

# X 线对舌鳞癌细胞系 Tca8113 端粒长度影响的动态观察

谢 谦<sup>1</sup>, 黄洪章<sup>1</sup>, 魏 菁<sup>2</sup>, 毛永林<sup>3</sup>, 胡晓文<sup>1</sup>, 余东升<sup>1</sup>

(中山大学附属第二医院 1. 口腔颌面外科, 2. 林百欣医学研究中心, 3. 肿瘤科, 广东 广州 510120)

**摘 要:** 【目的】探讨放射线对人舌鳞癌细胞系 Tca8113 端粒长度变化的影响。【方法】采用流式原位杂交法(FLOW-FISH)检测 Tca8113 细胞的端粒相对长度(RTL)。【结果】与未照射细胞相比,经 X 线处理后,Tca8113 细胞 RTL 值明显下降( $P < 0.05$ );在照射后 1 h 至 3 h 间,不同照射剂量的细胞 RTL 值均有一定程度上升,5 h 时,除 2 Gy 组外,其它各照射剂量组的 RTL 值均下降。【结论】经 X 线照射后,Tca8113 细胞端粒明显缩短。端粒缩短可能是放射损伤的机制之一。

关键词 端粒; 荧光原位杂交; 流式细胞术; X 线

中图分类号:R73

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2004)05-0454-04

## Dynamic Observation on Effect of X-ray on Telomere Length in Squamous Cell Carcinoma Tongue Tca8113 Cell Line

XIE Qian<sup>1</sup>, HUANG Hong-zhang<sup>1</sup>, WEI Jing<sup>2</sup>, MAO Yong-lin<sup>3</sup>, HU Xiao-wen<sup>1</sup>, YU Dong-sheng<sup>1</sup>

(1. Department of Oral &amp; Maxillofacial Surgery, 2. Lin Bai-xin Research Center, 3. Department of Oncology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** 【Objective】To investigate the effects of radiation on telomere length dynamics in squamous cell carcinoma tongue Tca8113 cell line. 【Methods】Telomere length was detected in cultural cells of Tca8113 by FLOW-FISH and the relative telomere length (RTL) was analyzed.

【Results】RTL values of Tca8113 cells incubated for various periods after exposure to various doses of X-ray radiation were much lower than those of non-irradiated cells ( $P < 0.05$ ). After incubation for 1h to 3h, RTL values of Tca8113 cells treated with various doses of X-ray irradiation rose to a certain extent. RTL values of the cells incubated for 5h after radiation decreased except the group of 2 Gy.

【Conclusion】The obvious shortening telomeres are observed in Tca8113 cells treated with X-ray radiation. Telomere shortening may be one of the causes of radiation damage.

**Key words:** telomeres; fluorescence *in situ* hybridization; flow cytometry; X-ray

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(5): 454 - 457]

端粒是位于真核细胞染色体末端的特殊蛋白结构,对维持线性染色体的稳定性至关重要,与衰老、肿瘤密切相关<sup>[1]</sup>。端粒的长度反映着细胞的复制潜力,被称为细胞的“有丝分裂钟”(mitotic clock)<sup>[2]</sup>。正常体细胞因有丝分裂不断进行而端粒长度不断缩短,最终失去分裂能力。恶性肿瘤细胞

的生存虽然也依赖于端粒长度的稳定,但与正常体细胞相比,大多数恶性肿瘤细胞的端粒长度较其相应正常细胞缩短,且其长度可由端粒酶调控和替代性端粒延长机制(Alternative lengthening of telomeres, ALT)<sup>[3]</sup>来维持。放射治疗仍是目前治疗恶性肿瘤的主要手段之一,最近有研究表明端粒是放射

收稿日期 2004-03-15

作者简介 谢 谦(1971-),女,湖南涟源人,博士生,主治医师;黄洪章,教授,导师,通讯作者。E-mail: huang hongzhang@tom.com

线诱导基因组不稳定的重要靶结构之一<sup>[4,5]</sup>。端粒长度与细胞生命密切相关,有关放射线对端粒长度影响的报道少见。因此,本实验拟从端粒长度着手,用流式原位杂交法(FLOW-FISH)检测经X线处理后人舌鳞状细胞癌细胞系 Tca8113 的端粒相对长度(relative telomere length,RTL),研究X线对口腔鳞癌细胞端粒长度变化的影响,试图从端粒角度解释放射损伤机制,以利于进一步研究以端粒为靶点的抗肿瘤策略。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人舌鳞状细胞癌细胞系 Tca8113,上海第二医科大学口腔医学院建立,本室保存;人宫颈癌细胞株 HeLa 由中山大学附属第二医院医学研究中心保存;细胞培养基 DMEM (低糖型)购自 GIBCO 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物材料研究所;用于流式细胞仪检测的 Telomere PNA kit/FITC 购自丹麦 DAKO 公司;PRIMVS 型 6MV-X 线直线加速器为德国 SIEMENS 公司产品;FAC-SCalibur 型流式细胞分析仪为美国 BECTON DICKINSON 公司产品。

### 1.2 细胞培养与分组

Tca8113 细胞、HeLa 细胞培养于 DMEM + 胎牛血清 (100 mL/L) 中,在 37℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养传代。放射前 48 h Tca8113 细胞按 2 × 10<sup>6</sup>/瓶接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,并于照射前 24 h 换液。根据 X 线给予量分 5 组,单次照射剂量分别为 2、4、8、12、20 Gy。对照组和 HeLa 细胞不受 X 线照射。

### 1.3 照射条件

选择处于指数生长期的细胞,使用 6MV-X 直线加速器进行照射。剂量率 2 Gy/min,源皮距 100 cm,射野大小为 10 cm × 10 cm,照射时于培养瓶内加培养液至 40 mL (相当于瓶上置 1.5 cm 厚的等效蜡板),旋紧瓶口。实测细胞平面百分剂量为 100%。

### 1.4 样品收集

于照射后 0.5、1、3、5 h 收集细胞 (含培养上清液内细胞),每个剂量组分别收集 3 瓶,磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗 1 次,制成单细胞悬液,加二甲基亚砜

(DMSO) (100 mL/L) 冻存于 -80℃,待样品收集齐全后一次完成所有测试。HeLa 细胞不受照射,同法收集,包括 2 份作为荧光质控品的样品。

### 1.5 原位杂交

取冻存细胞在 37℃ 水浴箱中快速解冻,制成单细胞悬液,每一样品分别取 4 支离心管,分别加入 1 × 10<sup>6</sup> 个细胞,加 1 mL PBS,500 × g 离心 (1-13 台式常温高速离心机, SIGMA 公司) 5 min,弃上清;随机取 2 管细胞标记为杂交管,加入 300 μL 含异硫氰荧光素标记的 (CCCTAA)<sub>3</sub> 端粒 DNA 序列特异性探针 [FITC-(CCCTAA)<sub>3</sub>-DNA probe] 杂交液,另 2 管标记为背景管,加入 300 μL 不含探针的杂交液,振荡混匀,82℃ 避光孵育,变性 10 min;再次振荡混匀,室温避光杂交过夜;次日加入 1 mL 洗液洗涤细胞,振荡混匀,40℃ 孵育 10 min,再次混匀,500 × g 离心 5 min,弃上清,重复洗涤 1 次;加入 0.5 mL DNA 染液 (碘化丙啶,PI),混匀,4℃ 避光染色孵育 3 h,300 目筛网过滤后进行流式细胞仪测定。

### 1.6 流式细胞仪测定

在流式细胞仪上通过光电倍增管 FL1 通道 (带通滤光片为 514 nm) 检测 FITC 荧光强度,通过光电倍增管 FL2 (带通滤光片为 460 nm) 检测 PI 荧光强度;用对数 FL1 和线性 FL2 散点图分析细胞的平均 FITC 荧光强度 (图 1),端粒相对长度按下式计算:

$$RTL = [(\text{含探针 Tca8113FL1 平均荧光强度} - \text{不含探针 Tca8113FL1 平均荧光强度}) \times \text{HeLa DNA 指数}] / [(\text{含探针 HeLaFL1 平均荧光强度} - \text{不含探针 HeLaFL1 平均荧光强度}) \times \text{Tca8113 DNA 指数}]$$

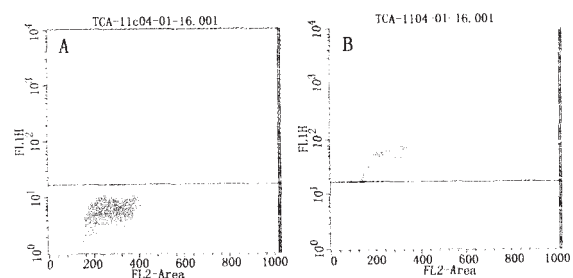


图 1 杂交散点图

Fig. 1 Dot plots of FL1-height vs FL2-area of Tca8113 cells

A. hybridized with hybridization solution without telomere DNA probe. B. hybridized with telomere DNA probe/FITC in hybridization solution

RTL 数值表示通过荧光强度表示的 Tca8113 细胞中染色体的端粒与 HeLa 细胞端粒长度的比值。每一样品均重复测定 1 次,取均值。

1.7 统计学分析

所有统计数据以均数 ± 标准差表示,使用 SPSS10.0 for Windows 统计软件进行分析。两样本间比较采用成组 t 检验。

2 结果

2.1 荧光质控品的批内重复性比较

本实验所有样品均为一次测定完成,故不存在批间变异,而批内变异成为实验误差的主要来源。为了消除批内变异的干扰,本实验另取 2 份 HeLa 样品作为荧光质控品,从开机到测试结束,每隔 1 h 重复测定 1 次,发现两份样品的荧光强度变异不大,证明仪器性能稳定,能满足实验。

2.2 放射前后 Tca8113 细胞端粒长度的变化

放射前后 Tca8113 细胞端粒相对长度的变化见表 1。

表 1 经 X 线照射后不同时间点 Tca8113 细胞端粒相对长度比较

Table 1 RTL values of Tca8113 cells incubated for various periods after exposure to X-ray irradiation

| Groups          | 0.5 h                         | 1 h                           | 3 h                           | 5 h                           |
|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Non-irradiation | 2.870 4 ± 0.006               | 2.867 4 ± 0.009               | 2.867 9 ± 0.001               | 2.870 2 ± 0.006               |
| Irradiation     | 1.917 8 ± 0.532 <sup>1)</sup> | 1.230 9 ± 0.048 <sup>2)</sup> | 1.594 9 ± 0.159 <sup>3)</sup> | 1.107 7 ± 0.236 <sup>4)</sup> |

Compared with non-irradiation group, 1) *t* = 6.933, *P* < 0.05; 2) *t* = 131.015, *P* < 0.05; 3) *t* = 30.918, *P* < 0.05; 4) *t* = 28.910, *P* < 0.05

2.3 RTL 与照射剂量及照射后时间的关系

经不同剂量 X 线照射后,RTL 值均明显下降。除 2 Gy 组在照射后的 5 h 内 RTL 值呈缓慢上升外,其余各组 RTL 值在 1 h 时均继续下降,3 h 时 RTL 值有所上升,5 h 又下降至更低。其中 2 Gy 和 4 Gy 组在照射后 0.5 h 时较其它各剂量组下降更明显(图 2)。

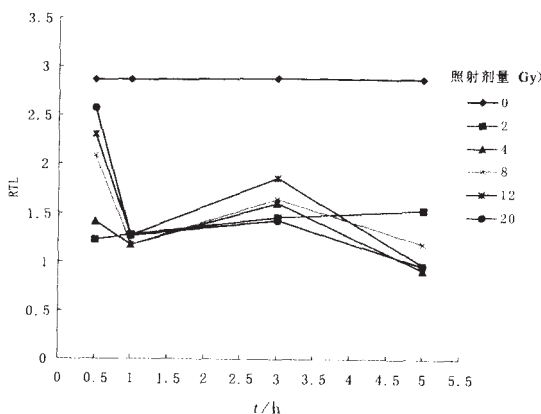


图 2 各种照射剂量组的 RTL 值与照射后时间的关系

Fig. 2 Relationship between RTL values of Tca8113 cells incubated for various periods after irradiation and various doses of X-ray irradiation

3 讨论

FLOW-FISH 法是近年发现的测量端粒长度的

一种新方法,它结合荧光原位杂交法和流式细胞术,检测原理主要是根据端粒由高度重复序列 TTAGGG 组成,其长度越长,所含重复序列数目就越多,所结合的 FITC-(CCCTAA)<sub>3</sub>DNA 探针也越多,荧光就越强;此外,每个细胞的染色体数目越多,端粒就越多,荧光也越强。以往测量端粒长度的经典方法是 Southern 印迹法,该法虽准确可靠,但费时费力,且受同位素污染,不适于大样本批量检测。近年来的研究表明,FLOW-FISH 法可测出小于 3 kb 的端粒差,灵敏度大大提高,且简便、快速、重复性好,与 Southern 印迹法的结果相关良好<sup>[6-9]</sup>。FLOW-FISH 法还可用于临床标本的批量检测,应用前景较好。

本研究采用 FLOW-FISH 法检测了 Tca8113 细胞端粒长度,比较了 X 线照射前后及不同剂量 X 线照射后 0.5 h、1 h、3 h、5 h 端粒长度的变化,首次从端粒角度证明放射线对舌鳞癌细胞生存的影响。由于细胞每分裂一次,端粒缩短 50 ~ 200 bp,当端粒缩短到临界水平(*Q* ~ 4 kb),染色体末端原来被掩藏的重要遗传信息被暴露,细胞将失去分裂能力,提示端粒长度可作为细胞潜在复制能力的标志<sup>[10]</sup>。本研究发现,经放射线处理后继续培养不同时间的细胞的 RTL 值均较未照射细胞明显下降 (*P* < 0.05),说明细胞端粒长度明显缩短,能继续进行有丝分裂的次数将会减少,此时,端粒合成与

丢失的平衡一旦破坏,细胞将会较快地趋向死亡。在放射线处理后 0.5 h,各照射剂量组的 RTL 值出现不同程度下降,其中 2 Gy 和 4 Gy 组下降较快,表现出明显的即刻效应;1 h 时,除 2 Gy 组外,其余 4 组端粒长度继续缩短,说明大剂量放射线对端粒的损伤仍在延续;而在 1 h 至 3 h 间端粒又不同程度地延长,一方面可能是放射线造成一部分细胞处于亚致死损伤状态,在没有进一步的追加损伤时,这些细胞可在 1 h 内进行局部修复:有实验证明在照射后 40 min 之内 DNA 的断链大部分已经重新连接<sup>[11]</sup>;另一方面可能与细胞受照射刺激后的代偿性适应有关,有人用标记化合物掺入 DNA 的灵敏指标来观察照射后短时间内 DNA 合成受抑及恢复的规律,发现不同辐射剂量照射后 DNA 表现了 3 h 的暂时性代偿适应过程<sup>[11]</sup>。3 h 后端粒又进一步缩短,可能与潜在致死损伤细胞因端粒缩短未能及时延长,继续走向死亡有关。然而,本实验仅是从端粒角度研究放射线对细胞影响的开端,端粒长度的变化与细胞内端粒酶、端粒相关蛋白调控密切相关,放射线如何对端粒维持机制起作用,从而影响细胞的生存将是后续的研究课题。

## 参考文献:

- [1] Sharpless N E, DePinho R A. Telomeres, stem cells, senescence, and cancer [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113 (2): 160-8.
- [2] Harley C B, Futcher A B, Greider C W, *et al.* Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts [J]. *Nature*, 1990, 345(6274): 458-60.
- [3] Reddel R R, Bryan T M, Colgin L M, *et al.* Alternative lengthening of telomeres in human cells[J]. *Radiat Res*, 2001, 155(1Pt2): 194-200.
- [4] Undarmaa B, Kodama S, Suzuki K, *et al.* X-ray-induced telomeric instability in ATM-deficient mouse cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 315(1): 51-8.
- [5] Urushibara A, Kodama S, Suzuki K, *et al.* Involvement of telomere dysfunction in the induction of genomic instability by radiation in SCID mouse cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(4): 1037-43.
- [6] Hultdin M, Gronlund E, Norrback K F, *et al.* Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry[J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(16): 3651-6.
- [7] Lauzon W, Sanchez Dardon J, Cameron D W, *et al.* Flow cytometric measurement of telomere length [J]. *Cytometry*, 2000, 42(3): 159-64.
- [8] Law H, Lau Y. Validation and development of quantitative flow cytometry-based fluorescence *in situ* hybridization for intercenter comparison of telomere length measurement[J]. *Cytometry*, 2001, 43(2): 150-3.
- [9] Suleman S. Telomere length analysis as a novel diagnostic test for bladder cancer[J]. *Enquiries Interdisciplinary Studies for High School Students*, 2003, 1(1): 1-5.
- [10] Counter C M, Hirte H W, Bacchetti S, *et al.* Telomerase activity in human ovarian carcinoma[J]. *PNAS USA*, 1994, 91(8): 2900-4.
- [11] 苏燎原. 淋巴细胞及其辐射效应 [M]. 北京:原子能出版社, 2000. 66-8.
- (编辑 刘清海)
- 
- (上接第 453 页 from page 453)
- Circulation, 1991, 84(4): 1662-6.
- [2] Stroth U, Unger T. The rennin-angiotensin system and its receptors[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1999, 33(Supp 1): S21-8.
- [3] Pitt B, Poole-Wilson P A, Segal R, *et al.* Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomized trial—the Losartan Heart Failure Survival Study—ELITE II [J]. *Lancet*, 2000, 355 (9215): 1582-7.
- [4] Luft F C. Mechanisms of cardiovascular damage in hypertension[J]. *Hypertension* 2001, 37(part 2): 594-8.
- [5] 高修仁,刘思明,马虹等. 阵发性心房颤动者心房内及房室结电生理特性[J]. *中山医科大学学报*, 2001, 22 (1): 51-3.
- [6] 郭志坤,葵新华,文小军等. 心房颤动的细胞形态学基础 [J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 1998, 12(1): 23-5.
- [7] Kumagai K, Nakashima H, Urata H, *et al.* Effect of angiotensin II type 1 receptor antagonist on electrical and structural remodeling in atrial fibrillation[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41(12): 2197-204.
- [8] Komatsu T, Nakamura S, Suzuki O, *et al.* Long-term efficacy of combination therapy using anti-arrhythmic agents and angiotensin converting enzyme inhibitor in patients with paroxysmal and persistent atrial fibrillation: importance of the timing of administration[J]. *J Cardiol*, 2003, (2): 73-80.
- (编辑 黄小延)