

会减少^[12]。caspase - 3、caspase - 12 蛋白是细胞凋亡途径中诱发表达的两个重要蛋白质分子。ADR 本身可以激活 FAS 以及 FASL 的蛋白表达,从而进一步的激活 caspase - 8 最终激活 caspase 的级联反应使得细胞开始凋亡。

当归多种主要成分如挥发油、多糖、有机酸类化合物、氨基酸具有抗氧化损伤、阻止细胞凋亡的作用。本实验结果显示,与正常对照组比较,ADR 损伤组细胞存活率明显下降,培养液中 LDH 浓度明显上升,钙离子 - ATP 酶活性明显降低,caspase - 3、caspase - 12 蛋白表达上调。与 ADR 损伤组比较,药物干预组细胞存活率明显上升,培养液中 LDH 浓度明显下降,钙离子 - ATP 酶活性明显升高,caspase - 3、caspase - 12 蛋白表达下调。实验结果提示当归超滤物具有拮抗 ADR 致心肌细胞损伤的作用,其机制与其增强细胞 ATP 酶活性、降低细胞内 LDH 释放、抑制凋亡因子释放有关,为其防治 ADR 致心肌损伤应用提供了一定依据。本实验结果是益气活血中药在化疗中具有减毒增敏效应的有利佐证。

参考文献

- 1 刘颖. 浅议当归的化学成分与临床药理作用[J]. 中国医药指南, 2010,8(27):51-52
- 2 倪竹南,吕圭源,楼招欢. 当归挥发油化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国中医药信息杂志,2007,14(7):93-94

- 3 仇平,张端莲. 当归注射液对大鼠心肌缺血再灌注损伤后 FAK 表达的研究[J]. 基础医学研究,2010,23(1):28-30
- 4 Mussi SV, Silva RC, Oliveira MC, *et al.* New approach to improve encapsulation and antitumor activity of doxorubicin loaded in solid lipid nanoparticles [J]. Eur J Pharm, 2013,48(1):282-190
- 5 王桂敏,翟宏颖. 菟丝子黄酮对心肌缺血再灌注损伤大鼠 Bcl-2、Caspase-3 表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2012,32(2):343-345
- 6 张三典. 阿霉素与 X 射线对体外培养乳鼠心肌细胞损伤的初步实验研究[D]. 苏州:苏州大学,2005
- 7 刘微. 阿霉素心脏毒性中心肌细胞凋亡发生机制及抗凋亡的研究进展[J]. 中国医学文摘:儿科学,2007,26(3):193
- 8 谢玲,杨凌红,李晓惠. 当归药理作用研究进展[J]. 中医药研究,2000,16(6):56-58
- 9 杨静薇,欧阳静萍,廖维靖,等. 当归对大鼠局灶性脑缺血损伤保护作用的研究[J]. 中国病理生理杂志,2000,10:36-38
- 10 Lei X, Chen Y, Du G, *et al.* Gossypol induces Bax/Bak-independent activation of apoptosis and cytochrome c release via a conformational change in Bcl-2 [J]. FASEB J, 2006, 20(12):2147-2149
- 11 Hu X, Jiang H, Ma F, *et al.* Similarities between ischemic preconditioning and postconditioning in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Int J Cardiol, 2010,144(1):135-136
- 12 Kang YJ, Zhou ZX, Wang GW, *et al.* Suppression by metallothionein of doxorubicin induced cardiomyocyte apoptosis through inhibition of p38 mitogen activated protein kinases [J]. J Biol Chem, 2000, 275:13690-13698

(收稿日期:2013-11-18)

(修回日期:2013-12-25)

Mus81 和 GEN1 基因在肺癌组织中的表达及其临床意义

喻光懋 吴云路 钱颖 董学君

摘要 **目的** 研究肺癌组织中 Mus81 及 GEN1 的表达及其临床意义。**方法** 采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和 Western blot 检测 30 例肺癌组织及其相应癌旁组织中 Mus81 及 GEN1 mRNA 和蛋白的表达情况,分析其临床意义。**结果** 30 例肺癌组织中 Mus81 mRNA 和蛋白表达水平低于相应癌旁组织,差异具有统计学意义($t = -3.529, P < 0.05; t = -4.273, P < 0.05$);30 例肺癌组织中 GEN1 mRNA 和蛋白表达水平同癌旁相比无统计学差异($t = -2.006, P > 0.05; t = 0.957, P > 0.05$)。30 例肺癌组织中 Mus81 表达水平和 GEN1 表达水平无明显相关性($P > 0.05$)。**结论** 肺癌组织中 Mus81 表达低于癌旁组织,提示 Mus81 表达下调可能和肺癌的发生相关;GEN1 在肺癌组织中的表达水平同癌旁相比无统计学差异,提示 GEN1 在肿瘤的发生、发展过程中可能不起主要作用;肺癌组织中 Mus81 的表达水平和 GEN1 的表达水平无明显相关性。

基金项目:浙江省市共建重点学科(GJSX-010-003);浙江省医药卫生平台基金资助项目(2011ZDA025);浙江省医药卫生平台重点资助计划(2013ZDA024);绍兴市科技计划重点项目(2011A23009)

作者单位:312000 浙江省绍兴市人民医院/浙江大学绍兴医院(喻光懋、吴云路、钱颖、董学君);325035 温州医科大学检验医学院、生命科学学院(吴云路、钱颖)

通讯作者:董学君,电子信箱:dxj9666@163.com

关键词 肺癌 Mus81 GEN1 反转录-聚合酶链反应 Western blot

[中图分类号] R393 [文献标识码] A

Expression of Mus81 and GEN1 in Lung Cancer Tissues and Their Clinical Significances. Yu Guangmao, Wu Yunlu, Qian Ying, et al. Shaoxing People's Hospital, Shaoxing Hospital of Zhejiang University, Zhejiang 312000, China

Abstract Objective To explore the expression and clinical significances of Mus81 and GEN1 in lung cancer tissues. **Methods** The expression levels of Mus81 and GEN1 mRNA and protein in 30 human lung cancer tissues and paired paracancerous tissues were detected by RT-PCR and Western blot. **Results** The expression levels of Mus81 mRNA and protein in lung cancer tissues were significantly lower than those in paracancerous tissues ($t = -3.529, P < 0.05; t = -4.273, P < 0.05$). There was no significant difference in the expression levels of GEN1 mRNA and protein between lung cancer tissues and paired paracancerous tissues ($t = -2.006, P > 0.05; t = 0.957, P > 0.05$). There was no significant correlation between the expression levels of Mus81 and GEN1. **Conclusion** The Mus81 expression levels were decreased significantly in lung cancer tissues, which indicated that the downregulation of Mus81 may be related to the occurrence of lung cancer. Meanwhile, detecting the expression levels of Mus81 contributed to the diagnosis of lung cancer. There was no significant difference in the expression levels of GEN1 mRNA and protein between lung cancer tissues and paired paracancerous tissues, which indicated that GEN1 may not play a major role in tumor occurrence and development. There was no significant correlation between the expression levels of Mus81 and GEN1.

Key words Lung cancer; Mus81; GEN1; RT-PCR; Western blot

肺癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,发生率逐年增加,其疗效一般均较差,除手术难以清除外,术后化疗耐药是重要原因。肿瘤化疗耐药尚无理想的对策,其重要原因在于耐药机制及重要分子不甚明了,因此是当前研究的热点之一。对于通过损伤 DNA 来杀死肿瘤细胞的药物,其耐药性与 DNA 损伤修复相关分子及其表达有关,并得到普遍认同。Mus81 和 GEN1 是近年被发现的与 DNA 修复相关的新基因。李婵媛等^[1]报道, Mus81 在喉癌中表达下调,并认为 Mus81 下调与喉癌发生具有显著相关性。本研究组以往对乳腺癌的研究结果表明,乳腺癌患者病灶组织 Mus81 表达明显低于相应的癌旁组织,有研究发现 Mus81 表达异常与耐药性相关^[2]。Turnbull 等^[3]报道, GEN1 基因在乳腺癌病灶组织和相应癌旁组织表达无显著差异。而 Kuligina 等^[4]认为, GEN1 突变是乳腺癌易感的隐性标志。

由此可见, Mus81 和 GEN1 基因在部分肿瘤中表达有特异性改变,并显示其改变与化疗耐药相关,但肺癌中的相关研究报道较少。本研究目的是了解肺癌组织中, Mus81 和 GEN1 是否与其他肿瘤一样有表达上的改变,并探讨其对肺癌诊断和治疗的潜在临床价值及二者表达是否存在相关性。

材料与方法

1. 材料:(1)临床资料:收集肺癌患者手术标本 30 例(包括病灶组织和相应的癌旁组织)。所有标本均来源于笔者医院心胸外科,肺癌患者年龄 41~80 岁,平均年龄 64 岁。患者术前均未经放化疗,病理诊断均经两位病理医师确诊。(2)主

要仪器:NANO DROP2000 分光光度计购自美国 Thermo 公司, Anthos 2010 酶标仪购自英国 Anthos 公司,琼脂糖电泳仪购自上海复日科技公司,凝胶电泳成像系统购自美国 Gibco 公司,定性 PCR 仪、Western blot 电泳仪电源、垂直电泳仪、转移电泳槽均购自美国 Bio-Rad 公司。(3)主要试剂:E. Z. N. A.® Total DNA/RNA/Protein Kit 购自美国 Omega 公司,Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自北京 Solarbio 公司,cDNA 第一链合成试剂盒、PCR 试剂盒均购自美国 Biomiga 公司, β -actin、Mus81、GEN1 上下游引物均委托上海生工生物工程股份有限公司合成, β -actin 鼠抗人一抗、Mus81 鼠抗人一抗、GEN1 兔抗人一抗、HRP 兔抗鼠二抗、HRP 羊抗兔二抗均购自英国 Abcam 公司,ECL 化学发光 A、B 液购自上海 Beyotime 公司。

2. 方法:(1)标本处理:标本用装有一次性无菌袋的 0℃ 保温瓶收集,收集后 20min 内用生理盐水冲洗、分装,并立刻置于液氮中速冻,之后迅速转存于 -80℃ 冰箱中保存备用。(2)Mus81 和 GEN1 mRNA 达表的检测:1)组织总 RNA 的抽提:取大约 500mg 新鲜组织加入液氮充分研磨后,按说明书加入 E. Z. N. A.® Total DNA/RNA/Protein Kit (Omega),提取组织总 RNA。提取出的总 RNA 用 Thermo NANO DROP2000 分光光度计测定浓度及纯度,OD260/OD280 在 1.8~2.0 之间为最佳。2)RT-PCR:按照 cDNA 第一链合成试剂盒 (Biomiga) 说明书,将 5 μ g 总 RNA 反转录成 cDNA,之后进行 PCR 反应。所用引物序列如下:Mus81 上游引物:5'-TGTGGACATTG-GCGAGAC-3',下游引物:5'-GCTGAGTTGTGGACGGA-3' (产物长度 319bp);GEN1 上游引物^[5]:5'-CCACATGACTAT-GAATACTGCTGTCCTT-3',下游引物:5'-TGGAATCCCT-CACAACAGCAAGC-3' (产物长度 116bp); β -actin 上游引物:5'-ACCCACACTGTGCCCATCTAC-3',下游引物:5'-TCGGTGAGGATCTTCATGAGGTA-3' (产物长度 108bp)。

PCR 反应体系 20 μ l, 包括 Taq MasterMix 10 μ l、上下游引物各 1 μ l、cDNA 1 μ l、去离子水 7 μ l。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 90s, 然后 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5min。取 5 μ l PCR 终产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。使用 ChemiDoc™ XRS 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司) 进行灰度扫描、Quantity One - 4.6.2 分析结果。以同一标本 Mus81 以及 GEN1 基因 mRNA 条带与内参基因 β -actin mRNA 条带的光密度比值作为该基因的相对表达量。(3) Mus81 和 GEN1 基因蛋白表达的检测: 取新鲜组织约 500mg 按照说明书加入 E. Z. N. A.® Total DNA/RNA/Protein Kit (Omega), 提取组织总蛋白。使用 Anthos 2010 酶标仪结合 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (Solarbio) 测定蛋白浓度, 根据蛋白浓度调整每孔蛋白上样量, 使每孔总蛋白量保持一致。100V 恒压, SDS-PAGE 电泳 2h; 300mA 恒流, 转膜 1h。转膜完成后用丽春红染液 (Solarbio) 染色 5min, 蒸馏水洗去残留染液。1 $\times$ TBST 洗膜 5 分/次 $\times$ 3 次后, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2h, 1 $\times$ TBST 洗膜 15 分/次 $\times$ 3 次, 然后分别加入 β -actin 鼠抗人抗体 (1: 3000, Abcam)、Mus81 鼠抗人抗体 (1: 1000, Abcam)、GEN1 羊抗兔抗体 (1: 75, Abcam), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。弃一抗, 1 $\times$ TBST 洗膜 15 分/次 $\times$ 3 次。 β -actin 和 Mus81 组加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗鼠二抗 (1: 10000, Abcam), GEN1 组加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔二抗 (1: 20000, Abcam), 室温孵育 1h。弃二抗, 1 $\times$ TBST 洗膜 15 分/次 $\times$ 3 次。最后滴加 ECL 化学发光 A、B 液 (Beyotime), 曝光、显影、定影。使用 ChemiDoc™ XRS 凝胶成像系统进行灰度扫描、Quantity One - 4.6.2 分析结果, 以同一标本 Mus81 以及 GEN1 蛋白条带与 β -actin 蛋白条带的光密度比值作为该蛋白的相对表达量。

3. 统计学方法: 采用统计软件 SPSS 17.0 分析数据, 计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。 t 检验比较癌组织、癌旁组织 Mus81 及 GEN1 表达量的差异。Spearman 相关分析检测 Mus81 和 GEN1 表达水平的相关性。所有检验均采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 肺癌病灶组织及癌旁组织 Mus81 mRNA 和蛋白的表达: 在肺癌组织中, Mus81 mRNA 的平均相对表达量 (0.365 ± 0.098) 低于相应癌旁组织 (0.455 ± 0.123), 差异有统计学意义 ($t = -3.529, P < 0.05$) (图 1、图 3)。Mus81 蛋白平均相对表达量 (1.046 ± 0.121) 低于相应癌旁组织 (1.341 ± 0.190), 差异有统计学意义 ($t = -4.273, P < 0.05$, 图 2、图 4)。

2. 肺癌病灶组织和癌旁组织 GEN1 mRNA 和蛋白的表达: 肺癌组织中, GEN1 mRNA 的平均相对表达量 (0.420 ± 0.111) 与相应癌旁组织 (0.455 ± 0.123) 相比, 差异无统计学意义 ($t = -2.006, P > 0.05$, 图 1、图 3)。GEN1 蛋白平均相对表达量 (0.769 ± 0.188) 同相

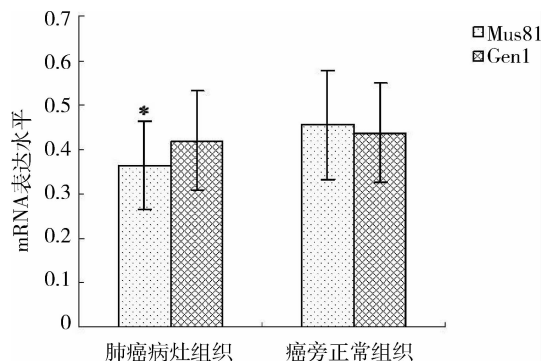


图 1 肺癌组织和癌旁组织中 Mus81 以及 GEN1 mRNA 表达水平

与癌旁正常组织比较, * $P < 0.05$

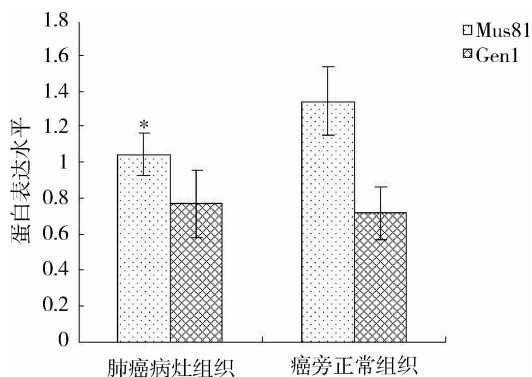


图 2 肺癌组织和癌旁组织中 Mus81 以及 GEN1 蛋白表达水平

与癌旁正常组织比较, * $P < 0.05$

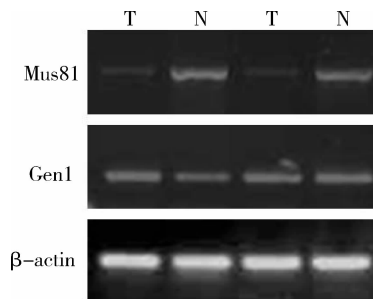


图 3 肺癌组织和癌旁组织中 Mus81 以及 GEN1 PCR 电泳结果

T. 肺癌组织; N. 癌旁组织

应癌旁组织 (0.719 ± 0.148) 相比, 差异无统计学意义 ($t = 0.957, P > 0.05$, 图 2、图 4)。

3. 肺癌 Mus81 和 GEN1 表达的相关性: Spearman 相关分析得出, 30 例肺癌组织中, Mus81 表达水平和 GEN1 表达水平无直线相关关系 ($P > 0.05$), 但在 Mus81 高表达的 6 例肺癌组织中, Mus81 的表达水平和 GEN1 的表达水平呈正相关。

讨 论

现有的研究认为, Mus81 是一种抑癌基因, 其编

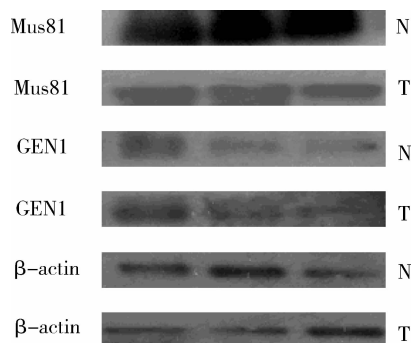


图 4 肺癌组织和癌旁组织中 Mus81 以及 GEN1 Western blot 结果

T. 肺癌组织; N. 癌旁组织

码的蛋白属于 XPF 核酸内切酶家族,在 DNA 修复及分解霍利迪连接体上具有重要作用^[6]。本组 30 例肺癌病灶组织及癌旁组织的对照研究结果, Mus81 mRNA 表达, 肺癌病灶组织显著低于癌旁组织 ($P < 0.05$), Mus81 蛋白表达的结果也有统计学差异 ($P < 0.05$), 表明 Mus81 可能与肺癌的发生相关。Mus81 具有 DNA 修复功能, 因此推测可能的机制为 Mus81 表达下调降低了对正常细胞损伤 DNA 的修复, 细胞不能及时识别处理受损 DNA, 导致细胞癌变, 这与已明确 DNA 损伤可致癌的理论相符。喉癌、乳腺癌、肺癌中均见到类似结果, 提示 Mus81 表达下调导致肿瘤发生可能是不同肿瘤的共同现象, 但具体的机制尚不明确, 因此, 进一步了解 Mus81 在细胞中的作用机制, 对了解肿瘤的发生过程具有十分重要意义。

近年研究发现, GEN1 作为 XPG 家族的新成员, 具有分解霍利迪连接体, 进而保证 DNA 顺利修复的功能, 并且 GEN1 和 Mus81 存在着密切关系, 两者共同影响细胞中霍利迪连接体的分解及 DNA 修复^[7,8]。Wood 等^[9]运用“基因组地形”技术, 发现 2 例乳腺癌患者的 GEN1 基因存在突变, 并认为 GEN1 可能是一种新的抑癌基因。Turnbull 等^[3]通过分析乳腺癌患者以及对照组 GEN1 的表达认为, GEN1 的表达情况和乳腺癌的发生没有明显关系。与此不同, Kuligina 等^[4]认为, GEN1 在单侧乳腺癌患者的体内表达较对照组高 ($P = 0.031$), 但双侧乳腺癌患者同对照组比差异无统计学意义。尚未发现 GEN1 在肺癌中表达情况的相关报道。鉴于 GEN1 和 Mus81 存在着密切关系, 为此本研究进行这二基因的联合分析, 结果显示, GEN1 mRNA 和蛋白的表达水平, 在肺癌和相应的癌旁组织中无统计学差异, 这一结论和 Turnbull 等^[3]的报道相一致, 提示在肺癌的发生、发

展过程中, GEN1 的作用可能并不是主要的, 而之前也有学者认为 GEN1 作为 Mus81 的替代基因而存在^[10]。本研究 30 例肺癌组织中, Mus81 和 GEN1 的表达没有明显的相关性, 可能的原因是 Mus81 和 GEN1 之间, 尚有其他中间相关因子发挥作用。但是在 Mus81 高表达的 6 例肺癌组织中, Mus81 的表达水平和 GEN1 的表达水平呈正相关, 这一结论或许可以从侧面证明 Mus81 和 GEN1 共同影响着细胞 DNA 的修复^[8]。

综上所述, 肺癌组织中 Mus81 的表达低于癌旁组织, 提示 Mus81 的表达下调可能和肺癌的发生有关; 结合之前相关报道, 提示 Mus81 表达下调可能是不同肿瘤普遍存在的现象; GEN1 在肺癌组织中的表达水平同癌旁相比无统计学差异, 这提示 GEN1 在肿瘤的发生、发展过程中并未起主要作用。Mus81 表达水平和 GEN1 表达水平无明显相关性。本研究观察到 Mus81 异常表达与乳腺癌化疗耐药相关, 但在肺癌中的相关性有待于进一步验证。

参考文献

- 1 李婵媛, 王淑云, 袁海明, 等. Mus81 基因在喉癌中的突变和表达 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2008, 25(5): 560-565
- 2 钱颖, 张帆, 倪晓妍, 等. Mus81 基因在乳腺癌中的表达及其意义 [J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(6): 1313
- 3 Turnbull C, Hines S, Renwick A, et al. Mutation and association analysis of GEN1 in breast cancer susceptibility [J]. Breast Cancer Res Treat, 2010, 124(1): 283-288
- 4 Kuligina ES, Sokolenko AP, Mitiushkina NV, et al. Value of bilateral breast cancer for identification of rare recessive at-risk alleles: evidence for the role of homozygous GEN1 c. 2515_2519delAAGTT mutation [J]. Fam Cancer, 2013, 12(1): 129-132
- 5 Wechsler T, Newman S, West SC. Aberrant chromosome morphology in human cells defective for Holliday junction resolution [J]. Nature, 2011, 471(7340): 642-646
- 6 Agmon N, Yovel M, Harari Y, et al. The role of Holliday junction resolvases in the repair of spontaneous and induced DNA damage [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(16): 7009-7019
- 7 Ishikawa G, Kanai Y, Takata K, et al. DmGEN, a novel RAD2 family endo-exonuclease from Drosophila melanogaster [J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(21): 6251-6259
- 8 Rass U, Compton SA, Matos J, et al. Mechanism of Holliday junction resolution by the human GEN1 protein [J]. Genes Dev, 2010, 24(14): 1559-1569
- 9 Wood LD, Parsons DW, Jones S. The Genomic Landscapes of Human Breast and Colorectal Cancers [J]. Science, 2007, 318(5853): 1108-1113
- 10 Ho CK, Mazón G, Lam AF, et al. Mus81 and Yen1 promote reciprocal exchange during mitotic recombination to maintain genome integrity in budding yeast [J]. Mol Cell, 2010, 40(6): 988-1000

(收稿日期: 2013-11-15)

(修回日期: 2013-12-06)