

外源性 ATM 基因对辐射诱导 AT 细胞端粒酶逆转录酶 mRNA 表达的影响

盛方军 曹建平 罗加林 朱巍 刘芬菊 冯爽 宋建元 李狮
(苏州大学放射医学与公共卫生学院放射生物学教研室 苏州 215123)

摘要 通过观察外源性毛细血管扩张性共济失调症突变基因 (Ataxia-telangiectasia mutation, ATM) 对毛细血管扩张性共济失调症 (Ataxia-telangiectasia, AT) 患者皮肤的成纤维细胞系 AT5BIVA (AT 细胞) 端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) mRNA 表达的影响, 探讨 ATM 对 hTERT 的调控作用。采用 RT-PCR 法, 对比 ATM 基因转染前、后 AT 细胞 hTERT mRNA 表达的变化及与源自正常人皮肤的成纤维细胞系 GM0639 (GM 细胞) 相比的差异; 以及细胞经 3 Gy ^{60}Co γ 射线照射后其 hTERT mRNA 表达的变化。结果显示, 未照射时, GM 细胞 hTERT mRNA 表达呈阴性, AT 细胞 hTERT mRNA 表达呈阳性, 转染 ATM 基因后的 ATM⁺-AT 细胞其 hTERT mRNA 的表达明显下降 ($p < 0.05$); ^{60}Co γ 射线照射后, GM 细胞 hTERT mRNA 表达呈阳性, AT 细胞、空载体 AT 细胞 (PEBS7-AT 细胞) 和 ATM⁺-AT 细胞 hTERT mRNA 的表达量比未照射时明显增加 ($p < 0.05$), ATM⁺-AT 细胞 hTERT mRNA 相对表达量的增加低于 AT 细胞和空载体 AT 细胞 ($p < 0.05$)。提示 ATM 可下调 hTERT mRNA 的表达; 电离辐射可诱导细胞 hTERT mRNA 表达; 端粒酶参与 DNA 损伤修复。

关键词 毛细血管扩张性共济失调症, 毛细血管扩张性共济失调症突变基因, 端粒酶逆转录酶, 电离辐射
中图分类号 R811.5, R730.49, Q786, Q345

Ataxia-telangiectasia (AT, 毛细血管扩张性共济失调症) 是由位于染色体 11q22-11q23 的 ATM (AT mutation)^[1] 基因突变所致的一种单基因常染色体隐性遗传病, 其主要临床症状表现为: 基因组不稳定性、端粒缩短、早衰、高辐射敏感性、肿瘤的发病率增高等^[2]。传代培养的 AT 细胞表型与临床表现一致。国外研究发现 AT 细胞具有端粒酶活性^[3]。端粒酶是一种依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶, 能以自身 RNA 作为模板, 在 DNA 3' 端逆转录合成端粒重复序列, 以弥补复制造成的端粒缩短, 是体内一种维持端粒 DNA 长度的具有逆转录酶活性的核糖核蛋白^[4]。端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 作为端粒酶的催化亚基组分, 其表达对端粒酶激活是必需的, 是端粒酶激活的限速步骤^[5]。本工作通过逆转录 PCR (Reverse transcriptase-PCR, RT-PCR) 实验方法, 观察了 ATM 基因转染前后 AT 细胞 hTERT mRNA 表达量的变化及

与 GM 正常对照细胞 hTERT mRNA 表达量的差异性, 以及细胞经 3 Gy ^{60}Co γ 射线照射后其 hTERT mRNA 表达的变化, 研究 ATM 基因对细胞 hTERT mRNA 表达调控的影响。

1 实验材料与方法

1.1 材料

人成纤维细胞系 AT5BIVA 和 GM0639 承德国 GSF 国家环境与健康研究中心放射生物实验室惠赠。质粒 PEBS7-YZ5 (含 ATM 基因 cDNA 9.2 kb ORF) 本教研室业已构建, PEBS7 载体上含有潮霉素抗性基因, 以便筛选细胞克隆。RT-PCR 试剂盒、DMEM 培养基购自 Invitrogen 公司, 潮霉素 B 购自 ROCHE 公司, DNA marker 购自 TaKaRa 公司, 引物设计采用 Primer Premier 5.0 软件, 并经 GenBank Blast 进行同源检索后由上海生工合成。

国家自然科学基金项目 (30170288)、江苏省普通高校自然科学基金重点项目 (04KJA180121)、江苏省研究生创新计划 (Xm04-67)、苏州大学医学发展基金重点项目 (EE126032) 资助

第一作者: 盛方军, 男, 1979 年 10 月出生, 2003 年 6 月毕业于苏州大学, 现为苏州大学在读硕士研究生, 从事分子放射生物学研究

通讯联系人: 曹建平

收稿日期: 初稿 2005-04-13, 修回 2005-06-09

hTERT mRNA 引物序列为:

正义引物:

5'-GGCGACATGGAGAACAAGC-3'

反义引物:

3'-GGGAGACGATGAGGTAGGACT-5'

预期 PCR 产物大小为 604 bp。

β -actin 内参引物序列为:

正义引物:

5'-GAAACTACCTTCAACTCCATC-3'

反义引物:

5'-CGAGGCCAGGATGGAGCCGCC-3'

预期 PCR 产物大小为 208 bp。

其余试剂均为分析纯。

1.2 细胞培养及基因转染

AT 细胞和 GM 细胞接种于 DMEM 培养基(含 10%小牛血清和青、链霉素各 100 U/mL),在 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养。取对数生长期 AT 细胞(5×10^6 /mL),0.25%胰蛋白酶消化,离心(1000 r/min, 10 min)收集细胞,重悬于低渗电穿孔缓冲液,重悬细胞浓度为 $(2-3) \times 10^6$ /mL,室温静置 5 min 后分装于电极杯,分别加入 PEBS7-YZ5 和 PEBS7 各 10 μ L (5-20 μ g/mL),放入电穿孔仪,750 V 电压下电击 60 μ s。电击后,室温下放置 8 min 后,接种于上述 DMEM 培养基中,在 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养,24 h 后加入含(10 mg/mL)潮霉素 B 75 μ L 的 DMEM 培养液 5 mL,而后每隔 4-5 d 换液,每次均加入同量的潮霉素 B,3 周后筛选完毕。细胞在含(10 mg/mL)潮霉素 B 50 μ L 的 DMEM 培养液 5 mL 中传代培养。

1.3 照射

对数生长期的 AT 细胞、PEBS7-AT 细胞(空载体 AT 细胞)、PEBS7-YZ5-AT 细胞(ATM⁺-AT 细胞)、GM 细胞,室温条件下用 ⁶⁰Co γ 射线照射,照射剂量为 3 Gy (剂量率 1.0 Gy/min)。照射后,上述细胞在 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养 2 h。

1.4 细胞总 RNA 抽提和鉴定

对数生长期的未照射、照射后 2 h 的各组细胞经 0.25%胰蛋白酶消化,DMEM 培养基制成细胞悬液,计数活细胞并调整细胞浓度为 3.5×10^5 /mL。取 2 mL 细胞悬液,离心(1000 r/min, 10 min)收集细胞,PBS 清洗 2 次后加入 1 mL Trizol,混匀,移入一新离心管,室温下放置 5 min,再移入一新离心管,加入 200 μ L 氯仿,振荡 30 s,室温置 3 min。4°C、

12000 r/min 离心 15 min。吸取上层水相约 400 μ L 至一新离心管,加入等体积异丙醇,混匀后-20°C 下放置 30 min。4°C、12000 r/min 离心 10 min 后去上清,加入 70%乙醇 800 μ L 洗涤 2 次,4°C、8000 r/min 离心 5 min 后去上清,室温晾干沉淀。加入 40 μ L DEPC-H₂O 溶解 RNA 沉淀,-70°C 冻存。取 2 μ L 于 Eppendorf 紫外分光光度计测 OD 值。以 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值确定 RNA 的纯度,以 OD₂₆₀ 值确定提取的 RNA 浓度。

1.5 RT-PCR 检测 hTERT mRNA 表达

1.5.1 RT 反应体系 各细胞株 RNA 2 μ L, Oligo-dT 1 μ L, DEPC-H₂O 8 μ L,混匀后 70°C 下放置 5 min,立即冰浴 3 min。再加入 5 $\times$ Buffer 4 μ L, dNTP 2 μ L,去离子水 2 μ L, 25°C 放置 5 min。加入 AMV 逆转录酶 1 μ L, 25°C 10 min, 42°C 1 h, 70°C 10 min 后进行 PCR 反应。

1.5.2 PCR 反应体系 上述逆转录合成的 cDNA 2 μ L, 10 $\times$ PCR Buffer 2 μ L, MgCl₂ 1.2 μ L, dNTP 0.4 μ L, hTERT mRNA 正、反义引物各 0.5 μ L,在同一细胞另一新 PCR 管中加入 β -actin 正、反义引物各 0.5 μ L 作为内参, Taq 酶 0.2 μ L, 加去离子水至 20 μ L。混匀后稍离心,加入 10 μ L 石蜡油, 94°C 4 min。在 PCR 仪上进行 30 次循环反应,循环条件: 94°C 45 s、52°C 40 s、70°C 1 min,最后 70°C 延伸 7 min。

1.5.3 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物 9 μ L 和上样缓冲液 1 μ L 混合上样,1.5%琼脂糖凝胶进行电泳,紫外图像分析仪摄像并应用 Quantity One 软件测定条带的平均密度值进行半定量分析。hTERT mRNA 的相对表达量 (RE)=hTERT mRNA 的平均密度值/ β -actin 的平均密度值。

1.6 统计分析

实验所得数据以均数 $\pm$ 标准差表示,两两对比采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 ATM 基因转染前、后 AT 细胞 hTERT mRNA 的表达

应用 RT-PCR 技术分析 ATM 基因转染前后 AT 细胞 hTERT mRNA 的表达结果见图 1。由图 1 可见,AT 细胞、空载体 AT 细胞 (PEBS7-AT)、ATM⁺-AT 细胞 (PEBS7-YZ5-AT) 在对应分子量 604 bp 处均出现一条带,而正常对照的 GM 细胞则未出现;

ATM⁺-AT 细胞的条带的荧光强度明显弱于 AT 细胞和空载体 AT 细胞的条带的荧光强度。表明除 GM 细胞外, 其余各组细胞均有 hTERT mRNA 表达; ATM 基因转染后, ATM⁺-AT 细胞的 hTERT mRNA 表达水平明显降低。图 2 和表 1 是各组细胞的 hTERT mRNA 的相对表达量 (RE)。正常对照的 GM 细胞的 hTERT mRNA 的 RE 值为 0; AT、

PEBS7-AT、ATM⁺-AT 细胞的 hTERT mRNA 的 RE 值明显高于 GM 细胞 ($p<0.05$)。转染 ATM 基因的 ATM⁺-AT 细胞的 hTERT mRNA 的 RE 值比 AT 细胞、空载体 AT 细胞明显降低 ($p<0.05$); 空载体 AT 细胞的 hTERT mRNA 表达量与 AT 细胞的差别没有统计学意义 ($p>0.05$)。

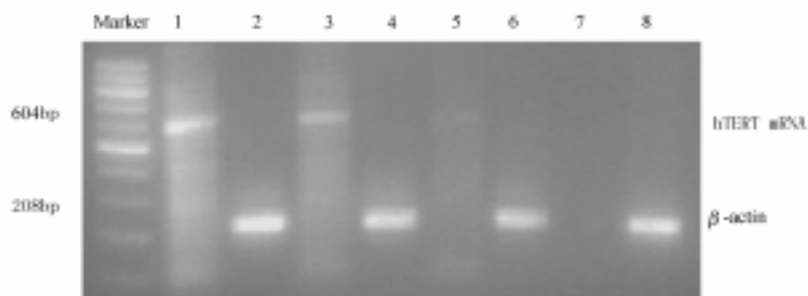


Fig.1 RT-PCR analysis of mRNA expression of hTERT
1. AT; 3. PEBS7-AT; 5. PEBS7-YZ5-AT; 7. GM; 2,4,6,8. β -actin (Internal control)

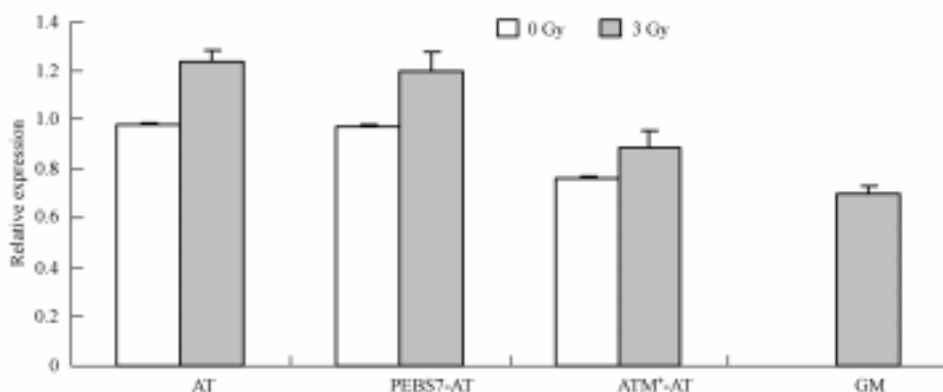


Fig.2 Levels of relative expression of hTERT mRNA after ^{60}Co γ -ray irradiation

Table 1 Relative expression of hTERT mRNA after ^{60}Co γ -ray irradiation

Dose /Gy	Cells			
	AT	PEBS7-AT	ATM ⁺ -AT	GM
0	0.978±0.003 ⁺	0.975±0.004 ⁺	0.763±0.004 ⁺	0
3	1.240±0.042 [#]	1.200±0.073 [#]	0.890±0.064 [#]	0.700±0.035 [#]

AT, PEBS7-AT are compared with ATM⁺-AT respectively, * $p<0.05$;

AT, PEBS7-AT, ATM⁺-AT are compared with GM respectively, ⁺ $p<0.05$;

The 3 Gy groups are compared with 0Gy respectively, [#] $p<0.05$, $n=6$

2.2 ^{60}Co γ 射线对细胞 hTERT mRNA 的表达的影响

各组细胞经 3 Gy ^{60}Co γ 射线照射后, 其 hTERT mRNA 表达的 RT-PCR 检测结果见图 3。由图 3 可见, 照射后各组细胞在 604 bp 处均可出现一条带, 表明均有 hTERT mRNA 表达。但条带的荧光强度

不同, AT 细胞和空载体 AT 细胞 (PEBS7-AT) 的条带的荧光强度最强, ATM⁺-AT 细胞的条带的荧光强度次之, GM 细胞的条带的荧光强度最弱。图 2 和表 1 是 3 Gy ^{60}Co γ 射线照射后各组细胞 hTERT mRNA 的相对表达量。 γ 射线照射后, AT 细胞、空载体 AT 细胞和 ATM⁺-AT 细胞的 hTERT mRNA 相对表达量均比未照射时增加 ($p<0.05$); 正常 GM 细胞的 hTERT mRNA 的 RE 值为 0.700 ± 0.035 , 低于

ATM⁺-AT 细胞 ($p<0.05$); AT 细胞和空载体 AT 细胞的 hTERT mRNA 相对表达量无明显差别 ($p>0.05$); ATM⁺-AT 细胞的 hTERT mRNA 相对表

达量的增量 (0.127 ± 0.061) 低于 AT 细胞 (0.262 ± 0.040) 和空载体 AT 细胞 (0.225 ± 0.070) ($p<0.05$)。

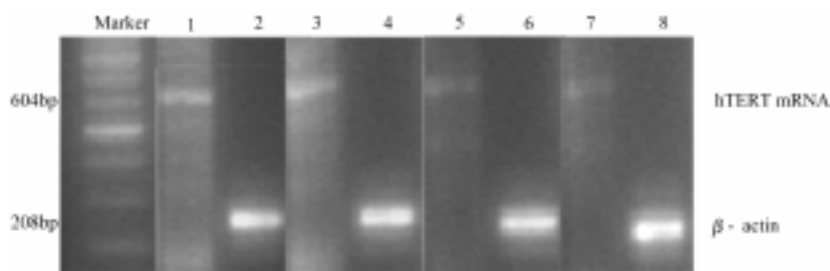


Fig.3 Levels of relative expression of hTERT mRNA after ^{60}Co γ -ray irradiation
1. AT; 3. PEBS7-AT; 5. PEBS7-YZ5-AT; 7. GM; 2, 4, 6, 8. β -actin (Internal control)

3 讨论

端粒(Telomere)是真核细胞染色体末端的一种特殊结构,能防止染色体 DNA 降解、末端融合、异常重组、缺失,从而维持染色体的稳定。在正常体细胞中,由于 DNA 聚合酶不能完全复制线性染色体末端,每次 DNA 复制,端粒长度会减少 50—100bp,当端粒长度缩短到一定程度时,无法维持染色体结构而引起细胞凋亡^[6]。端粒酶可维持端粒 DNA 长度。而端粒酶逆转录酶的表达与端粒酶活性具有一致性^[4]。迄今为止的研究发现,正常体细胞分化过程中,端粒酶是没有活性的,而 80%—90% 的肿瘤组织可检测到端粒酶活性。国外研究发现 AT 细胞具有端粒酶活性^[3]。AT 细胞作为一种非肿瘤细胞而具有端粒酶活性,这令我们对 ATM 与端粒酶活性之间的关系产生了兴趣。我们的研究发现正常的 GM 细胞其 hTERT mRNA 的表达呈阴性,AT 细胞 hTERT mRNA 的表达呈阳性,这与 Carl 等^[3]的研究结果相一致。转染 ATM 基因后的 ATM⁺-AT 细胞其 hTERT mRNA 的表达明显下降,这一结果表明 hTERT mRNA 是 ATM 复杂作用网络的底物之一,ATM 可通过对 hTERT mRNA 的调控降低 hTERT mRNA 的表达。国外亦有相关研究报道了 ATM 激酶家族对端粒酶催化亚基,即端粒酶逆转录酶的这种作用^[7]。肿瘤细胞具有端粒酶活性的一个重要原因是肿瘤细胞的基因组不稳定性。AT 病是由于 ATM 基因突变引起的,ATM 基因编码一种与 PI-3K (磷酸酰肌醇 3-激酶)的催化功能域有高度同源性的蛋白激酶,该激酶通过磷酸化不同细胞周期的不同靶蛋白来调控细胞周期关卡,在 DNA 损伤信号传导及损伤 DNA 的修复、细胞凋亡、基因组稳定性方面具有重要作用^[8]。而 AT 细胞由于 ATM

基因的突变,在电离辐射等各种因素引起 DNA 损伤时不能激活正常的细胞周期关卡,使 DNA 损伤不能及时得到修复,导致基因组的不稳定,使其表达 hTERT mRNA 而具有端粒酶活性。我们的研究表明 ATM 基因突变是导致 AT 细胞表达 hTERT、具有端粒酶活性的重要原因。但 ATM 下调 hTERT 的具体机制仍旧不明,有待于进一步的研究。我们的研究结果亦显示转染 ATM 基因后的 ATM⁺-AT 细胞其 hTERT mRNA 的表达虽明显下降,但仍有表达,这可能与转染的 ATM 基因为外源性,其 ATM 蛋白激酶的表达量与内源性 ATM 蛋白激酶的表达量存在差异,这种差异可能引起 ATM 下游底物作用的变化而导致其仍可表达 hTERT mRNA。

本研究中,在受到 3 Gy ^{60}Co γ 射线照射后,正常的 GM 细胞出现 hTERT mRNA 的表达,AT 细胞、空载体 AT 细胞和 ATM⁺-AT 细胞 hTERT mRNA 的相对表达量则比未照射时增加。表明电离辐射可诱导细胞 hTERT mRNA 的表达。这与细胞对放射损伤的修复有关。DNA 是射线作用的主要靶点。射线可引起 DNA 链断裂,这种损伤是最严重的细胞毒效应,是细胞致死的主要原因。断裂的染色体高度不稳定,容易发生融合或丢失,直到通过端粒酶在断端合成新的端粒,或者通过重组获得一个已经存在的端粒进行修补,以稳定断裂的染色体^[9]。而 hTERT 是端粒酶活化的关键酶,其表达的增加直接导致端粒酶活性的升高,使其参与 DNA 损伤的修复。有意思的是,在受到相同剂量 ^{60}Co γ 射线照射后,ATM⁺-AT 细胞 hTERT mRNA 表达的增加低于 AT 细胞和空载体 AT 细胞,显示 ATM⁺-AT 细胞对电离辐射导致的 DNA 损伤的修复能力强于 AT 细胞和空载体 AT 细胞,这进一步表明 ATM 基因对 DNA 损伤修复具有重要作用。但同剂量照射后,

ATM⁺-AT 细胞 hTERT mRNA 表达量高于 GM 细胞,表明外源性 ATM 与内源性 ATM 对 DNA 损伤的修复仍有差别,其具体机制有待于深入研究。

致谢 本实验在苏州大学放射医学与公共卫生学院“放射医学与防护”省级重点实验室完成,在此表示感谢。

参考文献

- 1 Nowak R. Science, 1995, **268**(5218): 1700-1701
- 2 Helen H, Richard A. DNA Repair, 2004, **3**(8-9): 1187-1196
- 3 Carl N Sprung, Tracy M Bryan, Roger R Reddel, *et al.* Mutation Research, 1997, **379**(2): 177-184
- 4 Bong-Kyeong Oh, Chan-Hee Lee, Chanil Park, *et al.* Experimental Cell Research, 2004, **298**(2): 445-454
- 5 Counter C M, Meyerson M, Eaton E N, *et al.* Oncogene, 1998, **16**(9): 1217-1222
- 6 Martens U M, Chavez E A, Poon S S, *et al.* Exp Cell Res, 2000, **256**(1): 291-299
- 7 Simon W L, Jennifer Chang, John Prescott, *et al.* Current Biology, 2001, **11**(16): 1240-1250
- 8 罗加林, 曹建平, 朱 巍, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2004, **22**(6): 365-369
- 9 LUO Jialin, CAO Jianping, ZHU Wei, *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2004, **22**(6): 365-369
- 9 Goytisolo F A, Samper E, Martin-Caballero J, *et al.* J Exp Med, 2000, **192**(11): 345-349

Effects of exogenous ATM gene on mRNA expression of human telomerase reverse transcriptase in AT cells induced by irradiation

SHENG Fangjun CAO Jianping LUO Jialin ZHU Wei LIU Fenju FENG Shuang
SONG Jianyuan LI Chong

(School of Radiation Medicine and Public Health, Soochow University, Suzhou 215123)

ABSTRACT The study is to observe effects of exogenous ATM gene on mRNA expression of hTERT (human telomerase reverse transcriptase) in fibroblast cells (AT5BIVA cells) from skin of Ataxia-telangiectasia (AT) patients and to study the regulation of ATM to hTERT. Using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), mRNA expression of hTERT in AT、PEBS7-AT、ATM⁺-AT and GM cells irradiated with 0 and 3Gy of ⁶⁰Co γ-rays were examined respectively. The difference of the mRNA expression of hTERT among AT、PEBS7-AT、ATM⁺-AT and GM cells were analyzed. Difference of the mRNA expression of hTERT between 0Gy and 3Gy groups was analyzed, too. The results showed that the mRNA expression of hTERT in GM cells was negative, but positive mRNA expression of hTERT in AT cells. The mRNA expression of hTERT in ATM⁺-AT cells decreased significantly ($p<0.05$). After exposure to ⁶⁰Co γ-rays, the mRNA expression of hTERT in GM cells was positive, and that in AT、PEBS7-AT、ATM⁺-AT cells was increased ($p<0.05$). The increase of relative expression of hTERT mRNA in ATM⁺-AT cells was lower than that in AT and PEBS7-AT cells respectively ($p<0.05$). It is postulated that exogenous ATM is able to downregulate the mRNA expression of hTERT in AT cells, ionizing radiation can induce the mRNA expression of hTERT in cells and telomerase anticipates the repair of damaged DNA.

KEYWORDS Ataxia-telangiectasia, ATM gene, Human telomerase reverse transcriptase, Ionizing radiation

CLC R811.5, R730.49, Q786, Q345