

文章编号: 1007-4627(2015)01-0110-05

重离子对人胃癌细胞 DNA 错配修复基因 *MSH2* 表达的影响

缪国英^{1, 2, 3, 4, 5}, 张红^{1, 2, 3, 4}, 卢启明⁵, 李鸿岩^{1, 2, 3, 4}, 狄翠霞^{1, 2, 3, 4}, 郭逸潇⁵

(1. 中国科学院近代物理研究所, 兰州 730000;
2. 中国科学院重离子束辐射生物医学重点实验室, 兰州 730000;
3. 甘肃省重离子束辐射医学应用基础重点实验室, 兰州 730000;
4. 中国科学院大学, 北京 100049;
5. 甘肃省人民医院, 兰州 730000)

摘要: 采用高传能线密度(LET)重离子辐照人胃癌 SGC7901 细胞, 应用流式细胞技术、蛋白质印迹法(Western blot)及反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)观察重离子诱导人胃癌 SGC7901 细胞周期、凋亡和 *MSH2* 表达状况。结果表明: 与对照组相比, SGC7901 细胞在辐射后 72 h G2/M 期所占细胞比率(33.26 ± 0.08)和凋亡率(24.16 ± 0.64)均达到峰值, 且呈时间依赖性增加; 经重离子照射后, DNA 错配修复基因 *MSH2* mRNA 和蛋白表达水平在 6 h 最高。结果提示: 重离子在体外诱导 SGC7901 细胞周期阻滞和凋亡, 且具有显著的时间依赖性效应; 重离子在一定剂量和时间下, 诱导了 SGC7901 细胞 *MSH2* 基因表达。DNA 错配修复基因 *MSH2* 可能参与了重离子辐照诱导胃癌细胞 DNA 损伤的修复应答。

关键词: 细胞凋亡; 重离子束; *MSH2*; 基因表达

中图分类号: R73-3 **文献标志码:** A **DOI:** 10.11804/NuclPhysRev.32.01.110

1 引言

常规采用的射线和电子束进入人体内后产生的剂量随深度的增加呈指数衰减, 对肿瘤周围的正常组织有一定的杀伤作用, 而重离子由于剂量分布具有 Bragg 峰, 能使剂量区集中于肿瘤部位, 从而有效地保护周围的健康组织, 是较理想的放疗手段^[1-2]。

DNA 错配修复基因(mismatch repair, *MMR*)是一组高度保守的管家基因, 具有修复 DNA 碱基错配、增强 DNA 复制忠实性、维持基因组稳定性和降低自发性突变的功能。*MMR* 在修复 DNA 复制过程中的错误和内源性、外源性因素造成的损伤中具有重要作用, *MMR* 是由一系列特异性修复 DNA 碱基错配的酶分子组成, 能修复各种因素所致的 DNA 碱基错配、小片段插入或缺失、小环形成等形式的 DNA 损伤和基因结构异常, 在维持基因结构稳定性、降低基因突变率、保证遗传信息稳定性方面起着重要作用^[3-6]。在以往对遗传性非息肉性大肠癌等遗传性肿瘤的研究中发现, *MSH2* 和 *MLH1* 是最先发现的 2 个 *MMR*, 与肿瘤关系

密切^[7]。*MSH2* 蛋白与 *MSH6*、*MSH3* 蛋白分别形成异二聚体 hMutS- α 和 hMutS- β , 可识别错配位点, 并与错配位点结合形成复合物, 从而启动错配修复。已有研究表明胃癌组织中有 *MSH2* 的表达, 说明 DNA *MMR* 在胃癌的发展中起作用。据研究, 放疗的敏感性可能与 *MSH2* 有关^[8-9], 已知放疗杀伤肿瘤的原理是射线对 DNA 的损伤, 同时伴有 DNA 修复基因激活, 它们修复受损 DNA, 但在射线作用于肿瘤时, *MSH2* 是否起作用, 在什么时候起作用, 以及重离子辐射胃癌细胞后, 会引起怎样的 DNA 修复, 目前尚未见报道。所以研究重离子诱发的 DNA 链断裂及修复机制, 对重离子治癌具有重要的意义。本实验的目的是通过重离子辐照胃癌细胞系 SGC7901 细胞, 检测其对 *MSH2* 表达的影响, 为重离子治癌提供一个预测及评估敏感性和疗效的指标。

2 材料和方法

2.1 细胞培养

SGC7901 细胞用体积分数为 10% 小牛血清的 RPMI

收稿日期: 2014-03-12; 修改日期: 2014-04-22

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2010CB834202); 国家自然科学基金资助项目(10835011, 10675151); 甘肃省重大科技专项项目(0702NKDA045, 0806RJYA020); 中国科学院西部之光人才培养计划项目(XB106012); 甘肃省科技支撑计划资助(1104FKCA155); 甘肃省自然科学基金资助(096RJZA030)

作者简介: 缪国英(1972-), 女, 河北保定人, 博士研究生, 从事辐射医学研究; E-mail: miaoguoying@impcas.ac.cn。

通信作者: 张红, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn; 卢启明, E-mail: luqim@163.com。

1640 培养液培养, 培养液含 100 U/mL 青霉素和 100 ug/mL 链霉素, pH 7.2, 在 37 °C 体积分数为 5% 的 CO₂ 孵箱中常规培养。

2.2 照射条件

重离子照射实验于中国科学院近代物理研究所 HIRFL-CSR 装置的深部肿瘤重离子治疗终端进行, 束流为 ¹²C 离子束。采用分组照射, 吸收剂量率 0.3 Gy/min, LET 为 44.56 keV/μm, 细胞吸收剂量分别是 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 Gy。

2.3 细胞增殖测定

取对数生长期细胞, 按每孔 25 × 10⁴/200 μL 接种于 96 孔板中, 按剂量组设 10 个复孔, 分别给予 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 Gy 照射, 培养 72 h 后, MTT 比色法测定细胞增殖能力, 用多功能自动酶标仪 (RT-2100C) 于 490 nm 处测定光密度值 (OD 值), 计算平均值, 得出细胞存活率, 以剂量为横轴, 细胞存活率为纵轴绘制剂量-效应曲线。

2.4 流式细胞仪测定细胞周期及凋亡

消化收集各组不同剂量辐射后, 24, 48, 72 h 的 SGC7901 细胞约 1 × 10⁶/mL, PBS 洗两遍, 4 °C 预冷, 75% 乙醇固定过夜, 固定后的细胞用 PBS 洗涤, 并重悬于含 0.1 mg/mL 碘化丙啶中, 用流式细胞术分析。在 DNA 直方图上 G₀/G₁ 期细胞峰前出现一个亚二倍体细胞峰被定义为凋亡细胞峰。

2.5 Western 印迹法

SGC7901 细胞 (1 × 10⁶) 接种于细胞瓶中, 用重离子 4.0 Gy 照射后, 在 6, 12, 24, 48 h 收集细胞, 并用冰 PBS 洗 2 遍, 每孔细胞用 lysis buffer 50 μL 等量蛋白 (40 ug) 在 15% SDS 聚丙烯酰胺凝胶中被分离, 并电转至硝酸纤维素膜, 根据蛋白标志物位置, 剪取相应大小的 NC 膜, 去离子水漂洗去色后, 用以 TBS 溶解的 5% 的脱脂奶粉在室温封闭 1 h, 然后与一抗兔抗人 MSH2 抗体 (稀释至 1:500) 及 actin 抗体孵育 (稀释至 1:1000), 4 °C 过夜, 再用体积分数为 0.1% 吐温 20 的 TBS 洗液洗 3 遍, 将膜与羊抗兔二抗 (稀释至 1:5000) 孵育, 以辣根过氧化物酶介导的化学发光法检测结果。最后用凝胶成像系统分析结果。根据以下公式计算蛋白表达抑制率: 抑制率 = [1 - (转染组平均相对灰度值 / 未转染组平均相对灰度值)] × 100%。

2.6 RT-PCR

SGC7901 细胞 (1 × 10⁶) 接种于细胞瓶中, 培养于含有体积分数 10% RPMI 1640 培养液中, 在 6, 12, 24, 48 h 收集细胞, 用 trizol 试剂提取总 RNA, 用一步法 RT-PCR 试剂盒进行逆转录反应, 反应体系中各加入的两对引物第一对为人 MSH2 基因引物上游: 5'-ggggcgacttctatacgg-3' 下游 5'-ggttgaggatgggtatgt-3' 第二对引物为人 β-actin 基因引物: 上游: 5'-gtggcatgggtcagaag-3' 下游: 5'-gaggcgtacaggatagcac-3' 循环条件为 42 °C 30 min, 94 °C 2 min, 94 °C 15 s 28 循环, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min 最后在 72 °C 延伸 10 min。RT-PCR 产物在用 EB 染色的琼脂糖凝胶中观察。根据以下公式计算 mRNA 表达抑制率: 抑制率 = [1 - (转染组平均相对灰度值 / 未转染组平均相对灰度值)] × 100%。

3 结果

3.1 形态学表现

SGC7901 细胞形态学观察在倒置显微镜下可见对照组细胞贴壁生长良好, 呈圆形和多角形, 且数量较前明显增加。经重离子处理的细胞在剂量 0.5, 1.0 Gy 时, 细胞形态变化不明显, 但数量较对照组减少, 2.0, 4.0 Gy 时有大量细胞自培养皿底部脱落, 收缩变小、濒死或崩溃溶解。随培养时间延长, 细胞畸变, 贴壁生长的细胞生长缓慢, 细胞轮廓有所增加, 随剂量增加, 脱落死亡的细胞逐渐增多。

3.2 细胞增殖率的测定

经 MTT 比色法测定细胞增殖能力, 于 490 nm 处测定 OD 值, 计算各组平均值, 得出细胞存活率。可见随辐照剂量的增加, 细胞存活率逐渐降低, 以 4.0 Gy 时降低最明显。如图 1 所示。

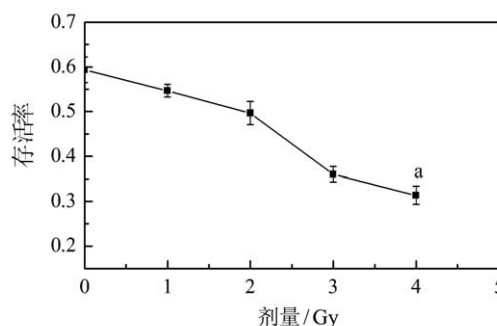


图 1 剂量效应曲线

数据代表三次实验的 mean ± SD, 4.0 Gy 组与其它组相比, P < 0.01。

3.3 流式细胞检测

流式细胞仪检测重离子对SGC7901细胞的凋亡作用结果显示, 4.0 Gy组的SGC7901细胞在72 h照射

时, G2/M期所占细胞比率较对照组及24, 48 h组高, 并且4.0 Gy组出现明显的凋亡峰(见表1), 说明4.0 Gy重离子辐射后, 可使SGC7901细胞复制停滞于G2/M期, 并伴随着细胞凋亡的发生。

表 1 重离子照射不同时间细胞周期的变化(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞周期			凋亡率
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
对照	46.21±3.39	9.26±2.73	11.08±0.92	0.83 ±0.34
24 h	43.93±2.78	10.56±4.12	12.58±2.90	1.08 ±0.33
48 h	41.34±4.04	14.02±3.42	25.80±0.07	13.56 ±0.91 ^a
72 h	36.14±3.02 ^a	16.06±2.48 ^a	33.26±0.08 ^a	24.16±0.64 ^a

^a 数据代表6次实验的均数±标准差 $P < 0.01$ 表示对照组与24, 48 h组相比。

3.4 RT-PCR 检测 mRNA 的表达

RT-PCR 法检测各组细胞 MSH2 mRNA 表达情况, 以 β -actin 为看家基因, 电泳后, β -actin 亮度相

同, 说明 cDNA 上样量相同。对于碳离子辐照, 在 4.0 Gy 时 MSH2 表达在照射后 6 h 最高, 随照射后时间的延长, 表达逐渐下降, 在照射 24 h 后恢复至对照组水平, 结果见图 2(a)、2(b)。

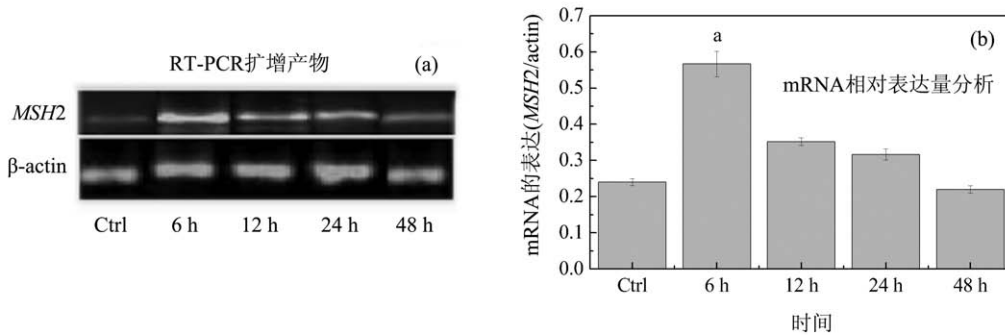


图 2 RT-PCR 分析重离子照射后不同时间点 MSH2 mRNA 表达量分析
数据代表三次实验的 mean±SD, 6 h 与其他时间相比 MSH2 mRNA 表达量, $P < 0.01$ 。

3.5 Western 印迹法检测蛋白表达

用 Western 印迹方法检测蛋白水平上 MSH2 的表达

结果与 mRNA 的表达趋势相类似。在 4.0 Gy 照射后, 6 小时表达最高, 随照射后时间的延长, 表达逐渐下降至对照水平, 结果见图 3(a)、3(b)。

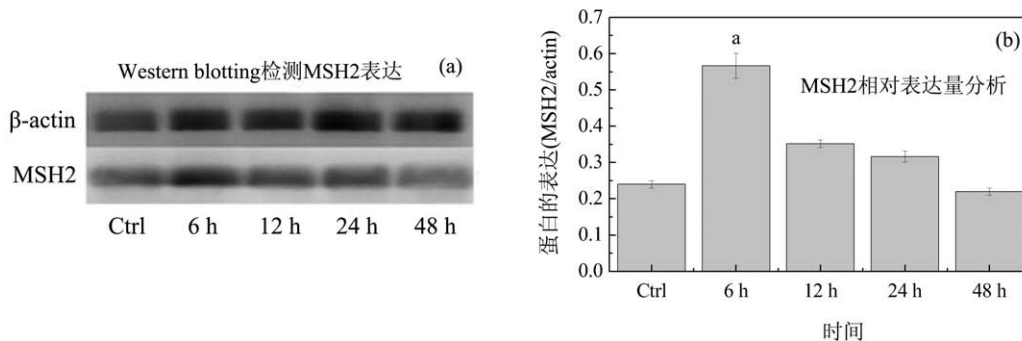


图 3 Western blot 检测重离子照射时不同时间 MSH2 蛋白表达
数据代表三次实验的 mean±SD, 6 h 与其他时间点相比, MSH2 蛋白表达 $P < 0.01$ 。

4 讨论

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 每10万人口的年死亡率为25.12%, 在各种恶性肿瘤中占首位。肿瘤的发生需经过一个较长的、多步骤的过程, 涉及多个癌基因的激活和抑癌基因的失活。目前胃癌的治疗仍以手术为主, 但因大部分患者确诊时已为中晚期, 失去手术机会, 根据美国国家综合癌症网络(NCCN)指南, 放疗是目前胃癌治疗的重要手段, 所以怎样提高放疗的疗效及敏感性成为大家关注的问题。

重离子束治癌是一种先进的放射治疗方法, 适用于局部非扩散肿瘤的治疗(如放射敏感的实体瘤), 具有优越的物理、生物和医疗三大特性, 具有理想的相对生物学效应(RBE), 束流通过受照的靶区时, 重离子的物理剂量深度分布比较均匀, 在射程末端有一个Bragg峰(能量沉积集中区)。在肿瘤治疗时可以通过调节, 使重离子能量损失集中于射程末端即使能量离子停止在肿瘤的指定部位, 这种能量沉积空间分辨率高的特性, 就可达到对肿瘤的最大杀伤效应。

DNA是生物体中一类最基本的大分子, 是遗传信息的载体, 是电离辐射引致细胞杀伤的主要靶分子。电离辐射通过直接或自由基的间接作用使DNA产生各种损伤, 其中双链断裂(DSB)是辐射所致生物效应中最重要的原初损伤。损伤后的DNA能否被正确修复, 关系到基因的突变、细胞的存活, 一些研究表明: DNA修复蛋白可能被用于预测肿瘤细胞对放化疗疗效应答的预测标志物^[10]。

本实验利用重离子不同剂量辐射胃癌SGC7901细胞后, 培养不同时间, 经MTT比色法, 测定细胞增殖能力, 观察到随辐射剂量的增加, 细胞存活率明显降低。细胞存活实验证实, SGC7901细胞经4 Gy重离子辐照, 在辐照后72 h, 与对照组相比细胞存活率接近50%, 说明在辐照后72 h, 4 Gy可能是SGC7901细胞半致死剂量; 流式细胞仪测定DNA含量的变化, 发现经重离子辐照的SGC7901细胞在72 h G2/M期所占细胞比率较对照组明显增高, 说明经重离子辐射后使细

胞阻滞于G2/M期, 并伴随着细胞凋亡的发生, 这对重离子治癌提供了一定的依据。本实验还显示当细胞受到重离子辐射时MSH2表达在照射后6 h最高, 随照射后时间的延长, 表达逐渐下降, 在照射24 h后恢复至照射前水平。

5 结论

综上所述, 重离子辐照呈剂量依赖地抑制胃癌细胞的增殖; 胃癌细胞经重离子辐射后, 出现G2/M期阻滞, 细胞凋亡增加, 推测在出现G2/M期阻滞后期开始进行修复, 而受损严重的细胞, 不能进行有效修复则转向凋亡; 在重离子作用于胃癌SGC7901细胞时, SGC7901细胞中有MSH2的表达, 并且6 h达到高峰, 24 h后基本恢复至基线水平, 说明MSH2可能参与了重离子辐射引发的DNA损伤修复应答, 本研究为重离子治癌及其敏感性研究提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] LOEFFLER J S, DURANTE M. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013; **10**(7): 411424.
- [2] SHIOYAMA Y, SHINOTO M, MATSUNOBU A, *et al.* *Fukuoka Igaku Zasshi*, 2012; **103**(4): 7381.
- [3] CONDE-PEREZPRINA J C, LEON-GALVAN M A, KONIGSBERG M. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, **11**(8): 19.
- [4] TENNEN R I, HAVE J E, WIJAYATILAKE H D, *et al.* *DNA Repair*, 2013, **12**(2): 97109.
- [5] TING S, MAIRINGER F D, HAGER T, *et al.* *Clin Lung Cancer*, 2013, **6**(26): 110.
- [6] KUMARASINGHE A P, de BOER B, BATEMAN A C, *et al.* *Pathology*, 2010, **42** (5): 414420.
- [7] BENDARDAF R, LAMLUM H, RISTAMAKI R, *et al.* *Tumour Biol*, 2007, **28**(4): 212.
- [8] BARWELL J, PANGON L, HODGSON S, *et al.* *J Med Genet*, 2007, **44**(8): 516520.
- [9] BERTOLINI F, BENGALA C, LOSI L, *et al.* *J Int Radiat Oncol Biol Phys*, 2007, **68**(5): 14551461.
- [10] OLAUSSEN KA, PLANCHARD D, ADAM J, *et al.* *Bull Cancer*, 2011, **98**(3): 305322.

Effects of Heavy Ion Irradiation on *MSH2* Expression in Human Gastric Cancer Cell SGC7901

MIAO Guoying^{1, 2, 3, 4, 5}, ZHANG Hong^{1, 2, 3, 4}, LU Qiming⁵,
LI Hongyan^{1, 2, 3, 4}, DI Cuixia^{1, 2, 3, 4}, GUO Yixiao⁵

(1. Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

2. Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Biology and Medicine of Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

3. Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730000, China;

4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

5. Gansu Provincial People's Hospital, Lanzhou 730000, China;)

Abstract: Human gastric cancer cell SGC7901 were irradiated with high linear energy transfer (LET) carbon ion. Apoptotic cells after irradiation were analyzed by flow cytometry and expression of *MSH2* genes in the irradiated cells was detected by western blot and RT-PCR assay. Compared with the control group, we found that the number of G2/M (33.26 ± 0.08) or apoptosis (24.16 ± 0.64) of SGC7901 cells reached a maximum after irradiation at 72 h in a dose dependent manner. And heavy ion irradiation efficiently up-regulated the expression of *MSH2* gene at 4.0 Gy after being irradiated 6 h. These results imply that heavy ion beam could induce cell apoptosis and cell cycle arrest in time-dependent manners. Furthermore, expression of *MSH2* genes activated by carbon ion irradiation suggests that DNA mismatch repair gene *MSH2* might be involved in DNA repair pathways.

Key words: cell apoptosis; heavy ion beam; *MSH2*; gene expression

Received date: 12 Mar. 2014; **Revised date:** 22 Apr. 2014

Foundation item: National Basic Research Program of China (973 Program)(2010CB834202); National Natural Science Foundation of China(10835011, 10675151); Scientific Technology Research Projects of Gansu Province (0702NKDA045, 0806RJYA020); Western Talents Program of Chinese Academy of Sciences (XB106012) Gansu Science and Technology Support Program (1104FKCA155); Natural Science Foundation of Gansu Province (096RJZA030)

Corresponding author: ZHANG Hong, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn. LU Qiming, E-mail: luqim@163.com.

<http://www.npr.ac.cn>