

低强度微波对盐酸阿霉素致人早幼粒白血病细胞损伤的影响

刘蕴莹^{1, 2a}, 靳宗达^{2b}, 姜秉成^{2b}, 周振^{2b}, 童建^{2b}, 曹毅^{2b}

摘要: [目的] 探讨低强度微波辐射对盐酸阿霉素(DOX)致人早幼粒白血病 HL-60 细胞损伤的影响。[方法] 将 HL-60 细胞随机分为对照组、单纯微波组、单纯 DOX 组和联合组(微波+DOX)。单纯微波组和联合组都给予 $12\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 微波照射, 1 h/d, 连续辐照 3 d, 对照组和单纯 DOX 组置于同一环境, 但不给予电磁辐射。第 4 天分别给予单纯 DOX 组和联合组以浓度为 $0.125\text{mg}/\text{L}$ 的 DOX。用钙离子依赖性磷脂结合蛋白-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)检测细胞凋亡率, 流式细胞仪检测线粒体膜电位和胞内游离 Ca^{2+} 浓度。[结果] 与对照组相比, 单纯 DOX 组凋亡率明显增加($P<0.05$); 线粒体膜电位明显下降($P<0.05$); 胞内游离 Ca^{2+} 浓度明显升高($P<0.05$)。与单纯 DOX 组相比, 联合组凋亡率明显降低($P<0.05$); 线粒体膜电位明显升高($P<0.05$); 游离 Ca^{2+} 浓度明显降低($P<0.05$)。[结论] 预先 900MHz 、 $12\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 低强度微波照射能够明显减轻 DOX 引起的细胞损伤。

关键词: 微波; 盐酸阿霉素; 凋亡; 线粒体膜电位; 钙离子

Low Intensity Microwave Pre-exposure Alleviates Damages to HL-60 Cells Induced by Doxorubicin Hydrochloride LIU Yun-ying^{1, 2a}, JIN Zong-da^{2b}, JIANG Bing-cheng^{2b}, ZHOU Zhen^{2b}, TONG Jian^{2b}, CAO Yi^{2b} (1.Pathological Department, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310022, China; 2.a.School of Radiation Medicine and Protection, Jiangsu Province Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection, b.School of Public Health, Medical College of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China). Address correspondence to CAO Yi, E-mail: yicao@suda.edu.cn • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To explore the protective effects of low intensity microwave on doxorubicin hydrochloride (DOX) induced damages in HL-60 cells. [Methods] HL-60 cells were randomly divided into control, microwave alone, DOX alone, and combined exposure groups. The microwave alone and the combined exposure groups were exposed to $12\mu\text{W}/\text{cm}^2$ microwaves, 1 hour per day for 3 days. The cells in the control and the DOX alone groups were placed in the same condition, but without microwave radiation. The combined exposure and the DOX alone groups were subsequently exposed to DOX at the concentration of $0.125\text{mg}/\text{L}$ on the 4th day. Apoptosis was detected with Annexin V-FITC/PI double staining. Mitochondrial membrane potential (MMP) and intracellular Ca^{2+} concentrations were determined by flow cytometry. [Results] Compared with the control group, the apoptosis rate and Ca^{2+} concentration of the DOX alone group significantly increased ($P<0.05$), while the MMP statistically decreased ($P<0.05$). Compared with the DOX alone group, the apoptosis rate and Ca^{2+} concentration of the combined exposure group significantly decreased ($P<0.05$), while the MMP statistically increased ($P<0.05$). [Conclusion] Under this experimental condition, pre-exposure with $12\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 900MHz microwaves could significantly alleviate DOX-induced damages to HL-60 cells.

Key Words: microwave; doxorubicin hydrochloride; apoptosis; mitochondrial membrane potential; Ca^{2+}

恶性肿瘤严重威胁着人类健康, 化疗作为其治疗的重要手段, 临床应用较为广泛^[1]。骨髓造血功能抑制是最为常见的肿瘤化疗副作用^[2]。采取合理有效的防护措施减轻骨髓造血抑制, 预防和减少化疗药物毒副作用, 是化疗成功实施的关键。文献报道低强度微波对化学毒物致造血系统损伤有一定的保

护作用^[3-5]。研究低强度微波辐射对盐酸阿霉素(doxorubicin hydrochloride, DOX)致造血损伤的防护作用及其机制, 对探讨化疗药物致造血损伤的防护具有一定意义。本实验用 HL-60 细胞作为研究材料, 研究预先低强度微波辐照对 DOX 致细胞损伤效应的影响, 初步探讨其可能的机理。

[基金项目] 江苏省放射医学与防护重点实验室开放课题(编号: KJS0930)

[作者简介] 刘蕴莹(1984—), 女, 硕士生; 研究方向: 辐射防护; E-mail: lyerion@163.com

[通信作者] 曹毅副教授, E-mail: yicao@suda.edu.cn

[作者单位] 1. 浙江省肿瘤医院病理科, 浙江 杭州 310022; 2. 苏州大学医学部 a. 放射医学与防护学院, 江苏省放射医学与防护重点实验室 b. 公共卫生学院, 江苏 苏州 215123

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人早幼粒白血病 HL-60 细胞(苏州大学医学部公共卫生学院卫生毒理教研室惠赠), 用含体积分数 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司)、 37°C 、饱和湿度、体积分数为 5% CO_2 条件下培养, 每 2~3 d 传代 1 次, 取对数生长期细胞进行后续实验。

1.2 细胞分组辐照与处理

取对数生长期的 HL-60 细胞, 按 10^6 个/皿接种于直径 35 mm 培养皿, 随机分为对照组、单纯微波组 ($12 \mu\text{W}/\text{cm}^2$)、单纯 DOX 组 (0.125 mg/L) 和联合组 (微波 $12 \mu\text{W}/\text{cm}^2 + \text{DOX } 0.125 \text{ mg/L}$), 每组设 3 个平行样。单纯微波组和联合组细胞在反射系数接近为 0 的吉赫兹横电磁波 (Gigahertz Transverse Electro Magnetic, GTEM) 室 (型号: DN6313A; 苏州大学) 以 900 MHz , $12 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 微波连续辐照 3 d, 1 h/d。对照组和单纯 DOX 组细胞置于同一环境, 但不给予电磁辐射。第 4 天对单纯 DOX 组和联合组一次性给予浓度为 0.125 mg/L 的 DOX (深圳万乐药业有限公司)。单纯 DOX 组和联合组在 DOX 作用 48 h 后收集细胞, 对照组和单纯微波组也在相同的时间点收集细胞, 进行各项指标的检测。

1.3 细胞凋亡检测

收集各组细胞, 4°C 预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤两次, 加入 $400 \mu\text{L}$ 结合缓冲液 (10 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸, 140 mmol/L 氯化钠, 2.5 mmol/L 氯化钙), 吹打细胞制成单细胞悬液, 加入 $5 \mu\text{L}$ 钙离子依赖性磷脂结合蛋白-异硫氰酸荧光素 (Annexin V-FITC) 和 $5 \mu\text{L}$ 碘化丙啶 (PI) 溶液, 充分混匀, 37°C 避光反应 15 min。流式细胞仪 (FC-500 型, 美国 Becton Dickinson 公司) 计数 10 000 个细胞, CellQuest 软件进行凋亡率分析。同时以只加 Annexin V-FITC 溶液和只加 PI 溶液染色作为对照进行荧光补偿, 调节去除光谱更迭和设置十字门的位置。

1.4 线粒体膜电位检测

于 DOX 作用 48 h 后收集细胞, 用预冷的 PBS 洗 2 次, $100 \times \text{g}$, 离心 5 min, 弃上清, 留下层细胞, 加入 $400 \mu\text{L}$ 浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$ 线粒体膜电位荧光探针 (JC-1, 美国 Molecular Probes 公司) 应用液重悬细胞, 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ 的培养箱中避光孵育 30 min, 细胞悬液上流式细胞仪检测, 激发波长 488 nm 、发射波长 527 nm (绿色) 和 590 nm (红色), 荧光强度以对数模式测定, 流式细胞仪采集 10 000 个细胞, 用随机所带专用软件包储存和分析资料, 线粒体膜电位降低率以细胞百分率表示。当红色荧光/绿色荧光值降低时, 表明细胞线粒体膜电位下降, 细胞发生早期凋亡。

1.5 胞内游离 Ca^{2+} 浓度的检测

于 DOX 作用 48 h 后处理细胞 (方法同“1.4”), 加入 $400 \mu\text{L}$ 浓度为 $10 \mu\text{mol/mL}$ 细胞内钙离子荧光探针 (Fluo-3-AM, 美国 Molecular Probes 公司) 应用液重悬细胞, 37°C 避光反应 30 min, 流式细胞仪检测, 激发波长 488 nm 、发射波长 526 nm 。流式细胞仪检测图横坐标表示荧光强度, 峰右偏表示荧光强度增强、胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高。流式细胞仪收集 10 000 个细胞, 用随机所带专用软件包存储和分析资料。

1.6 统计分析

数据以“均数 $\pm$ 标准差” ($\bar{x} \pm s$) 表示, 运用 SPSS 13.0 分析软件对数据进行单因素方差分析, 总体差异有统计学意义时, 组间比较采用 dunnett- t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 HL-60 细胞凋亡、线粒体膜电位和胞内游离 Ca^{2+} 浓度

由表 1 可见, 与对照组相比, 单纯 DOX 组细胞凋亡率明显升高 ($P<0.05$); 线粒体膜电位水平明显下降 ($P<0.05$); 胞内

游离 Ca^{2+} 浓度明显增加 ($P<0.05$)。与单纯 DOX 组相比, 联合组细胞凋亡率明显降低 ($P<0.05$); 线粒体膜电位水平升高 ($P<0.05$); 胞内游离 Ca^{2+} 明显降低 ($P<0.05$)。

表 1 低强度微波和 DOX 处理对 HL-60 细胞凋亡、线粒体膜电位与胞内游离 Ca^{2+} 浓度的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

分组	凋亡率 (%)	线粒体膜电位 (%)	Ca^{2+} 相对值
对照组	$5.84 \pm 1.04^{\#}$	$87.62 \pm 2.49^{\#}$	$18.08 \pm 0.87^{\#}$
单纯微波组	$6.67 \pm 1.09^{\#}$	$85.01 \pm 1.99^{\#}$	$21.82 \pm 0.71^{**}$
单纯 DOX 组	$20.99 \pm 1.44^{\#}$	$42.58 \pm 0.97^{\#}$	$30.25 \pm 0.15^{\#}$
联合组	$17.06 \pm 0.81^{**}$	$63.63 \pm 1.39^{**}$	$24.05 \pm 3.45^{**}$
F	136.93	407.53	23.68
P	0.001	0.001	0.001

[注]*: 与对照组相比, $P<0.05$; #: 与单纯 DOX 组相比, $P<0.05$ 。

2.2 HL-60 细胞内游离 Ca^{2+} 浓度与细胞凋亡率的相关性

对 HL-60 细胞的细胞内游离 Ca^{2+} 浓度与其凋亡率的相关分析表明, HL-60 细胞内游离 Ca^{2+} 浓度与凋亡率呈正相关 (图 1), $\hat{y}=1.257x-16.96$, $R^2=0.7784$ 。经统计分析, $r=0.882$, $P<0.05$ 。

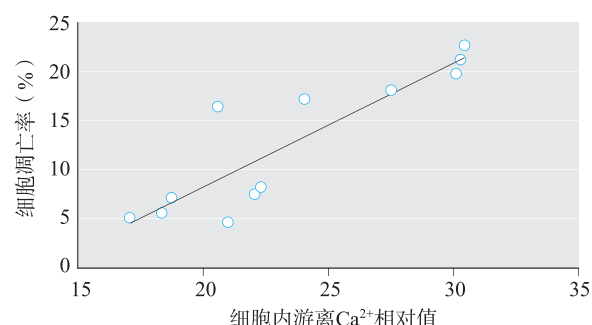


图 1 HL-60 细胞内游离 Ca^{2+} 与凋亡的相关性

3 讨论

造血组织具有高度增殖分化能力, 对电离辐射和化疗药物极为敏感^[6-7]。本课题组前期实验已经证实, 在 γ 射线照射前给予低强度微波辐射, 可减轻 γ 射线对造血系统的损伤, 低强度微波可在一定程度上减轻 γ 射线的损伤效应^[8-11]。本次研究采用体外培养的造血系统 HL-60 细胞, 探讨预先低强度微波照射对化疗药物所致损伤效应的影响。

采用整体动物进行实验时, 影响微波效应的实验动物因素较多, 结果一致性差。采用培养的原代细胞进行研究时, 由于原代细胞培养困难, 性状不稳定, 也会影响实验结果的稳定性和重复性。HL-60 细胞是人早幼粒白血病细胞, 又称人急性髓性白血病细胞, 均一性好, 生长稳定, 增殖速度快, 对毫米波和 DOX 较为敏感, 是研究低强度微波和 DOX 对造血系统复合作用的较理想的体外研究材料^[12-14]。

DOX 作为遗传损伤因子引发拓扑异构酶 II 裂解 DNA, 破坏 DNA 三级结构最终引起细胞凋亡^[15]。在细胞凋亡早期信号传导通路中, 线粒体跨膜电位的变化与 Ca^{2+} 稳态的改变起到关键作用。线粒体在细胞凋亡过程中起着重要作用^[16]。凋亡诱发因素促使线粒体膜内外的电势差减少, 通透性转运孔开放 (permeability transition pore, PTP), 线粒体跨膜电位崩溃, 诱导 Caspase 活化, 引起细胞凋亡的级联反应, 最终导致细胞凋亡^[17-18]。线粒体膜电位下降是早期细胞凋亡不可逆的变化^[19]。

本次实验结果显示, DOX 作用后 HL-60 细胞线粒体膜电位水平降低, 线粒体无法维持其功能, 诱导细胞凋亡的发生。联合组 HL-60 细胞线粒体膜电位水平高于单纯 DOX 组细胞, 提示 $12\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 低强度微波能减轻 DOX 对 HL-60 细胞产生的损伤效应, 在 DOX 作用前给予低强度微波可以一定程度地延缓 HL-60 细胞凋亡的发生, 降低细胞凋亡率, 与 HL-60 细胞凋亡实验结果相吻合。

细胞凋亡的诱导和抑制与信号传导通路有关, Ca^{2+} 作为信号分子在细胞生命活动的过程中起着重要的作用^[20]。钙稳态的破坏易诱导细胞凋亡的发生^[21-22]。本次实验发现 DOX 能导致 HL-60 细胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高, 提示 DOX 能造成 HL-60 细胞钙超载。钙超载与细胞凋亡和坏死等的发生有密切关系^[23-25]。本次实验结果显示, HL-60 细胞内游离 Ca^{2+} 浓度与细胞凋亡率之间呈现良好的相关性, 表明胞内钙超载的细胞增多时, 发生凋亡的细胞也随着相应增多。同时还观察到预先 $12\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 低强度微波照射减弱了 DOX 引起的 HL-60 细胞内游离 Ca^{2+} 浓度和细胞凋亡率的改变。

本次实验结果显示, 预先低强度微波照射可以减轻 DOX 引起的 HL-60 细胞损伤, 低强度微波辐射能够降低细胞凋亡率、阻止线粒体膜电位下降和减轻细胞内钙超载, 这可能是低强度微波照射在整体水平上减轻 DOX 化疗药物损伤的机制之一。

• 作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] SCHILLER JH, HARRINGTON D, BELANI CP, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer [J]. N Engl J Med, 2002, 346(2): 92-98.
- [2] VOOE E, BIENVENU J, WARZOKA K, et al. Factors that predict chemotherapy-induced myelosuppression in lymphoma patients: role of the tumor necrosis factor ligand-receptor system [J]. J Clin Oncol, 2000, 18(2): 325-331.
- [3] SANNINO A, SARTI M, REDDY B, et al. Induction of adaptive response in human blood lymphocytes exposed to radiofrequency radiation [J]. Radiat Res, 2009, 171(6): 735-742.
- [4] SANNINO A, ZENI O, SARTI M, et al. Induction of adaptive response in human blood lymphocytes exposed to 900 MHz radiofrequency fields: influence of cell cycle [J]. Int J Radiat Biol, 2011, 87(9): 993-999.
- [5] 李国光, 邱书明, 林崇文, 等. EHF 毫米波辐射对受化疗处理期小鼠造血系统的保护作用 [J]. 中华物理医学杂志, 1995, 17(3): 175-177.
- [6] BEYER J, SCHWELLA N, ZINGSEM J, et al. Hematopoietic rescue after high-dose chemotherapy using autologous peripheral-blood progenitor cells or bone marrow: a randomized comparison [J]. J Clin Oncol, 1995, 13(6): 1328-1335.
- [7] FLIEDNER TM, GRAESSLE D, PAULSEN C, et al. Structure and function of bone marrow hemopoiesis: mechanisms of response to ionizing radiation exposure [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2002, 17(4): 405-426.
- [8] CAO Y, XU Q, JIN Z D, et al. Effects of 900-MHz microwave radiation on gamma-ray-induced damage to mouse hematopoietic system [J]. J Toxicol Environ Health A, 2010, 73(7): 507-513.
- [9] CAO Y, XU Q, JIN Z D, et al. Induction of adaptive response: pre-exposure of mice to 900 MHz radiofrequency fields reduces hematopoietic damage caused by subsequent exposure to ionising radiation [J]. Int J Radiat Biol, 2011, 87(7): 720-728.
- [10] 徐茜, 靳宗达, 董亮, 等. 低剂量微波辐射减轻 γ 射线对小鼠造血系统的损伤 [J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2009, 27(5): 289-296.
- [11] 徐茜, 童建, 靳宗达, 等. 低强度微波对 γ 射线辐射的防护作用及其可能机制 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2009, 27(9): 520-524.
- [12] DREXLER H G, QUENTMEIER H, MACLEOD R A F. Cell line models of leukemia [J]. Drug Discov Today Dis Models, 2005, 2(1): 51-56.
- [13] 李戈, 季丽娟, 黄建鸣. 槲皮素诱导和增加 HL-60 白血病细胞对阿霉素的反应性 [J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2009, 14(1): 12-15.
- [14] 袁淑兰, 王艳萍, 陈念永, 等. 毫米波辐射对急性早幼粒白血病细胞增殖及分化的影响 [J]. 中国肿瘤临床, 2001, 28(7): 485-488.
- [15] KALYANARAMAN B, JOSEPH J, KALIVENDI S, et al. Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity [J]. Mol Cell Biochem, 2002, 234(1/2): 119-124.
- [16] CHANDRA D, LIU J W, TANG D G. Early mitochondrial activation and cytochrome c up-regulation during apoptosis [J]. J Biol Chem, 2002, 277(52): 50842-50854.
- [17] DAUGAS E, NOCHY D, RAVAGNAN L, et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis [J]. FEBS Lett, 2000, 476(3): 118-123.
- [18] MATTSO MP, KROEMER G. Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection [J]. Trends Mol Med, 2003, 9(5): 196-205.
- [19] GREEN DR, KROEMER G. The pathophysiology of mitochondrial cell death [J]. Science, 2004, 305(5684): 626-629.
- [20] BERRIDGE MJ, BOOTMAN MD, LIPP P. Calcium—a life and death signal [J]. Nature, 1998, 395(6703): 645-648.
- [21] BIAN X, HUGHES F M JR, HUANG Y, et al. Roles of cytoplasmic Ca^{2+} and intracellular Ca^{2+} stores in induction and suppression of apoptosis in S49 cells [J]. Am J Physiol, 1997, 272(4 Pt 1): C1241-C1249.
- [22] ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B, NICOTERA P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(7): 552-565.
- [23] CASAS J, GJON MA, VIGO A G, et al. Overexpression of cytosolic group IVA phospholipase A2 protects cells from Ca^{2+} -dependent death [J]. J Biol Chem, 2006, 281(9): 6106-6116.
- [24] KRUMAN II, MATTSO MP. Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis [J]. J Neurochem, 1999, 72(2): 529-540.
- [25] HAJNOCZKY G, CSORDAS G, DAS S, et al. Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca^{2+} uptake in apoptosis [J]. Cell Calcium, 2006, 40(5/6): 553-560.

(收稿日期: 2011-12-11)

(英文编审: 黄建权; 编辑: 郭薇薇; 校对: 葛宏妍)