

文章编号: 1007-4627(2017)04-0790-07

## 基于细胞红外光谱预测乙酰化细胞的辐射敏感性

张凤秋<sup>1,2,3</sup>, 黄青<sup>1,2,†</sup>

(1. 中国科学技术大学核科学技术学院, 合肥 230026;

2. 中国科学院合肥物质科学研究院技术生物与农业工程研究所, 合肥 230026;

3. 郑州大学物理工程学院, 郑州 450001)

**摘要:** 组蛋白乙酰化是表观遗传修饰的一种重要方式。肿瘤细胞的组蛋白大部分呈现低乙酰化状态, 而组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (histone deacetylase inhibitor, HDACi) 可以增加肿瘤细胞的乙酰化水平, 诱导细胞周期阻滞及凋亡。曲古菌素 A (trichostatin A, TSA) 是组蛋白去乙酰化酶抑制剂的典型代表药物之一, 能够提高肿瘤细胞组蛋白和非组蛋白的乙酰化水平。傅里叶变换红外 (Fourier Transform Infrared, FTIR) 光谱可以对无染色、无标记的生物样品进行无损检测, 具有特征性明显、快速、分辨率高、重复性好等优点, 已被广泛应用于细胞的微观生物过程的研究。本文利用红外光谱技术结合免疫荧光技术的手段, 研究 TSA 处理细胞后的乙酰化作用效果, 发现红外光谱中甲基与亚甲基的伸缩振动强度之比能够表征细胞内的乙酰化水平变化, 然后基于红外光谱的分析结果预测了乙酰化状态不同的细胞辐射敏感性的变化。结果表明, 乙酰化细胞的辐射损伤效应可以通过甲基与亚甲基的伸缩振动强度之比进行评价, 且该比值与细胞的辐射敏感性呈正相关, 表明红外光谱技术可以辅助预测细胞的辐射敏感性, 并进行细胞表观遗传学特征与辐射效应关系的研究。

**关键词:** 红外光谱; 细胞; 表观遗传学; 乙酰化; 曲古菌素 A; 辐射敏感性

**中图分类号:** Q691; Q67 **文献标志码:** A **DOI:** 10.11804/NuclPhysRev.34.04.790

### 1 引言

放射治疗是肿瘤治疗的主要手段之一, 即采用电离辐射 (ionizing radiation, IR) 杀死肿瘤细胞。然而, 由于肿瘤细胞对辐射的不敏感使得放射治疗无法有效的根治癌症<sup>[1]</sup>。另外, 过高剂量的辐射可能超出正常细胞的耐受范围, 不可避免地对正常细胞造成伤害<sup>[2]</sup>。基于上述原因, 研究人员尝试利用各种辐射增敏剂来提高放疗效果。最近几年, 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (histone deacetylase inhibitor, HDACi) 成为了潜在的辐射增敏试剂, 受到广泛关注。目前发现 HDACi 类化合物对各种肿瘤细胞均具有放射增敏的作用<sup>[3-7]</sup>。曲古菌素 A (trichostatin A, TSA) 作为 HDACi 的典型代表, 能够增加组蛋白和非组蛋白的乙酰化水平<sup>[8-10]</sup>, 抑制肿瘤细胞的增殖。研究表明, TSA 能够提高肿瘤细胞的辐射敏感性<sup>[11, 12]</sup>。

因为 HDACi 的主要作用是增加细胞的乙酰化水平, 又因为 HDACi 作用下细胞的辐射敏感性增加, 说明乙酰化在肿瘤细胞辐射敏感性中的作用至关重要<sup>[13]</sup>, 另外因为治疗时间及治疗的精确性将直接影响患者的预后

效果, 所以在制定个性化放疗方案前如何简单、快速、精确判定细胞的乙酰化水平尤为重要。

目前, 乙酰化测量方法主要依赖免疫荧光或 Western blot 的方法进行<sup>[14, 15]</sup>, 而上述方法因所用试剂费用昂贵、操作步骤繁琐、技术水平要求高等因素极大地限制了大批量样品的快速检测。红外光谱法具有非破坏性、不用试剂和高度自动化等优点, 其样品制备相对简单, 目前已成为抗肿瘤药物效应研究的重要工具之一<sup>[16]</sup>。本课题组研究已经证明, 细胞经 TSA 处理后乙酰化水平变化可以通过红外光谱技术进行表征<sup>[17]</sup>。本研究中, 作者进一步采用红外光谱表征细胞乙酰化的方法, 预测乙酰化细胞的辐射敏感性变化, 期望通过这项工作为将来的肿瘤放疗方法研究提供有益的参考。

### 2 材料与方法

#### 2.1 实验材料

HeLa 细胞由中国科学院强磁场中心馈赠; 高糖 DMEM 培养基购自北京索莱宝科技有限公司; TSA 购自 Sigma 公司; 乙酰化- $\alpha$ -微管蛋白单克隆抗体

收稿日期: 2016-11-02; 修改日期: 2016-11-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (11635013, 11475217, 11704343); 中国科学院战略先导项目 (XDA08040107)

作者简介: 张凤秋 (1977-), 女 (满族), 辽宁锦州人, 博士, 从事核技术和生物光谱应用方面研究; E-mail: zhangfengqiu@zzu.edu.cn

† 通信作者: 黄青, E-mail: huangq@ipp.ac.cn.

购自美国 CST 公司; Alexa Flour 488 标记驴抗兔 IgG 购自碧云天生物技术研究所; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; KBr 购自国药集团化学试剂有限公司; 吉姆萨染料购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 TSA 配制

TSA 溶于 DMSO, 浓度为 200  $\mu\text{mol/L}$ ,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。实验中将 TSA 稀释到培养液中至所需浓度。

### 2.2.2 乙酰化水平分析

将 HeLa 细胞接种在已灭菌盖玻片上培养过夜, 更换含不同浓度 TSA 的培养液, 继续培养至所需时间, 弃培养液, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗 3 次。加入 4% 多聚甲醛, 室温固定细胞 30 min, PBS 缓冲液洗 3 次, 然后加入 0.1% TritonX-100, 在室温下孵育 30 min, PBS 缓冲液洗 3 次后加入 1% BSA 室温封闭 1 h (或  $4\text{ }^\circ\text{C}$  过夜), 加入兔抗乙酰化  $\alpha$ -微管蛋白单克隆抗体 (1:400 稀释),  $4\text{ }^\circ\text{C}$  条件下湿盒中孵育过夜。PBS 缓冲液洗 3 次, 继续加入 Alexa Flour 488 标记的驴抗兔 IgG (1:100 稀释), 湿盒中  $37\text{ }^\circ\text{C}$  孵育 2 h, PBS 缓冲液洗 3 次, 激光共聚焦下观察并拍照。

### 2.2.3 红外光谱分析

胰酶消化 TSA 处理后的 HeLa 细胞, 收集细胞, 用 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 1% 甲醛固定细胞 30 min, 离心弃甲醛溶液, 洗涤细胞后再离心, 自然干燥, 采用 KBr 压片法制备红外光谱分析的细胞样品, 每个压片样品含细胞约为  $10^7$  个。每个处理重复 20 次, 制备 20 个 KBr 压片。光谱采集条件如下: 光谱范围  $900\sim 4000\text{ cm}^{-1}$ , 分辨率  $2\text{ cm}^{-1}$ , 扫描 128 次。

### 2.2.4 单细胞凝胶电泳检测

消化收集细胞, 用 PBS 调整细胞浓度为  $10^4$  个/mL 左右。配制 0.7% 正常熔点的琼脂糖凝胶, 立即倒入盛有磨砂载玻片的器皿中, 盖上盖玻片,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中冷却 10 min 后移去盖玻片。配制浓度为 0.5% 的低熔点琼脂糖凝胶, 置于  $37\text{ }^\circ\text{C}$  水浴锅中保温, 将细胞悬液与 0.5% 低熔点琼脂糖凝胶混合, 吸取该混合液滴加到第一层胶上, 盖上干净盖玻片, 置于  $4\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱 10 min 后取下盖玻片, 将含有细胞的载玻片放入细胞裂解液中,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  条件下裂解 2.5 h, 以纯水小心缓慢漂洗 2 次, 再将载玻片放入水平电泳槽, 使 DNA 在碱性介质中解旋 25 min, 25 V 条件下电泳 25 min 后浸没在中和液中 5 min, PI (10  $\mu\text{g/mL}$ ) 染色 10 min, 荧光显微镜下观察拍照。

### 2.2.5 平板克隆形成试验

细胞计数, 接种到  $\Phi 60\text{ mm}$  培养皿中 (每个处理重复 3 次)。每皿细胞接种量依次为 400, 400, 500, 600, 800 个, 对应的辐射剂量分别为 0, 1, 2, 4, 6 Gy。

待细胞贴壁后加入 TSA (浓度依次为 0, 25 和 200 nmol/L) 预处理培养 24 h, 吸掉含 TSA 的培养液, 进行  $\gamma$  射线辐照, 辐照剂量依次为 0, 1, 2, 4, 6 Gy, 辐照后添加新鲜无 TSA 的培养液, 培养箱中继续培养 2 周后, 肉眼可见明显的细胞克隆, 吸掉细胞培养液, Giemsa 染色, 计数大于 50 个细胞的克隆数。分别计算 0, 25 和 200 nmol/L TSA 处理的细胞克隆效率 (plating efficiency, PE), 然后根据各自的 PE 值统计经不同剂量 TSA 预处理后再进行辐照的细胞存活分数 (survival fraction, SF)。

## 3 结果与分析

### 3.1 细胞乙酰化水平分析

之前的研究发现当 TSA 处理细胞 24 h, 乙酰化水平变化程度较小<sup>[17]</sup>。因此本研究采用 200 nmol/L TSA 和更低剂量的 25 nmol/L TSA 分别处理 HeLa 细胞 24 h, 采用免疫荧光技术和红外光谱技术分析细胞的乙酰化水平, 并进行两种方法的比较分析, 目的是观察乙酰化水平增加较少时对细胞辐射敏感性的影响, 以及红外光谱是否能够表征较低的乙酰化水平。

因为 TSA 能够增加组蛋白和非组蛋白的乙酰化水平<sup>[8-10]</sup>, 图 1 的微管乙酰化水平分析代表了细胞的乙酰化水平变化趋势。分析中所用的一抗为兔抗乙酰化  $\alpha$ -微管蛋白单克隆抗体, 二抗为 Alex Flour 488 标记的驴抗兔 IgG, 因此乙酰化微管呈现绿色荧光。研究中特别采用 PI (10  $\mu\text{g/mL}$ ) 染色细胞核, 使其红色荧光衬托乙酰化微管的绿色荧光。激光共聚焦显微镜观察发现 25 nmol/L TSA 处理的细胞微管乙酰化水平与对照细胞相比有微弱荧光增强 (图 1(b)), 说明 25 nmol/L TSA 处理 24 h 后的乙酰化增加量较小。图 1(c) 中 200 nmol/L TSA 处理的细胞乙酰化水平与对照细胞相比有较明显增加, 说明乙酰化增加量较大。

### 3.2 不同剂量 TSA 处理细胞后的辐射敏感性光谱预测

图 2 为细胞经过 TSA 处理后的红外光谱。表面上看 25 和 200 nmol/L TSA 处理后的细胞红外光谱与对照细胞没有明显的区别。根据蛋白质乙酰化的化学反应, 赖氨酸残基上会增加乙酰化基团, 结果会增加  $\text{CH}_3$  基团的含量, 因此有必要对 C-H 振动区域进行进一步地

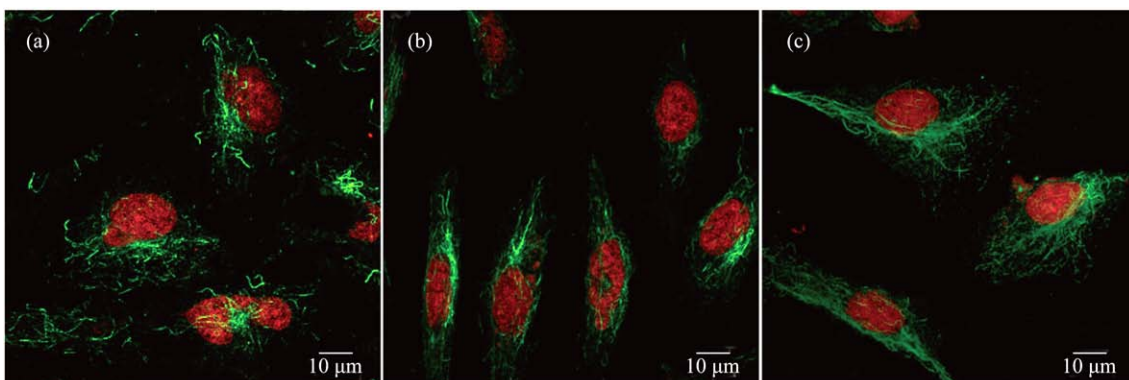


图 1 (在线彩图) TSA 处理 HeLa 细胞 24 h 后的微管乙酰化水平分析  
一抗为兔抗乙酰化  $\alpha$ -微管蛋白单克隆抗体, 二抗为 Alex Flour 488 标记的驴抗兔 IgG; a: Control; b: 25 nmol/L; c: 200 nmol/L。

分析。红外光谱中的 C-H 伸缩振动区域位于  $2800\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ , 直接观察只有 3 个峰位(图 2), 分别是  $2960, 2924$  和  $2853\text{ cm}^{-1}$ , 然而该谱带包含潜在的成分<sup>[18, 19]</sup>, 将  $2800\sim 3000\text{ cm}^{-1}$  区域进行光谱拟合, 结果  $\sim 2960\text{ cm}^{-1}$  归属于  $\text{CH}_3$  反对称伸缩振动,  $\sim 2874$  和  $\sim 2937\text{ cm}^{-1}$  归属于  $\text{CH}_3$  对称伸缩振动,  $\sim 2924\text{ cm}^{-1}$  归属于  $\text{CH}_2$  反对称伸缩振动,  $\sim 2853\text{ cm}^{-1}$  归属于  $\text{CH}_2$  对称伸缩振动(图 3(a))。本课题组已经采用  $A(\text{CH}_3)/A(\text{CH}_2)$  值, 即甲基与亚甲基伸缩振动强度比成功的表征了细胞经 TSA 处理后的乙酰化变化过程和效果<sup>[17]</sup>, 在本研究中继续利用该表征方法, 希望可以分析较低的乙酰化水平变化。

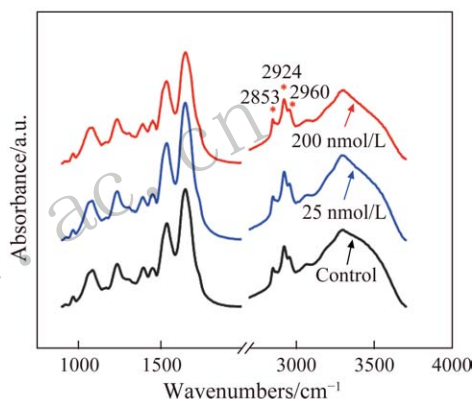


图 2 (在线彩图) HeLa 细胞经过 TSA 处理后的典型红外光谱

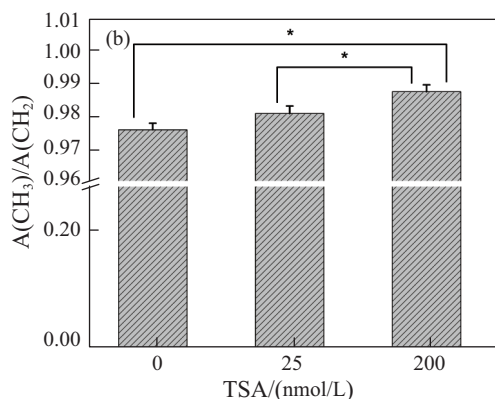
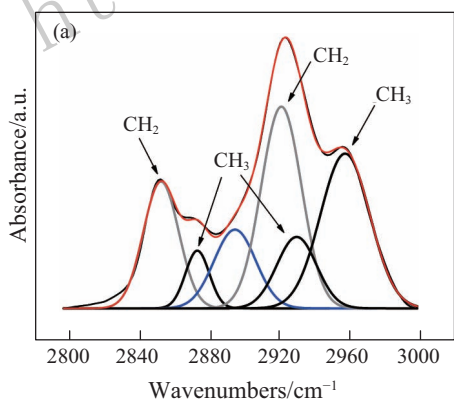


图 3 (在线彩图) TSA 处理 HeLa 细胞 24 h 的红外光谱  $\text{CH}_3$  和  $\text{CH}_2$  伸缩振动强度变化  
(a) 细胞红外光谱 C-H 振动区域曲线拟合结果; (b) 统计不同处理下细胞  $\text{CH}_3$  和  $\text{CH}_2$  伸缩振动强度之比;  
\* 代表具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

图 3(b) 显示当  $200\text{ nmol/L}$  TSA 处理细胞 24 h,  $A(\text{CH}_3)/A(\text{CH}_2)$  值相对于对照细胞有所增加, 具有显著性差异。然而当  $25\text{ nmol/L}$  TSA 处理细胞 24 h,  $A(\text{CH}_3)/A(\text{CH}_2)$  值增加不明显, 不具有显著性差异。说明红外光谱与免疫荧光的分析结果相同,

$A(\text{CH}_3)/A(\text{CH}_2)$  方法能够精确表征细胞中较低的乙酰化水平变化。

### 3.3 不同剂量 TSA 处理细胞后的辐射敏感性分析

因为 HDACi 的主要作用是增加细胞的乙酰化水平,

又因为HDACi作用下细胞的辐射敏感性增加,说明乙酰化在肿瘤细胞辐射敏感性中的作用至关重要<sup>[13]</sup>,因此预测红外光谱分析中的 $A(\text{CH}_3)/A(\text{CH}_2)$ 值增大时,细胞的辐射敏感性也将有所增加。那么细胞分别经过25 nmol/L和200 nmol/L TSA预处理24 h,再进行辐射的实际损伤效应是否和预测的结果相一致呢?

本研究中 $\gamma$ 射线的辐照剂量依次为0, 1, 2, 4, 6 Gy。单细胞凝胶电泳(彗星电泳)是检测细胞辐射损伤的经典方法之一,通常用于分析细胞内DNA的损伤断裂程度。图4显示200 nmol/L TSA预处理24 h后,伴随 $\gamma$ 射线辐照剂量的逐渐增加,DNA链损伤断裂程度越来越严重。

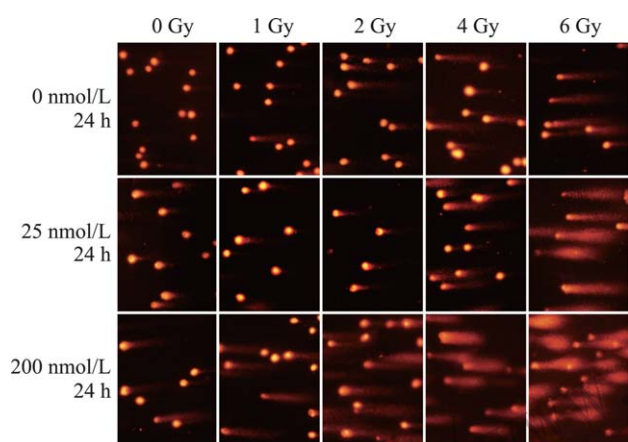


图4 (在线彩图)单细胞凝胶电泳(彗星电泳)分析 $\gamma$ 射线辐照后的DNA损伤断裂程度

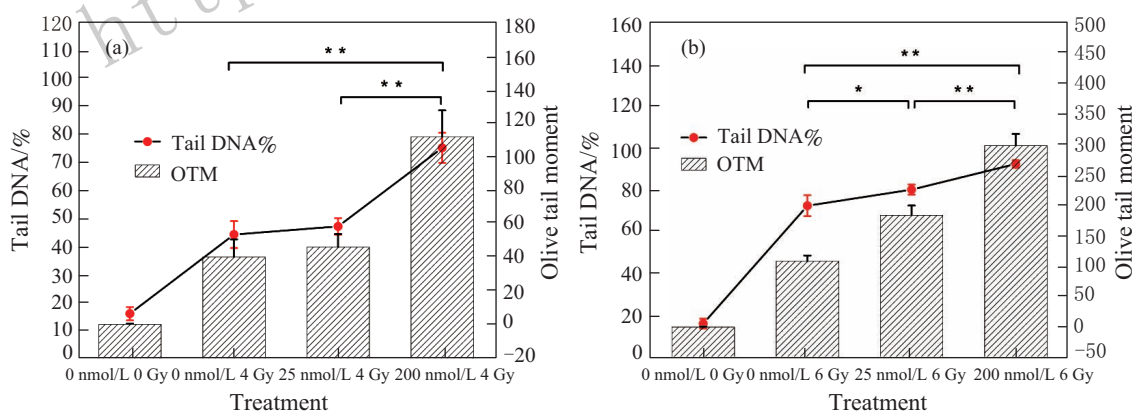


图5 (在线彩图)彗星尾部DNA含量和彗星Olive尾矩分析

(a)不同预处理后辐照4 Gy的彗星分析;(b)不同预处理后辐照6 Gy的彗星分析;

\*代表差异显著( $P < 0.05$ ); \*\*代表差异极显著( $P < 0.01$ )。

量越大效果越明显,25 nmol/L TSA预处理后细胞DNA链损伤断裂程度低于200 nmol/L TSA预处理的细胞,也即200 nmol/L TSA预处理24 h的细胞辐射敏感性高于25 nmol/L TSA预处理的细胞。这与我们

进一步采用CASP彗星图像分析软件对图4中辐照4和6 Gy的细胞进行分析,统计了彗星尾部DNA百分含量(Tail DNA%)和Olive尾矩(Olive tail moment, OTM)值的变化(图5)。Tail DNA%是衡量DNA损伤程度的重要指标,值越大,损伤越强;而OTM是综合评价DNA损伤的另一重要指标,该值越大,损伤也越强。图5(a)显示当0, 25和200 nmol/L TSA预处理细胞后进行4 Gy辐照,Tail DNA%以及OTM值呈现上升的趋势,特别当200 nmol/L TSA预处理细胞24 h,4 Gy辐照后,Tail DNA%以及OTM值与0及25 nmol/L预处理再进行辐照的细胞相比均差异非常显著。说明在较大剂量(200 nmol/L)TSA预处理下,辐照具有明显的增敏作用。进一步研究发现,随着辐照剂量的增加,TSA增敏作用更加明显。图5(b)显示当0, 25和200 nmol/L TSA预处理细胞后进行6 Gy辐照,Tail DNA%以及OTM值均呈现上升的趋势,特别当200 nmol/L TSA预处理细胞24 h,6 Gy辐照后,Tail DNA%以及OTM值与0及25 nmol/L预处理再进行6 Gy辐照的细胞相比均差异很显著,而0及25 nmol/L预处理再进行6 Gy辐照的细胞间虽有一些差异,但是与大剂量TSA处理相比,25 nmol/L TSA预处理对于6 Gy的辐照增敏作用要低于200 nmol/L TSA的预处理。

以上结果说明,TSA预处理后,细胞在较大剂量的辐照条件下,DNA链损伤断裂程度增加,并且TSA用

用 $A(\text{CH}_3)/A(\text{CH}_2)$ 值判断TSA作用下的细胞乙酰化程度,进而预测辐射敏感性的结果相一致。

本研究还采用平板克隆形成试验,进一步验证细胞的辐射敏感性变化,即:大剂量TSA预处理显著提高

细胞的辐射敏感性。图 6 统计了 0, 25 和 200 nmol/L TSA 处理后的细胞克隆效率 ( $PE = \text{克隆数} / \text{细胞接种数}$ )。结果显示: 200 nmol/L TSA 显著降低细胞的克隆效率, 说明 200 nmol/L TSA 对细胞的存活影响较大。因此, 可以根据不同剂量 TSA 处理后的 PE 值统计细胞辐照后的存活分数 (SF), 该 SF 值反映了细胞辐射敏感性的变化。图 7 显示了 SF 值随 TSA 剂量及辐射剂量的变化而发生的改变。图 7(a) 表明 200 nmol/L TSA 预处理 24 h, 细胞辐照后的存活分数低于未经 TSA 预处理直接进行辐照的对照细胞。因为图 4 显示 25 nmol/L 预处理 24 h 后, 辐射剂量在 4 Gy 和 6 Gy 才出现明显的 DNA 断裂损伤, 所以进一步采用 25 和 200 nmol/L 的 TSA 预处理细胞 24 h, 分别辐照 4 Gy 和 6 Gy 后统计细胞存活分数。图 7(b) 显示 200 nmol/L TSA 预处理 24 h 的细胞存活分数明显低于 25 nmol/L TSA 预处理的细胞, 说明 200 nmol/L TSA 预处理后细胞的辐射敏感性大于 25 nmol/L TSA 预处理后的细胞, 进一步

验证了之前的预测, 即乙酰化细胞中, 红外光谱的  $A(\text{CH}_3)/A(\text{CH}_2)$  值增大, 细胞的辐射敏感性可能也增高。

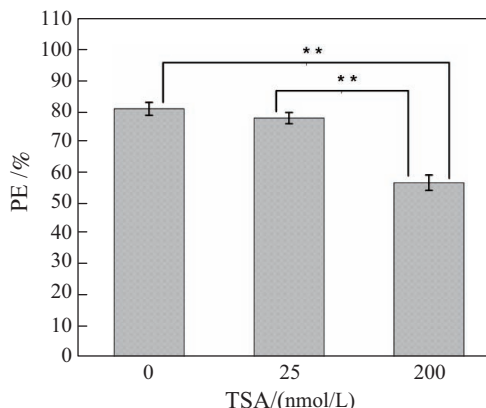


图 6 不同剂量TSA处理HeLa细胞24 h的平板克隆效率 (PE)  
\*\* 代表差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

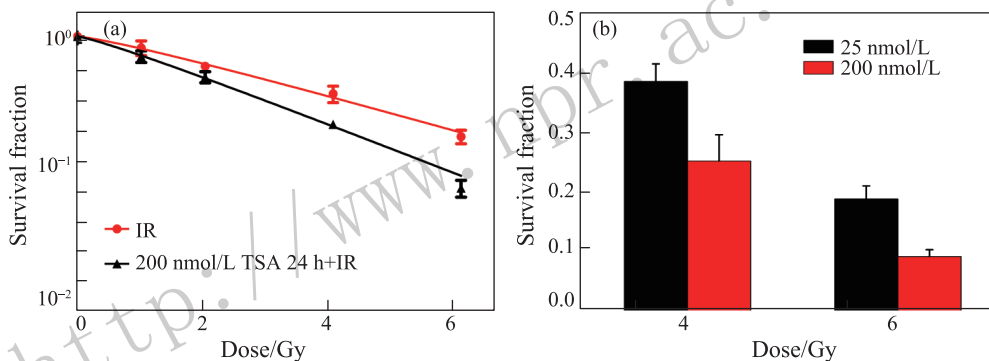


图 7 (在线彩图) HeLa 细胞经过 TSA 预处理 24 h 再进行  $\gamma$  射线辐照的存活分数

综合上述的实验结果, 表明红外光谱成功表征了细胞的乙酰化水平, 可以用做细胞辐射敏感性的辅助预测手段。

### 4 讨论

乙酰化水平的增加又是如何增强了细胞的辐射敏感性呢? 目前普遍认为如果 DNA 被蛋白质所包绕或结构比较致密的情况下, 受到自由基攻击的程度就会减轻, 相应引起的损伤就会减少<sup>[20]</sup>。实验也已证明染色质聚缩状态下可以保护 DNA, 防止  $\gamma$  射线辐射所引起的双链断裂损伤<sup>[21, 22]</sup>。Takata 等<sup>[23]</sup>进一步实验发现, 电离辐射后, 疏松伸展状态的 DNA 双链断裂的频率竟然是聚缩状态 DNA 的 5~50 倍。所以在恶性肿瘤中, 过度的组蛋白去乙酰化导致染色体聚缩凝聚在一起, 对放射线具有很强的抵抗作用。而组蛋白的乙酰化作用, 中和了组蛋白上的部分正电荷, 削弱了 DNA 与组蛋白间

的静电吸引作用, 有利于 DNA 构象展开, 原本聚缩的染色质将变得疏松<sup>[24, 25]</sup>, 从而增加了 DNA 链的损伤断裂程度。

此外大量的研究证据显示, HDACi 在抑制肿瘤细胞增殖的同时, 也抑制了细胞内 DNA 损伤断裂修复通路上部分基因的表达, 造成 DNA 双链断裂不能有效及时地被修复, 使肿瘤细胞内的 DNA 损伤蓄积, 显著增强了肿瘤细胞对放、化疗敏感性<sup>[26, 27]</sup>, 其具体影响机制也越来越受到学者们的关注。目前一致认为真核细胞内 DNA 双链断裂修复主要依赖两条途径: 同源重组 (homologous recombination, HR) 和非同源末端连接 (nonhomologous end joining, NHEJ)。Rad51 及 DNA-PKcs 被认为是 DNA 损伤修复通路的效应器, 分别在 HR 和 NHEJ 修复途径中起着至关重要的调控作用。通常辐照可诱导这两种基因表达上调, 而 Chinnaiyan 发现, SAHA 处理前列腺癌和胶质

瘤细胞, 将抑制修复蛋白的表达<sup>[28]</sup>, Valproic acid (VPA) 处理食管癌细胞后, Rad51 蛋白表达水平显著下调<sup>[29]</sup>, 丁酸钠处理黑色素瘤细胞, NHEJ 修复途径中关键蛋白因子表达水平均下降, 说明 HDACi 通过抑制修复通路中相关因子的表达, 从而影响 DNA 双链断裂的修复。此外 Soutoglou 等<sup>[30]</sup>提出, 核心组蛋白去乙酰化的过程是 DNA 双链断裂修复所必须的, 认为当 DNA 断裂发生, 大量组蛋白去乙酰化酶聚集到 DNA 双链断裂处, 使 DNA 链断裂附近的组蛋白发生去乙酰化, 使得染色质结构进一步被压缩, 缩短 DNA 链断裂的物理距离, 使断裂更易于修复。Miller 等<sup>[31]</sup>的研究也认为, 大量 HDACs 将迅速定位于 DNA 双链断裂处, 而 HDACi 的加入使组蛋白的乙酰化程度增加, 加大了 DNA 链两断端的距离, 从而使 DNA 链断裂的损伤灶暴露, 阻碍了正常的损伤修复过程。

## 5 结论

组蛋白的乙酰化作用可能通过使紧缩的核小体变得松弛来增强肿瘤细胞的辐射敏感性, 如果能够通过乙酰化水平的分析提前预测乙酰化细胞的辐射敏感性变化对于肿瘤的临床放射治疗具有重要的意义。本研究采用红外光谱技术表征细胞内的较低乙酰化水平, 实验结果与免疫荧光的方法相同。说明红外光谱可以灵敏地探测到细胞内的乙酰化水平变化, 通过光谱分析  $A(\text{CH}_3)/A(\text{CH}_2)$  值的变化来预测乙酰化细胞的辐射敏感性变化, 并进行实验验证该预测。结果表明, 细胞经过 TSA 预处理后会增加  $A(\text{CH}_3)/A(\text{CH}_2)$  值, 比值增加得越多, DNA 链断裂就越多, 细胞存活分数也就越低, 说明 TSA 的预处理增加了细胞的辐射敏感性, 也进一步说明红外光谱技术可以用作乙酰化处理后细胞辐射敏感性的辅助预测手段。

## 参考文献:

- [1] WASON M S, COLON J, DAS S, *et al.* Nanomedicine Nanotechnology Biology & Medicine, 2013, **9**(4): 558.
- [2] LAWRENCE Y R, LI X A, EI N I, *et al.* International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 2010, **76**(Suppl 3): S20.
- [3] SHA K, WINN L M. Birth Defects Research Part B Developmental & Reproductive Toxicology, 2010, **89**(2): 124.
- [4] ENTIN-MEER M, REPHAELI A, YANG X, *et al.* Molecular cancer therapeutics, 2005, **4**(12): 1952.
- [5] MUNSHI A, KURLAND J F, NISHIKAWA T, *et al.* Clinical Cancer Research, 2005, **11**(13): 4912.
- [6] JUNG M, VELENA A, CHEN B, *et al.* Radiation Research, 2005, **163**(5): 488.
- [7] ZHANG Y, JUNG M, DRITSCHILO A, *et al.* Radiation Research, 2004, **161**(6): 667.
- [8] VIGUSHIN D M, ALI S, PACE P E, *et al.* Clinical Cancer Research, 2001, **7**(4): 971.
- [9] YOSHIDA M, HOSHIKAWA Y, KOSEKI K, *et al.* Journal of Antibiotics, 1990, **43**(9): 1101.
- [10] WHARTON W, SAVELL J, CRESS W D, *et al.* Journal of Biological Chemistry, 2000, **275**(43): 33981.
- [11] KIM J H, KIM I H, SHIN J H, *et al.* Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association, 2013, **45**(4): 334.
- [12] ZHANG F, ZHANG T, TENG Z H, *et al.* Cancer biology & therapy, 2009, **8**(9): 823.
- [13] HSIAO K Y, MIZZEN C A. Journal of Molecular Cell Biology, 2013, **5**(3): 157.
- [14] ZILBERMAN Y, BALLESTREM C, CARRAMUSA L, *et al.* Journal of Cell Science, 2009, **122**(19): 3531.
- [15] MATSUYAMA A, SHIMAZU T, SUMIDA Y, *et al.* EMBO journal, 2002, **21**(24): 6820.
- [16] GASPER R, MIJATOVIĆ T, BÉNARD A, *et al.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2010, **1802**(11): 1087.
- [17] ZHANG F, HUANG Q, YAN J, *et al.* Analytical chemistry, 2015, **87**(4): 2511.
- [18] HILL I R, LEVIN I W. Journal of Chemical Physics, 1979, **70**(2): 842.
- [19] MICHAELIAN K H, ZHANG S L, HALL R H, *et al.* Canadian Journal of Analytical Sciences & Spectroscopy, 2001, **46**(1): 10.
- [20] XIA Shouxuan. Radiobiology [M]. Beijing: Military Medical Science Press, 1998: 243. (in Chinese)  
(夏寿萱. 放射生物学[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998: 243.)
- [21] WARTERS R L, NEWTON G L, OLIVE P L, *et al.* Radiation Research, 1999, **151**: 354.
- [22] DOUKI T, BRETONNIERE Y, CADET J. Radiation Research, 2000, **153**(1): 29.
- [23] TAKATA H, HANAFUSA T, MORI T, *et al.* PloS one, 2013, **8**(10): e75622.
- [24] STRAHL B D, ALLIS C D. Nature, 2000, **403**(6765): 41.
- [25] GREGORY P D, WAGNER K, HÖRZ W. Experimental Cell Research, 2001, **265**(2): 195.
- [26] SHUBASSI G, ROBERT T, VANOLI F, *et al.* Cancer Research, 2012, **72**(6): 1332.
- [27] CHAUHAN D, TIAN Z, ZHOU B, *et al.* Clinical Cancer Research, 2011, **17**(16): 5311.
- [28] CHINNAIYAN P, VALLABHANENI G, ARMSTRONG E, *et al.* International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 2005, **62**(1): 223.
- [29] SHOJI M, NINOMIYA I, MAKINO I, *et al.* International Journal of Oncology, 2012, **40**(6): 2140.
- [30] SOUTOGLU E, DORN J F, SENGUPTA K, *et al.* Nature Cell Biology, 2007, **9**(6): 675.
- [31] MILLER K M, TJEERTES J V, COATES J, *et al.* Nat Struct Mol Biol, 2010, **17**(9): 1144.

# Prediction of Radiosensitivity of Acetylated Cell Through FTIR Spectroscopy

ZHANG Fengqiu<sup>1,2,3</sup>, HUANG Qing<sup>1,2,†</sup>

(1. School of Nuclear Science and Technology, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;

2. Institute of Technical Biology and Agriculture Engineering, Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China;

3. School of Physical Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** Histone acetylation is one of important epigenetic modifications, and histone in most of tumor cells shows low acetylation state. However, histone deacetylase inhibitor (HDACi) can correct abnormal acetylation status, induce cell cycle arrest and apoptosis. Trichostatin A (TSA) is one of the representatives of histone deacetylase inhibitors, which can inhibit histone deacetylase, increase the acetylation level of histone and nonhistone in cell. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy is a powerful analytical tool which can detect nondestructively, qualitatively and quantitatively biological samples without bio-tagging and bio-labeling. FTIR spectroscopy technology has multiple advantages, including finger-print characteristics, rapid analysis, high resolution and good repeatability. Therefore, it has been widely used in the research of biological processes. This work applied FTIR spectroscopy to study the changes in cells treated with TSA, compared the acetylation level according to FTIR intensity ratio of methyl to methylene stretching vibration, and based on the FTIR analysis predicted the radiosensitivity of the cells with different acetylation levels. As a result, we have verified that the damage caused by radiation in acetylated cells can be evaluated by the ratio of methyl and methylene intensity which is positively correlated with cellular radiosensitivity. Therefore, this work demonstrates that FTIR spectroscopy can be useful for the prediction of radiosensitivity and may also open a door for the study of relationship between epigenetics and radiation bio-effects.

**Key words:** FTIR; cell; epigenetics; acetylation; Trichostatin A; radiosensitivity

---

**Received date:** 2 Nov. 2016; **Revised date:** 11 Nov. 2016

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (11475217, 11635013); Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Sciences (XDA08040107)

† **Corresponding author:** HUANG Qing, E-mail: [huangq@ipp.ac.cn](mailto:huangq@ipp.ac.cn).