

文章编号: 1007-4627(2013)01-0084-05

重离子和X射线对人微血管内皮细胞血管生成的抑制作用

刘圆圆^{1, 2, 3}, 张红^{1, 2, 3}, 刘阳^{1, 2, 3}, 孙超^{1, 2, 3, 4}, 武振华^{1, 2, 3}, 李鸿岩^{1, 2, 3, 4}

1. 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;
2. 中国科学院重离子束辐射生物学重点实验室, 甘肃 兰州 730000;
3. 甘肃省重离子束辐射医学应用基础重点实验室, 甘肃 兰州 730000;
4. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 研究了X射线和重离子照射对人微血管内皮细胞的增殖、迁移、管样结构形成及基质金属蛋白酶表达的影响。Transwell迁移实验结果显示, 照射24 h后, 非毒性照射剂量照射能抑制HMEC-1细胞的迁移, 且重离子照射抑制内皮细胞迁移能力较X射线的强。基质胶实验显示, 重离子照射可显著抑制自发性管样结构的形成, 但X射线照射的抑制作用不明显。同时, 明胶酶谱法证实了重离子照射可明显抑制HMEC-1细胞中基质金属蛋白酶(MMP-2和MMP-9)的表达, 而X射线照射对此类酶几乎无任何影响, 显示了重离子较X射线的肿瘤放疗优势所在。

关键词: 重离子; X射线; 辐照; 血管生成; 肿瘤

中图分类号: R730; R730.5 **文献标志码:** A **DOI:** 10.11804/NuclPhysRev.30.01.084

1 引言

血管生成是指从已有的血管上芽生出新的毛细血管, 参与伤口愈合、月经周期、胚胎发育、慢性炎症和肿瘤等许多生理病理过程^[1]。自1971年Folkman教授提出“肿瘤的生长与转移依赖于血管”学说后, 对血管生成的研究逐渐成为肿瘤治疗的热点。新生血管为肿瘤生长提供必需的氧气及营养成分, 且参与肿瘤转移, 其过程极为复杂, 包括基底膜的降解、内皮细胞的增殖、迁移和管样结构的形成等。放射治疗除直接杀伤肿瘤细胞外, 对肿瘤新生血管的破坏也是其治疗肿瘤的重要机制。而形成肿瘤新生血管的内皮细胞与肿瘤生长密切相关, 且与肿瘤细胞相比, 内皮细胞的遗传稳定性较高, 因此可作为放射治疗的重要靶点^[2-4]。

到目前为止, 重离子和X射线对肿瘤血管新生影响的研究较少, 对人微血管内皮细胞(HMEC-1)血管生成影响的研究, 国内外尚未见报道。因此本研究主

要探讨重离子与X射线两种不同辐照形式对HMEC-1血管生成的影响。

2 材料和方法

2.1 主要试剂及配制

MCDB131培养基(sigma aldrich公司), 胎牛血清(Themor公司), EGF(sigma aldrich公司), 氢化可的松(sigma aldrich公司), matrigel(Becton Dickinson公司), SRB(sigma aldrich公司), Hoechst33258(sigma aldrich公司), 考马斯亮蓝R-250(sigma aldrich)。

2.2 细胞培养

人微血管内皮细胞(human microvascular endothelial cell-1, 简称HMEC-1), 使用含有20%胎牛血清的MCDB131培养基, 于37℃和5%CO₂实验条件下常规培养。每隔3天传代一次, 取对数生长期细胞用于各组实验。

收稿日期: 2012-06-20 修改日期: 2012-08-19

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(973计划)(2010CB834202); 国家自然科学基金重点项目(10835011); 国家自然科学基金面上项目(10675151); 中国科学院西部之光人才培养计划项目(XB106012)

作者简介: 刘圆圆(1984-), 女, 甘肃通渭人, 从事辐射生物学相关研究; E-mail: Liuyy@impcas.ac.cn

通信作者: 张红, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn

<http://www.npr.ac.cn>

2.3 照射条件

重离子照射在兰州重离子研究装置(HIRFL)深层癌症治疗终端上进行, 各组照射剂量均为0.5, 1, 2和4 Gy, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束能量为250 MeV/u, LET为16 keV/ μm , 剂量率为0.4 Gy/min。

X射线照射采用Faxition 43885D型X射线机, 各组照射剂量均为2, 4, 6和8 Gy(照射剂量率为1.027 Gy/min), 能量为100 kVp。

2.4 细胞毒实验(Sulforhodamine B, 简称SRB)

取对数生长期HMEC-1细胞, 制得浓度为 5×10^4 的单细胞悬液。96孔板中每孔加入100 μL 。24 h待细胞贴壁后分别采用X射线及 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子进行照射至预定剂量。各剂量组设6个平行孔, 于培养箱中分别培养24 h。用预冷的10%三氯醋酸于4 $^{\circ}\text{C}$ 固定1 h, SRB染色30 min。用1%醋酸洗去未结合的染料, 室温干燥后加入150 μL 10 mM非缓冲Tris碱液溶解, 于酶标仪570 nm处测定各孔光吸收值^[5]。

2.5 细胞凋亡的检测

取对数生长期HMEC-1细胞, 用D-Hanks洗3次, 加入无血清MCDB131培养基, 采用X射线及 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子分别进行照射至预定剂量。继续培养24 h, 加入EDTA-胰酶混合液消化后于离心机上离心, 转速1000 r/min, 离心10 min, 用Hoechst33258染色后荧光显微镜下(Nikon)照相^[6]。

2.6 明胶酶谱法

取对数生长期HMEC-1细胞, 采用X射线及 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子分别进行照射至预定剂量, 无血清培养。24 h后收集培养液, 于4 $^{\circ}\text{C}$, 2000 r/min, 离心10 min。取上清液用于聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。待电泳结束后, 用洗涤缓冲液(1M Tris-HCl

pH 7.5, 10% Triton-X 100)洗涤除去SDS。于37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育36 h后, 用考马斯亮蓝R-250染色, 最后脱色至白色条带蓝色背景清晰为止^[7]。

2.7 细胞迁移

取对数生长期HMEC-1细胞, 采用X射线及 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子分别进行照射至预定剂量。立刻消化细胞后计数, 调整细胞密度为 5×10^5 cells/mL, 将400 μL 细胞悬液加入Transwell上室, 24孔板中加入600 μL 含20%血清的MCDB131培养基, 培养24 h后, 用棉棒轻轻拭去上室细胞, 甲醇固定30 min, 最后用结晶紫染色5 min, 以PBS洗涤3次, 镜下观察迁移结果并进行统计^[8]。

2.8 管样结构形成实验

取对数生长期HMEC-1细胞, 采用X射线及 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子分别进行照射至预定剂量。立刻消化细胞后, 调整浓度至 8×10^5 cells/mL(含有0.5%血清), 加入铺有matrigel基质胶已凝固的96孔板中, 随后放入培养箱中继续培养, 8 h后镜下观察管样结构形成的结果并统计^[9]。

2.9 统计方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用SPSS 11.0及Image-plus软件进行结果分析, 并采用T检验进行统计处理, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

3 结果

3.1 辐照对内皮细胞增殖及凋亡的影响

采用SRB法检测辐照对HMEC-1的细胞毒作用。照射后24 h时, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子在最大剂量4 Gy时的增殖抑制率约6.94%, X射线在最大剂量8 Gy时的增殖抑制率约8.77%(图1), 说明 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子和X射线在此实

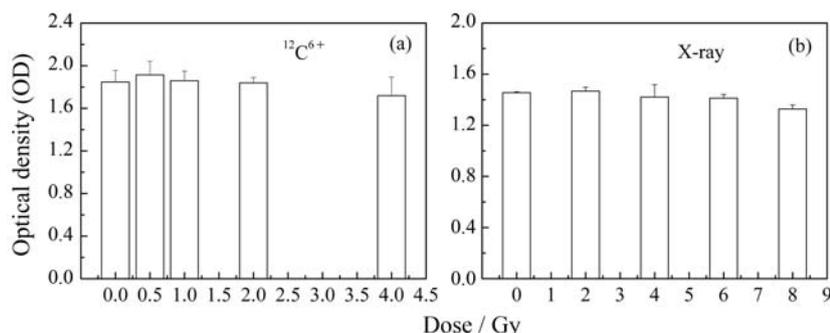


图1 采用SRB法检测辐照后, 对内皮细胞在24 h后增殖的影响

验剂量下对人微血管内皮细胞产生的毒性很小。同时，采用 Hoechst33258 染色法检测辐照对内皮细胞凋亡的影响(图2)。实验发现，经 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子和 X 射线

照射 24 h 后，未促进 HMEC-1 细胞凋亡，进一步说明照射 24 h 后，在 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子及 X 射线各照射剂量下对内皮细胞并无明显的细胞毒作用。

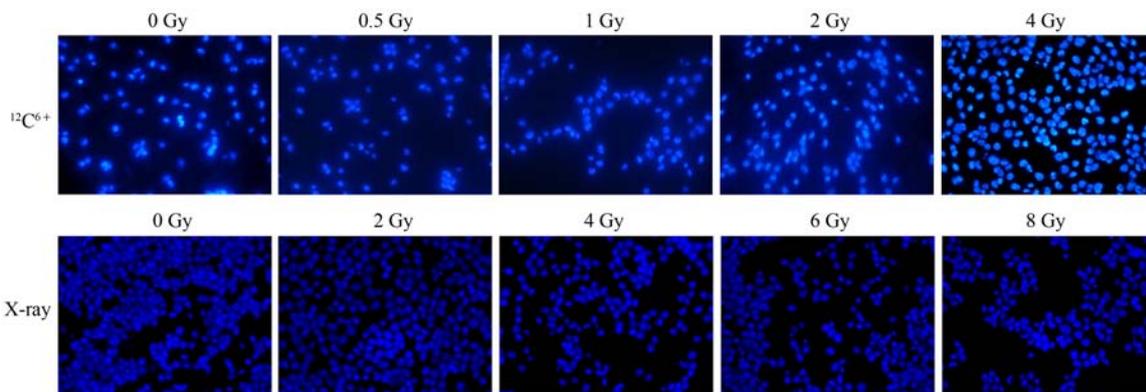


图 2 采用 Hoechst33 258 染色法检测辐照后，对内皮细胞在 24 h 后凋亡的影响

3.2 辐照对内皮细胞中 MMPS 表达的影响

肿瘤细胞和内皮细胞均能通过分泌如 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白酶来降解基底膜和细胞外基质，这些基质金属蛋白酶在血管生成及肿瘤转移中具有重要作用。实验采用明胶酶谱法观察 HMEC-1

细胞经 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子和 X 射线照射后 24 h 时的 MMP-2 和 MMP-9 表达的变化。结果显示， $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子能下调 MMP-2 的表达，最大照射剂量 4 Gy 时的抑制率约 12.8%，而经 X 射线照射后，这两种酶的表达几乎不受影响。结果见图 3。

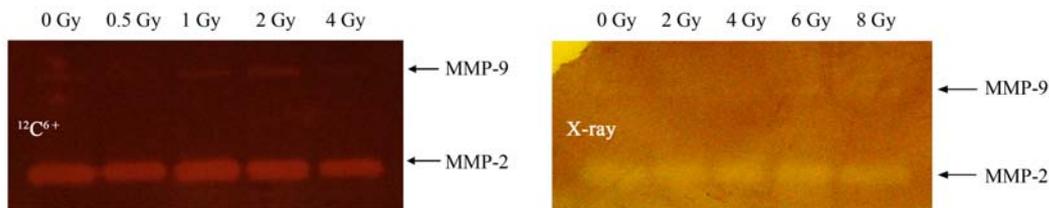


图 3 明胶酶谱法检测辐照后，对内皮细胞中基质金属蛋白酶表达的影响

3.3 辐照对内皮细胞迁移的影响

采用 Transwell 小室观察辐照对内皮细胞迁移活性的影响。结果表明，未照射组中大量的 HMEC-1 细胞通过 Transwell 膜的孔隙迁移至膜的另一侧，而经

照射后，内皮细胞的迁移明显受到抑制。 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射剂量在 0.5, 1, 2 和 4 Gy 时的迁移抑制率分别为 19.19%, 25.76%, 47.17% 和 54.66%；X 射线照射剂量在 2, 4, 6 和 8 Gy 时的迁移抑制率分别为 5.09%, 16.46%, 30.25% 和 34.48%。结果见图 4。

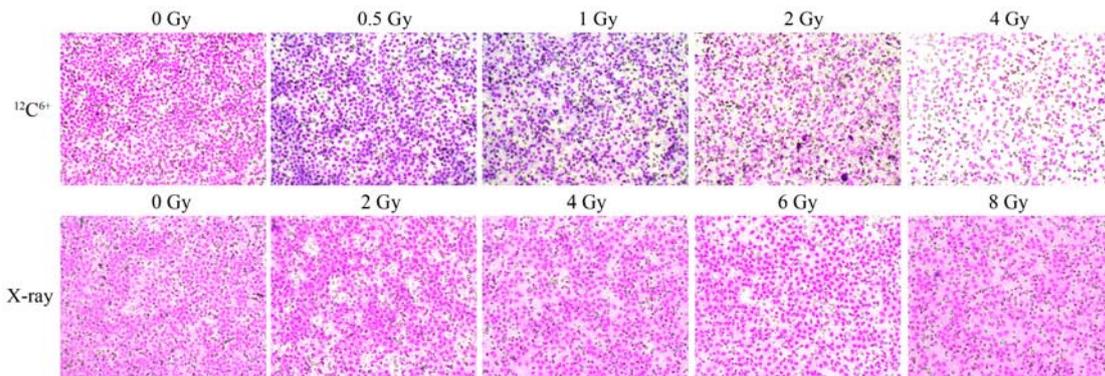


图 4 采用 Transwell 迁移小室检测辐照后，对内皮细胞迁移的影响

3.4 辐照对内皮细胞管样结构形成的影响

采用Matrigel胶模拟细胞外基质观察辐照对HMEC-1细胞管样结构形成的影响。实验发现, 8 h后未照射组的HMEC-1细胞在matrigel胶上可自主

形成管样结构, 而经 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射后, 管样结构的形成受到抑制, 在0.5, 1, 2和4 Gy时的迁移抑制率分别为6.87%, 4.1%, 33.64%和38.17%。但经X射线照射后, 与对照组相比, 辐照各剂量组的管腔样结构无明显差别(图5)。

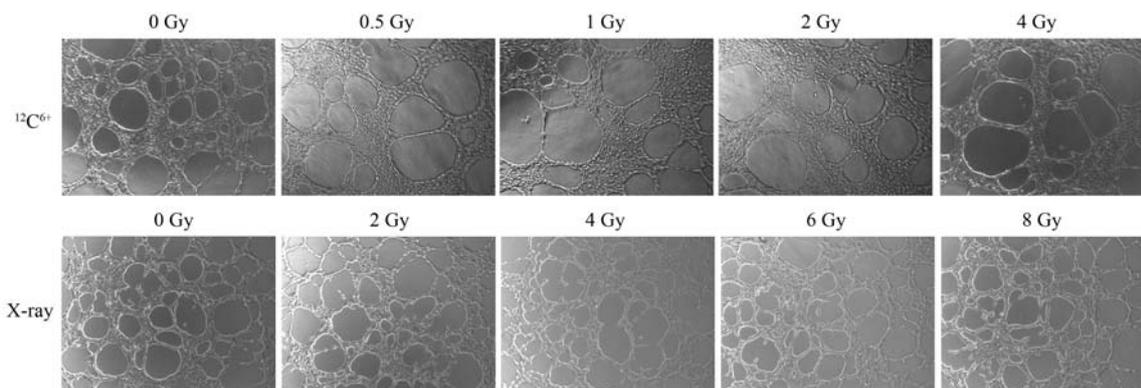


图5 采用Matrigel胶模拟细胞外基质观察辐照后, 对HMEC-1细胞8 h管样结构形成的影响

4 讨论

放射治疗能够直接破坏肿瘤的新生血管^[10]。本实验结果显示, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子和X射线照射对人微血管内皮细胞增殖抑制作用都比较小, 说明在照射后24 h内, 在此实验辐照剂量下对内皮细胞产生的毒性较小。因此研究辐照对内皮细胞迁移能力、管样结构形成和MMPS的影响均采用SRB法的辐照剂量。而采用4 Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射后, 对内皮细胞迁移的抑制率约为54.66%, 采用8 Gy X射线照射时迁移抑制率约为34.48%, 但二者对其增殖的抑制率均很低。这说明各剂量的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子和X射线照射, 在不诱导细胞毒前提下, 能够明显抑制HMEC-1细胞的迁移, 且重离子的抑制程度更强。

管样结构形成是内皮细胞分化的结果, 是血管生成的重要步骤^[11]。实验结果表明, 采用4 Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射后, 对内皮细胞管样结构形成的抑制率约为38.17%, 说明可能是通过其他相关机制介导, 如显著抑制迁移或下调某些蛋白分子(MMPs)的表达, 而不是由对内皮细胞的增殖抑制作用所诱导。但是经高剂量X射线照射后, 管样结构形成无明显变化。血管生成过程中, 肿瘤细胞和内皮细胞均能够分泌MMP, 以达到降解细胞外基质, 促进内皮细胞迁移, 从而促进血管生成的生物学效应。MMP-2和MMP-9是MMPs中的两种明胶酶, 在肿瘤转移过

程中发挥重要作用^[12]。本实验结果显示, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子能够显著下调MMP-2的表达, 而X射线对这两种酶的表达影响甚小。这与上述结果中对HMEC-1细胞管样结构形成的结果相符。

大量研究已证实, 放射与血管生成抑制剂联合使用, 产生叠加效应, 达到肿瘤治疗的最佳效果^[13-15]。本实验结果说明, 与X射线相比, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子可显著抑制肿瘤血管生成。若将 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子与特异性靶向内皮细胞的血管生成抑制剂相结合, 提高抗肿瘤血管生成能力, 从而增强抗肿瘤疗效。

参考文献 (References):

- [1] CARMELIET P, JAIN R K. *Nature*, 2000, **407**(6801): 249.
- [2] SKVORTSOV S, JIMENEZ C R, KNOL C, *et al.* *Radiother Oncol*, 2011, **101**(1): 177.
- [3] BENNEWITH K L, DEDHAR S. *BMC Cancer*, 2011, **30**(11): 504.
- [4] MAUCERI H J, HANNA N N, BECKEET M A, *et al.* *Nature*, 1998, **394**(6690): 287.
- [5] ZHANG C, YANG F, ZHANG X W, *et al.* *Br J Pharmacol*, 2006, **148**(6): 741.
- [6] YAO G, LING L, LUAN J, *et al.* *Int Immunopharmacol*, 2007, **7**(4): 444.
- [7] KWAK H J, PARK M J, PARK C M, *et al.* *Int J Cancer*, 2006, **118**(11): 2711.
- [8] LU N, GAO Y, LING Y, *et al.* *Life Sci*, 2008, **82**(17/18): 956.
- [9] YAMAKAWA S, ASAI T, UCHIDA T, *et al.* *Cancer Lett*, 2004,

- 210(1): 47.
- [10] MAUCERI H J, HANNA N N, BECKETT M A, *et al.* Nature, 1998, **394**(6690): 287.
- [11] RISAU W. Nature, 1997, **386**(6626): 671.
- [12] JOHN A, TUSZYNKI G. Pathol Oncol Res, 2001, **7**(1): 14.
- [13] UPRETI M, JAMSHIDI-PARSIAN A, KOONCE N A, *et al.* Transl Oncol, 2011, **4**(6): 365.
- [14] PENG F, XU Z, WANG J, CHEN Y, *et al.* PLoS One, 2012, **7**(4): e34646.
- [15] NIEDER C, WIEDENMANN N, ANDRATSCHKE N, *et al.* Cancer Treat Rev, 2006, **32**(5): 348.

Inhibitory Effect of $^{12}\text{C}^{6+}$ Ion and X-ray on Angiogenesis in HMEC-1

LIU Yuan-yuan^{1, 2, 3}, ZHANG Hong^{1, 2, 3}, LIU Yang^{1, 2, 3}, SUN Chao^{1, 2, 3, 4},
WU Zhen-hua^{1, 2, 3}, LI Hong-yan^{1, 2, 3, 4}

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

2. Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Medicine of Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

3. Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Biology and Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730000, China;

4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The study aims to explore the effect of $^{12}\text{C}^{6+}$ ion and X-ray on proliferation, migration, tube formation and MMPS of human microvascular endothelial cells (HMEC-1). Transwell migration experiment showed that the radiation could inhibit the migration of HMEC-1 in sub-lethal dose 24 h after irradiation. Furthermore, the inhibition ability of $^{12}\text{C}^{6+}$ ion was stronger than that of X-ray. Matrigel experiment indicated that $^{12}\text{C}^{6+}$ ion suppressed the tube formation of HMEC-1 spontaneously. However, the inhibitory effect of X-ray had no significance. Meanwhile, Gelatin Zymography showed the expression of MMP-2 was inhibited obviously by $^{12}\text{C}^{6+}$ ion, while X-ray had little effect on the expression of MMP-2. In conclusion, $^{12}\text{C}^{6+}$ ion is superior to X-ray in radiotherapy of tumor.

Key words: heavy ion; X-ray; radiation; angiogenesis; cancer

Received date: 20 Jun. 2012; **Revised date:** 19 Aug. 2012

Foundation item: National Basic Research Program of China (973 Program) (2010CB834202); National Natural Science Foundation of China (10835011, 10675151); Western Light Talents Training Program of Chinese Academy of Science (XB106012)

Corresponding author: ZHANG Hong, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn

<http://www.npr.ac.cn>