

文章编号: 1007-4627(2008)04-0385-06

# 真空、低能离子注入对人宫颈癌(HeLa)细胞中 *p53*及*c-fos* mRNA的表达影响\*

张凤秋, 方华圣, 押辉远, 秦广雍  
(郑州大学物理工程学院, 河南 郑州 450052)

**摘要:** 在具有高效护水功能石蜡油的保护下进行了人宫颈癌细胞(HeLa细胞)的低能离子注入及真空处理, 用荧光定量PCR的方法分别研究了真空和30 keV  $N^+$ 的不同注入剂量下, 细胞中*p53*基因和*c-fos*基因的mRNA表达变化。结果表明, 上述两个基因的表达与真空及低能离子注入之间存在着剂量关系。

**关键词:** 真空; 低能离子注入; HeLa细胞; 基因表达; 实时定量PCR

**中图分类号:** Q274; Q291      **文献标识码:** A

## 1 引言

自然界的粒子辐射, 无论是天然的还是人工的, 总有部分离子注入到人体细胞内, 引起细胞的损伤和突变。但是, 低能离子对动物细胞的影响研究一直鲜有文献报道, 原因在于实验需要在真空中进行, 而动物细胞对真空的耐受力极低, 在没有任何保护措施下无法进行低能离子注入的研究。2002年, 冯慧云等<sup>[1]</sup>报道选用甘油作为真空保护剂, 研究了不同浓度和处理时间条件下, 甘油对细胞在真空中的保护作用, 开创了动物细胞离子注入研究的先河, 但真空后细胞的存活率并不乐观。

石蜡油具有低致敏性及良好的封闭性、及有效的阻隔水分蒸发的作用<sup>[2]</sup>。研究人员尝试利用石蜡油高效护水的作用, 将其应用于动物细胞的保护, 以提高动物细胞在真空中处理后的存活率, 为低能离子束应用于动物细胞的研究奠定了基础。实验结果表明在石蜡油的保护下, 单纯真空处理 $10'36''$ 的HeLa细胞(即离子注入 $1 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>的真空对照样品) 75%以上能够存活, 保护效果明显<sup>[3]</sup>。最近研究人员又报道: 真空和低能离子注入均可引起动物细胞的凋亡, 但离子注入所引起的细胞凋亡要远远大于真空所引起的, 而真空的主要作用是引起细胞坏死; 另外还证明细胞的凋亡率随着注入剂量的增加而增加<sup>[4]</sup>。

随着分子生物学的迅猛发展, 已有大量研究结果证实辐射能影响细胞内一系列基因表达的变化, 使某些基因表达上调、下调或关闭, 还可能诱导产生新基因。

本实验在上述报道的基础上, 分别研究了在真空和不同注入剂量处理下, 细胞内*p53*和*c-fos*基因的mRNA相对表达, 为进一步探索低能离子束对动物细胞内基因表达的影响机制奠定了基础。

## 2 材料与方法

### 2.1 细胞培养

HeLa细胞接种于 $\phi 60$  mm玻璃培养皿中(接种密度为 $1 \times 10^5$  cells/ml), 在含有10%的胎牛血清(Hyclone, USA)和25  $\mu$ g/ml硫酸庆大霉素的RP-MI1640培养基(GIBCO, USA)中于37  $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>和饱和湿度条件下培养过夜。

### 2.2 样品的石蜡油保护处理

培养过夜的HeLa细胞经过石蜡油(SIGMA Lot 21k0030)浸泡保护后<sup>[3]</sup>, 弃掉石蜡油, 进行抽真空和离子注入处理。

### 2.3 离子注入

实验是在郑州大学的Titan脉冲式全元素离子

\* 收稿日期: 2008-01-07; 修改日期: 2008-04-18

\* 基金项目: 国家十五科技攻关资助项目(2001BA302B-03)

作者简介: 张凤秋(1977-), 女(满族), 河南郑州人, 讲师, 从事辐射生物学研究; E-mail: zhangfengqiu@zzu.edu.cn

源注入机上进行的, 脉冲式注入  $N^+$ , 束流为  $30 \mu A$ , 频率为  $25 \text{ Hz}$ , 脉冲宽度为  $400 \mu s$ , 真空度约为  $5 \times 10^{-2} \text{ Pa}$ , 注入能量为  $30 \text{ keV}$  (参照低能离子束诱变微生物时的仪器条件)。实验样品放在离子注入机的无菌微环境小靶室内, 可保证无菌条件。注入剂量分别为  $5 \times 10^{14}$  和  $2 \times 10^{15} \text{ ions/cm}^2$ 。各注入样品的真空对照是指与注入样品同样经过石蜡油的预处理, 同时进出靶室进行抽真空但不接受离子注入的样品。

## 2.4 细胞总RNA提取

分别将实验组细胞和对照组细胞溶解在 TRIzol 试剂中 (Invitrogen, USA), 按照 TRIzol 试剂的说明书进行细胞总 RNA 的提取。

## 2.5 RNA样品反转录

利用 TaKaRa 的反转录试剂盒 (ExScript™ RT-reagent Kit) 将提取到的细胞总 RNA 反转录, 反转录体系按照反转录试剂盒操作说明进行。

反转录反应条件如下: 混匀离心  $3-5 \text{ s}$ ,  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  反应  $15 \text{ min}$ ,  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  反应  $2 \text{ min}$ , 最后  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育  $2 \text{ min}$ , 得到 cDNA,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  下保存。

## 2.6 实时荧光定量PCR分析

本研究中的实时荧光定量 PCR 采用的是 TaKaRa 的 Real-time quantitative PCR 试剂盒。PCR 反应是由 Corbett Research Rotor-Gene 2000 型实时定量 PCR 仪进行, 并由 Rotor-Gene Real-Time 软件给出分析结果。用实时荧光定量 PCR 方法做基因表达量分析时, 需要对目的基因和管家基因进行定量。管家基因作为参比基因对样品进行归一化处理, 然后再对不同样品之间的目的基因表达量进行比较。本实验选用 glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 即葡萄糖醛酸脱氢酶作为实时定量 PCR 实验的管家基因。用于实时荧光定量 PCR 的引物 (GAPDH, *p53*, *c-fos*) 序列如表 1 所示。

表 1 用于实时荧光定量 PCR 分析的基因名称及其引物序列

基因名称	引物序列		扩增片断长度
	上游 (5' to 3')	下游 (5' to 3')	
GAPDH	TCGTTGTCATACCAGG	CTCTCCAGAACATCATCC	346
<i>p53</i>	TGCCCAACAACACCAGCTC	CCAAGGCCTCATTCAGCTCTC	123
<i>c-fos</i>	CTCGGGCTTCAACGCAGACTA	GGAATGAAGTTGGCACTGGAGAC	177

PCR 反应体系完全参照 TaKaRa 的 Real-time quantitative PCR 试剂盒说明书进行, 混匀离心  $3-5 \text{ s}$ , 将 PCR 反应管放入实时定量 PCR 反应系统中进行反应。扩增反应程序如下: (1)  $95 \text{ }^\circ\text{C}$   $10 \text{ s}$  进行一个反应; (2)  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  反应  $5 \text{ s}$ ,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  反应  $32 \text{ s}$ , 共进行 40 个循环。序列分析软件根据仪器探测的荧光信号给出每个反应管的扩增曲线以及融解曲线。

## 2.7 统计学处理

所有统计由 spss13.0 软件完成。

## 3 结果与分析

本实验采用实时荧光定量 PCR 的方法分别将空白对照样品、石蜡油保护样品、注入  $5 \times 10^{14} \text{ ions/cm}^2$  样品, 注入  $5 \times 10^{14} \text{ ions/cm}^2$  的真空对照样品、注入  $2 \times 10^{15} \text{ ions/cm}^2$  样品、注入  $2 \times 10^{15} \text{ ions/cm}^2$  的真空对照样品进行基因表达量的分析。

为了保证实验的顺利进行, 在进行实时荧光定量 PCR 反应之前, 有目的地验证 cDNA 质量, 即以

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

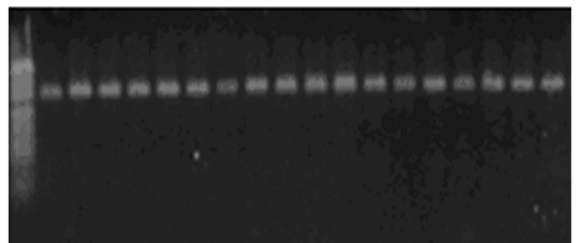


图 1 不同处理后的细胞 cDNA 经 PCR 扩增反应后 (引物均为 GAPDH) 电泳结果

1 DNA mark, 2—4 空白对照样品, 5—7 石蜡油保护样品, 8—10 注入  $5 \times 10^{14} \text{ ions/cm}^2$  样品, 11—13 注入  $5 \times 10^{14} \text{ ions/cm}^2$  的真空对照样品, 14—16 注入  $2 \times 10^{15} \text{ ions/cm}^2$  样品, 17—19 注入  $2 \times 10^{15} \text{ ions/cm}^2$  的真空对照样品。

cDNA 为模板, GAPDH 为引物进行了常规的 PCR 扩增, 反应条件完全同之后的实时荧光定量 PCR,

PCR 后进行琼脂糖电泳, 观察扩增条带。结果如图1所示: 所有泳道的条带均清晰可见(每个处理独立重复3次), 说明RNA提取过程没有问题, 反转录的cDNA合成效果较好, 可以用于实时荧光定量PCR反应。

实时荧光定量PCR反应进行到40个循环后, 仪器软件给出反应的融解曲线和扩增曲线(见图2和图3)。结果显示: 扩增到的样品融解曲线一致性好, 表明引物设计较好, 没有二聚体出现, 即实时定量PCR的结果可信。

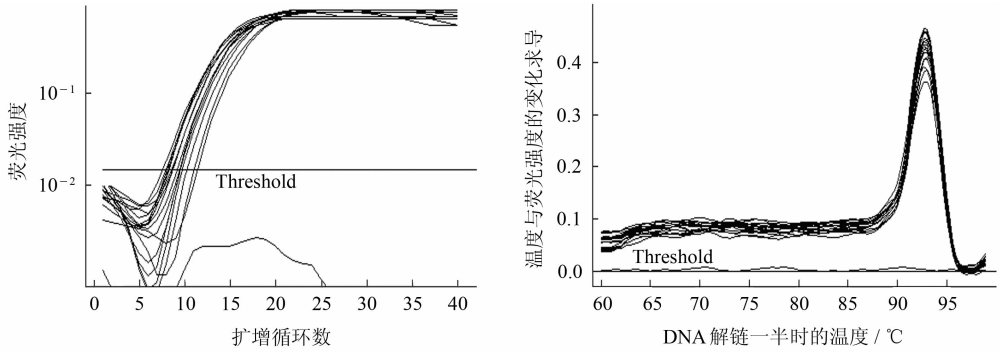


图2 管家基因GAPDH的扩增曲线和融解曲线

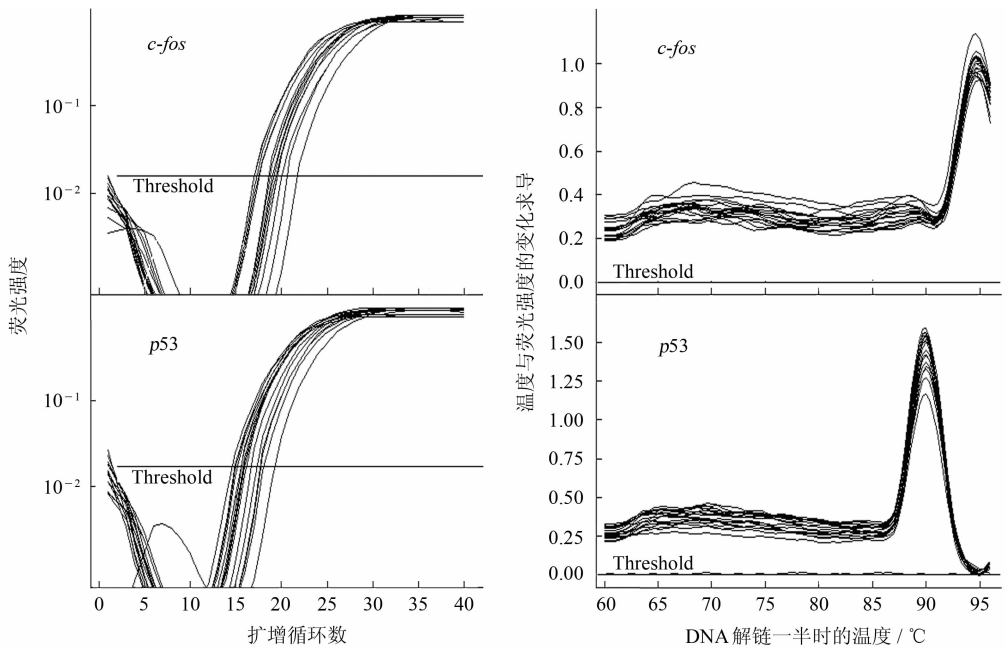


图3 目的基因*c-fos*和*p53*的扩增曲线和融解曲线

根据实时荧光定量PCR反应后仪器软件给出的Ct值, 用严格比较Ct值( $\Delta\Delta Ct$ )<sup>[5]</sup>的方法计算了不同处理前后的基因表达变化, 计算公式为Fold change =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , 其意义是: 实验组目的基因的表达相对于对照组的倍数。此处的 $\Delta\Delta Ct = [Ct_{GI}(\text{未知样品}) - Ct_{GAPDH}(\text{未知样品})] - [Ct_{GI}(\text{对照样品}) - Ct_{GAPDH}(\text{对照样品})]$ 。结果(见图4)表明: *c-fos*基因和*p53*基因表达均与实验处理有一定的关系, 其中真空对细胞基因表达的影响要

多于注入的影响。另外, *c-fos*基因和*p53*基因都在注入 $5 \times 10^{14}$  ions/cm<sup>2</sup>的真空对照样品中表达量急剧增加, 而在注入 $2 \times 10^{15}$  ions/cm<sup>2</sup>样品及其相应的真空对照样品中, 表达量又大幅减少。

单因素方差分析(表2)结果显示: (1) *c-fos*基因在注入 $5 \times 10^{14}$  ions/cm<sup>2</sup>的真空对照样品中, 基因表达增加较多, 即与其他处理结果相比较差异显著。除此之外的各处理样品间, 基因表达差异均不显著。(2) *p53*基因除了在注入 $2 \times 10^{15}$  ions/cm<sup>2</sup>的

样品及真空对照样品间的基因表达量差异不显著

外,其他处理样品间的基因表达结果均差异显著。

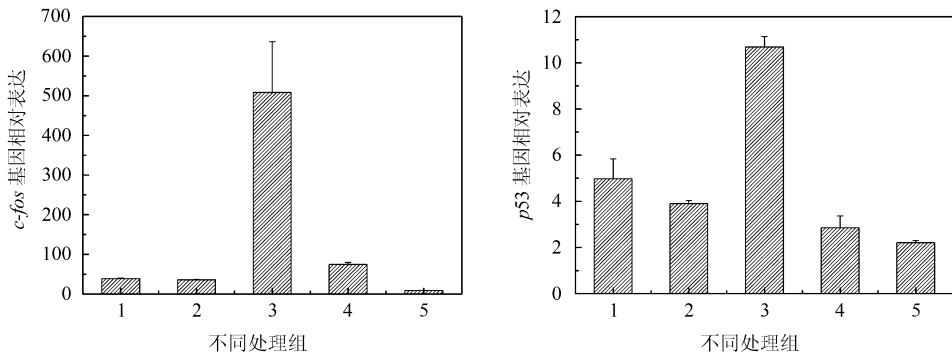


图4 不同处理后 *c-fos*和*p53*的基因表达变化(fold change)

1 石蜡油保护样品, 2 注入 $5 \times 10^{14}$  ions/cm<sup>2</sup>样品, 3 注入 $5 \times 10^{14}$  ions/cm<sup>2</sup>的真空对照样品, 4 注入 $2 \times 10^{15}$  ions/cm<sup>2</sup>样品, 5 注入 $2 \times 10^{15}$  ions/cm<sup>2</sup>的真空对照样品。

表2 不同处理间的基因表达差异显著性分析\*

相互比较的不同样品	Sig. <i>c-fos</i>	Sig. <i>p53</i>
石蜡油保护样品—注入 $5 \times 10^{14}$ ions/cm <sup>2</sup> 样品	0.945	0.022 <sup>a</sup>
石蜡油保护样品—注入 $5 \times 10^{14}$ ions/cm <sup>2</sup> 的真空对照样品	0.000 <sup>b</sup>	0.000 <sup>b</sup>
石蜡油保护样品—注入 $2 \times 10^{15}$ ions/cm <sup>2</sup> 样品	0.462	0.000 <sup>b</sup>
石蜡油保护样品—注入 $2 \times 10^{15}$ ions/cm <sup>2</sup> 的真空对照样品	0.532	0.000 <sup>b</sup>
注入 $5 \times 10^{14}$ ions/cm <sup>2</sup> 样品—注入 $5 \times 10^{14}$ ions/cm <sup>2</sup> 的真空对照样品	0.000 <sup>b</sup>	0.000 <sup>b</sup>
注入 $2 \times 10^{15}$ ions/cm <sup>2</sup> 样品—注入 $2 \times 10^{15}$ ions/cm <sup>2</sup> 的真空对照样品	0.188	0.143
注入 $5 \times 10^{14}$ ions/cm <sup>2</sup> 样品—注入 $2 \times 10^{15}$ ions/cm <sup>2</sup> 样品	0.429	0.027 <sup>a</sup>
注入 $5 \times 10^{14}$ ions/cm <sup>2</sup> 的真空对照样品—注入 $2 \times 10^{15}$ ions/cm <sup>2</sup> 的真空对照样品	0.000 <sup>b</sup>	0.000 <sup>b</sup>

\* a  $P < 0.05$ , b  $P < 0.01$ 。

## 4 讨论

近年来,即刻早基因研究较为热门,认为即刻早基因的表达与细胞凋亡关系十分密切,是细胞凋亡起始信号与细胞执行自杀的中间环节<sup>[6]</sup>。原癌基因*c-fos*属即刻早期应答基因(IEG)之一,其编码蛋白是真核细胞内重要的转录因子,可诱导下游报道基因mRNA的转录和蛋白表达,参与细胞增殖和凋亡调控。其作用原理为:*c-fos*蛋白通过形成碱性亮氨酸拉链与另一转录因子c-Jun蛋白以c-Fos/c-Jun杂合二聚体形式构成活化蛋白-1(AP-1),参与细胞增殖和凋亡动态平衡的调控<sup>[7, 8]</sup>。

在本研究中,实验的真空条件刺激了细胞中的*c-fos*基因,所以在注入 $5 \times 10^{14}$  ions/cm<sup>2</sup>的真空对照样品中,*c-fos*基因的表达量迅速明显上调。然而,在注入 $2 \times 10^{15}$  ions/cm<sup>2</sup>样品及其相应的真空对照样品中,因其作用时间变长,*c-fos*基因不再表

现瞬间表达作用,逐渐恢复正常表达。此外,发现真空对*c-fos*基因表达的影响大于注入(见图4),说明*c-fos*基因的表达变化与真空环境的刺激作用有着密切的关系。

*p53*基因编码的蛋白分野生型和突变型两种。其野生型蛋白与细胞周期的调控、DNA修复、细胞凋亡等重要生物学功能有关,诱导DNA损伤的细胞或损伤不能修复的细胞凋亡,从而保证基因组的稳定性。野生型*p53*基因对*c-fos*基因有抑制转录活性作用。突变的P53蛋白的积聚增强了细胞分裂和增生能力,对*c-fos*基因转录活性抑制作用的减弱<sup>[9]</sup>。因此,在注入 $5 \times 10^{14}$  ions/cm<sup>2</sup>的真空对照样品中,基因*p53*的表达量增加,基因*c-fos*表达量理应降低,但因为低能离子注入中的真空条件,使得*c-fos*基因在真空刺激下主要表现为早应答作用,即表达量增加。

低能离子注入动物细胞的凋亡研究<sup>[4]</sup>显示,细胞的凋亡率随着注入剂量的增大而增加,且离子注

入时所引起的细胞凋亡要多于真空时的情形。在本研究中调查的p53基因,在注入 $5 \times 10^{14}$  ions/cm<sup>2</sup>的真空对照样品中表达量上升,但在注入 $5 \times 10^{14}$  ions/cm<sup>2</sup>样品和注入 $2 \times 10^{15}$  ions/cm<sup>2</sup>样品中表达量较低,说明了低能离子注入的细胞凋亡并非通过p53途径,而是由Fas或Bax等引起。其原因有待于进一步实验证实。

本文中c-fos基因和p53基因有着相同的变化特点,即真空对基因表达变化的影响要超过离子注入的影响,其原因可能是注入的离子与细胞内某些物质发生了反应,当然也有可能是注入的离子破坏了细胞的应急能力,使得注入时的基因表达变化低于真空,其真正的原因还需要进一步的研究来确定。

另外从图4中还发现:c-fos基因和p53基因都在注入 $5 \times 10^{14}$  ions/cm<sup>2</sup>的真空对照样品中表达急剧增加,而在注入 $2 \times 10^{15}$  ions/cm<sup>2</sup>样品及其相应的真空对照样品中,基因表达量大幅减少。统计分析中也可以发现,该处理下的基因表达变化同其他处理时的表达结果比较均差异显著。上述结果表明,细胞在真空靶室中的时间很重要,注入 $5 \times 10^{14}$  ions/cm<sup>2</sup>的真空对照样品内部基因可能发生着一系列重要的变化。根据报道在此真空处理下细胞的存活率仍然为80%以上<sup>[3]</sup>,所以在今后的研究中应围绕该剂量点展开研究,以确定离子注入中真空环境对生物样品的影响,为进一步证明低能离子注入生物样品的作用机理奠定基础。

## 参考文献(References):

[1] Feng Huiyun, Yu Lixiang, Liu Xinghai, *et al.* Journal of the

Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, 2002, **19**: 372(in Chinese).

(冯慧云,余立祥,刘星海等.中国科学院研究生院学报, 2002, **19**: 372.)

[2] Right Understanding Mineral Oil. Country Resource of Shandong, 2005, **21**: 47(in Chinese).

(正确认识石蜡油. 山东国土资源, 2005, **21**: 47.)

[3] Zhang Fengqiu, Ya Huiyuan, Su Mingjie, *et al.* Acta Laser Biology Sinica, 2006, **15**: 594(in Chinese).

(张凤秋,押辉远,苏明杰等.激光生物学报, 2006, **15**: 594.)

[4] Zhang Fengqiu, Ya Huiyuan, Li Jingyuan, *et al.* Nuclear Science and Techniques, 2006, **17**: 222.

[5] Charlotte Beltramo, Nicolas Desroche, Raphaëlle Tourdot-Maréchal, *et al.* Research in Microbiology, 2006, **157**: 267.

[6] Hang Chunhua, Shi Jixin, Wu Wei. Parenteral & Enteral Nutrition, 2006, **13**: 281(in Chinese).

(杭春华,史继新,吴伟等.肠外与肠内健康, 2006, **13**: 281.)

[7] Zhao Wenjuan, Yu Shizhu, Pu Peiyu, *et al.* Chinese Journal of Contemporary Neurology and Neurosurgery, 2007, **7**: 141(in Chinese).

(赵文娟,于士柱,浦佩云等.中国现代神经疾病杂志, 2007, **7**: 141.)

[8] Zhou Cijie, Bi Guorong. Progress of Anatomical Sciences, 2007, **13**: 166(in Chinese).

(周慈杰,毕国荣.解剖科学进展, 2007, **13**: 166.)

[9] Wu Ligao, He Jie, Wang Chaofu, *et al.* Journal of Bengbu Medical College, 2006, **32**: 572(in Chinese).

(吴礼高,何杰,王朝夫等.蚌埠医学院学报, 2006, **32**: 572.)

# Effect of Vacuum and Low-energy Ion Implantation on p53 and c-fos mRNA Expression in HeLa Cells<sup>\*</sup>

ZHANG Feng-qiu<sup>1)</sup>, FANG Hua-sheng, YA Hui-yuan, QIN Guang-yong

(School of Physical Science & Technology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

**Abstract:** The relationship between gene expression and low-energy ion implantation has been studied.

\* Received date: 7 Jan. 2008; Revised date: 18 Apr. 2008

\* Foundation item: National Key Technologies R&D Program of China During the Tenth Five-year Plan Period(2001BA302B-03)

1) E-mail: zhangfengqiu@zzu.edu.cn

Because vacuum is prerequisite in low-energy ion implantation, mineral oil was used to protect cells from water evaporating. In this study, HeLa cells were implanted by low-energy ions (30 keV N<sup>+</sup>) at different doses, and *p53* gene and *c-fos* gene were studied with real-time quantitative PCR. The result shows that gene expression changed obviously when cells were acted as vacuum control to the sample implanted  $5 \times 10^{14}$  ions/cm<sup>2</sup>.

**Key words:** vacuum; low-energy ion; HeLa cell; gene expression; real-time quantitative PCR