

人脑胶质瘤中 *ATM*、*ATR*、*Chk1* 和 *Chk2* 基因表达研究

周雪梅 乔健 王尧 黄建萍 王慧博 邱裕友 陈永珍

【摘要】 目的 研究 *ATM*、*ATR*、*Chk1* 和 *Chk2* 在人脑胶质瘤中的表达及其与肿瘤发生的关系。方法 采用 SYBRTM Green 实时定量 PCR 技术检测 35 例人原发脑胶质瘤组织和 10 例正常脑组织中的 *ATM*、*ATR*、*Chk1* 和 *Chk2* 的表达水平。结果 *ATR*、*Chk1* 和 *Chk2* 基因在各级脑胶质瘤中表达较正常脑组织升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。其中,*ATR* 和 *Chk2* 基因表达在 II 级、III 级、IV 级胶质瘤组织之间差异均无统计学意义($P>0.05$),而 *Chk1* 在 IV 级胶质瘤中的表达较 II 级、III 级胶质瘤明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。*ATM* 基因表达量在正常脑组织和各级脑胶质瘤中差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 *ATR*、*Chk1* 和 *Chk2* 在人脑胶质瘤中表达上调,说明这些基因可能与人脑胶质瘤的发生有关。其中,*Chk1* 表达与肿瘤恶性程度有关,可作为判别胶质瘤病理级别的辅助指标。

【关键词】 神经胶质瘤; DNA 损伤; 细胞周期检控点; *ATM*; *ATR*; *Chk1*; *Chk2*

【中图分类号】 R730.264 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)07-0653-05

Expressions of *ATM*, *ATR*, *Chk1* and *Chk2* genes in human glioma ZHOU Xue-mei*, QIAO

Jian, WANG Rao, HUANG Jian-ping, WANG Hui-bo, QIU Yu-you, CHEN Yong-zhen*.

*Department of Embryology and Histology, Faculty of Medical Science, Suzhou University, Suzhou 215000, China

Corresponding author: CHEN Yong-zhen, Email: hesuzhou@163.com

【Abstract】 Objective To detect the expressions of DNA damage checkpoint genes including *ATR*, *ATM*, *Chk1* and *Chk2* in human primary gliomas and explore their relations with tumor progression.

Methods SYBRTM Green real-time quantitative PCR was performed to detect the expressions of *ATR*, *ATM*, *Chk1* and *Chk2* genes in 35 cases of primary gliomas and 10 of normal brain tissues. **Results** In glioma tissues of various pathological grades, the expressions of the target genes, with the exception of *ATM* gene, were significantly increased as compared to those in normal brain tissues ($P<0.05$). *Chk1* gene expression was significantly higher in grade IV than in grade II and III gliomas ($P<0.05$), but no significant differences were found in *ATR* or *Chk2* gene expression between grade II, III and IV gliomas ($P>0.05$). **Conclusion** The up-regulation of *ATR*, *Chk1* and *Chk2* genes in primary glioma suggests their association with the pathogenesis of glioma. *Chk1* expression may indicate the malignancy of glioma and help evaluate the pathological grade of glioma.

【Key words】 Glioma; DNA damage; Cell cycle checkpoint; *ATM*; *ATR*; *Chk1*; *Chk2*

脑胶质瘤是颅内发生率最高的恶性肿瘤,77%恶性胶质瘤在确诊后 1 年内死亡^[1]。研究证明,脑胶

质瘤绝大多数为原发性肿瘤,但其发病机制目前尚不明确^[2]。肿瘤的发生发展是一个复杂和多步骤的过程。DNA 损伤可导致基因突变率和癌症易感性增加。*ATM*、*ATR*、*Chk1* 和 *Chk2* 是细胞周期检控点的主要成员,可被不同类型的 DNA 损伤所激活,引起细胞周期阻滞,使 DNA 损伤得以修复。近年来研究发现 *ATR*、*ATM*、*Chk1* 和 *Chk2* 基因在乳腺癌、前列腺癌、肺癌、食管癌等人类常见肿瘤组织和细胞系中

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2009.07.002

作者单位:215000 苏州,苏州大学医学部解剖学与组织胚胎学系(周雪梅、陈永珍);214010 无锡市第三人民医院儿科(乔健、黄建萍);100035 北京,积水潭医院麻醉科(王尧);150001 哈尔滨,哈尔滨医科大学第一临床医学院神经外科(王慧博);200072 上海,同济大学附属上海第十人民医院放射科(邱裕友)

通信作者:陈永珍,Email:hesuzhou@163.com

异常表达,说明这些基因可能与肿瘤的发生进展相关^[3-6]。本研究检测了 *ATM*、*ATR*、*Chk1* 和 *Chk2* 基因在人脑胶质瘤组织的表达情况,以期进一步阐明胶质瘤的发病机制,为胶质瘤的生物学诊断和治疗提供理论基础。

材料与方法

一、实验标本

本实验所用标本为哈尔滨医科大学附属第一医院神经外科手术切除的 35 例原发脑胶质瘤患者标本(患者未经放疗或化疗)。所有病例均按 WHO 2000 新标准经病理诊断证实,Ⅱ级胶质瘤患者 12 例,其中男性 6 例,女性 6 例,年龄为 7~54 岁,平均 37.2 岁;Ⅲ级胶质瘤患者 9 例,其中男性 4 例,女性 5 例,年龄为 19~55 岁,平均 43.2 岁;Ⅳ级胶质瘤患者 14 例,其中男性 6 例,女性 8 例,年龄为 14~67 岁,平均 44.6 岁。另取同期颅脑创伤患者行内减压手术中所取的正常大脑组织 10 例作为正常对照组织,其中男性 6 例,女性 4 例;年龄为 22~53 岁,平均 38.9 岁。

二、主要试剂和实验方法

1. 主要试剂:TRIzol 试剂为美国 Invitrogen 公司产品,*DNase I* 为美国 Premega 公司产品,逆转录酶、随机引物、dNTP、RNase Inhibitor、SYBRTM Green Realtime Master Mix 等均为日本 TOYOBO 公司产品。

2. 组织标本的收集:手术中采集新鲜胶质瘤组织,剔除血管及结缔组织等,切成多个 0.3~0.5 cm 的小块,RNase-Free + 0.9%生理盐水漂洗,迅速投入液氮冷却,-80℃超低温冰箱冻存备用。

3. 引物设计与订购:通过引物设计软件 Primer 5,参照 Gene Bank 基因序列自行设计 *ATR*、*ATM*、*Chk1* 和 *Chk2* 引物,为避免基因组 DNA 的污染,上

游或下游引物设计为跨两个外显子。内参基因 *GAPDH* 引物由 ABI 公司设计。所有引物均由上海生物工程技术服务公司合成。引物序列及产物片段大小见表 1。

4. RNA 提取:TRIzol 法提取组织总 RNA,以 *DNase I* 消化 RNA 中残留的基因组 DNA。

5. 制备 cDNA:配制 16.5 μL 反应体系,其中总 RNA 10 μL,oligo dT 2 μL,随机引物 0.5 μL,DEPC 水 4 μL;72℃水浴 7 min;在上述反应体系中加入逆转录酶 1 μL,5×Buffer 5 μL,dNTP 2 μL,RNase Inhibitor 0.5 μL;将总体系为 25 μL 的样品于 GeneAmp PCR Systems 2700 PCR 仪进行反转录,反应条件为:42℃,1 h;95℃,5 min;将反转录制备的 cDNA 置于-20℃冰箱内保存备用。

6. SYBRTM Green 实时定量 PCR 检测目的基因的表达:配制 8 μL 反应体系,其中 2×Master Mix 4 μL,目的基因或内参基因引物 1 μL,样品 cDNA 1 μL,MilliQ 水 1 μL。按如下的反应条件进行 PCR 扩增和荧光定量:预变性,95℃,1 min;PCR 扩增,40 个循环,95℃,15 s,60℃,1 min;溶解曲线,95℃,15 s,60℃,15 s,95℃,15 s。采用参照基因的 ΔCt 法计算每个样本目的基因的表达值,其中 ΔCt 值表示基因反应产物的荧光值达到设定的域值时的反应循环数。目的基因表达值 = 2Ct_{GAPDH} - Ct_{目的基因}。

三、统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计软件进行处理,数据采用均数±标准差表示,多组间的比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 *q* 检验,*P*≤0.05 为差异具有统计学意义。

结 果

一、样品模板浓度的优化

当各样品 cDNA 的浓度稀释 2 倍时,内参基因

表 1 目的基因及参照基因引物序列及 PCR 产物大小

Tab.1 Primer sequences and product size of the target genes and *GAPDH* gene

| 基因 | 引物类型 | 引物序列(5'~3') | 产物大小(bp) |
|--------------|------|---------------------------------|----------|
| <i>ATM</i> | 上游 | TGGATCCAGCTATTGGTTTGA | 81 |
| | 下游 | CCAAGTATGTAACCAACAATAGAAGAAGTAG | |
| <i>ATR</i> | 上游 | TGTCTGTACTCTTCACGGCATGTT | 82 |
| | 下游 | AAGAGGTCCACATGTCCGTGTT | |
| <i>Chk1</i> | 上游 | GGTGAATATAGTGCTGCTATGTTGACA | 108 |
| | 下游 | TTGGATAAACAGGGAAGTGAACAC | |
| <i>Chk2</i> | 上游 | CCCAAGGCTCCTCCTCACA | 81 |
| | 下游 | AGTGAGAGGACTGGCTGGAGTT | |
| <i>GAPDH</i> | 上游 | GAAGGTGAAGGTCGGAGTC | 226 |
| | 下游 | GAAGATGGTGATGGGATTTTC | |

GAPDH 达到域值的循环数 <15; 当稀释 10 倍时, 内参基因 *GAPDH* 达到域值的循环数 >30; 而当稀释 5 倍时, 内参基因 *GAPDH* 达到域值的循环数介于 15~30 之间。因此, 样品 cDNA 稀释 5 倍为 SYBR™ Green 实时定量 PCR 反应的最佳模板浓度。

二、实时定量 PCR 的检测结果

图 1~4 分别为 *ATM*、*ATR*、*Chk1* 和 *Chk2* 基因的融解曲线和扩增结果, 融解曲线分析显示, 融解温度均一, 峰的形状也比较锐利。说明以上基因的实时定量 PCR 产物特异性高, 无杂带。

三、*ATM*、*ATR*、*Chk1* 和 *Chk2* 基因在胶质瘤和正常脑组织中定量分析

35 例原发性胶质瘤和 10 例正常脑组织中目的基因的表达情况如表 2 所示。与正常脑组织相比,

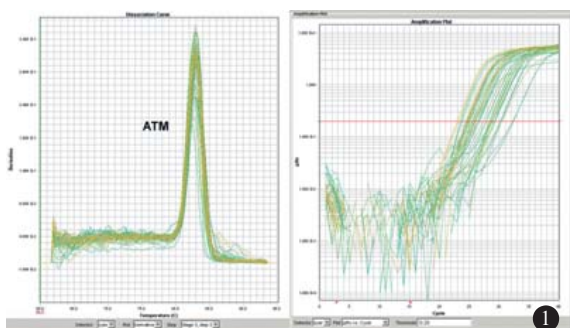


图 1 *ATM* 基因的融解曲线分析和扩增曲线

Fig.1 Dissociation and amplification curves of *ATM* gene

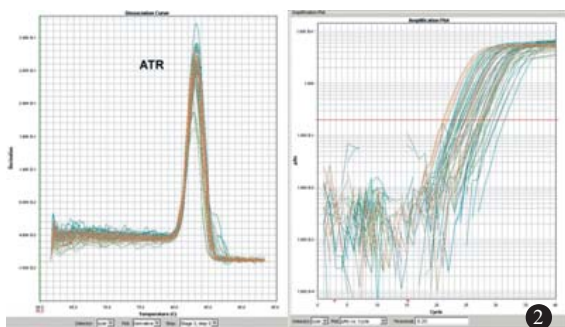


图 2 *ATR* 基因的融解曲线分析和扩增曲线

Fig.2 Dissociation and amplification curves of *ATR* gene

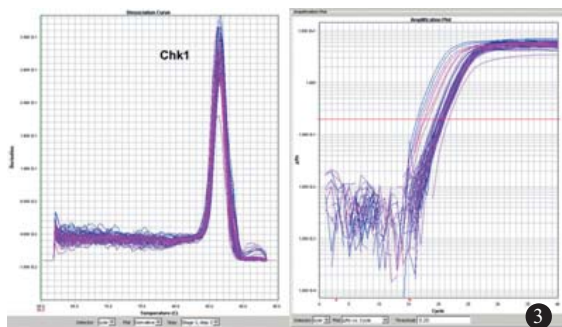


图 3 *Chk1* 基因的融解曲线分析和扩增曲线

Fig.3 Dissociation and amplification curves of *Chk1* gene

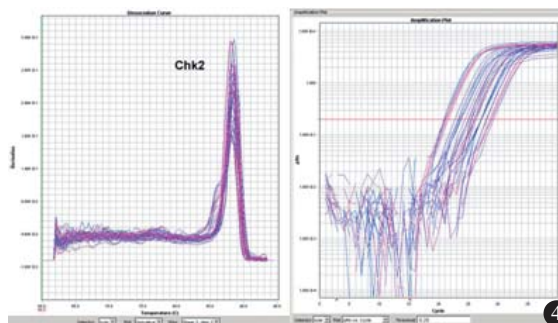


图 4 *Chk2* 基因的融解曲线分析和扩增曲线

Fig.4 Dissociation and amplification curves of *Chk2* gene

ATR、*Chk1* 和 *Chk2* 基因在 II 级、III 级、IV 级胶质瘤中表达明显上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 *ATM* 基因在各级脑胶质瘤及正常脑组织中表达量的比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。随着肿瘤组织的病理级别增加, *ATR*、*Chk1* 和 *Chk2* 基因表达量逐渐升高。其中, *ATR* 和 *Chk2* 基因表达在不同病理级别的胶质瘤组织之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 *Chk1* 在 IV 级胶质瘤中的表达比 II 级、III 级明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

讨 论

从分子生物学的角度看, 肿瘤是由于某些染色体上 DNA 损伤致使细胞内基因异常表达, 导致细胞生长失控、缺乏分化和异常增生的一类基因疾病。

表 2 *ATM*、*ATR*、*Chk1* 和 *Chk2* 在各级脑胶质瘤和正常脑组织中的表达情况

Tab.2 Expressions of *ATM*, *ATR*, *Chk1* and *Chk2* genes in glioma and normal brain

| 组别 | 例数 | <i>ATM</i> | <i>ATR</i> | <i>Chk1</i> | <i>Chk2</i> |
|-----------|----|--------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 正常组 | 10 | 76.30±28.12 | 19.98±6.88 | 20.42±5.63 | 115.50±21.78 |
| II 级胶质瘤组 | 12 | 91.27±12.82 | 73.99±25.38 ^a | 68.30±13.51 ^a | 388.10±195.95 ^a |
| III 级胶质瘤组 | 9 | 91.49±34.29 | 78.80±29.08 ^a | 100.86±33.18 ^{ab} | 388.19±195.95 ^a |
| IV 级胶质瘤组 | 14 | 130.54±81.20 | 93.10±30.76 ^a | 339.89±30.09 ^{abc} | 393.05±106.34 ^a |
| F 值 | | 2.658 | 17.136 | 462.802 | 9.103 |
| P 值 | | 0.061 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

与正常组比较, ^a $P < 0.05$; 与 II 级胶质瘤组比较, ^b $P < 0.05$; 与 III 级胶质瘤组比较, ^c $P < 0.05$

近年来,癌基因与抑癌基因与肿瘤形成的关系得到证实,同时细胞周期调控的异常也被视为肿瘤发生的又一重要原因。当某种细胞暴露在突变因子(如辐射、病毒等)时,这些突变因子会使其 DNA 造成损伤,进而使该细胞的生长明显快于其他正常细胞,即出现肿瘤细胞的失控性增殖。细胞在长期进化过程中形成了一套能够检测 DNA 损伤、维护细胞遗传稳定性和完整性的机制,即 DNA 损伤检控点。DNA 损伤检控点能够检测受损或者结构异常的 DNA,并启动检控点信号转导途径。检控点信号转导路径的激活可引发一系列下游生物学事件,如细胞周期阻滞和对受损 DNA 的有效修复。若 DNA 损伤不能及时和有效地修复,则表现为基因突变率和癌症易感性增加。

ATM 和 *ATR* 同属于磷脂酰肌醇-3-激酶样激酶(PIKKs)家族,是细胞周期检控点的主要成员。其中,*ATM* 在整个 DNA 损伤反应中起中心作用,而 *ATR* 可作为一个可供选择的途径来应答 DNA 损伤。先前的研究普遍认为,二者被不同类型的 DNA 损伤所激活,其中 *ATM* 主要被粒子辐射或者某些药物造成的 DNA 双链断裂所激活,而 *ATR* 则主要应对紫外照射以及复制压力带来的损伤。然而,最近有研究发现,*ATR* 的激活需要 *ATM* 的参与,从而提出 *ATM* 是 *ATR* 上游并对 *ATR* 的激活起到调控作用的观点^[7-9]。*ATM*、*ATR* 基因在胶质瘤中的表达水平及其与胶质瘤的发生的关系等较少见报道。为此,本研究检测了 35 例原发脑胶质瘤组织和 10 例正常脑组织中 *ATM*、*ATR* 基因表达情况。研究发现与正常脑组织相比,*ATM* 基因表达量在各级脑胶质瘤中无明显变化,推测可能与胶质瘤的发生关系不大;而 *ATR* 基因在脑胶质瘤中的表达明显上调,且其表达量随着肿瘤组织的病理级别增加而升高,说明 *ATR* 基因可能与人脑胶质瘤的发生相关。既往研究发现在多种肿瘤组织和细胞系中均检测到 *ATM* 基因的异常表达,如 Angele 等^[10]发现 *ATM* 在乳腺硬化性腺病中表达过量,推测这种增量调节可能是为了与细胞增殖相适应。目前关于 *ATR* 基因与肿瘤发生相关的报道较少。研究表明,将小鼠 *ATR* 基因敲除可引起胚胎致死,而在人类细胞中,*ATR* 基因突变可引起 *ATR* 激酶活性部分丧失,与人常染色体退行性疾病 Seckel 综合征有关^[11,12]。肿瘤的发生是一种多因素、多阶段长期相互作用的过程,涉及大量的有关因子,这些因子均可影响 *ATM*、*ATR* 的表达,而 *ATM*、*ATR* 表达的稳态对于保持基因稳定性、降低肿瘤发生及侵袭具有重要意义。

ATM 和 *ATR* 获得激酶活性后,通过使底物发生磷酸化而进行信号转导。*ATM* 和 *ATR* 有很多共享的磷酸化底物,主要包括 *Chk1*、*Chk2*、*p53*、*BRCA1*、*NBS1* 和 *MDM2* 等^[13]。本文检测了 *Chk1*、*Chk2* 基因在人脑胶质瘤组织中表达情况,结果表明,*Chk1* 和 *Chk2* 基因在脑胶质瘤中的表达上调,说明这些基因可能与胶质瘤的发生相关。同时,*Chk1* 表达与肿瘤恶性程度相关,可作为判别胶质瘤病理级别的重要指标。这与以往大量研究观察到的结果是一致的。Shigeishi 等^[14]报道 *Chk1* 和 *Chk2* 在 *p53* 突变胃癌的细胞周期检测点功能中发挥重要作用。Bartkova 等^[15]报道 *Chk2* 在原位癌和非侵袭性精原干细胞肿瘤中表达较高。研究表明,*Chk1* 的表达在不同分化程度子宫内膜癌患者中的差异有统计学意义,分化越低,表达越高,提示 *Chk1* 在低分化子宫内膜癌的发生发展中发挥了某些作用^[16]。

Chk1 和 *Chk2* 是 *ATM* 和 *ATR* 共享的磷酸化底物,但一般认为 *ATR* 是引起 *Chk1* 磷酸化的主要上游因子,*ATM* 是引起 *Chk2* 磷酸化的主要上游因子。*ATM-Chk2* 和 *ATR-Chk1* 两种通路可应对不同的基因毒性压力,其中 *ATR-Chk1* 通路是细胞应对紫外照射和复制压力的主要通路,而 *ATM-Chk2* 通路在离子辐射应激反应中发挥着重要作用。本研究表明,在人脑胶质瘤中主要是通过 *ATR-Chk1* 通路来应答 DNA 损伤。由此推测,人脑胶质瘤可能与紫外照射和复制压力相关。

综上所述,本研究表明 *ATR*、*Chk1* 和 *Chk2* 可能与胶质瘤发生相关,且 *Chk1* 可作为判别胶质瘤病理级别的重要指标,为胶质瘤的生物学诊断及化疗药物新靶点的探寻提供了理论基础。

参 考 文 献

- [1] Black PM. Brain tumor, part I [J]. N Engl J Med, 1991, 324(21): 1471-1476.
- [2] Fiveash JB, Spencer SA. Role of radiation therapy and radiosurgery in glioblastoma multiforme[J]. Cancer J, 2003, 3(1): 222-229.
- [3] Hall J. The Ataxia-telangiectasia mutated gene and breast cancer: gene expression profiles and sequence variants [J]. Cancer Lett, 2005, 227(2): 105-114.
- [4] Angle S, Falconer A, Edwards SM, et al. ATM polymorphisms as risk factors for prostate cancer development [J]. Br J Cancer, 2004, 91(4): 783-787.
- [5] Kim JH, Kim H, Lee KY, et al. Genetic polymorphisms of ataxia telangiectasia mutated affect lung cancer risk[J]. Human Molecular Genetics, 2006, 15(7): 1181-1186.
- [6] 王玉祥,祝淑叔,封巍,等. *Chk1* 和 *Chk2* mRNA 转染对食管癌细胞照射后 G2 期阻滞的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 2006, 28(8): 572-577.

- [7] Adams KE, Medhurst AL, Dart DA, et al. Recruitment of *ATR* to sites of ionizing radiation-induced DNA damage requires ATM and components of MRN protein complex[J]. *Oncogene*, 2006, 25(28): 3894-3904.
- [8] Myers JS, Cortez D. Rapid activation of *ATR* by ionizing radiation requires ATM and Mre11 [J]. *Biol Chem*, 2006, 281 (14): 9346-9350.
- [9] Cuadrado M, Martinez-Pastor B, Murga M, et al. ATM regulates *ATR* chromatin loading in response to DNA doublestrand breaks [J]. *Exp Med*, 2006, 203(2): 297-303.
- [10] Angele S, Jones C, Reis Filho JS, et al. Expression of ATM, p53 and MRE11-Rad50-NBS1 complex in myoepithelial cells of benign and malignant proliferations of the breast[J]. *J Clin Pathol*, 2004, 57(11): 1179-1184.
- [11] Brown EJ, Baltimore D. *ATR* disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality[J]. *Genes Dev*, 2000, 14(4): 397-402.
- [12] Oriscolli M, Ruiz-Perez VL, Woods CG, et al. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein(*ATR*) results in Seckel syndrome[J]. *Nat Genet*, 2003, 33 (4): 497-501.
- [13] Sancer A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, et al. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints[J]. *Annu Rec Biochem*, 2004, 73: 39-85.
- [14] Shigeishi H, Yokozaki H, Oue N, et al. Increased expression of CHK2 in human gastric carcinomas harboring p53 mutations[J]. *Int J Cancer*, 2002, 99(1): 58-62.
- [15] Bartkova J, Falck J, Rajpert De Meyts E, et al. CHK2 tumour suppressor protein in human spermatogenesis and testicular germ-cell tumors[J]. *Oncogene*, 2001, 20(41): 5897.
- [16] 马全富, 黄晓园, 高庆蕾, 等. Chk1/2 和 Ptk1 蛋白在子宫内腺癌中的表达[J]. *肿瘤防治研究*, 2008, 36(6): 424-426.

(收稿日期:2009-03-28)

(本文编辑:卢丽玉)

· 通知 ·

第二届国家级继续医学教育项目 《颅脑显微外科基本技能培训》招生通知

南方医科大学珠江医院神经外科在 2008 年成功承办第一届国家级继续医学教育项目《颅脑显微外科基本技能培训》的基础上,于 2009 年 9 月继续承办第二届《颅脑显微外科基本技能培训》(国家继续医学教育项目,编号:2009-04-09-006)。

培训内容:实验动物微血管及神经束分离吻合技术;人体尸头标本手术入路及解剖训练;现代显微颅脑外科手术理论及新进展。

培训方式:教员授课及示范,学员练习及自学、病例讨论及学习汇报。

培训时间和地点:2009 年 9 月 1 日~30 日;南方医科大学珠江医院神经外科实验室。

考核颁证:分阶段考核学员吻合微血管的速度与质量,检查学员选定手术入路解剖的影像记录。完成考核后颁发:(1)国家级继续医学教育学分 10 分;(2)广东省颅脑外科医疗质量控制中心颁发的培训合格证书。

学习费用:(1)学费 4500 元;(2)资料费 500 元;(3)基本显微器械费 1000 元;(4)招待所住宿费 1500 元;(5)伙食费自理(代办职工食堂饭卡)。

招生数量及报名方式:共招收 22 名学员(保证每 2 人有一台显微镜);报名时间:6 月 1 日~8 月 31 日;报名方式:采取回寄报名表和电话登记方式,但录取以交费为准。

报名联系人:王向宇 电话:13802943064,020-62782765;Email:wang_xy123@126.com

蔡颖谦 电话:13527890860,020-62782771

报 名 表

| | | | | | |
|---------|--|----|--|----|--|
| 姓名 | | 性别 | | 年龄 | |
| 单位 | | | | 职务 | |
| 学历 | | | | 职称 | |
| 住宿 | | | | | |
| 选派单位及公章 | | | | | |