

曲古菌素 A 增强食管癌细胞系 EC9706 对 X 射线的辐射敏感性

林晓丽¹ 方华圣² 张凤秋² 押辉远³ 秦广雍¹

¹(郑州大学离子束生物工程省重点实验室 郑州 450052)

²(郑州大学物理工程学院 郑州 450052)

³(洛阳师范学院生命科学系 洛阳 471022)

摘要 利用流式细胞仪及荧光定量 PCR 技术, 分别检测细胞凋亡率和 DNA 损伤修复相关基因 mRNA 表达变化, 以探讨曲古菌素 A (Trichostatin A, TSA) 能否在体外增强食管癌细胞对 X 射线的敏感性。结果显示, 辐射前 TSA 的处理显著提高了 X 射线引起的细胞凋亡率 ($P<0.05$); X 射线的单独处理显著上调了基因 *ATM*、*XRCC2* 和 *Lig4*(8Gy 除外)的 mRNA 水平 ($P<0.05$), TSA 单独和 TSA 联合 X 射线都下调了 *ATM*、*XRCC2* 和 *Lig4* 的 mRNA 水平。提示 TSA 很可能通过下调 *ATM*、*Lig4* 和 *XRCC2* mRNA 水平使食管癌细胞对 X 射线敏感。

关键词 曲古菌素 A, 食管癌细胞, X 射线, 辐射敏感性, 凋亡

中图分类号 Q279, Q691, R73-3, R735.1

TSA (Trichostatin A)属于氧肟酸类, 它是链霉素代谢产物, 是一种以纳摩尔浓度特异抑制组蛋白去乙酰基酶 (HDACs) 的抑制剂。在几种类型的白血病和实体瘤中, 研究者发现辐射前 TSA 的处理能显著增强肿瘤细胞对辐射的敏感性^[1]。最近一些研究^[2]共同指出参与 DNA 损伤修复通路相关基因及其相应的蛋白产物, 是癌症治疗的十分有潜力的靶分子, 通过下调它们的表达或抑制它们的活性和功能, 能增强肿瘤对化疗和放疗敏感性。本研究探讨了 TSA 在体外是否增强食管癌细胞 EC9706 对 X 射线的敏感度。

1 材料与方法

1.1 实验材料

RPMI1640 (GIBCO 公司产品), 胎牛血清 (Hyclone, USA), 曲古菌素 A 即 TSA (Trichostatin A) (Sigma, USA) 溶于二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO), 浓度为 50 $\mu\text{m/L}$, -20°C 保存。细胞凋亡检测试剂盒 (北京宝赛生物技术有限公司), TRIzol Reagent (Invitrogen, USA), Real-time

Quantitative PCR 试剂盒 (大连 TaKaRa)。

人食管癌细胞系 EC9706 (esophagealcancer cell line) 购自上海细胞库。将 EC9706 以适当的浓度接种于含有 10% 的胎牛血清培养基中, 在 37°C 、5% 的 CO_2 饱和湿度培养箱中贴壁培养, 每 3~4 d 传代 1 次, 取对数生长期的细胞进行实验。

1.2 实验方法

1.2.1 TSA 的预处理和 X 射线辐射 将处于对数生长期的 EC9706 以 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 的浓度接种于六孔板, 共接 13 个板。细胞培养 36 h 后, 将所接种的细胞随机分成实验与对照两组。实验组, 细胞的培养基分别换成含 50 nmol/L 和 150 nmol/L 的 TSA 的新鲜培养基; 对照组的细胞培养基换为新鲜培养基 (不含 TSA), 继续培养 24 h。TSA 作用 24 h 后, 除去所有组的培养基, 并用无菌 PBS 清洗两遍, 换上新鲜培养基 (不含 TSA)。用能量为 6 MV 的 X 射线辐照这些细胞, 辐照剂量为: 0、2、5 和 8 Gy, 剂量率为 2 Gy/min, 照射面积为 $40\text{ cm} \times 40\text{ cm}$, 德国 SIEMENS 加速器 (郑州大学一附院放射治疗科提供)。整个实验设 12 个处理, 每个处理设 3 个

国家 973 课题 (2004B3719604) 资助

第一作者: 林晓丽, 女, 1982 年 7 月出生, 目前为在读研究生, 研究方向为组蛋白去乙酰化酶抑制剂诱导的肿瘤细胞的辐射增敏机理

通讯联系人: 方华圣, E-mail: fanghsh@zzu.edu.cn

收稿日期: 初稿 2008-05-20, 修回 2008-09-03

重复。未辐照的细胞被同时放置在室温, 以尽可能保证相同条件下的可比性。辐照完毕后, 立即将细胞放回培养箱继续培养。细胞培养 24 h 后, 收集细胞分别进行流式细胞仪分析和总 RNA 的提取。

1.2.2 流式细胞仪分析细胞凋亡 用 0.25% 的胰酶分别消化对照组和处理组细胞, 然后依据细胞凋亡检测试剂盒说明书, 调整待测细胞的浓度为 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6 / \text{mL}$; 取 1 mL 细胞, 4°C 离心 10 min, 弃上清, 接着进行两次 PBS 洗涤, 最后加入 10 μL 的 AnnexinV-FITC 和 5 μL 的 PI 对细胞进行荧光染色。染色结束后, 加入 300 μL 的 Binding Buffer,

立即将样品用 FACS Vantage SE 型流式细胞仪 (Becton Dickinson, USA) 在 488 nm 处进行检测。荧光信号由 CellQuest 软件收集并分析。

1.2.3 细胞总 RNA 的提取和实时荧光定量 PCR (Real time quantitative PCR) 分析 参照 TRIzol Reagent 的说明书提取细胞总 RNA, 提取的总 RNA 融解于无 RNase 的灭菌双蒸水中; 在确保所提 RNA 有较好的纯度和完整性之后, 按照 TaKaRa 的反转录试剂盒对 RNA 样品进行反转录。PCR 反应所用的引物由 TaKaRa 设计并合成, 引物序列见表 1。

Table 1 Primer sequences

Gene	Primers sequences	
	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
RPL13A	CCTGGTGCTTGATGGTCGAG	AAATGTTGATGCCTTCACAGCGTA
ATM	ACTATCCCAATACACTGCTGGAGA	TTTGAGCAACTGACTGGCAAAC
XRCC2	GGGCGATGTGTAGTGCCCTTC	GCTGTTAGGTGATAAAGCATTTCTG
Lig4	CAGTATGTTTCGACGCCACACC	TGCTCCATGAAACCGAAGCTC

Real Time PCR 反应选用 ABI 7500 Real-Time PCR System 进行。每个样品的 PCR 反应均重复 3 次。本实验选用 RPL13A (Homo sapiens ribosomal protein L13a) 基因作为实验的内参^[3], 内参和目的基因在不同的反应管中进行反应。

PCR 反应液 (20 μL) 按照 TaKaRa 的 Real Time qPCR 试剂盒的说明配制, 反应条件: (1) 95°C , 20s 进行 1 个循环; (2) 95°C 反应 10 s, 60°C 反应 40 s, 共进行 40 个循环。SYBR Green I 只有与双链结合后才能发出荧光, 通过检测反应液中 SYBR Green I 的荧光强度, 达到监控 PCR 产物扩增的目的。

1.2.4 统计分析 实验中的每个处理均设 3 个重复, 每个样品重复 PCR 4 次, 所有实验数据均以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。统计分析采用 SPSS 13.0 统计软件, 细胞凋亡结果采用多因素方差分析, 不同处理样品的同一基因的 mRNA 水平的比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 TSA 的预处理联合 X 射线对食管癌细胞 EC9706 凋亡率的影响

食管癌细胞 EC9706 经不同方式处理后, 用流式细胞仪检测细胞凋亡率, 显著性分析是与未处理对照样品进行比对。细胞凋亡率结果分析 (见图 1) 显示: 单因素 TSA、X 射线的单独作用对细胞凋亡率的影响显著 ($P < 0.05$), 而 TSA 和 X 射线的联合作

用对细胞凋亡率的影响极显著 ($P < 0.01$); 辐射前 TSA 的处理显著提高了 X 射线引起的食管癌细胞的凋亡率, 而且当 X 射线的剂量大于或等于 2 Gy 时, 50 nmol/L TSA 的预处理引起的细胞凋亡率大于 150 nmol/L TSA 的。细胞凋亡率是评价肿瘤细胞对治疗手段是否敏感的一个重要标志, 凋亡率越高就越敏感; 因此, 由本研究结果可知: 较低浓度 (50 nmol/L) TSA 预处理的肿瘤细胞对辐射更加敏感, 这和 Flatmark 等^[4]研究得出的结论相一致。

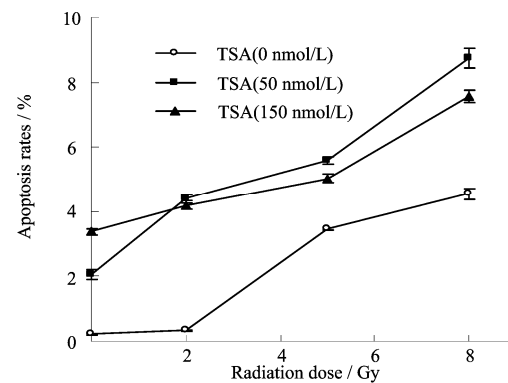


Fig. 1 Apoptosis rates of TSA Pre-treated EC9706 cells associated with different X ray doses ($n=3$, $\bar{X} \pm s$)

2.2 TSA 的预处理联合 X 射线对食管癌细胞 EC9706 的 DNA 损伤修复相关基因表达的影响

根据 Livak 推荐的方法^[5], 来计算每个未知样品的基因表达水平; 这一方法用到的公式 Fold

change = $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 中的 $\Delta\Delta C_T = [C_T \text{ GI} \text{ (未知样品)} - C_T \text{ RPL13A} \text{ (未知样品)}] - [C_T \text{ GI} \text{ (对照样品)} - C_T \text{ RPL13A} \text{ (对照样品)}]$, 其中 GI 指的是目的基因, 对于未经处理的对照组, $\Delta\Delta C_T = 0$, $2^0 = 1$ 。不同处理组的相关基因表达量见图 2

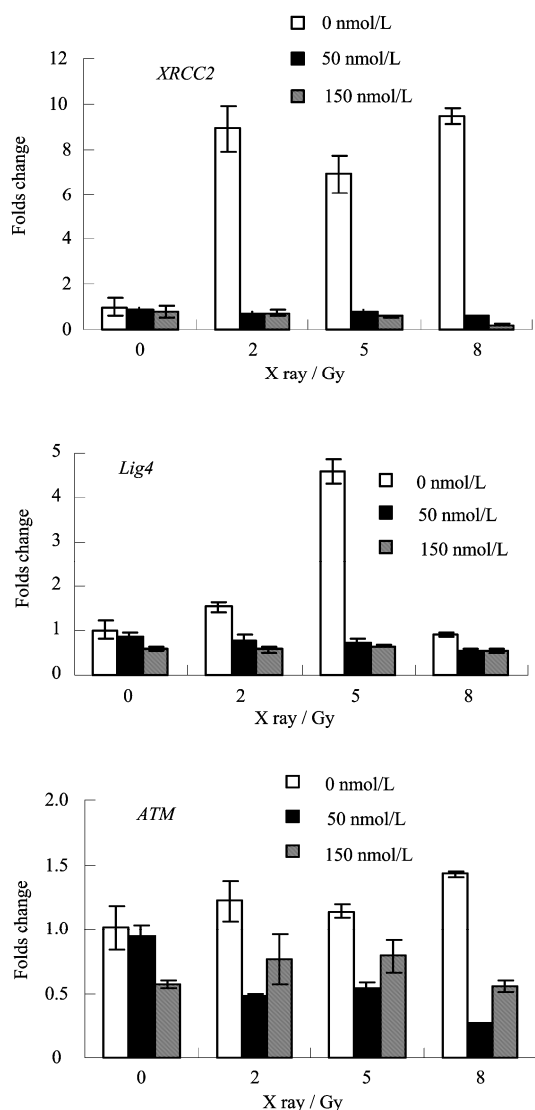


Fig. 2 Quantitative RT-PCR analysis of *XRCC2*, *Lig4* and *ATM* genes following trichostatin A (TSA) and X ray treatment individually or in combination in EC9706 cells ($n=4$, $\bar{X} \pm s$)

2.2.1 人类 X 射线交叉互补修复基因 *XRCC2* mRNA 表达量变化 与对照相比, X 射线辐射极显著地上调了基因 *XRCC2* mRNA 水平 ($P<0.01$), 其中 8 Gy 的 X 射线上调 mRNA 水平的幅度最大。无论是单一的 TSA, 还是 TSA 联合 X 射线都下调了基因 *XRCC2* mRNA 水平。相比于对照, 150nmol/L 的 TSA 联合 8 Gy 的 X 射线的下调作用是显著的 ($P<0.05$), 且是下调幅度最大的。与 X 射线的单

独处理相比, TSA 联合 X 射线都极显著地下调了基因 *XRCC2* mRNA 水平 ($P<0.01$)。

2.2.2 共济失调毛细血管扩张症突变基因 *ATM* mRNA 表达量变化 X 射线的单独处理都上调了 *ATM* 基因的 mRNA 水平, 其中 8 Gy 的 X 射线的上调作用极显著 ($P<0.01$)。与对照相比, TSA 的单独处理下调了 *ATM* 基因的 mRNA 水平。与 X 射线的单独处理相比, TSA 联合 X 射线极显著下调了基因 *ATM* 的 mRNA 水平 ($P<0.01$), 其中 50nmol/L 的 TSA 联合 8 Gy 的 X 射线下调基因 *ATM* mRNA 水平的幅度最大, 为未处理样品的 0.27 倍。

3.2.3 DNA 双链断裂非同源性末端连接酶基因 *Lig4* mRNA 表达量变化 相比于对照, TSA 的单独处理下调了 *Lig4* mRNA 的水平; *Lig4* mRNA 水平被 2 Gy 和 5 Gy 的 X 射线的单独处理极显著上调了 ($P<0.01$), 被 8 Gy 的 X 射线轻微下调了; 与 X 射线的单独处理相比, TSA 联合 X 射线极显著下调了 *Lig4* 基因的 mRNA 水平 ($P<0.01$), 50 nmol/L 的 TSA 联合 8 Gy 的 X 射线下调 *Lig4* mRNA 水平的幅度最大, 为未处理样品的 0.54 倍。

3 讨论

大量的研究表明细胞的 DNA 损伤修复能力是细胞辐射敏感性的主要决定因素^[6]。DNA 是电离辐射作用的主要“靶”之一, 辐射产生的高活性化学自由基造成碱基及糖的损伤, 进而导致 DNA 单链断裂 (Single-strand breaks, SSBs) 和双链断裂 (Double-strand breaks, DSBs)。在 DNA 发生损伤的同时, 通过信号分子对损伤信号的传递, 细胞内 DNA 损伤的修复系统立即启动。细胞放射敏感性的增加与不易修复的 DNA 损伤密切相关。

DNA 损伤修复有两种途径^[7]: 同源重组 (Homologous recombination, HR) 和非同源性末端连接 (Nonhomologous end joining, NHEJ), 两种途径在高等真核生物中都具有重要的意义并存在重叠。*XRCC2* 基因编码的蛋白是同源重组修复的重要元件, *Lig4* 基因在 NHEJ 修复通路中起关键作用。*Lig4* 或 *XRCC2* 功能缺陷的细胞对辐射高度敏感^[8]。*ATM* 缺陷或功能低下的细胞因其在 DNA 双链断裂修复方面的缺陷而表现出对辐射的高度敏感^[9]。因此, 检测 TSA、X 射线单独或联合处理对这几个基因表达的影响, 具有重要意义。

辐射前 TSA 的处理提高辐射引起凋亡率的主要原因很可能是: TSA 通过促使组蛋白乙酰化, 而使染色质结构由致密变得疏松, 使 DNA 更易受到辐射的损伤, 从而增强了单位剂量引起的损伤; 由

于细胞自身的修复能力是有限的, 当 DNA 损伤过多时, 必然会使这些损伤不能得到及时、完整的修复, 这终将导致细胞的突变或凋亡。

HDACI 改变染色质的构型, 同参与 DNA 损伤应答通路的关键信号转导蛋白相互作用, 并调节 DNA DSBs 修复通路关键基因的转录, 从而促使肿瘤细胞对辐射和其它一些化疗药物敏感^[1]。在本研究中, TSA 下调了基因 *XRCC2*、*ATM* 和 *Lig4* 的 mRNA 水平, 这很可能与 TSA 通过核心组蛋白的乙酰化来改变染色质的构型, 调节 DNA DSBs 修复通路关键基因的转录密切相关; 同时 TSA 也很可能在一定程度上削弱了这些基因的 DNA 损伤修复能力, 放慢了 DNA 的修复速率。

ATM 基因编码的 *ATM* 激酶是 DNA DSBs 的感应分子, 在 DNA 损伤传导通路中起中枢调控作用, 它启动 DNA 损伤反应信号级联, 并能调节在 DNA 损伤修复应答中起关键作用基因的转录^[10,11]。本研究中, 很可能是单纯的 X 射线辐射引起的 DNA DSBs 刺激了 *ATM* 表达的上调, 并激活下游参与 DNA DSBs 应答通路的因子, 启动 DNA 损伤反应信号级联, 进一步调节 *XRCC2* 和 *Lig4* 的表达量, 但基因表达量与辐射剂量之间不成线性依赖关系; 8Gy 的 X 射线上调基因 *ATM* 和 *XRCC2* mRNA 水平的幅度最大, 这提示: 8 Gy 很可能是一个影响细胞辐射敏感性的关键剂量点, 它引起的染色体结构的改变更加刺激了 *XRCC2* 和 *ATM* 基因表达的上调。从另一个角度来看, 肿瘤细胞可能主要利用这些基因的修复功能来抵抗 X 射线的损伤。此外, 与基因 *ATM* 和 *XRCC2* 不同, *Lig4* 的 mRNA 水平被 8 Gy 的 X 射线轻微下调, 这是一个特别的现象, 其中的机理有待研究。

本研究结果表明, 与 X 射线的单独处理相比, 无论是单纯的 TSA 还是 TSA 联合 X 射线都极显著下调了基因 *XRCC2*、*Lig4* 和 *ATM* mRNA 水平; 而且, 从对这些基因的 mRNA 水平下调的幅度上来看, 这两种处理方式差异很小。其中的原因很可能是: 辐射前 TSA 的处理通过乙酰化组蛋白, 进而改变染色质的构型抑制了这几个基因的表达, 而且显著削弱了由 X 射线辐射引起的这几个基因表达的上调; 同时, 主要是 TSA 而不是 X 射线对这几个基因 mRNA 水平的下调起决定作用。本研究中, 50nmol/L、150 nmol/L 的 TSA 分别联合 8 Gy 的 X 射线, 下调相应 DNA 损伤修复基因 mRNA 水平的幅度最大; 此外, 这两种处理方式所引起的食管癌细胞的凋亡率, 也是在各自的处理组中最高的; 将基因表达和细胞凋亡结合起来可以推测: 与其它处

理方式相比, 这两种处理方式下的食管癌细胞的修复能力很可能是最弱的。

Munshi 等^[12]的研究结果表明, 一种 HDAC 酶抑制剂 NaB 通过下调包括 *XRCC2*、*Lig4* 和 *ATM* 在内的 DNA 损伤修复基因的 mRNA 水平, 进而削弱其 DNA 损伤修复能力, 使两种恶性黑色素瘤细胞对辐射敏感。与以上研究结果相似, 本研究中, TSA 的辐射前处理显著提高了 X 射线引起的食管癌细胞的凋亡率, 同时 TSA 的辐射前处理显著降低了由 X 射线辐射显著上调的基因 *XRCC2*、*Lig4* 和 *ATM* 的 mRNA 水平; 由此, 可以推测 TSA 是通过下调这些基因的表达水平, 来抑制它们的 DNA 损伤修复能力, 进而导致一部分 DNA 损伤不能得到及时有效的修复而引发细胞凋亡。

本研究结果提示: TSA 很可能通过抑制 EC9706 细胞的 DNA 修复能力使其对 X 射线敏感, 并且再次证明两种 DNA 损伤修复途径存在重叠。本研究为提高临床 X 射线治疗肿瘤效果提供了一些线索。

参考文献

- 1 Karagiannis T C, El-Osta A. *Oncogene*, 2006, **25**(28): 3885-3893
- 2 Lieberman H B. *Current Med Chem*, 2008, **15**(4): 360-367.
- 3 Mogal A, Abdulkadir S A. *Mol Cell Probes*, 2006, **20**(2): 81-86
- 4 Flatmark K, Nome R V, Folkvord S, *et al.* *Radiation Oncology*, 2006, **1**: 25
- 5 Livak K J, Schmittgen T D. *Method*, 2001, **25**(4): 402-408
- 6 Li L, Story M, Legerski R J. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001, **49**(4): 1157-1162
- 7 Romeijn R J, Gorski M M, van Schie M A, *et al.* *Genetics*, 2005, **169**(2): 795-806
- 8 Hinz J M, Yamada N A, Salazar E P, *et al.* *DNA Repair*, 2005, **4**(7): 782-792
- 9 Kuhne M, Riballo M, Rief N, *et al.* *Cancer Res*. 2004, **64**(2): 500-508
- 10 Zgheib O, Huyen Y, DiTullio R A Jr, *et al.* *Radiother Oncol*, 2005, **76**(2): 119-22
- 11 冯爽, 曹建平, 朱巍, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2006, **24**(2): 115-119
FENG Shuang, CAO Jianping, ZHU Wei, *et al.* *J Radiat Res Radia Process*. 2006, **24**(2): 115-119
- 12 Munshi A, Kurland J F, Nishikawa T, *et al.* *Clin Cancer Res*. 2005, **11**(13): 4912-4922

Radio-sensitization of esophageal cancer EC9706 cells to X ray by histone deacetylase inhibitor Trichostatin A

LIN Xiaoli¹ FANG Huasheng² ZHANG Fengqiu² YA Huiyuan³ QIN Guangyong¹

¹(Henan Province Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

²(College of Physical Science and Technology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

³(College of Life Sciences, Luoyang Normal University, Luoyang 471022, China)

ABSTRACT Cell apoptosis and the expression of DNA damage repair-related genes *XRCC2*, *ATM* and *Lig4* were detected separately by flow cytometry analysis and real-time fluorescence quantitative (RT-PCR), in order to investigate the effect of Trichostatin A(TSA)pre-treatment on the radiosensitivity of esophageal cancer EC9706 cells to X ray in vitro. The results indicate that pre-irradiation exposure to TSA enhances cell apoptotic rate by X ray markedly ($P<0.05$) and the mRNA levels of *XRCC2*, *ATM* and *Lig4*(except 8Gy)are up-regulated by X ray individually($P<0.05$). TSA alone and TSA in combination with X ray all reduce mRNA levels of *XRCC2*, *ATM* and *Lig4*. In conclusions, TSA may radio-sensitize EC9706 cells to X ray by reducing mRNA levels of *XRCC2*, *ATM* and *Lig4*.

KEYWORDS Trichostatin A (TSA), Esophagealcancer cell, X ray, Radio-sensitivity, Apoptosis

CLC Q279, Q691, R73-3, R735.1