

X 射线照射诱导鼻咽癌细胞 hMSH2 的表达

范凯^{1,2}, 王辉³, 王彦¹, 富晶¹, 刘敏¹, 吕申¹

X irradiation Induces hMSH2 Expression in Nasopharyngeal Carcinoma Cells

FAN Kai^{1,2}, WANG Hui³, WANG Yan¹, FU Jing¹, LIU Min¹, LV Shen¹

1. Central Laboratory of the Second Hospital Affiliated to Dalian Medical University, Dalian 116027, China; 2. Anatomy Department of Dalian Medical University; 3. Radiotherapy Department of the Second Hospital Affiliated to Dalian Medical University

Corresponding Author: LV Shen

Abstract :Objective To study the effect of X-irradiation on hMSH2 expression in nasopharyngeal carcinoma (NPC) CNE-1 cells, and explore mechanisms of DNA mismatch repair after irradiation. **Methods** Control and experimental cells were irradiated with 0 Gy and 10 Gy respectively, and hMSH2 expression was tested by RT-PCR, immunocytochemistry and Western blot. **Results** The expression of hMSH2 mRNA and protein in experimental cells were increased after irradiation, and were significantly higher than those in control cells ($P < 0.01$). **Conclusion** X-irradiation may induce hMSH2 expression in NPC cells, which contributes to DNA repair and maybe responsible for reduction of radio-sensitivity after irradiation.

Key words :X-irradiation; Nasopharyngeal carcinoma; hMSH2; RT-PCR; Immunocytochemistry

摘要:目的 研究 X 射线照射对鼻咽癌 CNE-1 细胞错配修复基因 hMSH2 表达的影响,探讨放射损伤后肿瘤细胞的 DNA 修复机制。**方法** 应用逆转录-PCR (RT-PCR)、免疫细胞化学及蛋白免疫印迹 (Western blot) 方法,检测 X 射线照射后对照组和实验组 (照射总剂量分别为 0 Gy 和 10 Gy) 细胞中 hMSH2 基因 mRNA 及蛋白表达。**结果** 实验组细胞 hMSH2 基因 mRNA 及蛋白表达在照射终止后逐渐上调,其表达较对照组显著增强 ($P < 0.01$)。**结论** X 射线照射可诱导鼻咽癌细胞 hMSH2 的表达,有助于放射损伤后肿瘤细胞 DNA 修复,这可能是肿瘤放疗敏感性降低的原因之一。

关键词: X 射线; 鼻咽癌; hMSH2; RT-PCR; 免疫细胞化学

中图分类号: R730.55; R739.63 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-8578(2006)02-0094-03

0 引言

目前在恶性肿瘤放射治疗中,常出现肿瘤放疗敏感性降低的现象,这涉及到肿瘤本身的生物学特性及某些癌基因和抑癌基因的改变,但迄今为止尚未见到有关错配修复 (mismatch repair, MMR) 基因在其中有何作用的报道。研究证实,MMR 基因能够纠正 DNA 复制过程中产生的碱基错配,保证基因组的完整性和稳定性,其中 hMSH2 基因在错配修复过程中起着关键作用^[1]。本研究选用临床上以放射治疗为首选的鼻咽癌细胞为研究对象,应用逆转录-PCR (RT-PCR)、免疫细胞化学及蛋白免疫印迹 (western blot) 方法,检测 X 射线照射后鼻咽癌

CNE 细胞中 hMSH2 基因 mRNA 及蛋白表达,分析放射对 hMSH2 基因表达的影响,探讨放射损伤后肿瘤细胞的 DNA 修复机制,为增强肿瘤放疗敏感性及指导临床治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 CNE-1 细胞株

CNE-1 细胞株由中国科学院上海生物研究所提供,该细胞株的来源及生物学特性参见文献^[2]。用含 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养液,于 37℃、100% 饱和湿度、95% 空气 + 5% CO₂ 条件下的 CO₂ 孵箱培养,常规传代,待细胞进入指数生长期后进行实验。

1.2 照射条件及方法

取指数生长期细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化后制成单细胞悬液,按梯度稀释法用细胞培养液调整到合适的细胞浓度,将其接种于数个培养瓶中,放置于 CO₂ 孵箱中培养至细胞完全贴壁。照射源为 6-MV X 直线加速器,剂量率为 200cGy/min,射野大小为 10cm

收稿日期: 2005-03-07; 修回日期: 2005-06-22

基金项目: 中国科学院知识创新工程领域前沿基金资助项目 (DICPKaaaabc)

作者单位: 1. 116027 大连医科大学附属二院实验中心; 2. 大连医科大学解剖学教研室; 3. 大连医科大学附属二院放疗科

通讯作者: 吕申

作者简介: 范凯 (1973-), 女, 博士, 讲师, 主要从事肿瘤发病机制研究

×15cm,把培养瓶置于照射野中心。照射前对培养瓶进行衰减校正。将细胞分为对照组和实验组,每次照射剂量分别为 0、2 Gy,1 次/天,总剂量分别为 0、10 Gy。每次照射后将细胞放回 CO₂ 孵箱内继续培养,照射全部结束后立即收集两组部分细胞,其余细胞每周收集 1 次,共收集 5 次,冻存备用。

1.3 RT-PCR 方法检测 hMSH2 mRNA 的表达

用 Trizol 试剂分别提取两组细胞总 RNA,经 AMV 逆转录酶系统合成 cDNA。逆转录系统构成如下:RNA 1μg,随机引物 0.5μl,dNTP 1μl,AMV 逆转录酶 0.5μl,RNase 抑制剂 0.25,Mgcl₂ 2μl,10 ×Buffer 1μl,加 RNase 灭活蒸馏水补充至 10μl。PCR 反应系统构成如下:5 ×PCR Buffer 10μl,TaKaRa Ex Taq™ HS 0.25μl,hMSH2 基因及内对照 -actin 上、下游特异性引物各 0.5μl,加灭菌蒸馏水补充至 40μl。从基因 bank 查出 hMSH2 和 -actin 的引物序列,hMSH2: 5-GTCGGCTTCGTGCGCTTCTTT-3',5-TCTCTGGCCATCAACTGCGGA-3',扩增产物 429bp;-actin: 5-ACACTGTGCCATCTACGAGG-3',5-AGGGGCCGGACTCGTCATACT-3',扩增产物 621bp。引物由大连宝生物工程有限公司合成。扩增条件:94 5min,94 30s,59 30s,72 45s,共 30 个循环,最后 72 10min。取 10μl PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶电泳分离,UVP 凝胶成像系统扫描照相,计算 hMSH2 与 -actin 基因 RT-PCR 产物吸光度的比值,以此作为 hMSH2 mRNA 的相对含量。

1.4 免疫细胞化学检测 hMSH2 蛋白的表达

取两组细胞涂片,参照试剂盒(Zymed 公司)说明书,进行链酶亲和素-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase, SP)法免疫细胞化学染色。鼠抗人 hMSH2 单克隆抗体(Zymed 公司)使用时稀释度为 1 50。用已知表达阳性切片作阳性对照,以 PBS 代替一抗作阴性对照。光镜下观察到细胞核存在棕黄色颗粒为 hMSH2 阳性。采用 HPLAS-100 彩色图像分析系统检测阳性细胞吸光度值。

1.5 Western blot 法检测 hMSH2 蛋白的表达

将两组细胞分别加入 200μl 细胞裂解液(50mmol/L Tris-Hcl pH 8.0、150mmol/L NaCl、5mmol/L EDTA、1% triton X-100、1mmol

PMSF),沸水煮 5min,冰浴上超声粉碎,4 离心 5min(11 000rpm),取出上清液,用 BCA 蛋白定量试剂盒(Pierce 公司)进行蛋白定量。取蛋白样品 50μg,采用 SDS-PAGE 电泳进行蛋白转膜,加入 5%脱脂奶粉封闭,加入一抗(1:150)和二抗(1:1 000)孵育,ECL 显色。实验重复 3 次。UVP 成像分析系统扫描确定蛋白印迹条带的光密度值,以此表示蛋白含量。

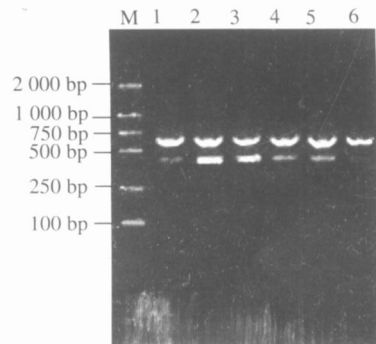
1.6 统计方法

采用 SPSS10.0 软件包,对所得结果进行 t 检验,P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hMSH2 mRNA 的表达

对照组细胞 hMSH2 mRNA 的表达极弱。实验组细胞照射终止后第 1~3 周内 hMSH2 mRNA 表达水平显著强于对照组(P<0.01),其中第 3 周 hMSH2 mRNA 表达最强,之后明显减弱(见图 1,表 1)。



M:DL-2000 DNA marker;Lane 1:对照组;Lane 2~6:实验组照射后 0~4w

图 1 RT-PCR 法检测 hMSH2 mRNA 表达

2.2 hMSH2 蛋白的表达

免疫细胞化学和 Western blot 法均显示实验组细胞 hMSH2 蛋白的表达在照射终止后逐渐增强,第 2~4 周其表达显著强于对照组(P<0.01)(图 2、3,表 1)。

3 讨论

DNA 是辐射引起细胞死亡的主要靶分子。X

表 1 RT-PCR 和 Western blot 法检测 hMSH2 基因的表达 (x̄ ±s)

| | 对照组 | 实验组照射终止后时间(W) | | | | |
|------------|-------------|---------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| hMSH2 mRNA | 0.08 ±0.02 | 0.17 ±0.03 | 0.26 ±0.01 ^a | 0.43 ±0.10 ^a | 0.56 ±0.13 ^a | 0.19 ±0.04 |
| hMSH2 蛋白 | 21.13 ±7.73 | 20.29 ±8.56 | 24.35 ±9.91 | 46.63 ±11.02 ^b | 47.71 ±9.25 ^b | 48.32 ±7.22 ^b |

^{a,b}:与对照组比较,P<0.01

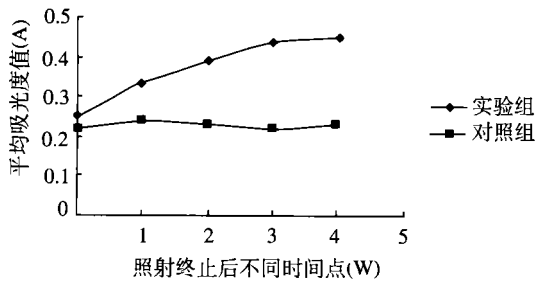


图2 免疫细胞化学法检测 hMSH2 蛋白表达

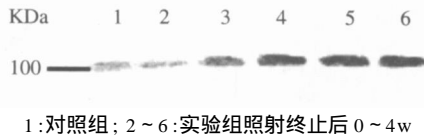


图3 Western blot 法检测 hMSH2 蛋白表达

射线作为一种电离辐射,可引起 DNA 结构和功能的损伤,最终导致细胞死亡^[3]。DNA 的修复能力是影响细胞存活和死亡的主要原因,也直接影响到肿瘤细胞的放射敏感性。研究表明,放射所致的 DNA 损伤至少有两个修复途径:重组修复和切除修复。其中 DNA 损伤切除修复系统是一系列的酶,如嘌呤嘧啶内切酶,修复聚合酶和连接酶等。细胞利用这些酶进行 DNA 的错配修复等^[4]。

自 1993 年以来,至少有 hMSH2、hMSH3、hMSH6、hMLH1、hPMS1 和 hPMS2 等 6 种 MMR 基因被分离克隆,其中 hMSH2 基因被发现的最早。hMSH2 基因位于染色体 2P21-22,基因组 DNA 全长 73 Kb,含有 16 个外显子。hMSH2 蛋白参与组成 hMutS 和 hMutL 二聚体,识别 DNA 复制中的错配碱基及插入缺失环,并与其结合,是完成 DNA 修复必需的组件之一^[5,6]。人体消化道、生殖腺等部位的细胞 DNA 复制活跃,需要 MMR 系统不断纠错,因此 MMR 基因通常有较高的表达。同样,肿瘤细胞由于增殖异常活跃,MMR 基因的表达也较强。

目前关于鼻咽癌与 MMR 基因的研究不多,而有关放疗对鼻咽癌细胞 MMR 基因影响的报道也极少。本研究从 mRNA 和蛋白两个水平研究 hMSH2 基因的表达。结果发现,对照组细胞 hMSH2

基因 mRNA 和蛋白均存在表达,说明鼻咽癌细胞中存在 DNA 复制错误,诱导 MMR 基因的转录和翻译。实验组细胞 hMSH2 蛋白的表达在照射终止后逐渐增强并维持在较高水平,这说明放射除了能造成 DNA 链断裂以外,还能造成碱基错配,从而促使 hMSH2 蛋白表达代偿性增强,以修复 DNA 碱基错配,纠正 DNA 复制错误,进而保持遗传信息的完整性和稳定性,避免遗传突变。另外,hMSH2 蛋白表达的上调可能还与照射后细胞的加速再增殖有关。细胞在旺盛的增殖过程中容易产生 DNA 复制错误,诱导 hMSH2 的表达。hMSH2 mRNA 表达在照射终止后的前 3 周逐渐增强,这与蛋白变化一致,但第 4 周时表达明显减弱。提示照射可引起 hMSH2 的转录增强,使损伤的 DNA 逐渐被修复,但当这种修复达到一定程度时,就会负反馈性地抑制其转录,因此出现 hMSH2 mRNA 水平的回落。hMSH2 基因 mRNA 和蛋白表达的相对一致性提示 hMSH2 基因表达可能受转录水平调节。但本研究中鼻咽癌细胞 hMSH2 表达的变化是否与放射引起的 hMSH2 基因本身的改变有关还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Thomas DC, Umar A, Kunkel TA. Microsatellite instability and mismatch repair gene defects in cancer[J]. *Mutat Res*, 1996, 350(1):201-205.
- [2] 人体鼻咽癌上皮细胞梭形细胞株的建立[J]. *中国科学*, 1978, 113-118.
- [3] Hall FJ. Molecular biology in radiation therapy: the potential impact of recombinant technology on clinical practice[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1994, 30(5):1019-1028.
- [4] Thompson L H. Evidence that mammalian cells possess homologous recombinational repair pathways[J]. *Mutat Res*, 1996, 363(2):77-88.
- [5] Schofield MJ, Hsieh P. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2003, 57:579-608.
- [6] Bignami M, Casorelli I, Karran P. Mismatch repair and response to DNA-damaging antitumour therapies[J]. *Eur J Cancer*, 2003, 39(15):2142-2149.

[编辑: 贺文]