

文章编号: 1007-4627(2015)02-0236-06

内质网应激对碳离子辐照宫颈癌 HeLa 细胞的影响

夏洁芳^{1,2}, 王转子¹, 魏巍¹, 党秉荣¹, 李文建¹

(1. 中国科学院近代物理研究所, 兰州 730000;
2. 兰州大学, 兰州 730000)

摘要: 利用不同剂量的碳离子辐照二硫苏糖醇 (2.5 mmol/L) 预处理的 HeLa 细胞, 探讨了内质网应激反应对碳离子辐照宫颈癌 HeLa 细胞的影响。实验发现: 与单独辐照组相比, 二硫苏糖醇联合碳离子辐照后细胞的存活率下降, 而凋亡率增加; 二硫苏糖醇联合碳离子辐照加重了碳离子辐照引起的细胞周期阻滞; 且联合辐照组的自噬被明显激活。结果表明, 持续的内质网应激可改变宫颈癌 HeLa 细胞对碳离子辐照反应, 且二硫苏糖醇可能通过影响 HeLa 细胞的自噬性细胞死亡通路发挥作用。

关键词: 碳离子辐照; 二硫苏糖醇; 细胞凋亡; 细胞周期; 自噬

中图分类号: Q28 **文献标志码:** A **DOI:** 10.11804/NuclPhysRev.32.02.236

1 引言

放射治疗是目前癌症治疗的三大常规手段之一, 长期以来, 常规放疗采用电子、X 和 γ -射线等辐射类型, 它们在某些肿瘤的治疗上已取得了良好的效果, 但常规射线在杀死癌细胞的同时, 周围健康组织也会受到较大的损伤, 造成明显的毒副作用, 为了避免肿瘤周围正常组织 (特别是对放射线敏感的重要组织和器官) 受到不必要的损伤, 有时不得不把总剂量减低, 以致肿瘤区得不到足够的照射剂量, 因此极大地降低了肿瘤的治愈率。而重离子束独特的物理学特性^[1]和放射生物学特性^[2], 使其在放疗上具有独特优势, 这种优势在基础和临床研究中得到了很好的体现^[3]。

常规射线辐照时所产生的活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 介导的细胞损伤是辐射致死的关键因素^[4]。经射线照射后细胞内生成大量 ROS, 使细胞处于持续的氧化胁迫状态^[5]。细胞中的氧化-还原稳态是通过还原型谷胱甘肽和蛋白中的巯基水平与 ROS 之间的动态相互作用来维系的。还原型谷胱甘肽是细胞中一类主要的巯基-二硫键缓冲物, 还原型谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽的比值是衡量细胞氧化-还原水平的一个指标。胞浆中, 该比值大于 50:1, 内质网中该比值则在 1:1~1:3 之间^[6]。内质网中正确的蛋白折叠以及二硫键的形成, 都有赖于内质网腔内的氧化环境, 内质

网腔内的氧化环境可促进二硫键的形成。当内质网腔中的氧化水平较高时, 将优先氧化内质网驻留的蛋白质, 使其失活, 从而导致未折叠蛋白聚集^[7]。二硫苏糖醇 (DTT) 是一种强还原剂, 一定浓度的 DTT 起到类似于还原型谷胱甘肽的作用, 有利于细胞中的氧化-还原稳态的维系, 保护细胞免受氧化应激损伤 (巯基类辐射防护剂)。但 DTT 也能抑制细胞内新合成蛋白中半胱氨酸残基的氧化, 影响肽链间二硫键的形成, 导致蛋白质折叠障碍, 大量折叠障碍的蛋白质堆积于内质网中, 触发内质网应激 (Endoplasmic Reticulum Stress, ERS)^[8]。所谓 ERS 是指由于某些原因导致内质网生理功能发生紊乱, 使细胞处于应激状态的一种亚细胞器病理过程。ERS 会激活细胞未折叠蛋白质反应 (UPR), 细胞通过 UPR 来增强内质网的功能、减轻内质网的负荷, 以适应 ERS, 因此, ERS 通常被视作为一种代偿反应, 具有保护性作用; 但是当内质网中错误折叠蛋白负荷过重时, 细胞 UPR 不能克服高强度的 ERS, 细胞就会死亡。

肿瘤细胞具有旺盛的蛋白合成和分泌功能, 因而其内质网稳态的维持显得尤为重要。肿瘤生长过程中缺氧、过酸和营养不足 (大多数实体瘤通常会遇到) 均能诱导 ERS, 激活 UPR, 进而使肿瘤细胞适应不利环境。许多类型的肿瘤被认为是依赖于 UPR 来适应苛刻的肿瘤微环境条件。肿瘤细胞 UPR 活化导致大多数肿瘤

收稿日期: 2014-05-28; 修改日期: 2014-06-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(11105189, 11179002)

作者简介: 夏洁芳(1988-), 女(回族), 宁夏银川人, 硕士研究生, 从事微生物与生化药学研究; E-mail: xia_jiefang@126.com

通信作者: 李文建, E-mail: wjli@impcas.ac.cn.

细胞能够在应激条件下存活, 允许肿瘤生长和增殖^[9], 这为治疗癌症提供了一种可行的思路, 即干扰肿瘤细胞 UPR, 诱导肿瘤细胞死亡。有两种靶向于 UPR 的方法: 其一, 抑制 UPR 组分, 使肿瘤细胞不能再应对环境应激而导致死亡; 其二, 增加对肿瘤细胞的应激压力, 使已激活的 UPR 超载而无法解决应激, 从而驱使细胞走向死亡途径。

不同抗肿瘤疗法联合使用的优点在于能限制单一疗法的超高剂量产生的非特异性毒性^[10]。为了重离子治癌研究的持续发展, 开展重离子联合其他治疗手段的基础研究工作是很有必要的。

研究显示, 辐照诱导的细胞死亡与内质网有一定的关联^[11], 而且, 辐照活体时也可引发内质网结构修饰^[12]。胞内应激情况下, ERS 与细胞存活息息相关, 反常的细胞应激可引起凋亡。本研究以强还原剂 DTT 为工具干扰 HeLa 细胞的氧化-还原状态, 建立 ERS 模型, 研究了 ERS 状态下细胞对碳离子辐射的各种应答效应, 通过与细胞对碳离子单独辐射应答效应的对比分析, 探讨了干扰 ERS 联合碳离子放射治疗癌症的可能性, 为重离子辐射治疗和防护制定出更为合理和有效的计划提供一定的实验数据支持。

2 材料和方法

2.1 细胞培养

人宫颈癌 HeLa 细胞由中国科学院近代物理研究所生物物理室保存并传代。将 HeLa 细胞置于体积分数为 10% 胎牛血清、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 青霉素的 RPMI1640 培养液中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5% CO_2 培养箱中培养。细胞呈贴壁生长, 待其铺满瓶壁时以 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 取对数生长期细胞进行实验。

2.2 碳离子照射

碳离子束由兰州重离子研究装置 (Heavy Ion Research Facility in Lanzhou, HIRFL) 深层终端提供, 引出能量为 365 MeV/u, LET 为 20 keV/ μm 。将细胞分为单独辐照组和联合辐照组, 联合辐照组在辐照前 3 h 加入 2.5 mmol/L DTT。碳离子剂量为 0, 0.5, 1, 2, 3, 5 Gy, 剂量率为 0.5 Gy/min。

2.3 辐照后处理

碳离子辐照 24 h 后去除 DTT, 继续培养 24 h, 消化细胞制成单细胞悬液, 进行细胞计数。

2.3.1 细胞克隆存活率测定

取上述细胞悬液, 梯度稀释后接种于 60 mm 培养

皿中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 10 d 左右, 弃掉培养基, 用 pH 7.2 的磷酸缓冲溶液 (PBS) 小心清洗, 甲醇固定, 8% Giemsa 染色, 统计细胞数大于 50 个的克隆数。绘制存活曲线。

2.3.2 细胞周期的测定

取上述细胞悬液, 离心, 用 PBS 洗涤两次, 75% 冰乙醇震荡混匀固定, 在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存待用。已固定的细胞, 离心, 弃去乙醇, PBS 洗涤两遍, 收集沉淀, 按试剂盒 (联科生物技术有限公司, 货号 CCS012) 加入 PI 染液, 振荡混匀后室温染色 15 min 后, 流式细胞仪 (Becton, Dickinson and Company) 上机检测 DNA 含量 (激发波长为 488 nm), 数据分析软件为 Modfit。

2.3.3 细胞凋亡的测定

取上述细胞悬液, 离心, 用 PBS 洗涤一次, 离心收集沉淀后, 按试剂盒 (碧云天生物技术研究, 货号 C1063-2) 加入 PI 染液与 Annexin V-FITC 染液, 染色 15 min 后流式细胞仪上机检测细胞凋亡率。Cell Quest 软件收集 1×10^4 个细胞, 并分析细胞凋亡变化。

2.3.4 细胞自噬相关蛋白 Beclin 1 的检测

取上述细胞悬液, 离心, 用 PBS 洗涤两次, 加入破膜液与封闭液, 混匀, 室温放置 1 h; 离心, 吸去破膜液与封闭液后, 直接加入 Beclin 1 兔多克隆抗体 (abcam, 货号: ab16998), 混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 离心, PBS 洗两次, 避光加入羊抗兔 IgG-FITC (Gaithersburg, 货号: 02-15-06), 混匀室温染色 1 h; 离心收集细胞, PBS 洗两次, 流式细胞仪上机检测蛋白表达百分率。

2.4 统计学处理

采用 Origin Pro 8.1 绘图, SPSS 15.0 统计软件, 两两比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为统计具有显著性差异。

3 结果

3.1 细胞克隆存活率

图 1 显示了碳离子束照射后 HeLa 细胞的存活分数 (SF)。SF 可按以下公式计算: $\text{SF} = S_x/S_0$, 式中 S_x 为细胞克隆形成率, S_0 为对照细胞克隆形成率。与对照组相比, 不同剂量的碳离子辐照及 DTT 联合辐照组 HeLa 细胞的存活率均明显下降。同时 DTT 联合碳离子辐照存活率相对于单独辐照组, 其细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$)。说明 DTT 可使碳离子辐照后的细胞存活率显著下降。

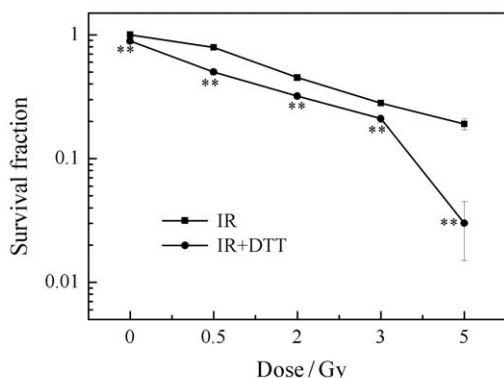


图 1 单独碳离子辐照及 DTT 联合碳离子辐照后 HeLa 细胞的克隆存活曲线
图中**表示 DTT 联合碳离子辐照组与单独辐照组相比具有显著差异 ($P < 0.01$)。

3.2 细胞周期检测

不同处理组的细胞周期分布如图 2 所示, 结果显示, 碳离子辐照及 2.5 mmol/L DTT 联合碳离子辐照, HeLa 细胞周期即发生变化, 其 G_2/M 期细胞数增加, 而 G_0/G_1 期细胞数减少; 同时 1 Gy+DTT, 2 Gy+DTT, 5 Gy+DTT 处理组 HeLa 细胞 G_2/M 期百分数明显高于 0 Gy 对照组 ($P < 0.05$)。此结果显示, DTT 加重了碳离子辐照诱导的 HeLa 细胞 G_2/M 期阻滞。

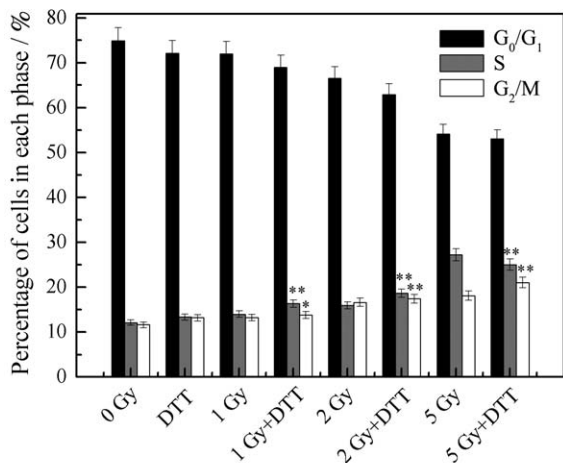


图 2 碳离子单独辐照及 DTT 联合碳离子辐照后 HeLa 细胞周期分布情况
图中*表示 DTT 联合碳离子辐照组 HeLa 细胞 S 期、 G_2/M 期分布与 0 Gy 组相比具有差异性 ($P < 0.05$); **表示 DTT 联合碳离子辐照组 HeLa 细胞 S 期、 G_2/M 期分布与 0 Gy 组相比具有显著差异 ($P < 0.01$)。

3.3 细胞凋亡检测

流式细胞仪分析显示, 碳离子辐照及 2.5 mmol/L

DTT 联合碳离子辐照, HeLa 细胞凋亡率都显著增加 (图 3)。与对照组比较, 1, 2, 5 Gy 及 1 Gy+DTT, 2 Gy+DTT, 5 Gy+DTT 处理组 HeLa 细胞凋亡率显著上升 ($P < 0.01$), 同时 DTT 联合碳离子辐照组 HeLa 细胞凋亡率明显高于单独辐照组 ($P < 0.05$), 即 DTT 提高了碳离子辐照诱导的细胞凋亡。

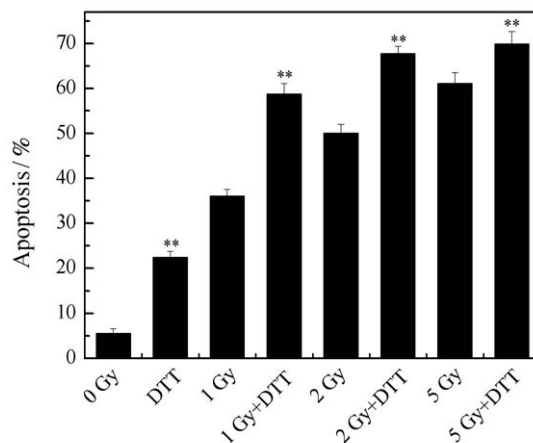


图 3 碳离子单独辐照及 DTT 联合碳离子辐照后 HeLa 细胞的凋亡率
图中**表示 DTT 联合碳离子辐照组 HeLa 细胞的凋亡率与 0 Gy 组相比具有显著差异 ($P < 0.01$)。

3.4 细胞自噬相关蛋白 Beclin 1 的检测

图 4 为 HeLa 细胞经不同方法处理后 Beclin 1 蛋白表达变化情况。表明: 碳离子辐照及 2.5 mmol/L DTT 联合碳离子辐照, Beclin 1 蛋白表达都明显增加 ($P < 0.01$), 同时 1 Gy+DTT、2 Gy+DTT、5 Gy+DTT 处理组 HeLa 细胞 Beclin 1 蛋白表达明显高于

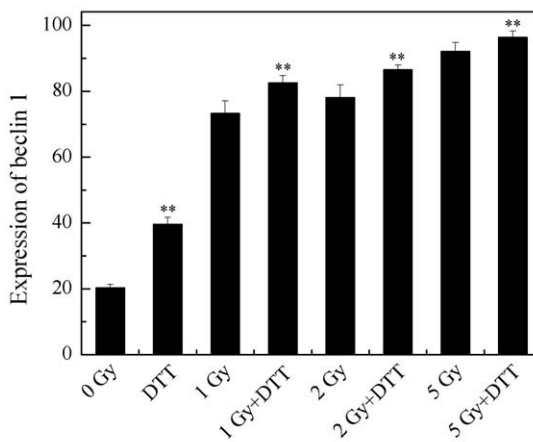


图 4 碳离子单独辐照及 DTT 联合碳离子辐照后 HeLa 细胞 Beclin 1 蛋白表达变化
图中**表示 DTT 联合碳离子辐照组 HeLa 细胞 Beclin 1 蛋白表达变化与 0 Gy 组相比具有显著差异性。

相应的单独辐照组 ($P < 0.01$)。表明碳离子辐照可引起 HeLa 细胞发生自噬, 而加入 DTT 后, 细胞发生了更加强烈的细胞自噬。

4 讨论

内质网对环境的刺激非常敏感, 扰乱内质网的功能可使细胞处于应激状态, 诱发 ERS, 电离辐射就可诱导此反应^[11]。轻度 ERS 可激活内质网分子伴侣等保护分子的表达, 以保护细胞免受损伤, 抵抗应激, 维持生存^[13]; 轻度 ERS 激活的 UPR 还可启动自噬, 清除那些超出蛋白酶体清除能力的错误折叠蛋白, 以恢复内质网稳态, 促使细胞存活^[14]。但是, 过度或持久的 ERS 不能被及时修复时, 内质网一方面可能通过启动内质网特有的凋亡途径促使细胞凋亡; 另一方面可能通过过度激活自噬致使细胞发生自噬性细胞死亡^[15]。研究显示, ERS 与肿瘤的发生、发展、转移以及预后有着密切的联系, 为肿瘤的治疗提供了一个新的研究方向。而在放射治疗肿瘤方面, ERS 的作用研究报道甚少。

DTT 可触发 ERS, 如 2.5 mmol/L DTT 可诱导肝癌细胞株 SMMC-7721 发生 ERS, 且应激条件下其蛋白质组表达发生了变化, 其中 2 倍以上差异表达的蛋白质有 3 个, 其功能涉及细胞增殖、细胞凋亡以及细胞周期等^[16]; 不同浓度的 DTT (0.8, 1.6, 3.2, 6.4 mmol/L) 作用 3 h 时就可诱发 HeLa 细胞 ERS, 随着作用时间的延长, 细胞发生了持续性的 ERS^[17]。本研究用 2.5 mmol/L 的 DTT 处理 HeLa 细胞建立 ERS 模型, 首次研究 ERS 状态下细胞对碳离子辐射的各种应答效应。

实验发现碳离子辐射对 HeLa 细胞有一定的致死效应, DTT 预处理可加强其致死效应, 表现为细胞克隆存活率下降 (图 1)。细胞克隆存活是细胞辐射敏感性的反应^[18], 因此, 这一结果说明了 DTT 预处理增加了细胞碳离子辐射敏感性。凋亡分析显示, 碳离子辐照及 DTT 联合碳离子辐照后 HeLa 细胞凋亡水平显著增加, 且 DTT 联合碳离子辐照组高于单独辐照组 (图 3)。DTT 预处理增加了 HeLa 细胞碳离子辐射敏感性, 可能是由于细胞周期阻滞所致。碳离子单独辐照引起 HeLa 细胞 G2/M 周期阻滞, DTT 联合碳离子辐照引起更严重的 G2/M 期阻滞 (图 2)。而资料显示, DTT 联合 ^{60}Co 射线照射能增加肿瘤细胞对辐射的抵抗性, 使细胞在辐射下生存率提高^[19]。究其原因, 可能是由于所用的 DTT 浓度不同 (分别为 2 和 2.5 mmol/L)、作用时间不同 (分别为 4 和 27 h) 以及辐射品质不同 (分别为 γ 射线和碳离子) 这几个因素综合所致。

一定浓度的 DTT 具有辐射防护作用, 但是, 浓度较高和持续作用的 DTT, 会使细胞处于过度还原状态, 强烈地阻止了蛋白二硫键的形成、并打开已形成的二硫键, 扰乱了胞内的氧化性蛋白折叠过程, 使蛋白折叠受阻, 导致严重的未折叠蛋白聚集, 这种高强度的 ERS 不能通过细胞 UPR 克服。据项喜艳报道^[17], 不同浓度的 DTT (0.8, 1.6, 3.2, 6.4 mmol/L) 对 HeLa 细胞存活的影响从促存活转变为促死亡。另外, 内质网是细胞内钙库之一, 在内质网腔中钙离子浓度是胞质钙离子浓度的数十倍, 两者之间极大的浓度差是信号转导途径中钙离子从内质网释放入胞质作为信使的基础; DTT 致内质网中严重的未折叠蛋白聚集可能触发钙离子渗漏至胞浆中, 干扰了内质网贮存钙离子的功能, 从而进一步抑制了蛋白折叠, 加剧了 ERS。同时电离辐射也导致胞质 $[\text{Ca}^{2+}]$ 上升, 并与辐射敏感性相关^[20]。而且, 重离子辐射诱导更严重的损伤, 更易诱发基因组不稳定性, 并产生一定的基因突变^[21], 表达结构异常的蛋白质, 结构异常的蛋白可在内质网内堆积, 更进一步加剧了 ERS。本实验研究显示, DTT 预处理联合碳离子辐照, 使细胞的存活率明显下降而凋亡率明显增加, 实验中 2.5 mmol/L DTT 持续作用 27 h 以上, 可能这种过度的/持续性的 ERS 发挥了促进细胞死亡的作用。Kim 等^[22]研究发现, ERS 导剂衣霉素也可增加 MCF-7 乳腺癌细胞的辐射敏感性。上述结果充分显示了 ERS 途径具有促细胞存活和死亡的双重作用, 这把“双刃剑”的分界线尚不明了, 有必要进一步了解如何调控这条通路以有效地提高抗肿瘤治疗效应和防护效应。

有研究指出 ERS 程度较重时, 后续活化的自噬主要发挥促细胞死亡作用^[23]。本实验也进一步分析了单独碳离子辐射和 DTT 联合碳离子辐射诱导细胞自噬情况。发现, 无论是单独辐照还是联合辐照, HeLa 细胞均出现一定程度的自噬, 且联合处理组的自噬明显高于单独辐照组 (如图 4)。DTT 联合碳离子辐射后 HeLa 细胞的自噬增强而细胞存活率下降 (如图 1 和图 4), 推测其原因可能是持续 ERS 激活的自噬主要发挥促细胞死亡作用。虽然自噬可以通过清除错误折叠蛋白来促使细胞生存, 但是当它为了更好地补偿细胞而使其降解能力趋于“过度”时, 就会给细胞造成消极的生存状态^[24]。也有研究证实, As_2O_3 诱导 U373-MG 神经胶质瘤细胞发生自噬, 导致其存活明显下降^[25], 依托泊苷等药物诱导 Bax/Bak 缺失小鼠胚胎成纤维细胞产生大量自噬, 抑制自噬后细胞存活增加^[26]。此外, 过度自噬可加重肌肉萎缩^[27]; 在心肌缺血/再灌注过程中, 自噬不利于心肌细胞的存活, 抑制自噬后细胞存活增加^[28]。结合

我们的实验结果, ERS 可增加碳离子辐射敏感性, 其主要原因可能是由于过度的 ERS 激活的自噬。ERS 和后续活化的自噬具有促细胞存活/死亡的双重作用, 条件不同, ERS-自噬这条通路的活化可能会在促存活作用和促凋亡作用之间转化。深入研究这条通路的调控机制对提高治癌效应及防护效应是十分有必要的。

5 结论

通过本实验, 我们发现, 与碳离子辐射效应相比, DTT 联合碳离子辐照后细胞的存活率下降, 凋亡率增加; DTT 联合碳离子辐照加重了碳离子辐照引起的细胞周期阻滞, 且联合辐照组细胞自噬被明显激活。表明持续的 ERS 改变了 HeLa 细胞对碳离子的辐射应答, ERS 激活的自噬导致了细胞发生自噬性死亡, 从而增加了 HeLa 细胞碳离子的辐射敏感性。此结果为肿瘤的碳离子综合治疗提供了一定的基础数据, 对碳离子联合 ERS 治疗癌症有着重要的理论意义, 而且对辐射防护研究也有一定的参考价值。

参考文献:

- [1] DANG Bingrong, LI Wenjian, MA Qiufeng, *et al.* 2005, **22**(1): 44. (in Chinese)
(党秉荣, 李文建, 马秋峰, 等. 原子核物理评论, 2005, **22**(1): 44.)
- [2] JING Xigang, LI Wenjian, YANG Jianshe, *et al.* Nuclear physics review, 2006, **23** (1): 40. (in Chinese)
(荆西刚, 李文建, 杨建设, 等. 原子核物理评论, 2006, **23**(1): 40.)
- [3] JING X G, LI W J, WANG Z Z, *et al.* Nucl Instr Meth B, 2009, **267**: 1837.
- [4] ZHAO W, DIZ D I, ROBBINS M E. Br J Radiol, 2007, **80**(1): 23.
- [5] DANG B R, YANG Y P, ZHANG E D, *et al.* Life Sciences, 2014, **97**(2): 123.
- [6] HWANG C, SINSKAY A J, LODISH H F. Science, 1992, **257**: 1496.
- [7] VAN D V, MAKKINJE M, JANSSENS A, *et al.* Antioxid Redox Signal, 2003, **5**: 381.
- [8] BONNEY W, HIRAM F, GILBERT. Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 2004, **1699**: 35.
- [9] HEALY S J, GORMAN A M, MOUSAYI-SHAFAEI P, *et al.* Eur J Pharmacol, 2009, **625**(1-3): 234.
- [10] CHUN Y J, PARK I C, PARK M J, *et al.* FEBS Lett, 2002, **519**: 195.
- [11] ZHANG B, WANG Y, PANG X L, *et al.* Int J Radiat Biol, 2010, **86**(9): 429.
- [12] BORAKS G, TAMPELINI F S, PEREIRA K F, *et al.* Brazilian Dental Journal, 2008, **19**: 73.
- [13] GUERIN R, ARSENEAUH G, DUMONT S, *et al.* Mol Biol Cell, 2008, **19**: 4404.
- [14] SCHEPER W, NIJHOLT D A, HOOZEMANS J J. Autophagy, 2011, **7**: 910.
- [15] OFIR M, EFRAT D, ARIEL W, *et al.* PLoS One, 2010, **5**: e9516.
- [16] YANG Dongmei, LIU Youping, DAI Rongyang, *et al.* World Chinese Journal of Digestology, 2011, **19**(13): 1331. (in Chinese)
(严冬梅, 刘友平, 代荣阳, 等. 世界华人消化杂志, 2011, **19**(13): 1331.)
- [17] XIANG Xiyang. The role of reactive oxygen species in dithiothreitol-induced ER stress-autophagy process [D]. Jilin: Jilin University, 2012: 25. (in Chinese)
(项喜艳. DTT 诱发内质网应激-自噬过程中活性氧的作用及其调节机制[D]. 吉林: 吉林大学, 2012: 25.)
- [18] WANG Z Z, LI W J, ZHANG H, *et al.* World J Gastroenterol, 2006, **12**(16): 2601.
- [19] LI Xiaowen, ZHOU Mei, SHEN Qinjian, *et al.* Shandong Medical Journal, 2010, **50**(5): 23. (in Chinese)
(李晓雯, 周梅, 沈歙健, 等. 山东医药, 2010, **50**(5): 23.)
- [20] ZHAO Wenxu, DANG Bingrong, LI Wenjian, *et al.* Pharmaceutical Biotechnology, 2012, **19**(3): 238. (in Chinese)
(赵文旭, 党秉荣, 李文建, 等. 药物生物技术, 2012, **19**(3): 238.)
- [21] WANG Z Z, LI W J, *et al.* Nucl Instr Meth B, 2009, **267**: 2521.
- [22] KIM K W, MORETTI L, MITCHELL L R, *et al.* Oncogene, 2010, **29**: 3241.
- [23] QIN L, WANG Z, TAO L, *et al.* Autophagy, 2010, **6**(2): 239.
- [24] DING W X, NI H M, GAO W, *et al.* J Biol Chem, 2006, **282**(7): 4702.
- [25] KANZAWA T, KONDO Y, ITO H, *et al.* Cancer research, 2003, **63**: 2103.
- [26] TSUJIMOTO Y, SHIMIZU S. Cell death and Differentiation, 2005, **12**: 1528.
- [27] DOBROWOLNY G, AUCELLO M, RIZZUTO E, *et al.* Cell Metab, 2008, **8**(5): 425.
- [28] AKI T, YAMAGUCHI K, FUJIMIYA T, *et al.* Oncogene, 2003, **22**(52): 8529.

Effect of Endoplasmic Reticulum Stress on the Response of HeLa Cells to Carbon Ion Radiation

XIA Jiefang^{1,2}, WANG Zhuanzi¹, WEI Wei¹, DANG Bingrong¹, LI Wenjian¹

(1. Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

2. Lanzhou University, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: To investigate the effect of endoplasmic reticulum stress on HeLa cells to $^{12}\text{C}^{6+}$ ion irradiation, HeLa cells were pretreated with 2.5 mmol/L dithiothreitol and irradiated by $^{12}\text{C}^{6+}$ ions with different doses. The results showed that, compared with IR alone, dithiothreitol combined with carbon ion irradiation caused HeLa cell survival decreased, and the apoptosis increased. Moreover, dithiothreitol and carbon ion radiation combination treatment led to a significant increase of G₂/M phase, and autophagy was activated obviously in combination treatment group. The results imply that continuous endoplasmic reticulum stress can change the response of HeLa cells to $^{12}\text{C}^{6+}$ irradiation, and dithiothreitol may affect HeLa cells through the autophagy cell death pathway.

Key words: $^{12}\text{C}^{6+}$ ion radiation; dithiothreitol; survival and apoptosis; cell cycle; autophagy

Received date: 28 May 2014; **Revised date:** 9 Jun. 2014

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (11105189, 11179002)

Corresponding author: LI Wenjian, E-mail: wjli@impcas.ac.cn.

<http://www.npr.ac.cn>