维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)09-0946-05

抑制 c-raf-1 基因对人宫颈癌细胞放射敏感性影响的实验研究

任庆兰[1],吴永忠[2],陈晓品[1],李少林[3]

(1. 重庆医科大学附属第一医院肿瘤科,重庆 400016; 2. 重庆市肿瘤医院放疗科,重庆 400030;
3. 重庆医科大学基础医学院核医学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨用反义技术抑制癌基因 c-raf-1 对宫颈癌细胞(HeLa)放射敏感性的影响。方法:设立空白对照组、c-raf-1 正义寡核苷酸组和脂质体组(仅加入等量的脂质体)作对照,用 RT-PCR 检测宫颈癌细胞处理前后 c-raf-1 表达水平的变化。用集落形成试验检测各实验组照射后人宫颈癌 HeLa 细胞株集落形成率,AO/EB 荧光染色法检测细胞凋亡率的变化,流式细胞仪测定 Bcl-2 蛋白的表达。结果:c-raf-1 反义寡核苷酸能有效抑制 c-raf-1 癌基因的表达,经脂质体介导的 c-raf-1 反义寡核苷酸作用的宫颈癌细胞经 $^{60}Co\ \gamma$ 射线照射后其集落形成率较正义寡核苷酸组及单纯照射组明显下降,而凋亡率明显增加,Bcl-2 蛋白的表达显著下调,与对照各组比较有显著差异($P<0.01$)。结论:c-raf-1 反义寡核苷酸通过抑制 c-raf-1 基因降低人宫颈癌 HeLa 细胞放射抗性。其辐射增敏作用可能与 c-raf-1 反义寡核苷酸抑制了辐射抵抗信号转导途径,增加照射后肿瘤细胞的凋亡率有关。

【关键词】人宫颈癌细胞株 HeLa;c-raf-1;反义技术;放射敏感性
【中国图书分类法分类号】R737.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-03-16

Effect of inhibiting c-raf-1 on radiosensitivity in human cervical carcinoma cell line HeLa

REN Qinglan, et al

(*Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effect of inhibiting c-raf-1 by antisense technology on radiosensitivity in human cervical carcinoma cell line HeLa. *Methods*: There were four groups in the study: control group, lipofectin group, sense oligodexynucleotides(S-ODN) group, antisense oligodexynucleotides(AS-ODN) group. The expression of c-raf-1 was detected by means of RT-PCR, Cellular response to irradiation was evaluated by the colony forming test, Apoptosis was observed by fluorescent staining. Bcl-2 protein expression was determined by flow cytometry. *Results*: AS-ODN group could significantly decreased the proliferation rate and increasing the apoptosis rate, significantly downregulating the expression of Bcl-2 of irradiated human cervical carcinoma cells, (vs lipofectin group or S-ODN group, $P<0.01$). *Conclusion*: c-raf-1 antisense oligodexynucleotides sensitized the HeLa to ionizing irradiation through decreasing the expression of c-raf-1, which might be related to inhibiting the celluar radiation-resistant signal transduction pathway and increasing the apoptosis rate of HeLa cells.
【Key words】 Human cervical carcinoma cell line HeLa; c-raf-1; Antisense technology; Radiosensitivity

放疗作为肿瘤治疗的主要手段,在许多恶性肿瘤治疗中发挥着无法替代的作用,如妇科肿瘤宫颈癌。C-raf-1 蛋白是肿瘤细胞增殖信号系统和辐射抗性信号转导通路中的重要环节,本文利用反义技术抑制癌基因 c-raf-1,从而干预辐射抗性信号转导途径,观察它对人宫颈癌细胞 HeLa 放射敏感性的影响,现将实验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验分组

设立空白组、脂质体组(加入等量脂质体)、c-raf-1 正义寡核苷酸组作为对照组以及 c-raf-1 反义寡核苷酸组。

1.2 寡核苷酸

c-raf-1 正义寡核苷酸序列为:5'-ATGGAGCACAT-

作者介绍:任庆兰(1972-),女,主治医师,博士,
主要研究方向:肿瘤辐射增敏。

维普资讯 http://www.cqvip.com

ACAGGGA-3'

c-raf-1 反义寡核苷酸序列为：5'-TCCCTGTATGTGCTC-CAT-3'

皆经全硫代修饰，由上海生物工程公司合成。

1.2 细胞培养

人宫颈癌细胞株 HeLa(P53 突变型低分化宫颈癌鳞状细胞系)购自重庆医科大学病理生理研究所。用含 10%小牛血清，青－链霉素各 100U/ml 的 RPMI-1640 培养液，置于 37℃、饱和湿度、5%CO_2 孵箱中无菌培养。

1.3 用脂质体介导转染寡核苷酸

将数目为 2×10^5 的细胞接种于 6 孔培养板上，大约 24h 后，细胞有 40%～60%融合，此时将脂质体和寡核苷酸按 1∶1 质量比分别加入 1μm 的 c-raf-1 正义和反义寡核苷酸中，参照 lipofectin 说明书(Gibco BRL 公司)进行转染。转染时用无血清，无抗生素的 RPMI-1640 培养液。6h 后，去除含脂质体－寡核苷酸的转染液，换用含 20%小牛血清的 RPMI-1640 培养液继续培养 48h。

1.4 RT-PCR 检测转染寡核苷酸前后 HeLa 细胞的 c-raf-1 表达

用 Trizol 提取转染寡核苷酸前后 HeLa 细胞的总 RNA。用分光光度计对溶解于 DEPC 的 RNA 定量，并将 3μgRNA 进行 1.2%琼脂糖凝胶电泳，检测 RNA 的完整性。取 5μgRNA 为模板，逆转录合成 cDNA，用 c-raf-1 的特异引物(Primer1：5'-TCAGAGAAGCTCTGCTAAG-3'；Primer2：5'-CAATGCACTGGACACCTTA-3')及内参照 β-actin(肌动蛋白)引物(Primer1：5'-GCGGGAAATCGTGCGTGACATT-3'；Primer2：5'-GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG-3')，在 Taq 酶作用下进行 PCR 扩增：94℃预变性 5min 后进入循环。循环参数为 94℃×1min，57℃×1min，72℃×2min，35 个循环。然后 72℃×5min。取 PCR 产物 10μl 在 1.5%琼脂糖凝胶电泳观察 c-raf-1 的表达。计算机采集图像存盘，对结果进行分析，测定各条带的灰度值(峰强度，Peak Intensity)，将各组所得图像灰度值数据的均数作为校正参数，各灰度值与组内均数的比值即为数据结果(即为 RT-PCR 量)。各组的 RT-PCR 量与对照组的比值，为该基因的表达量。

1.5 $^{60}Co\gamma$ 射线照射

收集处理后活细胞，将其悬浮于新鲜培养液中，在室温下行 $^{60}Co\gamma$ 射线照射，平均剂量率为 62.89cGy/min，按实验要求给予照射剂量(0Gy、2Gy、4Gy、6Gy)。

1.6 集落形成试验

照射后立刻制成单细胞悬液，调整细胞浓度为 1×10^3/ml，以每孔 300μl 接种于 6 孔板上(设 2 个复孔)，7～14 天后，终止培养，细胞固定、染色。在显微镜下计数含有≥50 个细胞的集落，计算集落形成率。重复实验 3 次，取 3 次实验结果做统计学处理。

集落形成率＝计数集落形成数/300×100%

集落形成率下降率＝(脂质体集落形成率－实验组集落形成率)/脂质体集落形成率×100%

1.7 AO/EB 荧光染色法检测细胞凋亡

将各实验组照射 4Gy 后的细胞用 0.2%胰酶消化，制成单细胞悬液，用 0.4%台盼蓝染色，计数活细胞数，调整细胞浓度为 1×10^5/ml。每组接种 2ml 于预先放有无菌小玻片的六孔板中。培养到 5 天终止实验，从孵箱中取出 6 孔板，用棉垫包裹避光送到荧光显微镜室。新鲜配制 AO/EB 混合液。AO(100μg/ml)与 EB(100μg/ml)按 1∶1 混合即可。用无菌小镊子轻轻地取出盖玻片，置于载玻片上，加 AO/EB 混合液一滴于盖玻片上，荧光显微镜下计数。活细胞(VN)----- 核染色质着绿色，呈现正常结构；早期凋亡细胞(VA)--- 核染色质着绿色，呈固缩/圆球状；晚期凋亡细胞(NVA)--- 核染色质着橘红色，呈固缩/圆球状；非凋亡的死细胞(NVN)--- 核染色质着橘红色，呈正常结构；细胞凋亡率的计算，随机选择 3 个不同的视野，计数各类细胞，重复 3 次，每组设 3 个平行孔。由以下公式计算：凋亡率(%)＝(VA＋NVA)÷(VN+NVN+VA+NVA)×100%

1.8 免疫荧光测定 Bcl-2 蛋白的表达

将各实验组照射 4Gy 后的细胞收集约 10^6 个细胞，清洗 2 次，加入甲醛和丙酮(1∶1)固定 10~15min，用 0.1%Saponin PBS 漂洗 2 次，再加入 1%人 AB 型血清，4℃，10min，加入 Bcl-2 Ⅰ抗(1∶10 稀释)10μl，4℃，30min，0.1% Saponin PBS 漂洗 2 次，加入 IgG-FITC Ⅱ(1∶100 稀释)50μl，4℃，30min，0.1%Saponin PBS 漂洗 2 次，将细胞重新悬入 1%多聚甲醛中，流式细胞仪检测。

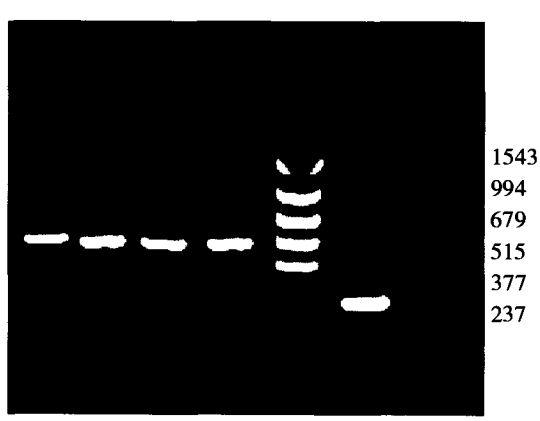
1.9 统计学处理

用 SPSS 10.0 for windows 统计软件处理。检测数据以均数±标准差(Mean±SD)表示，计数资料采用 χ^2 检验，计量资料采用 t 检验，$P<0.05$ 则表示有显著差异性，$P<0.01$ 表示有极显著差异性。

2 结 果

2.1 RT-PCR 检测转染寡核苷酸前后 HeLa 的 c-raf-1 表达见图 1

经计算机图像分析后的结果见表 1。



a:c-raf-1 反义寡核苷酸组 b:c-raf-1 正义寡核苷酸组 c:脂质体组 d:空白对照组 e:marker f:β-actin

图 1 c-raf-1 RT-PCR 琼脂糖凝胶电泳结果

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 实验各组 HeLa 细胞 c-raf-1 RT-PCR 结果

组 别	Peak Intensity	Quantity of RT-PCR	Expressing Rate(%)
空白对照组	160.887	1.342	100
脂质体组	154.291	1.287	95.9
c-raf-1 正义寡核苷酸组	151.603	1.264	94.2
c-raf-1 反义寡核苷酸组	81.955	0.683	50.9

由图 1、表 1 可见，转染 c-raf-1 反义寡苷酸后，HeLa 细胞 c-raf-1 癌基因的表达较空白对照组、脂质体组和转染正义寡苷酸组明显减弱，而后三者之间无明显差异。

表 2 HeLa 细胞经 ^{60}Coγ 射线照射后的集落形成率(% $\bar{x}\pm s$)

组 别	0Gy	2Gy	4Gy	6Gy
空白对照组	80.89 ± 2.89	62.92 ± 2.72	38.48 ± 1.55	28.43 ± 1.34
脂质体组	80.28 ± 2.54	61.47 ± 2.93*	38.52 ± 3.12*	26.51 ± 2.14*
c-raf-1 正义寡核苷酸组	79.91 ± 2.75	60.28 ± 2.76*	38.60 ± 1.61*	26.53 ± 1.48*
c-raf-1 反义寡核苷酸组	70.57 ± 2.91	48.53 ± 2.90**	24.90 ± 1.20**	12.95 ± 1.68**

* 和空白对照组比较，$P>0.05$； ** 和空白对照组、脂质体组及 c-raf-1 正义寡核苷酸组比较，$P<0.01$

表 3 转染反义寡核苷酸组和照射组及转染反义寡核苷酸后照射的集落形成下降率的比较

组 别	集落形成下降率(% $\bar{x}\pm s$)			
	0Gy	2Gy	4Gy	6Gy
单独转染反义寡核苷酸组	12.10 ± 1.94	——	——	——
单独照射组	——	23.43 ± 2.12	52.02 ± 3.02	66.98 ± 2.97
转染反义寡核苷酸后照射组	——	39.55 ± 2.89	68.98 ± 2.32	83.87 ± 2.69

由表 2 可见脂质体组和 c-raf-1 正义寡核苷酸组的形成率都较空白对照组有所下降，但无统计学显著性差异($P>0.05$)；转染 c-raf-1 反义寡核苷酸组照射后其集落形成率明显下降，与对照组比较有统计学显著性差异($P<0.01$)，而且由表 3 可见其集落形成下降率大于单独转染反义寡核苷酸组与单独照射组集落形成下降率之和，因此转染 c-raf-1 反义寡核苷酸对人宫颈癌 HeLa 细胞具有辐射增敏作用。

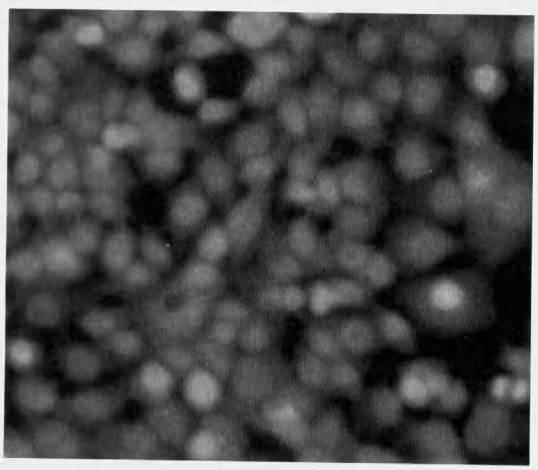


图 2 空白对照组(FM × 40)

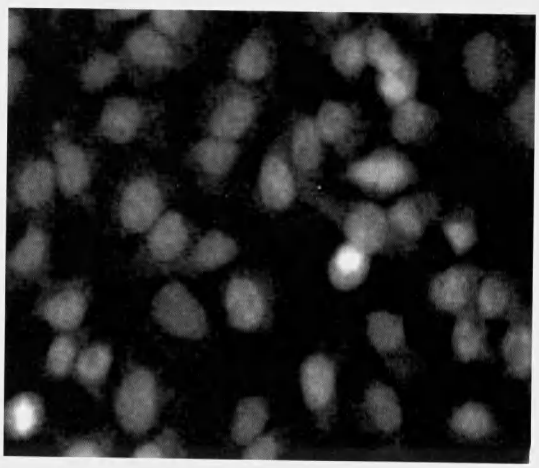


图 3 脂质体组(FM × 40)

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 4 c-raf-1 正义寡核苷酸组(FM × 40)

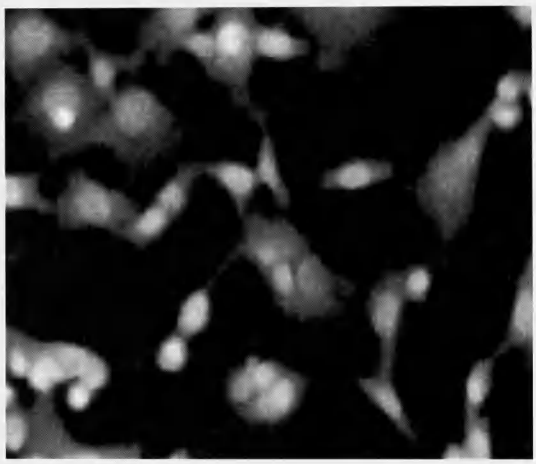


图 5 c-raf-1 反义寡核苷酸组(FM × 40)

2.2 集落形成试验结果及集落形成下降率的比较见表 2、表 3。

2.3 AO/EB 荧光染色法检测细胞凋亡结果(见图 2~图 5 及表 4)

c-raf-1 寡核苷酸对受照后人宫颈癌 HeLa 细胞细胞凋亡率的影响见表 4。

表 4 HeLa 细胞经 60Coγ 射线照射后的凋亡率(% $\bar{x}\pm s$)

组 别	凋亡率 (%)
空白对照组	10.67 ± 2.45
脂质体组	11.36 ± 2.37*
c-raf-1 正义寡核苷酸组	12.82 ± 3.02*
c-raf-1 反义寡核苷酸组	35.13 ± 2.67**

* 和空白对照组比较,$P>0.05$; ** 和空白对照组、脂质体组及 c-raf-1 正义寡核苷酸组比较,$P<0.01$

由上表可见脂质体组和 c-raf-1 正义寡核苷酸组的凋亡率都较空白对照组有所下降,但无统计学显著性差异($P>0.05$);转染 c-raf-1 反义寡核苷酸组照射后凋亡率明显下降,与对照组、脂质体组及 c-raf-1 正义寡核苷酸组比较有统计学显著性差异($P<0.01$)。

2.4 免疫荧光测定 Bcl-2 蛋白的表达见表 5。

表 5 实验各组 Bcl-2 蛋白阳性率(% $\bar{x}\pm s$)

组 别	Bcl-2 基因表达阳性率(%)
空白对照组	80.12 ± 2.12
脂质体组	78.98 ± 2.79*
c-raf-1 正义寡核苷酸组	75.23 ± 3.01*
c-raf-1 反义寡核苷酸组	30.56 ± 2.24**

* 和空白对照组比较,$P>0.05$; ** 和空白对照组、脂质体组及 c-raf-1 正义寡核苷酸组比较,$P<0.01$

由上表可见各实验组 Bcl-2 表达都较空白对照组有所下降,c-raf-1 反义寡核苷酸组 Bcl-2 表达明显下调,与其它各组比较皆有统计学显著性差异($P<0.01$)。

3 讨 论

放射治疗在宫颈癌治疗中占有重要地位,临床各期都可选择放射治疗,但由于放疗损伤引起的并发症如放射性膀胱炎、放射性直肠炎、阴道缩窄等严重影响患者的生活质量。因此宫颈癌的辐射增敏一直是放射肿瘤学者关注和研究的课题。

癌基因 c-raf-1 编码由 648 个氨基酸残基组成的具有内源性丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性的蛋白质,在一些肿瘤中常常存在着高表达,在细胞增殖分化的信号转导系统中起着枢纽作用。许多文献证实 C-raf-1 蛋白激酶活化后参与细胞增殖、转化、凋亡、发育和分化,以及细胞对不良因素的应激反应,是细胞内重要的、进化上十分保守的信号分子[1]。抑制 C-raf-1 基因的表达可有效抑制肿瘤细胞的增殖[2]。新近 Al-Mulla F 等学者研究发现 C-raf-1 蛋白与结直肠癌患者的预后相关, C-raf-1 抑制蛋白表达越高,患者肿瘤复发率越低,5 年生存率及无病生存率越高[3]。辐射作为一种特殊的外界损伤刺激因子,使细胞内产生自由基或直接损伤 DNA 等靶分子, 并以此作为信号分子,通过转录或转录后机理,诱导一系列基因表达和生化级联反应(cascade),最终引起细胞结构和功能的变化,导致细胞生长、增殖、分化改变。辐射抗性的产生也有其特有的信号转导途

维普资讯 http://www.cqvip.com

径,并且其中一个重要的途径与肿瘤细胞增殖相同即 Ras/Raf/MAPK/途径[4]。有学者发现肿瘤细胞受照后,能使 c-raf-1 基因活化[5,6],从而激活 Ras/Raf/MAPK/途径导致放射疗效的改变。这为对有辐射抗性的肿瘤细胞进行有针对性的基因治疗提供了线索,对提高肿瘤细胞辐射敏感性,降低辐射剂量,从而减少放疗并发症开拓了思路。Jones HA 等学者用 raf 基因的上游基因 ras 的抑制物逆转肿瘤辐射抗性取得很好的效果[7]。已有研究明确了 c-raf-1 基因在肝细胞性肝癌辐射抗性产生过程中的作用[8]。目前有关抑制辐射信号和增殖信号转导途径中的枢纽元件 c-raf-1 用于放射增敏的研究较少。

本研究利用反义技术抑制 c-raf-1 基因,可使其在宫颈癌细胞中的基因表达率下降约 50%。抑制 c-raf-1 基因后,受照宫颈癌细胞集落形成率较正义寡核苷酸组及单纯照射组明显下降,其下降率大于单独转染反义寡核苷酸组与单独照射组集落形成下降率之和,提示转染 c-raf-1 反义寡苷酸对人宫颈癌 HeLa 细胞具有辐射增敏作用,这可能与 c-raf-1 反义寡核苷酸抑制了辐射抵抗信号转导途径及照射后癌细胞的凋亡增加有关,因为我们还观察到反义寡核苷酸组照射后细胞凋亡率明显增加,由 c-raf-1 正义寡核苷酸组和脂质体组的 12.82%、11.36%增加至 35.13%。癌基因 bcl-2 有抗凋亡的功能,我们使用免疫荧光试验测定 Bcl-2 蛋白在各实验组中的表达发现反义寡核苷酸组 Bcl-2 蛋白表达率明显低于其它各组,推测抑制 c-raf-1 基因后照射细胞凋亡率增加与 bcl-2 基因下调有关。至于抑制 c-raf-1 基因后可有效降低人宫颈癌细胞的辐射抗性的作用机制仍有待进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Zebisch A,Czernilofsky AP,Keri G,et al. Signaling Through RAS-RAF-MEK-ERK:from Basics to Bedside[J]. Curr Med Chem, 2007;14(5):601-623.

[2] 吴永忠,任庆兰,李少林. c-raf-1 反义寡核苷酸转染对人卵巢癌 SKOV3 细胞增殖的抑制作用[J]. 重庆医科大学学报,2006;31(1):19-22.

[3] Al-Mulla F,Hagan S,Behbehani AI,et al. Raf kinase inhibitor protein expression in a survival analysis of colorectal cancer patients [J]. J Clin Oncol,2006;24(36):5672-5679.

[4] Gupta AK,Bakanauskas VJ,Cerniglia GJ,et al. The ras radiation resistance pathway[J]. Cancer Res, 2001;61(10):4278-4282.

[5] Kasid U. Raf-1 protein kinase,signal transduction, and targeted intervention of radiation response[J]. Exp Biol Med (Maywood),2001; 226(7):624-625.

[6] Kasid U,Suy S,Dent P,et al. Activation of raf by ionizing radiation[J]. Nature,1996;29(382):813-816.

[7] Johnes HA,Hahm SM, Bernhard E, et al. Ras inhibitors and radiation therapy[J]. Semin Radiat Oncol,2001;11(4):328-337.

[8] Tang WY,Chau SP,Tsang WP,et al. The role of Raf-1 in radiation resistance of human hepatocellular carcinoma Hep G2 cells [J]. Oncol Rep,2004;12(6):1349-1354.

(上接第 906 页)

and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9[J]. Am J Physiol,1999;277:F685-696.

[13] Rotta LN,Valle SC,Schweigert L,et al. Utilization of energy nutrients by cerebellar slices[J]. Neurochem Res,2002;27:201-206.

[14] Nguyen NH,Brathe A,Hassel B. Neuronal uptake and metabolism of glycerol and the neuronal expression of mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase[J]. J Neurochem,2003;85: 831-842.

[15] 郭国际,主编. 脑脊髓血管病基础与临床[M]. 北京:科学出版社,2003.212.