

^{60}Co 射线对 HeLa 细胞端粒酶活性的影响

高敏¹, 周云峰^{1*}, 周福祥¹, 肖创映¹, 刘诗权²

Effect of ^{60}Co -ray on telomerase activity of HeLa cells

GAO Min, ZHOU Yun-feng, ZHOU Fu-xiang, et al

Department of radiotherapy and chemotherapy, Zhongnan hospital of Wuhan university, Wuhan 430071, China

Abstract: Objective To study the effect of ^{60}Co rays on telomerase activity in human cervix carcinoma cell line HeLa. **Methods** HeLa cells were irradiated with 0.5 ~ 12 Gy of ^{60}Co rays and telomerase activity was determined by TRAP-ELISA at 24h, 72h and 120h after irradiation. **Results** Telomerase activity increased in a dose-dependent manner between 0.5 ~ 1.5 Gy at 24h after irradiation. The degree of increase reduced between 2 ~ 3 Gy. The telomerase activity gain increased in a dose-dependent manner between 4 ~ 12 Gy at 24h after irradiation, but it reduced in a dose-dependent manner at 72h and 120h after irradiation. **Conclusion** The up-regulation of telomerase activity in HeLa cells at 24h after high-dose radiation may suggest the release of telomerase from DNA. The up-regulation of it after low-dose irradiation may suggest the involvement of telomerase in DNA re-pair.

Keywords: HeLa cell; ^{60}Co -rays; Telomerase

摘要:目的 探讨射线对人宫颈癌细胞系 HeLa 端粒酶活性的影响。方法 不同剂量的射线照射 HeLa 细胞后 24h、72h、120h, 用 TRAP-ELISA 法检测端粒酶的活性。结果 射线照射细胞后 24h, 较低剂量(0.5 ~ 1.5) Gy 时, 端粒酶的活性呈剂量依赖式增加; (2 ~ 3) Gy 时增加的幅度减低; 而较高剂量(4 ~ 12) Gy 射线照射时, 又呈剂量依赖式增加。与照射后 24h 相比, 在较高剂量(4 ~ 12) Gy 照射后 72h 及 120h, 酶的活性呈剂量依赖式减少。结论 HeLa 细胞在较高剂量射线照射后 24h 出现的端粒酶活性上调反应, 可能是其组分从 DNA 释放增加或者与端粒酶的核内位置调节有关; 较低剂量照射后的上调反应, 可能与 DNA 的修复, 稳定断裂的染色体有关。

关键词: HeLa 细胞; ^{60}Co -射线; 端粒酶

中图分类号: R73-36 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2004)01-0033-03

0 引言

端粒酶在恶性肿瘤的发生与发展中起着重要作用。许多研究表明, 放射线能影响端粒酶的活性。较低剂量 LET 射线能增加端粒酶的活性, 而较高剂量射线则抑制端粒酶的活性^[1-3]。此研究在宫颈癌细胞 HeLa 尚未见报导。本实验采用 Telomerase TRAP-ELISA 法检测人宫颈癌细胞系 HeLa 经不同剂量射线照射后不同的时间, 端粒酶活性的变化情况, 以探讨端粒酶与放射的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 人宫颈癌细胞系 HeLa 由本室保存。Telomerase TRAP-ELISA 试剂盒购自瑞士 Roche 公司。1640 培养基购自 GIBCOBRL 公司, 其余试剂

均为国产优质分析纯。PCR-2400 型热循环仪 (PerkinElmer), 酶标免疫测定仪 (Bio-Rad Model 550)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人宫颈癌细胞系 HeLa 培养于含 10% 灭活的小牛血清的 RPMI1640 培养液中。培养条件为 37℃, 5% CO₂, 饱和湿度, 每隔 2 ~ 3 天用 0.25% 胰酶/0.02% EDTA 消化, 以 1:2 传代一次。

1.2.2 放射 待细胞生长至融合状态后, 室温, 接受 (0.5 ~ 12) Gy 的 ^{60}Co 射线照射。吸收剂量率为 68.92 cGy/min, 照后 24h、72h、120h 收集细胞。

1.2.3 TRAP-ELISA 法检测细胞端粒酶的活性 端粒酶活性的检测按试剂盒说明书的方法进行。检测设阳性对照和阴性对照。阳性对照: 恒表达端粒酶活性的 293 细胞提取物(试剂盒备有); 阴性对照: 对细胞提取物进行 65℃ 水浴处理 10min。具体步骤如下: (1) 制备细胞提取物: 收集各组培养细胞 2×10^5 个, 加裂解液 200μl, 冰浴 30min, 低温离心

收稿日期: 2003-03-10; 修回日期: 2003-04-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30171063)

作者单位: 1. 430071 武汉大学附属中南医院放疗科,

2. 肿瘤研究所 (* 通讯作者)

20min, 吸取上清; (2) TRAP 反应: 取 3μl 细胞提取物加入 PCR 反应混合物。25℃, 20min, 引物延伸。94℃, 5min, 端粒酶灭活。94℃, 30 秒, 变性; 50℃, 30 秒, 退火; 72℃, 90 秒延伸; 共循环 30 个周期。72℃, 10min, 平衡。(3) 杂交与 ELISA: 取 5μl 扩增产物, 加 20μl 变性剂室温下孵育 10min。加入 225μl 杂交缓冲液, 充分混匀, 37℃, 摇晃孵育 2h。加入 100μl 杂交混合液于预先包被的反应板 (MTP), 使杂交产物与 MTP 上的链酶亲和素相结合, 37℃, 再孵育 1h。洗板 3 次。加入 100μl 抗地高辛过氧化物酶工作液, 室温, 30min。洗板 5 次。加 TMB100 μl 显色, 室温 15min。最后加 100μl 终止剂, 终止颜色变深, 30min 内在酶标仪上读 450 的吸光度 (以 655 的波长为参考)。(4) 结果的解释: 阴性对照, A 必须 0.25, 否则整个实验包括 TRAP 反应重做; 阳性对照, A 必须 1.5, 否则整个实验包括 TRAP 反应重做; 样本, 从样本的吸光度值减去阴性对照的平均吸光度值。

1.3 统计学处理 每个样本重复实验 3 次, 用 SPSS 10.0 软件对所得的资料进行方差分析。

2 结果

不同剂量的⁶⁰Co 射线对 HeLa 细胞端粒酶的活性的影响, 见表 1、图 1。

表 1 不同剂量 射线对 HeLa 细胞端粒酶活性的影响

照射剂量 (Gy)	照射后时间		
	24h	72h	120h
0	1.552 ±0.023	1.566 ±0.023	1.629 ±0.060
0.5	1.775 ±0.059	1.230 ±0.020	1.053 ±0.021
1.0	2.291 ±0.014	1.820 ±0.015	1.736 ±0.018
1.5	2.347 ±0.019	1.929 ±0.025	1.980 ±0.025
2.0	2.131 ±0.049	1.919 ±0.016	1.743 ±0.022
3.0	2.105 ±0.067	1.131 ±0.015	1.463 ±0.026
4.0	2.260 ±0.032	1.037 ±0.017	1.409 ±0.055
6.0	2.349 ±0.026	1.048 ±0.022	1.002 ±0.007
8.0	2.646 ±0.031	0.844 ±0.013	0.875 ±0.022
12.0	2.745 ±0.036	0.652 ±0.028	0.595 ±0.016

由表 1、图 1 可以看出, HeLa 细胞受照后 24h, 低剂量 (0.5 ~ 1.5) Gy 时, 端粒酶活性呈剂量依赖式增加 ($P < 0.05$); (2 ~ 3) Gy 时, 其增加的幅度减低, 而较高剂量 射线 (4 ~ 12) Gy 照射后, 端粒酶活性又随照射剂量的增加而增加 ($P < 0.05$)。与照射后 24 小时相比, 细胞受较高剂量照射后 72、120 小时, 端粒酶的活性随着剂量的增加而减少 ($P < 0.05$)。照射后 72、120 小时端粒酶活性的整体水平较 24 小

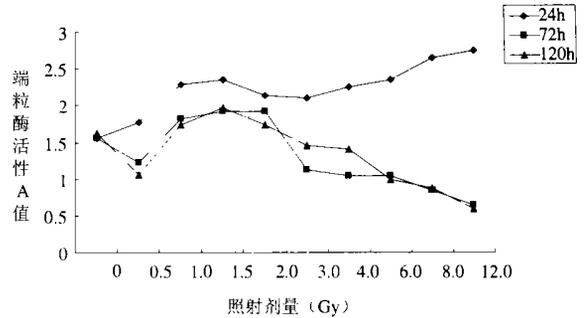


图 1 不同剂量 射线对 HeLa 细胞端粒酶活性的影响

时低 ($P < 0.05$), 但是, 照后 72 小时与 120 小时相比, 端粒酶活性变化无显著性差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

近年来许多研究发现, 电离辐射或紫外线可以影响端粒酶的活性。一般认为, 低至中等剂量的低 LET 射线可以诱导端粒酶的活性增加, 而较高剂量的射线则抑制端粒酶的活性^[1-3]。但是各个实验室所用的剂量有很大不同, 而且不同的细胞, 端粒酶活性开始增加、达到峰值及维持的时间均不相同。到目前为止, 还没有足够的证据来推断辐射后, 端粒酶活性变化的普遍特点。

本实验首次用低至高 8 个不同剂量的 射线照射 HeLa 细胞, 观察其照射后 24、72 及 120 小时端粒酶活性变化的特点。研究发现, HeLa 细胞经低剂量 (0.5 ~ 1.5) Gy 射线照射后 24h, 端粒酶活性呈剂量依赖式增加, 这种上调反应与先前的研究一致; (2 ~ 3) Gy 时, 其增加的幅度减低; 较高剂量 (4 ~ 12) Gy 照射时, 端粒酶活性没有受到抑制, 而又呈剂量依赖式增加, 但是照射后 72 及 120 小时, 端粒酶活性是呈剂量依赖式下降的, 12Gy 时降至最低, 分析这种现象的原因, 我们推测可能是较低剂量 射线照射后, 端粒酶活性上调因子被激活, 端粒酶活性增加; 随着照射剂量逐渐增加, 上调因子受抑制, 下调因子被激活, 端粒酶活性下降; 但是同时, 受照剂量越大, DNA 结构改变越严重, 致使端粒酶组分从 DNA 释放越多, 弥补了下调因子的作用, 从而使端粒酶活性呈上升趋势。我们知道, 离子射线可以导致 DNA-DNA 及 DNA 与蛋白质交联, 还能使与染色质相连的可溶性蛋白释放出来^[4]; 近来研究发现, 细胞周期, 放射线导致的 DNA 结构的改变可以使端粒酶在核内的位置发生改变, 从而调节端粒酶的活性^[5]。SatinG. 等用 10Gy 射线照射呈指数生长的 HeLa 细胞后, 发现端粒酶活性增加, 但是其具有催化活性的组分 hTERT 的 mRNA 并没有增加^[6]。因此较高剂量 射线照射后 24 小时, 端粒酶

的活性增加,可能是因为放射导致的 DNA 结构发生改变,从而使与 DNA 相连的端粒酶释放出来,照射的剂量越大,DNA 结构的改变越严重,端粒酶释放得就越多,以至于超过了下调因子的作用。表现为细胞照射后 24 小时随着照射剂量的增加,端粒酶的活性逐渐增加。

本研究还发现较高剂量 射线照射后 72 及 120 小时,端粒酶的活性呈剂量依赖式下降,可能是因为端粒酶逐渐恢复至原来的位置,或被释放的端粒酶因为被逐渐降解而随着时间的延长而逐渐减少,使下调因子的作用被显现出来,表现为较高剂量 射线照射后 72 及 120 小时,端粒酶的活性呈剂量依赖式下降。由此可以看出,端粒酶的活性调节是一个复杂的过程,与多种因素有关,其具体的机制有待于进一步深入的研究。

本实验中低剂量 射线照射后端粒酶的活性增加一直持续至照射后 120 小时。这种增加,可能与其参与 DNA 损伤的修复有关。Hande 等用端粒核酸探针通过 FISH 发现,在 X 线诱导的染色体断裂部位有新形成的端粒片段,25% ~ 50% 的片段长度在 200bp ~ 1Kb 之间,推测这些重复片段是通过端粒酶添加上去的^[7]。端粒酶缺乏、端粒较短的细胞系及鼠,放射诱导的 DNA 断裂的修补更慢,染色体畸变更加严重^[8]。在体动物肿瘤的研究发现,端粒酶抑制剂可以增加放射敏感性,推测可能与端粒酶参与 DNA 损伤修复有关^[9]。

因此,本实验中低剂量射线照射后诱导端粒酶

的活性增加,可能与端粒酶参与 DNA 损伤的修复有关。我们将对此进行进一步的研究。

参考文献:

- [1] Leteurtre F, Li X, Gluckman E, et al. Telomerase activity in human hematopoietic cells after gamma-irradiation. *Leukemia*, 1997, 11 (10): 1681-1689.
- [2] Wan G X, Liu Y, Chow L S, et al. Regulation of telomerase activity by gamma radiation in nasopharyngeal carcinoma cells. *Anti-cancer research*, 2000, 20 (1A): 433-437.
- [3] Finnon P, Sliver A R J, Bouffler S D. Upregulation of telomerase activity by X-irradiation in mouse leukemia cells is independent of Tert, Terc, Tnks and Myc transcription. *Carcinogenesis*, 2000 (21): 573-578.
- [4] Frankenberger G, Schwager M. Induction, repair and biological relevance of radiation-induced DNA lesions in eukaryotic cells. *Radiat. Environ. Biophys.* 1990 (29): 273-292.
- [5] Wan G J M, Kusdra L, Collins K. Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage. *Nature Cell Biology*. 2002, 4 (9): 731-736.
- [6] Sawant S G, Greig V, Dhar S, et al. Telomerase activity: a measure for monitoring radio-curability of tumor cells. *The FASEB Journal*, 1999 (3): 1047-1054.
- [7] Hande M P, Lansford P M, Natanson AT. Induction of telomerase activity in vivo by X-irradiation of mouse splenocytes and its possible role in chromosome healing. *Mutation Research*, 1998, 404 (1-2): 205-214.
- [8] Goytisolo F A, Samper E, Martin-Caballero J, et al. Short telomeres result in a more sensitive response to ionizing radiation in mammals. *Journal of Experimental Medicine*. 2000 (155): 345-352.
- [9] 阮晓峰, 周云峰. 端粒酶抑制剂联合放疗对小鼠乳腺癌作用的实验研究. *癌症*, 2001, 20 (3): 49-54.

(刘红武校对)