

研究论文

X射线对A549细胞DNA的损伤可能与JAK/STAT信号通路的激活有关

彭丽桥¹, 李程豪², 毛兵^{1,*}¹四川大学华西医院中西医结合科, 成都 610000; ²甘肃中医药大学甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究省级重点实验室, 兰州 730000

摘要: 本研究旨在观察不同剂量X射线对A549细胞DNA的损伤和JAK/STAT信号通路激活水平之间的关系。分别用2、4、8 Gy X射线对A549细胞进行照射后, 用CCK8法检测A549细胞增殖情况, 用酶联免疫法检测照射后不同时间点培养液上清中白介素6 (interleukin 6, IL-6)的含量, 用免疫荧光染色法检测细胞IL-6受体(IL-6 receptor, IL-6R)和p53结合蛋白1 (p53 binding protein 1, 53BP1)的蛋白表达情况, 用Western blot检测细胞JAK2、p-JAK2、STAT3和p-STAT3的蛋白表达水平。结果显示, 和对照组相比, X射线照射可降低细胞增殖水平, 上调53BP1表达, 提高细胞培养液上清中IL-6含量, 并上调IL-6R、JAK2、p-JAK2、STAT3和p-STAT3表达水平。X射线照射的上述作用存在一定的剂量依赖性。以上结果提示, X射线造成细胞DNA损伤的机制可能与JAK/STAT信号通路的激活有关。

关键词: X射线; A549细胞; JAK/STAT信号通路**中图分类号:** R734.2

Activation of the JAK/STAT signal pathway may be involved in DNA damage of A549 cells induced by X-ray

PENG Li-Qiao¹, LI Cheng-Hao², MAO Bing^{1,*}¹Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610000, China; ²Provincial-level Key Lab for Molecular Medicine of Major Diseases and the Prevention and Treatment with Traditional Chinese Medicine Research in Gansu Colleges and Universities, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

Abstract: The aim of this study was to investigate the relationship between the effects of different doses of X-rays on DNA damage and JAK/STAT signaling pathway activation in A549 cells. The A549 cells were radiated with X-rays at doses of 2, 4, and 8 Gy. The proliferation of A549 cells was detected by CCK8 method. The content of interleukin 6 (IL-6) in culture medium at different time points after irradiation was detected by enzyme-linked immunoassay, and the expression levels of IL-6 receptor (IL-6R) and p53 binding protein 1 (53BP1) were detected by immunofluorescent staining. The expression levels of JAK2, p-JAK2, STAT3 and p-STAT3 were detected by Western blot. The results showed that, compared with the control group, X-ray irradiation reduced the cellular proliferation, up-regulated the expression of 53BP1, increased the IL-6 content in the medium supernatant, and up-regulated the protein expression levels of IL-6R, JAK2, p-JAK2, STAT3, and p-STAT3. The above effects of X-ray irradiation were dose-dependent. These results suggest that the mechanism by which X-rays cause DNA damage in A549 cells may involve activation of the JAK/STAT signaling pathway.

Key words: X-ray; A549 cells; JAK/STAT signal pathway

Received 2018-12-13 Accepted 2019-06-02

This work was supported by Special Research Project of TCM Science and Technology of Sichuan Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine, China (No. 2016Z007) and the National Key R&D Program, China (No. 2017YFB1002303)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-23-45676868; E-mail: maobing@medmail.com.cn

肿瘤放射治疗是利用放射线治疗肿瘤的一种局部治疗方法,临床上大约70%的肿瘤患者接受过放射治疗,因此,放射性治疗为恶性肿瘤的主要治疗手段之一^[1]。目前常用的放疗仪器X射线治疗机或加速器所产生的X射线具有波长短、穿透力强、能量高等特点^[2]。当一定剂量的X射线对人体病灶部位进行照射时,被照射的细胞和组织将受到损伤或抑制,达到对肿瘤的治疗目的^[3]。非小细胞肺癌在临床上约占肺癌病例的80%~85%,由于其多以浸润性形式生长,难以通过手术完全清除,通常还需进行放、化疗,但放射治疗可能会导致放射性肺炎、放射性食管炎和放射性脊髓炎等并发症,且并发症的发生几率和程度与放疗剂量存在正相关关系^[4]。研究显示,高能X射线能够抑制宫颈癌HeLa细胞存活率,并与辐射剂量相关^[5];不同剂量的X射线照射能够影响人肺癌相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)表型蛋白的表达,但在0~16 Gy的辐射剂量范围中,8 Gy剂量的X射线照射对其增殖、迁移能力的影响最为显著^[6]。不同种属的肿瘤细胞对于X射线的敏感度、甚至生物学效应都不同。同时,X射线对机体的正常细胞和组织也存在一定的影响,并可能引发一系列病理反应^[7]。本课题组前期预实验显示,Lewis肺癌模型小鼠在接受不同剂量X射线干预后,虽然各组均有肿瘤细胞凋亡,但各组小鼠病理生理状态之间存在明显差异(数据未示)。因此,要在X射线最大效能范围内合理地控制辐射有效剂量,使得放射剂量尽可能保持最低。

JAK/STAT信号通路是X射线的敏感通路之一,大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤PC-12细胞的JAK/STAT信号通路在2、4和8 Gy X射线照射条件下均被激活,且X射线可剂量依赖性地上调该通路相关蛋白表达^[8]。但对于肺癌A549细胞,JAK/STAT3信号通路是否是X射线照射造成其损伤的关键通路,尚不清楚;同时,在不同的辐射剂量下,A549细胞受损伤程度与JAK/STAT3信号通路的激活程度间的关系尚不明了。本研究采用A549细胞为研究对象,用文献常用X射线剂量(2,4,8 Gy)进行干预,研究JAK/STAT3信号通路在不同剂量X射线诱导A549细胞DNA损伤过程中的作用,为X射线治疗肿瘤疾病的机制探索提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 0.25%胰蛋白酶购自Hyclone公

司,山羊多克隆抗体荧光二抗抗兔、兔抗人p53结合蛋白1(p53 binding protein 1, 53BP1)、JAK2、p-JAK2、白介素6受体(interleukin 6 receptor, IL-6R)多克隆抗体购自美国Abcam公司,Blocking Buffer购自美国Thermo公司,兔抗人GAPDH多克隆抗体购自ImmunoWay公司,兔抗人STAT3、p-STAT3多克隆抗体购自Cell Signaling Tech公司,山羊多克隆抗兔二抗购自ImmunoWay公司,IL-6酶联免疫试剂盒购自酶免公司,CCK8试剂购自Solarbio公司,DMEM高糖培养基购自Hyclone公司,胎牛血清购自上海翊圣生物科技有限公司。

1.2 细胞来源及培养 人A549细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心(Catalog No. TCHu150)。细胞培养液用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基。细胞于50 mL细胞培养瓶培养,置于37 °C、5% CO₂和饱和湿度细胞培养箱内培养。取对数生长期细胞进行实验。

1.3 照射条件及实验分组 X射线照射装置PRECISION X-RAY(美国Faxitron公司),剂量率为0.6 Gy·min(100 keV, 5 mA),照射剂量分别为2、4和8 Gy。实验分不接受X射线照射的对照组、2 Gy照射组(IR-1组)、4 Gy照射组(IR-2组)和8 Gy照射组(IR-3组)。

1.4 CCK8法检测细胞增殖水平 选取对数生长期的A549细胞,分别接种于96孔板,37 °C、5% CO₂培养箱中培养,每组5个复孔,并对辐射组细胞进行照射后继续培养,分别于1、2、3、4和5 d进行CCK-8法检测。于各时间点终止培养后,每孔加入10 μL CCK-8溶液,孵育4 h后在450 nm处用全波长酶标仪检测各组细胞的吸光度OD值。

1.5 酶联免疫法检测IL-6表达水平 在照射后24 h收集各组细胞培养液上清,用酶联免疫法进行测定,每组设5个复孔,具体步骤按照IL-6酶联免疫试剂盒说明书进行。

1.6 免疫荧光染色法检测IL-6R、53BP1表达情况

取对数生长期的A549细胞,接种于放置盖玻片的12孔板中,每组设3个复孔。照射组分别进行2、4和8 Gy X射线照射,对照组不接受照射,照射前细胞换液,各组细胞分别培养24 h后收集。用PBS缓冲液清洗后,4%多聚甲醛固定20 min,用Blocking Buffer,室温封闭10 min。加入含兔抗IL-6R、53BP1抗体(1:1 000)的Blocking Buffer,摇床上慢摇过夜。PBS冲洗后加入含荧光二抗(1:

500) 的 Blocking Buffer 孵育 1 h。PBS 冲洗后, 在盖玻片上滴加含 DAPI 染料的封片液 VECTASHIELD, 于激光共聚焦显微镜下观察, 用显微镜自带 FV10-ASW3.1 软件进行荧光定量检测。

1.7 Western blot 法检测 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 蛋白表达水平

收集各组细胞, 提取蛋白并定量。各组取 40 μg 蛋白上样, 经 5%、12% SDS-PAGE 分离, 转膜, 封闭后, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 分别与抗 JAK2 (1 : 1 000)、p-JAK2 (1 : 1 000)、STAT3 (1 : 1 000)、p-STAT3 (1 : 1 000) 及 GAPDH (1 : 5 000) 抗体相结合, 摇床过夜; 次日分别与山羊抗兔辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:5 000) 结合反应, ECL 发光显色后, 凝胶成像系统曝光检测, 并采用 ImageJ 软件对图像进行光密度分析, 以 GAPDH 作内参, 将目的蛋白条带与内参 GAPDH 条带的比值作为结果。

1.8 统计与分析

应用 SPSS 21.0 统计软件分析。两组间均数比较采用 *t* 检验, 多组均数间比较采用单因素方差分析, 用 LSD 法进行两两比较, $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同剂量X射线照射对细胞增殖水平的影响

与对照组比较, IR 组细胞生长速度明显较慢, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。在 X 射线照射后 1~2 d, 各 IR 组间增殖活性无明显差异; 在 X 射线照射后 3~5 d, IR-1 组增殖水平高于 IR-2 和 IR-3 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 在 X 射线照射后 4~5 d, IR-3 组 A549 增殖率低于 IR-2 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 1)。

2.2 各组53BP1表达情况

免疫荧光染色结果显示, 对照组细胞核中几乎没有出现表示 DNA 链损伤的 53BP1 焦点簇; IR 各组 A549 细胞核中出现了密集 DNA 损伤标志 53BP1 焦点簇, 而 IR-2 和 IR-3 组细胞核中 53BP1 焦点簇数量明显增多 (图 2)。

2.3 不同剂量X射线照射对细胞IL-6分泌的影响

与对照组相比, 经过辐射后 A549 细胞培养液中 IL-6 含量升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); IR-2 和 IR-3 组培养液中 IL-6 含量高于 IR-1 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); IR-3 组培养液中 IL-6 含量显著高于 IR-2 组 ($P < 0.05$) (图 3)。

2.4 不同剂量X射线照射对各组细胞IL-6R表达的影响

荧光定量结果显示, 与对照组相比, 辐射后的

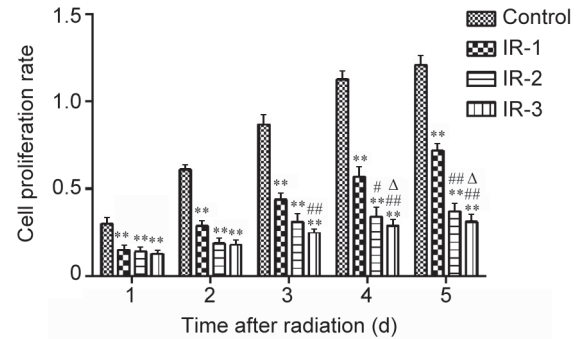


图 1. 不同剂量X射线对A549细胞增殖活性的影响

Fig. 1. The effect of different doses of X-ray on proliferation activity of A549 cells during 5 d after X-ray radiation detected by CCK8 method. Mean \pm SD, $n = 5$. ** $P < 0.01$ vs Control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs IR-1; $\Delta P < 0.05$ vs IR-2.

各组 IL-6R 表达量显著上调, 其中 IR-2 组和 IR-3 组 IL-6R 表达水平增加明显, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.01$); 而 IR-2 和 IR-3 的 IL-6R 表达量之间无显著差异 (图 4)。

2.5 不同剂量X射线照射对JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3蛋白表达水平的影响

与对照组相比, IR-2 和 IR-3 组细胞 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 蛋白的表达均显著增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 相较于 IR-1 组, IR-2 组和 IR-3 组 p-JAK2、p-STAT3 的表达显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); IR-2 组和 IR-3 组相比, 各蛋白的表达水平之间未见明显差异 (图 5)。

3 讨论

X 射线是一种波长短、能量大的电磁波, 能够被转变成热能, 使 A549 细胞器及 DNA 发生损伤, 进而导致细胞增殖抑制^[3, 9]。本研究结果显示, X 射线干预后, A549 细胞增殖均受到明显抑制, 但从第三天开始, IR-1 细胞增殖速度逐渐恢复, IR-2 和 IR-3 组 A549 细胞增殖率仍然处于较低水平, 且 IR-3 组的细胞增殖率低于 IR-2 组。另外, 53BP1 蛋白是一种关键的 DNA 损伤反应蛋白, 53BP1 焦点簇的数量直接反映 DNA 损伤的程度^[10, 11]。本研究结果显示, 不同剂量 X 射线干预后, 各干预组 A549 细胞核内均出现 53BP1 免疫荧光簇集点, 且簇集点的数量与辐射剂量有关, IR-2 和 IR-3 组 53BP1 免疫荧光簇集点明显多于 IR-1 组。以上结果表明, X 射线可剂量依赖性地损伤 A549 细胞 DNA, 从而抑制细胞增殖。

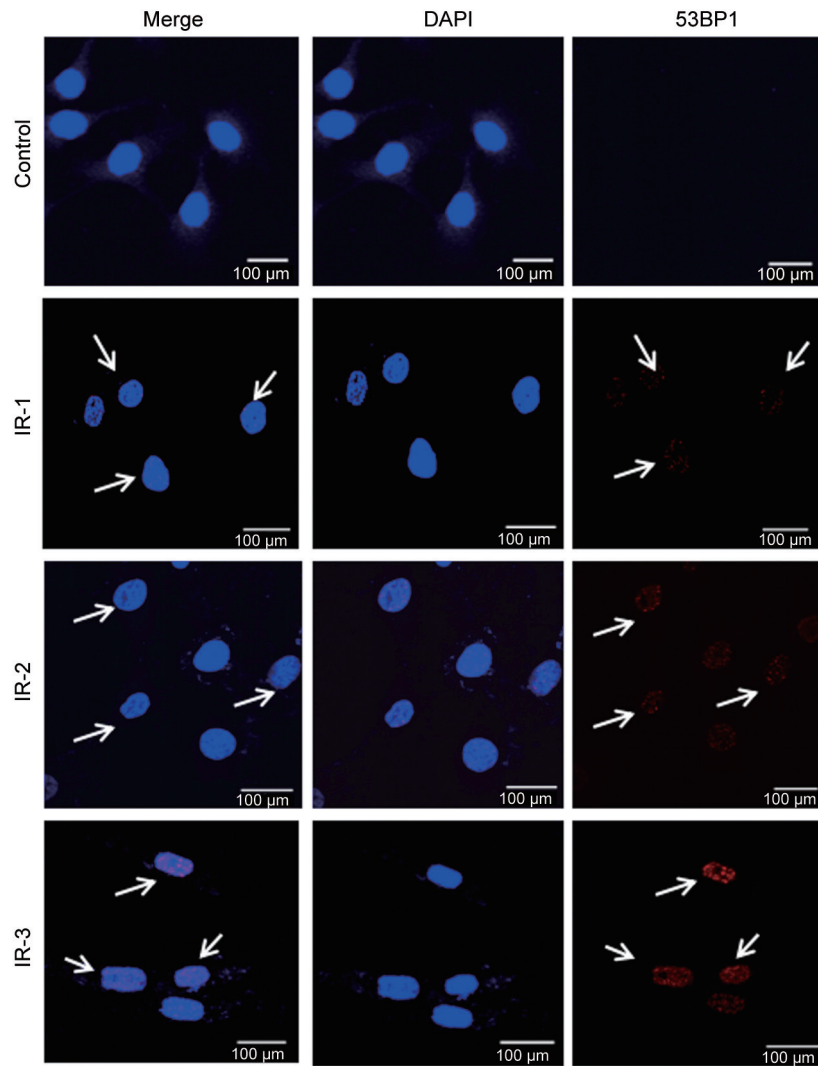


图 2. 不同剂量X射线照射A549细胞后产生53BP1免疫荧光簇集点情况

Fig. 2. Immunofluorescence cluster of 53BP1 produced by A549 cells irradiated with different doses of X-ray detected by immunofluorescence staining. Scale bar, 100 μm.

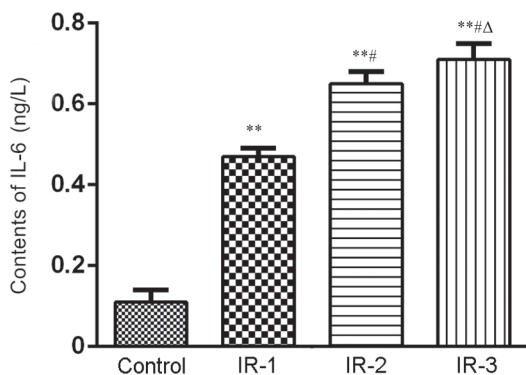


图 3. 不同剂量X射线对A549细胞上清中IL-6表达的影响

Fig. 3. The effect of different doses of X-ray on the expression of IL-6 in supernatant of A549 cells detected by ELISA. Mean ± SD, $n = 5$. ** $P < 0.01$ vs Control; # $P < 0.05$ vs IR-1; Δ $P < 0.05$ vs IR-2.

JAK/STAT 信号通路是经典的炎症信号通路，参与细胞的增殖、分化、凋亡以及免疫调节等许多重要的生物学过程^[12, 13]。外环境中的 IL-6 在与 IL-6R 结合后与细胞膜上 GP130 形成二聚体跨膜激活 JAK1/2，并进一步激活 STAT3，促使其磷酸化以实现信号转导^[14, 15]。STAT 磷酸化后发生聚合并以活化的转录激活因子形式存在，随后进入细胞核内调控相关基因的表达和转录^[16, 17]。JAK/STAT 信号通路被认为是对 X 射线敏感性较高的通路之一，但对 A549 细胞而言，其是否是 X 射线损伤的主要路径尚不清楚。本研究结果显示，X 射线干预后细胞培养液中 IL-6 含量明显增多，且与照射剂量成正比。本研究进一步观察 IL-6R 的表达情况，结果

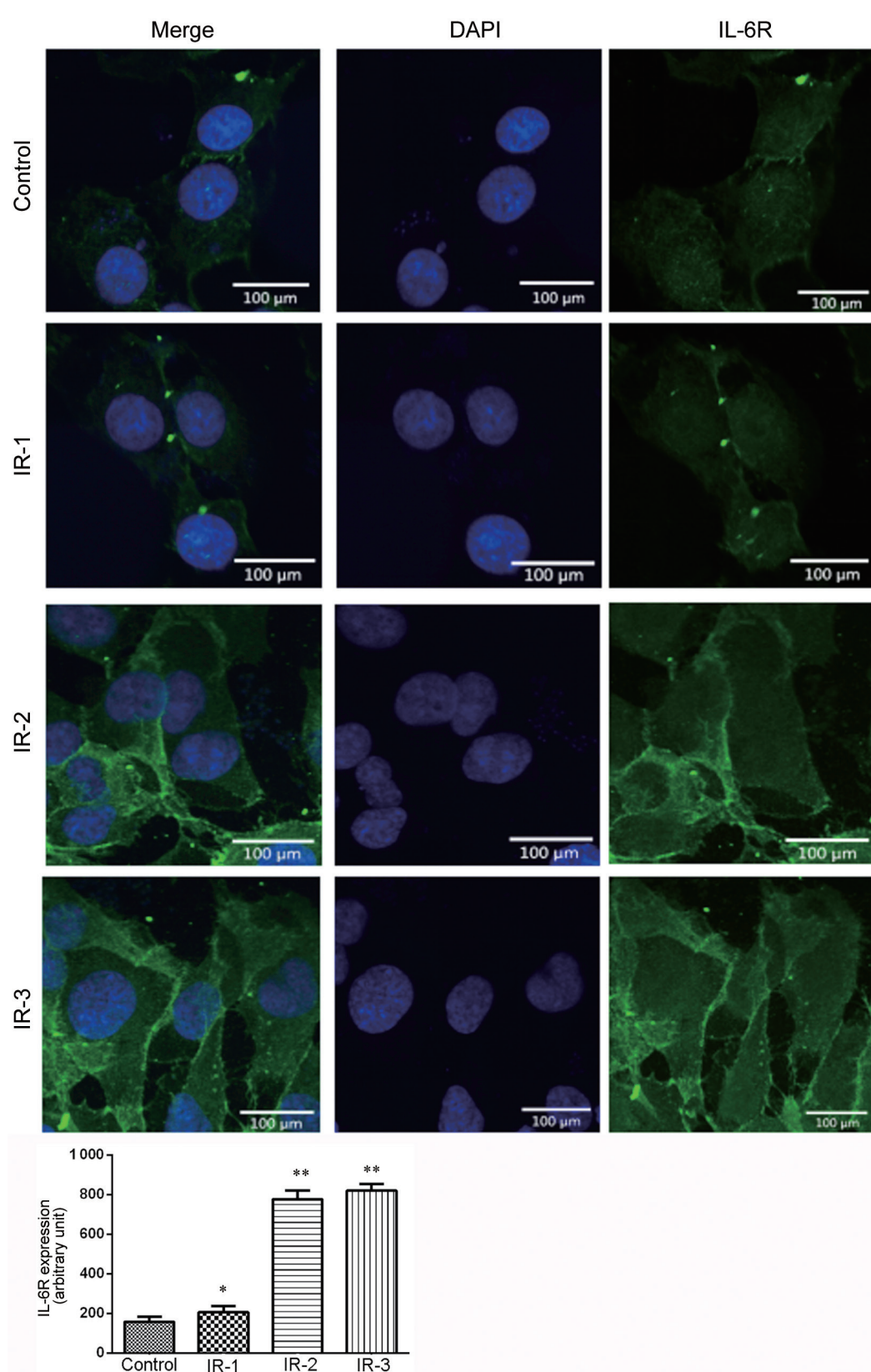


图 4. 不同剂量X射线对A549细胞膜上IL-6R表达水平的影响

Fig. 4. Effect of different doses of X-ray on the expression of IL-6R on A549 cell membrane detected by immunofluorescence staining. Scale bar, 100 μm. Mean ± SD, $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control.

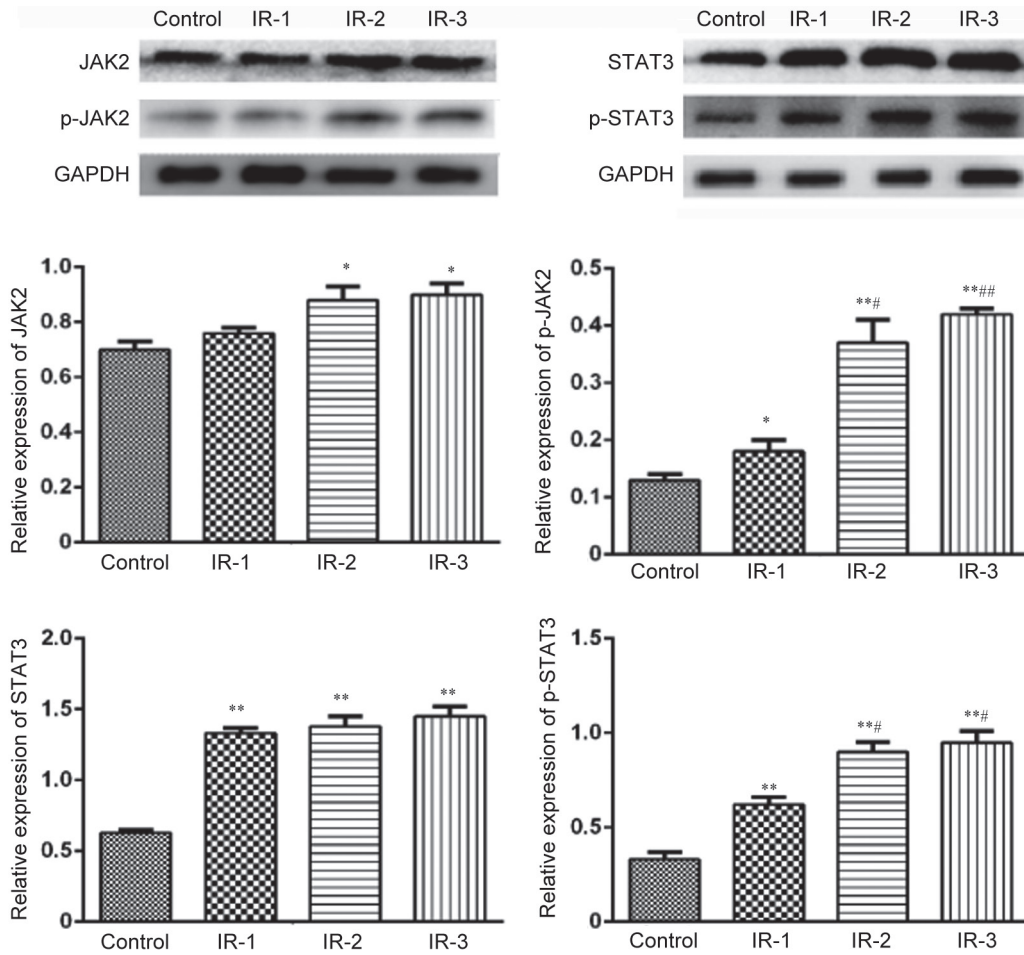


图 5. 不同剂量X射线对A549细胞JAK/STAT信号通路关键蛋白JAK2、p-JAK2、STAT3和p-STAT3表达的影响
 Fig 5. Effects of different doses of X-ray on the expression of JAK/STAT signaling pathway key proteins JAK2, p-JAK2, STAT3 and p-STAT3 in A549 cells. The protein expressions were detected by Western blot. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs IR-1.

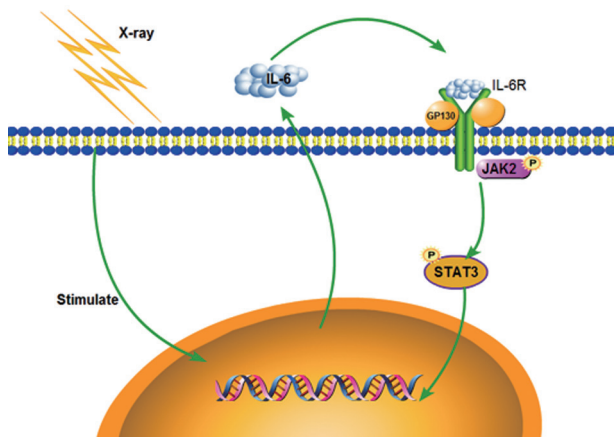


图 6. X射线激活A549细胞JAK/STAT信号通路造成DNA损伤关系图
 Fig. 6. Graph of DNA damage in A549 cells induced by X-ray through activation of JAK/STAT signaling pathway.

显示，X射线照射剂量依赖性地上调细胞IL-6R表达水平，但4 Gy和8 Gy X射线照射的作用无明显差异。该结果提示，由X射线诱导A549细胞生成的IL-6与细胞膜上IL-6R结合，进一步激活相关通路；而4和8 Gy X射线照射对IL-6R表达量作用之间没有明显差异，原因可能是4 Gy剂量X射线照射所诱导生成IL-6的量已经达到IL-6R的饱和结合量。本研究结果进一步显示，X射线可上调JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3蛋白表达水平，IR-2和IR-3组这些蛋白的表达水平高于IR-1组，而IR-2和IR-3组间无明显差异。以上结果提示，X射线刺激A549产生大量IL-6，IL-6与细胞膜上IL-6R发生结合后激活JAK/STAT信号通路，其中，4 Gy剂量所产生的IL-6已经达到与IL-6R饱和结合量，即

可最大程度地激活 JAK/STAT 通路 (图 6)。

综上所述, 本研究表明, 4 Gy X 射线照射对 A549 细胞 DNA 损伤作用虽然低于 8 Gy 剂量, 但是效果显著, 同时, 4 Gy 剂量 X 射线已能够充分激活 JAK/STAT 信号通路, 因此 4 Gy 是用于体外 X 射线干预 A549 细胞的合适剂量。此外, 鉴于 X 射线可能是多通路、多靶点对肿瘤细胞杀伤作用^[18], 需要进一步对其他信号转导通路及靶点进行研究。

参考文献

- 1 Wahl DR, Stenmark MH, Tao Y, Pollom EL, Caoili EM, Lawrence TS, Schipper MJ, Feng M. Outcomes after stereotactic body radiotherapy or radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2016; 34(5): 452–459.
- 2 Katsukawa M, Nakajima Y, Fukumoto A, Doi D, Takahashi J. Fail-safe therapy by gamma-ray irradiation against tumor formation by human induced pluripotent stem cell-derived neural progenitors. *Stem Cells Dev* 2016; 25(11): 815–822.
- 3 Harms W, Budach W, Dunst J, Feyer P, Fietkau R, Haase W, Krug D, Piroth M, Sautter B, Sedlmayer F, Souchon R, Wenz F, Sauer R. DEGRO practical guidelines for radiotherapy of breast cancer VI: therapy of locoregional breast cancer recurrences. *Strahlenther Onkol* 2016; 192(4): 199–208.
- 4 Jiang T, Min W, Li Y, Yue Z, Wu C, Zhou C. Radiotherapy plus EGFR TKIs in non-small cell lung cancer patients with brain metastases: an update meta-analysis. *Cancer Med* 2016; 5(6): 1055–1065.
- 5 Li ZR (李芷茹), LI Chao, Zeng SQ, He L, Huang JM, Lang JY. Effect of high energy X-rays at different dose rates on biological effects of cervical cancer HeLa cells. *J Cancer Res Prev Treat (肿瘤防治研究)* 2018; 45(11): 870–873 (in Chinese with English abstract).
- 6 Dong Y (董熠), Li YG, Yao Y, Zheng ZL, Song QB. Activation of human lung cancer-associated fibroblasts induced by irradiation. *J Chin Oncol (肿瘤学杂志)* 2018; 24(11): 1071–1075 (in Chinese with English abstract).
- 7 Guo N, Wang WQ, Gong XJ, Gao L, Yang LR, Yu WN, Shen HY, Wan LQ, Jia XF, Wang YS, Zhao Y. Study of recombinant human interleukin-12 for treatment of complications after radiotherapy for tumor patients. *World J Clin Oncol* 2017; 8(2): 158–167.
- 8 Yu J (喻晶), Zhang Y, Diao B. Effects of JAK-STAT signaling pathway, IL-1 β and IL-6 on injury of PC12 cells with X-ray irradiation. *Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志)* 2017; 33(1): 174–178 (in Chinese with English abstract).
- 9 Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Demaria S, Formenti SC, Kroemer G. Activating autophagy to potentiate immunogenic chemotherapy and radiation therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2017; 14(4): 247–258.
- 10 Meitinger F, Anzola JV, Kaulich M, Richardson A, Stender JD, Benner C, Glass CK, Dowdy SF, Desai A, Shiao AK, Oegema K. 53BP1 and USP28 mediate p53 activation and G1 arrest after centrosome loss or extended mitotic duration. *J Cell Biol* 2016; 214(2): 155–166.
- 11 Isono M, Niimi A, Oike T, Hagiwara Y, Sato H, Sekine R, Yoshida Y, Isobe SY, Obuse C, Nishi R, Petricci E, Nakada S, Nakano T, Shibata A. BRCA1 directs the repair pathway to homologous recombination by promoting 53BP1 dephosphorylation. *Cell Rep* 2017; 18(2): 520–532.
- 12 Nunes C, Almeida L, Barbosa RM, Laranjinha J. Luteolin suppresses the JAK/STAT pathway in a cellular model of intestinal inflammation. *Food Funct* 2017; 8(1): 387–396.
- 13 Yu CB (俞辰斌), Zhao GL, Yu LM, Yu SQ, Duan WX, Zhang HF. Proanthocyanidin protects H9C2 cells against hypoxia/reoxygenation injury via JAK2/STAT3 signaling pathway. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2016; 68(5): 568–574 (in Chinese with English abstract).
- 14 Pardanani A, Gotlib J, Roberts AW, Wadleigh M, Sirhan S, Kawashima J, Maltzman JA, Shao L, Gupta V, Tefferi A. Long-term efficacy and safety of momelotinib, a JAK1 and JAK2 inhibitor, for the treatment of myelofibrosis. *Leukemia* 2018; 32(4): 1035–1038.
- 15 Hu GQ, Du X, Li YJ, Gao XQ, Chen BQ, Yu L. Inhibition of cerebral ischemia/reperfusion injury-induced apoptosis: nicotiflorin and JAK2/STAT3 pathway. *Neural Regen Res* 2017; 12(1): 96–102.
- 16 Doi T, Ishikawa T, Okayama T, Oka K, Mizushima K, Yasuda T, Sakamoto N, Katada K, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Takagi T, Naito Y, Itoh Y. The JAK/STAT pathway is involved in the upregulation of PD-L1 expression in pancreatic cancer cell lines. *Oncol Rep* 2017; 37(3): 1545–1554.
- 17 Liu CB (刘重斌), Wang R, Dong MW, Gao XR, Yu F. Expression of hepcidin at the choroid plexus in normal aging rats is associated with IL-6/Stat3 signaling pathway. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2014; 66(6): 639–646 (in Chinese with English abstract).
- 18 Wu X, Wu MY, Jiang M, Zhi Q, Bian XJ, Xu MD, Gong FR, Hou J, Tao M, Shou LM, Duan WM, Chen K, Shen M, Li W. TNF- α sensitizes chemotherapy and radiotherapy against breast cancer cells. *Cancer Cell Int* 2017; 17(1): 13.