

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.07.006

酪氨酸激酶 Etk/BMX 对鼻咽癌细胞放射敏感性的影响

张振华¹, 张 健², 郭琳琅³, 朱伟良², 苏 珊², 肖明星², 李 岩²

Effects of Tyrosine Kinase Etk/BMX on Radiosensitivity of Nasopharyngeal Carcinoma Cell Lines

ZHANG Zhen-hua¹, ZHANG Jian², GUO Lin-lang³, ZHU Wei-liang², SU Shan², XIAO Ming-xing², LI Yan²

1. Department of Oncology, People's Hospital of Ningguo, Ningguo 242300, China; 2. Department of Oncology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, 3. Department of Pathology

Corresponding Author: GUO Lin-lang, E-mail: linlangg@yahoo.com

Abstract: Objective To study the relationship between the tyrosine kinases Etk/BMX and radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells. **Methods** Recombinant plasmid pcDNA3.0-Etk was transfected into Sune-1, and Etk was highly expressed in the transfected cell line Sune-wt. After 0, 2, 4, 10, 15Gy X ray radiation, MTT was used to measure survival fraction(SF) and flow cytometer (FCM) assay to examine cell apoptosis rate, cell cycle, proliferation index(PI), and apoptosis-related protein p53 and bcl-2. **Results** After different X ray radiations the survival fraction of Sune-wt were all higher than those of Sune-1 and Sune-vector($P < 0.05$). The cell apoptosis rate of Sune-wt were all dramatically lower than those of Sune-1 and Sune-vector($P < 0.05$). There was S, G₂ phase blockage and highly up-regulated of proliferation index in Sune-wt after 15 Gy irradiation dosages. Moreover, there were significantly different expression of p53 and bcl-2 in Sune-wt after 15Gy irradiation ($P < 0.05$). **Conclusions** This study suggested that Etk/BMX played an important role in protecting nasopharyngeal carcinoma cells from X ray irradiation. Its mechanics may be related to p53 and bcl-2 changing and S, G₂ phase blockage.

Key words: Nasopharyngeal carcinoma; Etk/BMX; Radiosensitivity

摘要:目的 研究酪氨酸激酶 Etk/BMX 对鼻咽癌细胞放射敏感性的影响并探讨其可能机制。**方法** 利用脂质体 2000 将野生型酪氨酸激酶 Etk/BMX 表达质粒 pcDNA3.0-Etk 导入 Etk/BMX 低表达水平的鼻咽癌细胞株 Sune-1 中, 建立 Etk/BMX 稳定高表达细胞株 Sune-wt, 空质粒 pcDNA3.0 转染细胞作为对照(Sune-vector)。X 射线(0、2、4、10、15Gy)照射后, MTT 法测定细胞的生存分数(survival fraction, SF); 流式细胞术检测细胞的凋亡率、细胞周期、增殖指数以及凋亡相关蛋白 p53 和 bcl-2 的变化情况。**结果** 不同剂量 X 线照射后 Sune-wt 较 Sune-1 和 Sune-vector 生存分数(SF)均显著增高而凋亡均显著减少($P < 0.05$), 累计剂量 15Gy 后出现明显 S, G₂ 期阻滞, 增殖指数增高。Sune-wt 照射前后 p53 和 bcl-2 的表达水平出现显著改变($P < 0.05$)。**结论** Etk/BMX 有增强鼻咽癌细胞对放射线的抵抗作用, 其可能是通过调控 p53 和 bcl-2 的表达以及引起 S, G₂ 期阻滞两种途径实现的。

关键词: 鼻咽癌; Etk/BMX; 放射敏感性

中图分类号:R739.63 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2010)07-0754-05

0 引言

鼻咽癌(Nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是

中国华南地区高发肿瘤之一, 其重要治疗手段是放疗。部分鼻咽癌患者出现肿瘤复发, 其主要原因是癌细胞对放射线产生抵抗性, 具体机制目前尚不十分清楚。

内皮/上皮细胞酪氨酸激酶 (The endothelial/epithelial tyrosine kinase, Etk/BMX), 属于蛋白酪氨酸激酶(Bruton's tyrosine kinase, Btk)家族。Etk 是其中唯一一种不仅分布于淋巴造血细胞, 还在上

收稿日期:2009-03-13;修回日期:2009-09-16

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(020061)

作者单位:1. 242300 安徽省宁国市人民医院肿瘤科;

2. 南方医科大学附属珠江医院肿瘤中心, 3. 病理科

通信作者:郭琳琅, E-mail: linlangg@yahoo.com

作者简介:张振华(1981-), 男, 硕士, 住院医师, 主要从事肿瘤放射敏感的研究

皮性瘤细胞和血管内皮细胞中表达的非受体类酪氨酸激酶^[1]。国外学者在前列腺癌和乳腺癌中研究发现:野生型 Etk 高表达可以明显抑制癌细胞凋亡,提高细胞生存分数^[2-4]。研究显示 Etk 在部分鼻咽癌细胞中出现异常高表达^[5]。本次实验旨在利用 Etk/BMX 稳定高表达细胞株(Sune-wt),研究 Etk/BMX 对鼻咽癌细胞放射敏感性的影响,为探讨鼻咽癌放射抵抗的机制提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

鼠抗人 Etk 单克隆抗体购自美国 BD Bioscience 公司, FITC 标记的羊抗兔 IgG 购自美国 CHEMICON 公司, RMPI 1640 培养液、胎牛血清购自美国 Gibco 公司。重组质粒 pcDNA3.0-Etk: 野生型 Etk-WT (wild-type), 空载体 pcDNA3.0 由美国加州大学 DAVIS 癌症中心 Kung 教授赠送。MTT 试剂盒(美国 CHEMICON 公司), Annexin V-FITC 凋亡试剂盒(美国 Beckman Coulter 公司), Lipofectamine2000 转染试剂盒(美国 Invitrogen 公司), Vector Elite ABC 检测试剂盒(美国 Vector 公司), 鼠抗人 p53 和 bcl-2 单克隆抗体 (DAKO 公司)。直线加速器照射: 美国 Varian 公司, 6MV-X 射线, 剂量 2 Gy, 剂量率 400 cGy/min, 照射野 15 cm × 30 cm。流式细胞仪: 美国 Becton Dickinson 公司 FAC-Sort 型。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 鼻咽癌细胞株 Sune-1(典型低分化鳞癌)由中山医科大学病理学研究室馈赠。培养条件: 细胞加入含 15% 灭活胎牛血清的 RMPI 1640 培养液, 置于 37℃, 饱和湿度 5% 的 CO₂ 培养箱中培养。实验中均采用指数生长期的细胞; Sune-wt 和 Sune-vector 培养过程中始终利用 G418 400 g/ml 筛选培养。

1.2.2 细胞转染 转染前一天将 Sune-1 细胞接种于六孔板上, 并使用无双抗(青霉素和链霉素)培养液, 使细胞在转染当天达到 90% 融合率, 按照试剂盒 Lipofectamine2000 (Invitrogen) 说明书操作。转染 72h 后, 通过加入含抗性霉素 G418 (800 μl/ml) 的 1640 培养液进行稳定转染筛选。隔日以含有 G418 的培养液换液。12d 后作为空白对照的 Sune-1 细胞 G418 的筛选全部死亡, pcDNA3.0-Etk 组细胞和 pcDNA3.0 空质粒组细胞经 G418 筛选后出现抗性克隆, 将筛选出的稳定转染细胞扩大培养, 形成的克隆分别命名为 Sune-wt 和 Sune-vector。

1.2.3 四唑盐比色试验(MTT)测定细胞 SF 取

指数生长期细胞 2×10^4 细胞数接种于 96 孔板中, 照射剂量为 2、4、10 和 15 Gy, 每个剂量设置 6 个复孔。细胞贴壁即进行 X 线照射。照射采用直线加数器作为靶源, 靶源距 80 cm, 照射面积 15 cm × 30 cm, 吸收剂量为 400 cGy/min; 照射后继续培养 24h 行 MTT 检测。根据 OD 值计算出生存分数并绘制生长曲线。

1.2.4 流式细胞术检测细胞周期、凋亡蛋白及 Etk 表达率 细胞于贴壁后照射, 照射剂量分别是 0、4、10 和 15 Gy, 每个剂量设置 3 个平行组, 照射后继续于 37℃ 培养箱中培养 24h 后收集细胞。(1) Annexin V/PI 双染法测凋亡: 将收获的细胞调整细胞浓度为 5×10^6 /ml, 取 100 μl 细胞悬液与 5 μl FITC-Annexin 混合, 加入 1 ml 1% 不含甲醇的甲醛溶液 (Binding Buffer 配制), 洗涤后加入 0.5 ml 的 PI 染色液对细胞核 DNA 进行染色。室温反应 1h 后利用流式细胞仪对凋亡定量分析。(2) 细胞周期: 标本加入 70% 冷乙醇 4℃ 固定 24h 以上, 离心后去除乙醇, 加入碘化丙啶染液 1 ml (含 0.25 mg/ml RNAase, 20 μg/ml 碘化丙啶), 置 4℃ 冰箱 30 min 后流式细胞仪分析。Multi-Cycle DNA analysis software 软件分析各个事项时相的 DNA 含量, 获取细胞周期中 G₀/G₁、S 期和 G₂/M 期细胞占总数的百分率, 按照公式计算出细胞增殖指数 PI(%) =

$$\frac{S + G_2/M}{G_0/G_1 + S + G_2/M} \times 100\%;$$

(3) 凋亡蛋白与 Etk 的检测。收集细胞后于 50 mg/ml 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤破膜裂解细胞。加入鼠抗人 (p53、bcl-2、Etk) 单克隆抗体, 稀释浓度为 1:100。孵育 1 h 后, 加入 FITC 标记羊抗鼠或兔 IgG 抗体, 稀释浓度为 1:50。再次孵育半小时后在流式细胞仪上检测蛋白表达阳性率。每种分组每种蛋白设三次重复。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 针对不同指标进行析因分析、t 检验、直线回归等。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 。

2 结果

2.1 Etk 蛋白表达检测情况

利用流式细胞仪对细胞株各种细胞进行检测。Sune-1 表达率为 (4.6 ± 1.45)%; Sune-wt 表达率为 (75.5 ± 2.34)%; Sune-vector 表达率为 (77.5 ± 1.56)%; Jurkat Etk 表达率为 (94.7 ± 0.95)%, 见图 1。

2.2 Sune-wt 组存活分数均显著高于对照组

如图 2 所示, 不同剂量 X 线照射后 Sune-wt 组 SF 均高于 Sune-1、Sune-vector。而 Sune-1、Sune-vector 之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。同时 Sune-wt 与 Sune-1、Sune-vector 回归直线截距的差

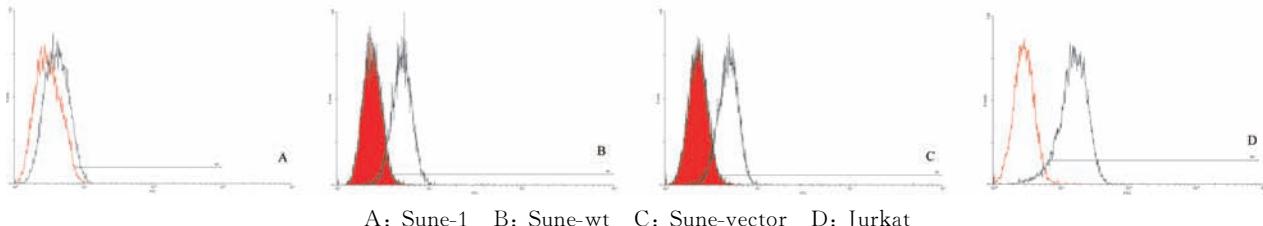


图 1 流式细胞仪检测转染前后各种细胞 Etk 表达率

Figure 1 The expression profile of Etk were examined in pre-transfecion and post-transfecion cell lines by FCM

异有统计学意义;其直线回归方程和相关系数分别为: $Y_{\text{Sune-1}} = 88.96 - 1.02X$, $R_{\text{Sune-1}} = -0.831$; $Y_{\text{Sune-vector}} = 90.81 - 1.09X$, $R_{\text{Sune-vector}} = -0.846$; $Y_{\text{Sune-wt}} = 98.23 - 0.33X$, $R_{\text{Sune-wt}} = -0.931$ 。

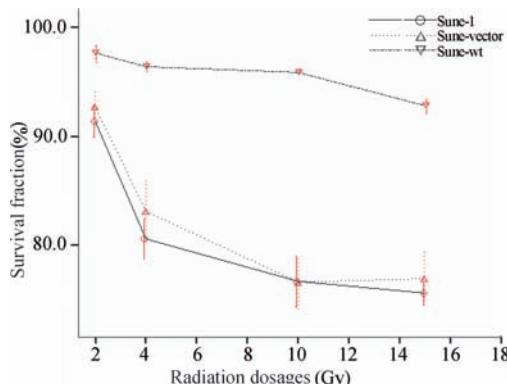


图 2 不同剂量 X 射线照射后 24 小时 Sune-1、Sune-vector 和 Sune-wt 存活分数的改变情况

Figure 2 The SF of three cell lines in various radiation dosages. Elevated of Etk in sune-wt confers the radiation resistance in NPC

2.3 Sune-wt 凋亡率均较对照组低

不同剂量照射后 Sune-wt 凋亡率均比阴性对照和空白对照组低。0、4、10 和 15Gy 照射后细胞凋亡均随着照射剂量的增加而增加,在同一剂量时 Sune-wt 均较其他细胞株不敏感,凋亡率低($P < 0.05$),而 Sune-1 和 Sune-vector 之间无明显差异($P > 0.05$),见图 3。

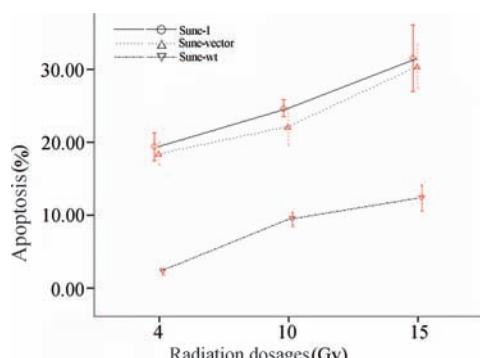


图 3 不同剂量 X 射线照射后 24 小时 Sune-1、Sune-vector 和 Sune-wt 凋亡率变化情况

Figure 3 The apoptosis of three cell lines in various radiation dosages

2.4 Sune-wt 照射后 p53 减少,bcl-2 增加

Sune-wt 照射组较 Sune-wt 未照射组 p53 减少,bcl-2 增加(t 检验 $P < 0.05$),而 Sune-1、Sune-vector 照射前后无差异($P > 0.05$),见图 4。

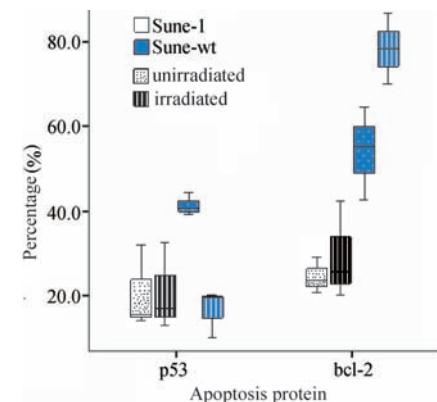


图 4 Sune-wt、Sune-1 中的凋亡蛋白 p53 和 bcl-2 4Gy 照射前后的改变情况

Figure 4 The expression of p53,bcl-2 in Sune-wt and Sune-1 after 4 Gy radiation

2.5 Sune-wt 增殖指数较对照组高并出现明显 S、G₂ 期阻滞

0、4、10Gy 时三者细胞周期无统计学改变。15Gy 后 Sune-wt 出现明显 S、G₂ 期阻滞,G₁ 期减少。照射后增殖指数均较照射前提高,Sune-wt 的增幅更加显著,见表 1、图 5。

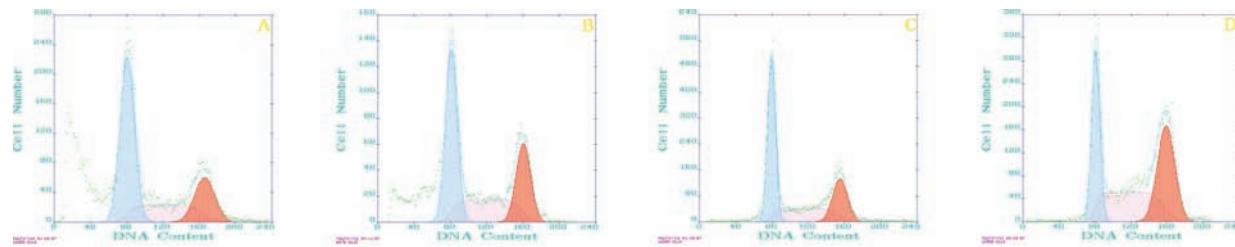
3 讨论

Etk/BMX 是一种与许多重要信号转导分子有关,参与了多种肿瘤细胞的增殖、分化及凋亡过程的非受体类酪氨酸激酶^[1, 6-7]。国外学者利用乳腺癌和前列腺癌细胞作为研究对象发现野生型高 Etk 表达细胞株 DNA 损伤后凋亡率低,细胞存活数多^[2-4]。Guo 等^[5]对 49 例鼻咽癌组织标本进行免疫组织化学研究后发现其中 Etk 阳性率为 26.5%,bcl-2 阳性率为 81.6%,所有 Etk 阳性的标本中 bcl-2 均为阳性。本实验通过转染导入外源性野生型 Etk 基因使其高表达来研究 Etk 对肿瘤细胞放射敏

表 1 细胞周期和增殖指数在 15Gy 照射前后的改变情况(%, n=3, $\bar{x} \pm s$)Table 1 The changes of cell cycles between non-radiation and 15 Gy radiation(%, n=3, $\bar{x} \pm s$)

Absorbed doses	Cell lines	G_0/G_1	S	G_2/M	PI
0 Gy	Sune-1	55.20 ± 0.96	23.90 ± 3.00	20.90 ± 1.71	44.81 ± 1.83
	Sune-vector	54.32 ± 2.35	24.08 ± 1.36	21.60 ± 1.45	45.37 ± 1.54
	Sune-wt	49.40 ± 3.63	26.20 ± 1.54	24.40 ± 2.26	50.60 ± 1.51
15 Gy	Sune-1	45.86 ± 2.76 *	28.3 ± 1.83 *	25.84 ± 1.20	54.14 ± 1.04
	Sune-vector	44.60 ± 0.53 *	29.1 ± 2.35 *	26.30 ± 2.30 *	55.40 ± 1.73
	Sune-wt	29.90 ± 1.35 *	34.6 ± 0.95 *	35.50 ± 2.33 *	70.10 ± 1.46 #

Notes: * : $P < 0.05$, compared with the same cell line at 0Gy; # : $F = 99.938$, $P < 0.001$, compared with the same dosage



A: Sune-1 unirradiated; B: Sune-1 after irradiated; C: Sune-wt unirradiated; D: Sune-wt after irradiated
图 5 15Gy X 线照射前后 Sune-1、Sune-wt 细胞周期的变化

Figure 5 The changes of cell cycles between non-radiation and 15Gy X-ray radiation

感性的影响。我们在实验中发现 X 线照射后高 Etk 表达细胞株 SF 显著增加, 淋亡明显减少, 并且出现 S、G₂ 期阻滞, 增殖指数显著提高, 同时较未照射细胞 p53 减少, bcl-2 增加。

目前研究显示细胞放射敏感性主要取决于 DNA 损伤诱导的凋亡程度和对 DNA 损伤的修复能力。DNA 是 X 射线损伤细胞的主要靶点。四唑盐 (MTT) 法检测细胞放射敏感性是利用 SF 综合 X 射线引起凋亡和损伤修复再存活两者结果。具有简单快速、准确的特点^[8], 并被广泛应用于放射生物学的研究。我们采用 MTT 法比较了高 Etk 表达的鼻咽癌细胞 Sune-wt 与 Sune-1 以及 Sune-vector 在不同剂量照射前后的细胞生存情况。发现 Sune-wt 细胞 SF 显著增加, 表明 Sune-wt 放射敏感性低。说明 Etk 有增强鼻咽癌细胞对放射线的抵抗作用。

本研究利用流式细胞技术检测细胞凋亡率发现在相同剂量照射时 Sune-wt 凋亡率均低于 Sune-1 以及 Sune-vector。说明 Etk 在鼻咽癌中可以抑制细胞凋亡。鼻咽癌中 Etk 抑制凋亡与射线诱导的凋亡蛋白和细胞周期的改变密切相关。

凋亡相关蛋白 p53 是 X 射线照射后诱导凋亡核心调控部分。p53 作为一个转录因子可以诱发细胞周期调控蛋白 p21 表达, 同时抑制抗凋亡蛋白如 bcl-2^[9-10]。刘宇等^[11]研究表明: p53、bcl-2 均参与了鼻咽癌的发生与分化。肖华平等^[12]研究显

示腺病毒 E1A 基因可通过上调 p53 基因表达来抑制人鼻咽癌细胞裸鼠移植瘤的生长并增加其对放疗的敏感性。最近 Guo 等^[13]在肝内胆管癌中发现 Etk 表达与 bcl-2 存在相关性。我们的实验揭示高 Etk 表达的鼻咽癌细胞 DNA 损伤后存在负性调节 p53, 正性调节 bcl-2, 可以说鼻咽癌细胞中 Etk 通过抑制 p53, 促进 bcl-2 蛋白表达降低了细胞凋亡。

X 射线照射后细胞周期重新分布与 DNA 损伤的修复和凋亡有关。哺乳动物的细胞在 DNA 损伤后会激发活细胞内的细胞周期监控机制即细胞周期关卡 (cell cycle checkpoint) 作用使得细胞停留在特定的阶段, 进而对损伤 DNA 进行修复, 以保证基因功能的正常发挥^[14]。照射后 Sune-wt 出现了明显的 S、G₂/M 期的阻滞, 即反映 S 与 G₂/M 细胞所占比例的增殖指数增高。通常认为 G₁ 期阻滞会引起细胞凋亡增加, G₂/M 期阻滞有利于肿瘤细胞 DNA 损伤修复减少凋亡。因此这样的改变虽然使有丝分裂受到暂时的抑制但却为部分损伤的 DNA 赢得了修复的机会, 使部分亚致死性细胞和潜在致死性细胞得以恢复正常减少凋亡。

综上所述, Etk/BMX 有增强鼻咽癌细胞对放射线的抵抗作用。其机制可能是通过 p53、bcl-2 改变以及 S、G₂/M 阻滞降低凋亡率。

- [1] Mano H. Tec family of protein-tyrosine kinases: an overview of their structure and function[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 1999, 10(3-4): 267-280.
- [2] Xie Y, Xu K, Dai B, et al. The 44 kDa Pim-1 kinase directly interacts with tyrosine kinase Etk/BMX and protects human prostate cancer cells from apoptosis induced by chemotherapeutic drugs[J]. *Oncogene*, 2006, 25(1): 70-78.
- [3] Bagheri-Yarmand R, Mandal M, Talukder AH, et al. Etk/Bmx tyrosine kinase activates Pak1 and regulates tumorigenicity of breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(31): 29403-29409.
- [4] Xue LY, Qiu Y, He J, et al. Etk/Bmx, a PH-domain containing tyrosine kinase, protects prostate cancer cells from apoptosis induced by photodynamic therapy or thapsigargin[J]. *1999*, 18(22): 3391-3398.
- [5] Guo L, Guo Y, Xiao S. Expression of Etk/Bmx tyrosine kinase in the tumorigenicity of naso-pharyngeal epithelium and its relation with EB virus infection and the apoptosis-related protein Bcl-2[J]. *Cancer letters*, 2006, 232(2): 255-261.
- [6] Wu YM, Huang CL, Kung HJ, et al. Proteolytic activation of ETK/Bmx tyrosine kinase by caspases[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(21): 17672-17678.
- [7] Wen X, Lin HH, Shih HM, et al. Kinase activation of the non-receptor tyrosine kinase Etk/BMX alone is sufficient to transactivate STAT-mediated gene expression in salivary and lung epithelial cells[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(53): 38204-38210.
- [8] Wasserman TH, Twentyman P. Use of a colorimetric microtiter (MTT) assay in determining the radiosensitivity of cells from murine solid tumors[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1988, 15(3): 699-702.
- [9] Miyashita T, Kitada S, Krajewski S, et al. Overexpression of the Bcl-2 protein increases the half-life of p21Bax[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(44): 26049-26052.
- [10] Oda E, Ohki R, Murasawa H, et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis[J]. *Science*, 2000, 288(5468): 1053-1058.
- [11] 刘宇, 张幸平, 陈晓品, 等. p53、bcl-2 蛋白和 p-gp 在鼻咽鳞癌中表达的研究[J]. 肿瘤防治研究, 2004, 31(7): 415-417.
- [12] Guo L, Guo Y, Xiao S. Expression of Etk/Bmx Tyrosine Kinase in Intrahepatic Cholangiocarcinoma[J]. *J Surg Oncol*, 2008, 97(5): 428-432.
- [13] Marc J, Belle R, Morales J, et al. Formulated glyphosate activates the DNA-response checkpoint of the cell cycle leading to the prevention of G₂/M transition[J]. *Toxicol Sci*, 2004, 82(2): 436-442.
- [14] 肖华平, 周蓉蓉, 廖遇平. E1A 抑制鼻咽癌细胞裸鼠移植瘤的生长并增强其对放疗的敏感性[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2009, 16(6): 614-618.

[编辑:周永红;校对:杨卉]

• 简讯 •

《肿瘤防治研究》杂志征订征稿启事

《肿瘤防治研究》杂志创刊于1973年,是我国第一本独立的全国性肿瘤专业高级学术刊物。中华人民共和国卫生部主管,湖北省卫生厅、中国抗癌协会、湖北省肿瘤医院主办。杂志是中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊、湖北省优秀医学期刊、中国抗癌协会系列刊物。被美国 CA、CSA、Ulrich PD、波兰 IC、英国 CABI、Golobal Health、日本 JST 等大型数据库收录。本刊以报道国内外肿瘤防治研究领域最新之研究成果及新进展为主。读者对象为肿瘤防治研究工作者及相关专业的医药科技人员。

主要栏目有:专题论坛、基础研究、临床研究、临床诊断、临床应用、流行病学、研究简报、技术交流、论著摘要、综述、短篇个案、简讯等。

邮发代号:38-70; 国外代号:MO6482; 定价:8.00元/册; 出版周期:月刊

中国标准连续出版物号:ISSN 1000-8578 CN 42-1241/R

投稿网站:<http://www.zlfzyj.com> E-mail:zlfzyj@263.net.cn

电话/传真:0086-27-87670126

通信地址:武汉市武昌卓刀泉南路116号《肿瘤防治研究》编辑部 邮政编码:430079