文章编号:1000-5404(2008)14-1305-03

论著

Polι在膀胱尿路上皮癌细胞株及肿瘤组织中mRNA的表达

赵 谦[1],曾益军[2],杨 劲[2],金锡御[1],陈志文[1],宋 波[1],位全芳[2],季惠翔[1],李 劲[1],周虎传[2] (第三军医大学:[1]西南医院全军泌尿外科研究所,[2]基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 检测DNA聚合酶ι(Polymerase iota,Polι)在尿路上皮癌细胞株及肿瘤组织的表达,探讨Polι在尿路上皮癌组织表达的意义。**方法** 培养尿路上皮癌细胞株BIU87、T24,反转录聚合酶链式反应(Reverse transciptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测Polι在尿路上皮癌细胞株的表达;收集人膀胱黏膜正常组织及临床膀胱尿路上皮癌、肾盂尿路上皮癌组织标本,检测组织标本中Polι的表达。**结果** Polι在尿路上皮癌细胞株有丰富表达,显著高于膀胱正常黏膜组织;Polι在膀胱尿路上皮癌及肾盂癌组织的表达显著高于膀胱正常黏膜组织的表达($P<0.01$),并与尿路上皮癌的分级有关。**结论** Polι在尿路上皮癌组织的高表达可能与尿路上皮癌的发生、发展有关。

关键词: DNA聚合酶; Polι;尿路上皮癌
中图法分类号: R394.3;R730.23;R737.14 **文献标识码:** A

mRNA expression of DNA polymerase iota in transitional cell carcinoma cell lines and tissues

ZHAO Qian[1], ZENG Yi-jun[2], YANG Jin[2], JIN Xi-yu[1], CHEN Zhi-wen[1], SONG Bo[1], WEI Quan-fang[2], JI Hui-xiang[1], LI Jin[1], ZHOU Hu-chuan[2] ([1]Urinary Surgery Research Institute, Southwest Hospital, [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the significance of DNA polymerase iota (Polι) expression in transitional cell carcinoma. **Methods** RT-PCR was applied to detect the expression of Polι in BIU87 and T24 cell lines, and in tissue samples of transitional cell carcinoma from bladder carcinoma and renal pelvic carcinoma. **Results** Expression of Polι was slight in normal bladder mucous membrane but significantly elevated in transitional cell carcinoma cell lines. Compared with Polι expression in normal bladder mucous membrane, the expression was significantly increased in transitional cell carcinoma tissues ($P<0.01$) and also associated with the grade of transitional cell carcinoma. **Conclusion** The significantly increased expression of polymerase iota may be associated with the genesis and development of transitional cell carcinoma.

Key words: DNA polymerase; polymerase iota; transitional cell carcinoma

尿路上皮癌在我国男性泌尿生殖系肿瘤中发生率居首位,近年有发生率增加和年轻化趋势。较为明确的尿路上皮癌危险因素为吸烟、化工染料(如苯胺)和药物(如非那西丁、环磷酰胺)等,上述危险因素均为DNA损伤剂。DNA损伤剂是如何导致基因突变,最终导致肿瘤的发生,其分子机制一直不清楚。直到近年生物细胞内一系列的Y家族DNA聚合酶及其相应的DNA损伤耐受机制的发现,为研究这一领域提供了新的线索[1,2]。Polι是Y家族DNA聚合酶之一,一方面可以通过高灵活性的Hoogsteen键进行碱基配对,而非严格的Waston-Crick碱基互补配对方式进行DNA复制[3,4],同时由于缺少3′-5′端外切酶活性,在DNA复制中缺乏错配碱基的校正阅读功能,两方面均导致其对DNA复制有很高的碱基错配倾向[5],是目前已知体外实验保真性最低的DNA聚合酶。由于Polι在跨损伤复制过程中碱基的高错配倾向,易产生基因突变。尿路上皮癌高复发、高异质性的生物学行为与其遗传背景不稳定、基因突变密切相关,因此我们认为Polι很有可能在膀胱肿瘤的发生、发展中起着重要的作用,对此我们进行了研究。

基金项目: 国家自然科学基金(30770460);全军医学科研"十一五"计划国际合作项目(06H026)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30770460) and the Research Project for Medical Development of PLA(06H026)
作者简介: 赵 谦,男,陕西省大荔县人,博士研究生,主治医师,主要从事膀胱肿瘤方面的研究。电话:(023)68752948, E-mail:qza521@sina.com
通信作者: 杨 劲,电话:(023)68754326,E-mail:yangjin@tmmu.edu.cn
金锡御,电话:(023)68754787
收稿日期: 2007-05-10;**修回日期:** 2007-10-26

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株来源和培养基 本研究使用的 BIU87、T24 细胞株均为膀胱尿路上皮癌细胞株,由第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所保存。培养基为 RPMI1640,配制时添加 $NaHCO_3$ 2.4 g/L,青霉素 100 U/ml,链霉素 100 U/ml,10% 胎牛血清(HyClone 公司)。

1.1.2 临床标本的收集 临床标本来自第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所,膀胱正常黏膜组织 15 例,膀胱尿路上皮癌组织 28 例,肾盂尿路上皮癌组织 11 例;尿路上皮癌组织Ⅰ级 13 例,Ⅱ级 16 例,Ⅲ级 10 例。组织标本取自 2005 年 5 月至 2006 年 9 月在西南医院行膀胱全切术及肾盂癌根治手术的患者,经过病理检查证实,均为尿路上皮癌。在肿瘤原发灶上切取 200 mg 左右组织作为癌组织标本;正常膀胱黏膜组织来自距膀胱肿瘤 2 cm 以上的正常黏膜或非肿瘤患者膀胱黏膜组织,作为对照。标本切取后均立即放入液氮冻存,防止 RNA 降解。

1.1.3 RT-PCR 检测试剂 Tripure 试剂(Sigma 公司);MMLV 反转录酶,RNaseOUT™重组核酸酶抑制剂(美国 Invitrogen 公司);随机引物(Promega 公司);*Taq* DNA 聚合酶,dNTP,DNA Marker DL-2000(大连 TaKaRa 公司);PCR 引物由上海生工公司合成,Polι(812 bp):正义引物 5′-GAGAAGACCTGACCCGCTACA-3′;反义引物:5′-TGAAGGAATAGGGCACTGACG-3′。内参 18S rRNA 引物(330 bp),正义引物:5′-CCTCGAAAGAGTCCTGTA-3′;反义引物:5′-GGGAACGCGTGCATTTAT-3′。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养剂,常规方法 5% CO_2、37℃条件下培养 BIU87、T24 膀胱尿路上皮癌细胞株。

1.2.2 尿路上皮癌细胞株及组织临床标本总 RNA 提取 将 100 ml 细胞培养瓶中细胞生长至 80% ~90%,弃去培养基,加入 1 ml Tripure,使细胞溶解,吹打均匀,移至 1.5 ml 的 EP 管(组织临床标本称取约 100 mg,液氮的冷却下,在研钵中研磨成粉末状,移至含有 1 ml Tripure 的 1.5 ml 的 EP 管),室温放置 5 min,使核蛋白复合物完全解离;加入 200 μl 氯仿于每毫升 Tripure,剧烈振动 15 s,于 4 ℃以 12 000 × *g* 离心 15 min 使混合物分为两相,将上层水相移入新的离心管;于水相中加入 500 μl 异丙醇,轻轻混匀,沉淀 RNA 10 min,于 4 ℃以 12 000 × *g* 离心 10 min,保留沉淀,加入 75% 乙醇(DEPC 处理)1 ml 洗涤,于 4℃以 10 000 × *g* 离心 5 min,留取沉淀物晾干,用 0.1% DEPC 20 μl 溶解 RNA;2 μl 加 0.1% DEPC 998 μl 释 500 倍,用紫外分光光度计测定 RNA 样品在 260 nm 和 280 nm 处的光密度值 *D*(260)和 *D*(280),用于浓度和纯度的鉴定,本实验 RNA 样品的 *D*(260)/*D*(280) 值为 1.8 ~2.0,符合纯度的要求。计算 RNA 的浓度,并取上述提取总 RNA 2 μl 于 1% 琼脂糖凝胶中电泳,初步检测 RNA 的分子量大体分布及完整性。

1.2.3 RT 获取 cDNA 将上述提取的总 RNA 样品 5 μg 移到离心管,依次加入以下试剂:随机引物(500 ng/μl) 1 μl;dNTP (10 mmol/L)1 μl;去 RNA 酶的去离子水 10 μl 减去总 RNA 样品体积;将上述溶液混匀后置于 65 ℃水浴 5 min,然后转移至冰浴约 5 min,然后加入以下溶液:5 × First-Strand Buffer -Ⅱ 4 μl; DTT(0.1 mol/L)2 μl;RNaseOUT™重组核酸酶抑制剂(40 U/μl) 1 μl;将上述混合体系在 37 ℃水浴 2 min,然后加入 M-MLV 反转录酶(200 U/μl) 1 μl;将上述反应体系总体积 20 μl,在 PCR 仪中设置如下条件:25 ℃温育 10 min;37 ℃反应 50 min,70 ℃温育 15 min;保存于 4 ℃。

1.2.4 PCR 检测各细胞及组织 Polι 的表达 将上述合成 cDNA 样品 5 μl 移到离心管,依次加入以下试剂:10 × PCR 缓冲液 5 μl;$MgCl_2$ (25 mmol/L) 3 μl;dNTP (10 mmol/L)1 μl;Polι 上、下游引物(10 μmol/L) 2 μl × 2;内参照 18S rRNA 上、下游引物(10 μmol/L) 0.5 μl × 2;*Taq* (5 U/μl) 冰浴中加 0.5 μl;去 RNA 酶去离子水 30.5 μl,反应总体积 50 μl,在 PCR 仪中设置如下条件:94 ℃加热变性 5 min,使反转录酶失活,RNA-cDNA 杂合物变性;设置如下循环:94 ℃变性 45 s,54 ℃(临床组织标本组)复性 45 s(细胞株组复性温度 57 ℃),72 ℃延伸 1 min,总共 35 个循环,末轮循环 72 ℃延伸 5 min,保存于 4 ℃。PCR 扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳,利用凝胶成像密度分析系统及密度分析软件 Quantity One (Bio-Rad 公司)进行条带亮度扫描,对 Polι mRNA 进行半定量分析。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行 *t* 检验。

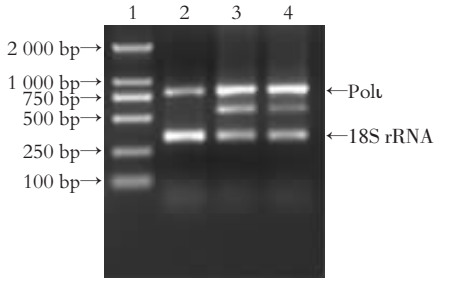
2 结果

2.1 膀胱尿路上皮癌细胞株和临床组织标本总 RNA 的提取

通过 Tripure 分离提取临床组织标本和膀胱尿路上皮癌细胞株总 RNA。紫外分光光度计检测值为 1.8 ~2.0。电泳结果显示:18S 和 28S 条带显示清晰,28S 条带的强度约为 18S 条带的 2 倍,5S 条带极弱,未见 DNA 污染条带出现,表明所提取的 RNA 完整性好,纯度可靠。

2.2 Polι 在膀胱尿路上皮癌细胞株 BIU87 及 T24 的表达

为了研究 Polι 是否与尿路上皮癌的发生有关,我们首先通过 RT-PCR 检测在 BIU87 肿瘤细胞株及 T24 肿瘤细胞株中 Polι mRNA 的表达。实验表明,在 BIU87 肿瘤细胞株及 T24 肿瘤细胞株有 Polι 的表达,是膀胱正常黏膜组织 Polι mRNA 表达的 2 倍以上(图 1),说明 Polι 与尿路上皮癌的发生可能有关。

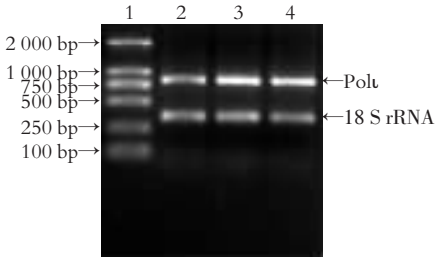


1:DNA 标准(DL 2000);2:膀胱正常黏膜;3:T24;4:BIU87

图 1 RT-PCR 检测 Polι 在膀胱正常黏膜、T24、BIU87 的表达

2.3　Polι 在膀胱尿路上皮癌组织及肾盂癌组织的表达

为了验证我们的设想,我们进一步通过 RT-PCR 检测 Polι mRNA 在临床组织标本膀胱正常黏膜组织、膀胱尿路上皮癌组织及肾盂癌组织的表达。发现 Polι 在膀胱尿路上皮癌及肾盂癌组织的表达显著高于膀胱正常黏膜组织的表达($P<0.01$)(图 2)。



1:DNA 标准(DL 2000);2:膀胱正常黏膜;3:膀胱尿路上皮癌组织;4:肾盂癌组织

图 2　RT-PCR 检测 Polι 在膀胱正常黏膜、膀胱尿路上皮癌组织、肾盂癌组织的表达

2.4　Polι 在尿路上皮癌组织的表达与尿路上皮癌分级的关系

为研究 Polι 是否与尿路上皮癌的异质性有关,我们将通过 RT-PCR 检测 Polι mRNA 在膀胱正常黏膜组织、Ⅰ级尿路上皮癌组织、Ⅱ级尿路上皮癌组织、Ⅲ级尿路上皮癌组织的表达。对结果进行统计分析,发现 Polι 在Ⅰ级尿路上皮癌组织和Ⅱ级尿路上皮癌组织的表达显著高于膀胱正常黏膜组织的表达($P<0.05$,$P<0.01$);在Ⅲ级尿路上皮癌组织的表达显著高于Ⅰ级尿路上皮癌组织($P<0.05$)。分析结果表明:Polι 可能与尿路上皮癌的异质性有关,即肿瘤的恶性程度越高,Polι 的表达量越高。

3　讨论

3.1　Polι 与肿瘤的发生、高异质性的关系

肿瘤分子遗传学研究普遍认为肿瘤的发生、发展是多基因改变多步骤的过程。DNA 损伤剂是导致肿瘤发生的主要原因之一,那么 DNA 损伤剂是如何导致基因突变,最终导致肿瘤的发生,其分子机制一直不清楚。直到近年 Y 家族 DNA 聚合酶及相应的 DNA 损伤耐受机制的发现,为研究此机制提供了重要的线索。Y 家族的 DNA 聚合酶主要功能为实施 DNA 损伤后的损伤耐受过程 - 跨损伤复制,故又名为跨损伤 DNA 聚合酶。跨损伤复制为细胞 DNA 损伤后的应急过程,在 DNA 过度损伤超越 DNA 修复能力或 DNA 修复缺陷时,当 DNA 复制叉进行至 DNA 的损伤碱基时,由于高保真 DNA 聚合酶无法识别 DNA 的损伤碱基,严重阻碍 DNA 复制,而错配倾向的 DNA 聚合酶能识别损伤碱基,并以损伤碱基为模板合成子链,从而跨越损伤,使复制继续进行,细胞由此免遭死亡;但由于可不严格遵照碱基互补配对原则实施 DNA 复制,跨损伤复制往往伴随高突变的产生。Polι 属于 Y 家族的 DNA 聚合酶之一,其保真性较高保真聚合酶低 1 000 ~ 10 000 倍,是目前已知的体外实验中保真性最低的 DNA 聚合酶。因此认为:Polι 较其他 Y 家族 DNA 聚合酶可能在诱发基因高突变中可能起着更为重要的作用。

目前,已有研究表明:人葡萄膜的黑素瘤的发展与高活性的表达 Polι 相关[1];肿瘤产生的缺氧诱导因子-1 可能通过介导人肿瘤细胞 Polι 的表达而导致肿瘤的基因突变和遗传的不稳定性[2];在 Polι 高表达的乳腺癌细胞株中,对 DNA 的损伤更容易诱导基因突变[7]。

3.2　Polι 在膀胱尿路上皮癌细胞株和临床组织的表达及意义

通过 RT-PCR 检测发现,在 BIU87 和 T24 肿瘤细胞株有丰富的 Polι 表达,且较膀胱正常黏膜组织表达有非常显著增加($P<0.01$)。膀胱尿路上皮癌和肾盂癌组织中,Polι 的表达显著增加,由于 Polι 高水平的表达可能导致 DNA 跨损伤复制过程中基因的高突变,因此 Polι 的高表达可能与尿路上皮癌的发生相关。

我们的结果显示:和正常膀胱黏膜组织相比,在尿路上皮癌组织中,Polι 表达显著增高。我们将 Polι 的表达与尿路上皮癌的分级进行了统计分析,也发现在Ⅲ级尿路上皮癌组织中,Polι 的表达较Ⅰ、Ⅱ尿路上皮癌组织显著增高。由于 Polι 其特殊的错误倾向的修复作用,有可能使其更容易引发基因的高突变[5],因此我们认为:Polι 的高表达很有可能与尿路上皮癌的发生及异质性有关。但其在尿路上皮癌诱发基因突变的具体机制仍需进一步深入研究。

参考文献:

[1] Gening L V, Grishina E E, Petrochenkov A N, *et al*. Association between high activity of DNA polymerase iota and the development of human uveal melanoma[J]. Genetika, 2006, 42(1): 98 - 103.

[2] Ito A, Koshikawa N, Mochizuki S, *et al*. Hypoxia-inducible factor-1 mediates the expression of DNA polymerase iota in human tumor cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 351(1):306 - 311.

[3] Johnson R E, Prakash L, Prakash S. Biochemical evidence for the requirement of Hoogsteen base pairing for replication by human DNA polymerase iota[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(30): 10466 - 10471.

[4] Nair D T, Johnson R E, Prakash L, *et al*. Human DNA polymerase iota incorporates dCTP opposite template G *via* a G. C + Hoogsteen base pair[J]. Structure, 2005, 13 (10): 1569 - 1577.

[5] Prakash S, Johnson R E, Prakash L. Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function[J]. Annu Rev Biochem, 2005, 74: 317 - 353.

[6] Yang J, Chen Z, Liu Y, *et al*. Altered DNA polymerase iota expression in breast cancer cells leads to a reduction in DNA replication fidelity and a higher rate of mutagenesis[J]. Cancer Res, 2004, 64(16): 5597 - 5607.

(编辑　栾　嘉)