·基础研究·

^{60}Coγ 射线照射对血管内皮细胞生物学作用的影响

胡舜英[1],高雅晶[2],赵晓腾[2],陈韵岱[1*],周平坤[2]
([1] 解放军总医院心血管内科,100853 北京;[2] 军事医学科学院放射与辐射研究所北京市放射生物学重点实验室,100850 北京)

【摘 要】 **目的** 观察^{60}Coγ 射线照射对血管内皮细胞生物学作用的影响。**方法** 用不同剂量^{60}Coγ 射线照射人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC),通过细胞生长曲线和克隆形成实验观察细胞增殖存活情况;流式细胞术检测照射后细胞周期的变化;中性单细胞凝胶电泳及蛋白印迹法(Western blot)观察细胞照射后 DNA 分子损伤及修复情况。**结果** ^{60}Coγ 射线照射后,HUVEC细胞生长速度及增殖率降低,降低程度与照射剂量呈正相关;HUVEC 细胞周期出现 G_2/M 期阻滞;HUVEC 细胞出现明显的 DNA 双链断裂,γH2AX 和 DNA-PKcs 表达增加。**结论** ^{60}Coγ 射线照射抑制血管内皮细胞增殖,导致 G_2/M 期阻滞,促进 DNA 断裂,相关修复蛋白表达增加。

【关键词】 γ 射线;人脐静脉血管内皮细胞;细胞增殖;细胞周期;DNA 损伤
【中图分类号】 R817.1 【文献标识码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2016.12.221

Effects of ^{60}Co γ-ray irradiation on biological behaviors in human umbilical vein endothelial cells

HU Shun-Ying[1], GAO Ya-Jing[2], ZHAO Xiao-Teng[2], CHEN Yun-Dai[1*], ZHOU Ping-Kun[2]
([1]Department of Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; [2]The Beijing Key Laboratory for Radiobiology, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

【**Abstract**】 **Objective** To determine the effect of ^{60}Co γ-ray irradiation on biological behaviors in cultured vascular endothelial cells *in vitro*. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were exposed to ^{60}Co γ-ray irradiation at different doses. After irradiation, the proliferation of HUVECs was evaluated by cell growth curve and colony formation assay. Cell cycle was detected by flow cytometry. DNA damage and repair were analyzed by neutral single-cell gel electrophoresis, and the expression of related proteins was detected by Western blotting. **Results** After γ-ray irradiation, the proliferation of HUVECs was significantly inhibited in a dose-dependent manner. The cells were arrested at G_2/M stage after irradiation exposure. Obvious DNA double-strand breaks and enhanced expression of γH2AX and DNA-PKcs were observed in the HUVECs after irradiation. **Conclusion** ^{60}Co γ-ray irradiation inhibits the proliferation of HUVECs, induces the cells arrested at G_2/M stage, promotes DNA break, and enhances the expression of repair-related proteins in endothelial cells.

【**Key words**】 gamma rays; human umbilical vein endothelial cells; cell proliferation; cell cycle; DNA injury
This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81102079) *and China Postdoctoral Science Foundation* (201003776).
Corresponding author: *CHEN Yun-Dai*, *E-mail*: *2276258021@qq.com*

放射性心脏病与心脏临近部位肿瘤如淋巴瘤、乳腺癌、食管癌、胸腺瘤及肺癌等的放射治疗有关,是肿瘤患者远期预后的重要影响因素,目前尚无有效防治措施[1]。血管内皮细胞是覆盖于血管内膜的单层细胞,若其出现物化损伤或功能紊乱可导致多种疾病的发生[2,3]。血管内皮细胞损伤在辐射导致心血管疾病的发生机制中起着关键作用,血管内皮细胞是放射性心脏病重要的射线损伤靶细胞[4],因此了解血管内皮细胞的放射损伤及修复机制对于防治放射性心脏病的发生发展有着重要的临床意义。DNA 是生物细胞中的遗传物质,维持细胞正常结构和功能对细胞增殖、细胞周期起着至关重要的作用,然而它也是生物细胞中易受辐射损伤的敏感分子,放射可造成细胞或组织遗传物质的结构损伤,细胞若不能及时正确修复这些损伤,就可造成基因组序列的缺失和基因突变,甚至出现细胞死亡、恶变

收稿日期:2016-06-27;**修回日期**:2016-08-05
基金项目:国家自然科学基金项目(81102079);中国博士后科学基金项目(201003776)
通信作者:陈韵岱,E-mail:2276258021@qq.com

等生物学后果。本研究利用^{60}Coγ 射线对人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVEC)进行照射,建立 HUVEC 辐射损伤模型,观察 γ 射线照射对 HUVEC 增值及细胞周期的影响,着重研究 HUVEC 受照射后 DNA 分子的损伤及修复机制,明确了 DNA 修复相关蛋白 γH2AX 和 DNA 蛋白激酶(catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase, DNA-PKcs)在HUVEC受照射后的表达变化,为进一步明确^{60}Coγ 射线照射导致HUVEC DNA 损伤及修复机制奠定基础,从而为放射性心脏病发病机制研究及防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

HUVEC 购自美国模式菌种收藏中心(American type culture collection,ATCC),高糖达尔伯克氏必需基本培养基(dulbeccos minimum essential medium, DMEM;Sigma 公司,美国)、新生胎牛血清(fetal bovine serum, FBS;Hyclone 公司,美国),胰蛋白酶(Amresco 公司,美国)。其他试剂均为北京化学试剂公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HUVEC 在含 10% FBS 的高糖 DMEM 中、37℃、5% CO_2 培养箱培养。

1.2.2 生长曲线与克隆形成实验 取生长状态良好的对数期细胞,胰蛋白酶消化后制成细胞悬液进行 ^{60}Coγ 射线照射,由军事医学科学院放射与辐射医学研究所 ^{60}Coγ 射线放射源进行照射,照射剂量分别为 0,1,2,4,6 Gy。照射后立即以 3×10^3 个/ml 浓度接种于 24 孔板进行常规培养,每个照射剂量 3 个平行孔,接种后第 2 天起取各剂量孔计数,连续 6 d,绘制细胞生长曲线图。另外,照射后的细胞以递增密度梯度接种于 60 mm 培养皿中连续培养 12 d,期间更换培养基 1 或 2 次。之后以预冷的 75% 乙醇固定细胞 30 min, Gemsia 染料染色 30 min,显微镜下计数每个培养皿 >50 个细胞的克隆数。计算克隆形成率:各皿克隆数/接种细胞数 ×100%。

1.2.3 流式细胞术检测细胞周期 对数期细胞给予 4 Gy 照射后,于 1,2,4,8,12,24 h 后收集细胞,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer solution, PBS)洗两遍后 75% 预冷乙醇 -20℃ 固定 >24 h,弃去固定液后用 0.5 ml PBS 重悬细胞,加入终浓度 50 mg/L 的核糖核酸酶(ribonuclease, RNase)37℃ 温浴 30 min,加碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色,上流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.4 中性单细胞凝胶电泳(彗星电泳) γ 射线照射细胞后,分别于照射后 15 min,1,2,4 h 收集细胞,以 PBS 重悬细胞至浓度为 5×10^5 个/ml。取 80 μl 1% 正常熔点的已融琼脂糖胶(PBS 配制)滴在磨砂玻片上,盖上盖玻片 4℃、15 min 凝固后取下盖玻片滴加含 10 μl 细胞悬液的 60 μl、0.65% 低熔点琼脂糖胶(PBS 配制),盖上盖玻片 4℃、15 min 凝固后再滴加 80 μl、0.65% 低熔点琼脂糖胶凝固后,放入预冷的中性细胞裂解液[氯化钠(NaCl) 2 mol/L,乙二胺四乙酸二钠(edetate disodium, Na_2EDTA) 30 mmol/L,三羟甲基氨基甲烷(trihydroxymethyl aminomethane, Tris) 10 mmol/L,十二烷基肌氨酸钠 1%,聚乙二醇辛基苯基醚(octyl phenoxy poly ethoxy, Triton-X100) 1%,二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO) 10%, pH 8.2 ~ 8.5]4℃,2 h 裂解细胞,用 0.5% Tris-硼酸电泳缓冲液(tris-boric acid-EDTA, TBE), pH 8.2 ~ 8.5, 4℃,浸没洗涤 2 ~ 3 次,每次 1 h,以 20 V、20 mA 电流进行 8 min 电泳,PI (2 mg/L)染色 15 min,荧光显微镜观察拍照,casp 软件分析细胞拖尾变化。

1.2.5 蛋白质印迹法(Western blot) 照射后收集不同时间点细胞,蛋白裂解液提取细胞总蛋白,用二喹啉甲酸法(bicinchoninic acid, BCA)测定蛋白浓度,经十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)后转移蛋白至硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 1∶1000 稀释度一抗孵育 2 ~ 3 h(室温)或过夜(4℃), TBST(tris buffer solution Tween)缓冲液洗涤后, 1∶2000 ~ 1∶4000 稀释度的辣根过氧化物酶标记二抗,室温孵育 45 min 后暗室压片显影。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 统计软件对实验数据进行统计分析,计量资料中呈正态分布者用均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用方差分析及 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ^{60}Coγ 射线照射对 HUVEC 增殖的影响

HUVEC 经 0,1,2,4,6 Gy 剂量照射后,连续观察 6 d,结果表明随着照射剂量增加,细胞生长速度锐减(图 1A)。相比未照射细胞,照射后细胞克隆形成数量和集落大小均随照射剂量增加而明显减小,差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$;图 1B)。

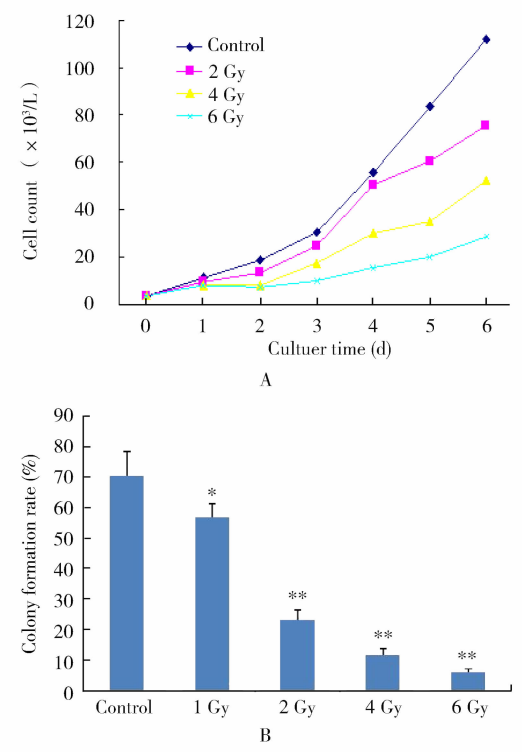


图 1 γ 射线照射对细胞增殖的影响

Figure 1 Effect of gamma ray irradiation on proliferation of HUVEC

HUVEC: human umbilical vein endothelial cells; A: cell growth curve under different ray doses; B: cell clone formation rate at different ray doses. Compared with control, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

2.2 ^{60}Coγ 射线导致 HUVEC 细胞周期阻滞

采用 4 Gy γ 射线照射 HUVEC 细胞，分别在照射后 4，8，12，24 h 观察不同细胞周期的细胞比例，结果显示，相比未照射细胞，照射后 24 h 内，G_2/M 期细胞比例逐渐升高，差异有统计学意义（$P<0.01$；图 2）。

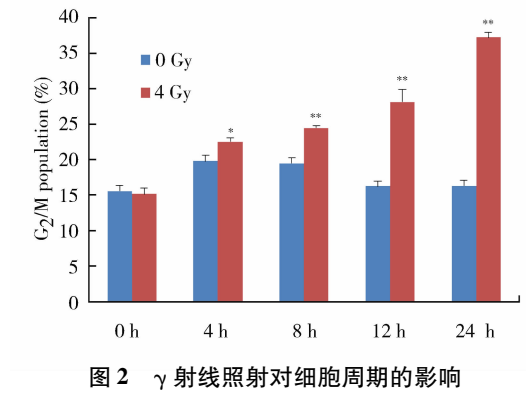


图 2 γ 射线照射对细胞周期的影响

Figure 2 Effect of gamma ray irradiation on cell cycle of HUVEC

HUVEC: human umbilical vein endothelial cells. Compared with 0 Gy group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

2.3 ^{60}Coγ 射线致细胞 DNA 双链断裂损伤与修复情况

中性单细胞凝胶电泳（彗星电泳）结果显示，^{60}Coγ射线 4 Gy 照射后，彗星尾矩延长，在照射后 15 min 达到峰值，表明血管内皮细胞经照射后出现明显的 DNA 双链断裂损伤，随着细胞开始修复，彗星尾部长度达到峰值后开始减小，DNA 进行修复（图 3）。4 Gy 照射后，H2AX 磷酸化在 15 min 处升高，1 h 时达到峰值，随后下降，在 8 h 再达到一个较小的峰值（图 4）。而 DNA PKcs2056 位点的磷酸化 15 min 明显升高，4 h 后缓慢的去磷酸化，呈先升高后降低的趋势（图 5）。

3 讨 论

乳腺癌、何杰金氏病以及其他胸部肿瘤的综合治疗方案中，放射治疗显著改善了患者疾病相关的

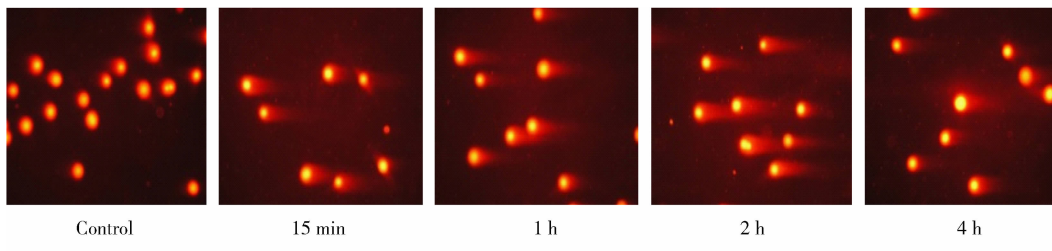


图 3 DNA 双链断裂彗星电泳图

Figure 3 Comet images of DNA DSB detected by neutral single cell gel electrophoresis (0 – 4 h post-irradiation)

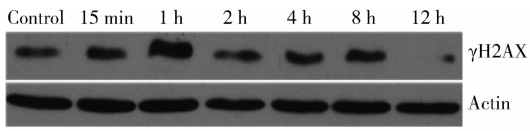


图 4 γ 射线照射对 γH2AX 表达的影响

Figure 4 Effect of gamma ray irradiation on γH2AX expression of HUVEC

HUVEC: human umbilical vein endothelial cells

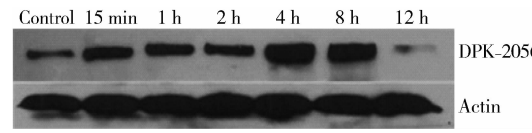


图 5 γ 射线照射对 DNA PKcs 2056 位点磷酸化的影响

Figure 5 Effect of gamma ray irradiation on phosphorylation of DNA PKcs of HUVEC

HUVEC: human umbilical vein endothelial cells

预后，然而，放射治疗可导致心脏并发症发生，包括冠状动脉疾病、心力衰竭、瓣膜病、心包疾病、传导异常以及心源性猝死。放射治疗所致的心血管并发症大多出现在放疗后 10 年甚至更长时间，已成为患者非肿瘤本身死亡的主要原因[5]。放射性心脏病机制研究中，研究人员认为毛细血管内皮细胞是射线损伤的靶细胞，心肌细胞的变性及心肌纤维化是继发于内皮细胞受损后的心脏微循环障碍所致[4,6]。DNA 是生物细胞中易受辐射损伤的敏感分子，DNA 复制在细胞增殖、细胞周期进展中起着关键作用，维持正常结构和功能是细胞正常生长和代谢的基础。

本研究结果表明，^{60}Coγ 射线照射对血管内皮细胞增殖有明显的抑制作用，并且抑制率与放射剂量呈正相关。而早期研究报道，低剂量射线刺激下，细胞内血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）及其受体 KDR 表达明显增加，从而促进细胞增殖[7]。张晓启等[8]推测细胞来源不同，其对辐射的耐受性也会有所差异，并且不同周期时相的细胞对辐射的敏感性也不同，一般来说，M 期细胞的耐受性最低，G_2 期细胞次之。放射引起 DNA 损伤后导致其在细胞周期监测点机制的纺锤体检查点和 DNA 结构检查点无法通过，从而滞留在 M 期[9]。研究结果显示，细胞在 G_2/M 期的阻滞随着照射剂量增大而延长，表明细胞损伤修复的难易程度随剂量增加而提高。而低剂量照射后，细胞越过阻滞后出现第二次较低峰值，可能是因为 G_2/M 期阻滞形成类似于同步化功能，大量细胞共同进入同一时相所致。细胞增殖实验结合流式细胞术检测细胞周期与凋亡实验推断，放射并不直接杀死所有细胞，而是造成 DNA 损伤后，大部分细胞经过数次分裂增殖或长时间细胞周期阻滞而诱发凋亡。

DNA 双链断裂损伤是放射作用于细胞基因组的严重损伤，双链断裂得不到修复会直接诱导细胞凋亡和坏死。中性单细胞凝胶电泳是一种能够比较直观检测 DNA 双链损伤的实验手段，通过对单细胞形成的彗星形态的 DNA 片段量化分析判断其 DNA 损伤程度[10]，从而更直观地验证 DNA 双链的损伤。

H2AX 是组蛋白的一种，存在于所有真核细胞，与其他组蛋白共同作用结合染色质形成核小体。其羧基端的 139 位为丝氨酸残基组成的丝氨酸－谷氨酰胺－谷氨酸结构域，该丝氨酸残基在 DNA 双链断裂损伤发生时可迅速被磷脂酰肌醇－3－激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）、关卡基因蛋白（ataxia telangiectasia mutated，ATM）、Rad-3 相关蛋白（Rad-3 related protein，ATR）、DNA 依赖的蛋白激酶（DNA-dependent protein kinase，DNA-PK）复合体等多种 DNA 修复相关蛋白磷酸化成 γH2AX，γH2AX 在 DNA 双链断裂损伤位点形成焦点复合物，并进一步募集下游相关修复蛋白进行 DNA 修复[11]。DNA-PK 复合物包括 DNA PKcs 和 Ku70/Ku80 亚基，属于丝氨酸/苏氨酸激酶[12]，是 DNA 双链损伤的非同源链接修复的重要分子，在修复过程中募集其他修复蛋白共同参与[13,14]。并且 DNA-PKcs 在 DNA 损伤相关的 H2AX 磷酸化反应中发挥着主导作用[15]。本研究结果显示，γH2AX 在照射后迅速形成焦点，随着损伤的修复逐渐降低，但在 8 h 前后再次出现一个较低的峰值，可能与大部分细胞修复完成后从 G_2/M期阻滞中解放出来后有关。

综上，血管内皮细胞损伤是放射性心脏病的重要发病机制，本研究证实在 γ 射线照射的情况下，血管内皮细胞存活率降低，G_2/M 期阻滞明显，DNA 双链损伤加重，同时 DNA 损伤修复相关蛋白 γH2AX 和 DNA-PKcs表达增加。DNA 损伤在机体放射损伤中起着至关重要的作用，该研究首次探讨了 DNA 损伤修复相关蛋白 γH2AX 和 DNA-PKcs 在血管内皮细胞放射损伤中的表达变化，上述蛋白分子能否在放射性心脏病的防治中发挥作用，仍有待于进一步研究。

【参考文献】

[1] Hu S, Chen Y, Li L, *et al*. Effects of adenovirus-mediated delivery of the human hepatocyte growth factor gene in experimental radiation-induced heart disease[J]. Intern J Radial Oncol Biol Phys, 2009, 75(5): 1537－1544.

[2] Loomans CJ, De Koning EJ, Staal FJ, *et al*. Endothelial progenitor cell dysfunction in type 1 diabetes: another consequence of oxidative stress[J]. Antioxid Redox Signal, 2005, 7(11－12): 1468－1475.

[3] Reinhart K, Bayer O, Brunkhorst F, *et al*. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis[J]. Crit Care Med, 2002, 30(5 Suppl): S302－S312.

[4] Boerma M, Hauer-Jensen M. Preclinical research into basic mechanisms of radiation-induced heart disease[J]. Cardiol Res Pract, 2010, 2011, pii: 858262.

[5] Jaworski C, Mariani JA, Wheeler G, *et al*. Cardiac complications of thoracic irradiation[J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 61(23): 2319－2328.

[6] Hu SY, Su C, Ma L, *et al*. Protecting effects of local heart irradiation with γ-rays on cardiac function *ex vivo* in rats[J]. Med J Chin PLM, 2007, 32(6): 571－573.[胡舜英, 苏 畅, 马 兰, 等. ^{60}Coγ 射线心脏局部照射对大鼠离体心脏功能的影响[J]. 解放军医学杂志, 2007, 32(6): 571－573.]

[7] Belkacémi Y, Piel G, Rat P, *et al*. Ionizing radiation-induced death in bovine lens epithelial cells: mechanisms and influence of irradiation dose rate[J]. Int J Cancer, 2000, 90(3): 138－144.

[8] Zhang XQ, Liu XS, Liu S, *et al*. Effect of vascular endothelial growth factor on irradiated primary human umbilical vein endothelial cells[J]. Chin J Radiol Med Prot, 2002, 22(3): 178－180.[张晓启, 刘旭盛,

刘 爽, 等. 血管内皮细胞生长因子对内皮细胞放射损伤的保护作用[J]. 中华放射医学与防护学杂志, 2002, 22(3): 178-180.]

[9] Mikhailov A, Cole RW, Rieder CL. DNA damage during mitosis in human cells delays the metaphase/anaphase transition *via* the spindle-assembly checkpoint[J]. Curr Biol, 2002, 12(21): 1797-1806.

[10] Klaude M, Eriksson S, Nygren J, *et al*. The comet assay: mechanisms and technical considerations[J]. Mutat Res, 1996, 363(2): 89-96.

[11] Riches LC, Lynch AM, Gooderham NJ. Early events in the mammalian response to DNA double-strand breaks[J]. Mutagenesis, 2008, 23(5): 331-339.

[12] Park SJ, Oh EJ, Yoo MA, *et al*. Involvement of DNA-dependent protein kinase in regulation of stress-induced JNK activation[J]. DNA Cell Biol, 2001, 20(10): 637-645.

[13] Yan YQ, Zhou PK. Mechanism of DNA non-homologous end joining and its biological implications[J]. J Med Mol Biol, 2001, 3(1): 69-72.[严雨倩, 周平坤. 哺乳动物细胞 DNA 非同源末端连接及其生物学意义[J]. 医学分子生物学杂志, 2001, 3(1): 69-72.]

[14] Falck J, Coates J, Jackson SP. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage[J]. Nature, 2005, 434(7033): 605-611.

[15] An J, Huang YC, Xu QZ, *et al*. DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression[J]. BMC Mol Biol, 2010, 11: 18.

(编辑: 王彩霞)

·消 息·

《中华老年多器官疾病杂志》“临床病理讨论”栏目征稿

临床病理讨论(Clinicopathological Conference,CPC)是临床实践中的一个重要环节,是多个学科合作对患者进行个体化诊治的一种形式,尤其对于一些疑难和罕见病例更为重要。综合患者的临床表现、实验室检查、影像学检查和病理检查等各项结果,一方面可以明确疾病的诊断并制定治疗方案,使患者受益,另一方面亦有利于为临床医师提供更好的经验和更开阔的思路,提高医师的诊疗能力。一篇好的临床病理讨论,往往是教科书上找不到的活教材,也是其他文体难以取代的好形式。

“临床病理讨论”一直以来都是本刊的一个特色栏目,深受广大读者喜爱。所刊登的一般多为回顾性的病例讨论与总结,旨在总结经验、吸纳教训和传播知识。在工作实践中,我们根据广大读者和作者的建议,对临床病理讨论文章的格式进行了调整。(1)作者在文题下署名(而非仅在文末注明由何人整理),**作者拥有本文的著作权**。(2)文章正文为中文,正文前有言简意赅的中英文摘要。**论文性质等同于本刊“论著”**。(3)所选病例可以是疑难、罕见病例,也可以是诊断明确、但病情危重或有诸多并发症、治疗上甚为棘手的病例,亦可为其他对临床实践有指导或提示意义的病例。

本刊热忱欢迎广大专家学者为本刊撰写或推荐相关稿件。

具体格式请参考本刊近期发表的“临床病理讨论”文章。

地址: 100853 北京市复兴路 28 号,《中华老年多器官疾病杂志》编辑部

电话: 010-66936756

网址: www.mode301.cn

E-mail: zhlndqg@mode301.cn