

DNA-PKcs 表达与鼻咽癌细胞株放射敏感性的关系

曲 颂¹,朱小东¹,黎丹戎²,张 玮²,曹 骥³

Relationship between the Expression of DNA-PKcs and Radiosensitivity in Nasopharyngeal Carcinoma Cell Lines

QU Song¹,ZHU Xiao-dong¹,LI Dan-rong²,ZHANG Wei²,CAO Ji³

Department of Radiation Oncology, Cancer Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Abstract: Objective This study was designed to determine the relationship between expression of DNA-PKcs gene (a catalytic subunit of DNA-PK, which is an important component in NHEJ pathway) and radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cell lines. **Methods** Radiosensitivity parameters of nasopharyngeal carcinoma cell lines were obtained by the colony forming assay and irradiation dose-survival curve were done by linear quadratic model. The two cell lines were exposed to ⁶⁰Co- ray and received 4 Gy, 12 hours later, the survival rate were obtained by MTT assay, and evaluated the different radiosensitivity of two cell lines. After receiving different irradiation dose, the dynamical changes of the expression of DNA-PKcs in mRNA level of CNE-1 and CNE-2 were detected by RT-FQ-PCR. **Results** Survival rate of CNE-1 was higher than those of CNE-2 at each dose point. Mean inactivation dose was higher in CNE-1 (2.78) than that in the CNE-2 (1.61), and the SF₂ was 0.627 and 0.341 respectively. After exposed to irradiation dose of 4 Gy, survival rate in CNE-1 was also higher than that in the CNE-2. The ratio of relative expression of DNA-PKcs in the two cell lines was 7.54 ± 2.71 (*t* = 4.17, *P* = 0.014). The expression of DNA-PKcs in CNE-2 was correlated with the irradiation dose and postirradiation time. **Conclusion** CNE-2 is more radiosensitive than CNE-1. The expression of DNA-PKcs gene is correlated with the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma.

Key words: Nasopharyngeal carcinoma cell line; RT-FQ-PCR; DNA-PKcs; Radiosensitivity

摘 要:目的 探讨不同放射敏感性鼻咽癌细胞株 CNE-1(鼻咽高分化鳞癌细胞株)和 CNE-2(鼻咽低分化鳞癌细胞株)中 DNA 依赖蛋白激酶(DNA-PK)的催化亚基 DNA-PKcs 基因的表达与鼻咽癌细胞放射敏感性的关系。方法 通过克隆形成实验测定 CNE-1、CNE-2 不同剂量的存活分数,并用线性二次模型拟合剂量存活曲线求出放射生物学参数 D_{50} 、SF₂、MID 值,以及四氮唑蓝比色分析法(MTT 法)检测 ⁶⁰Co- 线 4 Gy 照射后 12h 细胞的存活率,以评价两株细胞的放射敏感性。逆转录实时荧光定量 PCR 技术(RT-FQ-PCR)检测照射前、后不同时间及不同剂量 CNE-1、CNE-2 细胞 mRNA 水平 DNA-PKcs 基因的定量表达。结果 CNE-1 在各个剂量点的存活分数均比 CNE-2 高, MID 值分别为 2.78、1.61, SF₂ 值分别为 0.627、0.341; 4 Gy 照射后 12h 的存活率分别为 88.2%、72.3%; RT-FQ-PCR 显示两株细胞中均有 DNA-PKcs 基因的表达,其相对表达量之比为 7.54 ± 2.71 (*t* = 4.17, *P* = 0.014),表达差异有统计学意义, DNA-PKcs 基因在 CNE-2 细胞中存在时间、剂量依赖关系。结论 实验验证了 CNE-2 比 CNE-1 对射线更敏感, DNA-PKcs 基因的表达与鼻咽癌细胞的放射敏感性有关。

关键词:鼻咽癌细胞;实时荧光定量 PCR;DNA-PKcs;放射敏感性

中图分类号:R739.62 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2007)04-0237-04

0 引言

放射治疗是治疗鼻咽癌的主要手段,但临床

上患者对放射敏感性存在个体差异,因此,放射治疗前即对放射敏感性作预测性分析是目前放射生物学研究的课题之一。DNA-PKcs 是 DNA 依赖蛋白激酶(DNA-PK)的催化亚基,属于 PI3-K 激酶家族,具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性^[1,2],参与 DNA 双链断裂缺口的修复。由于细胞的放射敏感性与照射后 DNA 双链断裂损伤修复的关系密切^[3],近

收稿日期:2006-03-15;修回日期:2006-04-25
基金项目:广西科学基金资助项目(桂科基 0575090)
作者单位:1. 530021 南宁,广西医科大学附属肿瘤医院放疗科,2. 中心实验室,3. 实验病理研究室
通讯作者:朱小东
作者简介:曲颂(1978-),女,硕士,住院医师,主要从事恶性肿瘤放射治疗的基础与临床研究

年来已有研究证明 DNA-PKcs 催化亚基可能与肿瘤细胞的放射敏感性有关。本实验通过对不同放射敏感性鼻咽癌细胞株 CNE-1、CNE-2 照射前后及照射后不同时间 DNA-PKcs 基因表达的检测,探讨其与鼻咽癌放射敏感性的关系,为临床上从基因水平对 NPC 放射治疗进行干预提供理论基础。

1 材料与与方法

1.1 材料

CNE-1(人鼻咽癌高分化鳞状细胞癌细胞)及 CNE-2(人鼻咽癌低分化鳞状细胞癌细胞)由本院中心实验室提供,培养条件为含 10% 小牛血清及青、链霉素的 RPMI1640 培养基,5% CO₂ 孵箱 37 孵育。

1.2 照射条件及方法

采用加拿大 THERATRONICS780-C ⁶⁰Co 远距离治疗机,剂量率为 108 ~ 111cGy/min,源皮距 80cm,调整细胞上方培养液深度为 5mm,以此作为 ⁶⁰Co- 射线照射所需剂量建成区。

1.3 照射细胞存活曲线

设 0 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy、8 Gy、16 Gy 剂量点,取上述指数生长期细胞,用 0.25% 的胰酶消化成单细胞悬液细胞消化后制成悬液,以 10³ 的密度接种细胞于直径 6cm 培养皿中,待细胞贴壁后照射。照射后细胞继续培养 10 ~ 14 天,待出现可见集落时终止培养,弃培养液,甲醛固定,姬姆萨染色,计数细胞数 > 50 个以上的集落数,每个剂量点设 3 个平行样本。计算细胞存活率,计算机按线性二次模型(L-Q 模型)拟合,绘制细胞存活曲线,求 PE、SF2、MID 值。

1.4 MTT 法检测单次照射后细胞存活率

96 孔板接种细胞,每孔 10⁴ 个,每个时间点设 6 孔,培养 48h 后单次照射 4 Gy。未照射和照射后细胞在 5% CO₂ 孵箱 37 孵育后,分别于照射后 3、6、12、24、36、48h 以 10¹ 的体积加 MTT (5mg/ml),作用 4h 后吸弃培养液,每孔加 0.2ml 的 DMSO 使细胞裂解,37 孵育待紫色固体凝粒溶解均匀后,酶标仪测 OD₄₉₀ 值。用各时间点的 OD 值除以培养 48h 未照射对照组的 OD 值得到各时间点的存活率。

1.5 细胞总 RNA 抽提及 cDNA 制备

取上述对数生长期细胞,以 10⁵ 的密度接种于 100ml 培养瓶中,行 0 ~ 16Gy 照射后 12h 采用小量柱离心式细胞总 RNA 抽提试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)提取细胞总 RNA,具体操作步骤详

见说明书。按照 MMLV 反转录试剂盒(MBI 公司)说明书操作合成 cDNA 模板。

1.6 引物的设计与合成

根据 GenBank 中 GAPDH 和 DNA-PKcs 的 mRNA 序列,由 Primer 3 在线设计,上海生工生物技术有限公司合成,各引物序列设计如下:GAPDH (GI: 7669491) F: 5'-GAA GAT GGTGAT GGGAT TTC-3', R: 5'-GAA GGTGAA GGTCGGA GT-3', 扩增片断长度 225bp; DNA-PKcs (GI:13570016) F: 5'-ATCTCTTAAA GCGGGCCTTCG-3', R: 5'-AGGCA TCAACTCA GGGACTGG-3', 扩增片断长度 239bp。

1.7 逆转录-荧光定量-聚合酶链反应(RT-FQ-PCR)

采用 iCycler iQTM 实时 PCR 检测仪(BIO-RAD 公司)进行 PCR 扩增及结果分析。用未经照射的 CNE-2 细胞的 cDNA 制备标准品,等比稀释为 10⁰、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 浓度。反应体系 25μl: 10 × PCR Buffer 2.5μl、MgCl₂ 2μl、dNTP 2μl、Taq DNA 聚合酶(大连宝生物工程有限公司) 2U、上、下游引物各 10pmol、20 × SYBR Green I 染料(上海捷瑞生物工程有限公司) 1μl 及 cDNA 1μl。将上述成分混匀后,于 PCR 仪上进行扩增, GAPDH 和 DNA-PKcs 的扩增条件为 94 变性 30s, 67 退火 30s, 72 延伸 45s。共反应 40 个循环,在每一循环的退火温度时收集荧光进行实时检测。所用荧光的激发波长为 488nm,发射波长为 520nm。在 PCR 后进行熔解曲线分析以确定得到的产物是否为目的产物,温度以 0.5 / 10s 的速率从 50 缓慢递增至 100,相当于在 520nm 处连续测定样品的荧光强度以获取熔解曲线。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 11.5 统计软件包,照射前 CNE-1、CNE-2 细胞 DNA-PKcs 相对表达量的结果采用两组均数的 *t* 检验,4 Gy 照射后不同时间及 0 ~ 16Gy 照射后 12h 的相对表达量采用 Spearman 等级相关分析。

2 结果

2.1 细胞存活曲线

由线性二次模型(L-Q 模型)拟合的剂量存活曲线见图 1, CNE-1、CNE-2 细胞的放射生物学参数 (Gy⁻¹) 值分别为 0.059、0.323, (Gy⁻²) 值分别为 0.068、0.071, SF2 值分别为 0.627、0.314, MID (Gy) 值分别为 2.78、1.61, 可知 CNE-2 细胞的内在放射敏感性明显高于 CNE-1 细胞。

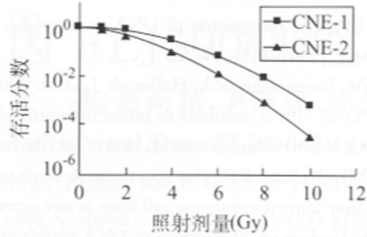


图1 CNE-1和CNE-2细胞存活曲线

2.2 4 Gy 照射后不同时间 CNE-1、CNE-2 细胞存活情况

4 Gy 照射 12h 后 CNE-1 细胞存活率为 88.2 % , CNE-2 细胞存活率为 72.3 % ,经 t 检验有显著差异 (t = 5.759 , P = 0.005) ,见图 2。结合结果 1 说明: 照射后 CNE-2 细胞无论是间期死亡还是增殖死亡均较 CNE-1 细胞增加 ,CNE-2 细胞较 CNE-1 细胞对射线更敏感。

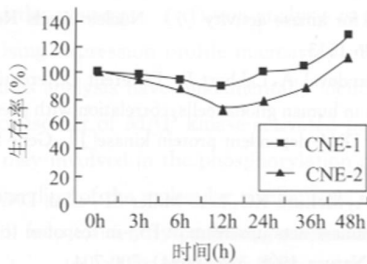


图2 4Gy 照射后不同时间存活率

2.3 RT-FQ-PCR 实验结果

通过琼脂糖凝胶电泳验证扩增产物的特异性, 见图 3, 结合熔解曲线分析可知 DNA-PKcs 在 CNE-1、CNE-2 细胞中均有表达, 见图 4。结果显示 CNE-1 细胞的 DNA-PKcs 相对表达量为 CNE-2 细胞的 7.54 ± 2.71 ($t = 4.17, P = 0.014$) ,从图 5、6 可见 0 ~ 16 Gy 照射后 12h 及 4 Gy 照射后不同时间 CNE-1、CNE-2 细胞中 DNA-PKcs 相对表达量的变化, 其中 CNE-2 细胞的 DNA-PKcs 表达具有时间和剂量依赖关系 (相关系数分别为 0.945、0.983 , $P = 0.005、0.001$) 。

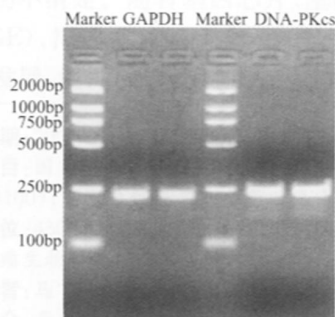


图3 琼脂糖凝胶电泳验证 RT-FQ-PCR 结果

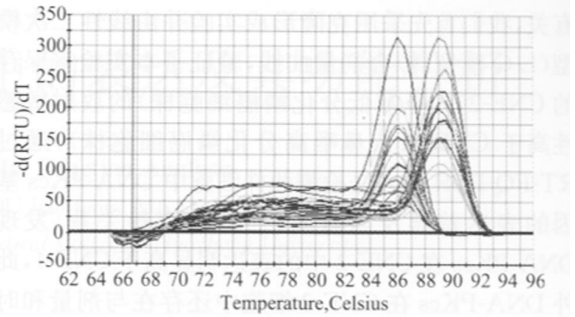


图4 GAPD 和 DNA-PKcs 的熔解曲线

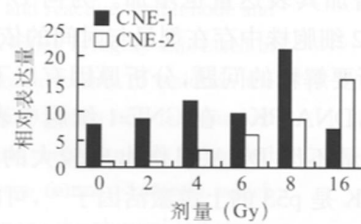


图5 不同剂量照射下 DNA-PKcs 的表达

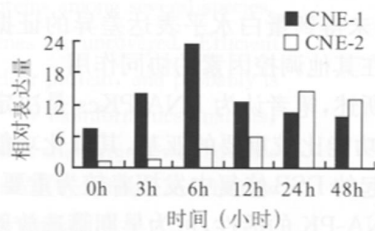


图6 4Gy 照射后不同时间 DNA-PKcs 的表达

3 讨论

放射线导致细胞损伤的主要靶点是 DNA ,由放射线的直接作用和电离效应产生的自由基共同导致的 DNA 单链和双链断裂损伤,其中以 DNA 双链断裂 (DSB) 损伤最为重要。DSB 可通过同源重组或非同源末端连接 (NHEJ) 实现修复 ,DNA-PK 是哺乳动物细胞中参与 NHEJ 主要的分子途径之一,是由 Ku70、Ku80 以及 DNA-PKcs 三亚基组成,其中 Ku70、Ku80 组成 Ku 蛋白调节亚基^[4] ,在 DSB 修复中起着辨认、结合和排列 DNA 末端并招募催化亚基 DNA-PKcs 的作用,任意一个组分缺陷均会导致 DNA-PK 活性丧失,而导致放射敏感性增加。国内外已有文献报道用针对 DNA-PKcs 的反义核酸可提高胶质瘤细胞、Hela 细胞的放射敏感性^[5、6] 。

Beamish 等^[7] 研究发现 DNA-PKcs 基因突变将导致小鼠产生重症联合免疫缺陷病,细胞对电离辐射敏感性增加。有的研究表明 DNA-PKcs 表达缺陷的胶质瘤细胞对放射线敏感,而其正常表达的胶质瘤细胞则对射线抗拒^[8]。以上均说明了 DNA-PKcs 与放射敏感性有着密切的联系。为了研究 DNA-PKcs 基因的表达是否与鼻咽癌放射敏感性

有关,我们首先采用克隆形成实验并由线性二次模型(L-Q 模型)拟合剂量曲线,验证了本实验室保存的 CNE-2(人鼻咽低分化鳞癌细胞株)的放射敏感性高于 CNE-1(人鼻咽高分化鳞癌细胞株),通过 RT-FQ-PCR 的方法检测两株细胞中 DNA-PKcs 基因的表达差异及与时间、剂量的依赖关系,发现 DNA-PKcs 在 CNE-2 中的表达明显高于 CNE-1,此外 DNA-PKcs 在 CNE-2 细胞中还存在着与剂量和时间的依赖关系,即随着照射剂量的增加和单次照射后时间的增加其表达量也增加。为何 DNA-PKcs 只在 CNE-2 细胞株中存在剂量与时间的依赖关系,这是我们所要解释的问题,分析原因有以下几种可能性:其一, DNA-PKcs 在 CNE-1 细胞中表达量较高,其表达量不因 DNA 损伤出现较大的波动;其二, DNA-PK 是 p53 的上游激活因子^[9],可能与 p53 所处的功能状态有关,而本实验尚未对此进行深入研究;其三,目前只从 mRNA 水平检测 DNA-PKcs 的表达,尚未得到蛋白水平表达差异的证据;其四,可能还存在其他调控因素的协同作用。

综上所述,笔者认为 DNA-PKcs 是决定鼻咽癌 DNA-PK 功能比较重要的亚基,其催化功能在射线照射后引起的 DSB 修复中发挥着较为重要的作用,调控着 DNA-PK 的活性,可为早期筛选放射敏感的鼻咽癌患者以及对鼻咽癌进一步的放疗增敏临床研究提供可靠的理论依据,有关 DNA-PKcs 与鼻咽癌放射敏感性的关系还需要进一步的深入研究来证实。

参考文献:

- [1] Jackson SP. The recognition of DNA damage[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1996, 6(1): 19-25.
- [2] Bailey SM, Brennen MA, Halbrook J, et al. The kinase activity of DNA-PK is required to protect mammalian telomeres [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2004, 3(3): 225-233.
- [3] McKay MJ, Kefford RF. The spectrum of in vitro radiosensitivity in four human melanoma cell lines is not accounted for by differential induction or rejoining of DNA double strand breaks [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1995, 31(2): 345-352.
- [4] Jeggo PA. Identification of genes involved in repair of DNA double strand breaks in mammary cells [J]. *Radiat Res*, 1998, 150(suppl): 580-591.
- [5] Daido S, Yamamoto A, Fujiwara K, et al. Inhibition of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit radiosensitizes malignant glioma cells by inducing autophagy [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(10): 4368-4375.
- [6] 余子建, 孙敬芬, 隋建丽, 等. DNA-PKcs 反义核酸增强 HeLa 细胞对辐射及化疗药物顺铂的敏感性 [J]. *中国现代医学*, 2005, 15(8): 1148-1151.
- [7] Beamish HJ, Jessberger R, Riballo E, et al. The C-terminal conserved domain of DNA-PKcs, missing in the SCID mouse, is required for kinase activity [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(7): 1506-1513.
- [8] Ai R, Sandoval A, Labhart P. Different Differential gene expression in human glioma cells: correlation with presence or absence of DNA-dependent protein kinase [J]. *Gene Expr*, 2003, 11(1): 35-45.
- [9] Woo RA, McLure KG, Lees-Miller SP, et al. DNA-dependent protein kinase acts upstream of P53 in response to DNA damage [J]. *Nature*, 1998, 394(6694): 700-704.

[编辑: 贺文]