

mtDNA4977 bp缺失预测肿瘤细胞辐射敏感性的体外研究

荣庆林¹,赵欣然²,王 芹²,李 进²,刘 强²,曹永珍¹,张耀文¹

中图分类号: Q691 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2008)04-0389-02

【摘要】 目的 探讨 mtDNA4977 bp缺失检测分析法用于预测肿瘤细胞辐射敏感性的可能性。方法 采用巢式PCR法检测人肝癌细胞(HePG₂)和人前列腺癌细胞(PC-3)经不同剂量X射线照射后的mtDNA4977 bp缺失率。结果 经照射后检测到辐射可诱发mtDNA4977 bp缺失, HePG₂细胞和PC-3细胞的mtDNA4977 bp缺失率具有剂量依赖性, HePG₂细胞在各剂量点的缺失率显著高于PC-3细胞(P<0.05),提示HePG₂细胞的辐射敏感性高于PC-3细胞。结论 简便快捷的检测mtDNA4977 bp缺失有可能成为预测肿瘤细胞辐射敏感性的方法。

【关键词】 人肿瘤细胞系; mtDNA4977 bp巢式PCR; 辐射敏感性
Prediction of Rad^osensitivity of Human Tumor Cell Lines in Vitro by Determining 4977 bp Deletion in Mitochondrial DNA RONG Qing-lin ZHAO Xin-ran WANG Qin et al Department of Radiation Oncology General Hospital of Tianjin Medical University Tianjin 300052 China

【Abstract】 Objective To evaluate the possibility of predicting the radiosensitivity of tumor cell lines using the assay of the mtDNA4977 bp deletion. Methods The mtDNA4977 bp deletion of HePG₂ cells and PC-3 cells were detected by nested PCR after irradiated by various doses of x-ray. Results The radiation-induced mtDNA4977 bp deletion of the tumor cell lines of HePG₂ and PC-3 were detected after irradiated. There was a dose dependent in the mtDNA4977 bp deletion of two tumor cell lines. The deletion rate of HePG₂ was higher significantly than that of PC-3 at each point of radiation dose (P<0.05), which implies that the radiosensitivity of HePG₂ was higher than that of PC-3. Conclusion The assay of the mtDNA4977 bp deletion may be an approach to predict the radiosensitivity of tumor cells.

【Key words】 Human Tumor Cell Line; mtDNA4977 bp; Nested PCR; Radiosensitivity

线粒体基因是独立于核外的唯一遗传物质,由于其结构和功能的特点,较核DNA发生基因突变的频率明显增高,其中具有代表性的是线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)4977 bp的缺失。大量研究表明,此缺失在一定程度上可以作为年龄、光老化和生物能量学疾病等方面的生物标记,但是有关其辐射生物学的研究并不多。本实验应用巢式PCR技术检测经X射线照射后肿瘤细胞mtDNA4977 bp缺失,根据剂量效应关系判断肿瘤细胞的辐射敏感性,初步探讨电离辐射致mtDNA4977 bp缺失检测用于预测肿瘤细胞辐射敏感性的可行性。

1 材料与方法

1.1 细胞系与细胞培养 人肝癌细胞系HePG₂(中国医学科学院放射医学研究所提供),人前列腺癌细胞系PC-3(天津市泌尿外科研究所惠赠)。细胞培养用RPMI 1640培养基(GIBCO公司),含10%小牛血清(杭州四季青公司),100U/ml青霉素、100μg/ml链霉素,置于37℃、5%CO₂饱和湿度的培养箱中培养,隔天用0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.2 主要仪器 直线加速器(Varian 600C美国)、酶标仪(ThermoMK3美国)、低温超速离心机(Hitachi SCR20BA日本)、紫外分光光度计(Beckman DU800美国)、PCR仪(Thermo美国)、凝胶图像处理系统(Bio-Rad DOC1000美国)。

1.3 细胞照射 取对数生长期的细胞,将培养瓶翻转平放,上面放置1.5 cm厚的有机玻璃板,射野10 cm×10 cm,源皮距100 cm,用6 MV-X射线在室温环境中照射细胞,剂量分别为2 Gy、4 Gy、8 Gy、12 Gy和16 Gy,剂量率为320 cGy/min。未照射对

照组置于相同环境中。

1.4 细胞mtDNA提取 细胞照射后在37℃培养箱中放置2 h,然后消化离心获得大于5×10⁶个细胞的沉淀。参照文献[1]“改进高盐沉淀法”的具体步骤提取mtDNA, -20℃保存提取样品。用BECKMAN DU800紫外分光光度计测定其含量。

1.5 PCR扩增

1.5.1 引物的设计与合成 普通PCR扩增内参片段:内参引物对扩增mtDNA中某一稳定的片段,代表反应体系中总mtDNA含量,作为内参计算发生mtDNA4977 bp缺失基因的比例。巢式PCR扩增mtDNA4977 bp缺失片段,引物对位于缺失片段两端附近, P1引物对在模板最外侧, P3引物对在模板最内侧。分别用P1、P2、P3引物对进行巢式第1、2、3轮PCR扩增。在限制PCR反应条件下,较短的延伸时间DNA聚合酶不能够扩增出约5 kb的片段,因此在巢式PCR反应中,未发生mtDNA4977 bp缺失的线粒体基因模板不能扩增出片段,而理论上无论是否存在mtDNA4977 bp缺失,线粒体基因模板均能用普通PCR扩增出内参片段。所有引物由上海捷瑞生物工程公司合成。

表1 PCR扩增mtDNA的引物

引物位置	引物序列	PCR产物片段 (bp)
上游 内参 (3304-3323)	5'-aacacccacagccacac-3'	533
下游 内参 (3836-3817)	5'-ggcagagcctcctcctcctc-3'	
上游 P1 (7901-7920)	5'-ggcagcctcctcctcctcctc-3'	1342
下游 P1 (14220-14201)	5'-tctcctcctcctcctcctcctc-3'	
上游 P2 (8201-8220)	5'-tctcctcctcctcctcctcctc-3'	673
下游 P2 (13851-13832)	5'-ggcagcctcctcctcctcctc-3'	
上游 P3 (8282-8305)	5'-cccctcctcctcctcctcctc-3'	391
下游 P3 (13650-13631)	5'-ggcagcctcctcctcctcctc-3'	

1.5.2 PCR反应体系 巢式PCR第一轮扩增加入提取的模板200 ng,第二轮和第三轮扩增分别加入前一轮扩增产物1 μl作为模板;普通PCR加入提取的模板25 ng,反应体系包含10×PCR buffer(无Mg²⁺) 5 μl, 20 mM MgCl₂ 2 μl, dNTP mix 1 μl, Taq

基金项目:天津市自然科学基金资助项目(07JCYBJC09200);中国医科院放射医学研究所基金(0651)
作者单位:1 天津医科大学总医院放疗科,天津 300052
2 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
作者简介:荣庆林(1981-),男,汉族,河北省人,硕士在读,研究方向:立体定向放射治疗。
通讯作者:曹永珍 (C4956@hotmail.com)

DNA聚合酶 0.5 U (2.5 U), 两端引物各 1 μl,最后加 H₂O补足总体积至 50 μl

1.5.3 PCR反应条件 普通 PCR反应条件:第 1个循环 94℃变性 5 min 55℃退火 5 min 72℃延伸 3 min;第 2~25个循环为 94℃变性 40 s 55℃退火 40 s 72℃延伸 50 s;最后 72℃延伸 10 min。巢式 PCR第 1轮反应条件:先 94℃预变性 3 min,然后 94℃变性 1 min 45℃退火 1 min 72℃延伸 1 min,共 35个循环;最后 72℃延伸 10 min。第 2、3轮反应条件均为先 94℃预变性 3 min,然后 94℃变性 40 s 45℃退火 40 s 72℃延伸 40 s,共 35个循环;最后 72℃延伸 10 min。

1.5.4 DNA缺失定量分析 扩增产物在 1%琼脂糖凝胶(含 0.5 g/mg的 EB)中电泳,用 DQ1000凝胶成像系统采集图像,用 Molecular AnalystSM软件分析电泳条带的灰度值,用 mDNA4977 bp缺失片段的灰度值与 mDNA内参片段的灰度值之比代表总体线粒体模板中存在 mDNA4977 bp缺失的模板所占的比例。

1.6 统计学处理 实验数据以均值标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS12.0软件进行统计分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 缺失片段 肿瘤细胞经 X射线照射后分别用普通 PCR扩增 mDNA内参和用巢式 PCR扩增发生 mDNA4977 bp缺失

的片段,以 8 Gy照射为例,普通 PCR扩增内参片段处于 500~750 bp之间,与理论长度 533 bp片段位置一致(见图 1A);巢式 PCR第 1、2轮扩增产物从图像中未显现,第 3轮扩增产物在 250~500 bp之间,与理论长度 391 bp位置吻合(见图 1B)。

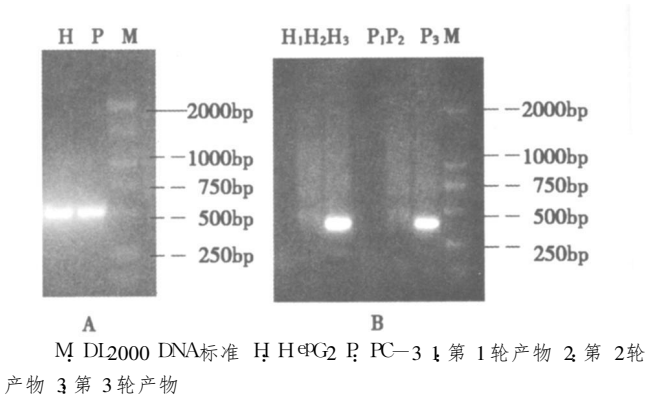


图 1 PCR扩增肿瘤细胞 mDNA内参片段和 mDNA4977 bp缺失片段的琼脂糖凝胶电泳图

2.2 经 X射线照射后肿瘤细胞的 mDNA4977 bp缺失率 经 X射线照射后两种肿瘤细胞 mDNA4977 bp缺失率升高,说明 X射线能诱导 mDNA4977 bp缺失的发生,并且随照射剂量的增加,HePG₂和 PC-3细胞 mDNA4977 bp缺失率均有不同程度的升高,与其对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 照射后肿瘤细胞 mDNA4977 bp缺失率

细胞	0 Gy	2 Gy	4 Gy	8 Gy	12 Gy	16 Gy
HePG ₂	0.6217 ± 0.0240	0.7750 ± 0.0647 ¹⁾	0.9567 ± 0.0753 ¹⁾	1.2483 ± 0.1179 ¹⁾	1.4517 ± 0.0618 ¹⁾	1.5700 ± 0.0780 ¹⁾
PC-3	0.7383 ± 0.0523	0.7450 ± 0.0437	0.8083 ± 0.0397 ¹⁾	0.7933 ± 0.0665 ¹⁾	0.9500 ± 0.0548 ¹⁾	1.2467 ± 0.0509 ¹⁾

注:1)与其对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 HePG₂和 PC-3肿瘤细胞辐射敏感性的比较 两种肿瘤细胞在未照射组均检测出 mDNA4977 bp缺失,即基础缺失率。本实验 HePG₂和 PC-3的平均基础缺失率为 0.6217和 0.7383。比较两种细胞辐射敏感性之前,应排除基础缺失率的干扰,即扣除各自基础缺失率后得出由辐射诱导的 mDNA4977 bp缺失率。如图 2所示,HePG₂细胞 mDNA4977 bp缺失率随照射剂量的增加呈升高趋势。PC-3细胞在较低剂量范围(0~8 Gy)mDNA4977 bp缺失率随剂量变化不显著,8 Gy照射后缺失率比 4 Gy略有下降;较高剂量范围(8~16 Gy)照射后的缺失率显著升高,表明 PC-3细胞的 mDNA4977 bp缺失累积主要发生在相对高剂量范围。HePG₂细胞在各剂量点的缺失率均显著高于 PC-3细胞($P < 0.05$)。提示 HePG₂细胞的辐射敏感性高于 PC-3细胞。

3 讨论

有文献报道肿瘤组织存在 mDNA4977 bp缺失,肿瘤细胞增殖过程中,遗传方面、不确定的环境因素和氧化应激等都可能引起 mDNA4977 bp缺失的增加。本实验中两种肿瘤细胞未照射组也检测到此缺失的存在。Kamalidehshan等^[2]检测到胃癌组织的 mDNA4977 bp缺失低于癌旁组织和正常组织,可能是含有 mDNA4977 bp缺失的肿瘤细胞由于线粒体功能缺陷,不能像其他肿瘤细胞一样无限增值。Yang等^[3]则发现皮肤肿瘤的 mDNA4977 bp缺失与光暴露皮肤无差别,认为可能是光照射引起的缺失增多。目前对于肿瘤组织的基础缺失率尚缺乏明确的认识,而且不同种类的细胞基础缺失率不尽相同,校正基础缺失率是准确判断细胞缺失对射线敏感性的前提。我们在比较肿瘤细胞辐射敏感性之前,分别扣除各自基础缺失率,避免基础缺失率的差异影响统计结果的准确性。

有关辐射诱导细胞 mDNA4977 bp缺失的研究发现,缺失可以累积并且与辐射剂量有关。Prasanna等^[4]分析间期淋巴细胞 mDNA4977 bp的缺失可准确估算 0.25 Gy~2 Gy之间急性照射的剂量,提示辐射剂量与缺失之间有明确的剂量效应关系。本实验结果也得出两种细胞的缺失率具有剂量依赖性,尤其是 HePG₂细胞在 0 Gy~16 Gy和 PC-3细胞在 8 Gy~16 Gy剂量范围。本实验用 mDNA4977 bp缺失率代表基因辐射损伤程度来判断细胞放射敏感性,得出 HePG₂细胞的放射敏感性高于 PC-3细胞,这与石卫民等^[5]和廖安燕等^[6]通过克隆形成法分别测定体外 HePG₂和 PC-3细胞的辐射敏感性结果一致。同时与临床肿瘤放射治疗的一般印象相吻合。

本实验 PC-3细胞经 8 Gy照射后的缺失率略低于 4 Gy,我们认为除了实验误差外,还可能是 PC-3细胞经 8 Gy辐射 mDNA4977 bp缺失及其累积不稳定,需要更精细的剂量划分和大量实验验证。Prithivirajasingh等^[7]应用 PCR检测分别经 2.5、10和 20 Gy照射后的五种人肿瘤细胞系的 mDNA4977 bp缺失情况,未发现辐射诱导 mDNA 4977 bp缺失与剂量之间的联系。可见并非所有肿瘤细胞或者任何剂量范围都存在明显剂量依赖关系,因此选择合适的肿瘤细胞和存在明显剂量效应关系的辐射剂量范围,是能否准确预测放射敏感性的关键因素。本实验仅处于初步探讨阶段,有待深入研究,建立一套成熟的检测技术和准确的评价体系,供肿瘤临床个案化和预测疗效之用。

参考文献:

[1] 李伟文,陆松敏.线粒体 DNA提取方法的比较[J].国外医学:分子生物学分册,2003,25(3):191-193.
[2] Kamalidehshan B, Houshmand M, Ismail P, et al. Deletion of mDNA 4977 is more common in non-tumoral cells from gastric

低剂量多层螺旋 CT对儿童气道异物检查的防护价值

汤群锋, 陈宏伟, 吴力源, 李国良, 陈玉林, 钱萍艳, 鲍 健

中图分类号: R814.42 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2008)04-0391-02

【摘要】目的 探讨低剂量多层螺旋 CT(MSCT)对儿童气管、支气管异物检查的防护价值,并与标准剂量作对比。方法 对临床怀疑气管、支气管异物的儿童患者 80例进行低剂量 MSCT前瞻性研究,并按照不同剂量随机分成四组(50mA Pitch=3 50mA Pitch=6 30mA Pitch=3 20mA Pitch=3),每组 20例。并随机抽取常规剂量组(150mA Pitch=3)20例气管、支气管异物儿童患者进行对照。结果 低剂量各组的权重 CT剂量指数(CIDW)和剂量长度乘积(DLP)均与常规剂量组有明显的差别($P<0.01$)。低剂量组(50mA Pitch=3)扫描图像质量以优为主,与常规剂量组没有差别($P>0.05$)。其余各组图像质量以良为主,未出现差级图像,不影响诊断。低剂量各组与常规剂量组对图像后处理质量没有差别($P>0.05$)。结论 低剂量 MSCT既能对气道异物得以正确的诊断和显示,又能大大降低儿童的辐射剂量,在对儿童进行气道异物的 MSCT检查中可常规采用 20mA至 50mA低剂量扫描。

【关键词】气管;支气管;异物;儿童;低剂量;辐射剂量;体层摄影术
Radioprotective Value of Low Dose Multi-slice CT in Pediatric Patients with Foreign Body in Trachea and Bronchi
TANG Qun-feng, CHENG Hong-wei, WU Li-yuan, et al. Department of Radiology, Wuxi People's Hospital, Wuxi 214000 China

【Abstract】Objective To investigate the radioprotective value of low dose multi-slice spiral CT(MSCT) in Pediatric Patients with foreign body in trachea and bronchi compared with conventional dose. Methods 80 children suspected airway lesions were prospectively studied with low dose MSCT and randomly divided into four groups(50mA Pitch=3 50mA Pitch=6 30mA Pitch=3 20mA Pitch=3) averagely. Results The weighted CT dose index (CIDW) and dose length product (DLP) in low dose group was lower than in conventional dose group with the significant difference($P<0.01$). The imaging quality in low dose group was mostly better with no the significant difference($P>0.05$), but inferior to conventional dose group while there is no poor images to influence the diagnosis of foreign body in trachea and bronchi. There was no significant difference($P>0.05$) between post processing images with different doses. Conclusion The low dose scanning will be accurate in diagnosis of foreign body in trachea and bronchi and beneficial to protect the children with lower radiation dose. The 20mA to 50 mA tube currents may be used as conventional dose for evaluating foreign bodies in the airways in the children.

【Key words】Trachea; Bronchi; Foreign Body; Children; Low Dose; Radiation Dose; Tomography

近年来,随着公众放射卫生和自身防护意识的提高,低剂量扫描技术逐渐收到关注。儿童正处于生长发育期,在接受同样辐射剂量产生癌症的风险敏感性是成人的十多倍^[1],因此将多层螺旋 CT(MSCT)低剂量技术应用于儿童患者,从而降低儿童辐射剂量,变得尤其重要。本研究将 MSCT的低剂量技术应用于儿童气管、支气管异物的 MSCT检查中,探讨其防护价值。

1 材料与方法

1.1 一般资料 自 2005 年 1 月~2007 年 2 月对临床怀疑气管、支气管异物的儿童患者 80 例进行低剂量 MSCT 研究,并按照不同剂量随机分成四组(50 mA Pitch=3 50 mA Pitch=6 30 mA Pitch=3 20 mA Pitch=3),每组 20 例。男 56 例,女 24 例,平均年龄 4 岁(2~15 岁)。并随机抽取 2005 年 1 月前常规剂量组(150 mA Pitch=3)20 例气管、支气管异物儿童患者进行对照。

基金项目:南京医科大学科技发展基金资助(项目编号:06NMUM076)
作者单位:无锡市人民医院医学影像科,江苏 无锡 214000
作者简介:汤群锋(1974~),男,江苏无锡人,硕士,主治医师。E-mail: qf48@163.com

1.2 MSCT扫描技术 扫描仪为美国 GE 公司 Light Speed Plus 多层螺旋 CT。扫描条件为电压 120 kV,层厚/层间隔=2.5/1.25mm。随机分成四组不同剂量(50 mA Pitch=3 50 mA Pitch=6 30 mA Pitch=3 20 mA Pitch=3)进行 MSCT 扫描。扫描范围从肺底至胸廓入口。

1.3 辐射剂量观察 从扫描程序设定栏内分别记录不同扫描剂量组下的辐射剂量参数,包括权重 CT 剂量指数(CIDW)、剂量长度乘积(DLP)。

1.4 图像评价 用胶布封住扫描条件,由 CT 室 2 位资深医师采用双盲法阅片评估,全部图像采用肺窗(窗宽 1 000HU,窗位 -700HU)及纵隔窗(窗宽 250HU,窗位 50HU)观察,评判标准分为优(图像清晰,无伪影)、良(有一定伪影,但不影响诊断)、差(伪影较多,影响诊断)三级。

1.5 图像后处理 扫描后图像送至 AW4.0 工作站进行重建,主要为多平面重建(MPR)和仿真支气管镜(VB)。同时比较不同剂量对后处理图像的影响,评判标准同前。

1.6 统计学分析 多组间差异的显著性分析用单因素方差分析(one-wayANOVA),图像质量评判采用校正的卡方(χ^2)检

cancer sample J. Arch Med Res 2006 37(6): 730-735

[3] Yang H, Lee HC, Chung JG, et al Mitochondrial DNA mutations in light-associated skin tumors. Anticancer Res J. 2004 24(3a): 1753-1758

[4] 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

[5] 石卫民, 范义湘, 陈龙华, 等. 两株人肝癌细胞放射敏感性

的体外研究[J]. 中国现代医学杂志, 2001 11(9): 6-7

[6] 廖安燕, 王俊杰, 赵勇, 等. ²⁵I 粒子持续低剂量率照射对人前列腺癌细胞的抑制作用[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2007 27(3): 226-228

[7] Prihvirajsingh S, Story MD, Bergh SA, et al Accumulation of the common mitochondrial DNA deletion induced by ionizing radiation [J]. FEBS Lett 2004 571(1-3): 227-232

(收稿日期: 2008-05-12)