

· 论 著 ·

# 电离辐射致线粒体 DNA 4 977 bp 缺失与肿瘤细胞放射敏感性关系的初步研究\*

荣庆林<sup>1</sup>, 刘 莉<sup>2</sup>, 王 芹<sup>3</sup>, 刘 强<sup>3</sup>, 陈艳芳<sup>1</sup>, 姜文华<sup>1</sup>, 李小东<sup>1△</sup>

(天津医科大学第二医院:1. 放疗科;2. 泌尿外科研究所 300211;3. 中国医学科学院/中国协和医科大学放射医学研究所分子核医学重点实验室, 天津 300192)

**摘要:**目的 探讨肿瘤细胞经 X 线照射后线粒体 DNA 4 977 bp 缺失率与存活分数的潜在关系。方法 选用人宫颈癌细胞系(Hela 细胞)、人肝癌细胞系(HepG2 细胞)、人食管癌细胞系(EC-9706 细胞)和人前列腺癌细胞系(PC-3 细胞)4 种肿瘤细胞系,经 0 Gy 到 8 Gy X 线照射后,采用克隆形成法测得存活分数,巢式 PCR 法检测线粒体 DNA 4 977 bp 缺失率。结果 肿瘤细胞放射敏感性由高到低依次是 Hela 细胞、HepG2 细胞、EC-9706 细胞和 PC-3 细胞。Hela 细胞经 1 Gy X 线照射后,HepG2 细胞、EC-9706 细胞和 PC-3 细胞经 2 Gy X 线照射后均检测到线粒体 DNA 4 977 bp 缺失。1 Gy X 线照射后,4 种细胞线粒体 DNA 4 977 bp 缺失率比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );2 Gy X 线照射后,Hela 细胞线粒体 DNA 4 977 bp 缺失率高于其余 3 种细胞( $P<0.01$ );4 Gy 和 8 Gy X 线照射后,Hela 细胞线粒体 DNA 4 977 bp 缺失率高于其余 3 种细胞( $P<0.05$ ),HepG2 细胞和 EC-9706 细胞线粒体 DNA 4 977 bp 缺失率高于 PC-3 细胞( $P<0.01$ )。Hela 细胞、HepG2 细胞和 EC-9706 细胞的存活分数和缺失率之间呈负相关( $r=-0.951, P<0.05$ ;  $r=-0.976, P<0.01$ ;  $r=-0.986, P<0.01$ )。结论 线粒体 DNA 4 977 bp 缺失可能是一个反映肿瘤细胞放射敏感性的生物标记。

**关键词:** DNA, 线粒体; 克隆形成法; 巢式 PCR; 辐射耐受性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.19.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)19-1906-03

## Preliminary study of relationship between radiation-induced mitochondrial DNA 4 977 bp deletion and radiosensitivity of human tumor cell lines\*

Rong Qinglin<sup>1</sup>, Liu Li<sup>2</sup>, Wang Qin<sup>3</sup>, Liu Qiang<sup>3</sup>, Chen Yanfang<sup>1</sup>, Jiang Wenhua<sup>1</sup>, Li Xiaodong<sup>1△</sup>

(The Second Hospital of Tianjin Medical University:1. Department of Radiation Oncology;2. Tianjin Institute of Urology, Tianjin 300211, China;

3. Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

**Abstract: Objective** To explore the potential relationship of the radiation-induced mitochondrial DNA 4 977 base pairs(mtDNA 4 977 bp) deletion and the radiosensitivity of tumor cell lines. **Methods** The surviving fraction(SF) and the ratio of mtDNA 4 977 bp deletion were determined by clone forming assay and nested polymerase chain reaction(PCR) technique respectively after tumor cells of Hela, HepG2, EC-9706 and PC-3 were irradiated by various doses of X-ray radiation from 0 Gy to 8 Gy. **Results** The descending order of the four tumor cell lines' radiosensitivities were the Hela, HepG2, EC9706 and PC-3 cells. The radiation-induced mtDNA 4 977 bp deletion were detected after 1 Gy irradiated in Hela cells and 2 Gy irradiated in HepG2, EC-9706 and PC-3 cells. The deletion rate of the four tumor cell lines had no significant difference at 1 Gy( $P>0.05$ ); but the deletion rate of Hela cells was significantly higher than that of the other tumor cell lines at 2 Gy( $P<0.01$ ); at 4 Gy and 8 Gy, the deletion rate of Hela cells was significantly higher than that of the other tumor cell lines( $P<0.05$ ), and the deletion rates of HepG2 and EC-9706 cells were higher significantly than that of PC-3 cells( $P<0.01$ ). There were negative correlations between the SF and the deletion rates in Hela, HepG2 and EC-9706 cells( $r=-0.951, P<0.05$ ;  $r=-0.976, P<0.01$ ;  $r=-0.986, P<0.01$ ). **Conclusion** The ratio of mtDNA 4 977 bp deletion may be a biological marker to predict the radiosensitivity of tumor cells.

**Key words:** DNA, mitochondrial; clone forming assay; nested polymerase chain reaction; radiation tolerance

肿瘤放射敏感性是放射治疗学主要研究领域之一,其中快速准确地预测放射敏感性对指导临床个体化治疗十分重要。经典的克隆形成实验被视为直接检测放射敏感性的金标准,但是等待时间长、成功率较低、不易广泛应用。人们曾尝试微核分析<sup>[1]</sup>、染色体畸变<sup>[2]</sup>、彗星分析等方法<sup>[3]</sup>,结果也不理想。近年来人们开始从分子水平研究细胞放射损伤和评价敏感性<sup>[4-5]</sup>,本研究把线粒体 DNA 4 977 bp 缺失作为观察终点,寻找与存活分数的潜在关联,初步探索其预测放射敏感性的

价值。

### 1 材料与方法

**1.1 细胞培养** 选用 4 种肿瘤细胞,即人宫颈癌细胞系(Hela 细胞)、人肝癌细胞系(HepG2 细胞)、人食管癌细胞系(EC-9706 细胞)和人前列腺癌细胞系(PC-3 细胞),Hela 细胞来自天津医科大学生命科学中心实验室,HepG2 和 EC-9706 细胞来自中国医学科学院放射医学研究所,PC-3 细胞来自天津市

\* 基金项目:天津市自然科学基金资助项目(07JCYBJC09200)。

△ 通讯作者, Tel: (022) 88326393; E-mail: lixiaodonglxd@163.com。

泌尿外科研究所。培养细胞所用 RPMI1640 培养液(Gibco 公司),其中加入 10% 小牛血清(杭州四季青公司)、青霉素 100 U/mL 和链霉素 100 μg/mL。将细胞置于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、100% 饱和湿度的孵箱中培养,2~3 d 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,进入指数生长期后收集细胞进行实验。

**1.2 X 线照射方法** 将培养瓶翻转,上置 1.5 cm 厚的固体水,在室温空气中用直线加速器 6 MV X 线照射细胞,设定照射剂量为 0、1、2、4 和 8 Gy。

**1.3 克隆形成实验** 制备肿瘤细胞单细胞悬液,梯度倍数稀释后,根据增殖能力和受照射剂量,以适当的密度接种于培养皿中,继续培养约 14 d,然后弃培养液,甲醇固定,姬姆萨染色,低倍镜下观察,以大于 50 个细胞视为集落形成。克隆形成率(PE)=(克隆形成数/接种的细胞数)×100%,细胞存活分数(SF)=实验组 PE/对照组 PE。

**1.4 线粒体 DNA 提取** X 线照射后继续培养 2 h,消化离心获得约 10<sup>7</sup> 个细胞沉淀。使用 Column mtDNAout 柱式试剂盒提取线粒体 DNA,紫外分光光度计测定含量。

**1.5 PCR 引物设计** 参考 NCBI 基因文库中人类线粒体基因序列,采用 Primer 5.0 软件搜索,Oligo 6.0 软件评估,经预实验确定引物。普通 PCR 上游引物位于第 3 304~3 323 碱基,下游引物位于第 3 836~3 817 碱基,扩增片段(片段 I)长度 533 bp,此片段属于管家基因,作为内参代表线粒体 DNA 模板总含量。巢式 PCR 为连续 3 轮反应,引物位于线粒体 DNA 4 977 bp 的两端附近。第 1 轮引物位于最外侧,上游引物位于第 7 901~7 920 碱基,下游引物位于第 14 220~14 201 碱基,扩增片段(片段 II)长度 1 342 bp;第 2 轮引物位于产物 II 的两端,上游引物位于第 8 201~8 220 碱基,下游引物位于第 13 851~13 832 碱基,扩增片段(片段 III)长度 673 bp;第 3 轮引物位于产物 III 的两端,上游引物位于第 8 282~8 305 碱基,下游引物位于第 13 650~13 631 碱基,扩增片段(片段 IV)长度 391 bp。通过限制反应条件,在设定时间内不能延伸出 5 kb 的片段,只有发生 4 977 bp 缺失的模板才能扩增出相应的片段 II,而第 2 轮和第 3 轮反应模板分别使用片段 II 和 III,提高产物的特异性,以片段 IV 含量代表发生缺失的模板含量。

**1.6 PCR 反应体系及条件** 见参考文献[6-7]。

**1.7 缺失片段定量分析** 取固定体积的 PCR 片段 I 和 IV,经琼脂糖凝胶电泳,应用 Bio\_Rad DOC1000 采集凝胶图像,Molecular Analysis 软件分析电泳条带灰度值,线粒体 DNA 4 977 bp 相对缺失率=(片段 IV 灰度值/片段 I 灰度值)×100%。

**1.8 统计学处理** 采用 SPSS15.0 软件进行统计学处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,分别进行方差分析,t 检验和相关性分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 不同剂量 X 线照射后 4 种细胞的 SF 和放射敏感性参数** 根据多靶单击数学模型  $SF = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^n$  拟合剂量存活曲线,计算放射敏感性参数,见表 1、2 和图 1。放射敏感性由高到低依次是 HeLa 细胞、HepG2 细胞、EC-9706 细胞和 PC-3 细胞。

**2.2 线粒体 DNA 4 977 bp 缺失率** 照射后 4 种肿瘤细胞的线粒体 DNA 4 977 bp 缺失率,见表 3。分别与未照射前比较,HeLa 细胞经 1 Gy 照射后细胞线粒体 DNA 4 977 bp 缺失率增高( $t = 3.759, P = 0.002$ ),HepG2、EC-9706 和 PC-3 细胞经 1 Gy 照射后缺失率无明显变化( $t = 1.892, P = 0.079; t = 2.070,$

$P = 0.057; t = 1.958, P = 0.071$ ),而经 2 Gy 照射后线粒体 DNA 4 977 bp 缺失率增高( $t = 5.409, P = 0.000; t = 3.418, P = 0.004; t = 3.474, P = 0.004$ )。

1 Gy X 线照射后,4 种细胞线粒体 DNA 4 977 bp 缺失率比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );2 Gy X 线照射后,HeLa 细胞线粒体 DNA 4 977 bp 缺失率高于其余 3 种细胞( $P < 0.01$ );4 Gy 和 8 Gy X 线照射后,HeLa 细胞线粒体 DNA 4 977 bp 缺失率高于其余 3 种细胞( $P < 0.05$ ),HepG2 细胞和 EC-9706 细胞线粒体 DNA 4 977 bp 缺失率高于 PC-3 细胞( $P < 0.01$ )。

表 1 不同剂量 X 线照射后 4 种细胞的 SF( $\bar{x} \pm s$ )

细胞种类	1 Gy	2 Gy	4 Gy	8 Gy
HeLa 细胞	0.91±0.02	0.51±0.06	0.20±0.04	0.02±0.01
HepG2 细胞	0.90±0.03	0.54±0.04	0.27±0.04	0.08±0.02
EC-9706 细胞	0.89±0.04	0.57±0.06	0.31±0.04	0.09±0.04
PC-3 细胞	0.90±0.04	0.79±0.05	0.52±0.04	0.17±0.05

表 2 4 种细胞的放射敏感性参数

细胞种类	D <sub>0</sub>	D <sub>q</sub>	N	SF <sub>1</sub>	SF <sub>2</sub>	SF <sub>4</sub>	SF <sub>8</sub>
HeLa 细胞	1.41	1.53	2.96	0.86	0.56	0.16	0.01
HepG2 细胞	2.00	1.36	1.97	0.84	0.60	0.25	0.04
EC-9706 细胞	2.40	1.29	1.71	0.84	0.62	0.30	0.06
PC-3 细胞	3.58	2.08	1.79	0.92	0.78	0.51	0.18

表 3 照射后肿瘤细胞线粒体 DNA 4 977 bp 缺失率( $\bar{x} \pm s$ )

细胞种类	0 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy	8 Gy
HeLa 细胞	0.57±0.05	0.65±0.02	0.78±0.04	0.99±0.05	1.35±0.06
HepG2 细胞	0.62±0.08	0.68±0.03	0.77±0.04	0.97±0.05	1.21±0.06
EC-9706 细胞	0.32±0.08	0.38±0.04	0.45±0.04	0.68±0.06	0.87±0.05
PC-3 细胞	0.74±0.06	0.79±0.05	0.88±0.05	0.95±0.05	0.92±0.04

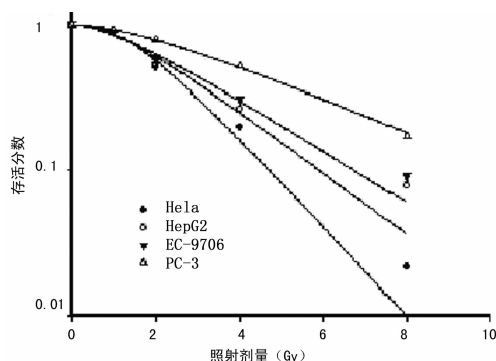


图 1 肿瘤细胞剂量存活曲线

**2.3 线粒体 DNA 4 977 bp 缺失率与 SF 的相关性** 肿瘤细胞具有固有放射敏感性,即每个肿瘤细胞系的 SF 具有固定的剂量依赖性,而线粒体 DNA 4 977 bp 缺失率随照射剂量增大而增加,也具有剂量依赖性。HeLa、HepG2 和 EC-9706 细胞的 SF 值与缺失率之间呈负相关( $r = -0.951, P = 0.013; r = -0.976, P = 0.004; r = -0.986, P = 0.002$ ),而在 PC-3 细胞的 SF 值与线粒体 DNA 4 977 bp 之间则呈负相关( $r =$

-0.831,  $P=0.081$ 。

### 3 讨 论

线粒体有独立于核外的基因组,由于处于裸露状态、缺乏(非)组蛋白保护,直接暴露于自由基环境等特点,发生突变的频率明显增高,且不易修复<sup>[8]</sup>。线粒体 DNA 4 977 bp 是位于线粒体 DNA 碱基序列 8 470~8 482 和 13 447~13 459 之间的 13 bp 正向重复序列,被称为“common deletion”。研究证实它可以作为衰老、光老化、辐射剂量学和退行性疾病的分子标记<sup>[9-11]</sup>,电离辐射亦可导致特异性的缺失。目前认为其机制是由同源重组所致,DNA 复制时该正向重复序列很容易发生错配,修复率很低,形成两条链下游环,而富含 G 碱基的环,对单链态氧较敏感,当受到电离辐射致使 DNA 双链断裂,该下游环断裂后末端相互链接,则缺失形成<sup>[12]</sup>。放射治疗是通过射线直接和间接(自由基等)对细胞的 DNA 损伤,主要是不易修复的双链断裂发挥杀伤效应,而线粒体 DNA 4 977 bp 缺失是 DNA 双链断裂的损伤程度的标志之一,以此作为观察终点来判断肿瘤细胞放射损伤和预测放射敏感性。

线粒体 DNA 4 977 bp 缺失广泛存在各种组织中,经电离辐射后缺失可以累积。本研究中 HeLa 细胞经 1 Gy X 线照射后即检测到缺失增加,证实经 1 Gy X 线照射后缺失累积,而其余 3 种细胞均经 2 Gy X 线照射后才出现。Kubota 等<sup>[13]</sup>的研究也得出类似结果,即放射敏感和抗拒的细胞分别经 2 Gy 和 10 Gy 照射发现缺失,认为导致缺失的起始剂量可能是判断肿瘤细胞放射敏感性的标志之一。依此推断放射敏感性不同的 HepG2、EC-9706 和 PC-3 3 种细胞在 1 Gy 和 2 Gy X 线照射之间各自存在导致缺失增加的辐射阈值,有待细分照射剂量来验证,可能成为一种区别放射敏感性的方法。

缺失率比较结果证明,1 Gy X 线照射后,4 种细胞线粒体 DNA 4 977 bp 缺失率比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );2 Gy X 线照射后,HeLa 细胞线粒体 DNA 4 977 bp 缺失率高于其余 3 种细胞( $P<0.01$ );4 Gy 和 8 Gy X 线照射后,HeLa 细胞线粒体 DNA 4 977 bp 缺失率高于其余 3 种细胞( $P<0.05$ ),HepG2 细胞和 EC-9706 细胞线粒体 DNA 4 977 bp 缺失率高于 PC-3 细胞( $P<0.01$ )。放射敏感的细胞较放射抗拒的细胞更容易发生缺失,照射剂量越大,缺失率差异越明显,放射敏感性接近,诸如 EC-9706 和 HepG2 细胞缺失率差距不明显,以此推断通过细胞间缺失率的比较可以间接判断肿瘤细胞放射敏感性。

研究发现,照射导致的缺失可以积累并具有剂量依赖性。Prasanna 等<sup>[14]</sup>分析外周血淋巴细胞线粒体 DNA 4 977 bp 缺失,发现很好的剂量效应关系,可以逆向准确推算出急性照射的剂量,Mohamed 等<sup>[15]</sup>也得出相似结论。放射敏感性决定细胞经一定剂量照射后的 SF,因此 SF 具有剂量依赖性,与缺失率比较,发现 HeLa、HepG2 和 EC-9706 3 种细胞呈显著负相关性,说明在一定程度上缺失率可以代替 SF,间接反映细胞放射敏感性。

本研究通过剂量间和细胞间的缺失比较,判断细胞放射敏感性,但仍存在剂量设定、缺失差异量化等问题,需进一步验证规律和探讨机制。

### 参考文献:

[1] Fench M. Biomarker of genetic damage for cancer epide-

miology[J]. *Toxicology*, 2002, 181(182): 411-416.

- [2] Bonassi S, Hagmar L, Strömberg U, et al. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human Cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(6): 1619-1625.
- [3] Chen SC, Kao CM, Huang MH, et al. Assessment of genotoxicity of benzidine and its structural analogues to human lymphocytes using comet assay[J]. *Toxicol Sci*, 2003, 72(2): 283-288.
- [4] 蒋亚齐. 基于辐射诱染染色体和 DNA 损伤的生物剂量计可行性研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2007.
- [5] 陈晓穗, 封江彬, 周丽君, 等. 电离辐射致 DNA 4 977 bp 缺失质粒构建及其鉴定[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2006, 26(1): 52-54.
- [6] 褚丽萍, 刘强, 王芹, 等. 线粒体 DNA 4 977 bp 缺失和彗星分析评价肿瘤细胞的放射敏感性[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2008, 28(2): 142-145.
- [7] 封江彬, 陆雪, 陈德清, 等. 巢式 PCR 分析电离辐射诱导人外周血线粒体 DNA 4 977 bp 缺失[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2004, 24(6): 533-536.
- [8] Croteau DL, Stierum RH, Bohr VA. Mitochondrial DNA repair pathways[J]. *Mutat Res*, 1999, 434(3): 137-148.
- [9] Meissner C, Bruse P, Mohamed SA, et al. The 4 977 bp deletion of mitochondrial DNA in human skeletal muscle, heart and different areas of the brain; a useful biomarker or more? [J]. *Exp Gerontol*, 2008, 43(7): 645-652.
- [10] Yang JH, Lee HC, Chung JG, et al. Mitochondrial DNA mutations in light-associated skin tumors[J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(3A): 1753-1758.
- [11] Park CB, Larsson NG. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging[J]. *J Cell Biol*, 2011, 193(5): 809-818.
- [12] Berneburg M, Grether-Beck S, Kuerten V, et al. Singlet Oxygen mediates the UVA-induced Generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(22): 15345-15349.
- [13] Kubota N, Hayashi J, Inada T, et al. Induction of a particular deletion in mitochondrial DNA by X rays depends on the inherent radiosensitivity of the cells [J]. *Radiat Res*, 1997, 148(4): 395-398.
- [14] Prasanna PG, Hamel CJ, Escalada ND, et al. Biological dosimetry using human interphase peripheral blood lymphocytes[J]. *Mil Med*, 2002, 167(2 Suppl): 10-12.
- [15] Mohamed SA, Wesch D, Blumenthal A, et al. Detection of the 4 977 bp deletion of mitochondrial DNA in different human blood cells [J]. *Exp Gerontol*, 2004, 39(2): 181-188.

(收稿日期: 2011-10-09 修回日期: 2012-01-06)