对数生长期 SHG44 细胞制成单细胞悬液, 培养皿中爬片培养 24h 使贴壁, 换用无血清 1640 培养液, 24h 后加 WORT 至相应实验浓度, 培养 5.5h 后照射, 30min 后加小牛血清至 10%, 设正常对照、单独 WORT、单独照射组作对照, 培养 48h 后, PBS 洗两次, 加 50μL AO/EB 染液避光孵育 30min, 激光共聚焦显微镜观察细胞形态 (AO 激发波长 488nm, 发射波长 500—520nm; EB 激发波长 543nm, 发射波长 600—700nm)。

1.2.7 统计学处理 数据均以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 统计分析采用 SPSS, 两两比较用 u 检验。

2 结果

2.1 WORT 对 SHG44 细胞克隆存活的影响

0.5、20μmol/L WORT 分别与 2Gy 照射联用结果见表 1。其克隆存活率低于单独照射组和 TAM 处理组, 20μmol/L WORT 与 5Gy 照射联用时克隆存活率仅 6%。说明 WORT 显著增加了 ^{60}Co γ 射线对脑胶质瘤细胞杀伤作用, 增强了细胞的辐射敏感性。

Table 1 Colony formation in SHG-44 cells treated with WORT or combined with ^{60}Co γ -irradiation ($\bar{x} \pm s$)

Radiation / Gy		WORT / $\mu\text{mol L}^{-1}$		
		I	II	III
		0	0.5	20
IV	0	100±5%	88±13% ⁽¹⁾	63±4% ⁽¹⁾
V	2	93±5% ⁽²⁾	15±12% ^{(1), (2)}	9±7% ^{(1), (2)}
VI	5	10±5% ⁽²⁾	5±4% ⁽²⁾	6±6% ^{(1), (2)}
VII	10	2±1% ⁽²⁾	2±2% ⁽²⁾	0% ⁽²⁾

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

Table 2 Tests of Between-Subjects Effects on ^{60}Co γ -rays and WORT

Groups	Mean Square	F	Sig.
WORT	1.715	4.233	0.029
RADIA	12.815	31.628	0.000
WORT * RADIA	2.691	6.642	0.001

采用完全随机分组两因素析因方差分析 ^{60}Co γ 射线与 WORT 交互作用的结果见表 2。不同剂量 ^{60}Co γ 射线照射后 SHG44 细胞克隆存活率不同 ($p<0.01$); 不同浓度的 WORT 处理后 SHG44 细胞克隆存活率不同 ($p<0.05$); ^{60}Co γ 射线与 WORT

有协同作用 ($p<0.01$)。对以上资料对数见图 1。单独照射后 SHG44 细胞效应曲线在 2Gy 以后直线下降。WORT 阻滞 PKB 活性后照射, 细胞效应曲线在 0Gy 以后均呈直线下降。

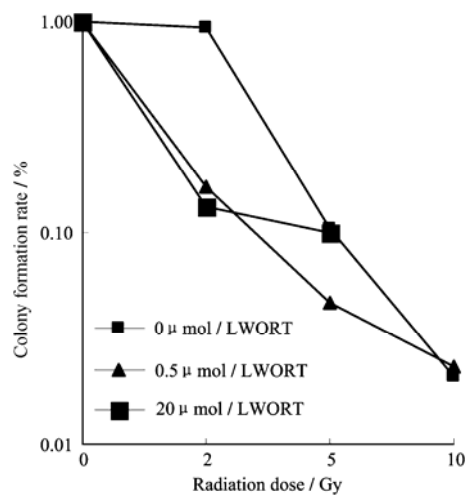


Fig.1 The impact of WORT on radiation effect of SHG44 cells

2.2 WORT 阻滞 PKB 活性后 ^{60}Co γ 射线对 SHG-44 细胞周期的影响

SHG44 细胞经 ^{60}Co γ 射线照射后继续培养 48h, 制备单细胞悬液经乙醇固定、PI 染色后于流式细胞仪检测。从表 3 可见, WORT 处理后 G_2/M 细胞比例上

升, 而 G_0/G_1 期细胞比例下降, 凋亡细胞比例为 1.0%; ^{60}Co γ 射线照射后 G_0/G_1 、S 期期细胞比例无明显变化, 而 G_2/M 期细胞百分比明显下降, 凋亡细胞比例为 9.3%; WORT 阻滞 PKB 后辐射使 SHG44 细胞 G_0/G_1 期细胞比例明显上升, 而 S 期细胞比例明显下降, 凋亡细胞比例明显上升为 23.4%。

Table 3 The impact of ^{60}Co -rays on cell cycle process with PKB blocked by WORT

Number	Group	Group	G ₁	S	G ₂	Apoptosis
I	WORT	0 $\mu\text{mol/L}$	46.5 $\pm$ 0.98	51.0 $\pm$ 0.98	2.5 $\pm$ 0.31	0
II	WORT	0.5 $\mu\text{mol/L}$	40.9 $\pm$ 0.96 ⁽¹⁾⁽²⁾	53.2 $\pm$ 0.98 ⁽²⁾	5.9 $\pm$ 0.46 ⁽¹⁾⁽²⁾	1.0 $\pm$ 0.20 ⁽²⁾
III	γ - ray	10Gy	47.5 $\pm$ 0.98 ⁽²⁾	52.5 $\pm$ 0.98 ⁽²⁾	0 ⁽¹⁾⁽²⁾	9.3 $\pm$ 0.57 ⁽¹⁾
IV	WORT+ γ - ray	0.5 $\mu\text{mol/L}$ +10Gy	73.2 $\pm$ 0.87 ⁽¹⁾	24.8 $\pm$ 0.85 ⁽¹⁾	2.0 $\pm$ 0.27 ⁽¹⁾	23.4 $\pm$ 0.93 ⁽¹⁾

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

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

从图 2a 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 2b 显示, SHG-44 细胞经 2Gy

照射联合 0.5 $\mu\text{mol/L}$ WORT 处理后可见凋亡细胞, 凋亡细胞呈黄绿色或橙红色。10Gy 照射联合 0.5 $\mu\text{mol/L}$ WORT 处理后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。

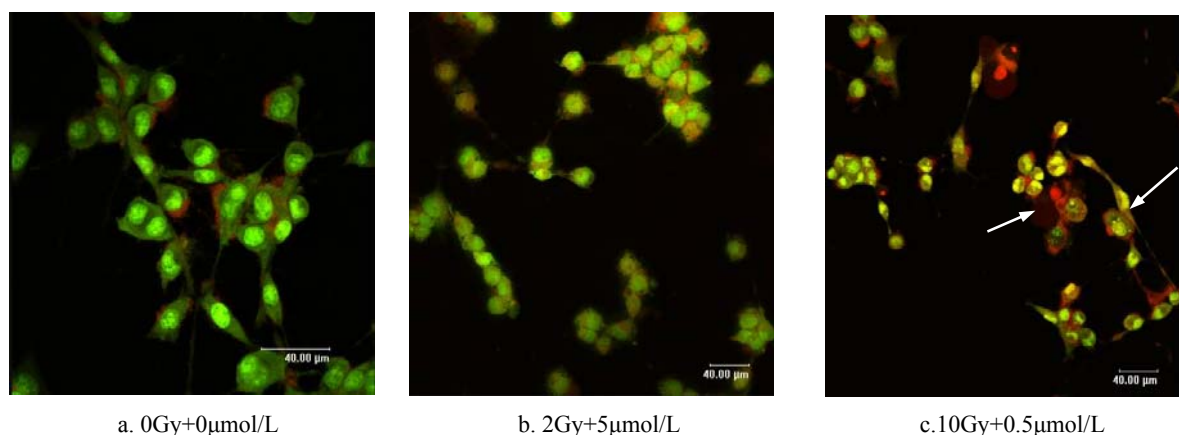


Fig.2 Morphology features of apoptosis in SHG44 cells treated by ^{60}Co γ -rays when PKB was blocked by WORT. (a: SHG-44 Cell was intact and showed no signs of apoptosis, cellular nucleus was bright green. b: most cells shrined and apoptotic cell was flavo-green or salmon color and appeared like being eroded by worm. c: aryopyknosis, nuclear fragmentation and apoptotic body were observed)

3 讨论

WORT 是一种脂溶性微生物产物,在培养基中不稳定,血清存在状态下也可能促进 WORT 失活,因而相关研究中细胞均用无血清培养基处理(血清饥饿)^[9]。克隆法是测定细胞增殖能力的有效方法,通过计数克隆形成率可对细胞的增殖潜力作定量分析,常用于药物敏感和放射敏感分析。国内外学者常采用该试验筛选最佳一、二线抗肿瘤药物,特别是在研究耐药性方面的精确度明显高于其他实验方法,对无效治疗的预报正确率近于 100%。本实验克隆法的研究数据显示当 WORT 和 2Gy γ 射线联用,其克隆存活率低于单独照射组与 WORT 处理组,说明 WORT 显著提高了脑胶质瘤细胞 SHG-44 对 ^{60}Co γ 射线的辐射敏感性。统计分析结果显示, ^{60}Co γ 射线与 WORT 有协同作用($p < 0.01$)。对数作图(见图 1)发现,单独照射后 SHG44 细胞效应曲线在 2Gy 剂量范围出现明显的“肩区”,而后直线下降,“肩区”说明 SHG-44 细胞有亚致死损伤的修复能力,与文献[10]报道一致。而 WORT 和照射联用时,细胞效应曲线呈直线下降,无明显的“肩区”,即在 WORT 作用后,SHG-44 细胞丧失亚致死性损伤修复的能力,辐射敏感性增加。

在照射后肿瘤细胞有丝分裂延迟,其特征为细胞在 G_1 期、 G_2 期停留时间延长,即 G_1 期阻滞和 G_2 期阻滞。细胞经照射后 G_1 期细胞比例的高低与细胞辐射抗性有关,在多株肿瘤细胞中发现敏感株的周期阻滞往往延长,而抗性株的却缩短,对辐射敏感的人鳞状上皮癌细胞不论在 2Gy 还是 50Gy 照射后阻滞在 G_1 期的细胞百分含量都高于抗性的 SQ20B^[11]。 G_0/G_1 期细胞比例主要受 P53、P21、P27

蛋白调控^[12],SHG44 细胞中 p53 基因发生突变^[13],P21 蛋白表达缺失^[14]。因此,SHG44 细胞 G_0/G_1 期细胞比例只有 P27 蛋白调控,而 P27 受 PKB 负调控。本研究发现 ^{60}Co γ 射线照射后 G_0/G_1 、S 期细胞所占百分比有略有上升但不明显,这可能与 SHG44 细胞内高活性 PKB 对 P27 蛋白的负调控有关,PKB 抑制了 P27 的 G_1 期阻滞功能,促进细胞快速通过 G_1 期。而 WORT 作用后照射使 SHG44 细胞 G_0/G_1 期细胞比例上升,而 S 期、 G_2/M 细胞比例下降,凋亡比例明显提高到 23.4%。这说明 WORT 通过抑制 PKB 活性从而恢复了 P27 的 G_1 期阻滞功能,阻滞在 G_1 期未能完全修复的细胞则发生凋亡使凋亡细胞比例明显提高。

本实验证实 WORT 能抑制胶质瘤细胞克隆形成,提高脑胶质瘤细胞的放射敏感性。且 WORT 在低浓度 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 联合 ^{60}Co γ 射线时就能引起 SHG-44 细胞 G_1 期阻滞,凋亡率增高。这说明 WORT 抑制细胞克隆形成,增加细胞的辐射敏感性可能与其诱导细胞 G_1 期阻滞和凋亡有关。

参考文献

- 1 李侠,章翔,吴景文,等.解放军医学杂志,2001,26(2): 79-82
LI Xia, ZHANG Xiang, WU Jingwen, et al. Med J Chinese PLA, 2001, 26(2): 79-82
- 2 Schlegel J, Durchschlag G, Piontek G, et al. Annals of the New York Academy of Sciences, 2002, 973: 224-227
- 3 Semenza G L. Cancer Cell, 2004, 5(5): 405-406
- 4 Feng J H, Park J, Peter C, et al. J Biol Chem, 2004, 279(39): 41189-41196
- 5 Viniegra J G, Martinez N, Modirassari P, et al. J Biol

- Chem, 2005, **280**(6): 4029-4036
- 6 Christopher J Bakkenist, Michael B Kastan. NATURE, 2003, **421**(1): 499-506
- 7 Kim A H, Khursigara G, Sun X, *et al.* Mol Cell Biol, 2001, **21**(3): 893-901
- 8 Okaichi K, Suzuki K, Morita N. Oncology Reports, 2002, **9**(4): 859-862
- 9 Yao R, Geoffrey M. Science, 1995, **267**(5206): 2003-2006
- 10 楚建军, 苏燎原, 许昌韶, 等. 中华放射医学与防护杂志, 2003, **23**(4): 255-257
CHU Jingjun, SU Liaoyuan, XU Changshao, *et al.* Chin J Med Prot, 2003, **23**(4): 255-257
- 11 Vijayakumar S, Czerski L, Majors A, *et al.* Cancer Res, 1992, **52**(19): 5299-5306
- 12 Gottschalk A, Basila D, Wong M. Cancer Research, 2001, **61**(3): 2105-2111
- 13 卞修武, 陈自强, 郭德玉, 等. 中华病理学杂志, 1999, **28**(3): 178-181
BIAN Xiuwu, CHEN Ziqiang, GUO Deyu, *et al.* Chin J Pathol, 1999, **28**(3): 178-181
- 14 王占祥, 章翔, 费舟, 等. 第四军医大学学报, 2003, **24**(22): 2030-2033
WANG Zhanxiang, ZHANG Xiang, FEI Zhou, *et al.* J Fourth Mil Med Univ, 2003, **24**(22): 2030-2033

Enhancement of wortmannin on ^{60}Co γ -irradiation effect of cell cycle procession and apoptosis induction in SHG-44 cells

XUE Jing^{1,2} LIU Fenju¹ YU Jiahua¹ LI Bingyan¹ YANG Xueqin¹ SUN Zhiqiang¹

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

²(Suzhou Municipal Hospital, Suzhou 215004)

ABSTRACT To study radiosensitizing effect and apoptosis induction of wortmannin on human glioma cells, colony formation assay, flow cytometry, laser confocal microscope were used to investigate the inhibition effect on colony formation, apoptosis and cell cycle procession. Experiment results suggested that wortmannin could inhibit colony formation in SHG-44 cells, and the combination of wortmannin with ^{60}Co γ -irradiation showed a synergistic action. Wortmannin could also induce G₁ arrest, apoptosis, and morphological changes such as karyopyknosis, nuclear-fragmentation and apoptotic body were observed. The above results revealed that wortmannin can sensitize SHG-44 cells to gamma radiation, which might be related with G₁ arrest and apoptosis pathway.

KEYWORDS Wortmannin, Glioma, Radiosensitivity, Apoptosis

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