

# 毫米波辐照诱导鼻咽癌细胞凋亡 及分子机制的实验研究\*

王艳萍 袁淑兰 陈晓禾 杨燕 宋毅 陈念永\*\*

(华西医科大学附属第一医院肿瘤中心肿瘤研究所, 四川, 成都, 610044)

**摘要** 采用细胞计数、光镜和FCM等方法检测毫米波对人鼻咽癌CNE<sub>1</sub>细胞增殖、细胞凋亡及相关基因表达的影响, 结果发现: 波长为7.1mm, 频率为42.2GHz, 功率密度为1mW/cm<sup>2</sup>的毫米波辐照, 1次/日, 30min/次, 照射4次, 能显著抑制CNE<sub>1</sub>细胞增殖和克隆形成; 并诱导细胞凋亡, 光镜下可见到明显的凋亡细胞, FCM示凋亡百分比显著增加。FCM结果表明其增殖抑制作用与P21表达上调及Cyclin D<sub>1</sub>表达下调有关, 其凋亡诱导机制可能是非P53依赖的途径, 而主要通过上调c-Myc、下调Bcl-2和Fas基因的表达来实现。

**关键词** 毫米波, 鼻咽癌细胞株, 凋亡, 基因表达。

## EXPERIMENTAL STUDY OF APOPTOSIS AND ITS MOLECULAR MECHANISMS OF NASOPHARYNGEAL CARCINOMA CELL INDUCED BY MILLIMETER WAVE IRRADIATION\*

WANG Yan-Ping YUAN Shu-Lan CHEN Xiao-He YANG Yan SONG Yi CHEN Nian-Yong\*\*

(Oncology Center and Cancer Institute, First University Hospital,  
West China University of Medical Sciences, Chengdu 610044, China)

**Abstract** The effect of millimeter wave radiation on the nasopharyngeal carcinoma cell line CNE<sub>1</sub> cell proliferation and apoptosis and the expression of related genes was studied by using cell count, light microscopy and the flow cytometry (FCM). By millimeter wave radiation with 1 mW/cm<sup>2</sup> power density at frequency 42.2GHz and wave length 7.1mm on CNE<sub>1</sub> cells for a duration of 30min/day for 4 days, cell proliferation and cloning formation were inhibited markedly, and cell apoptosis was induced. FCM also revealed that the inhibiting effect of CNE<sub>1</sub> proliferation by millimeter wave was probably associated with the up-regulation of P21 and the down-regulation of Cyclin D<sub>1</sub>. The molecular mechanism of apoptosis inducing may be p53-independent and c-Myc-dependent. The up-regulation of c-Myc and Fas and down-regulation of Bcl-2 may play an important role in the process of apoptosis.

**Key words** millimeter wave, nasopharyngeal carcinoma cell line, apoptosis, gene expression

### 引言

低功率毫米波辐射可以对哺乳动物产生多种生物学效应<sup>[1]</sup>, 但对癌细胞的作用研究甚少。有限的文献报道<sup>[2-4]</sup>, 毫米波辐照可使癌细胞克隆形成力下降、抑制细胞的生长, 但其生物效应的机理还远不清楚, 国内外尚未见毫米波诱导细胞凋亡及凋亡相关分子改变的研究报道。为进一步探讨低功率毫米波非热生物效应的分子机制, 本文采用人鼻咽癌上皮细胞株CNE<sub>1</sub>, 研究42.2GHz毫米波对CNE<sub>1</sub>细胞

增殖能力、细胞凋亡及凋亡相关分子表达的影响。

### 1 实验材料和方法

人鼻咽癌上皮细胞系CNE<sub>1</sub>培养于含10%灭活小牛血清的RPMI1640(Gibico)培养液中, 在37℃恒温水浴箱中密闭培养。

中国电子科技大学研制提供了毫米波辐射装置, 波长为7.1mm, 频率为42.2GHz, 功率密度为1mW/cm<sup>2</sup>(1mW组)和5mW/cm<sup>2</sup>(5mW组); 辐射喇叭口面积为12cm<sup>2</sup>, 细胞接种于25ml培养瓶,

\* 国家自然科学基金(编号39770198)资助项目

\*\* 四川省肿瘤医院放疗中心, 四川, 成都, 610044

稿件收到日期 2000-12-14, 修改稿收到日期 2001-04-14

- The project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 39770198)

Received 2000-12-14, revised 2001-04-14

毫米波辐射头直接照射于翻转的、有细胞生长的瓶壁外表面。接种对数生长期的细胞于25ml方瓶,  $1.25 \cdot 10^7$ /瓶。次日开始毫米波照射, 每组每天照1次, 每次30 min, 分别照射1、2、3、4、5次。对照组细胞也每天在室温下翻转培养瓶30min, 每天各取三瓶细胞, 用0.4%的台盼兰计数死活细胞数。细胞在照射过程中, 每日在倒置显微镜下, 观察其形态变化, 并用甲醇固定、Giemsa染色, 高倍镜下观察细胞凋亡形态。根据此实验结果, 选择1mW/cm<sup>2</sup>辐射剂量, 对毫米波照射4次的细胞进行下列实验。

克隆形成实验: 接种经照射的细胞及对照组细胞于35mm平皿中, 300/皿, 4皿/组, 在5%CO<sub>2</sub> 孵箱中培养, 12天后Giemsa染色计数克隆数, 计算克隆形成率。

用流式细胞仪(FCM)分析细胞周期、凋亡百分比及凋亡相关基因表达的方法见文献[4]。在FACS-420型FCM上检测, 结果经电脑处理并打印出DNA含量直方图, 并自动拟合出细胞周期各时相比例及凋亡细胞百分比。细胞增殖指数(Proliferation Index, PI) = (S + G<sub>2</sub>M)/(G<sub>1</sub>/G<sub>1</sub> + S + G<sub>2</sub>M), 衡量细胞的分裂增殖活动。P53单抗(P1801)为Oneogene Science Inc. 产品, Bax, Fas, P21, c-Myc, Cyclin D 均为Santa Cruz US产品, 样品经处理后, FCM上机检测, BiosConsort 30 软件处理数据, 计算上述基因蛋白产物的阳性蛋白标记率。

## 2 实验结果

### 2.1 毫米波对CNE<sub>1</sub>细胞形态的影响

光学显微镜下观察, 对照组细胞排列密集, 细胞核大而均匀染色, 核仁清晰可见, 细胞呈圆形或多角型(见图1); 1mW组, 毫米波照射4次后细胞排列稀疏, 多呈星形或梭形, 与对照组细胞相比, 更



图1 对照组细胞  
Fig.1 Cells of control

多细胞呈现胞浆浓缩、染色质深染、聚集于核膜下, 核碎裂, 胞膜起泡, 部分细胞胞浆出现空泡等凋亡细胞特征(见图2)。5mW组细胞形态无明显变化。

### 2.2 毫米波对CNE<sub>1</sub>细胞生长的影响

5mW组对细胞无生长抑制作用; 而1mW组则在照射4次后对细胞生长产生明显抑制作用, 与对照组比较, 台盼兰染色均未见死细胞增加(见表1)

表1 毫米波辐照后细胞数

Table 1 Cell count after millimeter wave irradiation

时间 (天)	细胞数( $1 \cdot 10^5$ )		
	对照组	1mW组	5mW组
1	9.5±1.6	9.5±1.4	11.5±2.1**
2	23.0±3.5	25.5±2.3	29.0±4.1**
3	7.0±2.2	27.0±1.5	31.0±2.8**
4	34.5±3.2	16.5±1.9*	33.0±3.9
5	27.0±2.7	10.5±3.3*	31.0±2.9

表1中1mW组、5mW组结果与对照组相比: t检验, \* P<0.05; \*\* P<0.01

### 2.3 毫米波对CNE<sub>1</sub>克隆形成率的影响

对照组细胞的克隆形成率为42.3%, 而1mW组细胞的克隆形成率为29.4%, 克隆形成抑制率为30.5%。

### 2.4 毫米波对CNE<sub>1</sub>细胞周期和凋亡指数的影响

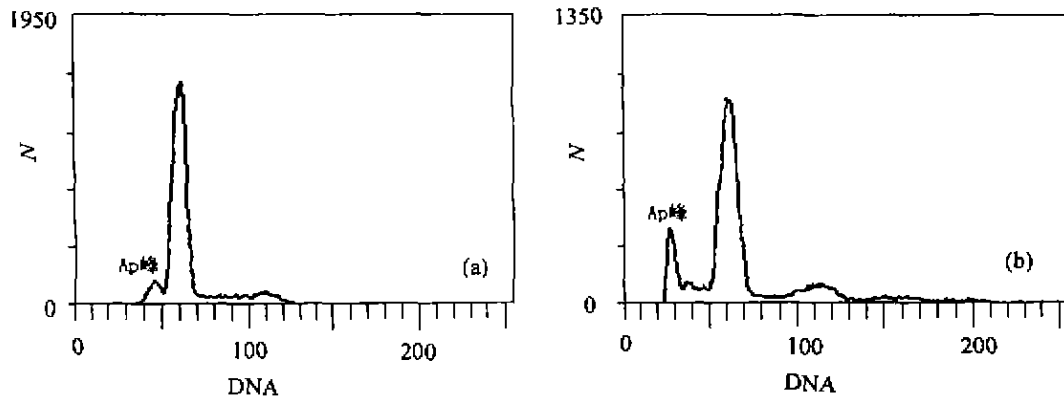
FCM检测显示, 经1mW毫米波照射4次后, 细胞周期分布发生改变, S期细胞由对照组的16.4%降至11.4%, G<sub>1</sub>/G<sub>1</sub>期细胞由74.0%增至76.9%, 细胞增殖指数(PI)由26.3%降至23.1%; 出现增高的亚二倍体凋亡峰(Ap峰)(见图3, N为细胞数), 细胞凋亡百分比由6.4%升至13.2%。

### 2.5 毫米波对CNE<sub>1</sub>细胞凋亡相关基因的影响

经毫米波作用后, CNE<sub>1</sub>细胞凋亡相关基因蛋白表达产物标记率变化见表2。



图2 1mW/cm<sup>2</sup>毫米波辐照后CNE<sub>1</sub>细胞凋亡形态  
Fig.2 Apoptotic pattern of CNE<sub>1</sub> cells after millimeter wave irradiation

图3 FCM检测CNE<sub>1</sub>细胞的DNA含量直方图

(a)对照组 (b)1mW组

Fig. 3 Histogram of DNA contents of CNE<sub>1</sub> measured by FCM  
(a) control (b) 1mW millimeter wave irradiation表2 毫米波辐照对CNE<sub>1</sub>细胞凋亡相关基因表达的影响  
Table 2 The effect of millimeter wave on the expression of apoptosis-related genes

组别	阳性蛋白标记率(%)						
	P53	Fas	Bcl-2	Bax	c-Myc	P21	cyclin D <sub>1</sub>
对照组	10.0	11.7	31.0	19.8	10.0	9.3	24.1
1mW组	9.0	20.0*	13.1*	16.6	19.5	19.3*	15.1

表2中1mW组结果与对照组比较, X<sup>2</sup>检验, \* P < 0.05

### 3 讨论

本文研究表明, 1mW/cm<sup>2</sup>的毫米波照射, 30min/次, 在照射4次以上时可对CNE<sub>1</sub>细胞的生长产生明显抑制, 并使细胞的克隆形成能力降低, 但对细胞无直接的细胞毒杀伤作用; 而5mW/cm<sup>2</sup>的毫米波照射, 则对CNE<sub>1</sub>细胞生长无明显影响, 说明毫米波对CNE<sub>1</sub>细胞的生长抑制作用与其功率密度有关, 但并不随功率密度的增加而增强, 只有一定的功率密度(1mW/cm<sup>2</sup>)才能抑制细胞生长, 这种生长抑制作用与毫米波辐照次数有关, 因为生物体可能在相当长时间中记忆毫米波作用的结果<sup>[3]</sup>, 为此辐照生物体需要足够长的时间, 或采取多次照射。

近年来的研究表明肿瘤的发生是细胞无限增殖和细胞凋亡受阻的结果; 多种抗肿瘤药物、放射线治疗等通过诱导凋亡途径而发挥抗肿瘤作用, 细胞凋亡的研究为抗肿瘤治疗提供了新的思路, 在临床上毫米波已用于肿瘤的治疗<sup>[4]</sup>, 但其临床抗癌效应及体外细胞生长抑制作用的机理还远不清楚, 是否存在诱导细胞凋亡机制尚未有研究报道, 本研究中毫米波对CNE<sub>1</sub>细胞的生长抑制作用与其对细胞的增殖抑制和诱导凋亡有关, FCM分析显示, 毫米波

照射4次后, S期细胞减少, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞增加, 细胞周期有被阻断于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的趋势, CDK-Cyclin D<sub>1</sub>复合物能促进细胞周期的进行, 使细胞不断增殖, 而P21蛋白则抑制它们的活性, 使细胞被阻断于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期, 毫米波对CNE<sub>1</sub>细胞增殖的抑制可能与其下调Cyclin D<sub>1</sub>、上调P21基因表达有关。

FCM分析表明, 1mW/cm<sup>2</sup>的毫米波辐照可诱导细胞凋亡百分率增加, DNA直方图中出现增高的亚二倍体凋亡峰(Ap峰), 光镜下也观察到凋亡细胞的特征, 从形态学角度证实毫米波可以诱导人体CNE<sub>1</sub>细胞发生凋亡, 细胞凋亡是一个多基因参与的级联式基因表达的过程, 目前研究较多的是依赖P53(P53-dependent)的细胞凋亡, 作为抑癌基因, wtP53基因通过上调P21蛋白的表达, 使细胞发生G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期停滞, 抑制细胞增殖; 或上调Bax基因表达启动凋亡, 清除DNA受损细胞, 许多研究表明, 放射线及许多化疗药物对肿瘤细胞诱导凋亡的作用是与P53有依赖性的, 但并非所有的凋亡都需要P53<sup>[5,6]</sup>, 本研究发现, CNE<sub>1</sub>细胞仅表达低水平的P53蛋白, 经毫米波处理后其表达无明显变化, 其下游基因Bax蛋白表达也无明显变化, 因此毫米波诱导的CNE<sub>1</sub>细胞凋亡的机制可能是非P53依赖的过程, 而毫米波诱导P21表达的增加则可能与P53无关, 王凤玮<sup>[7]</sup>等报道CNE<sub>1</sub>细胞的P53基因存在部分缺失, Spruck<sup>[8]</sup>等则报道CNE<sub>1</sub>细胞的P53基因第8外显子存在杂合子点突变, 李智<sup>[11]</sup>等报道CNE<sub>1</sub>鼻咽癌细胞移植瘤中瘤细胞的凋亡也是非P53依赖性的, 这些研究均支持CNE<sub>1</sub>细胞中发生的凋亡可能是不依赖于P53的过程。

Bcl-2 为凋亡抑制基因,可阻止多种细胞中不同凋亡刺激引起的凋亡,Bax 是第一个确定的 Bcl-2 同源基因.Bax 通过组成同源二聚体或与 Bcl-2 组成异源二聚体抑制 Bcl-2 的作用而发挥促进细胞凋亡的功能,细胞中 Bcl-2 与 Bax 的比例将决定细胞的生死命运.本研究发发现经毫米波处理后对 CNE<sub>1</sub> 细胞 Bax 的表达影响不大,但对 Bcl-2 的表达具有明显的抑制作用,使 Bcl-2/Bax 的比值下降,表明毫米波诱导凋亡可能是与抑制 Bcl-2 的表达有关.CNE<sub>1</sub> 细胞表达高水平的 Bcl-2(31.0%),这与王凤玮<sup>[4]</sup>等的研究结果一致.

激活 c-Myc 转录的同时就起始了细胞增殖和细胞凋亡这两种状态,发挥的功能取决于细胞接受的其它条件,当低血清、抑制细胞周期基因或抑癌基因存在时,促进细胞凋亡;当与致癌因素同时存在时(如 Bcl-2 异常表达时),c-Myc 促进细胞增殖.据文献<sup>[12,17]</sup>,c-Myc 基因诱导的成纤维细胞死亡是通过细胞表面 Fas-Fas L 作用途径实现的;T 淋巴细胞中发生的激活诱导的凋亡也是 c-Myc 依赖的 Fas-Fas L 介导的凋亡,即这些细胞凋亡的发生依赖于 c-Myc 的表达.毫米波辐照使 CNE<sub>1</sub> 细胞 c-Myc 表达增加,同时使 Bcl-2 表达降低、P21 表达增加,从而使 c-Myc 基因发挥其诱导凋亡的作用.CNE<sub>1</sub> 细胞 Fas 蛋白表达率较低,经毫米波处理后细胞表面 Fas 表达增加,因此毫米波很可能通过 c-Myc 依赖的 Fas/FasL 凋亡途径完成凋亡过程.

总之,波长为 7.1mm,频率为 42.2GHz,功率密度为 1mW/cm<sup>2</sup> 的毫米波辐照,1 次/日,30min/次,照射 4 次以上,可抑制 CNE<sub>1</sub> 细胞增殖,并诱导细胞凋亡增加.FCM 分析表明,其诱导细胞凋亡的分子机制可能不依赖 p53 基因,而是通过下调 Bcl-2、上调 c-Myc、上调 Fas 基因来实现,可能主要通过 c-Myc 依赖的 Fas-Fas L 途径诱导凋亡.此结果为进一步研究毫米波的抗肿瘤生物效应的机理提供了一个新的思路.

## REFERENCES

- [1] ZHANG Fu-Xin, LING Chong-Wen. *Biomedicine and Electronics of Extremely High Frequency*. Chengdu: University of Electronic Science and Technology Press (张富鑫,林崇文,极高频生物医学电子学.成都:电子科技大学出版社),1993:53-62.
- [2] DU Zhong-Min, GUO Yao. Effect of millimeter microwave radiation on the proliferation activity of HeLa cells in vitro. *Chinese J. of Physical Medicine* (杜忠民,郭鹏,毫米波辐照对培养的 HeLa 细胞增殖活性的影响.中华物理医学杂志),1993,15(4):199-202
- [3] DING Hua-Ye, WANG Wen-Liang, CHEN Jing-Zao, et al. Clonogenic capacity observation of millimeter-wave radiation in human hepatoma monolayer cell culture. *Chinese J. of Physical Medicine* (丁华野,王文亮,陈景藻,等.毫米波辐照人肝癌细胞克隆形成能力的观察.中华物理医学杂志),1992,14(3):168-170
- [4] HUANG Ren-Min, YUAN Shu-Lan, SONG Yi, et al. Cytometric analysis of tanshinone induced differentiation and apoptosis of HL-60 cells. *Chinese Clinical Oncology* (黄韧敏,袁淑兰,宋毅,等.丹参酮诱导 HL-60 细胞分化及凋亡的流式细胞术分析.中国肿瘤临床),1997,24(7):500-503
- [5] XUE Ping, CHENG Jing-Zao, YANG Hong, et al. Recent developments in the study of immunologic effect of millimeter wave. *Chinese J. of Physical Medicine* (雪平,陈景藻,杨红,等.毫米波免疫学效应研究近况.中华理疗杂志),1999,22(2):109-111
- [6] TANG You-Jun, WANG Zhong-He. Internal advance of supplementary therapy of millimeter wave radiation on malignant tumor. *Chinese J. of Physiotherapy* (唐友军,望中和,恶性肿瘤的毫米波辐照治疗国内研究进展.中华理疗杂志),1999,22(4):249-251
- [7] Clake AR, Purdie CA, Harrison DJ, et al. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature*. 1993,302:849-856
- [8] O'Neill AJ, Staunton MJ, Gaffney EF. Apoptosis occurs independently of bcl-2 and p53 over-expression in non-small cell lung carcinoma. *Histopathology*. 1996,29(1):45-50.
- [9] WANG Feng-Wei, LIANG Ke, YIN Wei-Bo, et al. Radiation-induced apoptosis of two nasopharyngeal carcinoma cell lines. *Chinese J. of Oncology* (王凤玮,梁克,殷蔚伯,等.辐射诱导鼻咽癌细胞系凋亡及其相关基因的研究.中华肿瘤杂志)1998,2:119-121
- [10] Spruck C H, Tsai Y C, Huang D P, et al. Absence of p53 gene mutations in primary nasopharyngeal carcinomas. *Cancer Research*,1992,52(17):4787-4790.
- [11] LI Zhu, FU Mao-Fu, ZONG Yong-Sheng, et al. Nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell apoptosis in nude mice. *Chinese J. of Cancer* (李智,傅茂福,宗永生,等.鼻咽癌细胞株裸鼠移植瘤中癌细胞的凋亡.癌症)1999,18(2):172-175
- [12] Wang R, Brunner T, Zhang L, et al. Fungal metabolite FR901228 inhibits c-Myc and Fas ligand expression. *Oncogene*. 1998,17(12):1053-1058
- [13] Hueber A O, Zorning M, Lyon D, et al. Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. *Science*. 1997,278(5341):1305-1309