

文章编号: 1004-616X(2004)02-0089-03

电离辐射调控脂质体介导的 $TNF\alpha$ 基因在 HeLa 细胞中的表达^①

刘建香, 苏旭

(中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所, 北京 100088)

【摘要】背景与目的: 用脂质体 Lipofectamin™2000 介导重组质粒 p-Egr-TNF α 转染人 HeLa 细胞, 研究该重组质粒在不同剂量 γ 射线作用下在细胞中的表达、细胞周期和细胞凋亡的变化。材料与方法: 用 ELISA 方法检测 $TNF\alpha$ 的表达, 并探讨剂量效应关系, 用流式细胞术检测细胞周期的变化。结果: 不同剂量 ^{60}Co γ 射线照射后, p-Egr-TNF α 在 HeLa 细胞中表达量为 (250~400) pg/ml, 明显高于对照组; 照射转染后的 HeLa 细胞周期出现明显的 S 期和 G₂M 期阻滞, 呈现剂量依赖性的增高, G₀/G₁ 比值则呈现剂量依赖性的下降。与之相对应, 细胞凋亡率也呈现剂量依赖性的增高。结论: ^{60}Co γ 射线可以调控脂质体介导的重组质粒 p-Egr-TNF α , 在被转染的 HeLa 细胞中表达量明显增高, 对细胞周期和细胞凋亡的影响也呈现剂量依赖性的效应关系。

【关键词】 ^{60}Co γ 射线; $TNF\alpha$ 表达; 细胞周期; 剂量效应

中图分类号: R146

文献标识码: A

Ionizing Radiation Regulated Expression of HeLa Cells by Lipofectamin-Mediated $TNF\alpha$ Gene

LIU Jian-xiang, SU Xu

(National Institute for Radiological Protection, China CDC, Beijing 100088, China)

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: To investigate the expression of p-Egr-TNF α , cell cycle and apoptosis in HeLa cells, which were transfected by recombined plasmid p-Egr-TNF α , induced by ^{60}Co γ -rays irradiation in different doses. MATERIAL AND METHODS: The expression of $TNF\alpha$ was detected by ELISA. The cell cycle and apoptosis were detected by Flow Cytometry. RESULTS: After γ -rays irradiation in different doses, the expression of $TNF\alpha$ was (250~400) pg/ml, significantly higher than that of the control group. The percentages of S and G₂M phase were markedly higher than that of the control group, and showed a dose-dependent increase, the rate of G₀/G₁ showed a dose-dependent decrease. Cell apoptosis rate showed a dose-dependent increase. CONCLUSION: γ -rays can regulate expression of p-Egr-TNF α by Lipofectamin-mediated $TNF\alpha$ gene in HeLa cells. The expression level shows a significantly increase in transfected HeLa cells. The change of cell cycle and apoptosis shows a dose-dependent effect.

【KEY WORDS】 ^{60}Co γ -rays; $TNF\alpha$ expression; cell cycle; dose effect

早期生长反应因子-1(Egr-1)是一个立即早期基因, 编码一个533个氨基酸的核磷蛋白, Egr-1蛋白包含3个锌指元件。Egr-1启动子中有6个CArG [CC(A+T-rich)₆GG]顺式作用元件, 可以在电离辐射诱导下启动, 并诱导其下游基因的表达^[1,2]。本研究用脂质体 Lipofectamin™2000 介导重组质粒 p-Egr-TNF α 转染人 HeLa 细胞, 研究了该重组质粒在不同剂量 γ 射线作用下在细胞中的表达、细胞周期和细胞凋亡的变化。为进一步研究基因与辐射联合治疗肿

瘤的规律和机理提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 质粒的准备 携带 Egr-1 和 $TNF\alpha$ 质粒由汕头大学吴丛梅博士惠赠。采用碱裂解法大量提取质粒, 在 DU-640 分光光度计检测质粒的浓度。

1.2 细胞的培养和转染 HeLa 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养, 4×10^5 个细胞/孔, 接种 6 孔板, 待细胞生长至 80% 融合时开始转染。用无血清

① 收稿日期: 2004-01-09; 修订日期: 2004-02-11

作者简介: 刘建香(1973-), 女, 河北省滦县人, 助研, 博士研究生, 研究方向: 辐射生物学。

Tel: 010-62389928, Email: jxliu@163.com

的 DMEM 洗细胞 3 次, 然后转染, 转染方法按照 Invitrogen™ 的说明书进行。

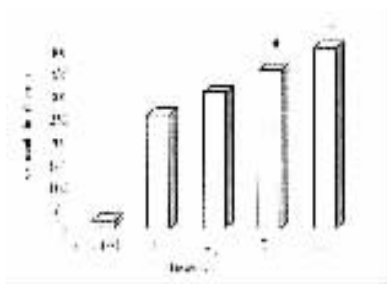
1.3 照射条件 更换培养液 36 h 后采用 ^{60}Co γ 射线分组照射, 剂量率为 51.58 cGy/min, 剂量分别为 0, 2, 5, 10 Gy。 ^{60}Co γ 射线发生器, 由设在中国疾病预防控制中心辐射安全所的国家次级标准剂量学实验室(SSDL)提供。

1.4 $TNF\alpha$ 的检测 照射后 8 h 收集细胞上清, 冻存后备用。使用晶美公司的人的 $TNF\alpha$ ELISA 试剂盒, 方法见试剂盒使用说明书。

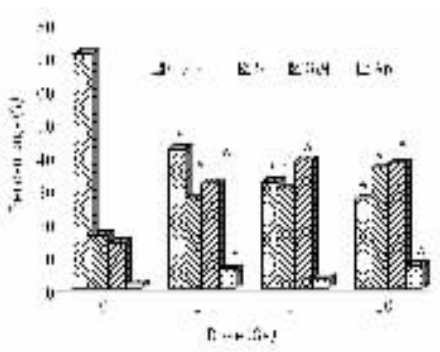
1.5 细胞周期的检测 照射后 8 h 收集细胞, 用 PBS 洗 2 次, 用 RNase 37 °C 作用 30 min 后, 用含有 Triton X-100 的碘化丙啶 (PI) 染色 30 min 后进行流式细胞仪 (Becton-Dickinson) 检测, 得到细胞周期各时相的百分比。

1.6 统计学处理 采用 t 检验, 曲线相关分析。

2 结果



$\bar{x} \pm s, n=3, *p < 0.01, \#p < 0.05$ vs 0 Gy group
图 1 不同剂量 γ 射线照射后 $TNF\alpha$ 在 HeLa 细胞中的表达
Figure 1 Expression of $TNF\alpha$ in HeLa cells after γ -ray irradiation in different doses



$\bar{x} \pm s, n=3, *p < 0.001, \#p < 0.01, \wedge p < 0.05$ vs 0 Gy group
图 2 不同剂量照射转染 p-Egr-TNF α 后的 HeLa 细胞周期和凋亡的变化
Figure 2 Changes in cell cycle progression and apoptosis of HeLa transfected with p-Egr-TNF α after different doses irradiation

2.1 细胞中 $TNF\alpha$ 基因表达的变化 从图 1 中可见, 重组质粒转染后的 HeLa 细胞经过不同剂量 ^{60}Co

γ 射线照射后 8 h, 检测 $TNF\alpha$ 的表达。结果显示, 假照组 (0 Gy) 和不同剂量照射组 $TNF\alpha$ 的表达均远远高于未转染组, (2~10) Gy 照射后 $TNF\alpha$ 的表达均高于假照组, 并呈现剂量依赖性的增高。

2.2 细胞周期的变化 从图 2 中可见, p-Egr-TNF α 体外稳定转染联合 ^{60}Co γ 射线对 HeLa 细胞的增殖有明显的抑制作用, 接受不同剂量射线照射后, 照射转染后的 HeLa 细胞周期出现明显的 S 期和 G₂M 期阻滞 ($P < 0.05, P < 0.01$), 呈现剂量依赖性的增高, G₀/G₁ 比值呈现剂量依赖性的下降 ($r = -0.9799, P < 0.025$)。

3 讨论

近年来有关研究资料表明, 电离辐射可激活 Egr-1 启动子并诱导下游基因表达增强^[3,4]。电离辐射对 Egr-1 的诱导作用, 是由于其启动子中有 6 个血清反应因子 [CC(A+T-rich)₆GG] 顺式作用元件, 其中最远端的 3 个 CArG 元件在 Egr-1 对电离辐射的反应中起到重要作用。在 1995 年 Ralph R. Weichselbaum 等将 TNF 连接到 Egr-1 启动子的下游, 构建 pE425-TNF 表达载体, 20 Gy X 射线照射后 2、24 h, 7、14 d 检测 TNF 的表达量, 发现 2 h 表达量最高, 高于对照组的 2.5 倍^[5]。吕星等将荧光素酶基因连接到 Egr-1 启动子的下游, 构建 pGL3-Egr 表达载体, 重组转染 B16 细胞, 经过 2.5、5.0、10 Gy 照射后, 检测荧光素酶的表达, 结果显示, 2.5 Gy 照射组表达量最高, 为对照组的 2.5 倍^[6]。

$TNF\alpha$ 是一种多效性的细胞因子, 具有放射敏感性, 对一些肿瘤细胞有毒性, 且能增加电离辐射的杀伤性, 激活细胞免疫反应, 导致微循环破坏, $TNF\alpha$ 有明显的抗肿瘤作用, 然而其系统性的毒性作用 (热、恶心等) 限制了其治疗效果, Egr-1 启动子与 $TNF\alpha$ 基因的配伍解决了这些问题^[7]。我们根据 $TNF\alpha$ 的这些特性, 研究了不同剂量 ^{60}Co γ 射线照射转染重组质粒 p-Egr-TNF α 后的人 HeLa 细胞的 $TNF\alpha$ 基因表达的变化、细胞周期和细胞凋亡的变化。实验结果证实, 不同剂量 ^{60}Co γ 射线照射后, p-Egr-TNF α 在 HeLa 细胞中表达量为 (250~400) pg/ml, 明显高于对照组; 照射转染后的 HeLa 细胞周期出现明显的 S 期和 G₂M 期阻滞 ($P < 0.05, P < 0.01$) 呈现剂量依赖性的增高, G₀/G₁ 比值则呈现剂量依赖性的下降 ($P < 0.001$)。与之相对应, 细胞凋亡率也呈现剂量依赖性的增高。通过脂质体介导转染人 HeLa 细胞株, 给

予不同剂量 γ 射线处理, 检测 $TNF\alpha$ 的表达和细胞周期的变化, 研究证实, 电离辐射可以有效增强电离辐射敏感启动子 (Egr-1 启动子) 驱动的 $TNF\alpha$ 在 HeLa 细胞中的表达, 并呈剂量依赖性, 提示利用电离辐射可以从时空诱导 Egr-1 启动子驱动下游基因的表达, 这一研究有利于探索基因与辐射联合治疗恶性肿瘤的新途径。

参考文献:

[1] Datta R, Taneja N, Sukhatme VP. Reactive oxygen intermediates target CC(A/T)6GG sequences to mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(6):2 419-2 422.

[2] Tsai-Morris CH, Cao XM, Sukhatme VP. 5' flanking sequence and genomic structure of Egr-1, a murine mitogen

inducible zinc finger encoding gene[J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16:8 835-8 846.

[3] Staba MJ, Maucer HJ, Kufe DW, et al. Adenoviral $TNF-\alpha$ gene therapy and radiation damage tumor vasculature in a human malignant glioma xenograft[J]. *Gene Ther*, 1998, 5(3):293-296.

[4] Maucer HJ, Hanna NN, Wayne ID, et al. Tumor necrosis factor alpha ($TNF\alpha$) gene therapy targeted by ionizing radiation selectively damages tumor vasculature[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(19):4 311-4 314.

[5] Seung LP, Mauceri HJ, Beckett MA, et al. Genetic radiotherapy overcomes tumor resistance to cytotoxic agents[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(1):5 561-5 565.

[6] 吕星, 邢瑞云, 孙志贤, 等. 小鼠 Egr-1 基因调控序列的克隆及其辐射诱导特性的鉴定[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1998, 5(1):16-19.

[7] 田梅. 博士学位论文[D]. 吉林大学. 2003, 19.

中国环境诱变剂学会第三届风险评价专业委员会 换届大会暨第七次学术交流会会议征稿通知

中国环境诱变剂学会风险评价专业委员会和药物安全评价学组定于 2004 年 6~7 月在甘肃省酒泉市或兰州市召开第七届全国学术交流会。会议征文内容如下:

1. 致癌物、生殖毒物、致突变物风险评价和安全性评价的程序与方法。
2. 食品、化妆品、药品和农药的安全性和有效性评价的检测。
3. 群体和个体健康风险评价的原理、方法和监测。
4. 其它相关的试验方法、检测报告、试验研究和综述性论文。

最好提交论文全文, 也可 800 字以内的中文摘要。经审定录用的论文将全部推荐由《癌变·畸变·突变》杂志刊出。

请于 2004 年 5 月 10 日前将论文和参会回执寄至: 100050 北京市天坛西门 中国药品生物制品检定所林飞收; 或 E-mail 发至 linfeibj@yahoo.com.cn。电话: (010) 67017755-576。欢迎从事本专业的人员踊跃投稿。亦欢迎未提供稿件者寄参会回执参加学术研讨。

第二轮通知将在收到回执后的 5 月底发出。

中国环境诱变剂学会风险评价专业委员会

参 会 回 执

姓 名		性 别		年 龄		邮 编	
地 址							
单 位							
论文题目							
联系电话							
网 址							