

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.03.003

## 沉默 *HerpUD1* 基因表达提高人肝 L-02 细胞对放射处理的敏感性

张乃宁<sup>1</sup>, 杨彦勇<sup>2</sup>, 马莉<sup>3</sup>, 张倩<sup>1</sup>, 宋立华<sup>1,4</sup> (1. 上海交通大学 农业与生物学院 食品科学与工程系, 上海 200240; 2. 第二军医大学 海医系 防原医学教研室, 上海 200433; 3. 第二军医大学 长征医院 营养科, 上海 200025; 4. 上海交通大学 陆伯勋食品安全研究中心, 上海 200240)

**[摘要]** **目的:** 利用 RNA 干扰技术沉默人肝 L-02 细胞内可诱导的同型半胱氨酸内质网应激泛素样结构域 1 (homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1, *HerpUD1*) 基因表达, 探讨其对入肝 L-02 细胞的辐射增敏作用。 **方法:** 根据 *HerpUD1* 基因序列设计 shRNA 片段, 构建靶向 *HerpUD1* 基因的 shRNA 表达载体, 稳定转染 L-02 细胞, 采用 real-time PCR 和 Western blotting 检测转染后细胞中 *HerpUD1* mRNA 及蛋白的表达。以 8 Gy X 射线照射转染后细胞, Hoechst 荧光染色观察细胞的凋亡情况。 **结果:** 成功构建靶向 *HerpUD1* 的真核表达干扰载体, 并建立稳定转染 sh*HerpUD1* 的 L-02 细胞株。在稳定转染的 L-02 细胞中, sh*HerpUD1*-1420 干扰片段干扰效果最好, 与 pGPU6-NC 组 (阴性对照组) 相比, sh*HerpUD1*-1420 组 *HerpUD1* mRNA 表达显著下降 [ (0.15 ± 0.05) vs (1.00 ± 0.08),  $P < 0.05$  ], 其蛋白水平的表达也显著降低 [ (0.19 ± 0.01) vs (1.62 ± 0.08),  $P < 0.01$  ]。转染后细胞经 8 Gy X 射线照射后 24 h, L-02-sh*HerpUD1*-1420 组细胞凋亡率显著高于 L-02-NC 组 (阴性对照组) [ (10.23 ± 3.37)% vs (6.89 ± 1.49)% ,  $P < 0.01$  ], 而 L-02-NC 组与 L-02-Neo 组相比则无显著差异 ( $P > 0.05$ )。 **结论:** *HerpUD1* 基因表达沉默显著增加 X 射线辐射引起的 L-02 细胞凋亡, 具有辐射增敏作用。

**[关键词]** RNA 干扰; *HerpUD1* 基因; 内质网膜蛋白; 人肝 L-02 细胞; 放射处理; 增敏作用

**[中图分类号]** R730.54; R730.55

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2013)03-0272-06

## Silencing *HerpUD1* gene expression promotes the sensitivity of human liver L-02 cells to radiation treatment

Zhang Naining<sup>1</sup>, Yang Yanyong<sup>2</sup>, Ma Li<sup>3</sup>, Zhang Qing<sup>1</sup>, Song Lihua<sup>1,4</sup> (1. Department of Food Science and Technology, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 2. Department of Radiation Medicine, Faculty of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200240, China; 3. Department of Nutrition, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200025, China; 4. Bor S. Luh Food Safety Research Center, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the radiosensitization effect of homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1 (*HerpUD1*) on human liver L-02 cells through silencing the expression of *HerpUD1* gene by RNA interference technology. **Methods:** Based on the *HerpUD1* gene sequence, shRNA expression vector interfering *HerpUD1* gene was constructed and L-02 cells were stably transfected. The expressions of *HerpUD1* mRNA and protein in cells after transfection were detected by real-time PCR and Western blotting. The transfected cells were radiated by 8 Gy X ray and the cell apoptosis was analyzed by Hoechst fluorescence assay. **Results:** Eukaryotic expression interference vector targeting *HerpUD1* gene was successfully constructed and L-02 cell line stably transfected with sh*HerpUD1* was established. The sh*HerpUD1*-1420 interference fragment had the highest interference efficiency in stably transfected L-02 cells. Compared with pGPU6-NC (empty vector) group, the expression level of *HerpUD1* mRNA in sh*HerpUD1*-1420 group was significantly decreased [ (0.15 ± 0.05) vs [ 1.00 ± 0.08 ],  $P < 0.05$  ], and the expres-

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (No. 30972460); 上海市自然科学基金资助项目 (No. 09ZR1415400)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30972460), and the Natural Science Foundation of Shanghai (No. 09ZR1415400)

**[作者简介]** 张乃宁 (1987 - ), 女, 山东省莱阳市人, 硕士生, 主要从事食品营养方面的研究。E-mail: 410848136@qq.com

**[通信作者]** 宋立华 (Song Lihua, corresponding author), E-mail: yslihua@hotmail.com

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130605.0923.004.html>

sion level of *HerpUD1* protein was also significantly reduced ( $[0.19 \pm 0.01]$  vs  $[1.62 \pm 0.08]$ ,  $P < 0.01$ ). The apoptotic rate was higher in L-02-sh*HerpUD1*-1420 group than that in L-02-NC group (negative control group) 24 h after 8 Gy X ray irradiation ( $[10.23 \pm 3.37]\%$  vs  $[6.89 \pm 1.49]\%$ ,  $P < 0.05$ ), while there was no significant difference between L-02-NC and L-02-Neo group. **Conclusion:** Silencing the expression of *HerpUD1* gene significantly increases the X ray radiation-induced apoptosis of L-02 cells, therefore playing an role in radiosensitization.

**[ Key words ]** RNA interference; *HerpUD1* gene; endoplasm omentum protein; human liver L-02 cell; radiation treatment; sensitization effect

[ Chin J Cancer Biother, 2013, 20(3): 272-277 ]

放疗是癌症患者的重要治疗手段之一,但放疗在杀伤肿瘤细胞的同时,也对肿瘤组织周围邻近的正常组织细胞也会造成一定的损伤,如电离辐射可引起肝功能及肝酶学的一系列变化,从而引起肝脏细胞代谢的改变,并产生放射性肝炎甚至肝纤维化<sup>[1]</sup>。因此,如何减轻放疗对正常组织细胞的辐射损伤一直是临床上亟待解决的问题之一。

选择合适的辐射增敏剂与放疗协同作用,不仅能够提高放疗对肿瘤细胞的杀伤效应,而且可以大大降低放疗的辐射剂量,从而减轻放疗对正常组织细胞的辐射损伤。目前常用的辐射增敏剂有高电子亲和力和类化合物如硝基咪唑及其衍生物等。近年来肿瘤放疗联合基因治疗逐渐成为肿瘤治疗领域的研究热点,人们利用基因转染的方法抑制辐射诱发的 DNA 损伤修复,可大大增强辐射对肿瘤的杀伤能力。

本课题组前期的体内外实验<sup>[2-3]</sup>均发现,人肝 L-02 细胞内可诱导的同型半胱氨酸内质网应激泛素样结构域 1 (homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1, *HerpUD1*) 基因在射线照射后,其 mRNA 和蛋白水平在肝内的表达明显升高。另有研究<sup>[4-6]</sup>表明,内质网应激能够降低辐射引起的细胞损伤和凋亡。因此,干扰 *HerpUD1* 的表达理论上应该能够降低辐射诱导的内质网应激,具有辐射增敏作用。本实验构建了靶向 *HerpUD1* 的 shRNA 表达载体,转染人肝 L-02 细胞,探讨 *HerpUD1* 在辐射增敏中的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞株及主要试剂

L-02 细胞株(人正常永生生化肝细胞)购自中科院细胞库。携带编码 GFP 的 shRNA 表达载体由吉玛制药技术有限公司合成。DMEM 培养基、胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶均购自上海索宝生物科技有限公司,G418 购自美国 Sigma 公司,转染试剂 Lipofectamine™ 2000 购自美国 Invitrogen 公司,细胞裂解液、PMSF、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液等均购自碧

云天生物技术研究所。Hoechst 33342 试剂盒购自南京凯基生物公司,鼠抗人 *HerpUD1* 单抗、鼠抗人  $\beta$ -actin 多抗购自台湾 Abnova 公司,HRP 标记山羊抗鼠 IgG 购自美国 Bioworld 公司,SYBR Premix EX Taq 荧光定量试剂盒购自大连宝生物工程公司。

### 1.2 靶向 *HerpUD1* 基因的 shRNA 表达载体的构建

根据 shRNA 的设计原则及质粒载体 pGPU6-GFP-Neo 的特点,使用 BLAST 将选定的序列和相应的人基因组数据库进行比较,排除和其他编码序列 EST 同源的序列,最后选择出 3 条片段作为 *HerpUD1* 基因干扰片段,并设计一条乱序非编码片段作为阴性对照,*HerpUD1* 干扰片段分别为:①位于 592 ~ 613 bp 的 GCTGTTGTTGGATCACCAATG;②位于 1 100 ~ 1 121 bp 的 GCTCCTCAAGTGTTGTTAAT;③位于 1 420 ~ 1 441 bp 的 GGAAGGCACTGATCCTGAAAC;阴性对照片段为 GTTCTCCGAACGTGT-CACGT。得到的重组质粒分别命名为 pGPU6-sh*HerpUD1*-592、pGPU6-sh*HerpUD1*-1100、pGPU6-sh*HerpUD1*-1420,和 pGPU6-NC 同时在载体上设计增强型 *GFP* 作为报告基因。经公司测序,显示载体构建正确。

### 1.3 pGPU6-sh*HerpUD1* 质粒转染人肝 L-02 细胞

将 L-02 细胞接种于 6 孔板中,分别加入质量浓度为 0、100、200、400、600、800 和 1 000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 G418 DMEM 培养基,每天观察细胞生长状况,并每 3 d 更换一次含各质量浓度 G418 的培养基,以 10 d 时细胞全部死亡的 G418 最低质量浓度为使用浓度。经观察,对于 L-02 细胞,G418 的使用质量浓度为 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

稳定转染及荧光显微镜观察:将 L-02 细胞接种于 6 孔板中,细胞融合度至 80% ~ 90% 时转染。分为 3 组:pGPU6-NC 阴性对照组(L-02-NC),pGPU6-sh*HerpUD1* 质粒转染组(L-02-sh*HerpUD1*-592, L-02-sh*HerpUD1*-1100, L-02-sh*HerpUD1*-1420),空载体对照组(L-02-Neo)。转染前 1 ~ 2 h 给细胞换液,转染按 Lipofectamine™ 2000 操作说明书进行,分别使用

250  $\mu$ l 无血清 DMEM 培养基稀释 shRNA 重组质粒和脂质体, 分别温和混匀后室温下静置 5 min, 再将两溶液混匀, 室温静置 20 min 后, 均匀滴加至 6 孔板中, 4~6 h 后更换为正常培养基。转染 24 h 后, 加入含 800  $\mu$ g/ml G418 DMEM 培养基进行筛选, 10 d 后正常对照组细胞全部死亡。荧光显微镜下观察细胞克隆, 将 shRNA 干扰组和空载体对照组细胞稀释至 24 孔板中, 形成单克隆时, 利用荧光显微镜挑取各细胞单克隆于 96 孔板中扩大培养, 最终获得各 shRNA 组细胞的单克隆细胞系, 扩大培养后获得稳定转染细胞株。

#### 1.4 Western blotting 检测 HerpUD1 蛋白的表达

各稳转细胞培养于 6 孔板中, 待细胞融合度为 80%~90% 时, 使用预冷 PBS 洗细胞 2 次, 加入适量细胞裂解液及 PMSF 裂解细胞, 并提取总蛋白, 分别进行 SDS-PAGE, 转膜、封闭, 用鼠抗人 HerpUD1 单克隆抗体 (1:1 000)、鼠抗人  $\beta$ -actin 多克隆抗体 (1:4 000) 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 做为二抗室温孵育 2 h, 显影, 凝胶图像分析软件分析灰度值。

#### 1.5 Real-time PCR 检测 HerpUD1 mRNA 的表达

取对数生长期稳定转染细胞, TRIzol 试剂提取细胞总 RNA 5  $\mu$ g, 加入随机引物逆转录合成 cDNA。分别取 2  $\mu$ l cDNA 作模板, real-time PCR 检测 HerpUD1 mRNA 的表达。HerpUD1 上游引物: 5'-TTTTGCATCTGGTGTGCAAT-3', 下游引物: 5'-CCCTTTCGCTTAAACCATCA-3';  $\beta$ -actin 上游引物: 5'-CTC-CATCCTGGCCTCGCTGT-3', 下游引物: 5'-GCTGT-CATCTTCACCGTTCC-3'。HerpUD1 mRNA 的相对含量根据  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算。实验重复 3 次。

#### 1.6 Hoechst 33342 荧光染色法检测受辐射细胞的凋亡

将各稳定转染组细胞培养于 6 孔板中, 24 h 后接受 8 Gy X 射线照射, 继续培养 24、48 和 72 h 后, 去除培养基, PBS 洗 2 次, 加入荧光染料 Hoechst 3342 (5  $\mu$ mol/L), 于 37  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min 后, 荧光显微镜随机取 5~7 个视野观察并拍照, 每组计数 500 个细胞, 计算细胞凋亡率。实验重复 3 次。

#### 1.7 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS16.0 统计软件, 组间数据比较应用  $t$  检验, 多组数据比较采用方差分析, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 成功构建 HerpUD1 基因的 shRNA 表达载体

通过 PCR 反应扩增 shRNA 序列, 并采用 T4 连接

酶连接酶切纯化后的 shRNA 和 pGPU6 载体片段, 热激法将重组质粒转化到感受态大肠杆菌, 摇菌扩增, 得到大量含有 pGPU6-shRNA 重组质粒的大肠杆菌表达菌。提取质粒经公司测序, 显示载体构建正确。

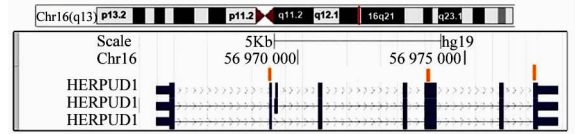


图 1 HerpUD1 基因结构及干扰序列在基因编码区的位置

Fig. 1 Genetic structure of HerpUD1 and location of interference sequence in the coding region

#### 2.2 pGPU6-shHerpUD1-1420 稳定转染 L-02 细胞

将 pGPU6-shHerpUD1-1420 干扰质粒和 pGPU6-NC 质粒各自转染人肝 L-02 细胞, 分别形成 L-02-shHerpUD1-1420 细胞和 L-02-NC 细胞, 由于 pGPU6-GFP-NC 载体带有 GFP 报告基因, 因此, 转染成功的细胞会发出绿色荧光。对照图 2 中普通显微镜和荧光显微镜照片, 发现细胞中成功转染外源基因, L-02-shHerpUD1-1420 组和 L-02-NC 组转染效率均达到 90% 以上。

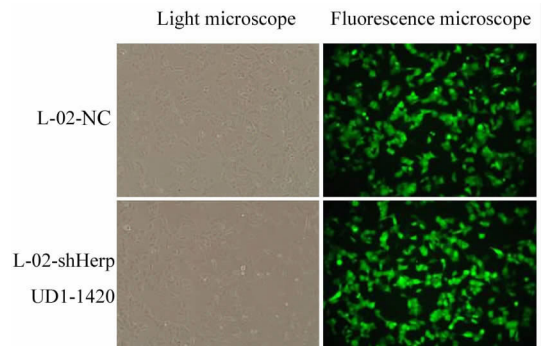


图 2 pGPU6-shHerpUD1-1420 转染后 L-02 细胞中 GFP 的表达 (×200)

Fig. 2 Expression of GFP in L-02 cells after pGPU6-shHerpUD1-1420 transfection (×200)

#### 2.3 pGPU6-shHerpUD1 转染后 L-02 细胞中 HerpUD1 mRNA 的表达

Real-time PCR 检测结果(图 3)显示, 不同 pGPU6-shHerpUD1 转染人肝 L-02 细胞后, 与 L-02-NC 细胞相比, 3 个不同稳定转染 HerpUD1 干扰细胞克隆中以 pGPU6-shHerpUD1-1420 的干扰效果最好, 其 HerpUD1 mRNA 表达水平为  $(0.15 \pm 0.05)$ , 明显

低于 L-02-NC 细胞的(  $1.00 \pm 0.08$  ) (  $P < 0.01$  ), 抑制率达到 85%; 而 shHerpUD1-1100 及 shHerpUD1-592 组表达量均高于 L-02-NC 组(  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$  )。

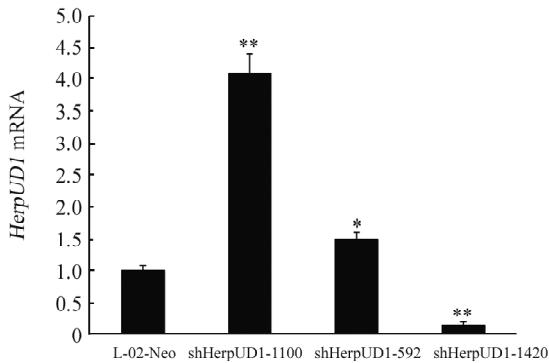


图3 Real-time PCR 检测 pGPU6-shHerpUD1 转染后 L-02 细胞中 *HerpUD1* mRNA 的表达

Fig. 3 *HerpUD1* mRNA expression in L-02 cells after pGPU6-shHerpUD1 transfection detected by real-time PCR  
\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$  vs L-02-Neo cell

#### 2.4 pGPU6-shHerpUD1 转染后 L-02 细胞中 HerpUD1 蛋白的表达

带有不同干扰片段的 3 个 pGPU6-shHerpUD1 质粒载体转染人肝 L-02 细胞后, Western blotting 检测结果(图 4)显示, HerpUD1 蛋白相对表达量, shHerpUD1-1420 为  $0.19 \pm 0.01$ , shHerpUD1-1100 为  $0.80 \pm 0.06$ , shHerpUD1-592 为  $0.56 \pm 0.06$ , L-02-NC 为  $1.62 \pm 0.08$ , *HerpUD1* 基因位于 1 420 ~ 1 441 bp 的片段被干扰后 HerpUD1 蛋白表达水平最低, 对 HerpUD1 干扰效果最好, shHerpUD1-1420 组细胞 HerpUD1 蛋白表达水平显著低于其他各组细胞(  $P < 0.01$  )。

#### 2.5 pGPU6-shHerpUD1-1420 转染促进辐照后 L-02 细胞的凋亡

L-02-NC 细胞形态大小比较均一, 细胞核呈椭圆形, 荧光显微镜下呈现均匀的淡蓝色荧光。经 8 Gy X 射线照射后, L-02-shHerpUD1-1420 细胞可见核固缩, 荧光染色呈高亮蓝色, 染色质浓缩、边集或形成碎块, 出现凋亡小体(图 5)。

各组细胞凋亡率如图 6 所示, 照射后 24、48 及 72 h, L-02-shHerpUD1-1420 组与 L-02-NC 组相比, 细胞凋亡率显著升高[ (  $10.23 \pm 3.37$  )% vs (  $6.89 \pm 1.49$  )%, (  $17.48 \pm 4.77$  )% vs (  $12.50 \pm 1.42$  )%, (  $30.71 \pm 6.39$  )% vs (  $20.25 \pm 4.32$  )% ;  $P < 0.05$  ]。此外, 照射后 24、48 及 72 h, L-02-NC 组

与 L-02-Neo 组相比, 细胞凋亡率无显著差异(  $P > 0.05$  )。结果表明, *HerpUD1* 基因表达沉默可显著增加受辐照后 L-02 细胞的凋亡。

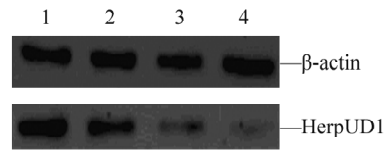


图4 Western blotting 检测 pGPU6-shHerpUD1 转染后 L-02 细胞中 HerpUD1 蛋白的表达

Fig. 4 Expression of HerpUD1 protein in L-02 cells after pGPU6-shHerpUD1 transfection detected by Western blotting  
1: L-02-NC; 2: L-02-shHerpUD1-592;  
3: L-02-shHerpUD1-1100; 4: L-02-Neo-shHerpUD1-1420

### 3 讨论

放疗作为临床上广泛应用的肿瘤治疗手段, 其机制是利用电离辐射效应而引起细胞致死性 DNA 损伤<sup>[7]</sup>。内质网发挥的基本功能包括调节蛋白质折叠、二硫键形成、蛋白转运和分泌、糖基化、膜整合<sup>[8-9]</sup>, 是真核生物的重要亚细胞器。研究发现, 辐射引起的内质网应激能启动辐射损伤修复信号通路, 减少辐射引起的细胞凋亡。这也是部分肿瘤细胞的内质网应激能增加其辐射抵抗性的原因之一<sup>[10]</sup>。因此, 降低肿瘤细胞的内质网应激能力是增强放疗效果的重要策略。*HerpUD1* 是定位于内质网膜的高半胱氨酸应答的类似泛素的区域构件蛋白<sup>[11]</sup>。有研究<sup>[12]</sup>表明, *Herp* 在大脑中通过稳定  $Ca^{2+}$  平衡和线粒体功能发挥保护作用, 当 *Herp* 高表达时, 通过减少 c-Jun 途径的磷酸化降低细胞凋亡, 并参与内质网相关蛋白的降解<sup>[13]</sup>。另有研究<sup>[14-15]</sup>表明, *Herp* 表达下调导致内质网移除错误折叠蛋白能力下降, 由此引起的内质网应激导致细胞死亡及炎症的发生; Hori 等<sup>[16]</sup>研究也发现, 小鼠畸胎瘤干细胞 *Herp* 基因被敲除后, 与野生型细胞相比, 细胞更易受到内质网应激损伤, 衣霉素处理该基因敲除的细胞后, 细胞更易发生不可逆变化导致细胞凋亡。此外, 还有研究<sup>[17]</sup>表明, *HerpUD1* 蛋白 N 末端具有类似泛素样结构域, 其功能尚不清楚, 但对酵母菌 Rad23 的功能是不可缺少的, 而 DNA 修复蛋白 hHR23a 可与 26S 蛋白酶体的 N 末端泛素样结构域发生相互作用<sup>[11, 18]</sup>。上述研究结果提示 *HerpUD1* 不但在细胞病理损伤中发挥重要的保护作用, 而且有可能在 DNA 辐射损伤修复中也发挥着重要作用。

下调 *HerpUD1* 的表达可能降低细胞的内质网应激能力, 具有辐射增敏作用。为了验证这一假设, 本实验针对 *HerpUD1* 基因的编码区设计了 shRNA 序列, 并构建了可在真核细胞内表达 RNA 干扰质粒, 建立了稳定转染 *shHerpUD1* 的人肝 L-02 细胞,

在 mRNA 水平和蛋白水平均成功地沉默了 *HerpUD1* 基因的表达。通过 Hoechst 33342 荧光检测, 表明辐照处理 24、48 和 72 h 后, *HerpUD1* 的沉默使 L-02 细胞凋亡率显著升高, 提示 *HerpUD1* 与凋亡及细胞的辐射增敏相关。

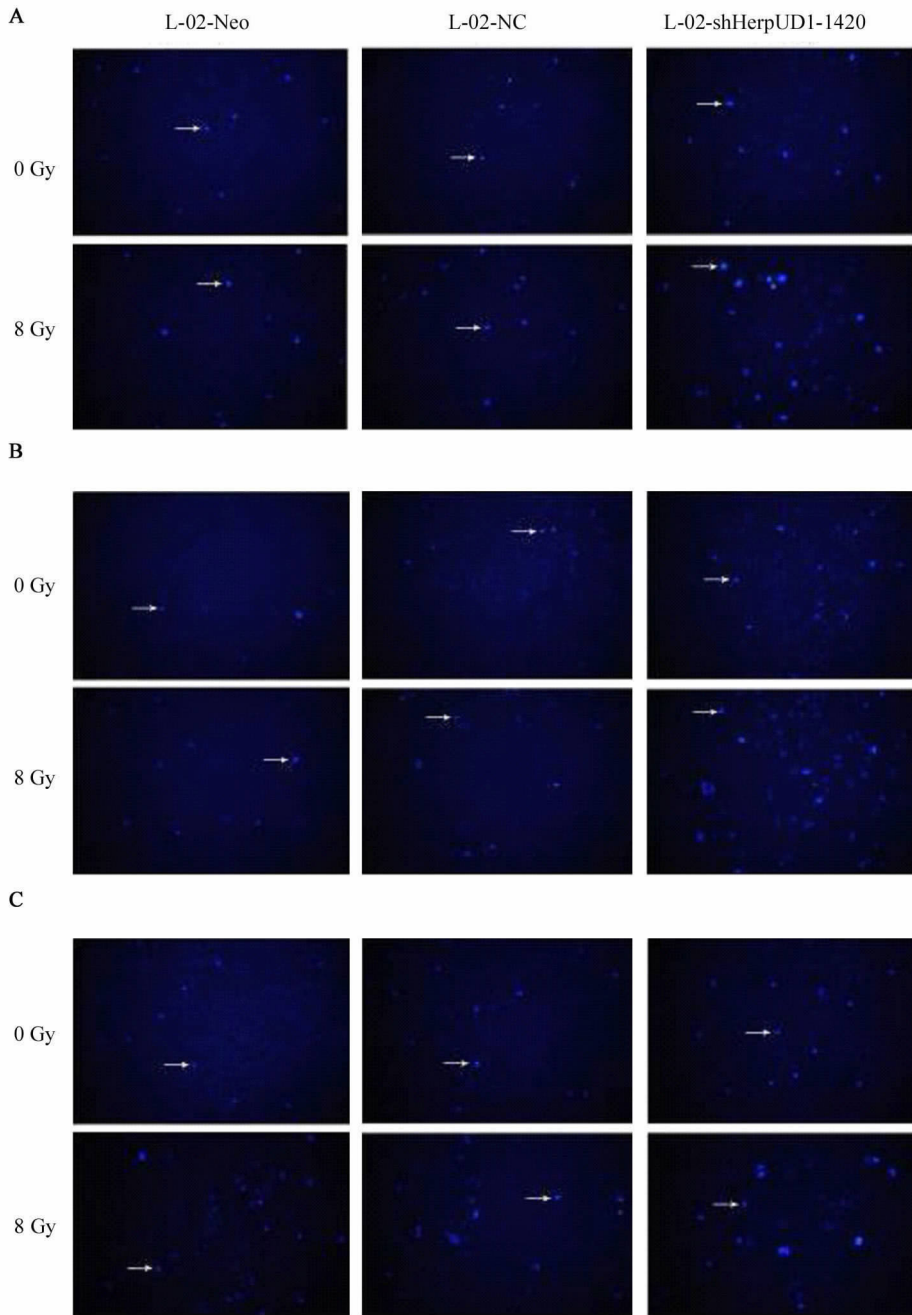


图 5 pGPU6-shHerpUD1-1420 转染增加辐照后 L-02 细胞的凋亡 ( ×200 )

Fig. 5 pGPU6-shHerpUD1-1420 transfection increased the apoptosis of L-02 cells after radiation ( ×200 )

A: 24 h; B: 48 h; C: 72 h

RNA 干扰技术可将表达 siRNA 的 DNA 结合到表达载体上, 在细胞中表达 siRNA, 从而起到干扰 RNA 的作用。该技术已被广泛应用到筛选药物靶

点、分析信号传导通路以及疾病治疗等领域<sup>[19]</sup>。常用的转染方法有非病毒载体( 脂质体、电穿孔、磷酸钙沉淀法 ) 和病毒载体( 逆转录病毒、腺病毒、慢病毒、腺

病毒相关病毒、单纯疱疹病毒)<sup>[20]</sup>。其中采用脂质体转染,并利用 G418 筛选稳转细胞,是建立稳定表达或干扰基因表达细胞系的有效手段。常用的筛选方法是将转染后的细胞进行倍比稀释,分别利用 96 孔板进行培养。理论上讲,在稀释倍数足够大的时候,96 孔板中每一个孔仅含有一个细胞克隆,最后利用定量 PCR 方法对 96 孔板中每一个克隆的 RNA 进行基因表达分析,筛选阳性的克隆。这种方法理论上是比较简单,但操作起来比较复杂:首先,一般转染均是在 6 孔板或 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中进行,细胞数目较多,如果稀释到单克隆,需要大量的 96 孔板;而要对 96 孔板中每一个克隆均进行定量 PCR 分析,工作量也非常大。如果细胞转染效率较低时,此方法在实际操作中尤为困难。由于本实验中所用的 shRNA 干扰质粒带有绿色荧光蛋白报告基因,便于在荧光显微镜下进行观察和操作,因此本研究对筛选方法进行了改进:转染后先加入 G418 进行筛选,形成细胞克隆后在荧光显微镜下挑取单克隆进行扩大培养,从而大大减轻了工作量,而且得到的克隆也比较纯。利用此方法,已经成功建立了几个基因稳转的干扰细胞系。实验结果为进一步研究 *HerpUD1* 在肝细胞 DNA 辐射损伤修复中的作用及其辐射增敏功能提供了实验基础。

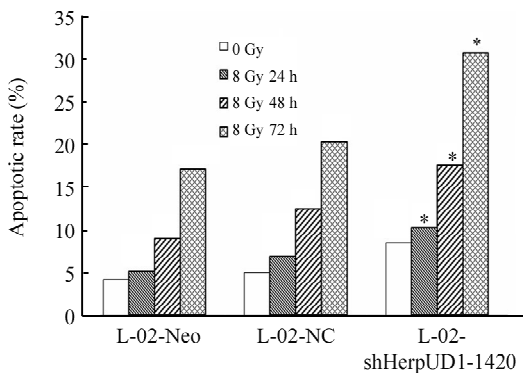


图 6 pGPU6-shHerpUD1-1420 转染对辐射后 L-02 细胞的凋亡率的影响

Fig. 6 Effect of pGPU6-shHerpUD1-1420 transfection on the apoptosis of L-02 cells after radiation

\*  $P < 0.05$  vs L-02-NC cell

## 参考文献

[1] 傅尚志. 电离辐射对肝脏的损伤 [J]. 国外医学: 放射医学核医学分册, 1997, 21(4): 188-191.

[2] 类春燕, 沈秀华, 张乃宁, 等. Genistein 对受辐射 L-02 人肝细胞增殖和 DNA 损伤的影响 [J]. 第二军医大学学报, 2012, 33(4): 359-363.

[3] Song LH, Yan HL, Cai DL. Gene expression profiles in the liver

of mice irradiated with <sup>60</sup>Co gamma rays and treated with soybean isoflavone [J]. Eur J Nutr, 2006, 45(7): 406-417.

[4] 黄啸, 周植星, 段为钢, 等. 内质网应激与肝脏损伤的治疗 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(3): 168-173.

[5] 吴涛, 季光, 郑培永, 等. 内质网应激与肝细胞凋亡 [J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(23): 2507-2515.

[6] 姜山, 谢青. 内质网应激与细胞凋亡 [J]. 国外医学: 流行病学传染病学分册, 2004, 31(6): 330-333.

[7] Philip P, Samuel H. Advances in radiotherapy and implications for the next century: A historical perspective [J]. Cancer Res, 2009, 69(2): 383-392.

[8] Buchberger A, Bukau B, Sommer T. Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: Brothers in arms [J]. Mol Cell, 2010, 40(2): 238-252.

[9] Ellgaard L, Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(3): 181-191.

[10] 李晓雯, 周梅, 沈嵌健, 等. 内质网应激对  $\gamma$  射线照射诱导肿瘤细胞死亡的影响 [J]. 山东医药, 2010, 5(2): 23-24.

[11] Kokame K, Agarwala KL, Kato H, et al. Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress [J]. J Biol Chem, 2000, 275(42): 32846-32853.

[12] Chan SL, Fu W, Zhang P, et al. Herp stabilizes neuronal Ca<sup>2+</sup> homeostasis and mitochondrial function during endoplasmic reticulum stress [J]. J Biol Chem, 2004, 279(27): 28733-28743.

[13] Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response [J]. Annu Rev Biochem, 2005, 2005(74): 739-789.

[14] Yan S, Zheng C, Chen ZQ, et al. Expression of endoplasmic reticulum stress-related factors in the retinas of diabetic rats [J]. Exp Diabetes Res, 2012, 2012(2012): 743-780.

[15] Lin JH, Li H, Yasumura D, et al. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response [J]. Science, 2007, 318(5852): 944-949.

[16] Hori O, Ichinoda F, Yamaguchi A, et al. Role of Herp in the endoplasmic reticulum stress response [J]. Genes Cells, 2004, 9(5): 457-469.

[17] Watkins JF, Sung P, Prakash L, et al. The saccharomyces cerevisiae DNA repair gene RAD23 encodes a nuclear protein containing a ubiquitin-like domain required for biological function [J]. Mol Cell Biol, 1993, 13(12): 7757-7765.

[18] Wang Q, Goh AM, Howley PM, et al. Ubiquitin recognition by the DNA repair protein hHR23a [J]. Biochemistry, 2003, 42(46): 13529-13535.

[19] Xie W, Zhao M, Zhou W, et al. Targeting of integrin-linked kinase with small interfering RNA inhibits VEGF-induced angiogenesis in retinal endothelial cells [J]. Ophthalmic Res, 2012, 49(3): 139-149.

[20] 成凤, 王秦, 匡文斌, 等. Ad5F35-GFP Ad5-GFP 及 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 对 4 种细胞转染效率的比较 [J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(11): 1444-1448.

[收稿日期] 2013-02-05

[修回日期] 2013-04-15

[本文编辑] 周玲琳