

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00725

DNA 氧化损伤修复基因 hOGG₁ 高表达细胞株的建立

王 昱^{1,2}, 卢仲毅², 许 峰², 朱宇熹^{3,4*}

1. 第三军医大学西南医院儿科, 重庆 400038

2. 重庆医科大学附属儿童医院, PICU, 重庆 400014

3. 重庆医科大学附属第一医院肿瘤科, 重庆 400016

4. Department of Radiation Oncology & Image-applied Therapy, Kyoto University Graduate School of Medicine, 606-8225 Japan

[摘要] **目的** 联合 pcDNA3.1(+)/Myc-HisA-hOGG₁ 和 pGL3 promoter 荧光质粒稳定转染人肺癌 A549 细胞获得 hOGG₁ 基因高表达细胞株, 并初步探讨转染细胞生物学特性的变化。**方法** 成功构建 pcDNA3.1(+)/Myc-His A 载体后, 大量抽提阳性重组子并在 Fu GENE 6 的介导下联合 pGL3 promoter 荧光质粒转染 A549 细胞(转染组), 同时设空白对照组(A549)和阴性对照组[PGL3+pcDNA3.1(+)/Myc-HisA 转染的 A549 细胞]。生物荧光检测转染细胞 hOGG₁ mRNA 表达的改变, 蛋白质免疫印迹法检测转染细胞 hOGG₁ 蛋白表达水平。将 3 组细胞于不同高氧条件下培养, 相差显微镜观察形态学变化, 彗星试验比较各组细胞对抗损伤和修复能力的情况, 同时测定 DNA 氧化损伤标志物 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)的变化。**结果** 转染细胞荧光素酶稳定表达, 蛋白印迹检测转染组 hOGG₁ 蛋白明显高于两对照组细胞, 提示 hOGG₁ 基因高表达细胞株建立成功。相同高氧条件下, 转染组形态学变化明显减轻, 彗星细胞率和 olive tail moment 明显低于空白组和阴性对照组, 修复完成率高, 修复时间缩短($P < 0.05$), 测定氧化损伤标志物 8-OHdG 明显下降, 提示细胞对抗 DNA 损伤和修复能力均增高($P < 0.05$)。**结论** hOGG₁ 基因的高表达可减轻细胞对 DNA 氧化损伤的敏感性, 提升细胞 DNA 的修复能力。

[关键词] hOGG₁ 基因; 共转染; 彗星试验; DNA 损伤修复

[中图分类号] Q 78 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)07-0725-06

Establishment of a lung cancer cell line A549 highly expressing DNA oxidative damage related repair gene hOGG₁

WANG Yu^{1,2}, LU Zhong-yi², XU Feng², ZHU Yu-xi^{3,4*}

1. Department of Pediatrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

2. Department of PICU, the Affiliated Pediatric Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China

3. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

4. Department of Radiation Oncology & Image-applied Therapy, Kyoto University Graduate School of Medicine, 606-8225 Japan

[Abstract] **Objective** To establish a human lung cancer cell line A549 highly expressing human 8-oxoguanine-DNA glycosylase (hOGG₁) by co-transfecting pcDNA 3.1(+)/Myc-HisA-hOGG₁ and PGL3 promoter, and to observe the biological behavior of the transfected cells. **Methods** PcDNA3.1(+)/Myc-His A-hOGG₁ and PGL3 promoter were steadily co-transfected into A549 cells *via* mediation of Fu GENE 6 (transfected group); untransfected cells served as blank control and cells transfected with PGL3+pcDNA3.1(+)/Myc-HisA served as negative control. The hOGG₁ mRNA expression in A549 cells was detected by Bio-luciferase activity and the hOGG₁ protein expression by Western blotting analysis. Cells in the three groups were exposed to hyperoxia condition, and the morphological changes were observed by phase-contrast microscope. Comet cell rate and olive tail moment of cells were tested after different exposure periods. After exposure, the cells were incubated for 0, 60, 120, and 180 min, and the same indices were determined by modified comet assay; changes of DNA oxidative damage markers 8-hydroxy-desoxoguanosine (8-OHdG) was tested at the same time. **Results** The bio-luciferase activity was stable in the co-transfected cells. Western blotting analysis showed that the expression of hOGG₁ protein in co-transfected A549-T cells was significantly higher than those in the other two groups, indicating the successful establishment of hOGG₁ highly expressing cells. Under the same hyperoxia condition, the morphological changes of transfected cells were greatly alleviated, and the Comet cell rate and olive tail moment of cells were obviously lower than those of the other two groups($P <$

[收稿日期] 2010-01-13 **[接受日期]** 2010-05-17

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30670931), 重庆市自然科学基金(2006BB5035). Supported by National Natural Science Foundation of China(30670931) and Natural Science Foundation of Chongqing(2006BB5035).

[作者简介] 王 昱, 博士, 讲师、主治医师. E-mail: ewy009@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:0081-909-995-0519(Japan), E-mail: zhuyuxi17@hotmail.com

0.05)。Transfected A549-T cells had significantly increased ability of DNA repair and shorter repair time compared with cells in the other two groups ($P < 0.05$). Furthermore, the level of 8-OHdG in transfected A549-T cells was significantly lower than those of the other two groups under the same hyperoxia condition, indicating a significantly higher ability of DNA damage resisting and repair ($P < 0.05$). **Conclusion** High hOGG₁ expression can decrease the cell sensitivity to DNA damage and improve the repair ability of cells.

[Key words] hOGG₁; co-transfection; comet assay; DNA damage and repair

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(7): 725-730]

在正常情况下,细胞每天可产生 10^{11} 个活性氧分子(reactive oxygen species, ROS),诱发自由基攻击 DNA。在各种 DNA 氧化损伤中,鸟嘌呤 8 位碳原子氧化后形成的 8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-desoxyguanosine, 8-OHdG)是形成频率最高、致突变能力最强的产物,被公认为 DNA 氧化损伤和细胞内氧化应激的指示剂^[1]。人类 8-羟基鸟嘌呤 DNA 糖苷酶(human 8-oxoguanine DNA glycosylase, hOGG₁)是 hOGG₁ 基因编码的蛋白,同时具有糖苷酶和 AP 裂解酶活性,最主要的功能是修复 DNA 的氧化损伤,包括 8-OHdG 的切除,在维持基因组稳定和肿瘤预防上具有举足轻重的作用^[2]。本室成功构建了 pcDNA3.1(+)/Myc-His A-hOGG₁ 质粒,并通过共转染的方法获得人肺腺癌 A549 细胞 hOGG₁ 高表达细胞株,初步研究 hOGG₁ 高表达对细胞生物学行为以及对氧化剂诱导的 DNA 氧化损伤与修复的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料及仪器 PGL3 promoter (TaKaRa); pcDNA3.1(+)/Myc-His A 真核表达载体(本室构建); A549 肺癌细胞株(本室保存), Polyfection 转染试剂(Qiagen), DMEM 细胞培养液(Gibco); RNase 抑制剂(TaKaRa), G418 和 Triton X-100 (Invitrogen), Bio Spec-mini DNA/RNA/PROTEIN Analyzer (Shimadzu), NC 膜(Pierce), 单细胞凝胶电泳彗星分析试剂盒(Gemmed), 其他试剂为国产分析纯。高氧细胞培养箱(Sanyo); 荧光显微镜(Leica); PCR 扩增仪(Biometra); POWER/PAC3000 型电泳仪、UVI 凝胶成像系统、Mini Trans-Blot Electrophoresis Transfer Cell(Bio-Rad)。

1.2 hOGG₁ 基因高表达细胞株的建立和鉴定 pcDNA3.1(+)/Myc-His A-hOGG₁ 由本室前期实验构建完成。构建产物经酶切后 Bio Spec-mini DNA IRNA/PROTEIN Analyzer 测序鉴定目的基因, 保证插入基因的正确性。设立空白对照组(A549)、阴性对照组[PGL3+pcDNA3.1(+)/Myc-HisA, A549-P]、转染组[PGL3+pcDNA3.1(+)/Myc-HisA-hOGG₁, A549-T]。转染组按 9:1 比例配制质粒 pcDNA3.1(+)/Myc-His A-hOGG₁ 和 pGL3 promoter, 阴性对照组将

pcDNA3.1(+)/Myc-His A 换成 pcDNA3.1(+)/Myc-His A, 配制比例一致。荧光显微镜下挑选转染成功细胞克隆, G418 筛选出稳定转染的阳性细胞克隆。取稳定转染后 3 组细胞, 每组 4 孔, 每孔 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 个细胞, 蛋白印迹法检测 3 组细胞 hOGG₁ 蛋白水平, 每孔重复测定 3 次。

1.3 转染对细胞生物学特性的影响 (1)形态学观察 3 组细胞外观形态变化; (2)MTT 比色法观察细胞生长速度; 用平均 D 值与各时间点为横纵坐标绘制细胞生长曲线, 连续 7 d 后绘制细胞生长曲线。细胞倍增时间按 ($T_D = t \times \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$) 计算, 其中 T_D 为细胞倍增时间, t 为培养时间, N_t 为培养时间后终末细胞数, N_0 为初种细胞数。(3)流式细胞仪测定各组细胞细胞周期、凋亡率和增殖指数 [$PI = (S + G_2/M) / (G_0/G_1 + S + G_2/M) \times 100\%$] 的变化。

1.4 三组细胞对高氧培养处理下的 DNA 损伤和修复效应比较 3 组细胞常规培养流程处理并置于高氧培养箱内, 培养液暴露于 95% 高氧环境中, 并分别于 0、12、24、48 h 收集标本检测分析。检测指标: (1)部分细胞 4% 多聚甲醛-PBS 固定 10 min, 相差显微镜进行形态学观察。(2)部分细胞常规消化离心后, 改良彗星实验^[3] 观察 DNA 损伤效应, 彗星图像用专用软件 Kinetic Comet 4.0 分析, 根据彗星尾长 (tail length, TL) 及拖尾细胞数 (tail cell, TC) 计算出彗星尾矩 (olive tail moment, TM)。(3)取部分 95% 高氧浓度下 24 h 和 48 h 的细胞, 高氧处理完毕后置含小牛血清完全培养液 37℃ 继续培养, 分别于 0、60、120 和 180 min 取出细胞, 离心收集后, 改良彗星试验法检测 DNA 修复情况。(4)DNA 氧化损伤标志物 8-OHdG 的测定: 按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 以标准物的浓度为横坐标 (对数坐标), D 值为纵坐标 (普通坐标), 在半对数坐标纸上绘出标准曲线, 根据样品的 D 值由标准曲线查出相应的浓度; 再乘以稀释倍数, 即为样品的实际浓度。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本均数比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Dunnett's t 检验。检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 插入目的基因的鉴定 *EcoR* I / *Kpn* I 双酶切连接构建的 pcDNA3.1(+)/Myc-His A-hOGG₁, 凝胶电泳确认二者长度与估计大小基本一致(hOGG₁ 为 1 200 bp, pcDNA3.1/myc-His A 为 5 346 bp, 图 1)。测序结果显示质粒里插入片段的序列与 GenBank 公布的 hOGG₁ 基因编码序列相同。

2.2 hOGG₁ 基因高表达细胞株的鉴定 连续 5 d 检测细胞荧光酶活性, 转染组细胞荧光酶稳定, 提示在携带目的基因的共转染组中 hOGG₁ mRNA 出现了与荧光素酶同步的高表达。经蛋白印迹检测, 转染组 hOGG₁ 蛋白表达水平较阴性对照组和空白对照组明显升高(图 2)。

2.3 转染对细胞生物学特性的影响

2.3.1 一般形态学 3 种细胞软琼脂克隆形成数之间无明显差异, 各组细胞均显示典型的 A549 细胞的多角形或梭形形态, 高倍镜下可见细胞间连接, 细胞形态饱满, 核质明显。

2.3.2 细胞生长速度和倍增时间 3 组细胞的生长速度相似, 初期平稳增加, 于第 3 天进入快速增殖期, 第 4 天开始进入平台期, 以后开始逐步下降。A549、A549-P 和 A549-T 组细胞的群体细胞倍增时间分别为 2.17、2.09 和 2.15 d, 3 组细胞各时间点数据比较差异均无统计学意义。

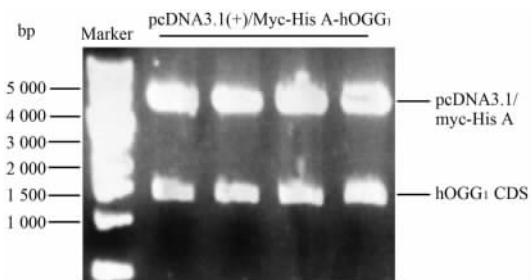


图 1 重组质粒 *EcoR* I / *Kpn* I 双酶切片段鉴定

Fig 1 Electrophoresis of recombinant plasmid by *EcoR*I/*Kpn*I

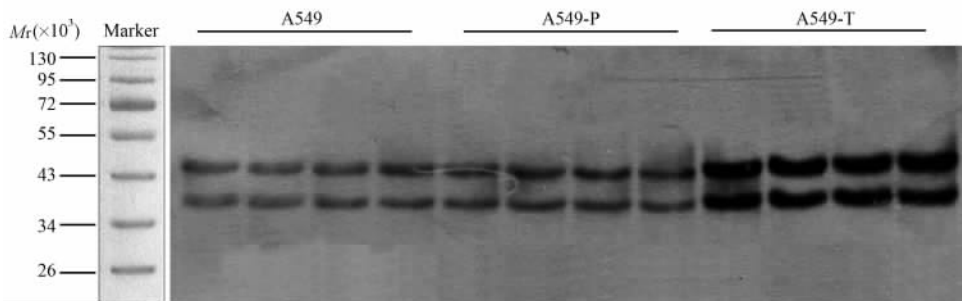


图 2 蛋白印迹法检测 3 组 A549 细胞转染后 hOGG₁ 蛋白水平的比较

Fig 2 Variation of hOGG₁ protein expression in A549 cells after transfection detected by Western blotting analysis

2.3.3 细胞周期和凋亡率的变化 流式细胞术检测结果见表 1, A549 组、A549-P 组和 A549-T 组细胞相比, 细胞周期的分布没有明显改变。各组细胞

凋亡率和细胞增殖指数之间亦无统计学差异。表明转染质粒和 hOGG₁ 基因均未对细胞周期的分布产生明显影响。

表 1 采用流式细胞术检测 3 组细胞细胞周期结果

Tab 1 Analysis of cell cycle apoptosis and proliferation index by flow cytometry

(n=3, $\bar{x} \pm s$)

Group	Apoptosis rate (%)	Cell cycle			Proliferation index (%)
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
A549	5.88±0.75	55.35±0.20	38.27±0.43	6.30±0.39	41.20±0.26
A549-P	4.87±0.81	58.66±0.80	33.11±1.87	8.23±2.30	40.27±0.80
A549-T	5.62±1.33	58.44±1.39	35.43±3.41	6.13±1.97	40.60±1.39

2.4 各组细胞对高氧诱导的损伤效应

2.4.1 形态学变化 相差显微镜下直接观察细胞形态(图 3), 可见暴露开始(0 h)时, 各组细胞均呈上皮样细胞贴壁生长, 多呈梭形、纺锤形, 排列紧密, 核仁清楚, 组间无明显差异。高氧暴露后, 细胞分布逐

渐稀疏, 细胞体积变小, 皱缩呈圆形, 部分细胞内出现空泡、细胞核浓染, 提示细胞可能发生了凋亡样改变, 随着时间的增加, 以上损伤呈现逐步加重趋势。高氧暴露 24 h 后, A549 与 A549-P 细胞失去基本形态, 暴露 48 h 后, 视野内细胞普遍固缩浓染, 失去活

性迹象。A549-T 较其他两组形态变化明显轻微,随着时间的推移,差异更加明显,即使高氧暴露 48 h

细胞原形态依然维持较好,提示 A549-T 对抗氧化损伤能力强于其他两组,并可能存在主动修复行为。

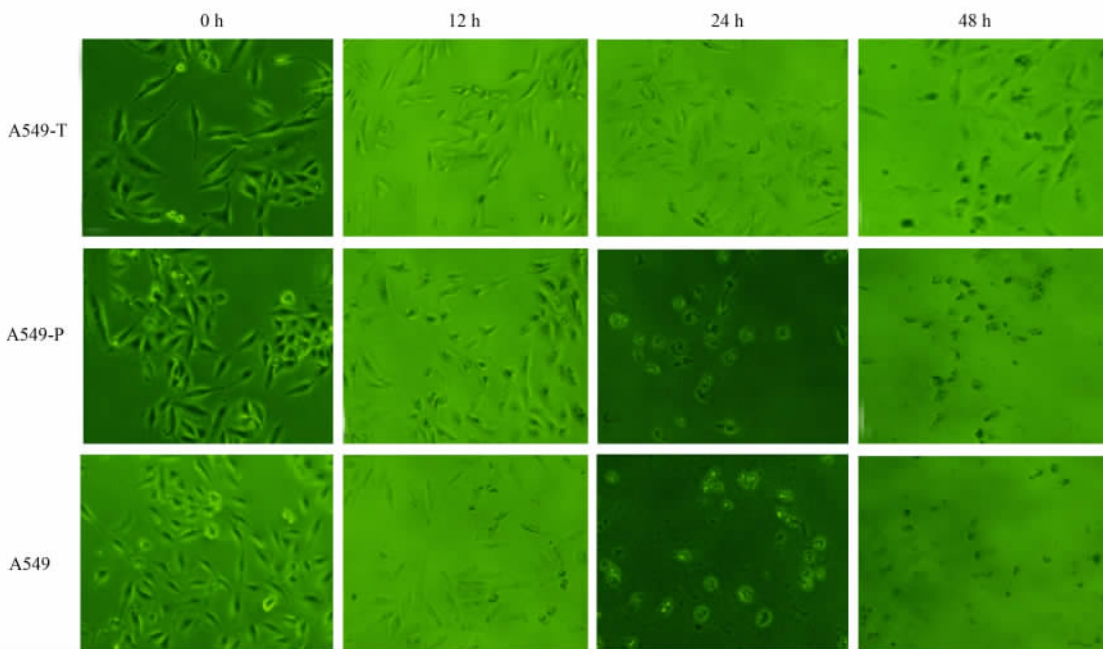


图 3 不同时间高氧处理对细胞形态学的影响

Fig 3 Morphological change of A549 cells at different time points of exposure to hyperoxia

2.4.2 DNA 损伤效应 彗星试验中,正常状态细胞在荧光下仅显像圆形彗星头部,无拖尾变形(图 4A)。高氧暴露后,各种细胞均表现出不同程度 DNA 损伤,无论是拖尾率还是彗星尾矩,均随高氧暴露时间的增加而增加。从表 2 可以看出,当高氧暴露 12 h 时,拖尾细胞开始出现,表明细胞损伤开始出现,但 3 组细胞指标无明显统计学差异,这与形态学变化基本一致。当时间延长到 24 h 时,空白组

和阴性对照组拖尾率明显高于转染组,断裂样拖尾增多,尾矩与 A549-T 细胞组相比增大($P < 0.05$)。高氧暴露 48 h 后,以上数据变化更加明显,彗星细胞头部由圆形强荧光到点状弱荧光,而尾部渐增大,荧光由弱到强(图 4B~4F),彗星细胞核缩小尾宽大似凋亡样(图 4F)。相较之下,转染组细胞(A549-T)变化明显轻微,提示 A549-T 细胞对高氧引起的 DNA 损伤有对抗作用。

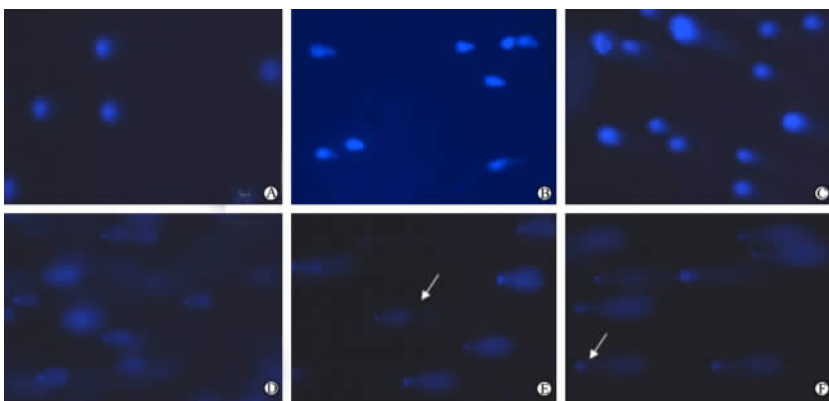


图 4 彗星实验显示 95%高氧诱导 48 h 后 A549 细胞的 DNA 损伤

Fig 4 Comet images of A549 cells exposed to 95% oxygen for 48 hours

A: Normal cell; B-F: Fluorescence of comet cell heads weakened gradually, and the tails became longer with stronger fluorescence expression. Arrows show tails of comet cells fractured. Original magnification: $\times 200$

2.4.3 DNA 修复效应 本实验中,有统计学意义的修复开始时间,在 A549-T 细胞是 60 min,而在空

白组和阴性对照组却延迟到了 120 min。表 3 数据显示,A549-T 细胞可以完全修复不同时间高氧暴露

诱导的 DNA 损伤。而空白组和阴性对照组除了修复开始时间延迟外, 还有 7% 和 11% 的损伤细胞最终不能完成修复过程 ($P < 0.05$)。当暴露时间延长到 48 h, 在 180 min 未能完成修复的细胞比例高达 40%, 且与 120 min 时相比, 修复速度明显减慢。以

上结果提示, A549-T 细胞对高氧诱导的 DNA 损伤有着比 A549 细胞和 A549-P 细胞更强、更快、更完全的修复能力。而 A549 细胞和 A549-P 细胞修复能力无明显差异, 提示修复能力的提高来自于 hOGG₁ 的作用而与转染的质粒本身无关 (表 3)。

表 2 高氧诱导下 DNA 损伤对各组细胞的影响

Tab 2 Effect of hyperoxia on cell DNA damage of A549 cells in three groups

($n=3$)

Exposure time <i>t</i> /h	A549		A549-P		A549-T	
	Comet cell (%)	Olive tail moment ($\bar{x} \pm s$)	Comet cell (%)	Olive tail moment ($\bar{x} \pm s$)	Comet cell (%)	Olive tail moment ($\bar{x} \pm s$)
0	0	0	0	0	0	0
12	10*	4.61 ± 1.62*	11*	5.94 ± 0.21*	11*	4.06 ± 0.43*
24	96*	18.30 ± 3.95*	100*	18.37 ± 2.40*	27*▲	8.72 ± 1.88*▲
48	100*	47.22 ± 1.62*	100*	47.62 ± 4.37*	73*▲	18.21 ± 0.53*▲

* $P < 0.05$ vs 0 h; ▲ $P < 0.05$ vs A549 and A549-P

表 3 高氧诱导 DNA 损伤后各组细胞修复效应

Tab 3 Effect of hyperoxia on cell DNA repair of A549 cells in three groups

($n=3$)

Exposure time <i>t</i> /h	Repair time <i>t</i> /min	A549		A549-P		A549-T	
		Comet cell (%)	Olive tail moment ($\bar{x} \pm s$)	Comet cell (%)	Olive tail moment ($\bar{x} \pm s$)	Comet cell (%)	Olive tail moment ($\bar{x} \pm s$)
24	0	95	19.30 ± 3.95	100	17.67 ± 2.40	27	8.90 ± 1.88▲
	60	94	18.70 ± 2.51	94	19.21 ± 0.53	18	6.77 ± 2.40*▲
	120	46	9.46 ± 2.47*	38	9.01 ± 1.62*	0	0
	180	7	2.79 ± 1.62*	11	3.86 ± 0.53*	0	0*▲
48	0	100	49.22 ± 1.62	100	47.62 ± 4.37	73	19.21 ± 0.53▲
	60	100	48.30 ± 1.82	100	46.07 ± 2.15	36	9.41 ± 3.22*▲
	120	53	27.54 ± 6.61*	55	26.87 ± 2.12*	13	4.97 ± 1.42*▲
	180	41	17.12 ± 0.53*	40	19.21 ± 0.33*	0	0*▲

* $P < 0.05$ vs 0 h; ▲ $P < 0.05$ vs A549 and A549-P

2.4.4 DNA 氧化损伤标志物 8-OHdG 的测定 实验数据 (图 5) 显示, 随着高氧暴露时间的增加, 三组 A549 细胞的 8-OHdG 均呈现逐步上升的趋势, 说明高氧刺激可确切引起 DNA 氧化损伤并产生大量损伤相关物质, 损伤程度随高氧暴露时间而增加。组间比较, A549-T 细胞内 8-OHdG 的增加水平明显低于相同时间点下空白对照组和阴性对照组, 在实验第 4 天开始差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。两对照组间未观察到显著差异, 提示对 8-OHdG 的清除作用来自 hOGG₁ 基因本身, 与载体质粒无关。

细胞凋亡越多。

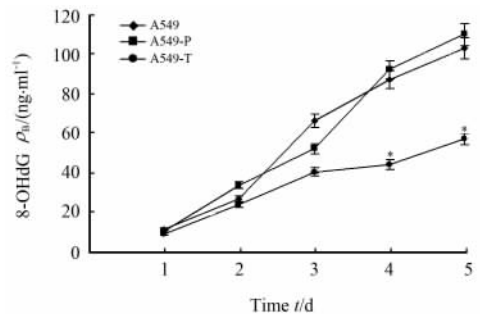


图 5 三组 A549 细胞 DNA 氧化损伤标志物 8-OHdG 时间变化趋势图

Fig 5 Time-varying trends of 8-OHdG of A549 cells in three groups

* $P < 0.05$ vs A549 and A549-P; $n=3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

反应性氧化产物 (reactive oxygen species, ROS) 造成的 DNA 损伤可以导致多种高氧损伤的发生。May 等^[4]发现机械通气后早产儿肺组织上皮细胞凋亡显著增加, 且通气时间越长, 氧浓度越高,

目前认为, hOGG₁ 是人体细胞中 DNA 氧化损

伤修复的第一环节^[5],基因位于人染色体 3p2526 区域内,由 7 个外显子和 6 个内含子组成,hOGG₁ 基因编码的 hOGG₁ 蛋白是一个带有 AP 裂解酶活性的双功能 DNA 糖苷酶,其主要功能是识别和切除 DNA 双链中的 8-羟基鸟嘌呤(8-OHdG)^[6],此外,其 AP 裂解酶活性可修复自发碱基丢失或因 DNA 糖苷酶作用后产生的突变^[7],在维护基因组稳定和预防肿瘤发生上具有重要的作用。

目前,hOGG₁ 基因与肿瘤发生关系的研究日趋完善,对基因结构及多态性的研究也较为集中^[5,8],虽然实验已经确认 hOGG₁ 对抗氧化损伤改善的对抗作用^[9],但就如何调控 hOGG₁ 基因的活性增强对损伤 DNA 的主动修复能力,国内外研究尚少。本研究成功构建 pcDNA3.1/Myc-His A-hOGG₁ 真核表达载体,且生物学实验同时证实,共转染未对细胞本身的特性造成影响。这为生物靶向治疗,如逆转 DNA 氧化损伤的基因工程细胞等的研究打下了良好的基础,也为深入研究 DNA 氧化损伤和修复提供了一个十分有效的生物学工具。

本实验在成功构建 hOGG₁ 基因高表达 A549 细胞后,将其作为受试细胞进一步探索了 hOGG₁ 基因高表达对高氧损伤的对抗作用。实验采用的是改良“彗星实验”(Comet Assay),又称单细胞凝胶电泳(single cell gel electrophoresis, SCGE),是一种在单细胞水平上检测 DNA 链损伤的方法,经碱性测试方法改良的彗星实验灵敏度提高到每 1×10^9 (相对分子质量)中即可检测出 0.1 个 DNA 断裂。DNA 的断裂、合成以及再连接修复与“彗星”细胞的出现与消失一致,因此该实验可作为从损伤切除、修复到合成、连接的单步骤各时点的观察。本实验中,各组 A549 细胞彗星细胞率和 Olive 尾矩与高氧暴露时间呈现出良好的效应关系,与形态学上的变化呈现一致性,说明高氧确实可引起 DNA 的损伤诱发细胞凋亡。通过比较彗星细胞率和 Olive 尾矩发现,相同暴露时间下,hOGG₁ 基因高表达的 A549-T 细胞对高氧诱导的 DNA 氧化损伤有更强的对抗能力,表现为细胞形态更完整、类似凋亡细胞的比例更低。在修复能力的检测中,hOGG₁ 基因高表达的 A549-T 细胞对损伤 DNA 的修复速度明显提前,修复完全程度也明显提高,与相差显微镜下观察到的细胞形态学变化基本一致。

如前述,hOGG₁ 蛋白主要功能是识别和切除 DNA 双链中的 8-OHdG,并掺入正常的鸟嘌呤碱基以修复受损细胞。在本实验对 8-OHdG 的测定中,再次验证了 hOGG₁ 基因高表达对氧化损伤的抵抗和主动修复能力的增强作用。实验中可见,hOGG₁

基因高表达 A549 细胞的 8-OHdG 明显低于两对照组,且随着时间的推移和损伤程度的加剧,组间差异更加明显,提示 A549-T 细胞高表达的 hOGG₁ 蛋白逐步发挥了碱基切除修复功能,这一结果与彗星实验显示的结果基本一致。以上结果提示 hOGG₁ 真核载体导入的 hOGG₁ 基因得到了高表达,降低了细胞对 DNA 损伤剂的敏感性,增加了细胞的 DNA 修复能力,说明 hOGG₁ 基因在 DNA 氧化损伤与修复方面确有重要作用。

但必须看到,因为定向分化、突变、增殖调控等瓶颈问题始终无法解决,A549-hOGG₁ 基因高表达细胞的建立虽然提供了一个良好的体外实验平台,但对提高细胞修复能力作用仍然有限,因此,从增强启动、促进表达、减少降解等方面促进在体细胞 hOGG₁ 基因的作用,是我们进一步研究的方向。

[参考文献]

- [1] Ide H, Kotera M. Human DNA glycosylases involved in the repair of oxidatively damaged DNA[J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27:480-485.
- [2] Nakabeppu Y, Sakumi K, Sakamoto K, Tsuchimoto D, Tsuzuki T, Nakatsu Y. Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids[J]. *Biol Chem*, 2006, 387:373-379.
- [3] McKelvey-Martin V J, Green M H, Schmeizer P, Pool-Zobel B L, De M o M P, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review[J]. *Mutat Res*, 1993, 288:47-63.
- [4] May M, Str bel P, Preissshofen T, Seidenspinner S, Marx A, Speer C P. Apoptosis and proliferation in lungs of ventilated and oxygen-treated preterm infants[J]. *Eur Respir J*, 2004, 23:113-121.
- [5] 张遵真, 张勤, 吴媚. hOGG₁ 特异性锤头状核酶真核表达载体的构建及初步的功能研究[J]. *四川大学学报:医学版*, 2006, 37:165-170.
- [6] Panduri V, Liu G, Surapureddi S, Kondapalli J, Soberanes S, de Souza-Pinto N C, et al. Role of mitochondrial hOGG₁ and aconitase in oxidant-induced lung epithelial cell apoptosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47:750-759.
- [7] Wu M, Zhang Z, Che W. Suppression of a DNA base excision repair gene, hOGG₁, increases bleomycin sensitivity of human lung cancer cell line[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 228:395-402.
- [8] Luna L, Rolseth V, Hildrestrand G A, Otterlei M, Dantzer F, Bj r s M, et al. Dynamic relocalization of hOGG₁ during the cell cycle is disrupted in cells harbouring the hOGG₁-Cys326 polymorphic variant[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33:1813-1824.
- [9] Kannan S, Pang H, Foster D C, Rao Z, Wu M. Human 8-oxoguanine DNA glycosylase increases resistance to hyperoxic cytotoxicity in lung epithelia cells and involvement with altered MAPK activity[J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13:311-323.