

# <sup>125</sup>I 粒子对胆管细胞癌 HCCC-9810 细胞凋亡及 Livin 基因表达的影响

杜小丽<sup>1</sup>, 刘兆玉<sup>2</sup>, 贺倩<sup>1</sup>, 林伟<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨<sup>125</sup>I 粒子对胆管细胞癌 HCCC-9810 细胞凋亡及 Livin 基因表达的影响。方法 实验分为空白对照组、空壳组、<sup>125</sup>I 粒子组(根据临床常用放射性活度分为: 0.5 mCiGy <sup>125</sup>I 粒子组、0.7 mCiGy <sup>125</sup>I 粒子组、0.9 mCiGy <sup>125</sup>I 粒子组)。体外培养 HCCC-9810 细胞, 实验组经相应活度<sup>125</sup>I 粒子干预 48 h 后, 通过免疫组化法、RT-PCR 法分别检测各组细胞 Livin 蛋白及 mRNA 的表达, 同时应用流式细胞术 (FCM) 检测各组细胞的凋亡率变化。结果 与空白对照组比较, 空壳组 Livin 蛋白和 mRNA 的表达及细胞凋亡率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与空白对照组及空壳组比较, <sup>125</sup>I 粒子组 (0.5、0.7 和 0.9 mCiGy) 中胆管细胞癌 HCCC-9810 细胞的凋亡率及 Livin 基因表达水平同时增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。0.5 mCiGy <sup>125</sup>I 粒子组中 HCCC-9810 细胞的 Livin 蛋白和 mRNA 的表达水平最低而细胞凋亡率最大, 0.7 mCiGy <sup>125</sup>I 粒子组 HCCC-9810 细胞 Livin 蛋白和 mRNA 表达水平最高, 但细胞凋亡率却最低, 0.9 mCiGy <sup>125</sup>I 粒子组中 HCCC-9810 细胞的 Livin 蛋白和 mRNA 的表达水平及细胞凋亡率介于两者之间。结论 不同剂量的<sup>125</sup>I 粒子诱导胆管细胞癌 HCCC-9810 细胞凋亡的能力存在差异, 其作用机制与其调节细胞内 Livin 基因表达水平高低密切相关。Livin 作为凋亡抑制基因, 其表达水平的高低可能与胆管癌细胞放射抵抗性有一定的相关性。

**关键词** <sup>125</sup>I 粒子; Livin 基因; 胆管细胞癌; 放射抵抗性; 细胞凋亡

中图分类号 R 815.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)11-1714-04  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.11.014

人类胆管细胞癌来源于胆管上皮细胞, 可发生在肝内外胆管的任何部位<sup>[1]</sup>。近几年来, 胆管细胞癌是肝脏最常见恶性肿瘤, 且发生率逐渐增高<sup>[2]</sup>。由于治疗方式选择的限制及大部分病例确诊时已经是中晚期, 胆管细胞癌的存活率相当低<sup>[3]</sup>。放疗是

胆管细胞癌非手术治疗方式之一, 粒子植入治疗方式属于放疗中的一种。Schoenthaler et al<sup>[4]</sup>认为针对病理检查提示切缘阳性者, 术后辅助放疗尤其是植入粒子放疗, 有效缓解肿瘤痛的同时, 能获得较单纯手术更好的预后。此外, Moon et al<sup>[5]</sup>进行的胆管癌体外研究发现, 胆管细胞癌具有显著的放射抵抗性。Livin 作为新发现的凋亡抑制基因, 具有抑制肿瘤细胞凋亡的作用, 可能对肿瘤细胞的放射敏感性存在着一定的影响。因此, 该研究将探讨<sup>125</sup>I 粒子对人胆管细胞癌 HCCC-9810 细胞 Livin 基因的表达及细胞凋亡的影响, 不仅能为胆管细胞癌细胞 Livin 基因功能及胆管细胞癌放射抵抗性探讨提供一些实验佐证, 还可为临床胆管细胞癌治疗提供新的思路。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 人胆管细胞癌 HCCC-9810 细胞购于中国协和医科大学细胞库; RPMI1640 培养基、0.25% 胰蛋白酶、胎牛血清购于美国 Hyclone 公司; Annexin V/PI 双染试剂购于南京凯基生物科技发展有限公司; 浓缩型 DAB 显色试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司; RT-PCR 试剂盒购于大连 TaKaRa 生物工程有限公司; <sup>125</sup>I 粒子购于北京同辐公司。

**1.2 实验分组** 将对数生长期的细胞接种于 25 ml 培养瓶内。实验分为 5 组, 分别为: 空白对照组、空壳组、0.5 mCiGy <sup>125</sup>I 粒子组、0.7 mCiGy <sup>125</sup>I 粒子组、0.9 mCiGy <sup>125</sup>I 粒子组。

**1.3 细胞培养** 用含 12% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基, 在 37 °C、饱和湿度、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养胆管细胞癌 HCCC-9810 细胞。0.25% 胰蛋白酶传代, 选取对数生长期细胞(培养 48 h 后)进行实验。

**1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率** 对照组及各实验组每组设 5 个复孔。参照文献<sup>[6]</sup>描述的方法操作。

**1.5 免疫组化法检测 Livin 蛋白的表达** 对照组及各实验组每组设 12 个复孔。按照说明书进行, Livin 的一抗浓度为 1:200。用 Motic Images Advanced 3.2 图像分析系统采集图片, 测平均灰度值

2020-06-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81871465)

作者单位: <sup>1</sup> 成都市第一人民医院放射科, 成都 610016

<sup>2</sup> 中国医科大学附属盛京医院放射科, 沈阳 110004

作者简介: 杜小丽, 女, 硕士研究生;

林伟, 男, 教授, 主任医师, 责任作者, E-mail: 277504169

@qq.com

及平均光密度值。

**1.6 RT-PCR 法检测各组细胞 Livin 的 mRNA 的表达** 对照组及各实验组每组设 24 个复孔。参照文献<sup>[7]</sup>描述的方法操作,用 PTC-100 型 PCR 仪(美国 M J Research 公司)进行 PCR 扩增和观察。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件对各数据结果进行统计分析。多组间均数差异采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法,实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 <sup>125</sup>I 粒子诱导各组胆管细胞癌 HCCC-9810 凋亡率的变化** 利用流式细胞仪 Annexin V/PI 双染

法检测细胞凋亡率的变化,见图 1,结果显示:与空白对照组比较,空壳组细胞凋亡率无改变,<sup>125</sup>I 粒子处理均能诱导 HCCC-9810 细胞凋亡率增加,差异有统计学差异( $F = 185.09, P < 0.05$ ),其中 0.5 mCiGy <sup>125</sup>I 粒子实验组细胞凋亡比例最高,0.7 mCiGy <sup>125</sup>I 粒子诱导细胞凋亡率水平最低。

**2.2 免疫组化检测 Livin 蛋白分布、表达的变化** 结果如图 2 所示:<sup>125</sup>I 粒子可诱导胆管细胞癌 HCCC-9810 细胞中 Livin 蛋白含量增加,其中 0.7 mCiGy <sup>125</sup>I 粒子实验组中表达量最高,差异有统计学意义( $F = 98.017, P < 0.05$ )。此外,Livin 蛋白主要分布在细胞胞质中,细胞核可见少量表达。

**2.3 各组 HCCC-9810 细胞中 Livin 蛋白和 mRNA**

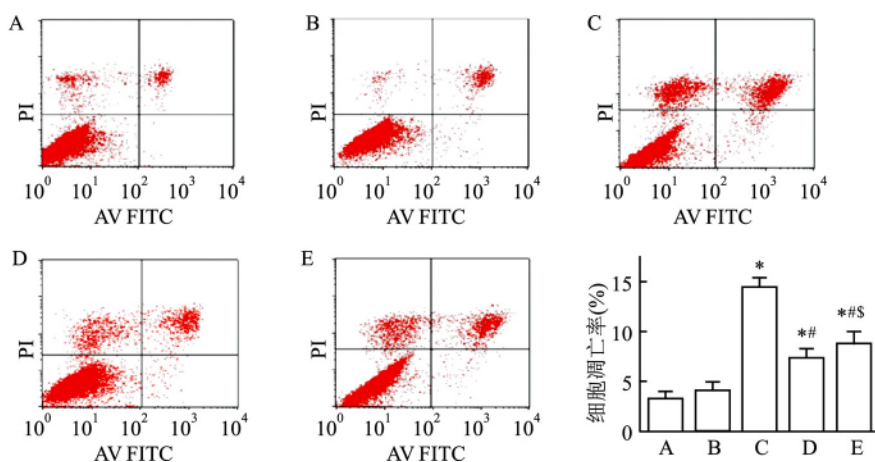


图 1 <sup>125</sup>I 粒子诱导胆管细胞癌 HCCC-9810 细胞凋亡率增加

A: 空白对照组; B: 空壳组; C: 0.5 mCiGy 组; D: 0.7 mCiGy 组; E: 0.9 mCiGy 组; 与空白对照组和空壳组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 0.5 mCiGy 组比较: #  $P < 0.05$ ; 与 0.7 mCiGy 组比较: \$  $P < 0.05$

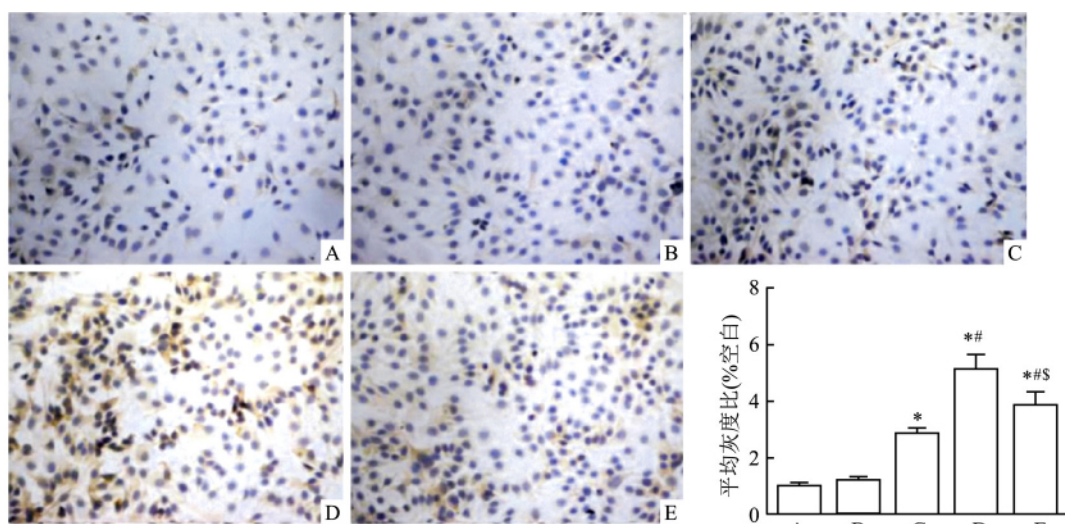


图 2 <sup>125</sup>I 粒子上调胆管细胞癌 HCCC-9810 细胞中 Livin 蛋白表达

各组细胞平均灰度值  $n = 5$ ; A: 空白对照组; B: 空壳组; C: 0.5 mCiGy 组; D: 0.7 mCiGy 组; E: 0.9 mCiGy 组; 与空白对照组和空壳组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 0.5 mCiGy 组比较: #  $P < 0.05$ ; 与 0.7 mCiGy 组比较: \$  $P < 0.05$

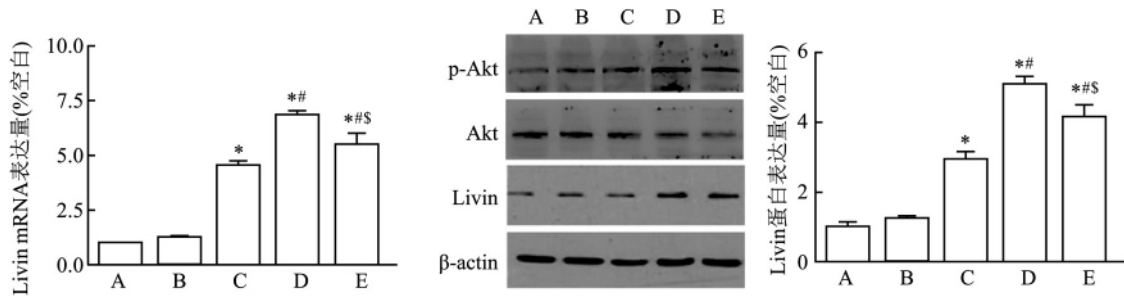


图3 <sup>125</sup>I 粒子增加胆管细胞癌 HCCC-9810 细胞中 Livin mRNA 和蛋白的表达

各组细胞平均灰度值 n = 5; A: 空白对照组; B: 空壳组; C: 0.5 mCi Gy 组; D: 0.7 mCi Gy 组; E: 0.9 mCi Gy 组; 与空白对照组和空壳组比较:

\* P < 0.05; 与 0.5 mCi Gy 组比较: # P < 0.05; 与 0.7 mCi Gy 组比较: \$ P < 0.05

的变化 分别利用 RT-PCR 和 Western blot 法检测各组 HCCC-9810 细胞中 Livin mRNA 和蛋白的变化 结果如图 3 所示: 与空白对照组比较, 空壳组中 Livin 基因和蛋白水平无变化, 但 <sup>125</sup>I 粒子处理可上调细胞内 Livin mRNA ( $F = 84.132, P < 0.05$ ) 和蛋白 ( $F = 285.893, P < 0.05$ ) 的表达, 且两者的变化趋势相一致, 差异有统计学意义; 其中 0.7 mCi Gy <sup>125</sup>I 粒子组中 Livin 表达最多; 此外, 我们还发现细胞内蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 可被 <sup>125</sup>I 粒子磷酸化激活, 其激活水平与 Livin 表达相一致, 提示 Akt 的活化可能参与胆管癌细胞内 Livin 的表达。

### 3 讨论

胆管细胞癌由于其治疗方式选择的限制及大部分病例确诊时已经是中晚期, 预后较差且存活率偏低<sup>[8]</sup>。既往介入化疗栓塞术或化疗灌注术为无法手术的进展期胆管细胞癌的主要治疗手段, 但考虑胆管细胞癌多为乏血供肿瘤, 介入化疗栓塞术或化疗灌注术也不能明显提高患者生存期<sup>[9]</sup>。

<sup>125</sup>I 粒子治疗肿瘤的机制之一是利用其释放出的  $\gamma$  射线破坏肿瘤细胞的 DNA 双链, 诱导细胞凋亡和抑制有丝分裂而杀死细胞<sup>[10]</sup>。Livin 基因作为凋亡抑制因子 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 家族的成员之一, 具有抑制肿瘤细胞凋亡的作用, 可能对肿瘤细胞的放射敏感性产生一定的影响。已有研究<sup>[11]</sup>发现, Livin 基因的表达状况与恶性肿瘤患者放射治疗及化疗疗效有一定的相关性。汤志华等<sup>[12]</sup>通过免疫组化法检测胆管细胞癌组织及细胞中 Livin 蛋白的表达时发现, 仅胆管细胞癌组织及胆管细胞癌细胞中表达 Livin 蛋白, 癌旁组织及非肿瘤细胞中无 Livin 蛋白表达。本研究结果显示, 空白对照组与空壳组中胆管细胞癌细胞内 Livin 基因的表达差异无统计学意义, 提示空壳对胆管细胞癌 Livin

基因的表达影响不大, 但细胞凋亡率出现轻度增加 (差异无统计学意义), 这可能与空壳钛金属材料改变了细胞生长微环境所致有关。然而, 3 组 <sup>125</sup>I 粒子实验组中的细胞凋亡率均显著高于空白对照组 ( $P < 0.05$ ), 可能与置入 <sup>125</sup>I 粒子后改变细胞生长微环境及 <sup>125</sup>I 粒子释放出  $\gamma$  射线诱导细胞凋亡有关; 同时 3 组中 Livin 蛋白表达水平均较空白对照组及空壳组增加, 表明胆管细胞癌具有一定的放射抵抗性, 进一步佐证了 Moon et al<sup>[5]</sup>的研究结果。

本研究还发现, <sup>125</sup>I 粒子诱导 HCCC-9810 细胞内 Livin 表达和 <sup>125</sup>I 粒子诱导 HCCC-9810 细胞凋亡呈现明显的负相关, 即 Livin 表达越高, 细胞凋亡发生率越低, 0.7 mCi Gy <sup>125</sup>I 粒子诱导 HCCC-9810 细胞 Livin 基因表达的能力最强。考虑到 Livin 作为重要的凋亡抑制基因, 在各种恶性肿瘤中特异性高表达, 如肺癌、黑色素瘤等<sup>[13-14]</sup>, 已有学者认为其可作为抗肿瘤治疗的重要靶点<sup>[15]</sup>。但目前仅有少数体外细胞学研究证实胆管细胞癌中 Livin 的存在, 考虑体内外分子调控环境差异, 现有相关研究尚存在一定的欠缺, 故亟需建立胆管细胞癌动物模型以进一步论证上述结论。

综上所述, 本研究发现 <sup>125</sup>I 粒子可诱导胆管细胞癌细胞凋亡及 Livin 基因的表达, 同时也从基因和蛋白进一步验证胆管细胞癌放射抵抗性可能与 Livin 的表达水平有一定的相关性, 提示 Livin 可作为胆管细胞癌放射抵抗性的判断标志物及治疗靶点。

### 参考文献

[1] Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, et al. Global burden of disease cancer collaboration, The global burden of cancer 2013 [J]. *Jama Oncol* 2015, 1: 507-27.

[2] Khan S A, Davidson B R, Goldin R D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update [J].

- Gut ,2012 ,61( 12) : 1657 – 69.
- [3] Chen Y , Wang X L , Yan Z P , et al. The Use of  $^{125}\text{I}$  Seed Strands for intraluminal Brachytherapy of Malignant Obstructive Jaundice [J]. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* , 2011 , 27 ( 5) : 317 – 23.
- [4] Schoenthaler R , Phillips T L , Castro J , et al. Carcinoma of the extrahepatic bile ducts. The University of California at San Francisco experience [J]. *Ann Surg* , 1994 , 219( 3) : 267 – 74.
- [5] Moon Y , Dahlberg WK , Yu Y , et al. Radio-sensitivity of human biliary tract cancer cell lines in vitro [J]. *Int J Oncol* , 1997 , 10 ( 3) : 545 – 51.
- [6] Yang J F , Cao J G , Tian L , et al. 5,7-Dimethoxyflavone sensitizes TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Chemother Pharmacol* , 2012 , 69( 1) : 195 – 206.
- [7] 谢云霞, 马黎明. 蛋白酶体抑制剂联合伊马替尼对 K562 细胞 Livin 基因表达的影响 [J]. *山西医科大学学报* , 2009 , 40( 6) : 508 – 11.
- [8] Chen Y , Wang X L , Yan Z P , et al. The use of  $^{125}\text{I}$  seed strands for intraluminal brachytherapy of malignant obstructive jaundice [J]. *Cancer Biother Radiopharm* 2012 27(5) : 317 – 23.
- [9] Harder J , Blum H E. Cholangiocarcinoma [J]. *Praxis ( Ben 1994) , 2002 , 91( 34) : 1352 – 6.*
- [10] Qian J , Bao Z , Zou J , et al. Effect of pedicle fixation combined with  $^{125}\text{I}$  seed implantation for metastatic thoracolumbar tumors [J]. *J Pain Res* 2016 9: 271 – 8.
- [11] 洪有军, 夏海龙, 朱立新, 等. 抗凋亡基因 Livin 在成人急性淋巴细胞白血病细胞中的表达及临床意义 [J]. *安徽医科大学学报* , 2010 , 45( 4) : 480 – 3.
- [12] 汤志华, 陈积圣, 叶林, 等. Livin 基因在人胆管癌组织及胆管癌细胞系中的表达和意义 [J]. *华西医学* , 2009 , 24( 1) : 67 – 9.
- [13] Yuan D , Liu L , Xu H , et al. The effects on cell growth and chemosensitivity by livin RNAi in non-small cell lung cancer [J]. *Mol Cell Biochem* , 2009 , 320( 1/2) : 133 – 40.
- [14] Lazar I , Yaacov B , Shiloach T , et al. The oncolytic activity of newcastle disease virus NDV-HUJ on chemoresistant primary melanoma cells is dependent on the proapoptotic activity of the inhibitor of apoptosis protein Livin [J]. *J Virol* , 2010 , 84( 81) : 639 – 46.
- [15] Chen Y S , Li H R , Miao Y , et al. Local injection of lentivirus-delivered livin shRNA suppresses lung adenocarcinoma growth by inducing a G0/G1 phase cell cycle arrest [J]. *Int J Clin Exp Pathol* , 2012 , 5( 8) : 796 – 805.

## Effect of $^{125}\text{I}$ seeds brachytherapy on Livin expression and apoptosis of HCCC-9810 cholangiocarcinoma cells

Du Xiaoli<sup>1</sup> , Liu Zhaoyu<sup>2</sup> , He Qian<sup>1</sup> , et al

<sup>1</sup>Dept of Radiology , Chengdu First People's Hospital , Chengdu 610016;

<sup>2</sup>Dept of Radiology , Shengjing Hospital of China Medical University , Shenyang 110004)

**Abstract Objective** To observe the effects of  $^{125}\text{I}$  seeds brachytherapy on apoptosis of HCCC-9810 cholangiocarcinoma cells and Livin expression. **Methods** The study included 5 groups: blank control group , vacant shell group , and  $^{125}\text{I}$  seeds group ( 0. 5 mCiGy , 0. 7 mCiGy and 0. 9 mCiGy group) . HCCC-9810 cholangiocarcinoma cells were cultured in vitro. RT-PCR was used to detect the expression of Livin mRNA in HCCC-9810 cholangiocarcinoma cells 48h after treatment with  $^{125}\text{I}$  seeds. The expression of Livin protein in the cells was indicated using Immunohistochemistry and Western Blot. Flow cytometry was performed to assess apoptosis by using annexin V-fluorescein isothiocyanate ( Annexin V-FITC) /PI double staining. **Results** Compared with blank control group and vacant shell group , cell apoptosis rates of the three experimental groups were increased (  $P < 0.05$  ) , also , the expression of Livin was significantly enhanced (  $P < 0.05$  ) . Among the three experimental groups , the lowest expression of Livin along with the highest cell apoptosis rate were detected in 0. 5 mCiGy  $^{125}\text{I}$  seeds group; but the expression of Livin in 0. 7 mCiGy  $^{125}\text{I}$  seeds group was higher than that of another two groups , accompanying with the lowest cell apoptosis rate. However , there was no significant difference in Livin expression and apoptosis rate between blank control group and vacant shell group. **Conclusion** There is significant difference in ability to induce cell apoptosis among different doses of  $^{125}\text{I}$  , which may be related to the ability to elevate Livin expression in HCCC-9810 cholangiocarcinoma cells. Radio-resistance may be related to the level of Livin ( an apoptosis suppressor gene) gene expression in cholangiocarcinoma cells.

**Key word**  $^{125}\text{I}$  seeds; Livin; cholangiocarcinoma; radio-resistance; apoptosis