

电离辐射对肿瘤细胞端粒酶抑制作用的研究 *

朱涵能 莫素珍 熊思东 程文英

(上海医科大学放射医学研究所 上海 200023)

摘要 运用多聚酶链扩增反应 (PCR) 及端粒重复扩增方法 (TRAP) 法检测肿瘤细胞 HeLa、A431 和 KB 在电离辐射后 hEST2 功能区片段表达和端粒酶活性的变化。结果表明: 肿瘤细胞 hEST2 功能区片段表达和端粒酶活性呈剂量依赖性下降; hEST2 功能区片段的 PCR 法测定结果与 TRAP 法相符合; 提示电离辐射对端粒酶活性的抑制是肿瘤放射治疗的重要机制之一。端粒酶活性检测可能成为评估电离辐射对肿瘤杀伤作用的新指标。

关键词 电离辐射, 端粒酶, PCR, TRAP

中图分类号 R818

放射治疗是治疗肿瘤病人的主要方法之一, 治疗后肿瘤细胞存活状况是肿瘤复发的重要原因。如何评估电离辐射对肿瘤细胞的杀伤水平是医务工作者长期关心的问题, 虽然有一些生物标志物被用于检测残余肿瘤细胞活性^[1,2]但还没有一个统一的标志物适用于各类肿瘤。

端粒酶是一种核酸蛋白复合体, 能以其 RNA 亚基为模板, 在 DNA 复制时^[3]于染色体的 3'-端合成端粒 DNA 重复序列, 以解决“染色体末端端粒复制问题”, 使细胞永生代化。运用端粒重复扩增方法 (TRAP) 检测端粒酶活性, 发现 90% 人肿瘤细胞端粒酶都有活性, 呈阳性^[4~6], 而绝大多数正常细胞中则均无活性。端粒酶活性与端粒酶催化亚基基因 hEST2、hTERT 和 hTERT 表达有着紧密的相关性^[7,8]。Pandita 等^[9]的工作表明端粒酶的活性水平与细胞癌变过程的不同时期相密切联系。因此, 端粒酶活性检测不仅是临床诊治的一个重要标志, 而且很可能是辐射治疗后评估肿瘤复发的潜在指标。本实验运用 RT-PCR 半定量方法及 TRAP 法观察宫颈癌细胞 (HeLa)、表层癌 (A431) 和口腔表皮样癌细胞 (KB) 分别在 2、4、8Gy 照射后, hEST2 功能区片段和端粒酶活性变化情况, 以及辐射后端粒酶 RNA 水平和蛋白质水平变化规律。

1 材 料 和 方 法

1.1 细胞培养与照射条件

HeLa、A431 和 KB 细胞株购于中国科学院细胞所, 培养于含 10% 小牛血清的 1640 培养液中, 37℃ 培养箱中含 5%CO₂。指数生长期细胞用于实验。用放射医学研究所 ¹³⁷Cs 源室温照射, 剂量为 2、4、8Gy, 剂量率为 1.12Gy/min。

1.2 半定量 PCR 分析 hEST2 功能区片段表达

肿瘤细胞电离辐射后 24h 内用于实验, 用无钙镁的预冷 PBS 冲洗细胞 3 次, 用酚-氯仿-异硫氰酸胍一步法抽提细胞总 RNA, 紫外分光光度计和电泳分析 RNA 的含量和纯

* 上海市科委攻关项目资助 (9741190401)

收稿日期: 初稿 1999-11-30, 修回 2000-01-24

度。取 $4\mu\text{g}$ 总 RNA, 采用逆转录试剂盒以 oligo(dT)15 为引物合成 cDNA。PCR 反应总体积为 $50\mu\text{L}$, 取逆转录产物 $5\mu\text{L}$, 同时进行 GAPDH 和 hEST2 功能区片段平行扩增, 以看家基因 GAPDH 作为内对照。hEST2 功能区片段引物为: 引物 1-5'-CGGAATTCCTGGCCAA GTTCCTGCAC-3'; 引物 2-5'-CAGAACGCCGACTTCACACTTAAGGC-3'。GAPDH 引物为: 引物 1, 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'; 引物 2, 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'。扩增条件: 先 95°C , 变性 5min; 之后 95°C , 变性 45s; 57°C 退火 45s; 72°C , 延伸 90s; 循环 29 次。然后 95°C 变性 45s; 57°C 退火 45s, 72°C , 延伸 10min, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后摄影, 然后进行吸光度扫描, 并以 GAPDH 校正作相对量分析, 以两者之积分吸光度的比值表示表达强弱, 以对照组的比值作为标准 1.0。

1.3 端粒重复扩增法

根据 Kim^[4] 报道的 TRAP 方法, 检测癌细胞体及正常组织中的端粒酶活性。取 $5 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$ 个细胞或 50~100mg 组织经裂解液裂解, 15000r/min 离心 20min, 分别加入 TRAP 缓冲液, 端粒酶引物 TS 和 CX, 94°C , 50min 延长引物, 按下列条件进行 PCR 扩增, 30°C 30s, 50°C 30s, 72°C 90s, 循环 35 次, 然后 72°C 10min, PCR 产物经 12.5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶分析, 电泳条件为 $0.5 \times \text{TBE}$ 缓冲液, 电压 120V, 每次实验均设阳性和阴性对照。阳性对照即为药合中端粒酶标准品; 阴性对照为 85°C 高温处理, 以防假阳性。硝酸银染色, 振荡显色 5~10min, 即可显示 DNA 条带。

色 5~10min, 即可显示 DNA 条带。

2 结 果

2.1 人端粒酶 hEST2 功能区片段

图 1 表明 RT-PCR 扩增产物, 琼脂糖凝胶电泳后的条带, 第 2 条条带为 cDNA 产物扩增条带, 第 3 条为以第 2 条条带产物为模板扩增的条带, 表明此条带为所需条带, 证实了其正确性。

2.2 电离辐射对人端粒酶 hEST2 功能区片段表达的影响

图 2 可见, HeLa、KB 和 K431 细胞体在电离辐射后, 1.3kb 端粒酶 hEST2 功能区片段表达随辐射剂量的增加而减少, 并具有剂量依赖性。

2.3 电离辐射对肿瘤细胞端粒酶活性的影响

图 3 表明, 根据 TRAP 法, 电泳 6bp 条带的浓度深浅可反映端粒酶活性高低, 电离辐射可使 HeLa、KB 和 A431 肿瘤细胞体的端粒酶活性下降, 并随辐射剂量的增高而显著减少。阳性和阴性对照正常, 表明实验条件和样品质量可靠。

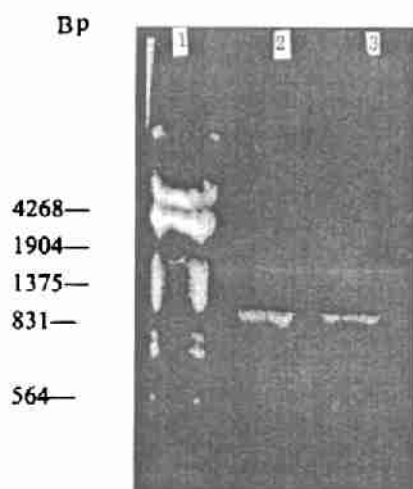


Fig.1 Ethidium bromide-stained agarose gel of telomerase reverse transcriptase fragment

From left of right, Lane 1: size markers, numbers on the left indicate in bp. Lane 2: product of 1.3kb telomerase reverse transcriptase fragment amplified by PCR from total RNA. Lane 3: the product of 1.3kb telomerase transcriptase fragment by PCR which use extracted 1.3kb fragment as template

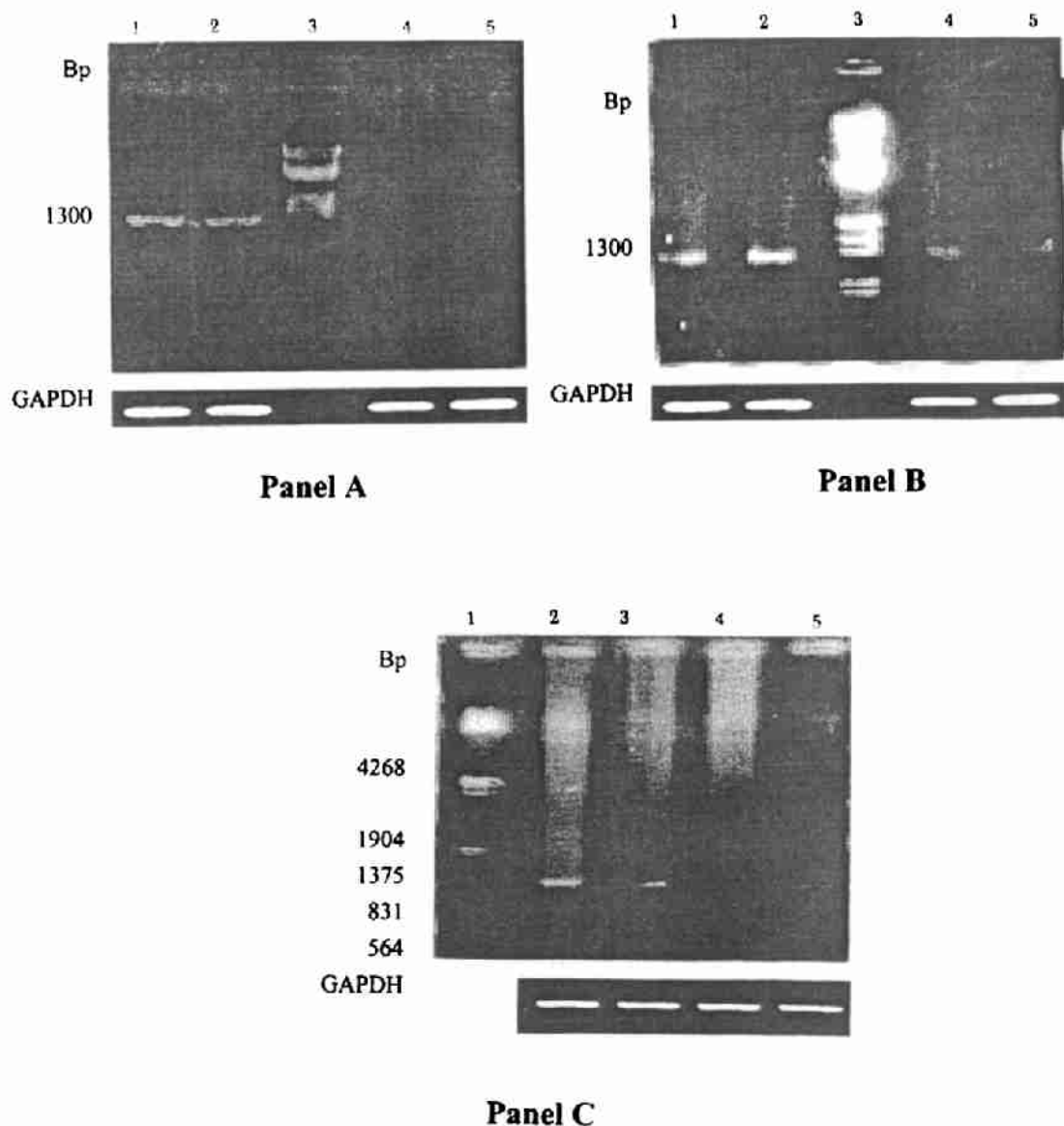


Fig.2 Shows an ethidium bromide-stained gel. the expression of 1.3kb telomerase RT fragment from HeLa, KB and K431 cell lines decreased after exposure to the increasing dosage of radiation.

Panels A, B and C show the 1.3kb fragment amplified from HeLa, KB and K431 cell lines of RNA. Panels A, B: Lane 1 is control; lanes 2, 4 and 5 show the different fluorescence density of 1.3kb bands detected by PCR after exposed to 2, 3 and 8Gy irradiation. Lane 3 is the size marker (Lambda DNA/EcoR I + Hind III Marker). Panel C: Lane 1 is the size marker (Lambda DNA/EcoR I + Hind III Marker), Lane 2 is control; Lanes 3, 4 and 5 show the PCR products after 2, 4 and 8Gy irradiation.

Bellow the pictures are GAPDH control

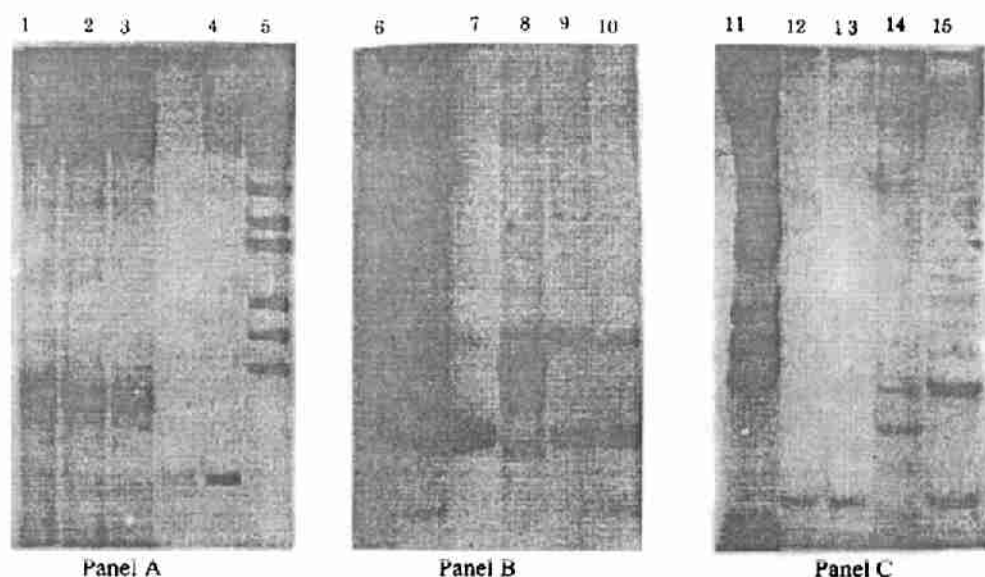


Fig.3 Panels A, B and C represent the telomerase activity analysis of HeLa, KB and K431 cell line after exposure to radiation of 2, 4 and 8Gy.

The results show that the telomerase activity decreased with the increasing dosage for radiation. Lines 1, 10 and 13 means cells exposure to 8Gy; lines 2, 9 and 14 means cells exposure to 4Gy; lines 3, 8 and 15 means exposure to 2Gy. Lines 4, 7 and 12 means negative control; lines 5, 6 and 11 means positive control

3 讨论

正常细胞的端粒随着细胞的分裂而缩短, 经过一定的分裂次数后, 细胞老化并死亡, 而在肿瘤细胞中, 端粒酶的表达机制被激活, 端粒酶使每次细胞分裂的端粒 DNA 丢失和合成保持平衡, 端粒不再缩短, 肿瘤细胞永生生长^[10]。文献表明, 端粒酶活性水平与细胞分化程度、转移及辐射敏感性都有着密切关系。

电离辐射对肿瘤细胞的杀伤作用可通过诱导染色体畸变、细胞凋亡等途径来实现。染色体端粒具有防止染色体粘连、融合、重排和易位的作用, 保持染色体的稳定性^[11]。端粒也是电离辐射的敏感部位。作为在合成端粒 DNA 以及肿瘤细胞生长分化过程中起重要作用的端粒酶, 在辐射后的变化情况可能是肿瘤辐射治疗的重要机制之一。

本实验结果表明, HeLa、A431 和 KB 细胞在 2、4、8Gy 照射后, 端粒酶活性下降, 这种下降与辐射剂量呈正比。说明电离辐射对肿瘤细胞的杀伤作用, 还可能通过抑制端粒酶活性, 破坏肿瘤细胞端粒 DNA 的丢失和合成平衡, 使端粒处于不断缩短状态, 直至死亡。人端粒酶基因 hEST2 与端粒酶活性密切相关^[12], hEST2 中有 6 个小功能区片段, 片段高度保守, 我们运用 RT-PCR 技术, 扩增包括功能区片段的 1.3kb 基因片段, 结果表明, hEST2 功能区片段表达在辐射后呈剂量依赖性下降, 与 TRAP 法检测的端粒酶活性结果一致。说明 hEST2 基因功能区片段是端粒酶活性表达的重要部位, 电离辐射对此基因片段表达的抑制, 降低了

端粒酶活性水平。

电离辐射对端粒酶活性以及 hEST2 功能区片段表达的剂量依赖性抑制的初步研究, 可以为评估辐射对肿瘤细胞的杀伤水平提供参考。

参 考 文 献

- 1 Sidransky D. Science, 1997, 278:1054-1059
- 2 Brandt-Ranck P W, Pincis M R. Pharmacol Therapy 1998, 77:135-148
- 3 Blackburn E H. Science 1990: 249-289
- 4 Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K R *et al.* Science 1994, 266:2011-2015
- 5 Holt S E, Wright W E, Shay J W. Mol Cell Biol, 1996, 16:2932-2939
- 6 Meeker A K, Coffey D S. Biochemistry(Moscow), 1997, 62:1323-1331
- 7 Meyerson M, Counter C M, Eaton E N *et al.* Cell, 1997, 90:785-795
- 8 Nakamura T M, Morin G B, Chapman K B *et al.* Science, 1997, 277:955-959
- 9 Pandita T K, Hall E J, Hei T K *et al.* Oncogene 1996, 13:1423-1430
- 10 Counter C M, Hirte H W, Bacchetti S. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91:2900-2918
- 11 Zhu H N, Cheng W Y. Foreign Med Sci, Radiat Med Nucl Med Branch (in Chinese), 1998, 5:231-234
- 12 Zhu H N, Xiong S D, Cheng W Y. Foreign Med Sci, Radiat Med Nucl Med Branch (in Chinese). 1998, 2: 77-80

STUDY ON SUPPRESSION EFFECT OF IRRADIATION ONTO TUMOR CELL TELOMERASE ACTIVITY

ZHU Hanneng MO Suzhen XIONG Sidong CHENG Wenying

((Shanghai Institute of Radiation Medicine, Shanghai Medical University, Shanghai 200023))

ABSTRACT Telomerase has been detected in more than 85% of human tumor cell lines and tissue, but not exist in majority of normal cell and tissue. PCR and TRAP were employed in this experiment to test the telomerase activity changing of tumor cell line HeLa, A431 and KB after irradiated. The result indicated that: tumor telomerase activity and expression of hEST2 functional area fragment are dose-dependent decreased; the result of PCR test method are correlated with that of TRAP, those data suggest that the suppression effect of irradiation onto tumor telomerase activity is one of critical mechanism of radiotherapy. Determining the telomerase activity level perhaps is a new index to evaluate the killing effect of irradiation onto tumor.

KEYWORDS Irradiation, Telomerase activity, PCR, TRAP

CLC R818