

重离子诱导人舌鳞癌细胞凋亡和 Bax/Bcl-2 蛋白表达的变化

刘斌^{1,2} 侯玮玮² 李宁¹ 张洁² 张红¹

¹(中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

²(兰州大学口腔医学院 兰州 730000)

摘要 探讨重离子辐照对人舌鳞癌 Tb 细胞的凋亡及 Bax/Bcl-2 蛋白表达的影响。采用 0、0.5、1.0、2.0、4.0 Gy 重离子束辐照人舌鳞癌 Tb 细胞,应用 MTT 法检测细胞存活,流式细胞技术检测细胞周期变化,Hoechst 33258/PI 复染法观察 Tb 细胞凋亡形态,并采用 Western-blot 法检测 Bax/Bcl-2 蛋白表达情况。结果发现,Tb 细胞经 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照后存活率显著下降,呈剂量依赖性的生长抑制;Tb 细胞呈现蓝色荧光浓集成团的凋亡形态,且凋亡比例随辐照剂量增加;G₂/M 期细胞百分数随照射剂量增加而增加 ($P<0.05$)。Western-blot 结果显示 Bax 蛋白表达水平随辐照剂量逐渐上升,但在 4 Gy 组其表达不再增高,Bcl-2 蛋白在 1.0、2.0、4.0 Gy 组随剂量增大呈下降趋势。以上结果提示重离子束辐照对 Tb 细胞有抑制作用,Bax/Bcl-2 蛋白表达是重离子治癌机制之一。

关键词 重离子束,人舌鳞癌细胞,凋亡,细胞周期,Bax/Bcl-2

中图分类号 Q274, Q691, R730.2, R735.7

舌癌为口腔常见的恶性肿瘤,一般恶性程度较高,生长快,浸润性强,常波及舌肌。手术治疗损伤大,且易复发。放射治疗是目前治疗的主要手段之一,临床上常用的 X、 γ 射线传能线密度 (LET) 低,对肿瘤乏氧细胞和 G₀ 期细胞敏感性差,组织剂量分布不理想,限制了治疗效果。

经过半个多世纪的探索,发现高传能线密度的重离子束在肿瘤的治疗中比传统的放射治疗具有显著的优势^[1]。在生物方面,其相对生物效应 (RBE) 高,对肿瘤乏氧细胞的杀伤力比 X、 γ 射线大,对细胞生长周期依赖较小。在物理方面,重离子束在通过介质时,速度会逐渐降低而损失其能量并形成明显的电离吸收峰 (Bragg),并且吸收峰的深浅及宽度均可通过特殊装置调节以适应大小形状不同的病灶,重离子在体内到达的位置也便于观察确定,是一种理想的放射治疗方法。

日本和德国在重离子治疗肿瘤的临床试验中已取得了很好的疗效^[2-4],我国的研究才刚刚起步。本研究采用中国科学院近代物理研究所的重离子加速

器 (HIRFL) 提供的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照人舌鳞癌 Tb 细胞,观察细胞增殖、凋亡及 Bax/Bcl-2 蛋白表达情况,探讨重离子辐射诱导的 Tb 细胞凋亡机制,为重离子治疗头颈部肿瘤提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人舌鳞癌 Tb 细胞 (兰州大学医学实验中心提供) 用含 10% 胎牛血清 (兰州民海生物工程有限公司) RPMI-1640 (GIBCO) 培养液,在 37℃、5%CO₂ 孵箱中常规培养,传代 3 到 4 次使细胞达到良好的生长状态。

1.2 照射条件

重离子照射在兰州近代物理研究所 HIRFL 重离子装置辐照终端进行,束流为 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束,束流能量为 831.28 MeV,LET 为 35.5 keV/ μm 。采用分组照射,吸收剂量率 2 Gy/min。细胞吸收剂量分别

中国博士后基金(20070410812)、国家自然科学基金资助项目(10675151)、中国科学院 2002 年度“百人计划”基金(0306010BRO)、甘肃省科技攻关项目(2GS052-A43-008-02) 资助

第一作者:刘斌,男,1967年5月出生,2000年在四川华西医科大学获得医学硕士学位,2006年于中国科学院化学物理研究所获理学博士学位,现在中国科学院近代物理研究所作博士后,从事辐射生物学研究工作,副教授

通讯联系人:张红, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn

收稿日期:初稿 2008-04-23,修回 2008-06-17

是 0、0.5、1.0、2.0、4.0 Gy。用空气电离室监测剂量，样品更换和剂量的数据获取由计算机控制。

1.3 细胞增殖测定

取对数生长期细胞在辐照前 48 h 接种到直径 35 mm 的培养皿中 (1×10^5 个/皿)。分为 5 组，分别给予 0、0.5、1.0、2.0、4.0 Gy 照射。将照射后的细胞用胰酶消化，计数并将样品稀释至适当浓度。以 MTT 法检测细胞增殖，按每孔 2.5×10^4 个/200 μL 将定量的细胞悬液接种到 96 孔板中，每个剂量点设 6 孔重复，在 5% CO_2 、37℃ 条件下培养 12、24、48 h 后，检测前每孔加入四甲基偶唑蓝 (MTT) 10 μL ，培养 4 h 后，弃去培养液，加入二甲亚砜 (DMSO) 100 μL /孔，用 Bio-Rad550 型酶标仪在 490 nm 处测定光密度值 (OD 值)。重复检测 3 次，计算平均值，得出细胞存活率，以剂量为横轴，细胞存活率为纵轴绘制剂量-效应曲线图。

1.4 流式细胞术测定细胞周期

辐照后 24 h 收集细胞，PBS 洗 2 遍，4℃ 预冷 70% 乙醇固定过夜。加入适量 RNA 酶 (终浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 PI 染料 (终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 抚育 30 min，用 FACSCalibur 流式细胞分析仪 (Becton Dickinson) 检测。每个样品设 3 个平行，取均值。

1.5 凋亡细胞形态观察

消化收集各组不同剂量辐照后 24 h 的 Tb 细胞，离心，PBS 洗 2 遍，加入 Hoechst 33258 染液 (终浓度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，避光 5 min，加入 PI (终浓度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，37℃ 避光保存 30 min，PBS 洗 1 遍，在荧光显微镜下观察凋亡细胞和坏死细胞^[5]。

1.6 Bax/Bcl-2 蛋白表达测定

采用 Western-blot 法检测 Bax/Bcl-2 蛋白表达，消化收集各组不同剂量辐照后 6、12、24 h 的 Tb 细胞，PBS 洗 2 遍，弃上清，用细胞裂解液 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH=7.4; $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ edetic acid pH=8.0; 0.5% Triton-X 100) 在冰浴中裂解提取蛋白，用 Bradford 检测试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司) 测定蛋白含量，采用相同蛋白量上样，经 SDS-PAGE 电泳分离蛋白，后转移到硝酸纤维素膜，封闭后分别按 1: 1000 稀释加入兔抗人 Bax, Bcl-2 抗体 (中杉公司)，4℃ 孵育 8 h，按 1: 2500 稀释加入辣根过氧化物酶耦联的羊抗兔 IgG (Invitrogen) 孵育 2 h，化学发光法显色观测。重复 3 次。

1.7 统计学分析

实验数据均采用 SPSS10.0 for windows 软件包处理，进行 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 细胞增殖率测定

经 MTT 比色法测定细胞增殖能力，绘制剂量-效应曲线图。从图 1 可见随收集时间的增加，细胞存活率逐渐降低。12、24、48 h 曲线都呈“L”形，随辐照剂量的增加，呈显著下降，其中 0.5 Gy 剂量组在 24 和 48 h 后细胞存活率即可降为 15% 左右。

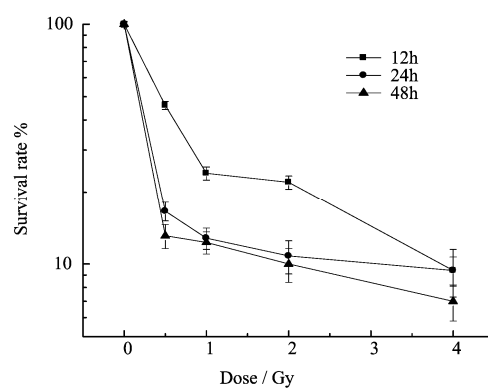


Fig. 1 Survival fraction of Tb cells after $^{12}\text{C}^6$ ions irradiation of different doses ($n=6$)

2.2 流式细胞术测定细胞周期

表 1 为 0、0.5、1.0、2.0、4.0 Gy $^{12}\text{C}^6$ 离子束照射 Tb 细胞后 24 h 细胞的周期变化，出现 G_2/M 期明显阻滞，且具照射剂量依赖性 ($r=0.912$, $P<0.05$)，1.0、2.0、4.0 Gy 组与对照组相比，具有统计学意义。

2.3 Tb 凋亡细胞形态观察

在荧光显微镜下蓝色荧光均匀分布者为正常细胞；凋亡细胞对 PI 拒染，对 Hoechst 33258 着色而呈蓝色，细胞膜完整，核出现浓染致密的固缩蓝色颗粒，染色质浓缩、凝集在核内形成不规则团块 (见图 2(a) 中箭头所示)；死亡细胞为 PI 着色而呈红色 (见图 2(b) 中箭头所示)。结果也显示不同剂量组在照射后 12~48 h 均有不同比例凋亡细胞的出现，有时间和照射强度依赖性关系，但在 4 Gy 时，凋亡比例不再明显增加，而坏死细胞明显增多。

Table 1 Percentage of cells in different interphases to total cells of Tb 24 h after $^{12}\text{C}^6$ ions irradiation of different doses ($\bar{x} \pm s$) (%)

Dose/Gy	G ₁ /G ₀	S	G ₂ /M
0	49.98±3.79	25.48±1.22	24.54±0.73
0.5	50.89±4.79	23.75±1.32	25.37±3.67
1.0	44.34±0.90	20.42±0.56	35.24±2.13 ^(a)
2.0	13.99±1.94	24.31±1.83	61.70±1.21 ^(a)
4.0	12.56±0.73	31.45±1.26	55.99±2.46 ^(a)

Note: $n=3$. The differences among data of individual groups were performed with the analysis of Student-T test. (a) $P<0.05$, vs. Control

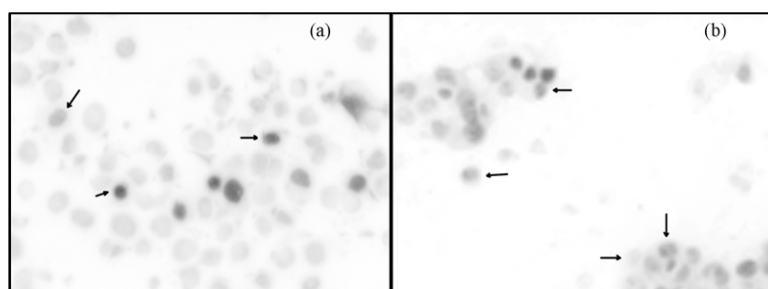


Fig. 2 Effects of carbon ions irradiation on morphologic changes of Tb cells
(a): Apoptosis cells (Hoechst 33258 staining $\times 400$); (b): Necrosis cells (PI staining $\times 400$)

2.4 Bax/Bcl-2 蛋白表达测定

Western-blot 结果显示照射后 24 h 的 Tb 细胞中 Bax 蛋白表达水平逐渐增高, 但 4 Gy 时其表达不再增高, 略有所下降, Bcl-2 蛋白在小剂量 0.5、1Gy 组略有增加, 随后呈下降趋势 (见图 3)。

3 讨论

重离子是一种理想的放射治疗方式, 能通过直接或间接的方式诱导被照射细胞内的 DNA 断裂, 导致细胞周期改变和凋亡的发生, 从而取得良好的生物学效应。但是, 射线照射后细胞会采取多种途径来维持基因组的完整性, 且多数与细胞周期相关^[5]。细胞周期检测点可发现 DNA 的损伤或突变, 必

将受损细胞阻滞在相应的检测点处, 以赢得时间来修复断裂的 DNA。本研究发现, 人舌鳞状细胞癌 Tb 受照后 G₂/M 期的细胞比例显著增高, 且呈剂量依赖性。这意味着细胞摆脱对放射线抗拒的 G₀/G₁ 期, 而进入对放射线敏感的 G₂/M 期, 当 DNA 损伤累积到一定程度, 凋亡相关基因将被激活, 并诱导凋亡。Danielsson 等^[6]研究人头颈部鳞癌细胞株在放射治疗下, 高剂量照射时 G₂ 期细胞数比率多于低剂量照射, 这与本研究结果相类似。G₂/M 期阻滞可保证有丝分裂分配的忠实性, 同时说明该期细胞对放射敏感性较高, 这为剂量选择和后期放疗等提供了依据, 有利于再次照射时对细胞的杀伤效应的增强, 这也是临床分割放疗和超分割放疗的理论基础之一。

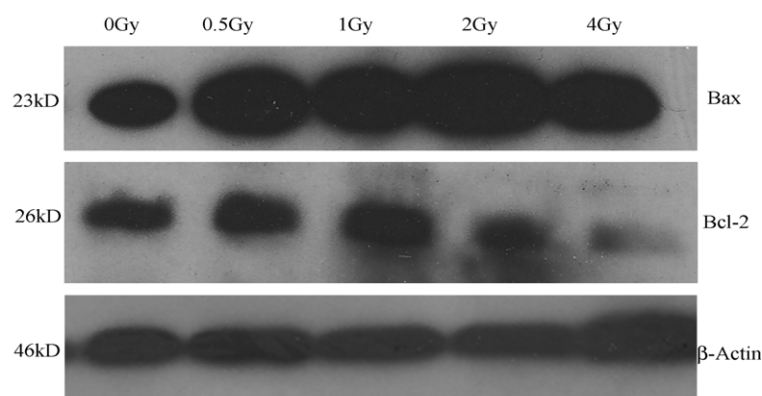


Fig. 3 Effects of carbon ions irradiation on the expression of Bax, Bcl-2 in Tb cells

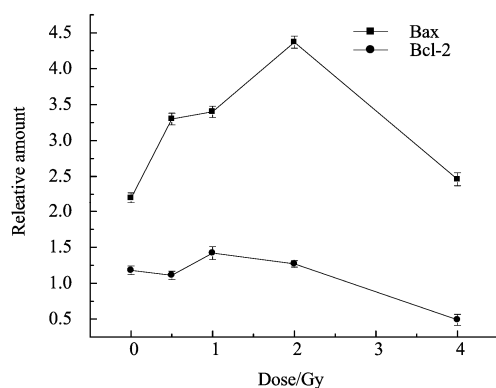


Fig.4 Effects of carbon ions irradiation on the relative amount of Bax, Bcl-2 proteins in Tb cells

细胞凋亡是一种受众多分子精细调控的多基因多途径的细胞程序化死亡过程^[7],可由生理因素、非生理因素(如辐射、化学药物等)诱发产生。这种细胞死亡与细胞坏死迥然不同,形态学表现为细胞变小,核浓缩,核破碎,而细胞膜在凋亡早期相对完整,在晚期形成由细胞膜包绕的“凋亡小体”。细胞凋亡已作为探讨和揭示疾病的发生机制,探讨各种治疗手段的作用机制的手段^[8]。本实验采用 Hoechst 33258/PI 复染荧光显微镜观察重离子辐照人舌鳞癌 Tb 细胞后细胞的形态,发现随着重离子照射剂量的增加,Tb 细胞发生凋亡的比例增加,呈现出特征性改变,如核染色体断裂,核固缩,凋亡小体出现,因此重离子可能在体外诱导 Tb 细胞凋亡。

肿瘤的生成不但涉及到细胞增殖,而且也与细胞凋亡的下降有关,凋亡在肿瘤的形成、发展和治疗等方面起着重要的作用,它是由 Bcl-2 家族的系列基因所控制的^[9],其中包括抗凋亡基因 Bcl-2 和促凋亡基因 Bax,研究认为它们可能是细胞发生凋亡的重要因素,Bcl-2 表达与口腔鳞癌的早期发生有关,Bax 表达增强预示着口腔鳞癌的恶性程度,Bcl-2/Bax 比例的下降又被认为是舌鳞癌患者生存率的重要指标。本实验结果显示,随重离子辐射剂量的增加,Bax 表达显著上调,而 Bcl-2 的表达则受抑制,因此,重离子诱导 Bax 基因表达上调的同时,也抑制 Bcl-2 基因的表达,进而两者结合,介导细胞凋亡的发生,这与 Loro 等^[10,11]的研究结果相同,认为 Bax 的激活可由 Bcl-2 所阻滞,两者的比

例可调节线粒体中细胞色素 C 的释放,从而激活 caspases 启动细胞凋亡的程序,也可说明 Bcl-2、Bax 表达水平和 Bcl-2/Bax 比例可作为治疗疗效的预测指标,为临床照射剂量与时间量的调整提供可靠的依据。

重离子治癌在我国虽尚未应用于临床,但由于重离子高的相对生物学效应和独特的剂量分布优势在肿瘤治疗方面有很大的应用前景^[12],本研究的目的是为实现重离子治疗口腔鳞癌的临床应用提供一定的理论依据。

参考文献

- 肖国青, 张红, 李强, 等. 原子核物理评论, 2007, **24**(2): 85-88
XIAO Guoqing, ZHANG Hong, LI Qiang, et al. Nucl Phys Rev, 2007, **24**(2): 85-88
- Stelzer H. Nucl Phys B-Proceedings Suppl, 1998, **61**(3): 650-657
- Rosendahl I M, Baumstark-Khan C, Rink H, et al. Adv Space Res, 2005, **36**(9): 1701-1709
- GUO Chuanling, WANG Jufang, JIN Xiaodong, et al. Nucl Instrum Method Phys Res B, 2007, **259**(2): 997-1003
- Penny A J, Markus L. DNA Repair, 2006, **5**(9):1192-1198
- Danielsson A, Karlsson E, Delle E U. J Cancer Res Clin Oncol, 2005, **131**(7): 459-467
- Nemeth Z, Velich N, Bogdan S, et al. Neoplasma, 2005, **52**(2): 95-102
- 卫增泉, 李强, Kitagawa A, 等. 科学通报, 2005, **50**(5):1070-1075
WEI Zengquan, LI Qiang, Kitagawa A, et al. Sci Bull, 2005, **50**(5):1070-1075
- Derka S, Vairaktaris E, Papakosta Va, et al. Oral Oncology, 2006, **42**(5): 540-550
- Loro L L, Vintermyr O K, Liavaag P G, et al. Hum Pathol, 1999, **30**(9):1097-105
- Xie X, Clausen O P F, De Angelis P, et al. Cancer, 1999, **86**(6): 913-20
- WEI Zengquan, LI Qiang, Kitagawa A, et al. Nucl Sci Tech, 2005, **16**(2): 95-98

Effects of carbon ions irradiation on apoptosis and Bax/Bcl-2 expression of squamous cell in carcinoma of tongue

LIU Bin^{1,2} HOU Weiwei² LI Ning¹ ZHANG Jie² ZHANG Hong¹

¹(Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

²(School of Stomatology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT In order to investigate the effect of carbon ion irradiation on apoptosis and Bax/Bcl-2 expression in human tongue carcinoma cells, exponentially growing human tongue carcinoma cells (Tb) cultured in vitro were irradiated with 0, 0.5, 1.0, 2.0 or 4.0 Gy of $^{12}\text{C}^{6+}$ ions respectively. Survival rate of irradiated cells at various doses were measured by MTT assay. The nucleus changes of apoptosis and necrosis of cells stained by Hoechst/PI were observed through fluorescence microscope. The cell cycle changes were detected by flow cytometry (FCM). The expressions of Bax and Bcl-2 were detected by Western blot analysis. The results show that the viability of Tb cells decreases gradually with increment of irradiation doses of carbon ions. The proportions of apoptosis cells in the irradiated groups are significantly higher than those in the control group. There is a positive correlation between irradiation doses and retardation strength in G₂/M phase at 24 h after irradiation ($P < 0.05$). And the expressions of Bax and bcl-2 are significantly up-regulated and down-regulated respectively by $^{12}\text{C}^{6+}$ ion irradiation. It can be concluded from above that cell apoptosis induced by heavy ion with high-LET may be mediated through the Bax/Bcl-2 expression pathway.

KEYWORDS Heavy ion irradiation, Human tongue carcinoma cells, Apoptosis, Cell cycle, Bax/Bcl-2 expression

CLC Q274, Q691, R730.2, R735.7