

文章编号:1004 - 616X(2002)01 - 0010 - 03

·论著·

粒子诱发转化人支气管上皮细胞系 BEP2D 中 XRCC5 等基因的突变检测

楼铁柱,葛世丽,项晓琼,吴德昌

(军事医学科学院放射医学研究所放射毒理研究室,北京 100850)

【摘要】目的与方法:用聚合酶链式反应-单链构象多态性分析(PCR-SSCP)方法观察 粒子诱发人支气管上皮细胞系 BEP2D 细胞转化过程中相关基因的改变。结果:细胞转化过程中,双链断裂修复基因 XRCC5 发生碱基突变,改变从转化早期过程就持续存在;而 p16 基因 exon2 和 hMSH2 基因 exon12 未见变化。结论:XRCC5 基因在 粒子照射后早期发生突变,使细胞丧失修复双链断裂损伤的能力,是 粒子诱发支气管上皮细胞转化过程中的启动事件之一。

【关键词】 粒子;BEP2D 细胞;细胞转化;PCR-SSCP;DNA 修复基因

中图分类号:R734.2;R730.231

文献标识码:A

DETECTING RELATED GENES MUTATION IN HUMAN BRONCHIAL EPITHELIAL CELL LINE BEP2D TRANSFORMED BY α -PARTICLES IRRADIATION

LOU Tie-zhu, GE Shi-li, XIANG Xiao-qiong, WU De-chang

(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract: Purpose and Methods: To detect related genes mutation in human bronchial epithelial (BEP2D) cells transformed by α -particles and by using PCR amplification and single-strand conformation polymorphism (SSCP).

Results: The point mutation of double-strand break repair gene XRCC5 occurred at the early stage of transformation, but no mutation was found in the exon 2 of p16 gene and exon12 of hMSH2 gene. **Conclusion:** Mutated XRCC5 gene can't repair DNA lesions induced by α -particles, and plays as one initiator in the process of transformation induced by α -particles.

Key words: alpha-particle; BEP2D cell; cell transformation; PCR-SSCP; XRCC5 gene

辐射是已知的环境致癌因素,其损伤的终点是基因组 DNA 的结构和功能¹。辐射可引发 DNA 双链断裂、单链断裂、碱基损伤和 DNA-蛋白质交联。DNA 损伤修复可以对抗辐射的这种危害。若损伤修复机制发生紊乱的细胞或机体,则对电离辐射和/或紫外线敏感,有恶性转化或发展成癌症的倾向²。辐射还影响细胞周期的调控、信号转导路径和细胞凋亡等过程。双链断裂修复基因 XRCC5、碱基错配修复基因 hMSH2 均为重要的 DNA 损伤修复基因,p16 基

因则参与细胞周期阻滞。虽然在许多肿瘤细胞系中发生改变³,但目前这些基因在 粒子诱发转化和氡及其子体诱发肺癌中作用的研究资料还很缺乏。为此我们以 粒子照射诱发转化的 BEP2D 细胞为模型,进行上述基因突变热点区的聚合酶链式反应-单链构象多态性分析(PCR-SSCP),观察它们在细胞转化过程中是否突变,了解辐射是否通过诱发修复基因等突变而发挥作用,探讨氡及其子体诱发肺癌的机制。

收稿日期:2000-11-20;修订日期:2001-02-18

基金项目:国家重点基础研究专项经费资助(G1998051200)

作者简介:楼铁柱(1972-),男,安徽省滁州市,助理研究员,医学博士,研究方向为辐射致癌的细胞和分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞 人支气管上皮永生化细胞系 BEP2D, HPV18 转染, Prof. Harris 馈赠⁴; R15H 细胞, 本实验室用 1.5 Gy 粒子照射(照射装置本实验室研制, 照射源为 ²³⁸PuO₂, 能量 3.94 MeV, 剂量率 0.2 Gy/min) BEP2D 细胞建立的恶性转化细胞系, 其恶性转化特性已经软琼脂和裸鼠成瘤试验证实⁵, 上述细胞均为 LHC-8 无血清培养液(Biofluids Inc.) 培养。

1.2 细胞 DNA 提取 收集 BEP2D 和 R15H 细胞, 按照文献 6, 用酚/氯仿/异戊醇(25:24:1) 提取 DNA, 重溶于 TE 中, -20 保存备用。

1.3 PCR 扩增 引物由 GeneMed Biotechnologies Inc. 合成。反应体积 25 μl, 94 预变性 2 min; 94 30 s, Tm 1 min, 72 50 s, 35 次循环; 72 延伸 10 min。扩增产物均经琼脂糖凝胶电泳检测, 证实与预期片段一致。

1.3.1 hMSH2 exon 12 退火温度(Tm) 51, 产物长度 309 bp

primer 1 5' TTT CTG TTT TTA TTT TTA TAC ACG 3'

primer 2 5' AAA CGT TAC CCC CAC AAA G 3'

1.3.2 XRCC5 Tm 57, 产物长度 277 bp

primer 1 5' GTG TAT TAG TGA CGA CTT ATG AGG G 3'

primer 2 5' ATC ACT TCA CTG TTC TCT ACT TGC A 3'

1.3.3 p16 exon 2 Tm 61, 产物长度 304 bp

primer 1 5' GTC ATG ATG ATG GGC AGC GC 3'

primer 2 5' AGG GAC CTT CCG CGG CAT CT 3'

1.4 SSCP 电泳分析 基因突变检测采用 PCR-SSCP 方法。配制 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶液, 灌胶, 聚合。取 PCR 产物与等量变性液混合, 沸水变性后加样, 1 × TBE 电泳缓冲液, 60 V 电泳 6 ~ 8 h, 结束后 SYBR Gold 凝胶染色 30 min, 紫外透射仪上观察电泳结果。

2 结果

对 BEP2D 和 R15H 细胞 DNA, 用 XRCC5 引物进行 PCR 扩增, 扩展产物为 XRCC5 基因核心编码区, 控制其重要的结构功能。琼脂糖凝胶电泳检测, 均扩

增出所期望的片段。SSCP 结果发现 XRCC5 基因在照后第 5 代转化细胞 R15Hp5 的电泳带型与正常细胞相比发生变异, 表明发生了碱基突变, 而且在照后 10、20 和 30 代细胞中一直都能观察到(图 1), 显示在细胞转化早期 XRCC5 基因核心编码区就发生突变, 并且在转化细胞中得到保持。

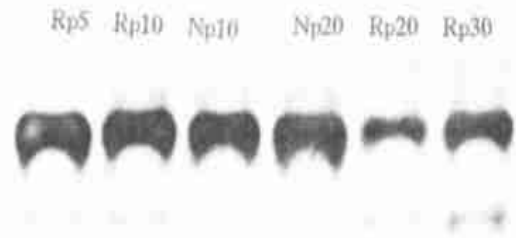


图 1. XRCC5 基因 SSCP 电泳结果

Figure 1. SSCP electrophoresis analysis of XRCC5 gene

N: BEP2D cells; R: R15H cells; p and Arabic numerals: passage number of cells.

p16 基因 exon 2 和 hMSH2 基因 exon 12 是上述基因在肿瘤中的突变热点区。本研究选择它们作为检测对象, 但 PCR-SSCP 电泳检测均未发现上述 2 个外显子发生泳动变位, 表明它们在细胞转化过程中没有发生碱基突变。

3 讨论

在辐射作用下, DNA 损伤造成了基因的突变、丢失或表达的改变, 引起了细胞的突变或癌变。本研究发现双链断裂修复基因 XRCC5 核心编码区发生突变。XRCC5 产物是 Ku80 蛋白(Ku 家族), 在双链断裂(DSB) 修复和 V(D)J 重组中起重要作用, 促进双链断裂的重接和重组, 它的作用是 DNA 双链断裂修复中所必需的⁷。更重要的是 Ku 蛋白还是 DNA 依赖性蛋白激酶 DNA-PK 的组分, 起 DNA 结合作用, 活化 DNA-PK 的另一催化组分 p350。DNA-PK 能使多种核内调节蛋白(如 p53、RB、FOS 等) 磷酸化, 对转录、复制、重组和 DNA 修复起调节作用。当 Ku80 突变时将减少 DNA 末端形成的 Ku70/Ku80 二聚体, 使动员 p350 的能力下降, DNA-PK 不能发挥正常的作用⁸。

辐射首先诱发 DNA 发生双链断裂(double-strand breaks, DSB), 还能诱导 Ku80 蛋白突变, 不能形成 DNA-PK 复合物, 不仅使细胞无法修复 DSB, 而且不能磷酸化激活许多重要的下游基因产物, 进一步阻止细

胞对损伤的修复、细胞周期阻滞和诱导凋亡等反应。

人错配修复基因 *hMSH2* 主要修复 DNA 双链中的 G-A、A-C 错配,它的突变与 60% 的人类遗传性非息肉结肠直肠癌 (HNPCC) 有关,主要为移码和缺失突变⁹。我们对外显子 12 进行 SSCP 分析,未发现突变的发生,说明 辐射诱发的 DNA 损伤并不是以碱基错配为主,细胞转化可能不需要 *hMSH2* 基因功能的改变。在许多癌症包括绝大部分肺癌中发现 *p16-cyclin D1-CDK4-Rb* 路径中至少有 1 个发生突变或功能改变。*Rb* 和 *p16* 基因主要发生等位基因丢失和突变,两者同时突变的情况很少,但均可伴随有 *cyclin D1* 的过度表达¹⁰。Hei 等人发现在体外氩诱发恶转 BBP2D 细胞中 *Cyclin D1* 表达水平增高,*RB* 蛋白以过磷酸化状态存在,失去抑癌活性,另外 *Rb* 基因发生杂合性丢失 (LOH)¹¹,但文献中未见 *p16* 基因与氩及 粒子照射相关的报道。本实验未观察到 *p16* 基因外显子 2 发生突变,参照 Hei 等人的结果¹¹,说明在 粒子致癌和转化过程中,可能主要通过诱导 *RB* 失活和 *cyclin D1* 过度表达,而非 *p16* 基因突变来影响 *p16-cyclinD1-CDK4-Rb* 细胞周期调控路径。

根据上述结果,我们初步推论 粒子照后早期发生 *XRCC5* 基因的突变,可能对后续的细胞转化发挥启动作用,阻止细胞对辐射损伤的修复和下游基因的表达,扼杀细胞的损伤调控机制,使损伤细胞逃脱细胞周期检查点,突变被固定后获得恶性增殖能力,最后转化为肿瘤细胞。而 *p16* 基因和 *hMSH2* 基因则可能不发挥作用。

参考文献:

- 1 Lohman PH, Cox R, Chadwick KH. Role of molecular biology in radiation biology J. *Int J Radiat Biol*, 1995, 68(3): 331 ~ 340.
- 2 Maity A, Kao CD, Muschel RJ. Potential molecular targets for manipulating the radiation response J. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1997, 37(3): 639 ~ 653.
- 3 Cox R. Molecular mechanisms of radiation oncogenesis J. *Int J Radiat Biol*, 1994, 65(1): 57 ~ 64.
- 4 Willey JC, Broussoud A, Sleemi A. Immortalization of normal human bronchial epithelial cells by human papillomaviruses 16 or 18 J. *Cancer Res*, 1991, 51(19): 5370 ~ 5377.
- 5 楼铁柱,项晓琼,吴德昌. 238 Pu 粒子诱发人支气管上皮细胞 BBP2D 转化的初步研究 J. *中国肺癌杂志*, 2000, 3(6): 428 ~ 431.
- 6 F 奥斯伯, R 布伦特, RE 金斯頓,等(颜子颖,王海林译). 精编分子生物学实验指南 M. 北京:科学出版社,1998. 35 ~ 36.
- 7 Taccioli GE, Gottlieb TM, Blunt T. Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination J. *Science*, 1994, 265: 1442 ~ 1445.
- 8 Olive PL. The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation J. *Radiat Res*, 1998, 150(S5): S42 ~ S51.
- 9 Beck NE, Tomlinson IP, Hornfray T. Use of SSCP analysis to identify germline mutations in HNPCC families fulfilling the Amsterdam criteria J. *Hum Genet*, 1997, 99: 219 ~ 224.
- 10 Harris CC, Reddel R, Pfeifer A. Role of oncogenes and tumor suppressor genes in human lung carcinogenesis R. *IARC Sci Publ*, 1991, 105: 294 ~ 304.
- 11 Hei TK, Pao CQ, Willey JC. Malignant transformation of human bronchial epithelial cells by radon-simulated α -particles J. *Carcinogenesis*, 1994, 15(3): 431 ~ 437.

欢迎订阅《中华男科学》杂志

《中华男科学》杂志主要报道国内外男科学、生殖医学最新诊断治疗进展,有关男女不育症、性功能障碍、前列腺疾病等诊治的研究动态,实验诊断方法,男科重要新闻,重大学术活动,出版消息,书刊评论等。《中华男科学》杂志已列入国家科技部中国科技论文统计源期刊和中国科学引文数据库医学类核心期刊,被美国化学文摘(CA)收录,入编《中国学术期刊(光盘版)》,并加入“万方数据资源系统(ChinaInfo)数字化期刊群”。本刊设有专家谈、论著、综述、研究简报、经验与技术交流、中医等栏目,适合生殖医学医疗、教学和科研工作者参考。本刊为双月刊,大16开本,72页,全铜版纸印刷,由邮局公开发行,邮发代号:28-257,每期定价10.00元,全年价60.00元(包括邮费),欢迎读者向全国各地邮局订阅。若错过订期,也可直接向本刊编辑部征订。另外,本刊自1995年创刊号起,各期尚有少量余刊,欢迎补订。同时,欢迎广大学界同仁投稿。

联系地址:南京市中山东路305号《中华男科学》杂志编辑部收(210002)。

电话/传真:025-4803061; E-mail: androl@jlonline.com; editor@ntlj-androl.com。