

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00137

## PTEN 在电离辐射诱导旁效应细胞中的表达变化

杨 剑, 韩 玲\*, 高 娴

第二军医大学海医系放射医学教研室, 上海 200433

**[摘要]** **目的:** 研究 PTEN 基因在旁效应细胞中的表达变化。**方法:** 采用未照射细胞与直接照射细胞按 1:1 共同培养, 以及将直接照射细胞培养液离心加入未照射细胞中培养形成 2 种旁效应细胞模型, 对比 PTEN mRNA 及蛋白表达在 2 种旁效应细胞、直接照射细胞、未照射细胞中的变化。**结果:** 直接照射的 PTEN 蛋白表达与照射剂量有关, 照射剂量越大其下调越为明显; PTEN 蛋白表达下调程度与细胞的处理方式有关, 以受照细胞培养液培养的旁效应细胞表达下调最为显著, 且 2 种旁效应细胞中 PTEN 蛋白的表达下调程度均高于直接受照细胞 ( $P < 0.01$ )。**结论:** PTEN 蛋白表达与低剂量电离辐射生物学效应及电离辐射旁效应的发生发展密切相关。

**[关键词]** PTEN; 电离辐射; 旁效应; 细胞增殖; 细胞周期

**[中图分类号]** R 818.74 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)02-0137-05

### Changes of PTEN gene expression in radiation-induced bystander cells

YANG Jian, HAN Ling\*, GAO Xian

Department of Radiation Medicine, Faculty of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the changes of PTEN gene expression in radiation-induced bystander cells. **Methods:** The irradiated cells and non-irradiated cells were co-cultured in a ratio of 1:1. The culture medium of irradiated cells was used to culture non-irradiated cells to create two bystander cell models. The expression of PTEN mRNA and protein in the bystander cells, irradiated cells, non-irradiated cells was compared. **Results:** The protein expression of PTEN in the irradiated cells was negatively associated with the irradiation dose. The down-regulation degree of PTEN protein was related to the different treatments of cells. The most prominent down-regulation was found in the bystander cells cultured with medium of irradiated cells. The down-regulation of PTEN protein in the two kinds of bystander cells was more severe than that in the irradiated cells ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** PTEN protein expression can be influenced by low dose radiation and the bystander effect of radiation.

**[KEY WORDS]** PTEN; ionizing radiation; bystander effect; cell proliferation; cell cycle

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(2):137-141]

辐射诱导旁效应(radiation-induced biologic bystander effect)是指未直接受照射细胞表现出与受照射细胞类似的生物学反应<sup>[1-2]</sup>。利用基因芯片技术可筛选出与旁效应密切相关的基因, 与张力蛋白在 10 号染色体同源缺失的磷酸酶(phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10, PTEN)就是其中之一, 它是迄今发现的第一个具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因<sup>[3]</sup>, 定位在染色体 10q23.3 上, 有 9 个外显子, 编码由 403 个氨基酸组成的蛋白。近年来有研究<sup>[4]</sup>表明 PTEN 与肿瘤的恶性增殖、侵袭和转移等生物学特性密切相关, 不仅在

诱导细胞周期的阻滞及细胞凋亡中起重要作用, 同时在调节细胞粘连、迁移和分化中发挥功能, 但它在旁效应细胞中的表达变化仍不十分清楚。

本研究应用不同剂量<sup>60</sup>Co $\gamma$ 射线照射人淋巴细胞(AHH-1)及受其影响的旁效应细胞中 PTEN 蛋白质的表达情况, 探讨其与旁效应发生的关系。

### 1 材料和方法

1.1 材料 人淋巴母细胞株 AHH-1(军事医学科学院馈赠); DMEM 培养基(Gibco, USA); 胎牛血清(杭州四季青生物有限公司); PTEN 引物: 上游引

**[收稿日期]** 2008-06-20 **[接受日期]** 2008-09-17

**[基金项目]** 国家自然科学基金(10575130). Supported by National Natural Science Foundation of China(10575130).

**[作者简介]** 杨 剑, 硕士. E-mail: yjian930\_dz@126.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81870351, E-mail: linghan8888@yahoo.com.cn

物 F 5'-CAC AGA ATT CCA GAC ATG ACA GCC ATC ATC-3', T<sub>m</sub> 54.5°C, 下游引物 R 5'-GTG GAT CCT CAT GGT GTT TTA TCC CTC TTG-3', T<sub>m</sub> 51.5°C, 目的片段长 1 209 bp, 由上海英俊生物技术公司合成; 抗体: 兔抗人 PTEN 多克隆抗体(100 μl) 购自 Cell Signaling 公司;

1.2 人淋巴母细胞株 AHH-1 细胞的培养 AHH-1 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 培养条件为 37°C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度, 悬浮培养, 隔天半量换液, 1 周传代。

1.3 实验分组 照射剂量率为 0.75 Gy/min。

对照组(C): 未照射细胞, 细胞密度为 1×10<sup>6</sup>/ml。

直接照射组(Z1: 0.5 Gy 照射细胞; Z2: 2 Gy 照射细胞; Z3: 5 Gy 照射细胞), 细胞密度为 1×10<sup>6</sup>/ml。

旁效应细胞模型(共同培养)的制备: 细胞照射后立即离心, 弃上清, 将直接受照细胞与未受照细胞按 1:1 比例在 Transwell(Corning 公司)中共同培养。细胞密度为 1×10<sup>6</sup>/ml。Transwell 为内置小室 6 孔板, 小室底部膜孔径为 0.4 μm, 可阻止细胞通过, 但允许培养液及细胞因子自由通过, 此未受照共同培养细胞为电离辐射诱导旁效应细胞。

旁效应细胞模型(培养液处理)的制备: 未照射细胞离心弃上清; 细胞照射后立即离心的上清加入未受照射细胞中共同培养。细胞密度为 1×10<sup>6</sup>/ml。

细胞处理好后, 在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下细胞培养箱中培养。

1.4 总 RNA 的提取、逆转录及 RT-PCR 检测 在冰上依次向逆转录产物反应管中加入 10 μl 5×PCR 缓冲液, 0.5 μl dNTP(10 mmol/L), PTEN F、R 引物(0.01 mmol/L)各 1 μl, 36.5 μl ddH<sub>2</sub>O, 最后加入 1 μl Taq Plus DNA 聚合酶(2.5 U/μl), 反应体积 50 μl。反应条件: 94°C 2 min, 然后 94°C 45 s, 55°C 1 min, 72°C 2 min, 25 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析。

1.5 总蛋白抽提 在照射后 0(即刻)、6、12、24 h 收集细胞(5×10<sup>6</sup> 个), 应用 NP-40 裂解液提取细胞总蛋白, 提取的总蛋白冻存于 -80°C 冰箱备用。蛋白质含量测定采用 Bradford 法。

1.6 免疫蛋白印迹法(Western blot)检测 蛋白样品在变性不连续 SDS-PAGE 电泳分离, 电转移至 PVDF 膜, 5% 牛奶封闭 2 h, 膜与抗体 4°C 孵育过夜, TBST 洗涤, HRP 标记二抗室温孵育 2 h, TBST 洗涤, 应用化学交联增强化学发光剂(ECL), 显影、定

影, X 线片洗涤干燥后电脑扫描记录。应用 Smart-View 密度分析软件进行扫描分析。以看家基因 β-actin 表达作为内对照校正。

1.7 Annexin V/PI 染色检测细胞凋亡 在照射后 24 h, 收集未受照细胞、受照细胞、受照细胞共培养细胞(2×10<sup>6</sup> 个), PBS 液充分洗细胞, 按照 Bender 公司 Annexin V/PI 凋亡试剂盒说明操作, 应用流式细胞仪(FACS)分析。

1.8 统计学处理 所得实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验。

## 2 结果

2.1 PTEN mRNA 的表达 未受照细胞、受照细胞、旁效应细胞中 PTEN 基因表达在不同培养条件、不同照射剂量和不同时间点检测变化均较小, 应用 SmartView 密度分析软件进行扫描分析, 受照细胞、旁效应细胞与未受照细胞相比均有下调趋势, 但变化不显著, 无统计学意义( $P > 0.05$ , 图 1)。

2.2 PTEN 蛋白的表达 结果显示: 与未受照细胞相比, 受照细胞、不同处理条件下的旁效应细胞中 PTEN 蛋白表达在不同照射剂量和不同时间点检测均下调, 变化明显(图 2)。

应用 SmartView 密度分析软件进行扫描分析, 受照细胞蛋白表达的下调程度与照射剂量有关, 随着照射剂量增大, 下调越为明显, 旁效应细胞蛋白表达下调程度与处理方式有关, 其中以照射后 12 h 变化最明显, 下调程度旁效应细胞(受照细胞培养液处理) > 旁效应细胞(共同培养细胞) > 受照细胞 > 未受照细胞, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ , 图 3)。但在照射后 12 h 检测点中, 受照细胞共培养的旁效应细胞组中, 0.5 Gy 旁效应细胞较 2 Gy 旁效应细胞 PTEN 表达下调更显著, 与前期基因芯片结果一致, 提示 PTEN 基因与低剂量电离辐射生物学效应及电离辐射旁效应的发生存在非常密切关系, 且考虑 PTEN 在低剂量电离辐射旁效应的发生、发展中起着较为重要的作用。

2.3 细胞增殖的变化 细胞生长曲线分析发现, 受照细胞及旁效应细胞较未受照细胞增殖能力均有所下降, 随照射剂量的增大, 增殖能力下降越明显(图 4), 在细胞生长 10 d 后, 除 0.5 Gy 照射组外, 其他各照射组的细胞数与对照组相比均有显著下降( $P < 0.05$ , 表 1)。受照射细胞组细胞增殖能力下降最为明显, 旁效应细胞组中培养液处理各组下降较共同培养组明显。

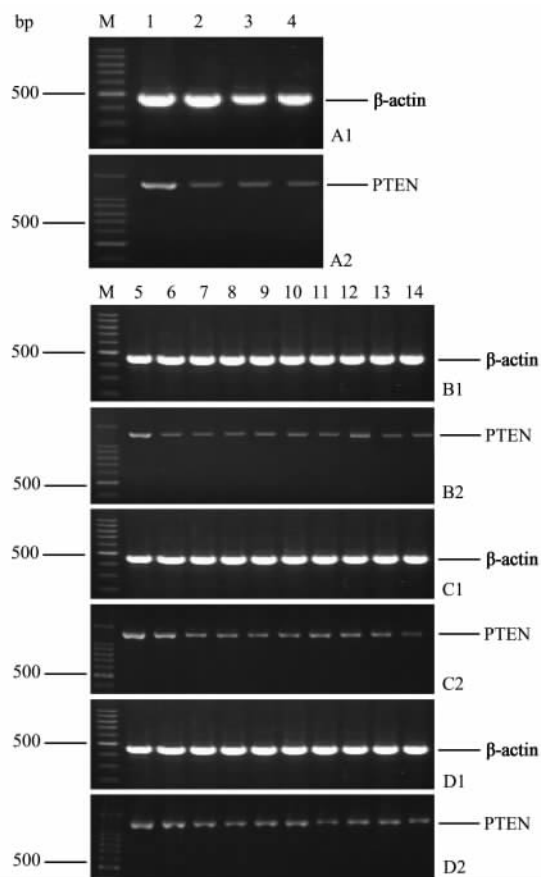


图 1 未受照及照后 0 h(A1, A2)、6 h(B1, B2)、12 h(C1, C2)、24 h(D1, D2) 各组 AHH-1 细胞  $\beta$ -actin、PTEN 基因 mRNA 的表达

Fig 1  $\beta$ -actin, PTEN gene mRNA expression in normal and irradiated 0 h(A1, A2), 6 h(B1, B2), 12 h(C1, C2), 24 h(D1, D2) cells

M; 100 bp DNA ladder marker; 1; Normal; 2; Irradiated 0.5 Gy; 3; Irradiated 2 Gy; 4; Irradiated 5 Gy; 5-8; Irradiated 0, 0.5, 2, and 5 Gy; 9-11; Co-culture with irradiated 0.5, 2, and 5 Gy; 12-14; Transacted by irradiated culture medium 0.5, 2, and 5 Gy

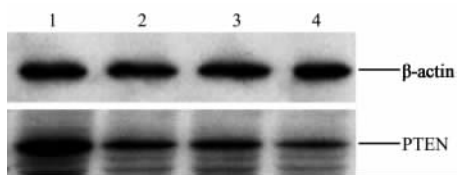


图 2 未受照及照后即刻各组 AHH-1 细胞中  $\beta$ -actin、PTEN 蛋白的表达

Fig 2  $\beta$ -actin, PTEN protein expression in normal AHH-1 cells and those immediately after irradiation

1; Normal; 2; Irradiated 0.5 Gy; 3; Irradiated 2 Gy; 4; Irradiated 5 Gy

2.4 PI 单染检测细胞周期的变化 细胞内的 DNA 含量随细胞周期进程发生周期性的变化, 利用 PI 染色方法, 通过流式细胞仪对细胞内的 DNA 的

相对含量进行测定, 可分析细胞周期各个时相的百分比, 实验重复 3 次。在本实验中我们发现, 受照细胞在照射后即刻各照射剂量组各期的细胞比例与对照组相比并无明显改变, 但在照后 12 h 随着照射剂量的增大, 处于  $G_1$ 、S 期的细胞明显减少, 而  $G_2$  期的细胞显著增多。旁效应细胞也出现相同的改变, 细胞  $G_2$  期受阻滞的程度趋势为: 直接受照细胞 > 受照细胞培养液处理细胞 > 受照细胞共同培养细胞 (图 5)。表明照射能使未经照射的旁效应细胞出现与受照细胞相同的  $G_2$  期阻滞现象。

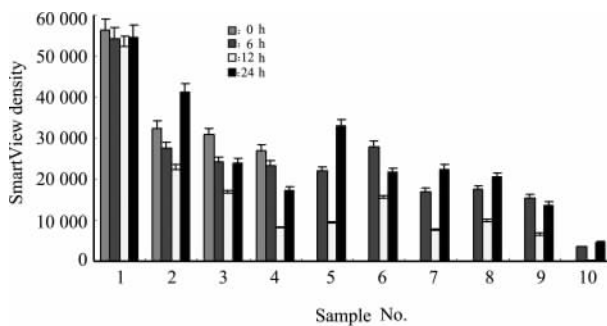


图 3 照射后不同时间未受照细胞、受照细胞、旁效应细胞 PTEN 蛋白表达

Fig 3 PTEN protein expression in normal, irradiated, and bystander effect cells at different time points after irradiation

1-4; Irradiated 0, 0.5, 2, and 5 Gy; 5-7; Co-culture with irradiated 0.5, 2, and 5 Gy; 8-10; Transacted by irradiated culture medium 0.5, 2, and 5 Gy;  $n=34, \bar{x} \pm s$

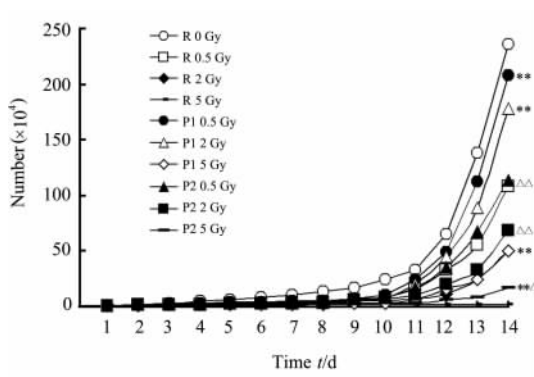


图 4 未受照细胞、受照细胞和旁效应细胞的细胞生长曲线

Fig 4 Cell growth curve in normal, irradiated, and bystander effect cells

R; Irradiated cell; P1; Co-cultured with irradiated cell; P2; Transacted by irradiated culture medium. \* \*  $P < 0.01$  vs irradiated cell group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs co-culture with irradiated cells

2.5 Annexin V/PI 双标检测细胞早期凋亡 结果表明: 在照射后即刻照射细胞各照射剂量组细胞早期凋亡率与对照组比较无明显变化, 照后 24 h 早期凋亡

的细胞明显增加且随着照射剂量的增加而增加(图6)。旁效应细胞组在处理24 h早期凋亡的细胞也明显增加,与对照组相比均有统计学差异( $P < 0.01$ ),

但与照射剂量无明显联系,表明与照射细胞共培养或用照射细胞培养处理的细胞均可产生与照射细胞相同的早期细胞凋亡率增加的现象。

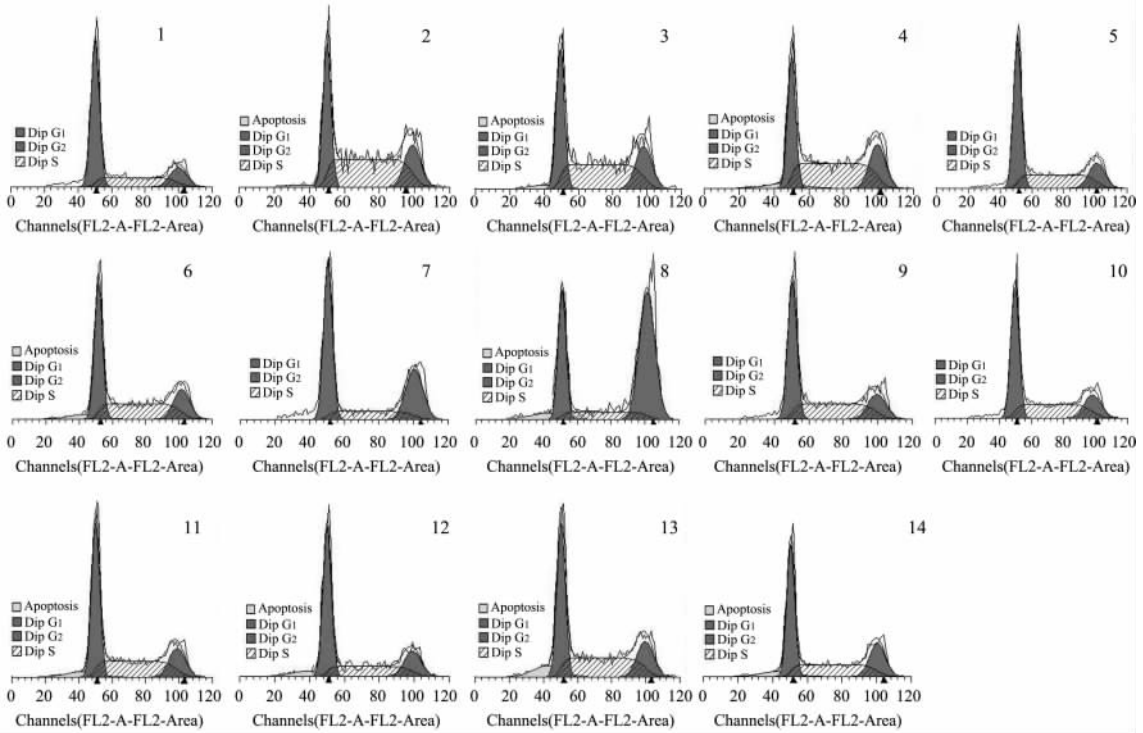


图5 照射后即刻及照射后12 h未受照细胞、受照细胞和旁效应细胞周期变化

Fig 5 Cell cycle of cells in normal, irradiated-immediately, irradiated 12 h later groups and bystander effect cells

1-4: Irradiated 0, 0.5, 2, and 5 Gy; 5-7: Co-cultured with irradiated 0.5, 2, and 5 Gy; 8-10: Transacted by irradiated culture medium 0.5, 2, and 5 Gy

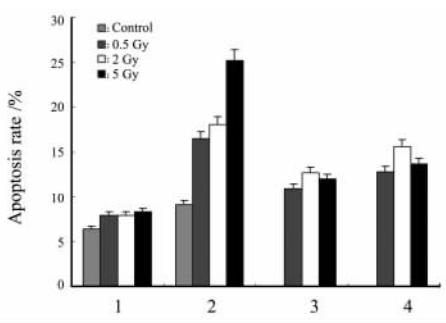


图6 照射后各组细胞凋亡率变化比较

Fig 6 Early apoptosis cells in normal, irradiated-immediately, irradiated 24 h later groups and bystander effect cells

1: Irradiated immediately group; 2: Irradiated 24 h group; 3: Co-cultured with irradiated 24 h group; 4: Transacted by irradiated culture medium 24 h;  $n = 14, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

PTEN 作为第一个具有磷酸酶活性的抑癌基因,自发现以来就备受关注。在电离辐射中,PTEN 的表达变化已被学者证实<sup>[5]</sup>,但国内外关于 PTEN

在电离辐射旁效应细胞中的表达研究甚少。随着对辐射损伤研究的深入,旁效应被发现,对深入理解电离辐射生物效应本质,揭示辐射致癌分子机制具有重要的理论意义和实际价值。大量实验均观察到旁效应的存在,然而目前尚未对产生旁效应的机制有统一的定论。

我们的研究结果显示:(1)直接照射及旁效应细胞的 PTEN 蛋白表达与照射剂量有关,照射剂量越大其下调越为显著。在照射后 12 h 变化最显著,在照射后 24 h PTEN 表达量有所增高,由此我们分析,AHH-1 细胞在受到辐射损伤后,于照射后 12 h 逐步启动自身修复功能,对其自身损伤进行修复。PI 单染检测细胞周期的变化中显示,照后 12 h 随着照射剂量的增大,处于 G<sub>1</sub>、S 期的细胞明显减少,而 G<sub>2</sub> 期的细胞显著增多,G<sub>2</sub> 期停滞的目的也是进行检查和修复。(2)PTEN 蛋白表达下调程度与细胞的处理方式有关,以受照细胞培养液培养的旁效应细胞表达下调最为显著,且 2 种旁效应细胞中 PTEN 蛋白的表达的下调程度均高于直接受照细

胞。(3)与受照细胞共同培养产生的旁效应细胞组, 0.5 Gy 旁效应细胞较 2 Gy 旁效应细胞 PTEN 表达下调更显著,推测 PTEN 对低剂量电离辐射更为敏感,与低剂量电离辐射旁效应细胞的发生、发展有一定关系,考虑两者具有协同关系,提示 PTEN 蛋白表达与低剂量电离辐射生物学效应及电离辐射旁效应的发生发展密切相关。

另外,细胞凋亡检测结果显示,受照细胞早期凋亡率随照射剂量的增大而增高,且旁效应细胞的凋亡率较未受照细胞也有所上升,结合细胞中 PTEN 蛋白的表达抑制情况,推测 PTEN 蛋白是通过影响细胞凋亡的过程,从而在旁效应的发生过程中起调节作用。但 PTEN 在电离辐射旁效应细胞中的表达机制及作用目前尚不是很清楚,还有待进一步研究。

#### [参考文献]

[1] Morgan W F. Is there a common mechanism underlying genomic instability, bystander effects and other nontargeted effects of

exposure to ionising radiation[J]? *Oncogene*, 2003, 22: 7094-7099.

[2] Little J B. Genomic instability and bystander effects: a historical perspective[J]. *Oncogene*, 2003, 22: 6978-6987.

[3] Li J, Yen C, Lliaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang S I, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer [J]. *Science*, 1997, 275: 1943-1947.

[4] Persad S, Attwell S, Gray V, Delcommenne M, Troussard A, Sanghera J, et al. Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 3207-3212.

[5] Colakoglu T, Yildirim S, Kayaselcuk F, Nursal T Z, Ezer A, Noyan T, et al. Clinicopathological significance of PTEN loss and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in sporadic colorectal neoplasms: is PTEN loss predictor of local recurrence[J]? *Am J Surg*, 2008, 195: 719-725.

[本文编辑] 尹 茶

#### • 书 讯 •

### 《中国泌尿外科学史》已出版

本书由那彦群、孙则禹、叶章群等著,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-81060-608-0,16开,定价150.00元。

本书详细介绍了中国泌尿外科发展史、历届中华泌尿外科学委员会的组成、中华医学会泌尿外科学分会历届全国学术交流大会简述、《中华泌尿外科杂志》简史及历届编委会组成;各直辖市、省、自治区及港、澳、台地区泌尿外科的发展史、学术交流史及重要学术贡献。本书还编撰了各届重要委员及早年或近代为中国泌尿外科学发展作出过贡献的前辈的人物小传、我国泌尿外科重要的专著目录,包括全国泌尿外科医师名录及中国泌尿外科学者参加历届国际泌尿外科协会会员名单。

本书出版后在京举行了中华医学会系统面市发布会,受到医学各科专业委员会领导的好评,他们认为,本书是国内第一部完整记录医学学科发展史,史料真实、可信,值得其他学科学习借鉴,为其他学科发展史的编撰起到很好的示范和推动作用,对忠实记载和收藏我国医学发展史有重要价值,对促进我国泌尿外科的发展也有非常重要的作用。

本书作者简介:那彦群,北京大学泌尿外科研究所所长、教授、主任医师、博导,中华医学会泌尿外科分会主任委员,《中华泌尿外科杂志》主编,著书10多部,发表论文300多篇;孙则禹,南京鼓楼医院泌尿外科主任、主任医师、教授、博导,中华医学会泌尿外科分会副主任委员,《中华泌尿外科杂志》副主编,著书10多部,发表论文百余篇;叶章群,华中科技大学同济医学院同济医院泌尿外科主任、教授、主任医师、博导,中华医学会泌尿外科分会副主任委员,《中华泌尿外科杂志》副主编,著书10多部,发表论文百余篇。

本书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.com>