

# 体外染氡对 V79 细胞凋亡影响及其机制研究

韦 晔<sup>1</sup>, 刘玉萍<sup>1</sup>, 吴周伟<sup>1</sup>, 吕 雪<sup>2</sup>, 朱正保<sup>1</sup>, 童 建<sup>1</sup>, 李建祥<sup>1\*</sup>

(1. 苏州大学医学部 公共卫生学院, 江苏 苏州 215123; 2. 苏州工业园区疾病防治中心, 江苏 苏州 215123)

**摘 要:** 建立中国仓鼠肺细胞(V79 细胞)体外染氡早期损伤模型, 对 V79 细胞凋亡的分子机制进行探析。筛选确定合适的染氡浓度及时间后将 V79 细胞分为对照组和染氡组, 以每孔  $1.5 \times 10^5$  个细胞接种于 Transwell 培养皿, 细胞贴壁后将 Transwell 培养皿置于细胞动式气体染氡装置中染毒, 染氡后收集各代细胞, 常规培养后检测细胞周期、细胞凋亡及 Caspase-3 蛋白表达情况。结果表明: 确定染氡浓度为  $40\ 000\ \text{Bq} \cdot \text{m}^{-3}$ , 时间为 10 min, 染毒后细胞 G1 期缩短, S 期延长, 细胞凋亡率逐渐升高, Caspase-3 蛋白的表达有明显上升趋势, 成功构建了 V79 细胞体外染氡早期损伤模型。在染毒早期阶段, V79 细胞凋亡率上升与 Caspase-3 蛋白表达增加间无良好相关性。

**关键词:** 肺癌; 氡; 中国仓鼠肺细胞; 凋亡; Caspase-3 蛋白

中图分类号: R 114

文献标志码: A

文章编号: 1671-4652(2012)03-0013-04

## Effects and mechanisms of radon exposure on apoptosis of V79 cells in vitro

WEI Ye<sup>1</sup>, LIU Yu-ping<sup>1</sup>, WU Zhou-wei<sup>1</sup>, LYU Xue<sup>2</sup>, ZHU Zheng-bao<sup>1</sup>, TONG Jian<sup>1</sup>, LI Jian-xiang<sup>1</sup>

(1. Coll of Med, Soochow Univ, Suzhou 215123, China;

2. Suzhou Indus Park Cen for Dis Cont and Prev, Suzhou 215123, China)

**ABSTRACT:** To establish an early radon exposure injury model of V79 cells in vitro and investigate the mechanisms of apoptosis, V79 cells were divided into two groups, the control group (C) and the radon exposure group (Rn) after time and concentration of radon exposure were determined.  $1.5 \times 10^5$  cells were planted onto Transwell membrane until getting adhered, then directly exposed to radon pumped in a gas inhalation box. After exposure cells were trypsinized into dishes for further growth. Cell cycle, apoptotic rate and expression of caspase-3 protein were detected through Flow Cytometer and ELIASA. After  $40\ 000\ \text{Bq} \cdot \text{m}^{-3}$  radon exposure for 10 min, G1 phase was significantly shorter while S phase was longer. The apoptotic rate and expression of Caspase-3 protein increased during radon exposure. V79 cells were built as an early radiation injury cell model successfully. During the early period of radon exposure, increased apoptotic rate of V79 cells was not correlated with increased Caspase-3 protein expression.

**KEY WORDS:** lung cancer; radon; V79 cells; apoptosis; Caspase-3 protein

全球每年大约有 120 万人死于肺癌<sup>[1]</sup>, 辐射是已知的环境致癌因子, 氡及其子体则是人类本底辐射的最主要成分, 天然本底辐射的 50% 来自氡及其子体, 它广泛存在于环境与居室中, 对人类健康构成威胁<sup>[2]</sup>。国际癌症研究机构(IARC)已将氡及其子体列为 I 类致癌物质<sup>[3]</sup>。人类肺癌的 10% 左右归因于氡及其子体的照射, 其中英国为 22%, 德国为 7%, 美国为 10%~14%, 我国的估计值则为 15%<sup>[4-6]</sup>。

细胞凋亡是多细胞生物更新正常细胞和清除异常细胞的重要手段, Caspase 家族被认为是与凋亡最为密切相关的一类蛋白酶, Caspase-3 在凋亡信号传递中起关键作用, 是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路<sup>[7]</sup>。肿瘤的发生发展与细胞凋亡有着密不可分的关系。本研究通过对染氡中国仓鼠肺成纤维

收稿日期: 2012-07-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81172707); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2012618)

作者简介: 韦晔(1987—), 江苏扬州人, 苏州大学硕士研究生, 主要从事氡致肺癌的基因和表观遗传修饰的比较研究。

\* 联系作者, E-mail: aljxcr@suda.edu.cn

细胞(V79 细胞)的细胞周期、细胞凋亡以及凋亡相关的 Caspase-3 蛋白的检测,建立 V79 细胞体外染氩的早期损伤模型,并初步探讨染氩 V79 细胞凋亡的机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要材料与仪器

V79 细胞(苏州大学医学部放射医学与防护学院馈赠);DMEM 培养基、新生胎牛血清(维森特公司产品);AnnexinV-FITC 凋亡检测试剂盒(bi-pec)、Caspase-3 分光光度法检测试剂盒(南京凯基生物有限公司产品)、细胞增殖活性检测试剂:CCK-8(WST-8 比色法)(碧云天生物技术公司产品);细胞培养箱(美国 Thermo Forma 公司产品)、细胞气体染毒装置(MED8170A,天津合普公司产品)、酶标仪(美国 Power wave XS, Bio-tek 公司产品)、Transwell 培养皿、96 孔板(美国 Corning 公司产品)、CK-40 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司产品);流式细胞仪(美国 Beeton Dickinson 公司)。

### 1.2 细胞培养与染氩方法

将 V79 细胞用 DMEM 培养基加 10% 胎牛血清置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,每 2 d 换液 1 次,每 3 d 传代 1 次。将对数生长期细胞制备单细胞悬液,以每孔  $1.5 \times 10^5$  个细胞接种于 Transwell 培养皿中,设立对照组(C 组)和氩染毒组(R<sub>n</sub> 组)。细胞贴壁后置于细胞气体染毒装置中(图 1),膜上方氩持续泵入直接对细胞染毒,膜下方通入培养基保持细胞湿润。细胞染氩一次记作染氩 1 代(R<sub>n1</sub>),收集细胞后,一部分继续下一次染毒,记作染氩 2 代(R<sub>n2</sub>),其余常规培养传代,传至第 *n* 代记作(R<sub>n1-n</sub>),共染毒 4 代,传代 10 代。对照组暴露于氩本底值浓度下该装置中,其余条件同染氩组。

### 1.3 体外染氩细胞模型的建立

通过不同染氩时间及染氩浓度对细胞进行染毒后测定细胞存活率来确定最适合染毒浓度及时间。氩浓度 20 000、40 000、60 000 Bq · m<sup>-3</sup> 对细胞分别染毒 10 和 20 min。完成 1 次染毒后采用 CCK-8 法测定细胞存活率。具体方法见文献[8]。

细胞存活率 =  $(A_s - A_b) / (A_c - A_b) \times 100\%$ , 式中: A<sub>s</sub> 为试验孔, A<sub>c</sub> 为对照孔, A<sub>b</sub> 为空白孔。

通过筛选确定合适染氩浓度及时间后,细胞共染氩 4 代,每代染氩细胞分别传代至第 10 代。染氩结束后收集 R<sub>n1-1</sub>、R<sub>n1-5</sub>、R<sub>n1-10</sub>、R<sub>n2-1</sub>、R<sub>n2-5</sub>、R<sub>n2-10</sub>、R<sub>n3-1</sub>、R<sub>n3-5</sub>、R<sub>n3-10</sub>、R<sub>n4-1</sub>、R<sub>n4-5</sub>、R<sub>n4-10</sub> 细胞检测指标。

### 1.4 细胞周期分析

染氩后消化离心收集细胞,流式细胞仪对样品进行细胞周期检测。

### 1.5 细胞凋亡检测

用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞,检测细胞凋亡的具体方法见文献[9-10]。

### 1.6 总蛋白浓度测定

收集细胞,BCA 法测定蛋白浓度,具体方法见文献[11]。

### 1.7 Caspase-3 检测

① 吸取 50 μL 含 200 μg 蛋白的细胞或组织裂解上清;如体积不足 50 μL 用 Lysis Buffer 补足至 50 μL(各组均采用同样蛋白量进行测定和比较)。② 加入 50 μL 的 2×Reaction Buffer。③ 加入 5 μL Caspase-3 Substrate 并于 37 °C 避光孵育 4 h。④ 用酶标仪在 405 nm 测定其吸光度,计算  $D_{\text{染氩组}} / D_{\text{阴性对照}}$  来确定细胞凋亡中 Caspase-3 的活化程度。

### 1.8 统计学处理

各组数据均以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,运用 SPSS 17.0 分析软件进行 One-way ANOVA 分析及 SNK 检验。 $P < 0.05$  为差异显著。

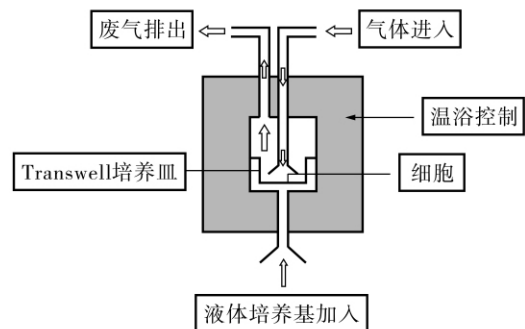


图 1 细胞染毒装置简要示意图  
Fig. 1 Schematic diagram of cell exposure device

## 2 结果与分析

### 2.1 体外染氡细胞模型的建立

细胞存活率的改变：随着染氡浓度的增加和染氡时间的延长，细胞存活率逐渐降低，各组间比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。当氡及其子体浓度达到  $60\ 000\ \text{Bq} \cdot \text{m}^{-3}$ 、时间 20 min 时，细胞已全部死亡(表 1)。因此确定染氡浓度和时间为  $40\ 000\ \text{Bq} \cdot \text{m}^{-3}$ 、10 min。

### 2.2 细胞周期的改变

与对照组相比，除 Rn4-1、Rn4-10 外，细胞 G1 期均有不同程度的缩短，S 期均有不同程度的延长，差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )，提示细胞受到辐射损伤程度大于其修复能力，细胞周期阻滞于 S 期(表 2)。

### 2.3 细胞凋亡率的改变

与对照组相比，除 Rn1-1、Rn4-5、Rn4-10 凋亡率下降，其余各代染氡细胞凋亡率均升高，差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )(表 2)。

表 1 氡及其子体对细胞增存活率的影响( $\bar{x} \pm s$ )<sup>\*</sup>

Tab. 1 Survival rate of cells after radon exposure %

染氡浓度/ $\text{Bq} \cdot \text{m}^{-3}$	10 min	20 min
0	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>
20 000	90.15 ± 1.01 <sup>a</sup>	75.41 ± 2.12 <sup>a*</sup>
40 000	71.92 ± 1.32 <sup>b</sup>	59.71 ± 0.85 <sup>b*</sup>
60 000	13.49 ± 1.21 <sup>c</sup>	0 <sup>d*</sup>

\* 不同时间、剂量，不同字母数值间表示差异显著；  
★ 与 10 min 组相比  $P < 0.05$ 。

表 2 氡体外染毒对 V79 细胞周期及凋亡的影响

Tab. 2 Effects of radon exposure on cell cycle and apoptosis

组 别	G1/%	S/%	G2/%	凋亡率/%	Caspase-3 表达相对值
C	46.25 ± 0.8	38.97 ± 0.8	14.76 ± 0.1*	6.11 ± 0.54	1.0
Rn1-1	38.48 ± 0.5*	47.16 ± 0.8*	14.36 ± 0.4*	5.49 ± 0.61*	0.86 ± 0.14
Rn1-5	36.36 ± 0.7*	44.19 ± 1.1*	19.45 ± 0.3*	9.54 ± 0.73*	1.07 ± 0.03
Rn1-10	43.54 ± 0.9*	42.07 ± 0.8*	14.58 ± 0.5*	11.36 ± 0.69*	0.94 ± 0.14
Rn2-1	43.16 ± 0.7*	39.96 ± 0.6*	16.88 ± 0.3*	12.68 ± 0.81*	0.91 ± 0.12
Rn2-5	44.74 ± 0.4*	39.76 ± 0.4*	15.51 ± 0.3*	11.44 ± 0.83*	0.99 ± 0.01
Rn2-10	43.37 ± 0.5*	40.83 ± 0.8*	15.80 ± 0.7*	8.71 ± 0.53*	0.96 ± 0.07
Rn3-1	28.15 ± 0.3*	52.93 ± 1.2*	18.92 ± 0.7*	6.67 ± 0.31*	1.55 ± 0.09*
Rn3-5	31.20 ± 0.7*	46.88 ± 0.7*	21.92 ± 0.6*	6.37 ± 0.36*	2.08 ± 0.41*
Rn3-10	29.24 ± 1.2*	48.34 ± 0.3*	22.42 ± 0.6*	8.06 ± 0.39*	1.61 ± 0.11*
Rn4-1	50.17 ± 2.1*	34.70 ± 1.9*	15.13 ± 1.5*	6.87 ± 0.41*	1.96 ± 0.22*
Rn4-5	39.27 ± 0.9*	39.99 ± 1.2*	20.74 ± 1.1*	3.51 ± 0.22*	2.48 ± 0.39*
Rn4-10	52.36 ± 1.9*	33.07 ± 1.3*	14.57 ± 1.7*	4.26 ± 0.13*	1.27 ± 0.12*

\* 与对照组相比差异显著， $P < 0.05$ 。

### 2.4 细胞 Caspase-3 蛋白表达改变

与对照组相比，Rn1-*n* 和 Rn2-*n* Caspase-3 蛋白表达无明显变化，而 Rn3-*n* 和 Rn4-*n* Caspase-3 蛋白表达明显上升(表 2)；且随着染氡次数的增加，不同染氡次数、相同代数的 Caspase-3 蛋白的表达有明显上升趋势，差异显著( $P < 0.05$ )(图 2)。

## 3 讨论

氡及其子体对 V79 细胞存活率的影响存在着一定的剂量反应关系。本试验根据细胞存活率选择合适的染氡时间及浓度，选择细胞存活率的标准为 70%~75%，这样既能保证细胞存活率较高，又能在一定程度上抑制细胞增殖，因此最后确定染氡时间为 10 min，浓度为  $40\ 000\ \text{Bq} \cdot \text{m}^{-3}$ 。

肿瘤的发生、发展与细胞增殖周期调控密切相关，而肿瘤组织发生、发展的重要原因之一是细胞异常增殖和凋亡失衡<sup>[12]</sup>。Sasaki 等<sup>[13]</sup>指出辐射损伤后 G1 期阻滞的主要作用是消除染色体损害以保持基

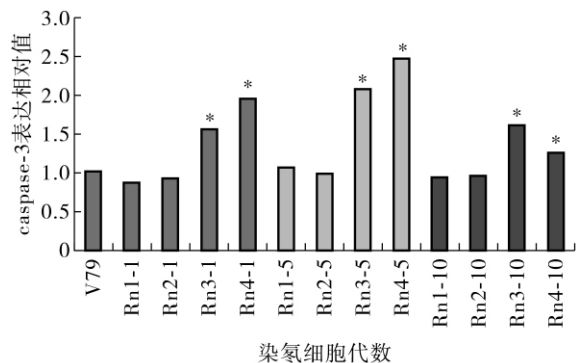


图 2 对照组及各染氡组细胞 Caspase-3 蛋白表达情况

Fig. 2 Caspase-3 expression of normal and radon exposure cells

\* 与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ )

因组的稳定性,电离辐射等因素损伤细胞时,G1/S 期检查点和 G2/M 期检查点可以通过 G1 期和(或)G2 期阻滞,使得细胞能够完成复制前和有丝分裂前的修复。而当损伤超过细胞修复能力时,阻滞去除,检查点则促进细胞的凋亡。辐照可使细胞从 S 期进入 G2 期的速度减慢,并且 S 期延长,形成所谓的“S 储积效应”<sup>[14]</sup>。本试验研究显示,氦及其子体作用于细胞后,G1 期细胞百分比明显减少,S 期明显延长,说明氦及其子体对 V79 细胞的辐射损伤超过了细胞的修复能力,细胞进入 S 期并诱发凋亡的发生。Rn4-10 细胞 G1 期延长,说明细胞正在进行复制前修复,与凋亡率降低结果一致,可能是由于染氦次数和传代次数增加,细胞开始出现恶性转化的趋势。

细胞凋亡最早的特征变化之一就是出现一系列蛋白水解酶——Caspase 酶。活化的 Caspase 酶裂解许多细胞内酶,引发凋亡细胞的特征性形态改变。这一过程的核心是 Caspase-3 的活化<sup>[15-16]</sup>。因此本试验通过对 Caspase-3 蛋白表达情况的检测探讨体外染氦 V79 细胞凋亡发生的机制,试验结果表明,Rn1-n 和 Rn2-n 细胞 Caspase-3 蛋白表达水平相对对照组无明显改变,Rn3-n 和 Rn4-n Caspase-3 蛋白表达明显上升,而凋亡率的变化与蛋白表达情况并不完全一致,Rn1-n、Rn2-n 细胞凋亡率明显上升,而在 Rn3-n、Rn4-n 细胞中,Rn4-5、Rn4-10 凋亡率出现下降,可能由于凋亡的过程机制比较复杂,多种基因蛋白参与到凋亡过程中,氦及其子体诱导的细胞凋亡率的变化是否由 Caspase-3 蛋白介导,其中的具体机制还需要进一步探讨。

综上所述,本研究表明氦体外染毒可以导致 V79 细胞发生辐射损伤,周期与凋亡发生相应改变,可为深入研究肺支气管肿瘤发生的细胞和分子机制提供细胞模型。氦及其子体导致 V79 细胞凋亡的上升与 Caspase-3 蛋白表达增加间并未出现良好的一致性;由于本研究观察的只是体外染氦的早期损伤效应,因此,还需进一步探讨体外染氦致细胞早期损伤及凋亡发生的机制。

#### 参考文献:

- [1] Parkin D M, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002 [J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.
- [2] UNSCEAR report: sources and effects of ionizing radiation [S]. Manhattan: UN, 1993: 123.
- [3] IPCS. Environment Health Criteria 211. Health Effects of Interaction between Tobacco Use Exposure to Other Agents [M]. Geneva: WHO, 1999: 57.
- [4] Darby S, Hill D, Anvinen A, et al. Radon in homes and lung cancer risk: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies [J]. BMJ, 2005, 330(7485): 223.
- [5] Schmid K, Kuwert T, DreMer H. Radon in indoor spaces [J]. Dtseh Arztebl Int, 2010, 7(11): 181-187.
- [6] 郭志英, 田梅, 苏旭. 氦及其子体生物学效应研究进展 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 2009, 29(2): 242-245.
- [7] 李瑶, 吴家霖. Caspase-3 与脑卒中 [J]. 皖南医学院学报, 2003, 22(1): 74-76.
- [8] 杜厚兵, 董建, 聂继华, 等. 香烟烟雾诱发 BEAS-2B 细胞体外恶性转化的研究 [J]. 毒理学杂志, 2011, 25(1): 17-20.
- [9] 刘学忠, 薛彬, 袁燕, 等. 乐果对大鼠肝细胞凋亡的影响及其机理研究 [J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2008, 29(4): 26-29.
- [10] 宁萍, 刘芬菊, 李冰燕. 三苯氧胺对人脑胶质瘤细胞内游离钙离子水平的影响 [J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2010, 31(1): 20-23.
- [11] 李涛, 毛亮, 谭晓秋, 等. ELISA 方法检测慢性心房颤动患者心房肌中 SK2 蛋白的表达 [J]. 重庆医学, 2012, 41(8): 756-758.
- [12] Liu J, Liu J, Mao J, et al. caspase-3-mediated cyclic stretch-induced myoblast apoptosis via a Fas/FasL-independent signaling pathway during myogenesis [J]. J Cell Biochem, 2009, 107(4): 834-844.
- [13] Sasaki T, Kitamura T. Roles of FoxO1 and Sirt1 in the central regulation of food intake [J]. Endocrine Journal, 2010, 57(11): 939-946.
- [14] Deng Xiang-qun, Cheng Jir-luo, Zhang Yun-ping, et al. Effects of caloric restriction on SIRT1 expression and apoptosis of islet beta cells in type 2 diabetic rats [J]. Acta Diabetologica, 2010, 47(1): 177-185.
- [15] 李富荣, 齐晖, 任莉莉, 等. 白细胞介素-18 对系统性红斑狼疮患者外周血淋巴细胞早期凋亡信号 Caspase-3 表达的影响 [J]. 免疫学杂志, 2005, 21(2): 161-163.
- [16] 程宏, 祝瑾, 贾筱琴. TRAIL 与 5-FU 联合诱导白血病细胞凋亡的分子机理研究 [J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2005, 26(4): 12-15.

(责任编辑 刘明寿)