

· 论 著 ·

RNAi 对肝癌细胞放射增敏的实验研究^{*}李高峰¹, 王宏梅², 陈龙华^{2△}

(1. 广西柳州市工人医院肿瘤科 545005; 2. 南方医科大学南方医院放疗科, 广州 510515)

摘要:目的 探讨 ATM 基因表达沉默对肝癌细胞辐射增敏的影响。方法 采用含 ATM 干扰片段的慢病毒感染 HepG2 细胞, 将细胞制成单细胞悬液, 给予不同剂量照射, 照射后继续培养细胞, 研究 RNAi 前后 HepG2 细胞照射后继续细胞集落形成率, 利用 Graphpad prism5.0 软件拟和线性二次曲线模型和单击多靶模型, 得出放射生物学参数。结果 HepG2 细胞干扰前后 D_0 值分别为: 3.37 ± 0.03 , 3.50 ± 0.06 , D_q 值分别为 1.73 ± 0.02 , 1.21 ± 0.03 , α/β 值分别 0.72 ± 0.11 , 3.52 ± 0.30 , D_0 、 D_q 、 α/β 值差异均有统计学意义。放射增敏比 $SER=1.37$ 。结论 RNAi ATM 基因可以改变肝癌细胞的放射生物学参数, 达到放射增敏的目的。ATM 有望成为肝癌患者治疗的新靶点。

关键词: ATM; 肝癌; RNAi; 放疗

中图分类号: R735.7; R730.55

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)12-1492-02

Experimental research of RNAi to the enhanced radiotherapy sensitivity of liver cancer cell^{*}LI Gao-feng¹, WANG Hong-mei², CHEN Long-hua^{2△}

(1. Department of Radiation Oncology, Liuzhou Worker's Hospital, Liuzhou, Guangxi 545005, China; 2. Department of Radiation Oncology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To explore the influence of the silent express of ATM gene on the enhanced sensitivity of radiotherapy to the liver cancer cell. **Methods** Different doses of radiotherapy were given to the single cell suspensions of different concentration made of virus infected HepG2 cells with ATM interference. Cells were cultivated after radiotherapy, To investigated HepG2 cells colong forming efficiency after radiotherapy before and after RNAi. Radiation biological parameter were obtained after the linear quadratic curve model and click multifarget model were astallished. **Results** The values of D_0 , D_q and α/β with HepG2 cells before and after RNAi were all significance. The ratio of enhanced radiotherapy sensitivity was 1.37. **Conclusion** The goal of enhanced radiotherapy sensitivity can be achieved by changing the radiation biological parameter of liver cancer cell through RNAi of ATM gene, ATM will hopefully be the new target of treatment in the liver cancer patients.

Key words: ataxia-telangiectasia mutant; liver cancer; RNA interference; radiotherapy

原发性肝癌是中国常见的恶性肿瘤之一, 具有发病率高、进展快、疗效差、死亡率高特点, 首选的治疗手段是手术, 但大多数患者丧失了手术机会, 放射治疗已成为肝癌非手术治疗的重要手段。由于肝细胞的耐受量低于肝癌细胞的根治量, 且放疗中存在的辐射抗拒, 导致疗效不满意, 为了能够降低辐射抗拒性而达到放疗增敏作用, 作者以前的研究成功地对 HepG2 细胞的 ATM 基因进行沉默, 本研究对 ATM 基因沉默的 HepG2 细胞进行放射, 观察 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 前后 HepG2 细胞的生长情况及放射生物学参数, 评价是否具有放射增敏作用。

1 材料与方法

1.1 材料 HepG2 肝癌细胞株为南方医科大学病理教研室自存; TRIzol 和 LipofectaminTM 2000 购自 Invitrogen 公司; DNAase I 购自上海生工生物公司; Reverse Transcription System 试剂盒购自 Promega 公司, 直线加速器: 美国 Varian 公司。

1.2 细胞培养 肝癌细胞株 HepG2 采用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养; 送至 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养, 取生长状态良好的细胞用于实验。

1.3 细胞照射 将指数生长细胞用 0.25% 胰酶消化后, 制成

单细胞悬液, 计数细胞悬液浓度, 然后稀释成 1×10^4 /mL、 2×10^4 /mL、 4×10^4 /mL、 1×10^5 /mL 4 组不同的浓度梯度, 分成 6 组, 接种于直径 9 cm 的玻璃培养皿中, 按 0、2、4、6、8、10 Gy 共 6 个剂量组给予照射, 采用 varian2100C 直线加速器 6 MV X 线为放射源, 源皮距照射, 剂量率 200 cGy/min, SSD=100 cm, PDD=80%, 照射野 100 mm×100 mm, 并用有机玻璃进行组织补偿。每个剂量点 3 个平行样本, 每组实验重复 3 次。

1.4 集落形成实验 照射后将细胞置于 37℃ 孵箱, 5% CO₂ 进行培养, 连续 10~14 d。终止培养后常规以 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次, 经甲醇固定后采用姬姆萨 (Giemsa) 染液染色, 在普通光学显微镜下计数细胞数大于 50 的细胞克隆, 计算克隆形成率 (克隆形成率 = 生成的克隆数/接种细胞数 × 100%) 以及存活分数 (survival fraction, SF), SF = 受照射细胞的克隆形成率/对照组细胞克隆形成率 × 100%。

1.5 放射生物学参数的获取及剂量存活曲线的绘制 以 3 次照射的存活分数均值进行分析, 运用 GraphPad 公司 Prism 5.0 软件进行单击多靶模型和 L-Q 线性模型曲线拟合, 绘制出剂量存活曲线。根据单击多靶模型求出 D_0 、 D_q 、N 和 SF₂ (survival fraction at 2 Gy), 其中 $\log N = D_q/D_0$, 根据线性二次模型求出 α 、 β 、 α/β 值及 SF₂。放射增敏比 (sensitizing enhancement

^{*} 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 (2005004776)。 [△] 通讯作者, E-mail: flclh@fimu.net。

表 1 HepG2 细胞 RNAi 前后集落形成率和细胞存活率 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

照射剂量(Gy)	HepG2 细胞 RNAi 前		HepG2 细胞 RNAi 后	
	集落形成率(%)	细胞存活率(%)	集落形成率(%)	细胞存活率(%)
0	0.230 0	1	0.225 0	1
2	0.205 3±0.000 7	0.892 9±0.003 1	0.177 9±0.003 1	0.785 0±0.004 2
4	0.155 9±0.000 7	0.681 8±0.007 4	0.136 8±0.000 7	0.607 9±0.003 2
6	0.119 7±0.000 2	0.520 4±0.000 9	0.093 0±0.005 4	0.413 2±0.004 0
8	0.063 8±0.000 1	0.277 4±0.000 6	0.045 4±0.000 7	0.201 8±0.003 0
10	0.020 9±0.000 1	0.091 0±0.000 4	0.000 9±0.000 7	0.043 5±0.004 7

ratio,SER),SER=干扰前组 SF₂/干扰后组 SF₂。

1.6 统计学方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 软件,配对 t 检验进行统计分析,以 P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

RNAi 前后 HepG2 细胞经过照射后,计算出各剂量组细胞集落形成率和细胞存活率,见表 1。将各实验组得到的数据输入 Prism5.0 软件,进行单击多靶模型和 L-Q 线性模型曲线拟合,绘制出剂量存活曲线见图 1。求出各放射生物学参数值 α 、 β 、 α/β 、D₀、Dq、N、SF₂,并进行统计学处理,具体结果见表 2,最后得到放射增敏比 SER=1.137。

表 2 HepG2 细胞 RNAi 前后放射生物学参数比较 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

参数	n	干扰前	干扰后	t	P
SF ₂	3	0.892 8±0.003 0	0.785 0±0.004 2	1.368	0.230
α	3	0.013 3±0.001 9	0.060 7±0.003 0	2.173	0.082
β	3	0.018 6±0.000 2	0.017 2±0.000 5	2.153	0.084
α/β	3	0.716 3±0.113 4	3.522 0±0.299 1	-3.929	0.011
D ₀	3	3.370 3±0.031 6	3.505 6±0.059 2	-15.395	0.000
Dq	3	1.734 6±0.018 0	1.214 0±0.025 2	-2.865	0.035
N	3	3.272 3±0.074 9	2.221 0±0.065 1	-4.890	0.005

Paired-samples T Test $\alpha=0.05$ 。

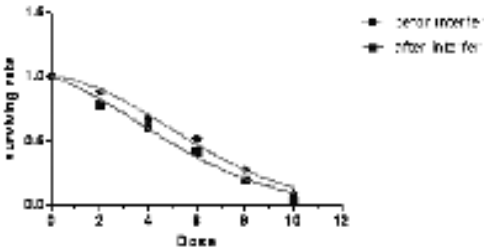


图 1 HepG2 细胞 RNAi 前后细胞存活曲线 (L-Q 线性二次模型)

3 讨 论

野生型 ATM 位于 11q22~23,有 150 kb DNA,66 个外显子,其表达基因 mRNA 长为 13 kb。整个 ATM 基因编码 3 056 个氨基酸,相对分子质量约 350×10³。ATM 最主要的功能区为磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K),它位于 ATM 蛋白 C 末端。此功能区主要参与细胞周期的调控,DNA 损伤识别和修复^[1]。ATM 通过磷酸化和去磷

酸化一系列蛋白底物如 P53、c2abl(一种非受体酪氨酸激酶)、复制蛋白 A(replication protein A,RPA)等参与激活细胞周期检测点和 DNA 损伤后修复信号网络系统,使受损的 DNA 停止于细胞周期检测点并对其进行修复^[2],当 ATM 由于突变而功能受损时,细胞则丧失这一功能,DNA 双链断裂修复障碍^[3-4],从而出现对放射的高度敏感性。对 ATM 蛋白在细胞信号传导通路,细胞周期检测点以及 DNA 的修复的研究可为肿瘤的放射增敏的治疗提供新的方法。

DNA 双链断裂(DSB)是放射治疗杀死肿瘤细胞的基本机制,在人类细胞内有 2 条 DSB 的修复途径:HR 和 NHEJ,前者所修复的 DNA 片段来自同一条 DNA 链,且末端每一个碱基完全按照互补配对原则进行重组修复,而后者所修复 DNA 链可来自不同的 DNA 链,其末端连接时仅部分碱基结合即可^[5]。ATM 与 HR 的关系密切,故而 ATM 基因缺失或表达受抑制会导致细胞放射敏感性增高^[6-7]。

RNA 干扰是在小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)的介导下特异性降解相应序列 mRNA 的现象,属于转录后基因沉默机制^[8],而 siRNA 的持续表达能引发更为持久的基因沉默,从而为研究基因功能创造有利条件。本实验利用 RNAi 技术抑制肝癌 HepG2 细胞的 ATM 基因表达或活性,观察细胞对放射线的敏感性变化。

目前集落形成法被认为是测定细胞内在辐射敏感性的黄金标准,是测定细胞存活的最可靠方法。L-Q 模型定义:假定辐射引起的细胞死亡是由两部分组成,一部分与照射剂量成比例,另一部分与照射剂量的平方成比例,用公式表达:SF=EXP(- α D- β D²)。其中 α 值越大,表明细胞对辐射越敏感,参数 β 的贡献随照射剂量增加而加大^[9]。本实验用集落形成法及 L-Q 模型拟合分析了 HepG2 细胞干扰后的辐射敏感性,发现干扰后的辐射敏感性明显增加。

D₀ 为曲线斜率倒数,它反映细胞在相对高剂量区对射线的敏感性,D₀ 值越大,细胞对放射越敏感。Dq 是存活曲线的直线部分向上延长与通过存活率等于 1 的横轴相交点的剂量,表明亚致死损伤修复能力的大小,Dq 小则细胞对亚致死损伤修复能力弱。本实验测得数据为:HepG2 细胞干扰前后 D₀ 值分别为:3.370 3±0.031 6、3.505 6±0.059 2,Dq 值分别为:1.734 6±0.018 0、1.214 0±0.025 2。干扰后 D₀、Dq 值均较干扰前减小,且差异有统计学意义(P<0.05)。说明干扰后细胞的放疗敏感性增加。组织的 α/β 值越低,对损伤修复能力强,反之 α/β 值越高,对损伤修复能力弱。HepG2 细胞干扰前后 α/β 值分别为 0.716 3±0.113 4、3.522 0±0.299 1,差异有统计学意义,即 HepG2 细胞 RNAi 后的 α/β 值(下转第 1496 页)

直达足底,但对降低截肢平面,挽救患者生命有重要作用,同时可为进一步治疗争取时间^[7]。本组资料中 7 例行髂/股浅动脉支架置入+股深动脉内膜剥脱,均取得满意的效果。

目前,临床上对下肢动脉硬化包括糖尿病下肢动脉硬化最为简便、客观、有效的诊断和定量无创性诊断方法是 ABI,临床上已广泛用于下肢动脉硬化的诊断和预后分析,比血氧测定法和脉搏振幅体积描计法等均敏感和可靠^[8]。本组结果发现各种血管重建方法均能明显提高 ABI 值,但杂交手术提高 ABI 值的幅度明显高于外科手术和腔内治疗,与临床疗效的结果完全一致。

本组病例采用彩色多普勒超声或血管造影判断通畅率,虽然血管造影仍然被认为是诊断血管疾病的金标准,但因其有创性使其临床应用受到一定程度的限制。彩超对显示动脉狭窄和闭塞具有较高的准确性,同时可以定量地测量管腔的狭窄百分比,且可重复检测,是判断通畅率的较好指标^[9]。

总之,下肢动脉硬化闭塞症的治疗相当复杂,任何一种方法均不能解决所有问题,需按照个体化原则制定包括血管重建在内的综合治疗方法^[10]。杂交手术扩大了外科干预的范围,提高了通畅率,值得继续临床实践。本组资料病例数较少,且随访率不高,随访时间较短,尚须进一步总结病例数及延长随访时间以观察杂交手术的远期疗效。同时,杂交手术的具体方式多样,如何根据患者的病变特点及全身情况选择合适的手术方案尚需积极探索。

参考文献:

- [1] 杜冬,庄永青,傅小宽,等. DSA 监测下选择性动脉旁路重建治疗下肢动脉硬化闭塞症[J]. 广东医学,2007,28(8):1272.

(上接第 1493 页)

较前明显增大,对放射损伤修复能力减弱,亦说明具有一定的增敏作用。SF₂ 为评价恶性肿瘤细胞放射敏感性指标之一,SF₂ 高,放射敏感性低。HepG2 细胞干扰前后分别为 0.892 8±0.003 0,0.785 0±0.004 2,干扰后较干扰前有所降低,但差异无统计学意义。通过计算放射增敏比值 SER 为 1.137,说明干扰后放射敏感性增高。

总之,本实验结果说明 ATM 基因沉默后促进了细胞对 X 线的敏感性,亦即对肝癌细胞 HepG2 具有一定的放射增敏作用。ATM 可能成为预示肿瘤细胞放射敏感性的指标,更有可能成为肝癌放疗增敏的理想靶点,今后还将进行动物实验以进一步观察其放射增敏作用。本研究为肝癌的基因治疗和放疗增敏提供了新的方法和思路。

参考文献:

- [1] Dasika GK, Lin SC, Zhao S, et al. DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis[J]. *Oncogene*, 1999, 18: 7883.
- [2] Olsen JH, Hahneemann JM, Borresen Dale AL, et al. Cancer in patients with ataxia-telangiectasia and in their relatives in the nordic countries[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93(2):121.

- [2] Hiatt WR. Medical treatment of peripheral arterial disease and claudication[J]. *N Engl J Med*, 2001, 344:1608.
- [3] Johnston KW, Rae M, Hogg-Johnston SA, et al. 5-year results of a prospective study of percutaneous transluminal angioplasty[J]. *Ann Surg*, 1987, 206:408.
- [4] Alan TH, Timothy PM, Marge BL, et al. Gaps in public knowledge of peripheral arterial disease: the first national PAD public awareness survey[J]. *Circulation*, 2007, 116: 2086.
- [5] Faglia E, Clerici G, Clerissi J, et al. When is a technically successful peripheral angioplasty effective in preventing above-the-ankle amputation in diabetic patients with critical limb ischaemia[J]. *Diabet Med*, 2007, 24(8):823.
- [6] Slovut DP, Demaioribus CA. Hybrid revascularization using silverhawk atherectomy and infrapopliteal bypass for limb salvage[J]. *Ann Vasc Surg*, 2007, 21:796.
- [7] 蒋米尔. 利用股深动脉重建严重缺血下肢血循环[J]. 中国实用外科杂志, 2004, 24(4):206.
- [8] 王彦, 陈兵. 糖尿病下肢动脉血管病变的临床评估方法: 踝肱压指数[J]. 重庆医学, 2004, 33(2):303.
- [9] 王众, 金蓉, 窦晓冬, 等. 115 例下肢动脉疾病的超声诊断[J]. 重庆医学, 2009, 38(8):972.
- [10] Jason HR, John RL. Overview of new technologies for lower extremity revascularization[J]. *Circulation*, 2007, 116:2072.

(收稿日期:2009-06-20 修回日期:2009-11-27)

- [3] Grebaek K, Worm J, Ralfkiaer E, et al. ATM mutations are associated with inactivation of the ARF-TP53 tumor suppressor pathway in diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Blood*, 2002, 100(4):1430.
- [4] Iliakis G, Wang Y, Guan J, et al. DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation[J]. *Oncogene*, 2003, 22:5834.
- [5] Willers H, Dahm-Daphi J, Powell SN. Repair of radiation damage to DNA[J]. *Br J Cancer*, 2004, 90:1297.
- [6] Sarkaria JN, Eshleman JS. ATM as a target for novel radiosensitizers[J]. *Semin Radiat Oncol*, 2001, 11(4):316.
- [7] 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(2):2224.
- [8] Lee SR, Collins K. Physical and functional coupling of RNA-dependent RNA polymerase and Dicer in the biogenesis of endogenous siRNAs[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14(7):604.
- [9] Wang JZ, Li XA, Souza WD, et al. Impact of prolonged fraction delivery times on tumor control: a note of caution for intensity-modulated radiation therapy(IMRT)[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2003, 57(2):543.

(收稿日期:2009-06-10 修回日期:2009-11-17)