

# POL I 基因对人食管癌细胞放疗敏感性的影响

刘 瑾,吴锦昌\*,周俊东

(南京医科大学附属苏州医院放疗科,江苏 苏州 215001)

**[摘要]** 目的:探讨 DNA 聚合酶 I (DNA polymerase I ,POL I )基因对人食管癌细胞 ECA-109 放射敏感性及对化疗药物顺铂敏感性的影响。**方法:**利用已经构建成功的针对 POL I 基因的短发夹 RNA(short hairpin RNA,shRNA)重组质粒,转染 ECA-109 细胞,通过倒置荧光显微镜观察转染效率,实时荧光定量 PCR 检测转染后 ECA-109 细胞中 POL I 的 mRNA 表达水平,用细胞克隆形成实验来研究 shRNA 抑制 POL I 表达后 ECA-109 细胞对 X 线放疗敏感性的变化,用 MTT 法检测 POL I 基因敲除后 ECA-109 细胞对顺铂敏感性的变化。**结果:**沉默 POL I 基因的 shRNA 转染 ECA-109 细胞后,荧光倒置显微镜下可见大量绿色荧光颗粒;实时荧光定量 PCR 检测发现,转染后细胞中 POL I 的 mRNA 表达水平显著降低( $P < 0.05$ );转染后的细胞对放疗敏感性提高,对顺铂的敏感性提高( $P < 0.05$ )。**结论:**shRNA 有效下调细胞中 POL I 的表达,提高了肿瘤细胞对化疗药物顺铂和放疗的敏感性。

**[关键词]** POL I ;shRNA;ECA109;放疗敏感;顺铂

**[中图分类号]** R735.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)01-006-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20130102

## Effects of POL I on radiosensitivity of human esophageal cancer cell line and its sensitivity to cisplatin

Liu Jin, Wu Jinchang\*, Zhou Jundong

(Department of Radiotherapy, the Suzhou Hospital Affiliated to NJMU, Suzhou 215001, China)

**[Abstract]** **Objective:**To investigate the effect of POL I (DNA polymerase I )on the radiosensitivity of human esophageal cancer cells(ECA-109)and their sensitivity to cisplatin. **Methods:**The plasmid expressing shRNA against POL I was constructed and transfected into ECA-109 cells. The transfection efficiency was evaluated by fluorescence microscopy. POL I expression was detected by Real-time Fluorogenic Quantitative PCR. The cell sensitivity to X-ray was detected by colony formation assay. MTT was used to determine the sensitivity of ECA-109 cells to cisplatin. **Results:**After successful transfection of constructed shRNA-POL I gene into ECA-109 cells,a large number of fluorescent particles were observed in fluorescence inverted microscope. The expression of POL I in mRNA was significantly reduced( $P < 0.05$ ). The ability of radiosensitivity was enhanced. On the other hand,sensitivity to cisplatin was enhanced( $P < 0.05$ ). **Conclusion:**ShRNA-POL I in human esophageal cancer cells could enhance their radiosensitivity and sensitivity to cisplatin.

**[Key words]** POL I ;shRNA;ECA-109;radiosensitivity; cisplatin

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(1): 006-010]

DNA 聚合酶 I (DNA polymerase I ,POL I )是 DNA 聚合酶 Y 家族的成员之一,是一种参与 DNA 损伤修复的基因,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 Watson-Crick 碱基互补配对方式进行 DNA 复制<sup>[1-2]</sup>,另一方

面由于缺少 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 复制有很高的错配倾向<sup>[3]</sup>。根据体外研究证实,到目前为止已知的所有真核多聚酶中,POL I 可能具有最低的保真性。很高的错配率导致很高的突变率,最后基因的突变导致癌症的发生,因此各个国家对 POL I 的各个不同特性进行了研究,取得了一系列成果。本实验室前期研究发现,POL I 在食管癌

**[基金项目]** 苏州市科技局社会发展基金(SYS201254)

\*通信作者(Corresponding author),E-mail:wjinchang@sina.com

组织中呈现高表达,本课题将探讨 POL I 基因敲除后,食管癌细胞对放疗和化疗敏感性的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

人食管癌细胞 ECA-109 (中国科学院上海细胞生物研究所细胞库),胎牛血清(杭州四季青有限公司),DMEM 高糖培养基(德国 Thermo 公司),胰酶、POL I 引物、GAPDH 引物(上海生工技术有限公司),RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、PCR 试剂和 *Taq* DNA 聚合酶(加拿大 Fermentas 公司)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 的设计与合成

根据 shRNA 设计原则和 GenBank 中 POL I 基因的编码序列,采用美国 Dharmacon 公司(www.dharmacon.com)的网上设计软件,由上海吉玛制药有限公司合成 shRNA-POL I 和 shRNA-NC 表达载体,名称为 PGPU6/GFP/Neo-POL I -homo-533 和 PGPU6/GFP/Neo-NC,具体序列分别为:5'-GGATCTAACAGAAATGGTTGA-3' 和 5'-GTTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。

#### 1.2.2 细胞培养及质粒转染

以含 10%胎牛血清、 $1 \times 10^5$  U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基对 ECA-109 细胞进行传代培养。将处于对数生长期的细胞用胰酶消化 3 min 后,以 1 500 r/min 离心 5 min。收集细胞, $5 \times 10^4$  个/孔接种于 6 孔板上,10%胎牛血清 DMEM 培养基培养。当细胞融合度接近 70%时用于转染。脂质体转染按 Lipofectamine2000 使用说明书进行,质粒转染的终浓度均为 200 nmol/L。加入新鲜培养基 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,转染后 48 h 荧光倒置显微镜下观察转染效率。

#### 1.2.3 RNA 提取和实时荧光定量 PCR

按照 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞中总 RNA,按照反转录试剂盒说明书反转为 cDNA,Primer4.0 软件优化设计 POL I 引物,上游为 5'-A-CAAACCGGATTTCCTACC-3',下游为 5'-TCA-CACTTCCTTCCCTTGAA-3'。以 cDNA 为模板,分别扩增目的基因 POL I 及内参对照 GAPDH。扩增条件为:94℃预变性 10 s,94℃ 5 s,60℃退火和延伸各 20 s,40 个循环。记录各管扩增 CT 值及基因拷贝数。

#### 1.2.4 克隆形成实验

VARIAN 直线加速器 6 MV-X 射线照射,剂量率

2 Gy/min,源皮距 100 cm,照射野 10 cm × 10 cm,培养板下置 1 cm 等效组织填充物。取对数生长期的 ECA-109 细胞,0.25%的胰酶消化后制成单细胞悬液,分别接种于 6 孔板中,分对照组、shRNA-NC 转染组、shRNA-POL I 转染组,每组设 3 个平行样本,设 0、1、2、4、6 Gy 5 个剂量点。接种细胞数为 400 个/孔(0 Gy)、600 个/孔(1 Gy)、800 个/孔(2 Gy)、1 200 个/孔(4 Gy)、1 600 个/孔(6 Gy)。次日晨进行照射,然后继续置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。10~12 d 后取出,倾倒入培养基,以 PBS 液轻轻冲洗 2 次,甲醇固定 30 min,吸去甲醇,晾干,Giemsa 染液染色 2 h 后,流水轻轻冲洗,然后自然晾干,计数肉眼可见的 > 50 个细胞的集落数。以上实验重复 3 次,实验结果为 3 次平均值。集落形成率(plating efficiency, PE, %)=集落数/接种细胞数×100%;细胞存活分数(survival fraction, SF)=某一剂量照射实验组的集落数/(该组细胞接种数×PE)。

#### 1.2.5 MTT 检测细胞对顺铂的敏感性

取对数生长期的上述细胞,经 0.25%的胰酶消化,用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基制成单细胞悬液,准确计数后细胞接种于 96 孔培养板中,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱内培养 24 h 待细胞贴壁,每孔含细胞数  $2 \times 10^4$  个。将细胞分为空白组、对照组和实验组,空白组只加培养液,对照组加细胞及培养液,实验组还分别加入不同浓度的顺铂(1.0、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 μg/ml)<sup>[4]</sup>,每组设 3 个复孔。继续培养 24 h,吸尽各孔内的培养液,加入 5 g/L MTT 50 μl,37℃继续培养 4 h,小心吸去上清液,加入 150 μl 的二甲亚砷(DMSO),震荡 10 min,在酶标仪 490 nm 处测吸光度值。实验重复 3 次,计算细胞存活率,计算公式为:存活率(%)=(药物组吸光度值-空白组吸光度值)/(对照组吸光度值-空白组吸光度值)×100%。

### 1.3 统计学方法

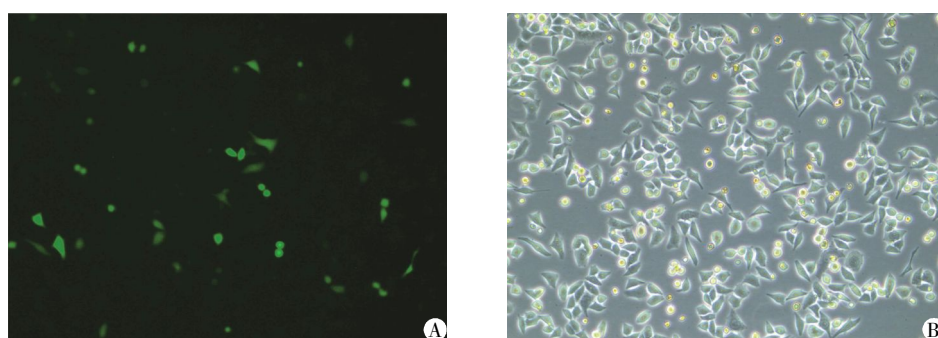
采用 SPSS13.0 分析,各组参数的比较用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-*q* 检验,以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 细胞转染结果

转染 ECA-109 细胞 48 h 后,倒置荧光显微镜下观察 shRNA-POL I 转染组细胞,可见大量绿色荧光蛋白,转染效率达 70%。转染效率满足实验需要(图 1)。

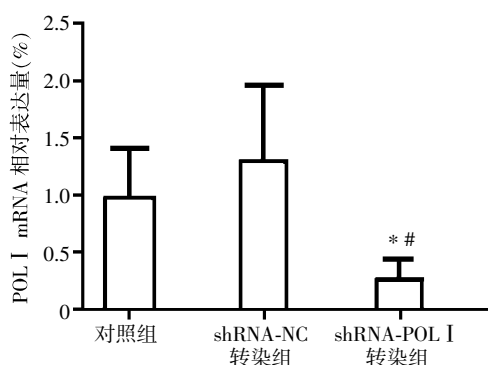
### 2.2 实时荧光定量 PCR 检测



A: 荧光观察; B: 白光观察。

图 1 转染 48 h 后, 倒置荧光显微镜下观察 shRNA-POL I 转染组的转染效率( $\times 100$ )Figure 1 The transfection efficiency was evaluated by fluorescence microscopy after 48 h( $\times 100$ )

荧光定量 PCR 法检测 ECA-109 细胞 POL I 的 mRNA 表达, GAPDH 作为内参对照。结果显示, 与对照组相比, shRNA-NC 转染组 POL I 的 mRNA 表达水平与对照组无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), shRNA-POL I 转染组 POL I 的 mRNA 水平与对照组和 shRNA-NC 转染组比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 2)。



与对照组比较,  $*P < 0.05$ ; 与 shRNA-NC 转染组比较,  $*P < 0.05$ 。

图 2 实时荧光定量 PCR 检测 3 组细胞中 POL I 的 mRNA 表达水平

Figure 2 POL I expression was detected by real-time fluorescent quantitative PCR

### 2.3 “多靶单击模型”分析 POL I 表达抑制对 ECA-109 细胞的放射增敏作用

应用多靶单击模型拟合细胞生存曲线, 得到外推值 (extrapolation number,  $N$ )、准阈剂量 (quasi-threshold dose,  $D_q$ )、2 Gy 照射后的细胞存活分数 (survival fraction,  $SF_2$ ) 和平均致死剂量 (mean lethal dose,  $D_0$ ) 值 (表 1)。N 值反映细胞对放射损伤的修复

能力,  $N$  值越高表示细胞修复能力越强、放射抵抗性越大, 杀死细胞所需剂量越大;  $D_q$  值与细胞存活曲线肩区宽度相关, 反映细胞亚致死修复能力的大小;  $D_0$  值为曲线指数区下降 63% 所需的剂量, 反映细胞在相对高剂量区对射线的敏感性。本研究结果表明, shRNA-POL I 转染组的  $D_0$ 、 $D_q$ 、 $N$ 、 $SF_2$  值均较对照组和 shRNA-NC 转染组明显降低, 与对照组相比, shRNA-POL I 转染组放射增敏比 (sensitization enhancement ratios, SER) 为 1.40, 与 shRNA-NC 转染组相比, shRNA-POL I 转染组 SER 为 1.37。提示抑制 POL I 的表达后, 其放射敏感性增强 (图 3)。

### 2.4 对顺铂敏感性的变化

MTT 检测结果显示 shRNA-POL I 转染组细胞的相对存活率随药物浓度的增高较对照组及 shRNA-NC 转染组的细胞明显降低 ( $P < 0.05$ ), 而 shRNA-NC 转染组与对照组无明显差别 ( $P > 0.05$ )。说明 shRNA-POL I 转染食管癌细胞后, 有效提高了细胞对顺铂的敏感性 (图 4)。

## 3 讨论

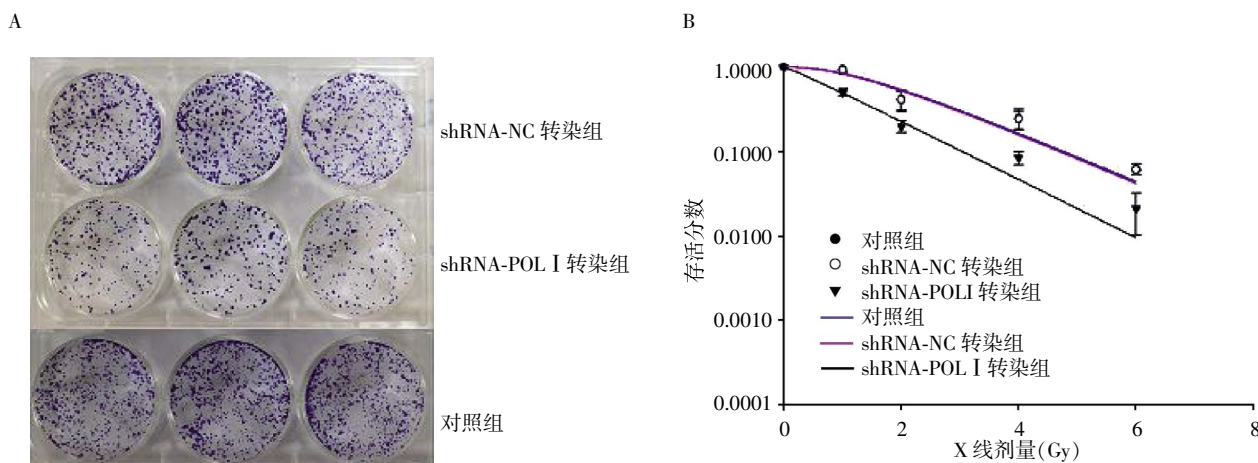
食管癌是中国最常见的恶性肿瘤之一, 食管癌的预后极差, 50% 的患者在诊断时已为晚期, 自然病程仅 6~8 个月, 5 年生存率 5%~7%, 接受手术的患者中 90% 有复发转移, 失去了手术根治的机会, 目前综合治疗是该病的主要治疗手段之一。化疗和放疗是食管癌非手术治疗的主要手段<sup>[5]</sup>。

70%~80% 的患者需进行放射治疗, 但常规放疗

表 1 ECA-109 细胞在 X 线照射后生存曲线的各项参数

Table 1 Radiobiological parameters of ECA-109 cell after X-ray

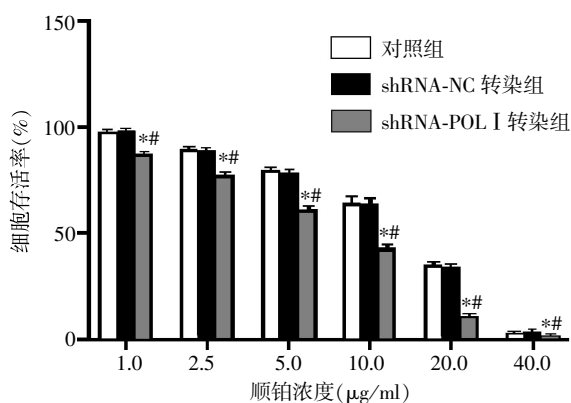
组别	平均致死剂量(Gy)	2Gy 照射时的细胞存活分数	准阈剂量(Gy)	外推值
对照组	1.50±0.02	0.97±0.04	1.40±0.05	2.54±0.03
shRAN-NC 转染组	1.49±0.03	0.97±0.06	1.36±0.03	2.48±0.05
shRAN-POL I 转染组	0.89±0.02	0.98±0.05	0.99±0.04	2.02±0.02



A:2 Gy 照射时平板克隆形成;B:不同剂量 X 线照射时细胞的存活分数。

图 3 POL I 沉默后 ECA-109 细胞的放疗敏感性变化

Figure 3 The radiosensitivity of ECA-109 cell after knockdown of POL I



与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 shRNA-NC 转染组比较, # $P < 0.05$ 。

图 4 MTT 法检测 3 组细胞对顺铂敏感性的变化

Figure 4 Cisplatin effect on the three groups cells by MTT assay

的 5 年生存率仅达 10%~20%左右,放疗后局部复发病死率高达 60%~80%。虽然近年来放疗技术取得了较快进步,明显提高了治疗的精度,但疗效还不能令人满意<sup>[6-7]</sup>。射线对细胞具有杀伤效应,电离辐射作用于细胞引起的各种损伤主要发生在 DNA 上,使 DNA 的完整性受到损伤,导致细胞死亡或突变<sup>[8]</sup>。所有的细胞都存在 DNA 损伤修复系统,这是细胞维持自身基因组稳定最重要的防御及保护机制。对于肿瘤细胞,DNA 损伤与修复则是抵抗放疗或导致对放疗不敏感的重要机制之一,因此从分子生物学水平探索放射敏感性、放疗疗效的生物学机制,寻求分子水平的治疗手段,可以从根本上改善食管癌的放射敏感性和放疗疗效,使食管癌患者获得长期生存能力。而铂类药物参与的化学治疗是食管癌综合治疗措施中必不可少的组成部分,顺铂是食管癌化学

治疗中常用的一线药物,顺铂主要的细胞毒性效应是损伤 DNA<sup>[9]</sup>。而 POL I 是 DNA 损伤修复系统中重要的聚合酶<sup>[10]</sup>。已证实 POL I 是肿瘤化疗敏感性的潜在药物靶点,临床上大部分食管癌患者在接受治疗的早期均对化疗药物敏感,但经过数个疗程之后,部分患者可出现对某些化疗药物的敏感性降低,因此探索食管癌的化疗方法,增强化疗疗效,提高食管癌患者的生存率具有重要的临床意义。

本实验室前期研究结果发现,POL I 在食管癌组织中的表达量是正常组织的 7.2 倍<sup>[11]</sup>。因此,本实验依照 shRNA 设计原则,构建针对 POL I 基因的重组质粒,将其转染入 ECA-109 细胞,观察 shRNA-POL I 转染组的细胞对放疗及顺铂敏感性的影响。克隆形成实验结果表明,shRNA-POL I 转染组的细胞克隆形成率明显低于对照组和 shRNA-NC 转染组,沉默 POL I 基因提高了 ECA-109 细胞对放疗的敏感性。在对化疗药物顺铂的敏感性实验中,发现 POL I 基因抑制后,细胞对顺铂的敏感性增加,随着顺铂浓度的增加,差别越来越明显,且呈浓度依赖性。说明肿瘤细胞中内源性 POL I 的表达水平影响细胞对化疗药物顺铂的敏感性。

POL I 是 DNA 损伤修复基因的重要组成部分,因它具有很高的错配率而导致很高的突变率,引起细胞功能紊乱导致癌症发生。关于 POL I 的表达与肿瘤的关系,目前已有研究表明,POL I 在几种肿瘤中都存在高表达,如赵谦等<sup>[12]</sup>采用 RT-PCR 方法发现尿路上皮癌组织中 POL I 的 mRNA 表达量高于正常,并与尿路上皮癌的分级有关。人葡萄膜的黑色

素瘤的发展与 POL I 的高表达相关<sup>[13]</sup>。POL I 的过表达与人神经胶质瘤相关<sup>[14]</sup>。体内试验发现在乳腺癌细胞中 POL I 呈现高表达,使其 DNA 聚合酶活性增高,导致了 DNA 复制保真度的显著降低和乳腺癌细胞基因突变率增高,当敲除 POL I 后乳腺癌细胞的基因突变率减小。说明在乳腺癌细胞的 DNA 复制过程中,POL I 可能参与自发的跨损伤突变,造成基因损伤的积累,从而增加肿瘤的易感性<sup>[15]</sup>。同时可能参与了肿瘤细胞对一些抗癌药物的耐受。

shRNA 是 RNA 干扰技术中的一种, RNA 干扰技术属于转录后水平调控方式,其抑制基因的表达不但高效特异而且作用持久、迅速,不仅可以用于迅速寻找与增殖、侵袭相关的靶标<sup>[16-17]</sup>,更可以作为潜在的治疗手段。本实验采用 RNA 干扰技术特异性沉默食管癌细胞 ECA-109 的 POL I 基因,提高了 ECA-109 细胞对放疗和化疗的敏感性。RNA 干扰技术在未来的食管癌基因治疗方面具有重要应用价值<sup>[18]</sup>,并有希望成为食管癌基因治疗的一个重要手段,为肿瘤的有效干预和治疗开拓一个新领域。

#### [参考文献]

- [1] Johnson RE, 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 USA*, 2005, 102(30): 10466-10471
- [2] Nair DT, Johnson RE, 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
- [3] Prakash S, Johnson RE, Prakash L. Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function[J]. *Annu Rev Biochem*, 2005, 74: 317-353
- [4] 韩丽萍, 刘娟芳, 赵国强, 等. RNA 干扰靶向沉默 pol  $\beta$  基因对人卵巢癌细胞增殖活性及对化疗药物敏感性的影响[J]. *中国肿瘤临床*, 2011, 38(4): 197-199
- [5] Berger B, Stahlberg K, Lemmiger A, et al. Impact of radiotherapy, chemotherapy and surgery in multimodal treatment of locally advanced esophageal cancer[J]. *Oncology*, 2011, 81(5-6): 387-397
- [6] 殷蔚伯. 食管癌的放射治疗进展[J]. *实用肿瘤杂志*, 2006, 21(2): 99-103
- [7] 许泽苹, 蔡舜吼, 徐建芳. 食管癌常规分割放疗同期化疗的临床观察[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2007, 14(10): 799-800
- [8] Bhsale SM, Huilgol NG, Mishra KP. Enhancement of radiation-induced oxidative stress and cytotoxicity in tumor cell by ellagic acid[J]. *Clin Chim Acta*, 2005, 359(1-2): 89-100
- [9] Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance[J]. *Oncogene*, 2003, 22(47): 7265-7279
- [10] Jain R, Nair DT, Johnson RE, et al. Replication across template T/U by human DNA polymerase-iota[J]. *Structure*, 2009, 17(7): 974-980
- [11] Zhou JD, Zhang SY, Xie L, et al. Overexpression of DNA polymerase iota in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(8): 1574-1579
- [12] 赵谦, 曾益军, 杨劲, 等. polt 在膀胱尿路上皮癌细胞株及肿瘤组织中 mRNA 的表达[J]. *第三军医大学学报*, 2008, 30(14): 1305-1307
- [13] Wang H, Wu W, Wang HW et al. Analysis of specialized DNA polymerases expression in human gliomas; association with prognostic significance[J]. *Neuro Oncol* 2010, 12(7): 679-686
- [14] Gening LV, Grishina EE, Petrochenkov AN, et al. Association between high activity of DNA polymerases iota and the development of human uveal melanoma[J]. *Genetika*, 2006, 42(1): 98-103
- [15] 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
- [16] 龚宝兰, 陈永利, 王任晓, 等. MicroRNA 下调 SiHa 中 CD147 的表达及对肿瘤生物学活性的影响[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2011, 31(2): 193-198
- [17] 蒋佳凯, 张翼, 张国新, 等. SiRNA 干扰人宫颈癌基因 (HCCR) 的表达对胰腺癌 PANC1 细胞增殖、凋亡和侵袭的影响[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2009, 29(5): 643-647
- [18] Liao HY, Wang GP, Gu LJ, et al. HIF-1 $\alpha$  siRNA and cisplatin in combination suppress tumor growth in a nude mice model of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(2): 473-477

[收稿日期] 2012-09-18