

IER5 基因对 HeLa 细胞辐射敏感性的影响*

李秀楠^{1)**} 李莉^{2)**} 杨川杰³⁾ 郝淳³⁾ 乔茶³⁾ 杨芬³⁾ 周平坤⁴⁾
王佩⁵⁾ 袁增强⁵⁾ 李延玲²⁾ 鲁玮媛²⁾ 张为远^{1)***} 丁库克^{2)***}

¹⁾首都医科大学附属北京妇产医院, 北京 100006; ²⁾首都医科大学生物医学工程学院与基础医学院, 北京 100069;

³⁾河北医科大学第二医院消化内科, 石家庄 050000; ⁴⁾军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850;

⁵⁾中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 为寻找放射敏感性基因, 采用基因芯片技术筛选出辐射可诱导表达 mRNA 上调的基因, 其中就有 IER5. 为探索 IER5 基因的生物学功能及其在宫颈癌放疗中的作用, 采用 RNA 干扰技术构建 IER5 基因表达抑制的质粒载体并构建 IER5-siRNA-HeLa 细胞系. 对该细胞系与 HeLa 细胞进行辐射, 旨在了解 IER5-siRNA-HeLa 的细胞生长曲线、细胞周期等实验参数的变化, 揭示了 IER5 基因在辐射诱导中的生物学功能. 实验发现, IER5 基因表达抑制可提高细胞分裂进入 S 期与 G2-M 期的比例, 促进细胞分裂, 促进细胞生长, 提高细胞对辐射的拮抗性, 同时发现 IER5-siRNA-HeLa 细胞在尺寸上大于 HeLa 细胞. 研究表明, IER5 基因表达抑制可促使细胞受辐射后发生 S 期与 G2-M 期的阻滞, IER5 参与辐射细胞周期的调控, 对临床宫颈癌放疗有一定的潜在应用价值.

关键词 IER5, 早期反应基因, HeLa 细胞, 辐射敏感性, 宫颈癌

学科分类号 Q6, R73

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00713

当前, 宫颈癌严重危害妇女的健康与生命. 放疗作为肿瘤治疗的常规手段之一, 广泛地应用在宫颈癌治疗上. 通过临床观察, 发现放疗常存在治疗效果不佳与辐射敏感性不理想等问题, 这些问题严重影响着宫颈癌的治疗. 因此, 人们试图从基因水平寻找对辐射敏感的放疗靶基因, 若该基因对辐射有很好的剂量效应和时间效应, 在很短的时间内出现基因表达^[1~6], 并能在某些辐射剂量下引起细胞凋亡, 或者引起细胞周期发生变化, 那么该基因很有可能成为潜在的辐射靶基因, 有利于肿瘤的放疗. 本课题组运用基因芯片检测方法, 筛选出了一批对不同剂量辐射反应敏感的基因, 其中就有 IER5 基因.

IER5 是 Immediate early response 5 的简称, 人 IER5 基因位于 1 号染色体上 1q25.3, cDNA 全长 2 369 bp, 而鼠的 IER5 基因位于 1 号染色体上 181.5 cM, cDNA 长度为 2 123 bp^[7]. IER5 属于早期慢反应基因家族中的一员. Williams 等证实, IER5 是一种富含脯氨酸且具有多个核酸位点的蛋白质, 与其他早期反应基因 pip92、IER2、ETR101

一样, 具有同源氨基端, 其生长因子的诱导动力学与 pip92、IER2、ETR101 相似, 不同之处在于其转录激活不需要磷酸激酶 C 的活化. 通过调节血浆生长因子反应证实: IER5 启动子区域序列可由转录因子结合位点决定并予以检测, 包含多种 AP-1 位点及 Ets-1 位点, 但缺少 CArG 及类似 CArG 的序列. IER5 通过磷酸化和(或)去磷酸化作用对外界刺激有快速调节作用, 这暗示 IER5 可能对细胞有丝分裂发挥重要作用^[8]. 有研究通过实验了解到 IER5 的辐射诱导表达规律, 但对该基因辐射效应的作用机理及其生物学功能尚不清楚^[5,9], 因此, 有必要利用 RNA 干扰等技术研究 HeLa 细胞 IER5 基因的辐射敏感性等问题.

* 国家自然科学基金(30770533, 30270423), 北京市教育委员会科技发展基金(Km200710025007), 北京市自然科学基金(7092013)和国家高技术研究发展计划(863)(2004AA221160)资助项目.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 010-83911554-269, E-mail: shouding@ccmu.edu.cn

收稿日期: 2008-10-24, 接受日期: 2009-01-19

1 材料与方法

1.1 细胞株和质粒

人宫颈癌细胞系(HeLa细胞)与淋巴母细胞系(AHH1)由军事医学科学院放射与辐射医学研究所第四实验室保存,用于 siRNA 表达的质粒载体 Psilencer™ 3.1-H1 hygro 购于 Ambion 公司. DH5 α 感受态细胞购自博大泰克公司.

1.2 主要试剂

T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司,质粒提取试剂盒为 Vigrous 公司产品, *Hind* III 和 *Bam*H I 为 NEB 公司产品; DMEM 和 Lipofectamine 为 GIBCO BRL 公司产品; 潮霉素(Hygomycin)B 为 Roche 公司产品; Trizol 试剂和反转录扩增试剂盒为 Invitrogen 公司产品; IER5 鼠抗人多克隆抗体(中国台湾 Abnova 公司); Ecl Anti-Mouse IgG(二抗), ECL 显色液购于 PerkinElmer 公司; 10%灭活的新生牛血清 DMEM, 蛋白质裂解液.

1.3 ⁶⁰Co γ 射线照射

在军事医学科学院辐射中心采用 ⁶⁰Co 源产生的 γ 射线照射离体培养的 HeLa 细胞与稳定转染后的单克隆细胞系 IER5-siRNA-HeLa, 采用辐射套照方式, 辐射剂量分别为 0.5 Gy、1 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy、8 Gy.

1.4 探针标记、杂交与基因杂交谱图像分析

将待预杂交的玻片放入 95℃ 水浴锅内变性 30 s, 取出玻片后立即将其放入无水乙醇中. 再将已加热的预杂交液加到玻片的点样区域内, 盖上盖玻片, 预杂交 6 h. 在 Eppendorf 管内加入三蒸水 23 μ l、逆转录引物 5 μ l、总 RNA 30 μ g, 反应终体积为 50 μ l. 水浴后迅速置于冰上, 加入逆转录酶缓冲液 10 μ l、DTT 5 μ l、dNTPs 4 μ l, 再加入逆转录酶 2 μ l、Cy5-dCTP(标记照射组细胞 cDNA)或 Cy3-dCTP(标记对照组细胞 cDNA)3 μ l, 混合后水浴, 再加入标记试剂 I 3 μ l 和标记试剂 II 4 μ l. 标记完后混匀. 避光、真空抽干至 50 μ l 左右. 使用 DNA 纯化柱纯化 DNA, 之后进行杂交. 期间使用 Parafilm 密封, 在 42℃ 杂交箱内杂交过夜(16~18 h). 洗片、晾干后进行荧光扫描. 用 ScanArray 4000 扫描仪扫描芯片, 获得基因表达的荧光信号强度值. 用 Genepix pro 3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度和比值. 为排除假阳性结果, 取两张芯片共同的差异表达基因作为本次实验的结果.

1.5 将已构建好的带有编码特异性沉默 IER5 基因 siRNA 的质粒载体转染至 HeLa 细胞

用含有 10%新生牛血清的 DMEM 培养基培养细胞. 在转染前 24 h 时, 将 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个 HeLa 细胞接种在 60 mm 的培养皿中, 用 Lipofectamine^M2000 将 siRNA 质粒转染 HeLa 细胞(按试剂盒说明操作). 转染后经过潮霉素 B 筛选、挑选出阳性单克隆细胞, 从而获得特异性沉默 IER5 基因的 HeLa 细胞系. 同时设阴性对照组, 即为与人类编码基因序列无同源性的片段和载体连接后转染的 HeLa 细胞.

1.6 检测 siRNA 对 HeLa 细胞中 IER5 基因的抑制效果

测试 IER5 基因 mRNA 水平所用的 IER5 引物序列为: 上游引物 5' CCGGGAACGTGGCTAAC-CC5 3', 下游引物 5' TTCCGTAGGAGTCCCGA-GAA 3'; β -actin 引物序列为: 上游引物 5' GCGC-GGCTACAGCTTCA 3', 下游引物 5' CTTAAT-GTCACGCACGATTTC 3'. 测试仪器为 7300 real-time PCR system, 反应循环次数为 40 次, 反应体系为 20 μ l, 反应条件为 50℃ 2 min, 95℃ 10 min, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min. 采用该仪器自带的 7300 系统 SDS 软件处理这些测试数据. 此外, 通过 Western blot 检测 IER5 蛋白表达. 将离体培养的细胞在收集后使用蛋白质裂解液处理, 提取总蛋白, 经过考马斯亮蓝染色法定量蛋白质. 肌动蛋白作为蛋白质上样量的标定.

1.7 集落克隆形成率法检测细胞辐射敏感性

将 HeLa 细胞与 IER5-siRNA-HeLa 细胞接种在 60 mm 的培养皿中, 再按照 0.5 Gy、1 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy、8 Gy 的辐射剂量(将未照射细胞作为对照组, 剂量为 0 Gy)进行 γ 射线照射. 每次实验每个辐射剂量设置 3 个培养皿, 共进行 3 次独立实验, 具体实验方案如表 1 所示. 细胞照射后置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中连续培养 12 天, 之后对细胞进行甲醇固定与吉姆萨(Giemsa)染色, 计算不同剂量的 γ 射线对正常 HeLa 细胞与 IER5-siRNA-HeLa 细胞的集落克隆形成率, 并对细胞集落的计数结果进行统计处理.

1.8 辐射对 HeLa 和 IER5-siRNA-HeLa 细胞增殖的影响

对培养的细胞进行处理、稀释, 再根据细胞的浓度算出实验所需的体积数. 用移液器将细胞加在 6 孔板中. 对于每种实验细胞, 均设对照组(即未照射组)、2 Gy 辐射组、4 Gy 辐射组. 每组实验要

Table 1 The test project for cell radio-sensitivity

HeLa	IER5-siRNA-HeLa	The size of culture medium (including cell)/ml	The number of cell	The dose of irradiation/Gy
0.5 Gy+0.2 ml	0.5 Gy+0.2 ml	0.2	200	0.5
0.5 Gy+0.4 ml	0.5 Gy+0.4 ml	0.4	400	0.5
1 Gy+0.2 ml	1 Gy+0.2 ml	0.2	200	1
1 Gy+0.4 ml	1 Gy+0.4 ml	0.4	400	1
2 Gy+0.4 ml	2 Gy+0.4 ml	0.4	400	2
2 Gy+0.8 ml	2 Gy+0.8 ml	0.8	800	2
4 Gy+1.0 ml	4 Gy+1.0 ml	1.0	1 000	4
4 Gy+2.0 ml	4 Gy+2.0 ml	2.0	2 000	4
6 Gy+0.5 ml	6 Gy+0.5 ml	0.5	5 000	6
6 Gy+1.0 ml	6 Gy+1.0 ml	1.0	10 000	6
8 Gy+0.5 ml	8 Gy+0.5 ml	0.5	5 000	8
8 Gy+1.0 ml	8 Gy+1.0 ml	1.0	10 000	8
0 Gy+0.2 ml	0 Gy+0.2 ml	0.2	200	0
0 Gy+0.4 ml	0 Gy+0.4 ml	0.4	400	0

铺设两块 6 孔板, 共做 3 次这样的独立实验. 在铺板的次日照射细胞, 在照射的次日开始对细胞进行消化、计数, 做到每天定时计数, 上述操作持续 6 天. 最后对正常 HeLa 细胞与 IER5-siRNA-HeLa 细胞增殖数据进行统计分析.

1.9 辐射对 HeLa 和 IER5-siRNA-HeLa 细胞周期的影响

让 HeLa 和 IER5-siRNA-HeLa 细胞在室温下接受 2 Gy、4 Gy 的 ^{60}Co γ 射线照射, 同时设对照组, 即为未照射组. 在照射后 2 h、4 h、8 h、12 h、24 h 和 48 h 时分别收集细胞. 用 0.30 ml DMEM 培养液悬浮细胞, 加入 95% 冰乙醇(-20°C 保存) 0.70 ml, 使乙醇的终浓度为 70%, 放置 -20°C 冰箱中过夜保存. 经过样品染色, 利用流式细胞仪测定细胞周期.

2 结 果

2.1 基因芯片的结果

用基因芯片检测比较 0.05~10 Gy 的 γ 射线照射 AHH1 细胞与未经照射(对照组)细胞的基因表达

谱情况. 图 1 为照射组 AHH1 细胞及对照组细胞基因表达谱的杂交图. Cy3 荧光信号和 Cy5 荧光信号分别表示为绿色和红色. 对于某一点的两种叠加荧光信号, 如果 Cy3(标记对照组细胞 cDNA)信号较强, 该点多显绿色, 即照射后呈下调趋势; 如果 Cy5(标记照射组细胞 cDNA)信号较强, 该点多显红色, 即基因表达呈上调趋势; 如果强度相似, 即显示黄色. 表 2 列出了不同剂量 γ 射线辐照 AHH1 细胞后表达上调的部分基因, 其中就包括 IER5 基因.

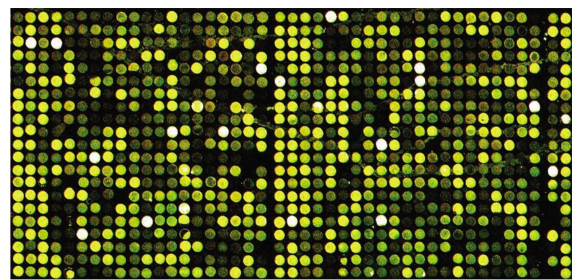


Fig. 1 The cluster analysis representative of transcriptional profiles in AHH-1 cells after exposed to 0.05 to 10 Gy γ -rays

Table 2 The list of upregulated genes with a dose-dependent tendency

Accession No.	Definition	0.05 Gy	0.2 Gy	0.5 Gy	2 Gy	10 Gy
NM_004879	Etoposide induced 2.4 mRNA (EI24)	1.022	1.543	1.652	2.624	2.727
NM_023039	Ankyrin repeat, family A (RFXANK-like), 2 (ANKRA2)	1.071	1.377	1.623	2.556	2.835
NM_147188	F-box protein 22 (FBXO22)	1.248	1.454	1.686	2.613	2.846
NM_016545	Immediate early response 5 (IER5)	1.071	1.354	1.608	2.018	2.876
NM_001001342	Biogenesis of lysosome-related organelles complex-1, subunit 2 (BLOC1S2)	1.241	1.560	1.609	2.176	3.321
D87328	mRNA for HCS	1.343	1.571	1.633	2.223	3.464

2.2 siRNA对 HeLa细胞中 IER5 基因抑制效果的检测

采用 7300 real-time PCR system 仪器检测上述转染细胞 1 号、2 号、3 号、4 号、5 号以及用阴性

对照序列转染的 6 号细胞 mRNA 水平. 该实验结果见表 3. 表 3 中 6 号细胞为阴性对照组, control 为整个反应系统的对照组. 此外实验中所有的 IER5 测定数据均以 β -actin 的数值为参考.

Table 3 The IER5 expression results of transfected cells

Sample	Ct value of IER5	Ct value of actin	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	Sample/Control = $2^{-\Delta\Delta Ct}$
1	23.139	19.476	3.914	4.372	$2^{-4.372}$
2	24.276	15.985	8.291	8.794	$2^{-8.794}$
3	23.076	15.594	7.482	7.940	$2^{-7.94}$
4	24.675	21.877	2.798	3.256	$2^{-3.256}$
5	23.595	21.390	2.205	2.663	$2^{-2.663}$
6	23.614	31.524	-7.910	-6.452	$2^{-6.452}$
Control	31.342	31.800	-0.458	0.000	$2^0=1$

若将 6 号细胞的 mRNA 值定为 1, 按此进行归一化处理, 则转染细胞 1 号、2 号、3 号、4 号、5 号的 mRNA 值分别为 $2^{-10.824}$ 、 $2^{-15.246}$ 、 $2^{-14.392}$ 、 $2^{-9.708}$ 、 $2^{-9.115}$. 从表 3 可以看出: 在上述 6 种细胞中, IER5 的 mRNA 水平表达最高的为对照组 6 号, 1~5 号细胞中 IER5 的 mRNA 表达水平都有不同程度的下降, 其中表达量最低的为 2 号细胞, 其次是 3 号、1 号、4 号、5 号细胞. 该实验结果说明对 IER5 基因抑制效果最好的就是 2 号细胞.

测试 IER5-siRNA-HeLa 细胞、HeLa 细胞与阴性对照组 6 号细胞的 IER5 蛋白表达水平, 旨在从蛋白质角度验证 IER5-siRNA-HeLa 细胞中的 IER5 基因是否真正受到表达抑制. 该实验结果如图 2 所示.

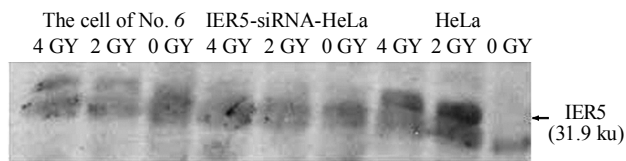


Fig. 2 The IER5 protein expressions in three cell lines

从图 2 可看出, 正常 HeLa 细胞的 IER5 蛋白表达在接受 2 Gy 和 4 Gy 射线照射时最强、最明显, 而且 2 Gy 对应的蛋白质条带比 4 Gy 对应的蛋白质条带要深一些, 说明不同辐射剂量引起 IER5 蛋白表达是有差异的, 而 IER5-siRNA-HeLa 细胞的 IER5 蛋白在相同的照射剂量下表达不明显, 比对照组 6 号细胞的 IER5 蛋白条带还弱. 正常 HeLa 细胞的 0 Gy 对应的条带比较浅, 是因为该孔蛋白质样品出现了漏胶所致. 此结果表明, 我们成功地转染并挑选、培养出 IER5-siRNA-HeLa 细胞系, 在蛋白质层面上其 IER5 基因表达也受到抑制.

2.3 细胞形态对比

在普通显微镜放大倍数相同的情况下观察到 IER5-siRNA-HeLa 的细胞(图 3a)比正常 HeLa 细胞(图 3b)稍大一些, 细胞形态呈圆形、卵圆形或三角形等.

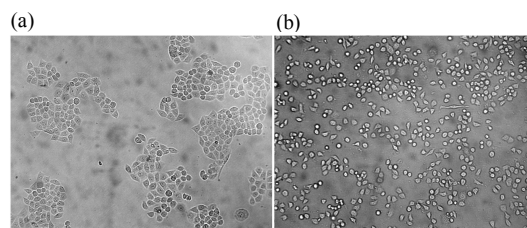


Fig. 3 The size and configuration of IER5-siRNA-HeLa compared with that of HeLa

2.4 IER5-siRNA-HeLa 细胞与正常 HeLa 细胞辐射敏感性对比结果

对实验数据统计分析后发现: 在相同辐射剂量下, 它们的集落克隆形成率, 即 survival ratio(%)具有显著性差异(图 4).

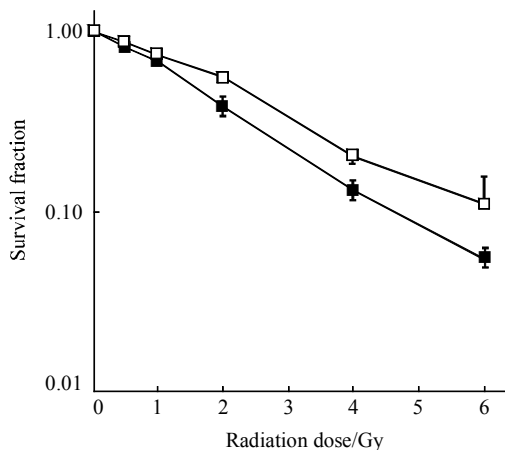


Fig. 4 The survival analysis of IER5-siRNA-HeLa and HeLa cells subjected to the different dosage of irradiation
 ■—■: HeLa; □—□: IER5-siRNA-HeLa.

由图 4 可知: IER5-siRNA-HeLa 细胞集落克隆形成率明显高于正常的 HeLa 细胞. 这说明抑制 IER5 基因的表达可提高细胞的辐射拮抗性.

2.5 辐射对正常 HeLa 细胞和 IER5-siRNA-HeLa 细胞增殖的影响

HeLa 细胞与 IER5-siRNA-HeLa 细胞增殖数据统计分析后的结果如图 5 所示.

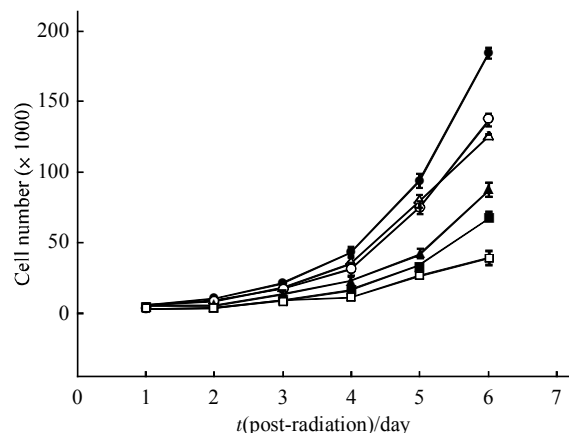


Fig. 5 The growth curves of IER5-siRNA-HeLa and HeLa cells subjected to the different dosage of irradiation

●—●: IER5-siRNA-0 Gy; ○—○: IER5-siRNA-2 Gy; ▲—▲: IER5-siRNA-4 Gy; △—△: NS-siRNA-0 Gy; ■—■: NS-siRNA-2 Gy; □—□: NS-siRNA-4 Gy.

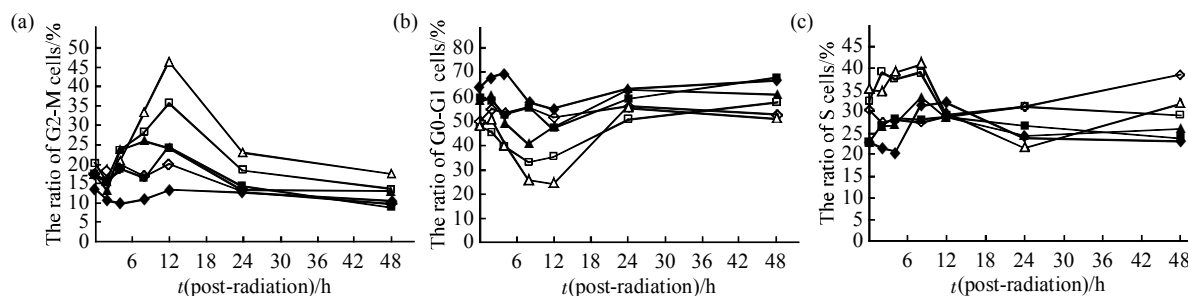


Fig. 6 The cell cycle analysis in IER5-siRNA-HeLa and HeLa cells after different dosage of radiation

◆—◆: NS-siRNA-0 Gy; ■—■: NS-siRNA-2 Gy; ▲—▲: NS-siRNA-4 Gy; ◇—◇: IER5-siRNA-0 Gy; □—□: IER5-siRNA-2 Gy; △—△: IER5-siRNA-4 Gy.

(NS-siRNA-0Gy、NS-siRNA-2Gy、NS-siRNA-4Gy、IER5-siRNA-0Gy). 这表明, HeLa 细胞在受辐射后 4 h 内细胞分裂出现了延迟现象, 在 12 h 时分裂的细胞增多, 而 IER5-siRNA-HeLa 细胞也具有这样的特性, 但是在 4 h 至 12 h 期间, 它的分裂比例大于 HeLa 细胞, 即 IER5-siRNA-HeLa 细胞比 HeLa 细胞分裂得快.

由图 6b 可知, 在辐射后 0 h 至 24 h 期间, HeLa 细胞与 IER5-siRNA-HeLa 细胞 G0-G1 的比例出现先增加而后下降至最低点, 之后再次上升, 直到 24 h 时它的数值保持基本不变, 与此同时随着

在 2 Gy、4 Gy 的 γ 射线辐射下, 两种细胞的增殖数据之间具有显著性差异, 并且 IER5-siRNA-HeLa 细胞生长速度明显大于 HeLa 细胞. 这一结果暗示 IER5 基因的高表达具有延缓 HeLa 生长的作用, IER5 基因表达抑制能增强细胞的增殖能力.

2.6 辐射对正常 HeLa 细胞和 IER5-siRNA-HeLa 细胞周期的影响

将 HeLa 和 IER5-siRNA-HeLa 细胞按实验组别分别接受 2 Gy、4 Gy 的 γ 射线照射, 之后测定它们的细胞周期, 图 6 显示出辐射后不同时间内 G2-M 期细胞(图 6a)、G0-G1 期细胞(图 6b)、S 期细胞(图 6c)的时间变化. 这些数据为 3 次独立实验的平均值. 在图 6 中用 NS-siRNA 表示 HeLa 细胞, IER5-siRNA 表示 IER5-siRNA-HeLa 细胞.

图 6a 显示: 在辐射后 4 h 正常的 HeLa 细胞与 IER5-siRNA-HeLa 细胞的 G2-M 比例均出现了下降, 之后再次上升, 大约在 12 h 时达到最高峰. 此外, IER5-siRNA-HeLa 细胞的对照组(IER5-siRNA-0Gy)G2-M 比例明显高于正常 HeLa 细胞的对照组(NS-siRNA-0Gy)G2-M 比例, IER5-siRNA-HeLa 细胞的 2Gy、4Gy 实验组(IER5-siRNA-2Gy、IER5-siRNA-4Gy)的 G2-M 比例也明显高于其他实验组

辐射剂量的增加, 这些实验组的 G0-G1 比例变小. 在这段时间内 G0-G1 期 HeLa 细胞比 IER5-siRNA-HeLa 各实验组的细胞要多一些.

图 6c 表明: 在辐射后 0 h 至 12 h 之间, 对照组细胞 S 期的比例呈现了先减少后增加的变化趋势, 低于它们受到辐射(辐射剂量为 2 Gy、4 Gy)的情况. 该实验说明辐射可以使更多的细胞处于染色体复制阶段, 即在这个阶段辐射可以促进细胞的染色体复制. 此外, IER5-siRNA-HeLa 在 S 期的细胞多于 HeLa 在 S 期的细胞.

3 讨 论

早期反应基因的激活被认为是细胞和染色体对外部刺激作出的第一步反应, 且在该反应中起到至关重要的作用. IER5 属于早期慢反应基因. Zeng 等^[10]利用基因芯片对 PSP 引起骨髓白血病 HL-60 细胞凋亡的分子机制进行研究, 研究发现 IER5、AP-1、IER2、EGR1 等早期转录因子通过上调表达调控 PSP 引起细胞凋亡. Okada 等^[11]研究发现: 在丙戊酸引起神经管畸形的过程中 IER5 基因出现了高表达, 也暗示 IER5 基因与细胞周期的调节、细胞凋亡有关. 但 IER5 在辐射后的生物学功能尚属未知.

本实验通过前期构建好的特异性抑制 IER5 基因的 siRNA 质粒载体, 转染至 HeLa 细胞, 通过潮霉素 B 的筛选, 挑选出 IER5-siRNA-HeLa 单克隆细胞系, 为研究 IER5 基因辐射诱导表达的机理研究及揭示 IER5 生物学功能奠定了基础.

表 3 的测试结果说明, IER5-siRNA-HeLa 细胞的 IER5 基因 mRNA 表达抑制效果明显. 在这种情况下, 利用 IER5-siRNA-HeLa 细胞与正常 HeLa 细胞进行对比实验, 类比的参数有细胞形态、细胞增殖、辐射敏感性、细胞周期等. 它们在细胞形态上主要区别有: IER5-siRNA-HeLa 细胞比 HeLa 细胞体积稍大. 在辐射敏感性方面, 细胞受到辐射后, 不管是低剂量 (0.5 Gy、1 Gy、2Gy) 还是大剂量 (4 Gy、6 Gy、8 Gy) 的辐射, IER5-siRNA-HeLa 细胞的细胞集落克隆形成率明显高于 HeLa 细胞, 这说明抑制 IER5 基因的表达可提高细胞的辐射抗性, 反过来, 即 IER5 基因的表达增加可提高细胞对辐射的敏感性. 细胞增殖实验说明, IER5-siRNA-HeLa 细胞比 HeLa 细胞生长快, 即使在受照射的情况下也具有这种特性, 并随着辐射剂量的增加, 细胞的生长速度变慢, 由此进一步说明抑制 IER5 基因的表达会促进细胞的生长. 此外, 细胞周期实验结果说明, IER5-siRNA-HeLa 细胞处于细胞分裂期的细胞比例高于 HeLa 细胞处于 S 期的细胞比例, 即抑制 IER5 基因的表达可促使更多的细胞在辐射后进入 S 期与 G2-M 期, 促进受辐射细胞出现 S 期与 G2-M 期的阻滞现象. 由此可见, IER5 基因确与 HeLa 细胞的辐射效应有关, 并与细胞生长、辐射敏感性等之间具有明确的直接关系.

众所周知, 细胞分裂是指一个细胞经生长、分裂而增殖成两个细胞所经历的全过程, 通常可分为

若干阶段, 即 G1 期、S 期、G2 期和 M 期. 细胞在 G1 期完成必要的生长和物质准备, 在 S 期完成其遗传物质——染色体 DNA 的复制, 在 G2 期进行必要的检查及修复以保证 DNA 复制的准确性, 然后在 M 期完成遗传物质到子细胞中的均等分配, 并使细胞一分为二^[12~17]. 生物信息通过一系列复杂的信号传递过程来诱导相关基因的表达、调控细胞分裂, 并决定细胞的转归. 相对于 IER5-siRNA-HeLa 细胞而言, HeLa 细胞属于 IER5 基因高表达的细胞, 在辐射情况出现了 G2-M 期与 G1-S 期相对阻滞的情况, 因此我们可以推断 IER5 基因高表达可以抑制细胞的分裂. 这个结论是从细胞周期实验中得到, 并与细胞增殖实验相吻合, 也与细胞的辐射敏感性实验相符合, 即 IER5 基因具有辐射敏感性, 在一定的辐射作用下可以促进 IER5 基因 mRNA 水平高表达, 这种 mRNA 高表达可抑制细胞的生长, 促进细胞死亡, 降低细胞进入 G1-S 期的比例或者阻止细胞分裂. 从这种角度来看, IER5 基因是对 HeLa 细胞辐射“有利”的基因, 与我们在临床上通过放疗提高肿瘤细胞的死亡率或者阻止这种肿瘤细胞的生长与细胞分裂的目的相一致. 因此, 我们可以预测 IER5 基因可能有利于宫颈癌的放射治疗, 此推论有待于结合临床上肿瘤放疗样品对 IER5 基因的作用进行更深层次的探索.

参 考 文 献

- 1 Mothersill C, Seymour C. Radiation-induced bystander effects and adaptive responses—the Yin and Yang of low dose radiobiology?. *Mutation Research*, 2004, **568**(1): 121~128
- 2 Murray D, McEwan A J. Radiobiology of systemic radiation therapy. *Cancer Biother Radiopharm*, 2007, **22**(1): 1~23
- 3 龙贤辉, 徐勤枝, 贺性鹏, 等. 5 c Gy γ 射线照射正常人淋巴母细胞基因表达转录谱的变化. *辐射防护*, 2006, **26**(2): 78~82
Long X H, Xu Q Z, He X P, *et al.* *Radiation Protection*, 2006, **26**(2): 78~82
- 4 王会平, 龙贤辉, 徐勤枝, 等. 基因芯片技术分析 20c Gy γ 射线照射人淋巴母细胞中差异表达的基因谱. *辐射防护*, 2006, **26**(3): 151~156
Wang H P, Long X H, Xu Q Z, *et al.* *Radiation Protection*, 2006, **26**(3): 151~156
- 5 丁库克, 沈晶晶, 许莉莉, 等. γ 射线辐射对 IER5 基因表达的影响. *中华放射医学与防护杂志*, 2008, **28**(1): 5~8
Ding K K, Shen J J, Xu L L, *et al.* *Chin J Radiological Medicine and Protection*, 2008, **28**(1): 5~8
- 6 Wang H P, Long X H, Sun Z Z, *et al.* Identification of differentially transcribed genes in human lymphoblastoid cells irradiated with 0.5 Gy of gamma-ray and the involvement of low dose radiation inducible CHD6 gene in cell proliferation and radiosensitivity.

- Internation J Radiation Biology, 2006, **82**(3):181~190
- 7 Gregory S G, Barlow K F, Mclay K E, *et al.* The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. *Nature*, 2006, **441**(7091): 315~321
 - 8 Williams M, Lyu M, Yang Y, *et al.* IER5, A novel member of the slow kinetics immediate-early genes. *Genomics*, 1999, **55**(3): 327~334
 - 9 Zhou P K, Rigaud O. Down-regulation of the human CDC16 gene after exposure to ionizing radiation: A possible role in the radioadaptive response. *Radiation Research*, 2001, **155**(1 pt1): 43~49
 - 10 Zeng F, Chau C, Sit W H, *et al.* Molecular characterization of *Coriolus versicolor* PSP-induced apoptosis in human promyelotic leukemic HL-60 cells using cDNA microarray. *International J Oncology*, 2005, **27**(2): 513~523
 - 11 Okada A, Kushima K, Aoki Y, *et al.* Identification of early-responsive genes correlated to valproic acid-induced neural tube defects in mice. *Birth Defects Research(Part A)*, 2005, **73**(4): 229~238
 - 12 Ojima E, Inoue Y, Miki C, *et al.* Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal cancer to preoperative radiotherapy. *J Gastroenterology*, 2007, **42**(9): 730~736
 - 13 Hirai Y, Hayashi T, Kubo Y, *et al.* X-irradiation induces up-regulation of ATM gene expression in wild-type lymphoblastoid cell lines, but not in their heterozygous or homozygous ataxia-telangiectasia counterparts. *Japanese J Cancer Research*, 2001, **92**(6): 710~717
 - 14 Chu G, Chang E. Xeroderma pigmentosum group E cells lack a nuclear factor that binds to damaged DNA. *Science*, 1988, **242**(4878): 564~567
 - 15 Li J, Wang Q E, Zhu Q, *et al.* DNA damage binding protein component DDB1 participates in nucleotide excision repair through DDB2 DNA-binding and Cullin 4A ubiquitin ligase activity. *Cancer Research*, 2006, **66**(17): 8590~8597
 - 16 Feldberg R S, Grossman L. A DNA binding protein from human placenta specific for ultraviolet damaged DNA. *Biochemistry*, 1976, **15**(11): 2402~2408
 - 17 Wittschieben B B, Wood R D. DDB complexities. *DNA Repair (Amst.)*, 2003(2): 1065~1069

The Influence of IER5 Gene on The Radiosensitivity of HeLa Cells*

LI Xiu-Nan^{1)**}, LI Li^{2)**}, YANG Chuan-Jie³⁾, HAO Chun³⁾, QIAO Cha³⁾, YANG Fen³⁾, ZHOU Ping-Kun⁴⁾, WANG Pei⁵⁾, YUAN Zeng-Qiang⁵⁾, LI Yan-Ling²⁾, LU Wei-Yuan²⁾, ZHANG Wei-Yuan^{1)***}, DING Ku-Ke^{2)***}

¹⁾ Beijing Obstetrics Gynecology Hospital, Beijing 100006, China;

²⁾ The School of Biomedical Engineering and The School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

³⁾ The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China;

⁴⁾ Institute of Radiation Medicine, The Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

⁵⁾ Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract In order to identify the radiosensitivity-related genes, microarray technology was used for candidate genes screening and it was identified that IER5 (Immediate early response 5) could be up-regulated after radiation. Biological relationship between IER5 and radiation was investigated, and its biological function was examined in human cervical carcinoma treated with radiation. RNAi technology was employed to knock down IER5 gene in HeLa cells and establish the stable transfected cell lines, IER5-siRNA-HeLa. It was found that there was more S/G2/M phases cells with larger size in IER5-siRNA-HeLa cells than that in the control cells when treated with irradiation. The results indicated that IER5 might be involved in cell growth and proliferation. Most importantly, IER5 knockdown increased the radioresistance in cells, which indicated IER5 might be a potential target for the radiotherapeutical treatment in the cervical carcinoma.

Key words IER5, immediate early response gene, HeLa, radiosensitivity, cervical carcinoma

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00713

*This work was supported by the grants from The National Natural Science Foundation of China(30770533, 30270423) and The Foundation of Beijing Municipal Education Commission (Km200710025007), and also supported by Beijing Municipal Natural Science Foundation(7092013) and Hi-Tech Research and Development Program of China (2004AA221160).

**LI Xiu-Nan and LI Li contributed equally to this work.

***Corresponding author. Tel: 86-10-83911554-269, E-mail: shouding@cemu.edu.cn

Received: October 24, 2008 Accepted: January 19, 2009