论著

文章编号:1000-5404(2005)18-1826-04

视黄酸对 pRARE4-IFNα 表达载体转染 HL-60 细胞放射敏感性的影响

张乾勇[1],糜漫天[1],程天民[2] (第三军医大学军事预防医学院:[1]营养卫生学教研室,[2]防原医学教研室、全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨视黄酸(RA)及其诱导的外源性α-干扰素(IFNα)对肿瘤细胞放射敏感性的影响及其可能机制。**方法** 含视黄酸反应元件(RARE)的IFNα表达载体(pRARE4-IFNα),转染肿瘤细胞并证实外源性IFNα基因的表达受RA的诱导后,对细胞进行RA和辐射联合处理,分析细胞增殖功能、细胞DNA片段化百分率,caspase-3蛋白表达与活性,以及caspase-3特异性抑制剂(DEVD-CHO)对RA和/或辐射的效应的拮抗作用。**结果** HL-60和HL-60$^{IFN\alpha}$细胞经2×10^{-7}mol/L RA和/或4 Gy ^{60}Co γ射线电离辐射处理后,细胞增殖能力减弱,DNA片段化百分率增加,caspase-3蛋白表达上调,活性升高,RA和辐射联合处理作用更明显,DEVD-CHO可拮抗RA引起的caspase-3活性升高,并部分削弱RA引起的细胞增殖抑制和凋亡。**结论** RA及其诱导的外源性IFNα可提高肿瘤细胞放射敏感性,caspase-3的表达和活性升高在RA和辐射诱导细胞凋亡过程中可能具有重要作用。

关键词: 视黄酸;干扰素;辐射敏感性;半胱氨酸蛋白酶

中图法分类号: R394.2;R73-36;R733.71 **文献标识码:** A

Effects of retinoic acid on the radiosensitization in HL-60 cells transfected with IFNα expression vector containing retinoic acid response element

ZHANG Qian-yong[1], MI Man-tian[1], CHENG Tian-min[2] ([1]Department of Nutrition and Food Hygiene, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of retinoic acid on the radiation sensitivity in HL-60 cells transfected with the IFNα expression vector containing retinoic acid response element and its possible mechanism. **Methods** HL-60 cells were transfected with pRARE4-IFNα, then treated by all-trans retinoic acid at the dose of 2×10^{-7}mol/L and/or irradiation under 4 Gy. The cellular proliferation capacity was observed with MTT assay, the cell apoptosis was measured with DNA fragmentation rate, the protein expression of caspase-3 was analyzed with Western blotting. Meanwhile, the activity of caspase-3 was examined. **Results** After HL-60 and HL-60$^{IFN\alpha}$ cells were treated by RA and/or radiation, the cellular proliferation capacity was decreased, the DNA fragmentation rate was increased, the protein expression and activity of caspase-3 were up-regulated. These changes were more apparent in transfected cells than non-transfected cells, and more significant in cells treated by radiation and RA than that treated by radiation or RA alone. The special caspase-3 inhibitor, DEVD-CHO could inhibit the activity of caspase-3 and impair the growth inhibition and apoptosis induced by RA and/or radiation. **Conclusion** Our study demonstrated that DNA fragmentation and growth inhibition of transfected and non-transfected cells induced by radiation could be enhanced with RA. The up-regulated expression and activity of caspase-3 may play a partial role in cell apoptosis induced by RA and radiation.

Key words: retinoic acid; interferon; caspase; radiosensitization

视黄酸(retinoic acid, RA)和α-干扰素(IFNα)对某些肿瘤细胞的增殖抑制、诱导分化和凋亡都具有协同作用,临床上联合应用RA和IFNα治疗宫颈癌、肾癌、头颈部鳞状上皮细胞癌也取得了一定的疗效,而放疗是上述肿瘤晚期的传统治疗策略的主要组成部分。单独应用RA或IFNα都能增强某些肿瘤细胞对电离

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770303)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39770303)

作者简介: 张乾勇(1969-),男,四川省南充市人,博士,副教授,主要从事营养与肿瘤方面的研究。电话:(023)68753585, E-mail: zqianyong@yahoo.com

收稿日期: 2004-11-08;**修回日期:** 2005-01-01

辐射的敏感性,联合应用时对提高肿瘤细胞的辐射敏感性的作用更明显[1,2]。我们构建了一种带有 4 个视黄酸反应元件(RARE)的 IFNα 真核表达载体(pRARE4-IFNα),其转染 HL-60 细胞后,IFNα 的表达受 RA 的诱导。2×10^{-7} mol/L RA 处理 24 h,每 10^6 个细胞 IFNα 分泌量可达 200 ng/ml 左右[3]。本研究探讨 RA 对 pRARE4-IFNα 转染肿瘤细胞的辐射敏感性的影响及其可能分子机制。

1　材料与方法

1.1　细胞培养与处理

pRARE4-IFNα 表达载体的构建及转染见文献[3],pRARE4-IFNα 转染的 HL-60 细胞命名为 HL-$60^{IFN\alpha}$,转染空载体的 HL-60 细胞命名为 HL-60^{neo}。细胞在含 100 ml/L 小牛血清的 PRMI1640 培养液中,37 ℃,5% CO_2,常规培养传代。全反式视黄酸(ATRA,Sigma 产品)溶于二甲亚砜,配成 10^{-3} mol/L,储存于 -20 ℃,处理细胞终浓度为 2×10^{-7} mol/L。^{60}Co γ 射线电离辐射剂量为 4 Gy。实验分为对照组、ATRA 处理组、辐射处理组、ATRA + 辐射联合处理组。

1.2　细胞增殖功能检测(MTT 实验)

以 1×10^5/ml 细胞密度接种于 96 孔培养板中,每孔 200 μl,RA 处理和/或 4 Gy 辐射,培养 2 d,收获细胞前 4 h,每孔加入 15 μl MTT(5 mg/ml),37 ℃,5% CO_2,饱和湿度条件下培养 4 h,去掉培养液,加入 200 μl 异丙醇、二甲亚砜混合液(1∶1,V/V)。室温 30 min,用酶标仪在 492 nm 处测 D 值。

1.3　DNA 片段化百分率检测

参照 Lenardo 等[4]的方法,用低渗溶解缓冲液(10 mmol/L Tris · Cl, 1 mmol/L EDTA, 0.2% Triton X-100, pH 7.5)溶破细胞,上清和沉淀中分别加入 1 ml 12.5% 三氯醋酸,4 ℃过夜,离心弃上清,加 80 μl 5% 三氯醋酸,90 ℃,15 min,再加入 160 μl 新鲜配制的二苯胺试剂(1.5 g 二苯胺、1.5 ml 浓硫酸、0.5 ml 乙醛溶于 98 ml 冰醋酸),37 ℃水浴过夜,200 μl 转移至 96 孔培养板中,用酶标仪在 595 nm 处检测 D 值,计算 DNA 片段化百分率。

1.4　Caspase-3 活性分析

$(1\sim5)\times10^6$ 细胞,用冰冷的 0.01 mol/L PBS 洗 2 次,加胞浆总蛋白提取缓冲液(50 mmol/L PIPES-NaOH, pH 7.0, 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L EGTA, 2 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 1 μg/ml Aprotinin, 1 μg/ml Leupeptin, 0.5 g/L Digitonin, 10 ml/L NP-40)200 μl。37 ℃水浴 2 h 后,-20 ℃反复冻融 3 次。离心收集上清液,测定蛋白质含量。取 50 μg 胞浆蛋白质,用稀释缓冲液(100 mmol/L Hepes-KOH, pH 7.5, 20 mmol/L DTT, 1 g/L Ovalbumin, 100 g/L 蔗糖)稀释至 1.5 ml,加 50 μl 1 mmol/L caspase-3 特异性底物 DEVD-AMC(CALBIOCHEM 产品),混匀,37 ℃水浴 12 h,用 930 荧光光度计在狭缝 2、激发光 360 nm、发射光 450 nm 条件下,测荧光值。

1.5　免疫印迹分析 caspase-3 蛋白表达水平

取 20 μg 蛋白质,用提取缓冲液稀释至 20 μl,加 20 μl 2 × SDS 凝胶加样缓冲液,煮沸 5 min,10% SDS-PAGE,电转移转膜,10 g/L BSA 封闭,加鼠抗 CPP-32 单克隆抗体(CALBIOCHEM 产品,1∶800 稀释),37 ℃孵育 1 h,再与通用型 S-P 试剂盒(生物素标记二抗和链菌素亲生物蛋白—过氧化物酶复合物,Zymed 公司产品)反应,DAB 显色。

1.6　DEVD-CHO 对 RA 诱导细胞凋亡的拮抗作用

DEVD-CHO(CALBIOCHEM 产品)是 caspase-3 特异性抑制剂,加 5 nmol/L DEVD-CHO 于细胞培养液中,观察 DEVD-CHO 对 RA 引起细胞的 caspase-3 活性升高、细胞增殖抑制和细胞凋亡的拮抗作用。

1.7　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 进行方差分析。

2　结果

2.1　辐射和 RA 对细胞增殖功能的影响

HL-60 细胞对辐射比较敏感,经 2 Gy 左右照射后细胞增殖减慢,传代数次后细胞增殖能力基本恢复;8 Gy 左右照射就能诱导明显的细胞凋亡,传代 2 ~ 3 次后,细胞逐渐失去生长活力并逐渐死亡。倒置显微镜下观察细胞形态特征:HL-60 细胞经 8 Gy 照射后,有的细胞出现核皱缩,有的细胞肿胀并裂解为细胞碎片。MTT 实验结果显示辐射联合 RA 处理细胞的 D(492)值明显低于单纯辐射或单纯 RA 处理组,其中以辐射联合 RA 处理的 pRARE4-IFNα 表达载体转染细胞组 D(492)值最低(表 1)。

表 1　辐射和 RA 对细胞增殖功能的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab 1　Effect of ATRA and/or radiation on the proliferation capacity of cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Group	0 Gy	4 Gy	4 Gy + DEVD-CHO
HL-60	0.851 ± 0.094	0.520 ± 0.037[b]	0.786 ± 0.067[c]
HL-$60^{IFN\alpha}$	0.831 ± 0.056	0.502 ± 0.013[b]	0.765 ± 0.053[c]
HL-60 + RA	0.564 ± 0.034[a]	0.403 ± 0.024[ab]	0.687 ± 0.041[c]
HL-$60^{IFN\alpha}$ + RA	0.486 ± 0.031[ad]	0.341 ± 0.021[abd]	0.716 ± 0.075[c]
F	135.054	44.368	3.019
P	0	0	0.094

a: $P<0.05$, *vs* HL-60 and IL-60 IFNα; b: $P<0.01$, *vs* 0 Gy; c: $P<0.01$, *vs* 4 Gy; d: $P<0.05$, *vs* HL-60 + RA

2.2　辐射和 RA 对 pRARE4-IFNα 转染细胞凋亡的影响

DNA 片段化百分率分析表明,RA 单独处理 2 d 或 4 Gy 辐射后 2 d 细胞 DNA 片段化百分率明显升高,RA 和辐射联合处理组 DNA 片段化百分率升高更明显(图 1)。

2.3　辐射和 RA 对 caspase-3 蛋白表达的影响

RA 和辐射单独处理均能上调 HL-60 细胞 caspase-3 蛋白的表达,但是,辐射和 RA 联合处理组比辐射单独处理组 caspase-3 蛋白表达水平高(图 2)。

2.4　辐射和 RA 对 caspase-3 活性的影响

以 Ac-DEVD-AMC 为底物分析 caspase-3 活性,结果表明,RA 处理 1 ~ 2 d 的 HL-60、HL-$60^{IFN\alpha}$ 细胞 caspase-3 活性明显升高($P<0.01$),4 Gy 辐射也能上调 HL-60、HL-$60^{IFN\alpha}$ 细胞 caspase-3 活性($P<0.01$),而经 RA 和辐射联合处理的 HL-60 和 HL-$60^{IFN\alpha}$ 细胞 caspase-3 活性增高最显著,比辐射或 RA 单独处理组高($P<0.01$),其中 RA 和辐射联合处理 HL-$60^{IFN\alpha}$ 细胞 caspase-3 的活性又比联合处理 HL-60 细胞高($P<0.01$)(表 2)。

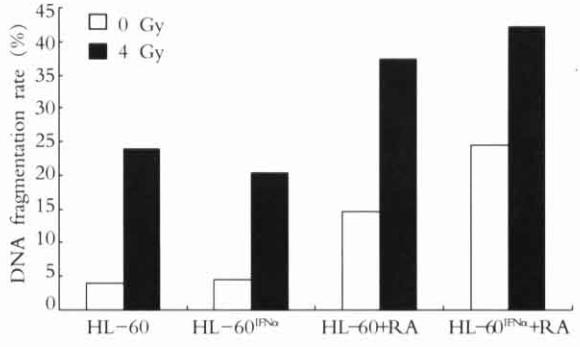
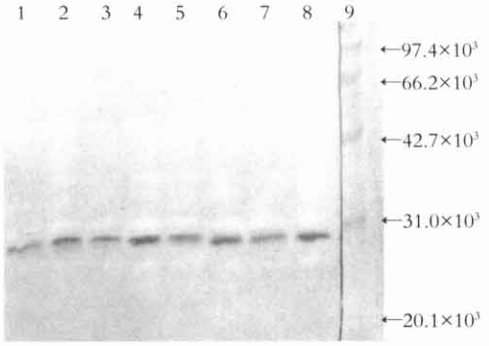


图1 RA 和辐射处理细胞 DNA 片段化百分率分析

Fig 1 Influence of RA and/or radiation on DNA fragmentation rate

2.5 Caspase-3 特异性抑制剂对辐射诱导细胞凋亡的抑制作用

在辐射和/或 RA 处理细胞的同时加入 5 nmol/L DEVD-CHO，可抑制辐射及 RA 引起的 caspase-3 的活性上升(表2)，部分拮抗辐射及 RA 的细胞增殖抑制作用(表1)。



1：HL-60；2：HL-60 + RA；3：HL-60$^{IFN\alpha}$；4：HL-60$^{IFN\alpha}$ + RA；5：HL-60 + radiation；6：HL-60 + RA + radiation；7：HL-60$^{IFN\alpha}$ + radiation；8：HL-60$^{IFN\alpha}$ + RA + radiation；9：Marker

图2 RA 和辐射对 caspase-3 蛋白表达的影响

Fig 2 Effect of RA and radiation on the protein expression of caspase-3 in HL-60 cells transfected with pRARE4-IFNα

表2 RA 和辐射对 caspase-3 活性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Effect of RA and radiation on the activity of caspase-3 in cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

Group	0 Gy/1 d	0 Gy/2 d	0 Gy/2d/DEVD-CHO	4 Gy/1 d	4 Gy/2 d	4 Gy/2 d/DEVD-CHO
HL-60	11.7 ± 0.3	11.5 ± 0.2	9.2 ± 0.2	61.2 ± 2.8^{c}	61.5 ± 1.2^{c}	17.5 ± 0.1
HL-60 $^{IFN\alpha}$	12.2 ± 0.5	11.2 ± 0.3	12.5 ± 0.4	62.3 ± 2.6^{c}	58.7 ± 0.7^{c}	17.0 ± 0.1
HL-60 + RA	52.3 ± 1.2^{a}	46.7 ± 0.8^{a}	15.8 ± 0.7	77.0 ± 1.8^{ac}	70.3 ± 1.5^{ac}	17.2 ± 0.3
HL-60 $^{IFN\alpha}$ + RA	64.5 ± 2.1^{ab}	57.3 ± 1.0^{ab}	16.7 ± 0.6	87.7 ± 1.3^{abc}	85.3 ± 2.9^{abc}	17.7 ± 0.2

a：$P<0.01$，*vs* HL-60 group；b：$P<0.05$，*vs* HL-60 + RA group；c：$P<0.01$，*vs* groups without radiation

3 讨论

RA 和 IFNα 对某些肿瘤细胞的增殖抑制、诱导分化和凋亡都具有协同作用，临床上联合应用 RA 和 IFNα 治疗宫颈癌、肾癌、头颈部鳞状上皮细胞癌也取得了一定的疗效，而放疗是上述肿瘤晚期的传统治疗策略的主要组成部分，并有明显的疗效。单独应用 RA 或 IFNα 都能增强某些肿瘤细胞对电离辐射的敏感性，联合应用时对提高肿瘤细胞的辐射敏感性的作用更明显[1,2]，另外，在体内应用时，RA 和 IFN 还对辐射引起的机体损伤具有保护效应[5,6]。有报道 RA 和 IFN 可保护放射对小鼠肠上皮细胞的损伤[5]，干扰素还可以增加射线对小鼠、兔、猴的辐射致死剂量，具有抗放射效应[6]。上述研究表明 RA 和 IFN 具有双重调节作用，对肿瘤细胞具有增强辐射的细胞毒作用，而在体内对正常组织细胞具有抗辐射损伤作用。MTT 实验和 DNA 片段化百分率检测结果表明，电离辐射联合 RA 处理对细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用比辐射或 RA 单独处理强。说明 RA 可提高辐射对 HL-60 细胞的细胞毒作用，RA 及其诱导的外源性 IFNα 基因产物联合提高肿瘤细胞对辐射的敏感性的作用更明显。提示 RA、IFN 联合放疗治疗某些肿瘤是可行的，但是其分子机制仍不十分清楚。

辐射诱导细胞凋亡的调控网络极其复杂，主要是通过下面两条信号转导通路：依赖于 p53 和依赖于死亡受体的信号转导通路[7,8]。不管哪条途径，最终都要通过 caspase 的激活而发挥凋亡效应。利用 DNA 微阵列技术研究表明，对辐射诱导细胞凋亡有抗性的细胞和辐射敏感性细胞在辐射前后基因表达模式不同，辐射敏感性细胞辐射后启动线粒体释放凋亡因子并激发 caspase 级联通路，而辐射抗性细胞在辐射后下调节这一通路[9]。辐射上调某些 caspase 的表达或/和活性，辐射引起 caspase-3 活性升高，导致 Bid 水解，促进细胞色素 C 释放，进而又促进 caspase-3 激活而形成正反馈调控[10]。许多研究显示，抑制 caspase 的活性就能减弱辐射诱导的细胞凋亡，如抑制 caspase 激活就可减轻 UV 对线粒体内膜的损害而减少细胞凋亡；抑制 caspase-3 的活性可阻断 Fas L 和 UV 诱导的凋亡，抑制 caspase-8 的活性可完全阻断 Fas L 介导的细胞凋亡而部分阻断 UV 诱导的细胞凋亡[11]；Coelho 等[12]认为 caspase-3 抑制剂只能阻断辐射诱导的细胞凋亡，但细胞死亡，推测 caspase-3 决定辐射诱导的细胞死亡方

式。本实验结果表明 RA 和辐射单独或联合处理的 HL-60 和 HL-60$^{IFN\alpha}$ 细胞 caspase-3 蛋白表达和活性增高，在辐射和/或 RA 处理细胞的同时加入 5 nmol/L DEVD-CHO，可抑制辐射及 RA 引起的 caspase-3 的活性上升，部分拮抗辐射及 RA 的细胞增殖抑制作用。总之，caspases 在辐射诱导细胞凋亡过程中有重要作用，只是不同的 caspase 在不同类型的射线引起的不同种类细胞凋亡中所起的作用不完全相同。

有研究显示，某些细胞 caspases 的表达需要 STAT1 或/和 IRF-1 的参与，凋亡信号不能诱导 STAT1 缺失的细胞 caspases 的表达而不能诱导其凋亡，而 STAT1 缺失细胞转染 STAT1 基因后可恢复对凋亡信号的敏感性[13]。我们以前的研究表明 RA 和 IFN 可上调 HL-60 和 MCF-7 细胞 IRF-1 和 STAT1 的表达[14]，既然 caspase 在辐射诱导细胞凋亡过程中有重要作用，而 RA 和 IFN 又能上调某些肿瘤细胞 STAT1 和 IRF-1 的表达而促进 caspases 的表达与活化，说明 RA 和 IFN 可通过上调 caspases 的表达与活性而提高辐射诱导肿瘤细胞凋亡的敏感性。

凋亡信号激活信号分子而诱导细胞凋亡的信号通路错综复杂，不同的信号通路之间还存在有交叉作用，但是，caspase 的激活却是细胞凋亡的共同步骤。Caspase 在辐射诱导细胞凋亡过程中发挥重要作用，一些能促进 caspases 表达与激活的因素可提高肿瘤细胞的辐射敏感性。总之，RA 及其诱导的外源性 IFNα 基因产物能提高肿瘤细胞对电离辐射的敏感性，上调 STAT1 和 IRF-1 的表达，并促进 caspase 的表达与激活可能是 RA 和/或 IFNα 提高肿瘤细胞辐射敏感性的分子机制之一。

参考文献：

[1] Malone C, Schiltz P M, Nayak S K, *et al*. Combination interferon-alpha2a and 13-cis-retinoic acid enhances radiosensitization of human malignant glioma cells *in vitro*[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(2): 417 - 423.

[2] Syljuasen R G, Belldegrun A, Tso C L, *et al*. Sensitization of renal carcinoma to radiation using alpha interferon (IFNA) gene transfection [J]. Radiat Res, 1997, 148(5): 443 - 448.

[3] 张乾勇，糜漫天，程天民，等. RARE 介导的视黄酸可调控的 IFNα 表达载体的构建与鉴定[J]. 免疫学杂志，2001，17(4)：277 - 280.

[4] Lenardo M J. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis[J]. Nature, 1991, 353(6347): 858 - 861.

[5] Mason K A, Tofilon P J. Unexpected radiation protection with 13-cis-retinoic acid plus interferon alpha-2a[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1994, 33(5): 435 - 437.

[6] Ivanov A A, Kuznetsov V P, Ulanova A M, *et al*. Therapeutic antiradiation properties of leukinferon[J]. Radiats Biol Radioecol, 1998, 38(1): 62 - 70.

[7] Broaddus W C, Liu Y, Steele L L, *et al*. Enhanced radiosensitivity of malignant glioma cells after adenoviral p53 transduction[J]. J Neurosurg, 1999, 91(6): 997 - 1004.

[8] Belka C, Marini P, Budach W, *et al*. Radiation-induced apoptosis in human lymphocytes and lymphoma cells critically relies on the up-regulation of CD95/Fas/APO-1 ligand[J]. Radiat Res, 1998, 149(6): 588 - 595.

[9] Voehringer D W, Hirschberg D L, Xiao J, *et al*. Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(6): 2680 - 2685.

[10] Slee E A, Keogh S A, Martin S J. Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release[J]. Cell Death Differ, 2000, 7(6): 556 - 565.

[11] Park H S, Huh S H, Kim Y, *et al*. Selenite negatively regulates caspase-3 through a redox mechanism[J]. J Biol Chem, 2000, 275(12): 8487 - 8491.

[12] Coelho D, Holl V, Weltin D, *et al*. Caspase-3-like activity determines the type of cell death following ionizing radiation in MOLT-4 human leukaemia cells[J]. Br J Cancer, 2000, 83(5): 642 - 649.

[13] Kumar A, Commane M, Flickinger T W, *et al*. Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases[J]. Science, 1997, 278(5343): 1630 - 1632.

[14] 张乾勇，糜漫天，程天民，等. 视黄酸对 pRARE4-IFNα 表达载体转染细胞增殖与凋亡的影响及其机制研究[J]. 免疫学杂志，2002，.18(1)：20 - 23.

（编辑　陈聪连）

关于修回稿件附软盘的说明

为缩短学报出版周期，减少编排错误，请作者根据学报编辑部提出的意见对文稿修改后，将修改稿以 Word 格式存入软盘，并请标明软盘中的文件名、作者姓名及稿件编号，连同修改稿一并送交本刊编辑部或 E-mail: aammt@ mail. tmmu. com. cn(校外稿件请邮寄)

本刊编辑部