

电离辐射对 MC3T3 细胞增殖和 Notch1、Jagged1 基因表达的影响

唐泉¹ 杨冰¹ 仲蕾蕾¹ 杨福军¹ 张晓东¹ 尚杰²
王芹¹ 韩英¹ 樊体强¹ 樊飞跃¹ 孙元明¹

¹ (北京协和医学院&中国医学科学院放射医学研究所 天津分子核医学重点实验室 天津 300192)

² (天津医科大学总医院药剂科 天津 300052)

摘要 揭示了电离辐射对成骨细胞系 MC3T3 细胞的增殖及其对 Notch1 和 Jagged1 基因表达的影响。成骨细胞系 MC3T3 细胞, 经过 0、2 和 4 Gy ¹³⁷Cs γ 射线照射, 运用 MTT、实时定量 PCR 技术, 检测电离辐射对 MC3T3 细胞的增殖和增殖分化相关基因 Notch1 和 Jagged1 表达的影响。照射剂量为 2 和 4 Gy 时, 细胞的增殖下降 ($p < 0.05$, $p < 0.01$); 照射剂量为 2 Gy 时, Notch1 基因表达量降低 ($p < 0.05$); 照射剂量为 2 和 4 Gy 时, Jagged1 基因的表达量均降低 ($p < 0.01$, $p < 0.05$)。电离辐射损伤使成骨细胞系 MC3T3 的增殖能力下降, 同时诱发 Notch1 基因和 Jagged1 的低表达。

关键词 电离辐射, 成骨细胞, MC3T3, Notch1, Jagged1

中图分类号 R336, R811.5

放射治疗与外科手术相结合是一种常用的有效治疗肿瘤的手段, 因此确定放射线对正常组织的影响至关重要。临床研究表明, 肿瘤放射疗法会损伤正常骨组织, 引起骨折、骨损伤等临床病症^[1]。骨折、骨组织损伤主要是骨质减少造成的。成骨细胞和破骨细胞的平衡对维持骨量稳定发挥重要作用。成骨细胞起源于间充质干细胞, 合成骨基质促进骨的形成^[2]。MC3T3 细胞系是成骨细胞系^[3], 发育早期 (1—9 d), 快速增殖, 细胞数目增多^[4], 被用来研究电离辐射对早期成骨细胞的影响。

Notch 信号通路在进化上高度保守^[5], 在生物发育过程中具有重要作用。当细胞相互接触, Notch 信号通路的受体与配体相互结合, 激活通路和下游反应, 发挥对细胞的增殖发育的调控作用。

本实验观察了电离辐射对 MC3T3 细胞增殖与 Notch 通路中受体基因 Notch1 和配体基因 Jagged1 表达的关系。

1 实验材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

α -MEM 培养基购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清

购自天津市川页生物技术公司; 逆转录试剂盒和实时定量 PCR 试剂盒均购自美国 Invitrogen 公司; ¹³⁷Cs γ 射线放射源为加拿大 γ II40; 实时定量 PCR 仪为美国 Bio-Rad 公司 CFX96; 酶标仪为瑞士 Tecan 公司 M200; 分光光度计为美国 Thermo 公司 NANODROP 2000。

1.2 细胞培养

根据文献[6]报道的方法, 将 MC3T3 细胞置于含有 10% 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 的 α -MEM 培养基中, 5% CO₂、37℃ 饱和湿度条件下培养, 每 3 d 换液 1 次, 至贴壁细胞 70%—80% 融合。

1.3 细胞照射

¹³⁷Cs γ 射线放射源, 剂量率为 71.80 R/min (照射量率: 单位时间内的照射量) 照射 MC3T3 细胞, 剂量分别为 2 和 4 Gy。

1.4 细胞增殖实验

MTT 方法分析 MC3T3 细胞增殖。将对数生长期 MC3T3 细胞进行 γ 射线照射, 用胰酶消化, 使其悬浮, 接种到 96 孔板中, 每孔中细胞数为 7×10^3 ,

国家自然科学基金 (30970867)、中国医学科学院放射医学研究所基金 (SF1105/ST1223) 资助

第一作者: 唐泉, 女, 1987 年 9 月出生, 2010 年获得山东省曲阜师范大学学士学位, 现为北京协和医学院&中国医学科学院在读研究生, 主要从事骨细胞生物学的研究

通讯作者 孙元明, Email: yuanmings1962@163.com

收稿日期: 初稿 2012-06-19, 修回 2012-08-06

每个剂量组有 8 个孔作为平行样; 细胞在 5%CO₂、37℃ 饱和湿度的条件下培养; 5 d 后, 每孔中加入 5 mg/mL MTT 20 μL, 继续培养 4 h, 弃上清, 每孔加入二甲基亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 150 μL, 待蓝紫色结晶完全溶解后, 置于酶标仪上, 490 nm 波长处测吸光值。实验重复 3 次。

MC3T3 细胞克隆形成检测。生长良好的 MC3T3 细胞经 γ 射线照射后, 用胰酶消化, 使其悬浮, 接种于 6 孔板中, 每孔 1×10⁴ 细胞数, 每个剂量有 3 个孔作为平行样, 培养 5 d 后, 对细胞克隆做 Giemsa 染色。

1.5 RNA 提取及逆转录

照射后第 3 天, 用 Trizol 法提取 RNA。RNA 样品用分光光度计测 260/280 比值, 进行 RNA 电泳,

确定 RNA 的完整性和浓度。根据 M-MLV 逆转录试剂盒说明书进行逆转录。逆转录后的 cDNA 分装后, -20℃ 保存备用。

1.6 实时定量 PCR

根据 Platinum SYBR Green qPCR Super-Mix-UDG with ROX 试剂盒说明书进行实时定量 PCR (Real-time PCR) 反应。在 0.2 mL EP 管中加入 25 μL 2×SYBR Green SuperMix, 上、下游引物 (10 μmol) 各 2 μL, cDNA 1 μL, 补加经 DEPC (Diethyl phosphorocyanidated) 处理灭菌过的双蒸水至 50 μL。实时定量 PCR 反应条件: 50℃ 2 min; 94℃ 3 min; 94℃ 15 s, 60℃ 20 s, 72℃ 1 min, 40 个循环。采用 2^{-ΔΔCt} [7] 方法来评价目的基因 mRNA 的表达水平。每个样品有 3 个复孔, 实验进行 3 次。靶基因引物见表 1。

Table 1 Primer sequences of target genes

| Gene | Forward primer (5'-3') | Reverse primer (5'-3') |
|---------|------------------------|------------------------|
| β-actin | GGGTGTGATGGTGGGAATG | CTCATTGTAGAAGGTGTGGTGC |
| Notch1 | AGCCTCTCCACCAATACCTT | GGCTGGAGCTGTAAGTTCTG |
| Jagged1 | CTCTGGAAACCTCTGTCAGC | TCAGGTGTGAGCAGTTCTTG |

1.7 统计分析

本实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 12.0 统计软件处理数据, 两两比较采用 *t* 检验方法检验, 以 $p < 0.05$ 确认为有统计学意义, 以 $p < 0.01$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 细胞增殖实验

MTT 实验观察 MC3T3 细胞的生长曲线结果见图 1。第 5 天时, 经 2 Gy 剂量照射时, 细胞的存活率下降 ($p < 0.01$), 5-7 d 时, 4 Gy 剂量照射时, 细胞存活率显著下降 ($p < 0.01$), 具有统计学意义。

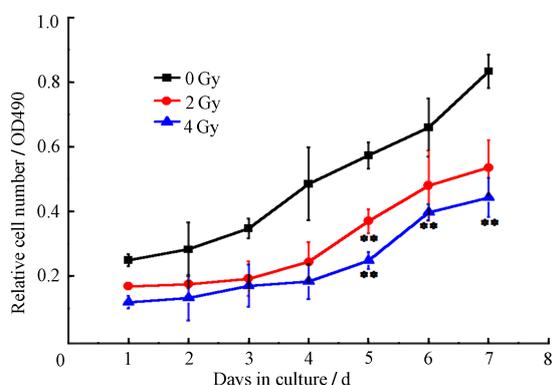


Fig.1 The proliferation curve assessed by MTT assay of cells irradiated with 0, 2, 4 Gy, respectively. ** $p < 0.01$ vs. control

MC3T3 细胞克隆生成实验结果得到了同样的结论。平板效率 (Plating Efficiency) 为细胞克隆数/接种细胞数, 生长率 (Surviving Fraction) 为实验组的细胞数/对照组的细胞数×100%。未照射 MC3T3 细胞培养 5 d 后, 细胞生长率为 100% 时, 受到 2 Gy 照射的 MC3T3 细胞相对生长率为 57.03%, 受 4 Gy 剂量照射时, MC3T3 细胞相对生长率为 35.21% (见表 2)。说明 4 Gy 照射剂量对细胞的增殖影响较大。

Table 2 Colony-forming efficiency of MC3T3 after 0, 2, 4 Gy irradiation

| Dose / Gy | Plating efficiency | Surviving fraction / % |
|-----------|--------------------|------------------------|
| 0 | 0.0391±0.006 | 1 |
| 2 | 0.0223±0.003* | 57.03% |
| 4 | 0.0138±0.005* | 35.21% |

Note: Compared with control, * $p < 0.05$.

2.2 电离辐射对 Notch1 和 Jagged1 基因的影响

以经过未照射、2 和 4 Gy 照射的 MC3T3 细胞 cDNA 为模板, 通过实时定量 PCR 分别检测各受照射剂量 MC3T3 细胞的 β-actin、Notch1 和 Jagged1 的 mRNA 表达量。相应的溶解曲线见图 2、图 3 和图 4。只有一个主峰, 底部也没有出现异常增宽, 表明 β-actin、Notch1 和 Jagged1 在扩增中没有出现特异性产物和污染。各受照射剂量 MC3T3 细胞的 Notch1 和 Jagged1 的 mRNA 相对于对照组表达量见图 5。

2 Gy 辐射剂量下, Notch1 基因表达量降低了 23.06% ($p < 0.05$); 4 Gy 剂量时, Notch1 表达量与 2 Gy 剂量时相比略有上升, 上升了 13.27%, 无统计学意义。照射剂量为 2 和 4 Gy 时, Jagged1 基因的表达量均降低, 分别为 47.31% 和 33.62% ($p < 0.01$, $p < 0.05$)。

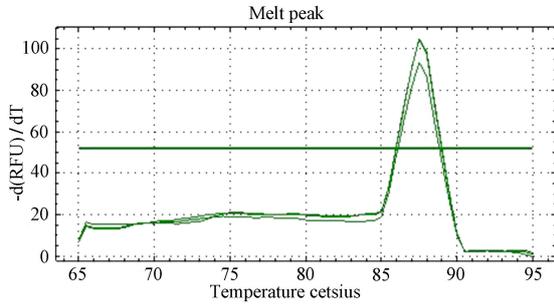


Fig.2 The melting curve of β -actin

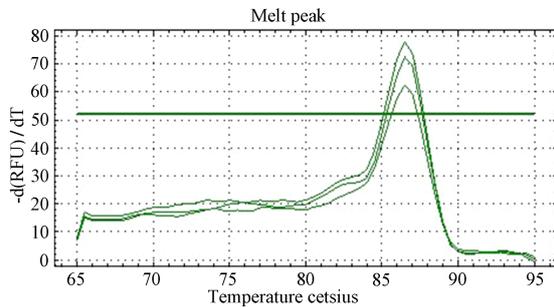


Fig.3 The melting curve of Notch1

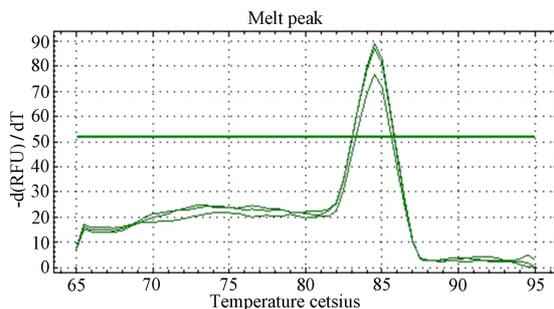


Fig.4 The melting curve of Jagged1

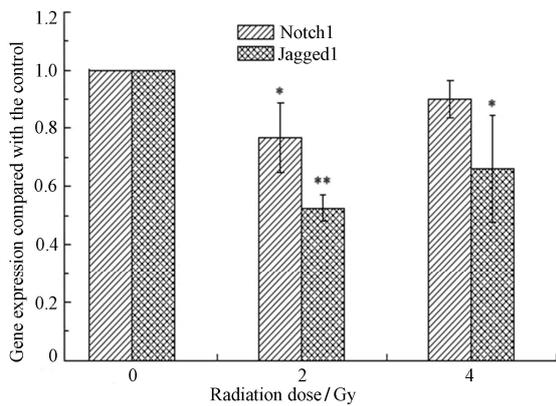


Fig.5 The expression of Notch1, Jagged1 irradiated with 0, 2, 4 Gy compared with the control. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. control

3 讨论

MC3T3 细胞是成骨细胞系, 是体外研究成骨细

胞增殖分化的理想模型。临床研究表明, 电离辐射抑制骨的发育和愈合^[8]。MC3T3 细胞在电离辐射条件下, 增殖能力降低, 分化能力升高, 且具有辐射剂量依赖性^[9]。电离辐射也能够诱导另外一种成骨细胞系 C2C12 增殖和分化的降低^[10]。MTT 实验和细胞克隆实验表明, 电离辐射能够造成成骨细胞增殖的下降, 特别是 4 Gy 剂量照射时, 细胞存活率显著下降。这表明在 4 Gy 照射剂量时大部分成骨细胞失去增殖能力。

Notch1 基因在多种细胞的增殖发育阶段都有重要作用。文献^[11]表明, MC3T3 细胞所形成的早期成骨细胞中, 抑制 Notch1 基因的表达会造成骨量减少并且可以减少成骨细胞的增殖和分化^[12]。本实验中, 2 Gy 剂量照射后, Notch1 基因表达下调, 并且细胞的存活率下降, 表明电离辐射造成的骨损伤与辐射后细胞增殖能力下降以及 Notch1 基因表达下调所导致的成骨细胞分化与增殖能力降低有关。

Jagged1 基因在某些生物体的胚胎发育中, 对组织的形成有重要作用。有文献表明^[13], Jagged1 在人体干细胞中是一种增殖因子。Jagged1 增加时, 某些原代前体细胞个数会增加 2—3 倍^[14]。而对于 Jagged1 在成骨细胞中的作用, 目前文献报道较少。本实验中, Jagged1 基因表达在 2 Gy 辐射剂量下, 显著降低。此时, 细胞的存活率也显著下降。结果说明, 电离辐射抑制 Jagged1 基因的表达。Jagged1 基因表达的变化对 MC3T3 细胞所形成的早期成骨细胞的影响, 应需要更进一步的研究。

Notch1 和 Jagged1 基因作为 Notch 信号通路中的受体和配体, 相互结合后可以激活 Notch 信号通路, 对细胞的活动进行调节。有文献报道^[15], Notch 信号通路对成骨细胞的增殖与分化具有抑制作用, 也有文献报道情况与之相反^[11]。本实验结果表明 Notch 信号通路对成骨细胞的增殖分化具有促进作用。

目前为止, 电离辐射对成骨细胞增殖和分化的影响尚未进行全面而深入的研究。电离照射后, 对成骨细胞增殖和分化相关基因的表达情况还并未有一个系统的研究。Notch 信号通路对多种细胞的增殖和分化具有调节作用, 但是是正向调节还是负向调节各种文献有不同报道^[16], 需要进一步的研究。

参考文献

1 Bongers E M, Haasbeek C J, Lagerwaard F J, *et al.* Incidence and risk factors for chest wall toxicity after risk-adapted stereotactic radiotherapy for early-stage lung cancer [J]. *J Thorac Oncol.* 2011, 6(12): 2052-2057

- 2 Watanabe K, Ikeda K. Osteoblast differentiation and bone formation [J]. *Nihon Rinsho*, 2009, **67**(5): 879-886
- 3 Chaves Neto A H, Machado D, Yano C L, *et al.* Antioxidant defense and apoptotic effectors in ascorbic acid and β -glycerophosphate-induced osteoblastic differentiation [J]. *Dev Growth Differ*, 2011, **53**(1): 88-96
- 4 Quarles L D, Yohay D A, Lever L W, *et al.* Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development [J]. *J Bone Miner Res*, 1992, **7**(6): 683-692
- 5 付亚娟, 叶枫. Notch 信号通路的研究现状[J]. *医学分子生物学杂志*, 2007, **4**(5): 447-450
FU Yajuan, YE Feng. Recent researches on the notch signaling pathway [J]. *Journal of Medical Molecular Biology*, 2007, **4**(5): 447-450
- 6 Wang D, Christensen K, Chawla K, *et al.* Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential [J]. *J Bone Miner Res*, 1999, **14**(6): 893-903
- 7 Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method [J]. *Nat Protoc*, 2008, **3**(6): 1101-1108
- 8 Gevorgyan A, La Scala G C, Neligan P C, *et al.* Radiation-induced craniofacial bone growth disturbances [J]. *J Craniofac Surg*, 2007, **18**(5): 1001-1007
- 9 Dudziak M E, Saadeh P B, Mehrara B J, *et al.* The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2000, **106**(5): 1049-1061
- 10 Sakurai T, Sawada Y, Yoshimoto M, *et al.* Radiation-induced reduction of osteoblast differentiation in C2C12 cells [J]. *J Radiat Res*, 2007, **48**(6): 515-521
- 11 Tezuka K, Yasuda M, Watanabe N, *et al.* Stimulation of osteoblastic cell differentiation by Notch [J]. *J Bone Miner Res*, 2002, **17**(2): 231-239
- 12 Sciaudone M, Gazzero E, Priest L, *et al.* Notch 1 impairs osteoblastic cell differentiation [J]. *Endocrinology*, 2003, **144**(12): 5631-5639
- 13 Karanu F N, Murdoch B, Gallacher L, *et al.* The notch ligand Jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells [J]. *J Exp Med*, 2000, **192**(9): 1365-1372
- 14 Varnum-Finney B, Purton L E, Yu M, *et al.* The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells [J]. *Blood*, 1998, **91**(11): 4084-4091
- 15 Pereira R M, Delany A M, Durant D, *et al.* Cortisol regulates the expression of Notch in osteoblasts [J]. *J Cell Biochem*, 2002, **85**(2): 252-258
- 16 Bai S, Kopan R, Zou W, *et al.* Notch1 regulates osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblast lineage cells [J]. *J Biol Chem*, 2008, **283**(10): 6509-6518

Effects of ionizing radiation on MC3T3 cells' proliferation and expression of Notch1 and Jagged1

TANG Quan¹ YANG Bing¹ ZHONG Leilei¹ YANG Fujun¹ ZHANG Xiaodong¹
SHANG Jie² WANG Qin¹ HAN Ying¹ FAN Tiqiang¹ FAN Feiyue¹ SUN Yuanming¹

¹ (Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tsinghua University, Tianjin 300192, China)

² (Department of Pharmacy, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China)

ABSTRACT In order to investigate the effects of ionizing radiation on MC3T3 cells' proliferation and expression changes of Notch1 and Jagged1 genes, MC3T3 cells were exposed to γ -rays with 0, 2 and 4 Gy, respectively. MTT assay and real-time PCR were adopted to detect the proliferation of MC3T3 cells and the changes of expression of Notch1 and Jagged1 genes which could be in association with proliferation and differentiation. When exposed to 2 and 4 Gy γ -rays irradiation, the MC3T3 cells' proliferation reduced ($p < 0.01$, $p < 0.01$). The expression of Notch1 decreased when treated with 2 Gy irradiation ($p < 0.05$). The expression of Jagged1 regulated down when given 2 and 4 Gy irradiation ($p < 0.01$, $p < 0.05$). Irradiated MC3T3 cells' proliferation potentialities reduced and Notch1 and Jagged1 were regulated down.

KEYWORDS Ionizing radiation, Osteoblast, MC3T3, Notch1, Jagged1

CLC R336, R811.5