

# Kras 基因与辐射诱发小鼠胸腺淋巴瘤的相关性研究

于雷 孙世龙 方芳 刘永哲 巩宏伟 石磊 鞠桂芝

(吉林大学公共卫生学院 长春 130021)

**摘要** 为探讨 *kras* 基因与辐射诱发小鼠胸腺淋巴瘤的关系, 先采用 X 射线照射 BALB/c 小鼠建立胸腺淋巴瘤模型, 取胸腺淋巴瘤和正常胸腺, 分别提取总 RNA、合成 cDNA 和提取总蛋白, 采用实时定量 PCR (Quantitative real-time PCR, QRT-PCR) 和 Western blot 法对 *kras* 基因 mRNA 和蛋白表达分别进行检测。结果表明, 胸腺淋巴瘤 *kras* 基因 mRNA 表达水平 ( $2.66 \pm 1.51$ ) 比正常胸腺组织 ( $0.93 \pm 0.30$ ) 明显增高, 两组比较有统计学意义 ( $p < 0.05$ ), 胸腺淋巴瘤 *kras* 基因蛋白表达水平也高于正常胸腺组织。结果提示, *kras* 基因与辐射诱发小鼠胸腺淋巴瘤密切相关, 可能是辐射致癌的一种易感基因。

**关键词** 胸腺淋巴瘤, *kras* 基因, 电离辐射, 实时定量 PCR

**中图分类号** Q345, R733

电离辐射是一个确定的致癌因素, 其引起肿瘤的发生过程中伴有遗传学变化, 包括原癌基因的激活和抑癌基因的失活、细胞增殖失控、基因剂量和染色体缺失与重排等, 同时也会引起表观遗传学改变<sup>[1]</sup>, 使某些关键基因的表达改变而影响生物学功能。但辐射致癌的具体机制目前尚不十分清楚。本实验通过建立辐射诱发小鼠胸腺淋巴瘤模型, 采用实时定量 PCR 技术和 Western blot 方法对胸腺淋巴瘤 *kras* 基因 mRNA 和蛋白表达变化分别进行检测, 以探讨 *kras* 基因与辐射诱导胸腺淋巴瘤的相关性, 为进一步阐明辐射致癌机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 建立小鼠胸腺淋巴瘤模型

采用近交系 BALB/c 小鼠 30 只, 雌性, 体重 ( $18 \pm 2$ ) g, 由吉林大学基础医学院实验动物中心提供, 应用国产 X 射线深部治疗机进行全身照射, 剂量率 0.287 Gy/min, 1.75 Gy/次, 1 次/周, 共 4 次。6 个月后, 将鼠处死, 取部分胸腺组织作病理, 以证明是否成瘤。

### 1.2 *kras* mRNA 的检测

**1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成** 取辐射诱发小鼠胸腺淋巴瘤和正常胸腺各 6 个样品, 按 Trizol 试剂说明书中的操作步骤提取总 RNA, 然后依据逆转

录试剂盒 (RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit) 提供的操作说明, 将 mRNA 逆转录成 cDNA, 置  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.2.2 引物设计** 采用 Primer premier 5 软件设计引物, *kras* 基因上游引物: 5'-CTGAAGATGTGCCTATGG-3', 下游引物: 5'-GAGGTCTCAATGAACGGA-3', 扩增产物长度为 118 bp, 应用  $\beta$ -actin 作内参, 上游引物: 5'-ATATCGCTGCGCTGGTCGTC-3', 下游引物: 5'-AGGAGTCCTTCTGACCCATTC-3', 扩增产物长度为 147 bp, 由大连宝公司合成。

**1.2.3 实时定量 PCR** 应用 Mx3000P 实时荧光定量 PCR 仪 (Stratagene, 美国) 进行, 25  $\mu\text{L}$  反应体系中包括: cDNA 2  $\mu\text{L}$ , 2  $\times$  SYBR Green PCR Master Mix (ABI 公司, 美国) 12.5  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$  (10 pmol/L), 去离子水 9.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序:  $95^{\circ}\text{C}$ 、10 min,  $95^{\circ}\text{C}$ 、30 s,  $58^{\circ}\text{C}$ 、40 s,  $72^{\circ}\text{C}$ 、40 s, 40 个循环。每个样品均作 3 个重复反应。

**1.2.4 PCR 产物的确定分析** 将所扩增的 PCR 产物同时进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳和溶解曲线分析, 以确定扩增产物的准确性。

### 1.3 *kras* 蛋白的检测

采用单去污裂解法提取总蛋白, 采用考马斯亮蓝法进行蛋白定量, 取 30  $\mu\text{g}$  处理后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳后, 电转移至 PVDF 膜上, 5%

国家自然科学基金项目 (30670630) 和吉林大学研究生创新基金项目 (20091032) 资助

第一作者: 于雷, 男, 1977 年 9 月出生, 2006 年于吉林大学获硕士学位, 讲师, 主要从事辐射肿瘤学研究

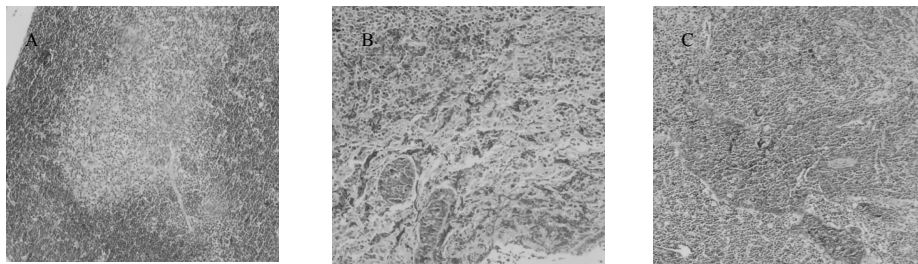
通讯作者: 石磊, E-mail: shilei0242002@yahoo.com

收稿日期: 初稿 2009-09-14, 修回 2009-11-15

脱脂奶粉 4℃ 过夜封闭后, 与 1:400 稀释后的一抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 15 min/次, 然后与 1:1000 稀释后的二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 15 min/次, 用 Luminol Reagent (Santa cruz biotechnology) 发光显影, 同时用  $\beta$ -actin 作内参。图像扫描后, 用 Quantity One 图像分析软件分析, 用 kras 与相应  $\beta$ -actin 灰度值之比表示相对表达量。

#### 1.4 统计学分析

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 SPSS14.0 统计软件, 采用  $t$  检验进行统计分析。



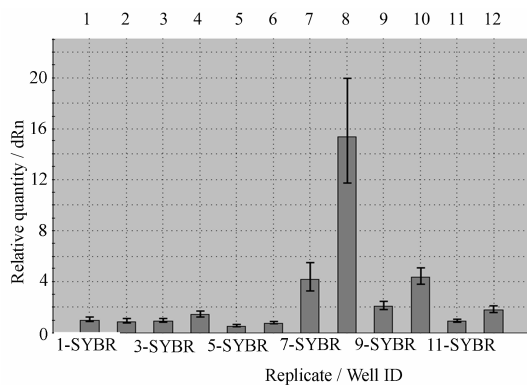
**Fig.1** The histological changes of thymus tissue (HE,  $\times 100$ ) after irradiation  
A: Normal thymus; B: Thymic lymphomas; C: Thymic lymphomas

#### 2.3 PCR 产物的确定分析

熔解曲线分析显示, 熔解温度均一, 峰的形状也较锐利, 说明两对引物都扩增出了特异性的产物。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 产物条带与目的条带大小一致。这些表明实验中所用的实时检测系统能分别扩增出各自特异性的产物。

#### 2.4 实时定量 PCR 检测结果

实时定量 PCR 采用目的基因拷贝数比值来评价 kras 基因 mRNA 的表达水平, 结果显示, 辐射诱发胸腺瘤后肿瘤组织中 kras 基因 mRNA 表达水平比正常胸腺组织明显增高 (见图 2), 胸腺淋巴瘤



**Fig.2** Relative quantity chart of expression of kras mRNA in normal thymus and thymic lymphoma 1-6:Normal thymus; 7-12: Thymic lymphoma

## 2 结果

### 2.1 小鼠胸腺组织形态学观察

光镜下小鼠胸腺组织见图 1。正常胸腺可见组织形态规则、皮质和髓质界限清晰 A; X 线照射诱发胸腺淋巴瘤初期可见皮质和髓质分界不清, 胸腺外皮质区出现癌巢 B; 继之, 正常胸腺组织结构消失, 肿瘤组织完全取代胸腺组织 C。

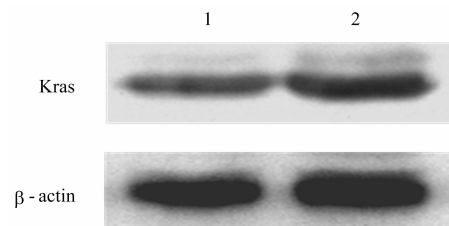
### 2.2 X 线照射后小鼠胸腺淋巴瘤的发生率

13/27 = 48.15% (3 只小鼠死亡)。

组 kras 基因 mRNA 相对表达量为  $(2.66 \pm 1.51)$ , 正常胸腺组织 mRNA 相对表达量为  $(0.93 \pm 0.30)$ , 两组比较有统计学意义 ( $p < 0.05$ )。

### 2.5 Western blot 结果

正常胸腺组织 kras 基因相对表达量为 0.63, 胸腺淋巴瘤 kras 基因相对表达量为 0.89, 升高近 1.41 倍 (见图 3)。



**Fig.3** The expression of kras in normal thymus and thymic lymphoma by Western blot: 1. Normal thymus; 2. Thymic lymphoma

## 3 讨论

电离辐射可引起细胞核 DNA 分子的严重损伤, 包括核苷碱基损伤、交联、DNA 单链和双链断裂, 其中双链断裂是导致各种生物效应的关键基因毒性损伤<sup>[2]</sup>, 它能引起细胞内 DNA 错配损伤修复反应, 使细胞增殖失控<sup>[3]</sup>。

Kras 基因是 ras 癌基因家族成员之一, 编码 p21

蛋白,其在信号传导过程中起重要作用,当 p21 蛋白受一些因子诱导激活后,就将细胞膜表的信号传递到细胞内效应器上,同时自身受 GTP 酶活蛋白控制的 GTPase 水解,从活性状态恢复到非活性状态<sup>[4]</sup>。当 Kras 基因突变而发生异常时, GTPase 活性降低, p21 与 GTP 牢固结合而不被 GTPase 水解,一直处于激活状态,持续刺激细胞增殖,导致肿瘤发生<sup>[5]</sup>。

研究发现,人类许多肿瘤如胰腺癌、肺癌、结肠癌等都发现了 p21 的高表达<sup>[6-8]</sup>,这些组织由一系列不同分化的细胞类型组成,但它们有共同的祖细胞,均来自相同的原始胚层——内胚层,突变活化的 Kras 可能在内胚层祖细胞或干细胞水平上发挥致癌活性<sup>[9]</sup>。Kim 等<sup>[10]</sup>研究也发现, Kras 活化可促进干细胞/祖细胞群增殖,后者可获得其它突变,而促进肿瘤进展,因此, Kras 基因在肿瘤发生中可能作为启动事件。Kras 活化还可通过上调 VEGF 的表达而促进肿瘤血管新生和发展,在肿瘤的生长和转移中起着重要的作用<sup>[11]</sup>。

本研究结果显示,辐射诱发胸腺淋巴瘤中 kras 基因 mRNA 和蛋白表达均高于正常胸腺组织,这表明电离辐射诱发癌基因 kras 高表达可能是辐射致癌的原因之一,但电离辐射激活 kras 基因的机制以及该基因在胸腺淋巴瘤发生过程中的作用仍值得深入探讨。

## 参考文献

- 1 Wichai P, Narisorn K, Chutipa P, *et al.* Nucleic Acids Res, 2008, **36**(11): 3667-3675
- 2 周莉薇, 陈晓明, 张建国, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2008, **26**(6): 321-325  
ZHOU Liwei, CHEN Xiaoming, ZHANG Jianguo, *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2008, **26**(6): 321-325
- 3 Vaish M, Mittal B. Indian J Exp Biol, 2002, **40**(9): 989-994
- 4 Malumbres M, Barbacid M. Nat Rev Cancer, 2003, **3**(6): 459-465
- 5 Quinlan M P, Quatela S E, Philips M R, *et al.* Mol Cell Biol, 2008, **28**(8): 2659-2674
- 6 Sarah E, Sarah O, Adrian P, *et al.* Cancer Biol Ther, 2006, **5**(8): 928-932
- 7 Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, *et al.* Nature, 2001, **410**(6832): 1111-1116
- 8 Minh D, Christine E, Anthony N, *et al.* Nat Genet, 2008, **40**(10): 1240-1244
- 9 Quinlan M, Quatela S, Philips M, *et al.* Mol Cell Biol, 2008, **28**(8): 2659-2674
- 10 Kim C, Jackson E, Woolfenden A, *et al.* Cell, 2005, **121**(6): 823-835
- 11 Khadija E, Cercina O, Emmanuelle S, *et al.* Mol Biol Cell, 2007, **18**(11): 4648-4658

## Study on relevance between kras gene and thymic lymphomas of mice induced by X-rays

YU Lei SUN Shilong FANG Fang LIU Yongzhe GONG Hongwei SHI Lei JU Guizhi

(School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China)

**ABSTRACT** In order to investigate the relation between kras gene and thymic lymphomas of mice induced by X-rays, we made the thymic lymphomas model of BALB/c mice exposed to X-rays, so as to extract total RNA and synthesize cDNA and total protein from both of thymic lymphomas and normal thymus tissue. The mRNA and protein expression of kras gene in thymic lymphomas and normal thymus were detected by QRT-PCR and Western blot, respectively. The results show that mRNA expression of kras gene in thymic lymphomas ( $2.66 \pm 1.51$ ) is significantly higher ( $p < 0.05$ ) than that of normal thymus tissue ( $0.93 \pm 0.30$ ); and protein expression of kras gene in thymic lymphomas is higher than that of normal thymus tissue. The results suggest that kras gene might be relative to thymic lymphomas induced by X-rays, and it might be a susceptibility gene to radiation carcinogenesis.

**KEYWORDS** Thymic lymphomas, Kras genes, Ionizing radiation, Quantitative real-time PCR

**CLC** Q345, R733