

· 论 著 ·

抑制 ATM 表达对 X 线照射下肝癌细胞损伤修复的影响*

练建平, 王宏梅, 王传玺, 陈龙华[△]

(南方医科大学南方医院放疗科, 广州 510515)

摘要:目的 探讨抑制毛细血管扩张-共济失调突变基因(ATM)表达对人肝癌细胞株 HepG2 在 X 线照射下细胞损伤修复的影响。方法 设计 3 条沉默 ATM 的小分子干扰 RNA(siRNA)的序列,用脂质体法转染 HepG2 细胞,筛选出有效的浓度及作用时间,分别利用实时定量 PCR 和蛋白质印迹法检测 ATM mRNA、蛋白表达水平,MTT 法检测转染后细胞增殖,流式细胞术检测 X 线照射后 HepG2 细胞周期、凋亡等生物学功能方面指标的变化。结果 筛选出沉默 ATM 基因的 siRNA 有效序列。qRT-PCR 结果显示第 3 条 siRNA 抑制率最高,可达 72%,转染后 48 h 的 ATM 蛋白表达抑制 78%。转染 siRNA^{ATM}后 HepG2 细胞的增殖能力无明显变化,HepG2^{ATM}组在 X 线照射后 G₂/M 期细胞明显增多,S 期细胞明显减少;X 线照射后 HepG2^{ATM}组早期凋亡百分比是阴性对照组的 2 倍。结论 抑制 ATM 表达可显著抑制肝癌细胞对辐射损伤的修复,为后期研究 ATM 在肝癌治疗中的作用机制提供了实验基础。

关键词:RNA 干扰;毛细血管扩张-共济失调突变基因;肝癌;转染;放射治疗

中图分类号:R735.7;R73-36

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)11-1338-04

Influence of siRNA targeting against ATM on DNA damage repair for hepatoma cells after X irradiation*

LIAN Jian-ping, WANG Hong-mei, WANG Chuan-xi, et al.

(Department of Radiation Oncology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstracts: Objective To study the influence of RNA interference targeting against ataxia-telangiectasia mutated(ATM) gene on DNA damage repair for human hepatoma cells HepG2 after X irradiation. **Methods** According to the genetic information, three siRNA sequences of ATM were designed, then transfected into the hepatoma cell by liposome, and chose the effective concentration and time. The expression level of ATM mRNA and protein was detected by qRT-PCR and Western blotting respectively. The cell proliferation was assessed by MTT assay and the changes in cell cycle and apoptosis were evaluated by flow cytometry. **Results** The valid siRNA sequence which could depress ATM gene was bolted. qRT-PCR demonstrated that the best inhibitory effect on ATM mRNA expression in HepG2 was 72% in the third siRNA sequence. Western blot demonstrated the inhibition ratio on protein expression was 78% in 48 h after transfection. The proliferation of HepG2 cells was not marked changing by siRNA^{ATM}. The number of cells at G₂/M stage in HepG2^{ATM} group was obviously increased, yet the number of cells at S stage was manifestly decreased after X irradiation. FCM showed the period apoptosis ratio in HepG2^{ATM} group was 2 folds than that of the negative control group. **Conclusion** The RNA interference targeting against ATM gene significantly inhibites DNA repair response of hepatoma cells after radiation damage. It may be helpful to provide solid foundation for studying the function of ATM in the therapy of liver cancer.

Key words: RNA interference; ATM gene; hepatoma; transfection; radiotherapy

毛细血管扩张-共济失调突变基因(ataxia-telangiectasia mutated, ATM)是共济失调-毛细血管扩张症(ataxia-telangiectasia, AT)的突变基因。近年有研究发现, ATM 基因在 DNA 双链断裂监测及修复中发挥重要作用^[1]。本课题组前期研究发现 ATM 基因在肝癌患者中过度表达^[2], 而肝细胞肝癌属于放射敏感性肿瘤^[3]; 因此, 把 ATM 作为治疗的靶点有可能为肝癌的放射治疗带来新的希望。RNA 干扰(RNA interfering, RNAi)是近年来运用比较成熟的基因技术。它是一种转录后的基因沉默, 能触发某种转录后监控程序, 导致特定 mRNA 单链的降解, 从而导致蛋白表达的沉默^[4-5]。本实验运用化学合成的小分子干扰 RNA(siRNA)使肝癌细胞株 HepG2 中 ATM 表达沉默, 并观察转染 HepG2 后 ATM mRNA 及其蛋白表达情况, 抑制成功后给予 X 线照射, 观察其对损伤修复的影响, 为下一步进行 ATM 在肝癌中的作用机制研究及基因治疗提供实验基础。

1 材料与方

1.1 材料 肝癌细胞株 HepG2 由本院肿瘤实验室惠赠, 胎牛血清、RBMI-1640 为 Gibco 产品, 鼠抗人 ATM 为单克隆抗体, 兔抗鼠抗体(二抗)购自 Abcam 公司, 脂质体(lipofectamine2000)、凋亡试剂盒、细胞周期试剂盒为 Invitrogen 产品, 定量 PCR 用酶 SYBR Green PCR Master Mix 购自 TOYOBO 公司; 定量 PCR 仪为 ABI PRISM[®] 7300 Sequence Detection System。

1.2 细胞培养 用含 10% 胎牛血清的 RBMI-1640 培养, 37℃、5%CO₂ 培养箱贴壁培养, 用 0.25% 胰酶(含 0.02% EDTA)常规消化。

1.3 siRNA 序列及引物设计 用 Ambion 公司在线 siRNA 设计软件确定特异针对人 ATM 的 siRNA 靶序列, 用 Tnschl 法设计选取 3 条 siRNA(表 1)。利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计 ATM 定量 PCR 扩增引物, 上游: 5'-ACTGGC

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30772530); 广东省自然科学基金资助项目(200504776)。△ 通讯作者, 电话: 8620-61642136; E-mail: flch@hotmail.com。

表 1 设计合成的 3 条 siRNA 序列

编号	正义链(5'-3')	反义链(3'-5')
1	CCA UGG AAG UGA UGA GAA A dTdT	dTdT GGU ACC UUC ACU ACU CUU U
2	GGU AGA AGA UUG UGU CAA A dTdT	dTdT CCA UCU UCU AAC ACA GUU U
3	GUG AUA GAU AAC AAG GAU A dTdT	dTdT CAC UAU CUA UUG UUC CUA U

CTT AGC AAA TGC-3',下游:5'-TTG CAG CCT CTG TTC GAT-3'。

1.4 siRNA 转染 挑取生长较好的肝癌细胞 HepG2 进行常规消化后,以 5×10^4 /孔密度铺于 6 孔板中。24 h 时观察细胞融合度为 60%,进行转染,1.5 mL optin-MEM 及 5 μ L lipofectamine 分别转染 3 条 siRNA,6 h 后选带荧光的 cy3 siRNA 在荧光显微镜下观察转染情况。

1.5 qRT-PCR 选取合适的干扰浓度及检测 mRNA 水平 按照说明书 TRIzol 法提取细胞总 RNA,然后检测其纯度及完整性。同时每条 siRNA 选取 3 个浓度进行最适浓度筛选实验(25、50、75 nmol/mL),逆转录,用 qRT-PCR 确定最适浓度及检测 mRNA 水平。

1.6 siRNA 转染 HepG2 细胞后 ATM 蛋白变化(蛋白质印迹法) 转染 24、48、72 h 后收获细胞,计算相同细胞数约 4×10^5 ,加入 $1 \times$ SDS 上样 Buffer,SDS-PAGE 凝胶电泳,硝酸纤维素膜低温转膜,TBST 漂洗,5%脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h,一抗(1:250)4 $^{\circ}$ C 过夜,二抗(1:2000)室温孵育 1 h,TBST 洗膜,化学发光显影。

1.7 MTT 检测细胞增殖活力 取对数生长期的细胞以 0.5×10^4 /孔密度接种于 96 孔板,分 3 组,当细胞融合度达到 80%左右时进行转染,方法、试剂同前。分别在转染后 2、3、4、5、6 d,加入 5 g/L 的 MTT 20 μ L,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 4 h,弃培养液,每孔加 150 μ L DMSO,避光并轻轻摇晃 10 min,待完全溶解后,用酶标仪 570 nm 检测光密度值(OD 值)。同时设对照组,每组 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.8 流式细胞术检测细胞周期 取对数生长期的细胞以 5×10^5 /孔密度接种于 6 孔板,分 3 组,转染方法、试剂同前。当细胞处于对数增殖期时,分别接受 0、6 Gy X 线照射,照射 24 h 后收集各组细胞制成单细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^6 /mL,用预冷的 PBS 液洗 3 次,1 500 r/min 离心 3 min 后 20 $^{\circ}$ C 预冷乙醇(70%)固定 1 h,再次 1 500 r/min 离心 3 min 后加 RNA 酶(终浓度 50 μ g/mL)及 PI(终浓度 30 μ g/mL)避光染色 40 min,用流式细胞仪检测各期细胞百分比。

1.9 流式细胞术检测细胞凋亡 细胞铺板、转染步骤同前,当细胞处于对数增殖期时,分别接受 0、6 Gy X 线照射,照射 24 h 后收集各组细胞制成单细胞悬液,用 Annexin V/FITC 试剂盒对细胞进行双染,避光染色 15 min,用流式细胞仪检测早期凋亡细胞百分比。

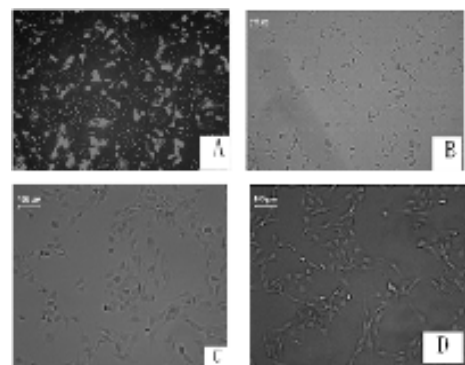
1.10 统计学方法 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 统计软件,组间用非配对 *t* 检验来比较均数差异的显著性,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 有效干扰序列的筛选 siRNA 转染 HepG2 细胞的效率达到 90%,见图 1。第 3 条待测 siRNA 抑制效率最高,达 72%,见图 2。因此,作者选取第 3 条 siRNA 作为下一步实验的目的基因序列。

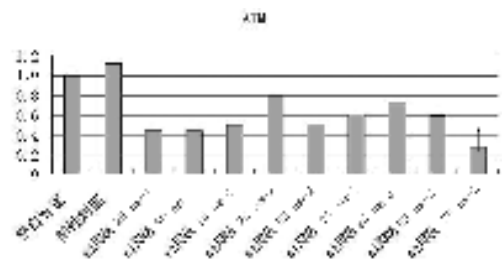
2.2 qRT-PCR 筛选 siRNA 合适干扰浓度及检测 ATM mR-

NA 水平 提取的总 RNA,其 OD260/OD280 为 1.96,说明无蛋白质及 DNA 污染;RNA 电泳图显示 RNA 完整性较好(图 3);siRNA 浓度为 75 nmol/mL 时抑制效率最高(图 2);qRT-PCR 检测 mRNA 水平,见图 2、4。



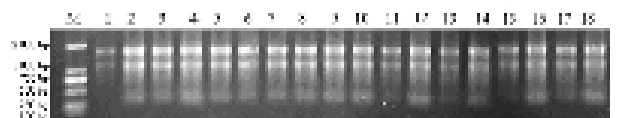
A、C:荧光显微镜下的 HepG2 细胞;B、D:正常的 HepG2 细胞。

图 1 siRNA 转染 HepG2 细胞结果



*:抑制效率最高的 siRNA 序列。

图 2 转染各 siRNA 后 ATM mRNA 表达水平



1~3:空白 1、2、3 组;4~8:分别为 25 nm-阳性对照、25 nm-阴性对照 25 nm-1、25 nm-2、25 nm-3;9~13:分别为 50 nm-阳性对照、50 nm-阴性对照、50 nm-1、50 nm-2、50 nm-3;14~18:分别为 75 nm-阳性对照、75 nm-阴性对照、75 nm-1、75 nm-2、75 nm-3;M:Maker。

图 3 提取 RNA 后完整性检测

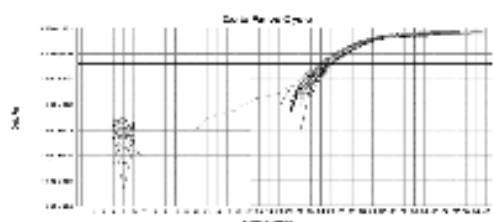
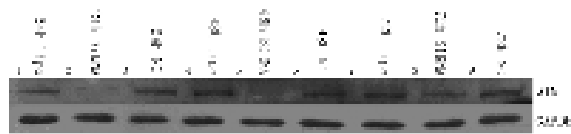


图 4 ATM 扩增曲线

2.3 siRNA 转染 HepG2 后 ATM 蛋白的表达 以 GAPDH 为内参,蛋白质印迹法显示 siRNA^{ATM}组在 24、48、72 h 抑制率

分别为 70%、78%、40%，相较于阴性对照组及空白对照组 ATM 蛋白表达明显下降；而 72 h 后其蛋白表达逐渐上升，见图 5。



1~9: 依次是 24、48、72 h 的 lipofectamine2000 组、siRNA^{ATM} 组、阴性对照组。

图 5 siRNA 转染 HepG2 后 24、48、72 h 蛋白质印迹法检测结果

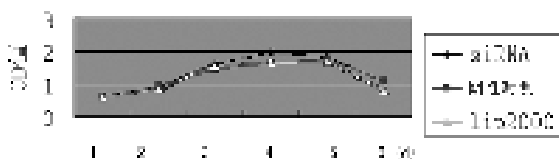
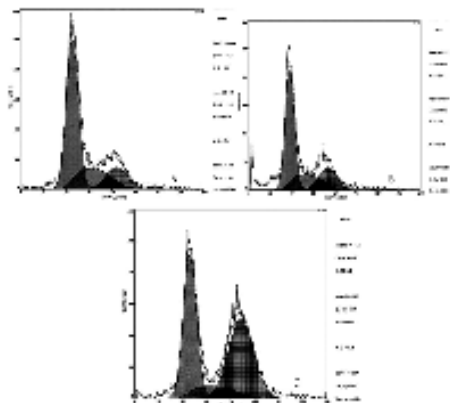
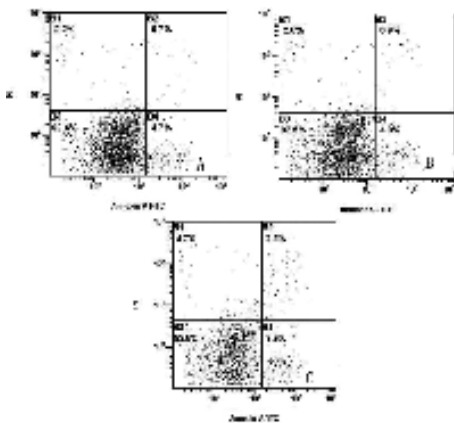


图 6 HepG2 细胞转染 siRNA 后增殖曲线



A: 正常 HepG2 细胞照射后; B: 阴性对照组细胞照射后; C: HepG2^{ATM} 组细胞照射后。

图 7 X 线照射后细胞周期检测



A: 正常 HepG2 细胞照射后; B: 阴性对照组细胞照射后; C: HepG2^{ATM} 组细胞照射后。

图 8 X 线照射后细胞凋亡检测

2.4 siRNA 对 HepG2 细胞增殖的影响 siRNA^{ATM} 转染 HepG2 细胞后, MTT 法显示细胞数随着天数的增加而增加, 至第 5 天后, 细胞所测 OD 值开始下降, 但 HepG2^{ATM} 组与阴性对照组及 lipofectamine2000 组对比未见明显异常, 见图 6。

2.5 siRNA 对 HepG2 细胞周期的影响 在未照射前, 3 组细

胞的各期百分比无区别, 但 6 Gy X 线照射 24 h 后出现明显变化, 正常 HepG2 细胞、阴性对照组细胞均形成 G₁、G₂ 峰。而 HepG2^{ATM} 组 G₂/M 期细胞明显增多, S 期细胞所占百分比从 23.8% 降至 11.4% (P<0.05), 见图 7。

2.6 细胞凋亡检测 各组细胞在未照射时无明显异常, 但在 6 Gy X 线照射 24 h 后发现正常 HepG2 细胞、阴性对照组细胞之间无明显变化, HepG2^{ATM} 组早期凋亡细胞的百分比是阴性对照组的 2 倍 (P<0.05), 见图 8。

3 讨 论

近年发现 ATM 在 DNA 双链断裂 (double-strand break, DSB) 监测及修复中发挥重要作用^[1]。当细胞受到外界作用使 DNA 损伤时, 在损伤早期, 其损伤信号能立即引起 ATM 的激活和募集至 DNA 断端, 同时引起 H₂AX 的磷酸化, 从而导致 ATM 自磷酸化其自身酶底物, 同时磷酸化多种参与细胞周期调控和 DNA 损伤修复的蛋白, 这些蛋白包括 p95、Brcal、p53、肿瘤抑制基因、细胞周期调控点激酶 chk2、SMC1、BLM 和 FANCD2 等, 这是 ATM 对检测及修复的正反馈^[6-10]。ATM 自磷酸化后能放大损伤信号, 同时招募修复蛋白复合物 MRX/N 等启动 DNA 同源重组或非同源末端连接 DNA 修复^[11-12]。目前研究认为是 DSB 的修复能力而非 DSB 数目来决定细胞的存活^[6, 13-14]。因此, ATM 在细胞 DNA 双链损伤及修复中有着重要的地位。

RNAi 技术研究基因功能具有操作简便、效率高、特异性好、可遗传性和传播性快的特点^[15]。本实验针对 ATM 设计了 3 条特异的 siRNA 序列, 通过 lipofectamine2000 脂质体转染法, 将 siRNA 瞬时转染入肝细胞癌 HepG2 中, 再通过 qRT-PCR 检测选出第 3 条 siRNA 序列作为研究目的基因序列。

Holen 等^[16]报道只有一小部分 siRNA 能有效抑制基因表达, 而且不同核苷酸组成的 siRNA, 其降解 mRNA 的部位亦不同。随着靶点的不同, siRNA 的抑制效果也随之不同。本实验分成抑制 ATM、阴性对照及未转染组, 通过脂质体转染法, qRT-PCR 检测显示当 siRNA 浓度为 75 nmol/mL 时, 第 3 条 siRNA 的抑制效率最高, 达 72%。同时蛋白质印迹法结果显示 siRNA^{ATM} 组在 24 h 时 ATM 蛋白表达有所下降, 48 h 时 ATM 蛋白表达明显抑制, 而 72 h 后其蛋白表达逐渐上升。说明此 siRNA 在转染后 48 h 抑制效果最好, 72 h 后其抑制效果逐渐减弱, 这可能与本实验的 siRNA 只是瞬时转染、不能持续表达有关。对 ATM 干扰后 HepG2 细胞生物学功能方面的研究显示, ATM 沉默后对细胞增殖能力无明显影响, 可能是与 ATM 基因只在细胞损伤后起作用, 而对正常细胞的增殖无影响有关, 其机制尚需进一步研究。细胞周期结果显示 HepG2^{ATM} 组 G₂/M 期细胞明显升高, S 期细胞百分比明显降低, 分析其原因可能由于 HepG2^{ATM} 细胞内 ATM 蛋白受到抑制, 抑制了细胞在受到电离辐射后 ATM 依赖性的 G₁/S、G₂/M 细胞周期检测点调控, 最终导致 ATM 依赖性 G₁/S、G₂/M 检验点失效。同时存在 ATM 非依赖性的 G₂/M 检验点调控机制^[17], 最终部分细胞将在 G₂/M 期增加, S 期减少, 这与 Li 等^[18]研究 ATM 在宫颈癌中经辐射后细胞周期的检测结果一致。凋亡检测结果显示 HepG2^{ATM} 组的百分比远大于阴性对照组及正常细胞组, 其原因可能与 ATM 抑制后其修复能力下降有关, 与李革等^[19]在直肠癌研究中的结果一致。

本研究成功筛选出能有效沉默 ATM 的 siRNA 序列, RNA 干扰 ATM 后 X 线照射下 G₂/M 期细胞增多, 早期细胞凋亡增加, 说明 ATM 抑制后能影响辐射后受损细胞内 DNA

损伤修复、细胞周期检测点调控等功能,可大大提高肝癌细胞对放疗的敏感性。因此,ATM 研究是未来肝癌放射治疗的一个新的方向。

参考文献:

- [1] Mouri K, Nacher JC, Akutsu T. A mathematical model for the detection mechanism of DNA double-strand breaks depending on autophosphorylation of ATM[J]. PLoS ONE, 2009, 4(4):e5131.
- [2] 李高峰,王宏梅,陈龙华. 原发性肝癌患者 ATM 表达水平及其临床意义[J]. 广东医学, 2008, 29(10):1652.
- [3] 曾昭冲. 肝细胞肝癌放射治疗现状与展望[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(13):961.
- [4] Ahmed N, Riley C, Oliva K, et al. Integrin-linked kinase expression increases with ovarian tumour grade and is sustained by peritoneal tumour fluid[J]. Pathol, 2003, 201(2):229.
- [5] Jeang KT, Xiao H, Rich EA. Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription Tat[J]. Biol Chem, 1999, 274(41):28837.
- [6] Pardo B, Gómez-González B, Aguilera A. DNA double-strand break repair; how to fix a broken relationship[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2009, 66(6):1.
- [7] Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation[J]. Nature, 2003, 421(69):499.
- [8] You Z, Bailis JM, Johnson SA, et al. Rapid activation of ATM on DNA flanking double-strand breaks[J]. Nat Cell Biol, 2007, 9(11):1311.
- [9] Cline SD, Hanawalt PC. Who's on first in the cellular response to DNA damage[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(5):361.
- [10] 李高峰,陈龙华. ATM 在肿瘤放射增敏治疗中的研究进展[J]. 重庆医学, 2007, 36(21):2224.
- [11] Junya K, Hiroshi T, Benjamin C, et al. Histone H2AX participates the DNA damage-induced ATM activation through interaction with NBS1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 380(4):752.
- [12] Bunsyo S, Zou L. Single-stranded DNA orchestrates an ATM-to-ATR switch at DNA breaks[J]. Mol Cell, 2009, 33(5):547.
- [13] Czornak K, Chughtai S, Krystyna H, et al. Mystery of DNA repair; the role of the MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair[J]. J Appl Genet, 2008, 49(4):383.
- [14] Kim YC, Gerlitz G, Furusawa T, et al. Activation of ATM depends on chromatin interactions occurring before induction of DNA damage[J]. Nat Cell Biol, 2009, 11(1):92.
- [15] Caplen NJ, Mousses S. Short interfering RNA (siRNA)-mediated RNA interference (RNAi) in human cells[J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 10(2):56.
- [16] Holen T, Amaizguioui M, Wiger MT, et al. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger tissue factor[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(8):1757.
- [17] Xu B, Kim St, Lim Ds, et al. Two molecularly distinct G₂/M checkpoints are induced by ionizing irradiation[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(4):1049.
- [18] Li W, Jian W, Xiaoping X, et al. Enhanced radiation-mediated cell killing of human cervical cancer cells by small interference RNA silencing of ataxia telangiectasia-mutated protein[J]. Int J Gynecol cancer, 2006, 16(4):1620.
- [19] 李革,李林虎,尹玩熙. 直肠癌自发性细胞凋亡指数、ATM 蛋白表达和放射敏感性的关系[J]. 广东医学, 2008, 29(3):409.
- (收稿日期:2009-12-01 修回日期:2010-03-02)
-
- (上接第 1337 页)
- [5] VanEeden SF, Klopper JF, Alheit B, et al. Ventilation-perfusion imaging in evaluating regional lung function in non-penetrating injury to the chest[J]. Chest, 1989, 95(3):632.
- [6] Cohn SM. Pulmonary contusion; review of the clinical entity[J]. J Trauma, 1997, 42(5):973.
- [7] 吴秋平,蒋耀光,何家庆,等. 声门紧闭状态下肺撞伤模型的建立[J]. 创伤外科杂志, 2004, 6(4):269.
- [8] 张锋攻,王成名,覃求. 70 例闭合性肺挫伤的 CT 诊断[J]. 海南医学, 2008, 19(2):113.
- [9] 王平,钟宏,梁大昌,等. 连枷胸合并肺挫伤 42 例的临床分析[J]. 广西医学, 2009, 31(6):887.
- [10] 王政清. SPECT 的临床应用[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2000, 3(5):434.
- [11] Cohn SM. Pulmonary contusion; review of the clinical entity[J]. J Trauma, 1997, 42(5):973.
- [12] Tennenberg SD, Jacobs MP, Solomkin JS, et al. Increased pulmonary alveolar-capillary permeability in patients at risk for adult respiratory distress syndrome[J]. Crit Care Med, 1987, 15(4):289.
- (收稿日期:2009-09-09 修回日期:2010-03-02)