维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)01-0025-04

X 射线对肺腺癌细胞粘附分子及其相关生物学特性的影响

刘 晓[1,2],蒋幼凡[1],岳 秀[1,2],雷淑慧[1]

(1. 重庆医科大学附属第二医院呼吸内科,重庆 400010;2. 重庆医科大学基础医学研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 X 射线对肺腺癌细胞粘附分子及其相关生物学特性的影响。方法:不同剂量 X 射线照射肺腺癌细胞 A549,MTT 法检测细胞增殖抑制; 免疫细胞化学法蛋白水平检测细胞中 E-cadherin 及其连环蛋白 β-catenin 的表达;Transwell 小室检测细胞的侵袭力。结果:X 射线对 A549 细胞的增殖抑制作用呈剂量依赖性;照射后 E-cadherin 和 β-catenin 蛋白的表达均显著高于对照组($P<0.05$),其变化趋势是随照射剂量增加表达逐渐增加;Transwell 小室结果表明随着照射剂量的增加,细胞侵袭力逐渐降低($P<0.05$)。结论:X 射线上调 A549 细胞上粘附分子 E-cadherin 和 β-catenin 在细胞中的表达,增加细胞间的粘附力,降低肿瘤细胞的侵袭力,这可能是 X 射线抑制肺腺癌细胞转移的作用机制之一。

【关键词】X 射线;A549;E-cadherin;β-catenin;转移

【中国图书分类法分类号】R734.2;R730.55 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-25

The effect of X-irradiation on adhesion molecules and their related biological characteristics of A549 human lung adenocarcinoma cell line

LIU Xiao, et al

(*Department of Respiratory Medicine, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of X-irradiation on Adhesion molecules and their related biological characteristics of Human Lung. *Methods*: A549 cells were irradiated with varying doses of X-rays. MTT assay was employed to evaluate the effects of X-irradiation on the proliferative inhibition of A549 cells. The immunocytochemical method was employed to analyze the protein expression levels of E-cadherin and β-catenin. The transwell chambers were employed to evaluate the invasion of A549 cells. *Results*: X-irradiation could inhibit the proliferation of A549 cells in a dose-dependent manner. The protein expression of E-cadherin and β-catenin in A549 were higher than that in control group($P<0.05$).And the cell invasions were lower than that in control group ($P<0.05$). The expression of E-cadherin, β-catenin and cell invasions showed a direct correlation with the dose. *Conclusion*: Up-regulating the expression of E-cadherin and β-catenin on A549 cells, which enhanced the adhesion between cells and depressed the invasion. That may be the mechanism of X-irradiation inhibiting the metastasis of Human Lung Adenocarcinoma Cell line.

【Key words】 X-irradiation; A549; E-cadherin; β-catenin; Metastasis

肿瘤的侵袭和转移是多种基因调控的复杂过程,细胞间的粘附降低可导致接触抑制生长的信号缺乏,易使肿瘤细胞从原位向远处侵袭,是肿瘤细胞转移的关键步骤。上皮型钙粘蛋白(E-cadherin)及其连环蛋白 β-catenin 主要参与介导细胞间的粘附,如果该复合物的表达、分布等出现异常将会影响到细胞的粘附,对于癌细胞而言,可促进其发生侵袭和转移[1,2]。本研究从粘附分子 E-cadherin/β-catenin 入手,探讨 X 射线抑制肺腺癌细胞转移的作用机制。

作者介绍:刘 晓(1982-),女,硕士,
主要研究方向:肺癌的早期诊断与治疗。

通讯作者:蒋幼凡,女,教授,E-mail:zengzuo1992@sina.com。

基金项目:重庆市卫生科技项目(03-2-053)。

1 材料与方法

1.1 材料

肺腺癌细胞株 A549,购自中科院上海细胞库;RPMI 1640 培养基、小牛血清购自美国 Hyclone 公司;PBS、0.25%胰酶等由重庆医科大学基础研究所提供;细胞裂解液购自上海申能博彩生物公司;一抗兔抗人 E-cadherin、鼠抗

维普资讯 http://www.cqvip.com

人 β-catenin、兔抗人 β-actin 均购自 Santa Cruz 公司；辣根羊抗小鼠 IgG、羊抗兔 IgG、S-P 免疫组化染色试剂盒购自北京中杉金桥生物公司；MTT、DMSO 购自美国 Sigma 公司；Matrigel、Transwell 小室购自 BD Biosciences 公司。Varian 2300C/D 直线加速器由重庆医科大学附属第一医院肿瘤科提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 肺腺癌细胞株 A549 培养于含 10%的小牛血清，100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液中，37℃，5%CO_2 孵箱，传代培养。待细胞生长至指数生长期进行 X 射线照射。

1.2.2 实验分组及照射条件[3] 取指数生长期细胞，用 0.25%胰酶消化成单细胞悬液，调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml，将其接种于培养瓶，放入孵箱至细胞完全贴壁。照射源为 6mV X 直线加速器，剂量率为 200cGy/min，培养瓶放置于照射野中心，照射前对培养瓶进行衰减校正。按射线照射剂量不同分为 0Gy(对照组)、2Gy、5Gy、10Gy 4 组，照射后 CO_2 孵箱继续培养 24h，分别于照射后 1h、3h、6h、12h、24h 观察细胞形态，照射后 24h 终止培养，分别检测各个剂量 X 射线照射后 24h 细胞增殖抑制率、E-cadherin 及 β-catenin 蛋白表达情况和细胞侵袭力。

1.2.3 MTT 法检测照射前后细胞增殖抑制率 用 0.1%胰蛋白酶消化射线处理后的 A549 细胞，用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液制成单细胞悬液，以每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔板中，每孔 200μl，每组设 5 个复孔。将培养板放入 CO_2 孵箱，在 37℃、5%CO_2 及饱和湿度条件下，培养 24h，待细胞完全贴壁。每孔加入 MTT 溶液(5mg/ml)20μl，37℃继续孵育 4h，终止培养，小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入 180μl DMSO，振荡 10min，570nm 波长，在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值，记录结果并绘制细胞生长抑制曲线。细胞增殖抑制率 = (A_{570} 对照组 − A_{570} 实验组) / A_{570} 对照组 × 100%

1.2.4 免疫细胞化学法检测射线照射前后 E-cadherin 和 β-catenin 蛋白表达变化 射线处理后的细胞接种在放有盖玻片的 24 孔板中，制成细胞爬片，继续培养 24h 备用。4%多聚甲醛固定后，按 SP 免疫组化试剂盒步骤处理，DAB 显色，苏木精复染，中性塑胶封片，自动图像分析仪随机计数 200 个细胞，得到平均光密度值(MOD)。E-cadherin 和 β-catenin 阳性细胞均呈细胞膜棕黄色染色，胞浆少量染色。以 pH7.40，0.01mol/L 的 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.2.5 细胞侵袭实验[4] 采用 Transwell 小室体外侵袭实验，8μm 孔径聚碳酸酯微孔滤膜上均匀涂布 1 层 1∶5 稀释的人工基底膜 Matrigel (约 40μl/室)，上室分别加入各组细胞悬液 100μl，细胞浓度均为 1×10^6 个/ml，每组细胞设 3 个复孔，测定各组细胞的侵袭力。每孔随机计数 5 个视野(400×)，取平均值，以穿膜的肿瘤细胞数目多少作为评价侵袭力的指标。

1.2.6 统计方法 所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SAS8.2 统计软件进行完全随机设计方差分析和组间 SNK 检验，$P<0.05$ 有统计学意义。

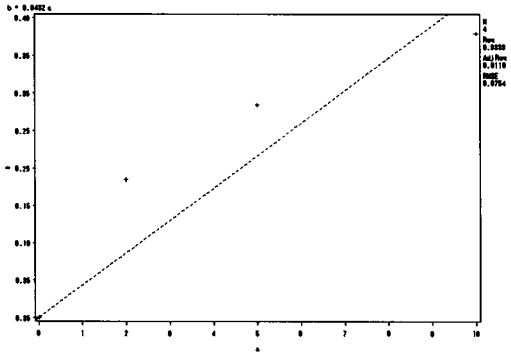
2 结 果

2.1 A549 生长性状观察

对照组(0Gy)细胞贴壁生长，几乎无脱落，胞质饱满，生长舒展，相邻细胞生长融合成片。射线照射后 1h，各剂量组细胞形态与对照组没有明显变化。照射后 3h，各剂量组细胞均可见部分细胞由贴壁脱落，悬浮于培养液中，细胞变圆，体积缩小，核固缩出现，核颜色加深，折光性增强，随着照射剂量的增加，上述形态表现越明显。随着时间推移，脱落细胞和出现核固缩的细胞明显增加，照射后 24h 达到顶峰。

2.2 射线对 A549 细胞的增殖抑制效应

不同剂量射线对 A549 作用后 24h 的生长抑制曲线显示 0Gy(对照组)、2Gy、5Gy、10Gy 对 A549 细胞的生长抑制率分别为 0、18.44%、28.42%、37.89%，可以看出 X 射线对 A549 细胞增殖的抑制作用是随着照射剂量的增加而增加的($P<0.05$)。见图 1。



直线回归方程 y=0.04325x (横坐标 X 代表照射剂量，纵坐标 Y 代表增殖抑制率)

图 1 不同剂量 X 射线对 A549 细胞的增殖抑制作用

2.3 免疫细胞化学法检测射线照射前后 E-cadherin 和 β-catenin 蛋白表达变化

X 照射照射前 A549 细胞膜上有较微弱的 E-cadherin 和 β-catenin 表达，两者的平均光密度值分别为 0.230±0.012 和 0.460±0.015。胞浆中偶有表达，E-cadherin 和 β-catenin 表达的平均光密度值分别为 0.020±0.007 和 0.060±0.004。照射后胞膜和胞浆 E-cadherin 和 β-catenin 均有不同程

维普资讯 http://www.cqvip.com

度增加。随着照射剂量的增加，E-cadherin 和 β-catenin 的平均光密度(MOD)值增加越明显。较对照组比较，差异有显著性($P<0.05$)。具体数值见表 1。

表 1 不同剂量 X 射线对 A549 上 E-cadherin 和 β-catenin 蛋白表达的影响

照射剂量 (Gy)	β-catenin MOD	E-cadherin MOD
0(对照组)	0.46 ± 0.015	0.23 ± 0.012
2	0.53 ± 0.011	0.28 ± 0.019
5	0.72 ± 0.023	0.37 ± 0.009
10	0.85 ± 0.017	0.56 ± 0.025

2.4 细胞侵袭实验

A549 细胞具有一定的体外侵袭能力，X 射线照射后其侵袭能力有不同程度的减弱，24h 浸润细胞数目随着照射剂量的增加逐渐减少，与对照组相比，差异有显著性($P<0.05$)。见图 2、表 2。

表 2 不同剂量 X 射线照射后 24h A549 细胞侵袭实验结果(侵袭细胞数/视野)

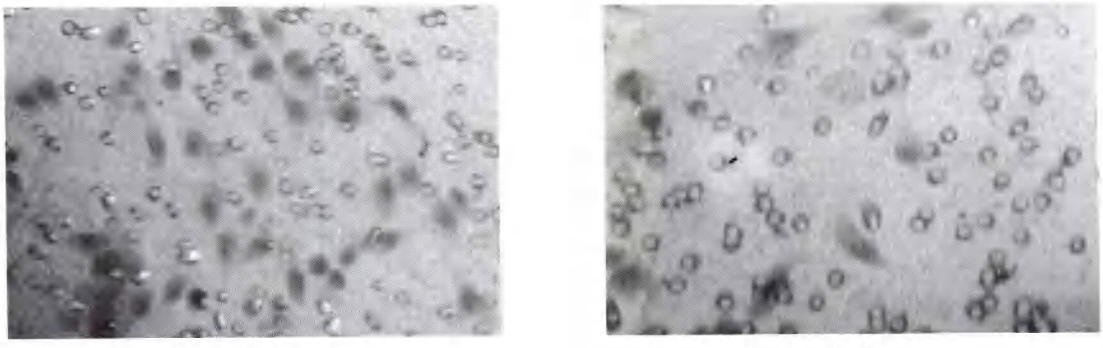
组别	视野数	侵袭细胞数($\bar{x} \pm s$)
0 Gy	5	36.4 ± 3.21
2 Gy	5	32.4 ± 3.36
5 Gy	5	26.2 ± 2.39
10 Gy	5	22.4 ± 2.07

3 讨 论

据统计，近年来有 90%以上的肿瘤病人死于肿瘤转移，因此肿瘤转移已成为肿瘤防治的重要靶环节。放射治疗是抑制肿瘤浸润和转移的重要手段。Takahashi Y 等[5]研究发现，在高传能线密度射线下，体外培养的 ECV304 及人脐静脉内皮细胞(HUVEC)粘附和迁移到玻璃粘环蛋白(Vitronetin)及骨桥蛋白(Osteopontin)的能力受到抑制，毛细血管样结构遭到破坏，同时伴随着 MMP-2 活性抑制，αvβ3-integrin 表达下降，基质金属蛋白酶组织抑制剂-2 显著升高。Susskind H、DAB 显色试剂等[6]对肺癌及乳腺癌患者放疗前后同健康人进行对比研究发现，这些患者放疗前血清 MMP-9 及基质金属蛋白酶组织抑制剂-1 水平明显高于健康人，放疗后 2周 MMP-9 在血清中的表达急剧下降。由此可见，电离辐射后正常组织和肿瘤组织粘附和浸润的相关因子的表达将发生改变，并且这些改变具有良好的照后时间和剂量生物学效应。这就为探寻肿瘤放射治疗的作用机制打开了一扇大门。

E-cadherin 是钙粘蛋白的 1 种，作为肿瘤抑制分子，可通过介导细胞间接触粘附，从而抑制肿瘤细胞的远处转移；β-catenin 是连环蛋白家族的 1 种，是 1 种原癌基因。在正常组织和细胞中，E-钙粘蛋白与 β-catenin 形成复合物，共同维持上皮极性和完整性：细胞内 β-catenin 的"胞内库"由游离 β-catenin 部分和与 E-cadherin、APC 蛋白等结合形成复合体的部分共同构成，其中胞膜部分与 E-钙粘蛋白结合，维持细胞上皮的完整性；而胞浆游离部分则与胞内其他蛋白结合并籍此调节细胞的增殖与分化。两部分互相平衡，共同维持着细胞粘附、增殖、分化等细胞的基本活动，平衡一旦破坏，则可能导致肿瘤发生、浸润和转移[7,8]。有研究证实，同时恢复 β-catenin 和 E-cadherin 的表达可降低细胞的运动能力和侵袭力，且可以抑制细胞的生长，促进细胞发生凋亡，从而抑制肿瘤的浸润和转移[9,10]。

肺腺癌细胞 A549 细胞膜上有较弱的 E-cadherin 与 β-catenin 的表达，并具有较强的体外侵袭



A.照射前　　B.照射后

图 2 射线照射后肺癌细胞 A549 体外侵袭力的变化(苔盼蓝染色×400)

维普资讯 http://www.cqvip.com

力，从而易于发生浸润、转移[1]。本研究用直线加速器产生的 X 射线照射 A549 细胞，试图增加细胞膜上 E-cadherin 与 β-catenin 的表达，进而减弱其体外侵袭力，从根本上抑制 A549 细胞的远处转移。实验结果显示，射线照射后，贴壁细胞脱落增加，细胞变圆，体积缩小，核固缩出现，核颜色加深，折光性增强，随着照射剂量增加和照射后时间的推移，上述形态表现越明显。X 射线对 A549 细胞增殖的抑制作用是随着照射剂量的增加而增加的。X 射线照射后，胞膜和胞质上的 E-cadherin 和 β-catenin 的表达均有不同程度的增加，并随着照射剂量的增加而增加，说明 X 射线影响了 E-cadherin/β-catenin 在细胞中的分布，这可能是因为 β-catenin 的“胞内库”由 2 部分构成，射线照射后与 E- 钙粘蛋白结合的胞膜部分增加，而胞核中参与细胞增殖、分化的部分减少。X 射线照射后，抑制了 A549 细胞的生长，并通过上调胞膜上 E- 钙粘蛋白与 β-catenin 的表达，降低其体外侵袭力，最终有效抑制 A549 细胞的远处转移。本研究从粘附分子角度探寻了放疗抑制肿瘤转移的机制，并证实放射对于肺腺癌治疗是有效的，它可以通过上调 E- 钙粘蛋白和 β-catenin 在细胞中的表达，增加细胞间的粘附力，降低肿瘤细胞的侵袭力，最终抑制肿瘤细胞的侵袭和转移。这为临床运用放射治疗抑制肿瘤转移提供了重要的实验依据。

参 考 文 献

[1] Haz an RB,Qiao R,Keren R,et al.Cadherin switch in tumor progression[J]. Ann N Y Acad Sci,2004;1014:155-163.

[2] Beavon IR. The E-cadherin catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation[J]. Eur J Cancer, 2000;36(13):1 607-1 620.

[3] 范 凯，王 辉，王 彦，等.X 射线照射诱导鼻咽癌细胞 hMSH2 的表达[J]. 肿瘤防治研究，2006;33(2):94-96.

[4] 胡 军，邵淑娟，赵瑾瑶，等.RNA 干扰技术抑制上皮性钙黏附分子表达对 HO 8 910 细胞的影响[J].解剖学报，2007;38(2):196-199.

[5] Takahashi Y,Teshima T,Kawaguchi N,et al. Heavy ion irradiation inhibits in vitro angiogenesis even at sublethal dose[J]. Cancer Res,2003;63(14):4 253-4 257.

[6] Susskind H,Hymowitz MH,Lau YH,et al. Increased plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in lung and breast cancer are altered during chest radiotherapy[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys,2003;56(4):1 161-1 169.

[7] Cronauer MV,Schulz WA,Ackermann R,et al. Effects of WNT/beta-catenin pathway activation on signaling through T-cell factor and androgen receptor in prostate cancer cell lines[J]. Int J Oncol,2005;26(4):1 033-1 040.

[8] Brembeck FH,Ros á rio M, Birchmeier W.Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin[J]. Curr Opin Genet Dev,2006;16(1):51-59.

[9] Lowy AM,Knight J,Groden J.Restoration of E-cadherin/beta-catenin expression in pancreatic cancer cells inhibits growth by induction of apoptosis[J]. Surgery,2002;132(2):141-148.

[10] Oloumi A,McPhee T,Dedhar S.Regulation of E-cadherin expression and beta catenin / Tcf transc riptional activity by the integrin linked kinase[J]. Biochim Biophys Acta,2004;1691(1):1-15.

[11] 李 晶，李 珏，王吾如. E 钙粘蛋白 /catenin 复合体在人非小细胞肺癌细胞系中的表达[J]. 解剖学报，2002;33(3):331-333.

（责任编辑：谭乐勤）

（上接第 24 页）

lection:the PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes[J]. Hum Genet,2005;76(4):561 - 571.

[9] Ban Y,Tozaki T,Taniyama M,et al. The codon 620 single nucleotide polymorphism of the protein tyrosine phosphatase-22 gene does not contribute to autoimmune thyroid disease susceptihility in theJapanese[J]. Thyroid,2005;15(10):1 115-1 118.