

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00361

肝癌 SMMC-7721 细胞受 X 线照射后线粒体 DNA 部分编码区断裂损伤状况

王璐¹, 时多¹, 蒋恒义¹, 王学敏^{1*}, 缪明永¹, 高春芳²

1. 第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433

2. 第二军医大学东方肝胆医院实验诊断科, 上海 200438

[摘要] **目的:** 研究肝癌 SMMC-7721 细胞受不同剂量的 X 线照射后线粒体 DNA 编码区的断裂损伤状况。**方法:** 对 SMMC-7721 细胞照射不同剂量(0、20、30、50 Gy)的 X 线, 根据人线粒体 DNA 编码区的序列设计引物, 用接头介导的 PCR (LM-PCR) 以及基因扫描技术来检测其断裂位点及程度。**结果:** 通过基因扫描的方法, 发现经不同剂量 X 线照射后 SMMC-7721 细胞线粒体 DNA 编码区存在对 X 线敏感的位点, 断裂损伤的程度和辐照剂量呈正相关, 并且这些位点的分布是非随机的; 在 SMMC-7721 细胞线粒体 DNA 编码区中, 重链的损伤程度较轻链高。**结论:** SMMC-7721 细胞受不同剂量的 X 线照射后线粒体 DNA 编码区有明显的断裂损伤, 线粒体 DNA 的变化对肿瘤的临床治疗有一定的指导价值。

[关键词] 线粒体 DNA; X 线; 辐射; 肝肿瘤

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)04-0361-04

Damages within coding region of mitochondrial DNA in human liver cancer cell line SMMC-7721 exposed to X-ray

WANG Lu¹, SHI Duo¹, JIANG Heng-yi¹, WANG Xue-min^{1*}, MIAO Ming-yong¹, GAO Chun-fang²

1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Laboratory Medicine, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438

[ABSTRACT] **Objective:** To study the damages within the coding region of the mitochondrial DNA in a human liver cancer cell line SMMC-7721 after exposure to different doses of X-ray irradiation. **Methods:** SMMC-7721 cells were radiated by different doses of X-ray (0, 20, 30, and 50 Gy). Primers for multiple PCR detection were designed according to the sequences of the coding region of human mitochondrial DNA, and the degree and location of mitochondrial DNA breaks were examined by LM-PCR (ligation mediated-PCR) and gene scanning technique. **Results:** The results of gene scanning showed the existence of X-ray sensitive breakpoints in the mitochondrial DNA coding region in human liver cancer cell line SMMC-7721, the degree of damage increased with the irradiation doses; the sensitive breakpoints were not distributed at random. The damage of heavy strand was severe than that in the light strand. **Conclusion:** X-ray irradiation can cause obvious damage to the coding region of the mitochondrial DNA in human liver cancer cell line SMMC-7721, and the changes of mitochondrial DNA may play a role in the clinical therapy of cancer.

[KEY WORDS] mitochondrial DNA; X-rays; radiation; liver neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(4): 361-364]

到目前为止, 肿瘤一直是导致人类死亡的主要原因之一, 放射治疗作为肿瘤的三大主要治疗手段(放疗、化疗、外科手术)之一有着不可替代的重要地位。射线之所以能够杀死肿瘤细胞主要在于它能够损伤肿瘤细胞的 DNA 分子, 引起 DNA 分子双链断

裂, 最终使细胞凋亡。治疗用的放射线分为两大类: 第一类是低线性能量传递 (liner energy transmission, LET) 射线, 第二类是高 LET 射线。高 LET 射线在国内外尚属于临床试用的阶段, 目前在临床上使用的主要还是低 LET 射线, 国内应用 γ 和 X 线

[收稿日期] 2007-09-03 **[接受日期]** 2008-02-26

[基金项目] 国家自然科学基金(30472175, 30171030). Supported by National Natural Science Foundation of China(30472175, 30171030).

[作者简介] 王璐, 硕士. E-mail: WAR_w1002@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-25070306-8005, E-mail: wang_xuemin@hotmail.com

治疗较为广泛。有文献^[1-2]报道高 LET 射线引起的核 DNA 双链断裂是非随机分布的,而低 LET 射线中 X 线引起的核 DNA 双链断裂位点是随机分布的,迄今为止,对辐照后 DNA 断裂损伤的研究主要集中于核 DNA (nDNA) 方面,而对线粒体 DNA (mtDNA) 的研究相对较少^[3-4]。本实验主要研究人肝癌 SMMC-7721 细胞 mtDNA 编码区经 X 线照射后的断裂损伤状况。

1 材料和方法

1.1 细胞培养 人肝癌 SMMC-7721 细胞株(本实验室保存)用含 10% 新生牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)的 RPMI1640 培养液(Gibco)接种细胞,37℃ 恒温条件下,于体积分数为 5% CO₂ 培养箱(美国 Forma Scientific 公司)中培养,待细胞增殖并长满培养瓶表面后,增殖密度约 1.5×10^6 /ml, 0.25% Trypsin-EDTA (0.25% Trypsin, EDTA-4Na, 上海博光生物科技有限公司)37℃ 消化 2 min, 轻轻吹打使团状细胞分散,以需要的密度传代细胞,2 d 换液 1 次,3 d 传代 1 次。

1.2 辐照细胞 取对数生长期的 SMMC-7721 细胞,0.25% Trypsin-EDTA 消化后用 1×PBS(pH=7.3±0.1, 上海博光生物科技有限公司)洗涤 1 次,并用 PBS 将细胞悬浮,细胞悬液密度 1.6×10^6 /ml, 于每支 Eppendorf 管中加入 1 ml 细胞悬液,再用 PBS 将 Eppendorf 管加满,X 线照射(剂量分别为 20、30、50 Gy),并设立对照组,每分钟 X 线照射的剂量为 5 Gy,辐射剂量由辐照时间的不同来决定,X 线辐照条件由长海医院放疗科提供,本实验重复 3 次。

1.3 细胞即时活力测定 用锥虫蓝染色法。每组取 0.1 ml 细胞悬液于 Eppendorf 管中,再加入等体积的 0.2% 锥虫蓝染液,用吸管轻轻吹打混匀,染色 2~3 min,再用吸管稍稍吹打,以防细胞沉淀,然后吸取悬液 1 滴于细胞计数板上计数;取少量细胞悬液滴在计数室边缘的斜面上,使细胞悬液均匀充满在计数室内,静置 2~3 min,待细胞在计数室中下沉后,在低倍镜下计数,按以下公式计算细胞活力:细胞活力(%)=(细胞总数-死亡细胞数)/细胞总数×100%。

1.4 计算细胞存活率 以上述所计算的活细胞数为接种标准,将细胞悬液分别按一定比例接种于细胞 6 孔培养板中,对照组与各实验组均为 3 份,置于 37℃ 恒温条件下,体积分数为 5% CO₂ 培养箱中培养 5 d,然后将细胞取出,用甲醇:冰醋酸(3:1)固定

液固定 15 min,再以姬姆萨染液(以 PBS 1:10 稀释)染色 15~20 min,于低倍镜下计数细胞数大于 50 的克隆,计算公式为:接种效率(PE,%)=(对照组克隆数/细胞接种数)×100%;存活分数(SF)=(实验组克隆数/细胞接种数)/PE。

1.5 基因组样品制备 将对照组及实验各组经 X 线照射后的细胞,在辐照完成后立即进行基因组 DNA 的抽提,用离心柱型血液/细胞/组织 DNA 提取试剂盒(北京天为时代生物科技有限公司)抽提基因组 DNA,752 紫外分光光度计测定所抽基因组 DNA 的 D 值, $D_{260}/D_{280}=1.7$ 。

1.6 接头介导 PCR(LM-PCR)

1.6.1 单链延伸 用 X 线照射后的各实验组细胞和对照组细胞的基因组 DNA 为模板,以 mtDNA 编码区细胞色素 b 基因的 2 个引物(C1:5'-ATC CCA TAC ATT GGG ACA GAC-3'; C2:5'-GCC TCC TGT TGG TCA TTC GA-3')为延伸引物。反应体系为:模板 DNA 1 μl,10×PCR 缓冲液 2.5 μl,dNTP 混合物(各 2.5 mmol/L)2 μl,TaKaRa Taq 酶(5 U/μl)0.2 μl,单链延伸引物(50 μmol/L)各加 0.5 μl,加 ddH₂O 至 20 μl。反应条件均为:95℃ 水浴 5 min,60℃ 水浴 30 min。

1.6.2 接头制备 合成两条寡核苷酸,Linker 1:5'-GCG GTG ACT GGT ATC CAG TCG A -3'; Linker 2:5'-TCG ACT GGA T-3',经退火,两条寡核苷酸链可形成局部互补的双链接头。接头制备过程为,取 Linker 1(50 μmol/L)和 Linker 2(50 μmol/L)各 50 μl 混匀,95℃ 水浴 5 min,转移至 70℃ 水浴 3 min 后缓慢冷却至 4℃,然后置于-20℃ 保存。

1.6.3 接头连接 取上述单链延伸产物各 5 μl,置于 PCR 反应管中,再加配制好的接头 4 μl,加 T₄ DNA 连接酶(4 U/μl)0.5 μl 和 10×连接缓冲液 2 μl,ddH₂O 加至 20 μl,16℃ 连接 14~16 h。

1.6.4 PCR 合成 FAM 荧光(518 nm)标记的单链延伸引物,分别与 Linker 1 组成一对引物进行 PCR 扩增。50 μl PCR 反应体系为:接头连接产物 5 μl,Linker 1 和荧光标记的引物均为 1 μl(1 μmol/L),10×PCR buffer 5 μl,dNTP mixture(各 2.5 mmol/L)4 μl,TaKaRa Taq 酶(5 U/μl)0.5 μl,加 ddH₂O 至 50 μl。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 3 min,然后 94℃ 变性 40 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 40 s,共 30 个循环,之后 72℃ 延伸 5 min。

1.7 基因扫描 用胶回收试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)对上述 LM-PCR 产物进行胶回收,无

水乙醇和醋酸钠(3 mol/L)沉淀,70%乙醇洗涤后干燥,送往基康公司进行基因扫描。

2 结果

2.1 辐照后细胞即时活力 不同剂量(20、30、50 Gy)X 线照射后,细胞即时活力仍然较高,分别为(95.4±2.43)%、(92.9±0.97)%、(88.2±1.01)%,对照组为(98.5±1.71)%。

2.2 辐照后细胞存活率 不同剂量(20、30、50 Gy)X 线照射后,细胞存活率随剂量的增加呈明显下降趋势,分别为(7.10±0.12)%、(5.06±0.70)%、(1.82±0.41)%,对照组为(99.83±0.15)%。

2.3 断裂位点的检测 经 LM-PCR 结合碱性凝胶电泳实验观察大致损伤程度,再通过基因扫描得出具体损伤位点和频率。基因扫描检测发现,实验组与对照组相比较出现了明显的峰值,基因扫描图中峰所在的位置即受损碱基的位点,而峰值的高低则反映的是碱基的受损程度。扫描结果显示,mtDNA 编码区(细胞色素 b 基因)轻链在 nt15262 和 nt15283 出现断裂敏感位点,而 mtDNA 编码区重链则在 nt15708、nt15722、nt15674、nt15624 出现断裂敏感位点,比较二者的断裂位点的数量以及断裂程度可以看出 mtDNA 编码区重链较轻链损伤严重,见图 1。

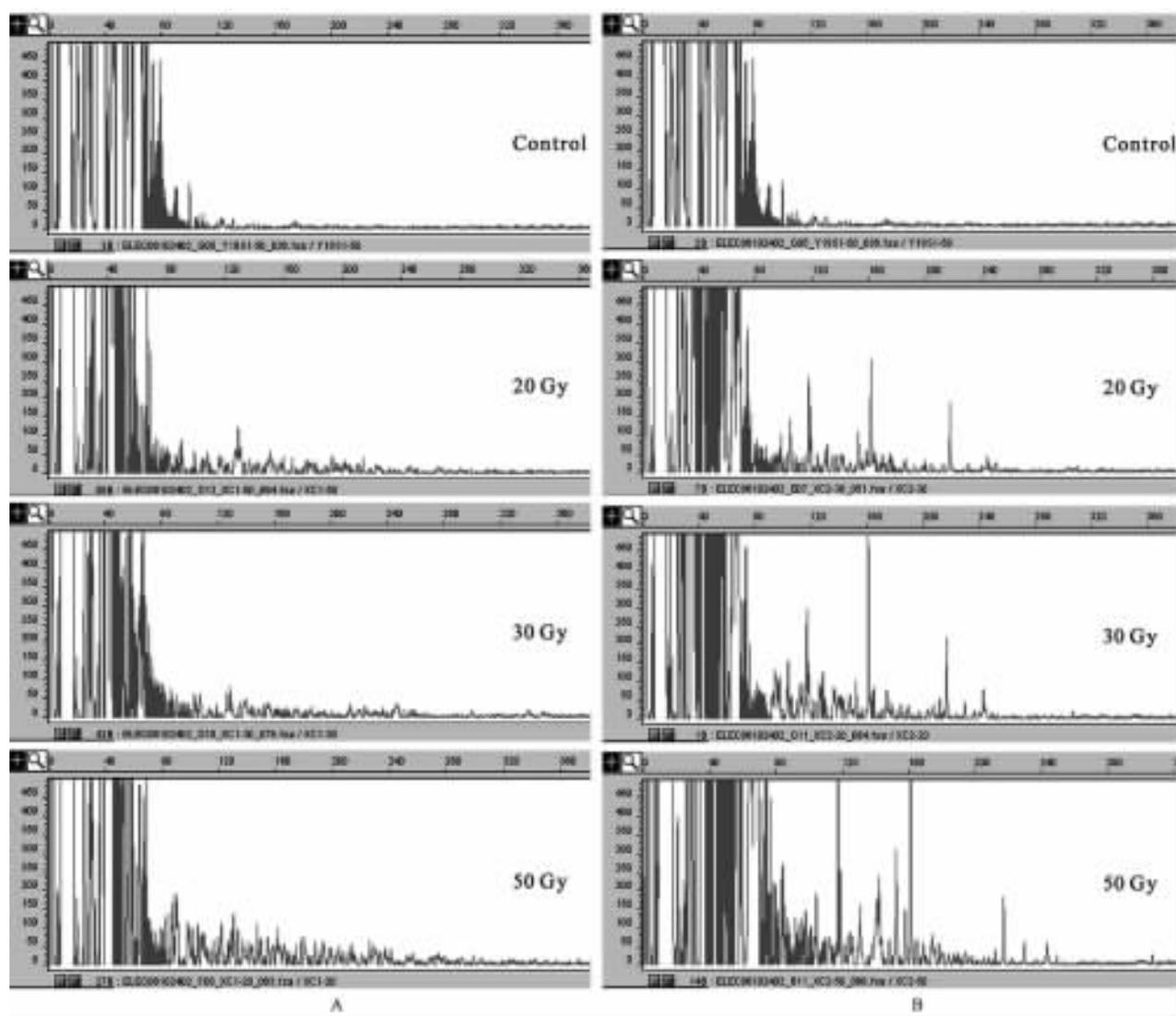


图 1 mtDNA 编码区经 X 线照射后轻链(A)和重链(B)的断裂损伤情况的基因扫描图

Fig 1 Gene scanning map of L-strand(A) and H-strand(B) within coding region of mtDNA irradiated with different doses of X-ray

3 讨论

射线引起细胞DNA断裂^[5]的途径有2种:直接损伤和间接损伤。直接损伤是射线直接作用于DNA分子引起DNA断裂;间接损伤主要是由射线照射导致细胞内的水分子发生电离,产生氧自由基(主要是·OH),这些自由基再和生物大分子发生作用,导致不可逆损伤,2种效应有同等的重要性。对肿瘤细胞进行放射治疗正是利用了DNA的这一特性,依靠电离辐射的作用使DNA发生断裂,从而诱导肿瘤细胞的死亡,达到治疗的目的。mtDNA是裸露在线粒体基质中的,与nDNA相比较,mtDNA缺乏组蛋白的保护,其损伤修复系统功能也不完善。所以mtDNA比nDNA更易受到损伤。mtDNA编码的所有基因对线粒体行使功能都是必需的,所以任何改变这些基因表达的损伤都有可能影响到整个细胞的正常生理功能,导致多种疾病的发生^[6-7]。

LM-PCR是研究较短区域内核苷酸损伤的有效方法^[8],通过检测产物的长度确定断裂位点的位置,检测产物的量确定断裂损伤的程度。通过研究实验结果我们发现一些规律:(1)检测到mtDNA编码区两条链上的断裂位点都不是随机分布的。长期以来,人们一直认为DNA的损伤和修复是随机进行的^[9]。然而,对DNA断裂是否随机分布至今尚未定论。有文献^[10]报道,低LET射线中, γ 射线诱导的DNA断裂也是随机分布的,X线引起的DNA双链断裂位点是随机分布的^[1-2],以上的报道均是以nDNA为研究基础得到的这些结论。本实验中用到的X线属于低LET射线,也是目前临床上用于肿瘤治疗的主要射线之一,应用X线放疗的最大剂量为60 Gy,本实验结果显示肿瘤细胞在接受20 Gy或30 Gy的辐照剂量时已达很低的存活率,暗示20 Gy或30 Gy可作为放疗的参考剂量;实验结果还显示,X线诱导的mtDNA断裂是非随机分布的,我们推测可能与DNA序列和射线的电离特性有关。(2)发现断裂位点的损伤程度随着剂量的增加呈递增趋势。由于DNA链断裂的量受到DNA链超螺旋度的影响^[11],即片段化后的DNA更容易产生断裂,很可能在原有的基础上再次发生断裂,造成大剂量下小片段的增多。(3)从受损核苷酸位点的碱基组成来看,在胸腺嘧啶(T)和鸟嘌呤(G)部位发生的断裂

占到了82%,这也从侧面证明了造成mtDNA断裂主要是通过间接途径实现的,因为T和G是羟自由基(·OH)的主要攻击对象,从而造成mtDNA的断裂多发生在这2个部位。(4)mtDNA编码区重链的损伤程度较轻链高,推测其原因可能是重链在转录时暴露较多,更易受辐射损伤之故。

综上所述,mtDNA与辐射生物学效应存在着密切关系,mtDNA的变化能够作为肿瘤细胞辐照前后损伤的一个重要指标,我们可将其作为细胞辐射敏感性研究的新的参考指数,同时对肿瘤的临床治疗提供一定的参考价值。

[参考文献]

- [1] Newman H C,Prise K M,Michael B D. The role of higher-order chromatin structure in the yield and distribution of DNA double-strand breaks in cells irradiated with X-rays or alpha-particles [J]. *Int Radiat Biol*,2000,76:1085-1093.
- [2] Martitute-López W,Folle G A,Cassina G,Méndez-Acuña L,Di-Tomaso M V,Obe G, et al. Distribution of breakpoints induced by etoposide and X-rays along the CHO X chromosome [J]. *Cytogenet Genome Res*,2004,104:182-187.
- [3] Mahjoub S,Sternberg D,Boussaada R,Filaut S,Gmira F,Mechmech R, et al. A novel mitochondrial DNA tRNA^{Ile} (m. 4322dupC) mutation associated with idiopathic dilated cardiomyopathy[J]. *Diagn Mol Pathol*,2007,16:238-242.
- [4] Beal M F. Mitochondria and neurodegeneration[J]. *Novartis Found Symp*,2007,287:183-192.
- [5] Prise K M,Newman H C,Folkard M,Michael B D. A study of DNA fragmentation patterns in cells irradiation with charged particles: evidence for non-random distributions[J]. *Phys Med*,1998,14(Suppl 1):20-23.
- [6] Craig K,Elliott H R,Keers S M,Lambert C,Pyle A,Graves T D, et al. Episodic ataxia and hemiplegia caused by the 8993T>C mitochondrial DNA mutation[J]. *J Med Genet*,2007,44:797-799.
- [7] Liu C Y,Lee C F,Wei Y H. Quantitative effect of 4977 bp deletion of mitochondrial DNA on the susceptibility of human cells to UV-induced apoptosis[J]. *Mitochondrion*,2007,7:89-95.
- [8] Steigerwald S D,Pfeifer G P,Riggs A D. Ligation-mediated PCR improves the sensitivity of methylation analysis by restriction enzymes and detection of specific DNA strand breaks [J]. *Nucleic Acids Res*,1990,18:1435-1439.
- [9] 夏寿萱. 放射生物学[M]. 北京:军事医学科学出版社,1998:78-79.
- [10] 周光明,李文建,王菊芳,何静,高清祥,陈炜,等. γ 射线诱导的肝癌细胞DNA双链断裂[J]. *核技术*,2000,23:776-779.
- [11] 邵春林,齐藤真弘,余增亮. 电离辐射诱导体外DNA链断裂机理研究进展[J]. *核技术*,2000,23:202-207.

[本文编辑] 尹茶