

分 类 号: R146

单位代码: 10183

研究生学号: 2017722001

密 级: 公 开



吉林大学

硕士学位论文

(学术学位)

UCP2 对人宫颈癌细胞辐射敏感性的影响及线粒体
相关机制研究

Effect of UCP2 on radiosensitivity of Human Cervical Cancer cells
and Mitochondrial related Mechanism

作 者 姓 名: 刘翠花

专 业: 放射医学

研 究 方 向: 辐射肿瘤学

指 导 教 师: 申延男 副教授

培 养 单 位: 公共卫生学院

2020 年 6 月

UCP2 对人宫颈癌细胞辐射敏感性的影响及线粒体
相关机制研究

Effect of UCP2 on radiosensitivity of Human Cervical
Cancer cells and Mitochondrial related Mechanism

作者姓名：刘翠花

专业名称：放射医学

指导教师：申延男 副教授

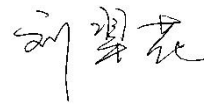
学位类别：医学硕士

答辩日期：2020 年 6 月 11 日

吉林大学硕士学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交学位论文，是本人在指导教师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：



日期： 2020 年 6 月 11 日

中文摘要

UCP2 对人宫颈癌细胞辐射敏感性的影响及线粒体相关机制研究

宫颈癌是妇科常见的恶性肿瘤之一，也是全球女性癌症致死的主要原因之一。在早婚、生育、人乳头瘤病毒(HPV)感染等因素作用下，宫颈癌的患病率往往较高，由于该病发展迅速，大多数女性在首次诊断时已为中晚期。临床上宫颈癌有多种治疗方法，放疗为主要治疗方法之一，但由于辐射抗性的存在，使患者对于放疗作用敏感性下降，严重影响了放疗患者的预后。但相关机制研究目前并未明确，因此，为增加诊断效率，提高放射治疗效果，探究宫颈癌辐射敏感性相关机制尤为重要。

解偶联蛋白(uncoupling protein 2, UCP2)是一种位于线粒体内膜上的阴离子载体蛋白，介导线粒体内膜的质子渗漏过程，从而影响细胞内活性氧的生成，进而调节细胞的氧化应激过程，进一步通过改变线粒体自噬，细胞增殖，细胞侵袭以及细胞凋亡，肿瘤进展以及化疗耐药等来影响肿瘤患者的预后。本研究以 HeLa 和 Caski 细胞为主要研究对象，以 UCP2 为目标基因，探究 UCP2 在辐射敏感性中的作用及线粒体相关机制。

目的：

以 UCP2 调节细胞氧化应激为切入点，探讨 UCP2 在宫颈癌细胞辐射敏感性中的作用机制，为优化宫颈癌个体治疗方案，使之成为宫颈癌诊断及治疗的新靶点提供理论依据。

方法：

1.利用 Q-PCR 法和 Western Blot 法检测不同种宫颈癌细胞中的本底表达水平，选择后续实验所用细胞，检测 HeLa 细胞在经过辐照后不同时间点的 UCP2 表达变化；

2.使用 HeLa 和 Caski 细胞，通过瞬时转染的方法分别构建 UCP2 沉默和过表达模型，利用 Q-PCR 法和 Western Blot 法分别检测转染效率；

3.采用集落形成和 CCK-8 实验对经过处理的细胞的克隆形成和增殖存活能力进行检测；

4.利用DCFH-DA探针检测UCP2 对辐射诱导的宫颈癌细胞的ROS的影响进行检测；

5.利用Mitotracker Green^{FM}检测UCP2 对两种宫颈癌细胞经过辐照后 6 h, 12 h, 24 h 的线粒体膜完整性的变化进行检测；

6.利用罗丹明 123 (Rhodamine123) 对两种宫颈癌细胞经过辐照后 6 h, 12 h, 24 h 的线粒体膜电位变化进行检测；

7.利用流式细胞术分别对 UCP2 沉默和过表达模型联合 X 线照射的细胞凋亡与周期进行检测；

8.利用免疫荧光法对 Hela DNA 损伤相关蛋白 γ -H2AX 的表达变化进行检测；

9.使用 Western Blot 法对于细胞凋亡、周期、DNA 损伤修复相关蛋白水平变化进行检测，探究 UCP2 在宫颈癌细胞凋亡、周期以及 DNA 损伤方面的相关分子机制；

10.实验数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，利用 SPSS 24.0 进行统计学分析，利用软件 GraphPad Prism 6.0 绘制柱状图，利用方差分析进行统计学分析， $P < 0.05$ 被认为具有统计学差异。

结果：

1.UCP2 在不同宫颈癌细胞中的本底表达水平不同，而且辐照可以诱导 UCP2 表达

在所测的五种宫颈癌细胞中，UCP2 在 Hela 细胞中本底表达较高，采用 Hela 细胞作为 UCP2 沉默模型所用细胞；UCP2 在 Caski 细胞中本底表达水平相对低，采用 Caski 细胞作为 UCP2 过表达模型所用细胞。并且 Hela 细胞在辐照后 6 h, 12 h, 24 h, UCP2 蛋白水平随时间延长而增加。

2.UCP2 对宫颈癌细胞增殖存活能力的影响

UCP2 沉默后 Hela 细胞在经过 2、4、6、8、10 Gy 辐照后，集落形成能力相较于阴性对照组有较大程度的降低；并且在经过 4 Gy 辐照后，UCP2 沉默后的 Hela 细胞的增殖存活能力明显降低，但在经过 8 Gy 辐照后的 UCP2 过表达的

Caski 细胞的增殖存活能力相较于阴性对照组的变化并不明显, 考虑与转染效率有关。

3. UCP2 对辐照诱导的宫颈癌细胞中 ROS 的影响

在两种宫颈癌细胞中, 辐照组相较于未辐照组细胞中的 ROS 生成量均有升高, 以 HeLa 细胞中对比更为明显。沉默 UCP2 的 HeLa 细胞辐照后 6 h, 12 h 时间点的 ROS 生成量相较于阴性对照组有较大程度的增加($P < 0.05$), 在辐照后 24 h, 各组 ROS 生成量相差不大, 考虑与 ROS 消散有关; 而在辐照后 6 h、12 h, UCP2 过表达组的 Caski 细胞相较于阴性对照组有一定程度的降低, 虽然差距不如 HeLa 细胞显著, 但具有统计学差异。

4. UCP2 对辐射诱导的宫颈癌细胞的线粒体结构与功能的影响

HeLa 细胞在经过 UCP2 沉默后, 在辐照后 6 h, 12 h 后, 能够较为明显的升高线粒体膜电位, 促进 ROS 生成, 并且在过量 ROS 作用下会促使线粒体膜电位崩溃, 即辐照后 24 h, UCP2 沉默组 HeLa 细胞膜电位明显降低; 而辐照后的 UCP2 过表达的 Caski 细胞中膜电位变化一直处于高于阴性对照组的状态。

在线粒体膜电位与 ROS 的变化的影响下, 细胞内线粒体膜完整性也发生了改变。我们观测到, 辐照对于 UCP2 沉默后的 HeLa 细胞线粒体膜完整性相较于对照组呈现进一步破坏, 并且辐照对于过表达 UCP2 的 Caski 细胞中线粒体膜的破坏性相对减弱。

5. UCP2 对辐射诱导的宫颈癌细胞凋亡的影响

未辐照组的宫颈癌细胞的凋亡率没有明显区别, 但经过辐照后, 细胞的凋亡率明显增加, 其中 UCP2 沉默增强了辐射诱导的 HeLa 细胞的凋亡($P < 0.05$), 并且与线粒体诱导的凋亡通路中抑凋亡蛋白 Bcl-2, Bcl-xl 水平在 UCP2 沉默组呈现较阴性对照组降低的现象, 促凋亡蛋白 Cleaved-Caspase3, Cleaved-Caspase9 以及与凋亡小体形成相关蛋白 Cyt-c, Apaf-1 水平在 UCP2 沉默组表现出进一步增加的现象; 而在 Caski 细胞中只观察到了 Bcl-xl, Caspase-9 和 Cyt-c 的表达水平出现了预期的变化, 考虑到与 UCP2 过表达质粒的瞬时转染效率较低有关。

6. UCP2 对辐射诱导的宫颈癌细胞周期的影响

我们通过流式细胞术对两种细胞的细胞周期变化进行了检测, 未辐照组中细

胞周期变化无明显差别，但 Hela 和 Caski 细胞分别在经过 4 Gy、8 Gy 辐照后，会出现较为明显的 G2/M 期阻滞，并且在辐照后的 Hela 细胞中，与阴性对照组相比，沉默 UCP2 后增强了这种阻滞效应 ($P<0.05$)；在辐照后的 Caski 细胞中，UCP2 过表达在一定程度上降低了辐照所引起的周期阻滞效应。Western Blot 结果也显示，与细胞周期相关蛋白-G2 期细胞周期检查点相关蛋白 CyclinB、CDC2 也表现出了相应变化。

7. UCP2 对辐射诱导的宫颈癌细胞 DNA 损伤的影响

我们使用免疫荧光法对辐照后不同时间点的 Hela 细胞内 γ -H2AX 的焦点形成数进行了检测，发现在辐照后 6 h 和 12 h 时间点，UCP2 沉默组与未辐照组相比， γ -H2AX 焦点形成明显增加，但辐照组内部各组之间差别不大，但在辐照后 24 h，UCP2 沉默组的 γ -H2AX 焦点形成相较于阴性对照组明显增加，即 UCP2 增强了 X 射线对于 Hela 细胞的 DNA 双链断裂损伤；并且 Western Blot 结果也显示，与 DNA 损伤修复相关蛋白 Ku70，Rad51 在辐照后 UCP2 沉默组表达水平相较于阴性对照组有一定程度的降低；并且通过 Western Blot 也检测到，在辐照后 12 h，Caski 细胞中的 γ -H2AX 蛋白水平在 UCP2 过表达组相较于阴性对照组减少，UCP2 过表达减弱了电离辐射对于细胞的 DNA 损伤，而 Ku70 蛋白水平在 UCP2 过表达组也表现出增加。

结论：

1. 电离辐射可以诱导宫颈癌细胞中 UCP2 的表达；
2. UCP2 可以影响电离辐射诱导宫颈癌细胞内 ROS 的产生，即沉默 UCP2 会促进辐射诱导的 Hela 细胞的 ROS 生成，UCP2 过表达则会一定程度减弱辐射诱导的 Caski 细胞的 ROS 生成能力；
3. UCP2 可以引起辐射诱导的宫颈癌细胞内线粒体部分结构与功能的变化，以线粒体膜电位和膜完整性为主，进一步影响线粒体诱导的凋亡通路的激活；
4. UCP2 可以引起电离辐射诱导的宫颈癌细胞细胞周期发生改变，以 G2 期阻滞最为显著，即 UCP2 沉默可以促进辐射诱导的宫颈癌细胞 G 阻滞，UCP2 过表达则会相应减弱阻滞作用；
5. 以上凋亡通路的激活的机制大部分可以归结于 UCP2 对宫颈癌细胞内

ROS的生成变化,并且生成的ROS产生间接影响了辐射诱导的宫颈癌细胞的DNA损伤及修复。

总之,UCP2 在宫颈癌细胞的辐射敏感性中起着非常重要的作用,有望成为宫颈癌放射治疗的新靶点

关键词:

电离辐射, 线粒体, UCP2, 辐射敏感性, 活性氧

Abstract

Effect of UCP2 on radiosensitivity of Human Cervical Cancer cells and Mitochondrial related Mechanism

Cervical cancer is one of the most common malignant tumors in gynecology, and it is also one of the main causes of cancer death among women all over the world. Under the influence of early marriage, childbirth, human papillomavirus (HPV) infection and other factors, the prevalence rate of cervical cancer in women is often higher. Due to the rapid development of the disease, most women are in the middle and late stage at the time of first diagnosis. In clinic, there are many treatments for cervical cancer, radiotherapy is one of the main treatment methods, but due to the existence of radiation resistance, it seriously affects the prognosis of patients with radiotherapy. However, the research on the mechanism of radiation resistance of cervical cancer is not clear at present. Therefore, in order to increase the efficiency of diagnosis and improve the effect of radiotherapy, it is particularly important to explore the mechanism of radiation resistance of cervical cancer.

UCP2 (uncoupling protein2,UCP2) is an anion carrier protein located in the intima of mitochondria, which mediates the proton leakage of mitochondrial inner membrane, thus affecting the production of intracellular reactive oxygen species, regulating the process of oxidative stress, and further changing mitochondrial autophagy, cell proliferation, cell invasion and apoptosis, tumor progression and chemotherapy resistance to affect the prognosis of tumor patients. In this study, Hela and Caski cells were taken as the main research objects, and UCP2 was used as the target gene to explore the role of UCP2 in radiosensitivity and mitochondrial-related mechanisms.

Objective:

The purpose of this study is to explore the mechanism of UCP2 in the radiosensitivity of cervical cancer cells by regulating cellular oxidative stress, so as to

provide a theoretical basis for optimizing individual treatment regimens for cervical cancer and making it a new target for diagnosis and treatment of cervical cancer.

Methods:

1. The background expression in different kinds of cervical cancer cells was detected by Q-PCR and WesternBlot. The cells used in the follow-up experiment were selected to detect the changes of UCP2 expression in Hela cells at different time points after 4Gy irradiation.

2. The UCP2 silencing and overexpression models of Hela and Caski cells were constructed by transient transfection, and the transfection efficiency was detected by QPCR and WesternBlot, respectively.

3. Clony formation and CCK-8 assay were used to detect the colony formation, proliferation and survival ability of the treated cells.

4. Using DCFH-DA probe to detect the effect of UCP2 on ROS of cervical cancer cells induced by radiation.

5. MitotrackerGreenFM detection of UCP2 was used to detect the changes of mitochondrial membrane integrity of two kinds of cervical cancer cells at 6 h, 12 h, 12 h and 24 h after irradiation.

6. The changes of mitochondrial membrane potential of two kinds of cervical cancer cells at 6 h, 12 h, 12 h and 24 h after irradiation were detected with rhodamine 123 (Rhodamine123).

7. Apoptosis and cell cycle of UCP2 silencing and overexpression models combined with X-ray irradiation were detected by flow cytometry.

8. The expression of DNA damage related protein γ -H2AX in Hela cells was detected by immunofluorescence.

9. WesternBlot was used to detect the changes of apoptosis, cycle and DNA damage-related protein expression in cervical cancer cells, and to explore the molecular mechanism of UCP2 in cervical cancer cell apoptosis, cycle and DNA damage.

10. The experimental data were expressed as average $\pm$ standard deviation ($\pm$ s). Statistical analysis was carried out by SPSS24.0, histogram was drawn by software GraphPadPrism6.0, and comparison between groups was made by ANOVA.

Results:

1. The background expression of UCP2 was different in different cervical cancer cells, and irradiation could induce the expression of UCP2 in Hela cells.

The background expression of UCP2 was higher in Hela, and Hela was used as the model of UCP2 silencing. The background expression of UCP2 in Caski cells was relatively low, and Caski cells were used as the model of UCP2 overexpression. The expression of UCP2 in Hela cells enhanced with the increase of time at 6 h, 12 h, 24 h after irradiation.

2. Effect of UCP2 on proliferation and survival of cervical cancer cells.

After UCP2 silencing, the colony forming ability of Hela cells after 2,4,6,8 and 10 Gy irradiation was significantly lower than that of the negative control group, and after 4 Gy irradiation, the proliferation and survival ability of Hela cells silenced by UCP2 was significantly decreased, but the proliferation and survival ability of UCP2 overexpressed Caski cells irradiated by 8 Gy was not obvious compared with the negative control group, which was related to the transfection efficiency.

3. Effect of UCP2 on ROS in radiation-induced cervical cancer cells.

In the two kinds of cervical cancer cells, the production of ROS in the radiation group was higher than that in the non-irradiation group, especially in Hela cells. The ROS production of Hela cells silenced by UCP2 at 6 h and 12 h after irradiation was significantly higher than that of the negative control group, and there was no significant difference in ROS production at 24 h after irradiation, which was considered to be related to the dissipation of ROS, while at 6 h and 12 h after irradiation, the Caski cells in the over-expression group of UCP2 decreased to some extent compared with the negative control group, although the difference was not significant, but the difference was statistically significant.

4. Effect of UCP2 on Mitochondrial structure and function of Cervical Cancer cells induced by radiation.

After UCP2 silencing, Hela cells could significantly increase the mitochondrial membrane potential and promote the production of ROS after 6 hours and 12 hours after irradiation, and the mitochondrial membrane potential collapsed under the action of excessive ROS, that is, the membrane potential of Hela cells decreased significantly in 24 hours after irradiation, while the change of membrane potential of UCP2 overexpressed Caski cells after irradiation was always higher than that of negative control group.

Under the influence of the changes of mitochondrial membrane potential and ROS, the integrity of mitochondrial membrane in two kinds of cells also changed. We observed that the mitochondrial membrane integrity of Hela cells after UCP2 silencing was further damaged by irradiation compared with the control group, and the destruction of mitochondrial membrane in Caski cells with UCP2 overexpression was relatively reduced by irradiation.

5. Effect of UCP2 on radiation-induced apoptosis of cervical cancer cells.

There was no significant difference in the apoptosis rate of cervical cancer cells in the non-irradiation group, but the apoptosis rate of cervical cancer cells increased significantly after irradiation. UCP2 silencing enhanced the radiation-induced apoptosis of Hela cells, and the level of Bcl-2, Bcl-xl were reduced, and the level of Cleaved-Caspase3, Cleaved-Caspase9 and Cyt-c which relating to the apoptosis pathway induced by mitochondria. The level of Apaf-1 increased further in UCP2 silent group. However, only the expected changes in the expression of Bcl-xl, Caspase-9 and Cyt-c were observed in Caski cells, which was related to the low transient transfection efficiency of UCP2 overexpression plasmid.

6. Effect of UCP2 on radiation-induced cervical cancer cell cycles.

The cell cycle changes of the two kinds of cells were detected by flow cytometry. There was no significant difference in cell cycle changes in the unirradiated group, but there was obvious G2 / M phase arrest in Hela and Caski cells irradiated by 4Gy and 8

Gy, respectively. Compared with the negative control group, the arrest effect was enhanced by silencing UCP2 in irradiated Hela cells. In irradiated Caski cells, compared with the negative control group, the overexpression of UCP2 reduced the cell cycle arrest effect induced by irradiation to a certain extent. WesternBlot results also showed that cell cycle-related proteins CyclinB and CDC2 related to G2 phase cell cycle checkpoint also showed corresponding changes.

7. Effect of UCP2 on radiation-induced DNA damage in cervical cancer cells.

After UCP2 silencing in Hela cells, we used immunofluorescence to detect the number of γ -H2AX focus formation at different time points after irradiation. It was found that at 6 h and 12 h after irradiation, compared with the non-radiation group, the γ -H2AX focus formation was significantly increased, but there was no significant difference within the irradiated groups, but at 24 h after irradiation, the γ -H2AX focus formation in the UCP2 silent group was significantly higher than that in the negative control group, but at 24 h after irradiation, the γ -H2AX focus formation in the UCP2 silent group was significantly higher than that in the negative control group. That is, UCP2 enhanced the damage of DNA double strand breaks in Hela cells induced by X-rays. The WesternBlot results also showed that the expression of Ku70, Rad51- proteins related to DNA damage and repair, decreased to a certain extent in the UCP2 silent group after irradiation, and it was also detected by WesternBlot that the γ -H2AX protein in the UCP2 overexpression group decreased compared with the negative control group 12 hours after irradiation, and the UCP2 overexpression attenuated the DNA damage caused by ionizing radiation, while the Ku70 protein increased in the UCP2 overexpression group.

Conclusion:

1. Ionizing radiation can induce the expression of UCP2 in cervical cancer cells.
2. UCP2 can affect ROS production in cervical cancer cells induced by ionizing radiation. Silencing UCP2 can promote radiation-induced ROS production in Hela cells, while overexpression of UCP2 can reduce radiation-induced ROS production in Caski cells to some extent.

3. UCP2 can cause some structural and functional changes of mitochondria in cervical cancer cells induced by radiation, mainly mitochondrial membrane potential and membrane integrity, which further affect the activation of mitochondrial-induced apoptosis pathway.

4. UCP2 can change the cell cycle of cervical cancer cells induced by ionizing radiation, and the arrest of G2 phase is the most significant, that is, UCP2 silencing can promote radiation-induced arrest of G2 phase of cervical cancer cells, while the overexpression of UCP2 can weaken the blocking effect accordingly.

5. Most of the activation mechanisms of the above apoptotic pathways can be attributed to the changes of ROS production in cervical cancer cells induced by UCP2, and the production of ROS indirectly affects radiation-induced DNA damage and repair in cervical cancer cells.

In short, UCP2 plays a very important role in the radiosensitivity of cervical cancer cells and is expected to become a new target for radiotherapy of cervical cancer.

Key words:

Ionizing radiation, Mitochondria, UCP2, Radiosensitivity, Reactive oxygen species

目 录

第 1 章 文献综述.....	1
1.1 电离辐射和辐射敏感性.....	1
1.2 宫颈癌.....	2
1.2.1 宫颈癌现状.....	2
1.2.2 宫颈癌与放射治疗.....	2
1.3 解偶联蛋白 2 (UCP2)	2
1.3.1 解偶联蛋白 (UCPs) 结构.....	2
1.3.2 UCP2 与肿瘤.....	3
1.4 线粒体.....	4
1.4.1 线粒体结构与功能.....	4
1.4.2 线粒体活性氧 (ROS)	5
1.4.3 线粒体和电离辐射.....	5
1.5 立题依据.....	6
第 2 章 材料与方法.....	8
2.1 实验试剂与器材.....	8
2.1.1 实验试剂.....	8
2.1.2 实验仪器与器材.....	10
2.2 实验方法.....	11
2.2.1 细胞来源及培养.....	11
2.2.2 照射条件.....	11

2.2.3	引物合成和质粒构建与扩增.....	11
2.2.3	细胞种板及转染.....	12
2.2.4	Q-PCR 实验.....	12
2.2.5	蛋白免疫印迹实验.....	14
2.2.6	细胞增殖存活能力检测.....	16
2.2.7	ROS 检测.....	16
2.2.8	线粒体膜完整性检测.....	17
2.2.9	流式细胞术检测细胞凋亡、周期、膜电位变化.....	17
2.2.10	γ H2AX 免疫荧光染色法.....	18
2.3	统计学方法.....	19
第 3 章	实验结果.....	20
3.1	UCP2 对电离辐射诱导的宫颈癌细胞增殖存活能力影响.....	20
3.1.1	宫颈癌细胞中 UCP2 本底表达水平检测.....	20
3.1.2	电离辐射对于 Hela 细胞中 UCP2 表达影响.....	20
3.1.3	建立 UCP2 沉默和过表达细胞模型.....	21
3.1.4	UCP2 对辐照前后宫颈癌细胞的增殖存活能力的影响.....	22
3.2	UCP2 对辐射诱导的宫颈癌细胞凋亡影响及线粒体相关机制.....	24
3.2.1	UCP2 对于辐射诱导宫颈癌细胞凋亡影响.....	24
3.2.2	UCP2 影响辐射诱导宫颈癌细胞凋亡的线粒体相关机制.	25
3.2.3	UCP2 对辐射诱导的宫颈癌细胞内 ROS 的影响.....	26
3.2.4	UCP2 对辐射诱导的宫颈癌细胞的线粒体膜电位的影响.	28
3.2.5	UCP2 对辐射诱导的宫颈癌细胞线粒体膜完整性的影响.	29
3.3	UCP2 对辐射诱导的宫颈癌细胞周期影响及相关机制.....	30

3.4 UCP2 对辐射诱导的宫颈癌细胞 DNA 损伤修复影响及相关机制	32
附 图.....	35
第 4 章 讨 论.....	37
4.1 UCP2 对辐照前后宫颈癌细胞的增殖存活能力的影响.....	37
4.2 UCP2 与辐射诱导的宫颈癌细胞凋亡关系及线粒体相关机制.....	38
4.3 UCP2 对辐射诱导的宫颈癌细胞周期影响及相关机制.....	39
4.4 UCP2 对辐射诱导的宫颈癌细胞 DNA 损伤修复影响及相关机制..	40
第 5 章 结 论.....	42
参考文献.....	43
作者简介及在学期间所取得的科研成果.....	53
致 谢.....	55

英文缩写表

英文缩写	英文全称	中文全称
BCA	Bicinchoninic acid	二喹啉甲酸
DMSO	Dimethylsulfoxide	二甲基亚砷
CCK8	Cell Counting Kit 8	细胞增殖—毒性检测试剂盒
UCP2	Uncoupling Protein	解偶联蛋白 2
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor-1	凋亡酶激活因子
AP	Ammonium Persulfate	过硫酸铵
DCFH-DA	2,7-Dichlorodi -hydrofluorescein diacetate	ROS 检测探针
QPCR	Real-time Quantitative PCR	实时荧光定量 PCR
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride	单去污裂解液
ECL	Enhanced Chemiluminescent	化学发光液
Cyt c	Cytochrome c	细胞色素 c
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
HeLa	Human cervical cancer cell line	人宫颈癌细胞株
Gy	Gray unit	吸收剂量单位
h	hour	时间单位小时
IR	Ionizing Radiation	电离辐射
kDa	Kilodalton	分子量单位
MDC	Monodansylcadaverine	单丹黄酰尸胺
min	minute	时间单位分钟
ROS	Reactive Oxygen Species	活性氧
rpm	Revolutions per minute	离心机转速
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链反应
NC	Nitrocellulose	硝酸纤维素膜
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate	十二烷基硫酸钠

WB	Western Blot	蛋白免疫印迹
TBST	Tris-NaCl-Tween 20	Tris-NaCl-吐温缓冲液
siRNA	Small interfering RNA	小干扰 RNA

第1章 文献综述

1.1 电离辐射和辐射敏感性

电离辐射是指能够通过初级过程或次级过程引起电离事件的带电粒子或不带电粒子,而放疗主要通过产生的各种射线引起的电离辐射作用来达到肿瘤治疗的目的。放疗是治疗癌症的一种有效而常见的治疗手段,超过一半的癌症患者在治疗期间接受过放疗,或单独治疗,或与手术或化疗联合治疗^[1-6]。而电离辐射产生的DNA损伤引起的癌细胞凋亡、坏死和衰老是辐射对肿瘤组织产生的主要影响。

辐射可以直接引起DNA损伤如DNA单链断裂(SSB)、双链断裂(DSB)、DNA交联和DNA-蛋白质交联等,也可以通过促进活性氧(ROS)或活性氮(RNS)的产生来间接诱导DNA损伤。其中,双链断裂(DSB)是染色体重排的起始因子,被认为是最有害的辐射损伤^[7-10]。而组蛋白H2AX在丝氨酸上的快速磷酸化(γ H2AX)被认为是电离辐射诱导DSB的敏感标志^[11, 12]。肿瘤细胞对强辐射诱导的DNA损伤的反应是通过DNA损伤传感器和细胞周期调节器传递的,可分为三个阶段:损伤诱导阶段、损伤信号通路激活阶段和损伤修复阶段^[13, 14]。如果DNA损伤得到有效和准确的修复,细胞将恢复其正常功能;否则,慢性DNA损伤将引发细胞凋亡或细胞衰老^[15]。就像Geraldo等人所证明的那样,高剂量率(HDR)短程照射可通过触发A431细胞进入有丝分裂死亡状态,最终抑制肿瘤细胞增殖,从而诱导耐辐射的人鳞癌细胞A431细胞发生G2/M期阻滞,即辐射诱导的DNA损伤会导致细胞周期检查点的激活和细胞周期的中断^[16-18],进而对细胞的增殖与生存产生影响。

辐射敏感性是指生物体、组织、细胞、细胞内含物或生物分子在一定剂量的射线影响下,在形态上和机能上发生相应变化的大小。肿瘤细胞对放射治疗的敏感性,会受到诸多因素的影响。其中细胞周期对细胞的敏感性影响研究发现,细胞在G2-M期对电离辐射最敏感,在S期晚期最不敏感^[19]。肿瘤细胞的位置也是重要的影响因素之一,Brenner发现肿瘤细胞因其在肿瘤内的位置而产生的敏感度,即空间敏感度,因缺氧和细胞间通讯等过程不同而不同^[20]。放射治疗对许多

类型的肿瘤组织的控制至关重要。近年来的技术进步使精确照射靶组织成为可能，同时使非靶组织的剂量最小化。为了加强对癌细胞的辐射损伤并进一步限制辐射对正常组织的影响，探究增强辐射敏感性的靶点显得尤为重要。

1.2 宫颈癌

1.2.1 宫颈癌现状

宫颈癌（cervical cancer）是女性生殖系统最常见的原发性恶性肿瘤之一，其中以鳞状细胞癌为主^[21, 22]。在发展中国家，宫颈癌的增长趋势与过早性行为以及多性伴侣、避孕套使用频率低、多胎妊娠合并衣原体感染、人乳头瘤病毒（HPV）感染等多种因素相关，其中 HPV 感染为主要致病因素^[23]。研究表明，宫颈癌发病率历年呈上升趋势，并且发病年龄呈年轻化趋势^[24]。

1.2.2 宫颈癌与放射治疗

根据疾病发展的不同阶段，治疗手段主要包括手术、放疗(RT)、同步放化疗或化疗。在早期阶段，宫颈癌可以完全接受根治性手术或放射治疗，两者的疗效相当^[25, 26]。在根治性子宫切除术后，辅助 RT 通常用于复发风险较高的患者，并且对于局部晚期宫颈癌患者，单纯放疗为主要治疗手段^[27]，但总体 5 年生存率并不理想。大约有 30- 35% 的宫颈癌患者在首次接受单纯放疗后 3 年内会出现复发性疾病。出现此结局往往与辐射抗性产生有关，然而，相关机制并不明确。

1.3 解偶联蛋白 2（UCP2）

1.3.1 解偶联蛋白（UCPs）结构

解偶联蛋白(UCPs)位于线粒体内膜，属于线粒体转运蛋白家族^[28-30]。解偶联蛋白与其他线粒体阴离子转运蛋白具有相似的结构。由六个跨膜结构域组成，这些跨膜结构域通过亲水链端连接在一起，每三个结构域由两个 α -螺旋和一个极性域组成。

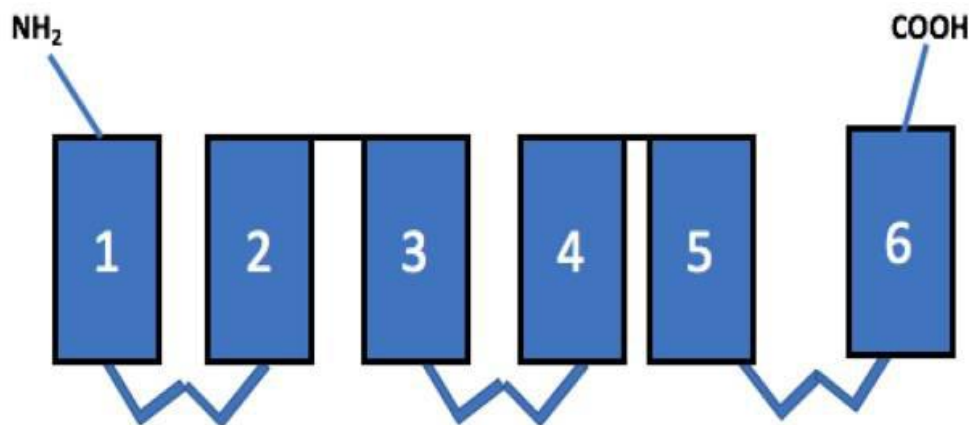


图1 UCPs 结构示意图^[31]。

目前发现 UCP 家族有 5 个成员：UCP1-5。5 种成员分布于人体的不同组织与器官。UCP1 主要分布于棕色脂肪组织中，是一种质子转运体，可以将线粒体膜电位转化为热能^[32]。UCP2 与 UCP1 为同源基因^[33]，但与 UCP1 不同，UCP2 在人体的许多器官和组织中都有表达，包括皮肤、脑、肝脏和肾脏^[34-37]。UCP2 也被认为是一种抗氧化剂，因为它能抑制线粒体中活性氧 (ROS) 的产生^[34]。UCP3 主要分布在骨骼肌和心肌(轻微)中，参与调节骨骼肌呼吸^[38, 39]。UCP4 和 UCP5 主要位于大脑^[40, 41]，在能量平衡和神经保护中发挥重要作用^[42]。由于氧的单电子还原，线粒体是产生超氧化物的主要来源，该反应与线粒体膜电位水平相关。因此，UCPs 引起的解偶联效应可以降低线粒体内超氧化物的生成^[43]。

UCP2 基因位于人类的 11 号染色体上^[44]，并且 11 号染色体是人类富含疾病的染色体之一。人的 UCP2 基因都位于 UCP3 终止密码子下游 7-10kb，UCP2 编码序列开始于外显子 3。此外，UCP2 启动子区域不包含 TA TA 盒，即 DNA 核心启动子区域通常存在的 DNA 序列(5'-TATAAA-3')。相反，它包含几种转录因子的潜在结合基序，如特异性蛋白 1(Sp1)、激活蛋白(AP-1、AP-2)和环磷酸腺苷反应元件结合蛋白等，并且 UCP2 基因多态性已有报道。

1.3.2 UCP2 与肿瘤

UCP2 可以调节机体的代谢变化，这使其成为某些代谢疾病如肥胖、糖尿病和癌症的潜在靶点^[43]。代谢改变是肿瘤产生的标志之一。早在 100 年前，奥托·沃伯格(Otto Warburg)就观察到，即使在富氧的条件下，癌细胞也会优先进行糖酵解，并比周围组织含有更多的能量^[45]。此外，癌细胞的能量来源比正常细胞更多。由

于对 ATP 合成和细胞代谢的调节作用, UCP2 在肿瘤代谢中起着重要作用。已有文献报道, UCP2 在某些肿瘤中高表达, 如白血病、皮肤癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、结肠癌和肝癌等^[46-48]。并且有研究表明, 在正常组织中, UCP2 表达呈中等水平, 而随着 UCP2 低表达可以通过促进细胞内活性氧 (ROS) 的生成来增强基因组的不稳定性来促进肿瘤的形成, 而 UCP2 高表达则可以负向调控 ROS 的生成来减弱细胞凋亡来达到促进肿瘤细胞进展以及化疗耐药的作用^[49-52]。在其他研究中, 靶向 UCP2 已被证明可以诱导肿瘤细胞凋亡。例如, 木蝴蝶素 A 通过抑制 UCP2 以剂量依赖的方式诱导结肠癌细胞线粒体通透性转换孔增多, 导致 ROS 水平增加和细胞凋亡。使用小干扰 RNA 敲除 UCP2 后, 发现结肠癌细胞对木蝴蝶素 A 治疗更敏感^[53]。促进细胞增殖被认为是 UCP2 促进肿瘤发生的重要机制, 有研究发现细胞计数和 Ki-67 染色表明 UCP2 缺乏可以明显抑制皮肤细胞增殖^[54]。但 UCP2 在放射治疗中的作用及其机制相关研究较少。

1.4 线粒体

1.4.1 线粒体结构与功能

真核细胞维持着一个复杂的内部结构, 以执行特殊的任务, 如迁移、收缩和细胞分裂, 以及对来自环境的各种化学和机械等刺激信号做出反应。所有这些活动都需要能量, 这些能量主要由线粒体通过氧化磷酸化过程以 ATP 的形式产生。除了这一中心作用外, 线粒体可以诱导细胞凋亡, 并有助于钙缓冲和活性氧(ROS)的产生^[55]。线粒体主要结构包含自身复制基因组、内膜和外膜以及线粒体基质。在真核生物中, 线粒体主要通过氧化营养物质产生能量, 并且此过程受到线粒体转录因子复合体的调控。每个线粒体包含 800-1000 个拷贝的 mtDNA, 它们是母系遗传的, 并包装在称为类核的高度有序的核蛋白结构中^[56]。虽然类核分布在线粒体基质中, 但它们通常位于携带氧化磷酸化系统的嵴附近。线粒体膜的外膜和内膜之间有一个很小的膜间隙。线粒体膜外膜和膜间隙相对比线粒体内膜通透性强。内膜因为含有参与电子传递链和 ATP 生成过程的酶, 因此通透性受到更多的限制。内膜包裹着线粒体基质, 其中三羧酸循环产生的电子被电子传递链吸收以产生 ATP, 跨内膜产生的电化学梯度, 即膜电位驱动氧化磷酸化的过程^[57]。

1.4.2 线粒体活性氧 (ROS)

ROS 是氧衍生的小分子, 是化学活性相对活跃的含氧化合物, 主要包括氧自由基如超氧化物($O_2^{\cdot-}$)、羟基($\cdot OH$)、过氧基($RO_2^{\cdot}$)和烷氧基($RO^{\cdot}$)和某些非自由基如次氯酸($HOCl$)、臭氧(O_3)、单线态氧(1O_2)和过氧化氢(H_2O_2)等, 它们要么是氧化剂, 要么容易转化为自由基。活性氧在细胞内有内生和外来两种来源。内源性 ROS 是亚细胞细胞器如线粒体、过氧化物酶体和细胞色素 P-450 的副产物。ROS 的外来来源是污染物、烟草、烟雾、药物、外源物质、辐射和其他介质。电离辐射通过与细胞内的水相互作用产生活性氧, 相互作用时, 水失去一个电子, 依次转化为羟基自由基($\cdot OH$)、过氧化氢(H_2O_2)、超氧自由基($O_2^{\cdot-}$), 最终转化为氧(O_2)^[58]

ROS 由体内各种生化和生理氧化过程产生, 也与许多生理和病理生理过程有关。线粒体是 ROS 的产生的主要场所, 线粒体通过电子传递链(ETC)上的氧化磷酸化合成 ATP, 在这个过程中, ROS 是由于 ETC 泄漏的电子对氧分子(O_2)进行单电子还原而产生的^[26]。而线粒体内膜上 UCP2 的存在会使电子传递过程减缓, 增加电子与氧分子接触的机会, 促进线粒体内 ROS 的生成。

ROS 在人类正常生理与病理过程中起着重要作用。在低浓度时, ROS 通过调节细胞内的信号转导和内环境稳态中表现出对机体有益的作用; 然而, 在高水平下, ROS 对细胞内的大分子如蛋白质、脂质和 DNA 的损伤中起主要作用^[59], 诱发机体出现一系列病理损伤。人体内的抗氧化防御系统包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)、谷胱甘肽还原酶(GR)、谷胱甘肽 S-转移酶(GST)和谷胱甘肽(GSH)等主要负责维持 ROS 的产生和中和之间的平衡^[60]。在正常组织细胞中, 活性氧和抗氧化防御系统之间的失衡会导致氧化应激, 从而启动癌症的发生^[61]。在肿瘤细胞中, 过量 ROS 还与介导肿瘤细胞凋亡有关^[62]。

1.4.3 线粒体和电离辐射

活性氧已被证明在介导电离辐射的生物学效应中发挥重要作用^[63-70]。电离辐射可通过诱导细胞外水解, 并且引起细胞内代谢改变或线粒体损伤来增加 ROS 的产生, 并且诱导 ROS 产生延迟性、持续性增加^[66, 69]。电离辐射还可以诱导可

逆的线粒体通透性转变, 刺激 ROS 的产生^[67], 会进一步导致电子传递链部分失活^[63, 70]。过量的 ROS 可以扰乱细胞内的氧化还原系统, 并对包括细胞内 DNA 在内的生物分子造成氧化损伤^[67]。线粒体是除细胞核之外唯一存在 DNA 的位置^[71, 72], 而电离辐射可以诱导环状线粒体 DNA 的各种损伤, 如链断裂^[73]、碱基不匹配^[74]和大的缺失^[75], 并且这些损伤同样可以在核 DNA 中观察到^[76-78], 因此, 除了细胞核外, 线粒体很可能是电离辐射的主要攻击目标。Kam 等人发现辐射可通过促进细胞内释放 ROS 直接促进线粒体内膜上的细胞色素 C(Cyt-c)释放, 或通过改变线粒体膜的通透性间接促进 Cyt-c 的释放来诱导细胞凋亡。Cyt-c 从线粒体释放到细胞质中, 与凋亡因子 Apaf-1 形成复合物, Caspases-9 由 Cyt-c/Apaf-1 复合体的卡域招募, 并且启动由 Caspases-3 介导的凋亡信号通路, 即线粒体诱导的凋亡通路^[66], 达到促进细胞凋亡的目的。

1.5 立题依据

宫颈癌目前已成为一种重要的公共健康问题, 尽管已经可以预防, 但是仍是全球第四大女性死亡原因, 并且在中国已经跃居第二位。目前宫颈癌的治疗手段主要是手术和放化疗。虽然这些治疗方法已显著提高了早期宫颈癌患者的治愈率, 但是局部晚期以及复发的宫颈癌患者的治愈率仍然较低, 这与放疗抵抗的存在有着不可分割的关系, 但其发生发展的确切机制也尚未明确。因此, 寻找提高宫颈癌放化疗疗效的特异性靶分子来提高放射敏感性以提高放射治疗的效果, 是我们目前需要解决的问题和研究的重点方向。

UCP2 作为一种阴离子载体蛋白, 主要参与线粒体内质子传递链的解偶联作用。并且 UCP2 的表达变化与肿瘤的发生发展密切相关, UCP2 可以通过调节细胞凋亡、细胞侵袭、细胞代谢来影响肿瘤细胞的生长。在正常组织中, UCP2 的表达呈中等状态, UCP2 低表达能够促进 ROS 的产生以及基因组的不稳定, 从而促进肿瘤的形成, 而随着 UCP2 的高表达可以通过反向调节 ROS 的产生来促进肿瘤的进展以及化疗耐药性的产生, 然而 UCP2 在放射治疗中的作用机制并不明确。

因此本次研究以宫颈癌细胞 Hela 和 Caski 为主要研究对象, 以 UCP2 作为目标靶基因, 以其对宫颈癌细胞以及线粒体的作用为切入点, 旨在为临床宫颈癌治

疗新增一种放射敏感性标志物,探究 UCP2 对宫颈癌细胞辐射敏感性作用及其机制。

第2章 材料与amp;方法

2.1 实验试剂与器材

2.1.1 实验试剂

MEM	MEM 培养基	北京生东科技有限公司
Foetal Bovine Serum	胎牛血清	江苏恩莫阿赛生物公司
Penicillin-Streptomycin	青霉素和链霉素	大连美仑生物技术公司
Acrylamide/Bis-acrylamide, 30% solution	30%丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺	Sigma 公司, 美国
Annexin V -FITC kit	Annexin V -FIT 试剂盒	BD 公司, 美国
Propidium iodide	碘化丙啶	大连美仑生物技术公司
BCA Protein Assay Kit	BCA 蛋白检测试剂盒	上海碧云天生物技术公司
Cell Counting Kit-8	细胞增殖检测试剂盒	同仁公司, 日本
Phosphate buffer saline	PBS 缓冲液	Solarbio 公司, 美国
DMSO	二甲基亚砷	北京索来宝生物科技有限公司
ECL luminescence kit	ECL 发光试剂盒	北京索来宝生物科技有限公司
Endo Free Maxi Plasmid Kit	无内毒素质粒大提试剂盒	北京天根生化科技公司
FITC-GoatAnti-Rabbit Secondary Antibody	FITC 标记山羊抗兔二抗	Santa Cruz 公司, 美国
Lipofectamine™ 2000Transfection Reagent	Lip2000 脂质体转染试剂	美国 Thermo Fisher Scientific 公司
Refect Transfection Reagent	Refect 转染试剂	常州百代生物科技有限公司
HRP-GoatAnti-Rabbit Secondary Antibody	辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗	Bioworld Technology, 美国
HRP-Goat Anti-Rabbit Secondary Antibody	辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠二抗	Bioworld Technology, 美国
LB broth	LB 肉汤	青岛海博生物公司
MDC	单丹磺酰尸胺	北京索来宝生物科技有限公司

NaHCO ₃	碳酸氢钠	佰耀生物技术有限公司, 江苏
Dimethylcarbinol	异丙醇	上海揽宇化工
Methanol	甲醇	北京化工
Absolute ethanol	无水乙醇	上海揽宇化工
QIAGEN plasmid maxi kit	天根大提试剂盒	上海亿言生物科技有限公司
RNase free H ₂ O	无 RNA 酶水	北京诺博莱德科技公司
NaOH	氢氧化钠	苏州富腾化工有限公司
HCL	盐酸	上海揽宇化工
Trichloromethane	氯仿	上海揽宇化工
Ponceau S	丽春红	Amersco 公司, 美国
Glycine	甘氨酸	Solarbio 公司, 美国
TEMED	四甲基二乙胺	Solarbio 公司, 美国
Primer and DNA ligase	引物和 DNA 连接酶	大连美仑生物技术公司
QPCR Amplification Kit	Q PCR 试剂盒	近岸蛋白质科技有限公司
Rabbit anti-caspase-3	兔 caspase-3 抗体	CST 公司, 美国
Rabbit anti-caspase-9	兔 caspase-9 抗体	CST 公司, 美国
Rabbit anti-Bcl-2	兔 Bcl-2 抗体	Bioworld Technology, 美国
Rabbit anti-Cyt-c	兔 Cyt c 抗体	Abcam 公司, 美国
Rabbit anti-Bcl-xl	兔 Bcl-xl 抗体	Bioworld Technology, 美国
Rabbit anti-Apaf-1	兔 Apaf-1 抗体	ImmunoWay 公司, 美国
Rabbit anti-Ku70	兔 Ku70 抗体	ImmunoWay 公司, 美国
Rabbit anti-Rad51	兔 Rad51 抗体	ImmunoWay 公司, 美国
Rabbit anti-CyclinB	兔 CyclinB 抗体	Santa Cruz 公司, 美国
Mouse anti-CDC2	鼠 CDC 抗体	CST 公司, 美国
Rabbit anti-UCP2	兔 UCP2 抗体	ImmunoWay 公司, 美国
Real-time PCR Kit	Real-time PCR 试剂盒	近岸蛋白质科技有限公司
Reverse transcription kit	逆转录试剂盒	近岸蛋白质科技有限公司
Rhodamine123	罗丹明 123	Sigma 公司, 美国
RIPA lysate	RIPA 裂解液	北京索莱宝科技有限公司

ROS detecting kit	活性氧（ROS）测试盒	大连美仑生物技术公司
TRIzol™ Reagent	裂解液	赛默飞世尔科技有限公司

2.1.2 实验仪器与器材

二氧化碳培养箱	TOMY 公司，日本
无菌超净台	济南卓奥生物技术有限公司
常温离心机	Thermo 公司，美国
X-RAD 320i X 射线辐照仪	Precision X-ray 公司，美国
低温高速离心机	TOMY 公司，日本
-80℃ 低温冰箱	SANYO 公司，日本
液氮罐	北京六一仪器厂
垂直电泳系统	Bio-Rad 公司，美国
水平电泳仪	Bio-Rad 公司，美国
金属浴	中国丹东康佳仪器设备公司
脱色摇床	上海重逢科学仪器有限公司
FACSCalibur 流式细胞仪	BD 公司，美国
恒温水浴锅	常州润华电器有限公司
烘干箱	杭州净化设备厂
凝胶成像分析系统	北京六一仪器厂
涡旋振荡器	Qlinbeier 公司，美国
磁力加热搅拌器	金坛区成辉仪器厂
倒置显微镜	Olympus 公司，日本
正置荧光显微镜	莱卡公司，德国
Epoch 酶标仪	BIO-Rad 公司，美国
实时荧光定量 PCR 仪	Bio-Tek 公司，美国
细胞培养皿	吉林萌创生物科技公司
细胞培养板（6 孔，12 孔，24 孔，96 孔）	Corning公司，美国
15mL 离心管	Corning公司，美国
EP管（200μL、500μL、1.5mL和 5mL）	Eppendorf公司，德国

流式管	NEST公司，美国
200 目尼龙过滤网	Corning公司，美国
移液器（20μL、200μL、500μL、1.5mL和 5mL）	Thermo公司，美国
医用X线胶片	Koda公司，美国

2.2 实验方法

2.2.1 细胞来源及培养

细胞来源：Hela 和 Caski（人宫颈癌细胞）由北京协和细胞库赠与，并都已经经过 STR 鉴定。Hela 细胞使用 MEM 培养基进行培养，Caski 细胞使用 1640 培养基进行培养，并且培养基中都含有 10%胎牛血清和 1%双抗（青霉素和链霉素）。在设定条件为 5% CO₂、37℃恒温培养箱中培养细胞，待细胞长到 70-80%左右进行传代或相应处理。

2.2.2 照射条件

采用实验室现有 X-RAD320 生物辐照仪（美国 PXI）进行照射，单次照射剂量在 Hela 和 Caski 细胞中分别为 4 Gy 和 8 Gy，照射时电压为 180 kV，电流为 12.0 mA，源靶距为 70 cm，剂量率为 1.02 Gy/min。

2.2.3 引物合成和质粒构建与扩增

本实验所用引物均由上海生物工程有限公司合成，引物序列如下：

UCP2 引物序列

上游引物：5'- GGUGGUCGGAGAUACCAA -3'

下游引物：5'- CCACCAGCCTCTATCGGTTT -3'

β-actin 引物序列

上游引物：5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTG-3'

下游引物：5'-GAGGTAGGACCGGAGCGA-3'

本实验所用 UCP2 过表达质粒以及空载体购于中国赛默飞世尔有限公司，质粒扩增步骤如下：取 10 μL 质粒原液与 100 μL 感受态细胞轻轻吹打混匀后冰浴 30 min，冰浴取出后置于金属浴 42 ℃热激 90 s 后冰浴 2 min，加入 900μL 无抗

生素 LB 培养液，于 37℃ 摇床震荡培养 1 h。取出后置于超高速离心机 12000 rpm/min 离心 5 min，根据质粒浓度适当弃上清后重新悬浮沉淀，将悬液涂于含有抗生素的 LB 固体培养基的平板上，倒置于 37 °C 孵箱，过夜孵育，于次日使用 10 μL 枪头挑取存活于培养平板上的单克隆细菌于含有 5 mL 带有 5μL 氨苄霉素的 LB 培养液的摇菌管中，切勿盖紧摇菌管盖子，置于 37 °C 摇床震荡过夜扩增培养。次日待培养液浑浊后离心得细菌沉淀后使用质粒大提试剂盒按说明进行质粒大提。

2.2.4 细胞种板及转染

将 HeLa 细胞或 Caski 细胞根据不同实验要求分别种于 6、12、24、96 孔板中，相同处理组 3 副孔，细胞密度达到 70%左右时，利用转染试剂 **Rfect** 向 Hela 细胞转染 siUCP2 和 siNC (siRNA 50 nM /孔，转染试剂 15 μL /孔)，转染后的细胞置于 37 °C 的培养箱培养 24 h，再进行剂量为 4 Gy 的 X 射线照射，并将 Hela 细胞分为照射组与非照射组，每组中分别存在空白对照组 (Con)

阴性对照组 (siNC) 和沉默组 (siUCP2)；在 Caski 细胞中通过美仑过表达转染试剂分别向细胞内转入 Vector (3 μg) 和 UCP2 (3 μg) 过表达质粒，转染后的细胞置于 37 °C 的培养箱培养 24 h，再进行剂量为 8 Gy 的 X 射线照射，即将 Caski 细胞分为照射组与非照射组，每组中分别存在空白对照组 (Con)，阴性对照组 (Vector) 和过表达组 (UCP2)。在辐照后不同时间点根据不同实验所需加入相应检测试剂进行相关指标检测。

2.2.5 Q-PCR 实验

(一) 细胞总 RNA 提取

(1)于细胞培养箱取出小皿，将小皿中的培养基吸除，加入 2 mL PBS 清洗细胞，吸除 PBS 后，加入 1 mL PBS 润湿细胞，用细胞刮刮取皿底细胞于 1.5 mL EP 管中，离心，吸除上清，加入 600 μL TRIzol，吹打混匀，室温静置 5 min。

(2)向 EP 管中加入 120 μL 氯仿 (TRIzol: 氯仿=5: 1)，上下颠倒数次后，振荡器振荡 15 s，充分混匀，置于室温静置 2-3 min。

(3)将 EP 管置于低温高速离心机中，12000 rpm，4 °C 离心 15 min。

(4)小心吸取溶液上层含 RNA 水相 (不要触及下方 DNA 与蛋白质)，将水相

移入新的 EP 管中。并在新的 EP 管水相中加入 300 μL 的异丙醇，上下颠倒混匀，室温静置 10 min。

(5) 再将 EP 管置于低温高速离心机中 12000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 小心倒掉上清（勿将管壁沉淀倒掉），保留 RNA 沉淀。

(6) 每管中加 1 mL 现配 75%乙醇（由无水乙醇和无 RNA 酶水按 3:1 的比例配置），轻弹 RNA 沉淀，以充分洗涤残存的异丙醇，12000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min, 弃上清。

(7) 室温静置 15 min, 或于超净台下吹 5 min, 使乙醇全部挥发干净。加入 20-50 μL 左右的 DEPC 水溶解沉淀。

(8) 利用 Epoch 微孔板核酸蛋白分析仪，定量检测 RNA 浓度和纯度，若符合要求，则置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 用于后续逆转录所用。

（二）逆转录反应

(1) 所用细胞 RNA 和逆转录试剂融化后置于冰上备用。

按下表所述溶液体系将各试剂组分分别加入 200 μL EP 管中：

模板 RNA	总 RNA (1 μg)
NovoScript 1st Strand cDNA Synthesis	10 μL
SuperMix	
gDNA Purge	1 μL
RNase Free dH ₂ O	Up to 20 μL

(2) 将各组分充分混匀后，离心，42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15-30 min。

(3) 75 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min，终止反应，反应产物可直接用于 PCR。

（三）Q-PCR 检测

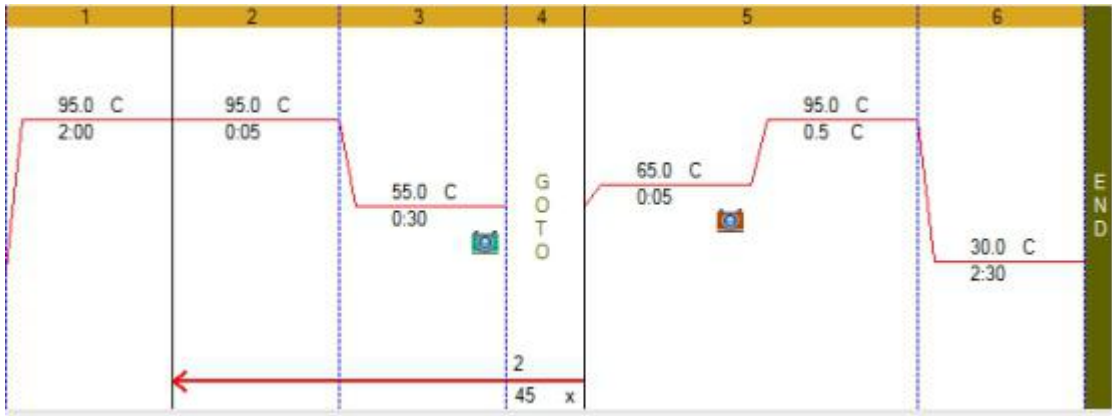
将上述逆转录产物稀释 5 倍（加入反应产物 4 倍体积的无 RNA 酶水）后，按照下述(1)反应体系配置好后，根据(2)所述循环条件用于 Q-PCR 检测。

(1) 常用反应体系（20 μL ）

试剂	使用量
SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus(2 x))	10 μL
Primer 1	0.5 μL

Primer 2	0.5 μL
cDNA	2.0 μL
RNase Free dH2O	7.0 μL
Total	20 μL

(2) 常用 QPCR 循环条件：



2.2.6 蛋白免疫印迹实验

(一) 蛋白提取与浓度测定

(1)全细胞蛋白质提取：经过处理后的细胞吸除培养液后，加入 PBS 清洗两遍，然后加入 1 mL PBS 后润湿细胞，用细胞刮刮取皿底细胞置于 1.5 mL EP 管中，置于超高速离心机上 12000 rpm，离心 2 min，弃上清；加入 200 μL 细胞裂解液和 2 μL PMSF（细胞裂解液：PMSF=100:1），置于 4 ℃细胞匀浆器匀速旋转（速度不宜太快）混匀 1 h，12000 rpm 离心 20 min，吸取上清于 1.5 mL EP 管，置于冰上备用。

(2) 蛋白浓度的测定：根据 200 μL/孔的量（标准品孔+待测蛋白样品孔）配制 BCA 工作液：A 液:B 液= 50:1，蛋白标准品按下表加入 96 孔板中，待测蛋白另选它孔分别加入。

蛋白标准（μL）	0	1	2	4	8	12	16	20	样品 2 μL
PBS（μL）	20	19	18	16	12	8	4	0	18
工作液（μL）	200	200	200	200	200	200	200	200	200

(3) 将已加好样品的 96 孔板置于水平微量震荡仪震荡混匀后, 置于 37 °C 孵育 30 min 后, 于酶标仪 562 nm 处检测加入溶液的各孔吸光度值, 并且根据装蛋白标准品的孔所对应的吸光度值绘制标准曲线, 根据曲线对应公式计算出待测蛋白样品的浓度。根据蛋白所需质量计算所需蛋白体积, 与一定量的上样缓冲液 (SDS) 以及裂解液混合成固定体系, 本实验采用 20 μ L/上样孔, 金属浴 100 °C 煮 5 min, 使蛋白变性, 煮好的蛋白混合液于 -20 °C 保存备用。

(二) Western Blot

(1)制胶: 根据所测蛋白抗体分子量的不同而配制不同浓度的 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶, 本文实验所用主要以浓度为 8% 和 15% 的 SDS-PAGE 胶为主。

(2)上样: 将已经凝固的胶内的梳子缓慢拔出, 将制胶板装入带有电极的夹子上并置于电泳槽, 先向内槽加满电泳缓冲液验漏, 再向外槽加入适量电泳液, 使内外槽形成回路, 用移液器向加样孔中分别加入蛋白 Marker 5 μ L 和蛋白样品 20 μ L/上样孔。

(3)电泳: 连接好电泳槽和电泳仪, 将浓缩胶的电压设为 80 V, 待所加样品跑出浓缩胶后将电压调为 120 V, 待所测蛋白分离到相应位置, 关闭电泳仪, 取出制胶板。

(4)转膜: 撬开制胶板并卸下后去除浓缩胶, 取出分离胶置于转膜夹滤纸上, 并且将 NC 膜置于胶上, 尽量排除 NC 膜与分离胶间的气泡, 再于 NC 膜上方放置一层滤纸以及黑色海绵, 夹紧转膜夹, 将其装入转膜槽, 并向槽内加入转膜液, 保证浸过 NC 膜与分离胶, 并向转膜槽内放入冰袋或将整个转膜槽置于冰盆中以防止转膜过程中产热对蛋白的影响, 将转膜电压设置为 90 V, 90 min 进行转膜。

(5)封闭: 用丽春红染色已转好的 NC 膜, 观查到所转条带后 (若未观察到相应条带, 暂停实验, 分析原因, 重新电泳转膜), 用 1 $\times$ TBST 洗净, 按照 Marker 的位置裁剪所需目的蛋白条带, 放入 5% 封闭液 (脱脂奶粉: 1 $\times$ TBST=5 g: 100 mL) 中, 室温封闭 1 h。

(6)一抗孵育: 封闭结束后倒掉封闭液, 用 1 $\times$ TBST 清洗掉多余的封闭液, 并加入使用 TBST 稀释的一抗 (1: 1000-1: 2000), 置于摇床上, 4 °C 过夜孵育。

(7)二抗孵育: 将一抗回收利用, 再用 1 $\times$ TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入用 TBST 稀释的二抗 (1:10 000-1: 50 000), 室温孵育 1 h。

(8)曝光：倒掉二抗，用1×TBST洗膜3次，每次10 min，向膜上加入ECL化学发光液（覆盖NC膜即可）进行孵育2 min，将NC膜上多余的发光液用吸水纸吸干，将NC膜置于暗匣中，于NC膜上放置X线胶片，根据所检测蛋白抗体特性或以往相应经验压片数分钟或数秒，将压好的片子置于显影液中进行显影，过水后，于定影液中进行定影，晾干片子后对所曝条带进行分析。

2.2.7 细胞增殖存活能力检测

（一）集落形成实验

(1) 取6块6孔板，将已经转染好的细胞经计数后，按照2000个/孔的细胞种于6孔板中，待贴壁后，分给予剂量为2、4、6、8、10 Gy照射，照射后置于37℃培养箱进行培养14天左右。

(2) 待细胞集落形成较为明显时，去除培养板中的培养基，加入PBS洗两次，每孔中加入1 mL 4%多聚甲醛，固定20 min，使用超纯水洗净多余的多聚甲醛，每孔中加入1 mL 结晶紫对固定的细胞进行染色30 min，回收结晶紫，将6孔板倒扣桌面于室温晾干。

(3) 计数各个孔中的集落形成数，计算克隆形成率：

集落形成率=（集落数/接种的细胞数）×100%

（二）细胞增殖活性检测

1. 细胞于小皿内转染后，用胰酶消化收取细胞后计数，种于96孔板中，4000个/孔，Hela细胞设置Con组，siNC组，siUCP2组，待细胞长到50%-70%左右后，给予4 Gy照射，继续培养24 h；Caski细胞设置Con组，Vector组，UCP2过表达组，待细胞长到50%-70%左右后，给予8 Gy照射，由于直接在96孔板中进行转染试剂毒性较大以及Caski细胞生长周期较长，转染效率会大大降低，结果会受到较大影响，所以采用先于小皿中转染后再种于96孔板的方法。

2. 向孔加入10 μL CCK-8溶液，37℃孵育3 h后，使用酶标仪测定450 nm处的吸光度值。按下面公式计算细胞存活率：

细胞存活率=[(实验孔-空白孔)/(对照孔-空白孔)]×100%

2.2.8 ROS检测

将转染24 h的细胞经胰酶消化后，计数，种于96孔板，8000个/孔，待细胞

贴壁后, 进行照射, 分别于照射后 6 h, 12 h, 24 h 三个时间点, 吸除细胞培养孔中的培养基, 每孔加入 100 μ L PBS 进行清洗, 吸除 PBS 后, 向每孔中加入终浓度为 8 μ M 的 DCFH-DA (2, 7-二氯荧光黄双乙酸盐) 探针, DCFH-DA 可以自由穿过细胞膜, 其本身并没有荧光, 但进入细胞膜后, 被细胞内的酯酶水解后生成 DCFH (2, 7-二氯二氢荧光素)。而 DCFH 不能穿过细胞膜, 从而使其较容易装载到细胞内, 而活性氧可以将无荧光的 DCFH 氧化而生成有荧光的 DCF (2, 7-二氯荧光素), 从而可以通过检测 DCF 的荧光来定量细胞内活性氧 (ROS) 的水平。将装入探针的细胞置于 37 $^{\circ}$ C 的培养箱避光孵育 20 min, 吸除多余的探针, 加入 PBS 洗两次(注意清洗时尽量不要使用复压泵, 其吸力较大, 易将边缘细胞洗掉, 影响拍照效果), 加入 100 μ L PBS 利用 Cytation™3 细胞成像系统进行拍照分析荧光强度来判定细胞内 ROS 的产生情况。

2.2.9 线粒体膜完整性检测

准备圆形盖玻片, 若为粘附性较差的盖玻片, 可使用强酸浸泡 20 min, 增强其对于细胞的粘附性或用多聚赖氨酸对盖玻片进行预处理。与处理后的盖玻片用酒精浸泡后, 置于酒精灯上燃烧, 待玻片上的酒精燃尽, 将处理好的盖玻片置于六孔板中, 同时向六孔板中种 1.2×10^5 个/孔的细胞, 待细胞贴壁后 Hela 细胞进行转染 siUCP2 和 siNC (siRNA 50 nM/孔, 转染试剂 15 μ L/孔), 并且设置空白对照 Con 组。转染后 24 h 设置辐照组与未辐照组, 辐照组进行剂量为 4 Gy 的照射; Caski 细胞转染 Vector 和 UCP2 过表达质粒各 3 μ g (质粒: 转染试剂=1 μ g: 2 μ L), 转染后 24 h 设置辐照组与未辐照组, 辐照组进行剂量为 8 Gy 的照射, 并且都于辐照后 24 h, 每孔中加入终浓度为 200 nM 的 Mitotracker Green^{FM}(一种线粒体绿色荧光探针, 可以用于活细胞线粒体特异性荧光染色, 荧光强度与线粒体膜完整性成正比)于 37 $^{\circ}$ C 的培养箱避光孵育 30 min, 吸除多余的探针, 加入 PBS 洗两次, 取出盖玻片置于荧光正置显微镜上拍照对根据荧光强度对线粒体膜完整性进行分析。

2.2.10 流式细胞术检测细胞凋亡、周期、膜电位变化

2.2.10.1 细胞凋亡检测

取出经过处理的细胞, 首先将培养皿中的细胞培养液置于备用离心管中, 向

培养皿中加入 PBS 清洗细胞后, 使用无 EDTA 的胰酶对细胞进行消化, 消化时间较长, 待细胞完全消化后向细胞培养皿中加入含血清的培养基以终止细胞消化, 轻轻混匀细胞后, 将细胞悬液移入离心管中, 置于离心机中 2000 rpm/min, 离心 5 min, 弃废液, 留取细胞沉淀, 使用凋亡试剂盒中的 1 X 的缓冲液 (需用现配, 使用去离子水将 5X 的缓冲液稀释为 1 X) 重悬细胞, 吸取足够数量的细胞于流式管中, 并且向每个流式管中加入 5 μ L FITC 和 10 μ L PI, 避光染色 30 min 后, 上机进行检测。

2.2.10.2 细胞周期检测

取出细胞后, 吸除细胞内原有的培养基, 向细胞培养皿中加入 4 mL PBS 进行冲洗, 向每个皿中加入 500 μ L 胰酶, 于细胞培养箱 37 $^{\circ}$ C 消化 5 min, 终止消化后, 移入 15 mL 离心管中, 1500 rpm 离心 5 min, 加入 4 mL PBS 吹打混匀, 离心, 吸除上清后再加入 4 mL PBS 吹打混匀, 吸除上清, 加入 150 μ L PBS, 再加入 400 mL 预冷的无水乙醇, 震荡混匀。放置于 4 $^{\circ}$ C 固定 30 min-2 h (固定的细胞可于 -20 $^{\circ}$ C 存放 4 周), 吹打混匀后, 置于离心机 1500 rpm/min, 离心 5 min, 吸除上清, 加入 1 mL PBS 后, 混匀, 再置于离心机中 1500 rpm/min, 离心 5 min, 吸除上清, 加入提前配制好的 PI 固定液 (由 1 X PBS 和终浓度为 40 μ g/L 的 250 X PI 固定液和终浓度为 50 μ g/mL 的 1000 X Rnase 配制而成) 300 μ L 于每一个待测样品中吹打混匀, 常温避光孵育 30 min (准备好的细胞要在 24 h 内检测), 上机前充分混匀后, 使用 300 目筛网过滤至流式管中, 立即上机检测。

2.2.10.3 线粒体膜电位检测

取出处理后的细胞, 吸除细胞培养皿中原有的培养基, PBS 清洗后, 加入 1 mL 胰酶进行消化, 消化后加入含有血清的培养基终止消化, 将细胞悬液转移至离心管中, 置于离心机 1000 rpm/min, 离心 5 min, 吸除上清后, 向每个离心管中加入 300 μ L 终浓度为 5 μ M 的罗丹明试剂, 于 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 20 min, 置于离心机离心, 经 PBS 洗涤, 重复洗 3 遍后, 加入 300 μ L PBS 上机检测即可。

2.2.11 γ H2AX 免疫荧光染色法

用已置有盖玻片的小培养皿培养 HeLa 细胞, 稳定传代三代以上后待细胞密

度达到 50%左右, 设置 siNC 阴性对照组, siUCP2 沉默组, 以及各自相应受辐照组, 使用 Rfect 试剂进行转染, 转染后 24 h 对辐照实验组进行 4 Gy 照射,

- (1)各组细胞分别经过相应处理后, 弃培养基, 加入 PBS 洗涤三次;
- (2)4%多聚甲醛 4 °C 固定 20 min;
- (3)弃多聚甲醛, 加入 PBS 洗涤三次, 5% Triton-X100 破膜 15 min;
- (4)弃 5% Triton-X100, 加入 PBS 洗涤三次, 加入 5% BSA 工作液, 室温封闭 2 h;
- (5)用 1: 200 稀释的 γ H2AX 抗体 (10 μ L) 孵育细胞, 4 °C 过夜;
- (6)PBS 振荡洗涤 5 min $\times$ 3 次, FITC 标记羊抗鼠二抗 (1: 1000), 室温避光孵育细胞 2 h;
- (7) PBS 振荡洗涤 5 min $\times$ 3 次, DAPI 室温避光染色 10 min, PBS 洗涤 5 min $\times$ 3 次;
- (8) 滴加抗荧光猝灭剂封片剂, 指甲油封片, 共聚焦显微镜下观察并拍照。

2.3 统计学方法

以上实验各自重复三次, 实验数据采用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析。实验结果均以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据指标均符合正态分布, 并通过方差分析进行组间比较, 柱状图使用 GraphPad 6.0 软件进行绘制, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

第3章 实验结果

3.1 UCP2 对电离辐射诱导的宫颈癌细胞增殖存活能力影响

3.1.1 宫颈癌细胞中 UCP2 本底表达水平检测

利用 Q-PCR 法和 Western Blot 法分别检测本实验室现有五种宫颈癌细胞 HeLa、Siha、C-33A、ME-180、Caski 中 UCP2 的 mRNA 和蛋白水平, 结果如图 3.1 所示, UCP2 mRNA 及蛋白水平在 HeLa 和 Siha 细胞中较高, 而 Caski 细胞中的 UCP2 的 mRNA 及蛋白水平相对于其他四种细胞均较低。后续实验选择本底表达水平高的 HeLa 作为构建 UCP2 沉默模型所用细胞, 选用本底表达水平低的 Caski 作为 UCP2 过表达模型所用细胞。

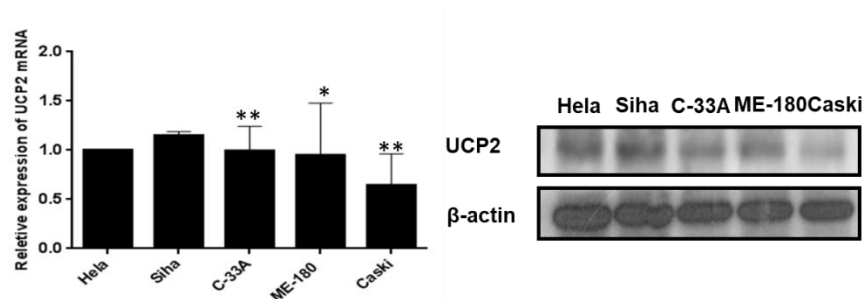


Figure3.1 UCP2 levels in five cervical cancer cells

$n = 3$, $\bar{x} \pm s$; * $P < 0.05$ vs HeLa

3.1.2 电离辐射对于 HeLa 细胞中 UCP2 表达影响

使用 Q-PCR 法和 Western Blot 法检测 HeLa 细胞在经过剂量为 4 Gy 的辐照后不同时间点的 mRNA 和蛋白水平, 发现随着辐照后时间的推移, UCP2 无论在 mRNA 还是蛋白水平均有较大程度的增加 ($P < 0.05$) (图 3.2), 由此推断 UCP2 可能为一种辐射诱导基因。

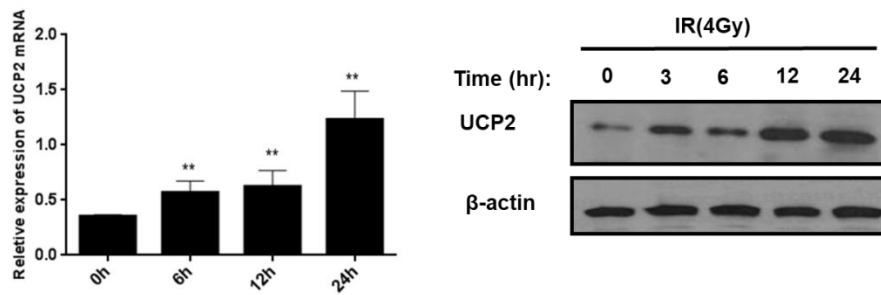


Figure 3.2 UCP2 expression was upregulated in response to ionizing radiation in HeLa cells
($n=3$, $\bar{x} \pm s$; ** $P < 0.01$ vs 0 h)

3.1.3 建立 UCP2 沉默和过表达细胞模型

将人工合成的 UCP2 沉默 RNA 片段 (siUCP2) 以及过表达质粒通过瞬时转染的方法, 分别转入 HeLa 和 Caski 细胞中, 即分别构建 UCP2 沉默与过表达细胞模型, 经过 Q-PCR 法和 Western Blot 法检测发现, 结果如图 3.3 A 和 B 所示, 两种 UCP2 siRNA 在 HeLa 细胞中沉默效率均较高 ($P < 0.01$), 择优选取 siUCP2#2 进行后续实验。但在 UCP2 过表达模型建立过程中发现, 与阴性对照组相比, 转染后的 Caski 细胞中 mRNA 水平有较为明显的升高, 蛋白水平虽有所升高 (图 3.3 C 和 D), 但转染效率与预期相比并不理想, 反复几次, 结果都相似, 可能与瞬时转染效率有关。受实验周期影响, 后续实验还是坚持在此基础上进行。

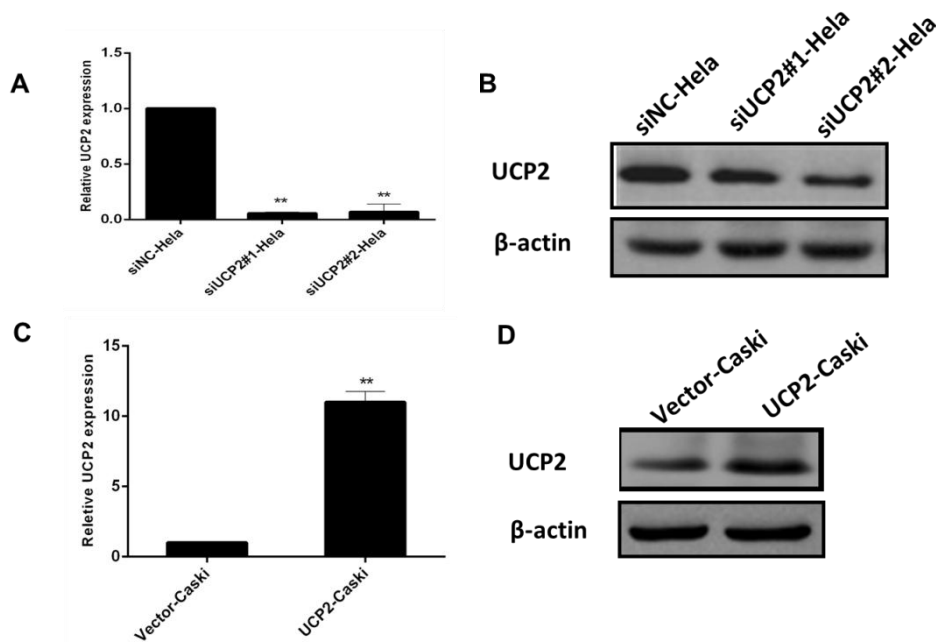


Figure 3.3 Detection of transient transfection efficiency

A,C: mRNA level of UCP2; B,D: protein level of UCP2 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$; ** $P < 0.01$ vs siNC or Vector)

3.1.4 UCP2 对辐照前后宫颈癌细胞的增殖存活能力的影响

利用集落形成实验检测了经过 0、2、4、6、8、10 Gy 照射后 HeLa 细胞的集落形成情况, 结果如图 3.4 A 和表 1 所示, 随着照射剂量的增加, 两组细胞的集落形成明显减少, 阴性对照组与沉默组的细胞在 4、6、8、10 Gy 剂量照射时, UCP2 沉默组细胞集落形成明显低于阴性对照组 ($P < 0.01$), 利用 Graphpad 6.0 拟合单剂多靶模型, 沉默组细胞的存活分数相较于阴性对照组有一定程度的降低 (阴性对照组存活分数为 0.876, 沉默组存活分数为 0.739)。并且 CCK-8 实验也发现 HeLa 细胞在经过辐照后, 辐照组细胞的增殖存活能力相较于未辐照组明显降低, 并且辐照组中, UCP2 沉默组细胞活力相较于阴性对照组明显降低 ($P < 0.05$) (图 3.4 B)。由于 Caski 细胞集落形成能力较弱, 未检测其集落形成能力, 并且经过前期预实验发现, Caski 细胞对于 4 Gy 辐照较不敏感, 后续对于 Caski 细胞的辐照剂量选定为 8 Gy, CCK-8 实验检测 Caski 细胞的增殖存活能力发现, 辐照后细胞活力相较于未辐照组有所下降, 表明 8 Gy 剂量对于 Caski 细

胞具有一定的杀伤作用，但辐照组中 UCP2 过表达后的细胞增殖存活能力与阴性对照组相比并无明显差别，可能与转染时效性有关，由于 Caski 细胞生长周期较长，未直接于 96 孔板中直接转染（图 3.4 C），但从沉默 UCP2 的 HeLa 细胞结果可以看出 UCP2 可能在宫颈癌细胞辐射敏感性中起着重要作用。

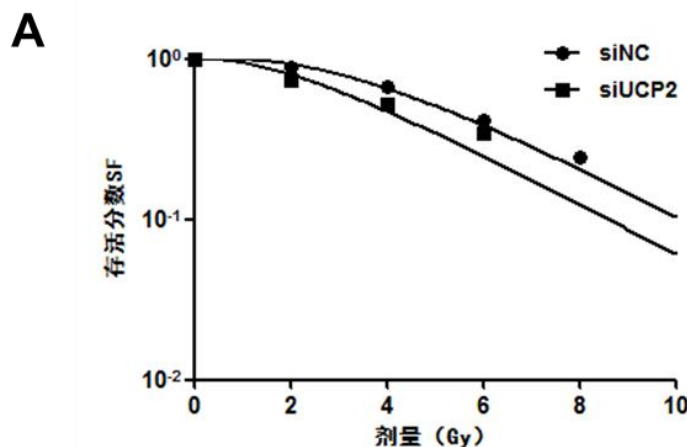


表1 单击多靶模型阴性对照组和沉默组HeLa细胞存活曲线拟合结果

组别	D0	N	Dq	SF2	R2
siNC	2.796	3.909	3.812	0.876	0.978
siUCP2	2.711	2.475	2.457	0.739	0.959

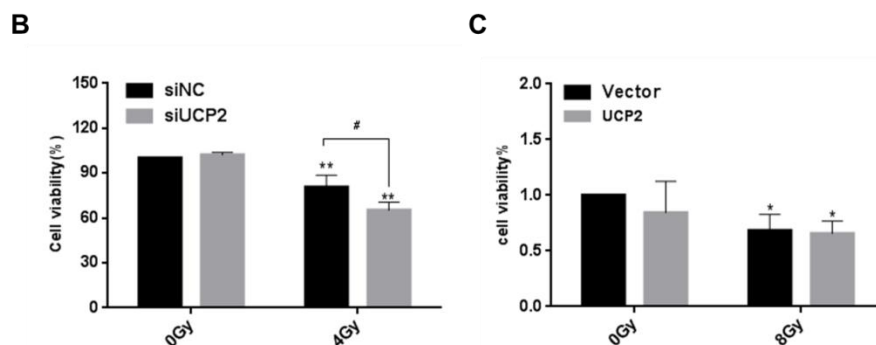


Figure3.4 Effect of UCP2 on radiosensitivity of cervical cancer cells

(A) Colony formation was detected in HeLa negative control group and silencing group

(B) Proliferation viability of HeLa cells was detected among each group

(C) Proliferation viability of Caski cells was detected among each group

($n=3$, $\bar{x} \pm s$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Con, # $P<0.05$ vs 4Gy siNC or 8Gy Vector)

3.2 UCP2 对辐射诱导的宫颈癌细胞凋亡影响及线粒体相关机制

3.2.1 UCP2 对于辐射诱导宫颈癌细胞凋亡影响

流式细胞术检测细胞凋亡情况发现, 在 HeLa 细胞中, 辐照后细胞凋亡率相较于未照射组明显增高 ($P<0.05$), 并且辐照组中, UCP2 沉默组相较于阴性对照组凋亡率显著增加 ($P<0.05$) (图 3.5 A 和 B), 即表明 UCP2 沉默可能会增强宫颈癌细胞的辐射敏感性; 同时, 我们也使用流式细胞术检测了 UCP2 过表达后的 Caski 细胞的凋亡情况, 如图 (3.5 C 和 D 所示); 而 Caski 细胞中, 辐照组细胞的凋亡率相较于未辐照组明显增加, 但经过照射后, UCP2 过表达组细胞相较于同组对照组细胞凋亡率虽有所降低且也具有统计学意义, 但变化不如 HeLa 细胞那样显著, 这与质粒转染效率之间应该存在较大相关性。由此得出结论 UCP2 高表达可能会诱导宫颈癌细胞产生辐射抗性。

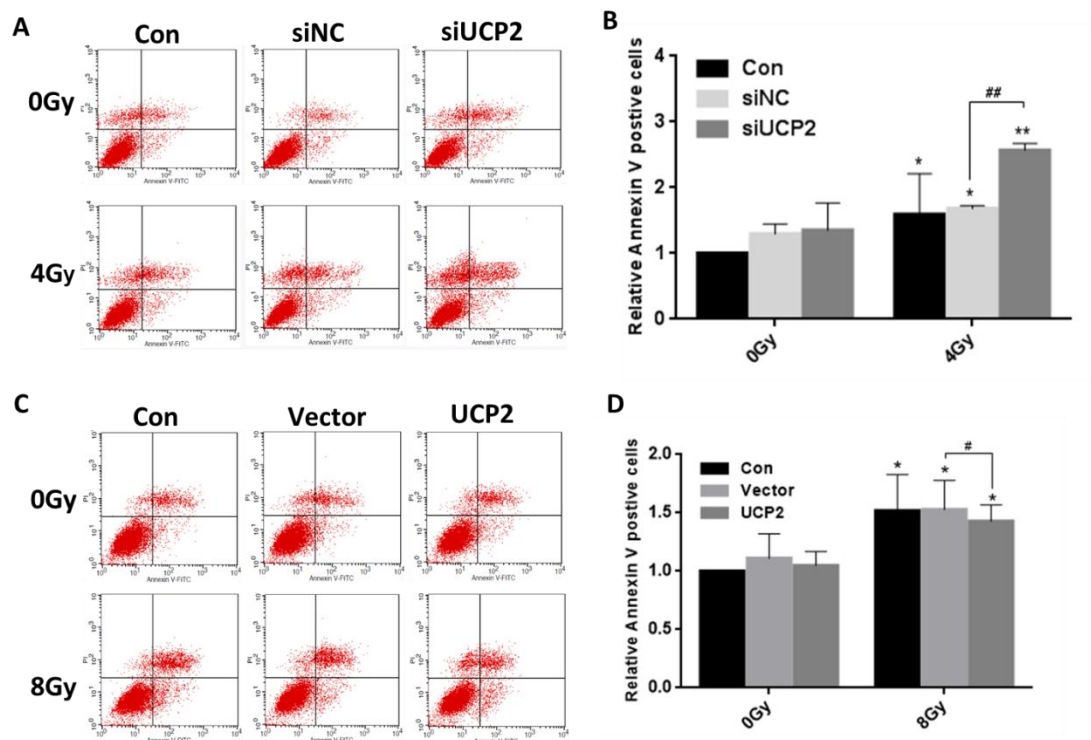
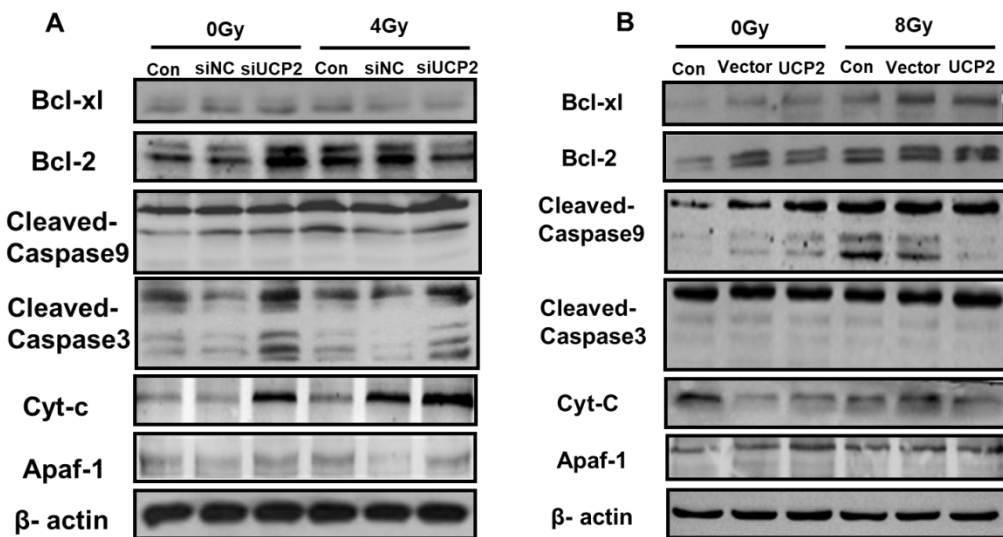


Figure 3.5 Effect of UCP2 on radiation-induced apoptosis of cervical cancer cells

(A)Flow cytometry analysis of apoptosis after UCP2 knockdown(B)Flow cytometry analysis of apoptosis after UCP2 overexpression (n=3, $\bar{x} \pm s$; *P<0.05, **P<0.01 vs Con, # P<0.05 vs 4Gy siNC or 8Gy Vector)

3.2.2 UCP2 影响辐射诱导宫颈癌细胞凋亡的线粒体相关机制

为探究 UCP2 引起上述凋亡变化的相关机制, 我们使用 Western Blot 法对与线粒体凋亡相关的一系列蛋白进行了检测, 结果如图 3.6 所示, 在 Hela 细胞中, 辐照后, 抑凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bcl-xl 水平在 UCP2 沉默组中相较于阴性对照组明显降低, 促凋亡蛋白 Cleaved-Caspase3、Cleaved-Caspase9 以及与凋亡小体形成相关的蛋白 Cyt-c、Apaf-1 在沉默组相较于阴性对照组较大程度的增加 (图 3.6 A 和 C); 并且在辐照后过表达 UCP2 的 Caski 细胞中检测到 Bcl-2 蛋白水平相较于阴性对照有一定程度增加, Cleaved-Caspase9 以及 Cyt-c 的蛋白表达在 UCP2 过表达组有一定程度的降低, 但 Bcl-xl、Cleaved-Caspase3 以及 Apaf-1 蛋白水平在各组间的差别并不明显 (图 3.6 B 和 D), 需进一步探究发生上述情况的机制。结合 UCP2 沉默细胞模型的结果以及部分过表达细胞模型的结果, 我们推测 UCP2 可能与线粒体诱导的凋亡通路有关。



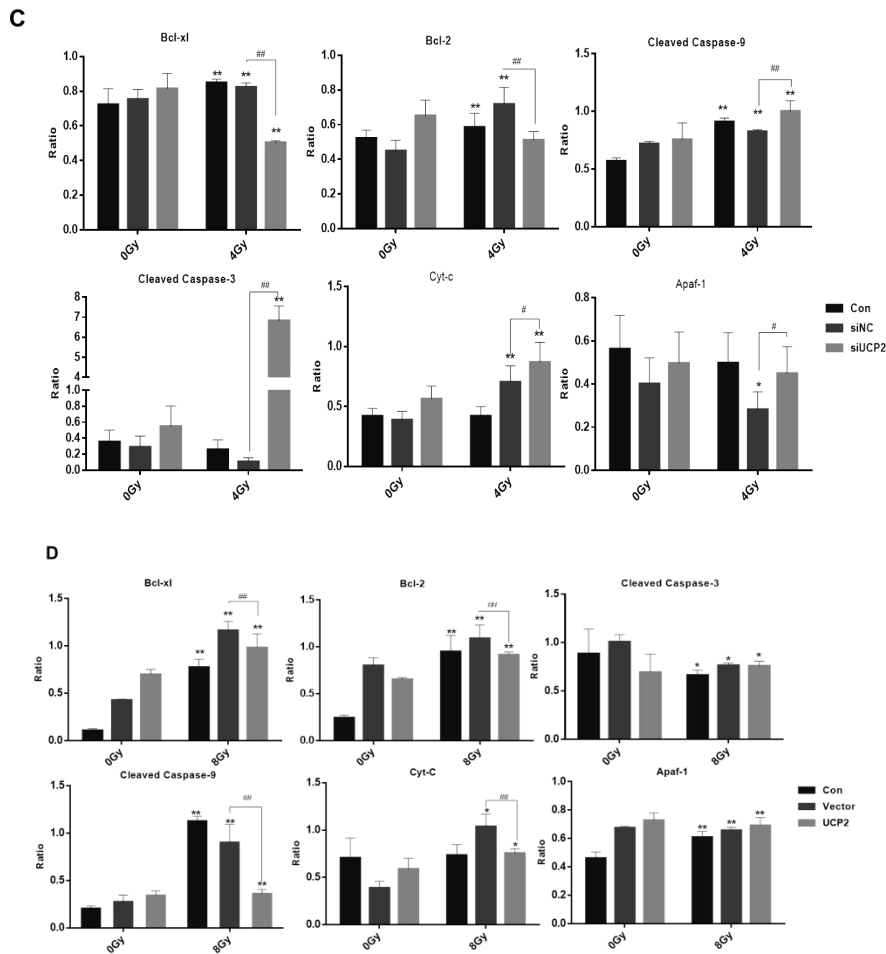
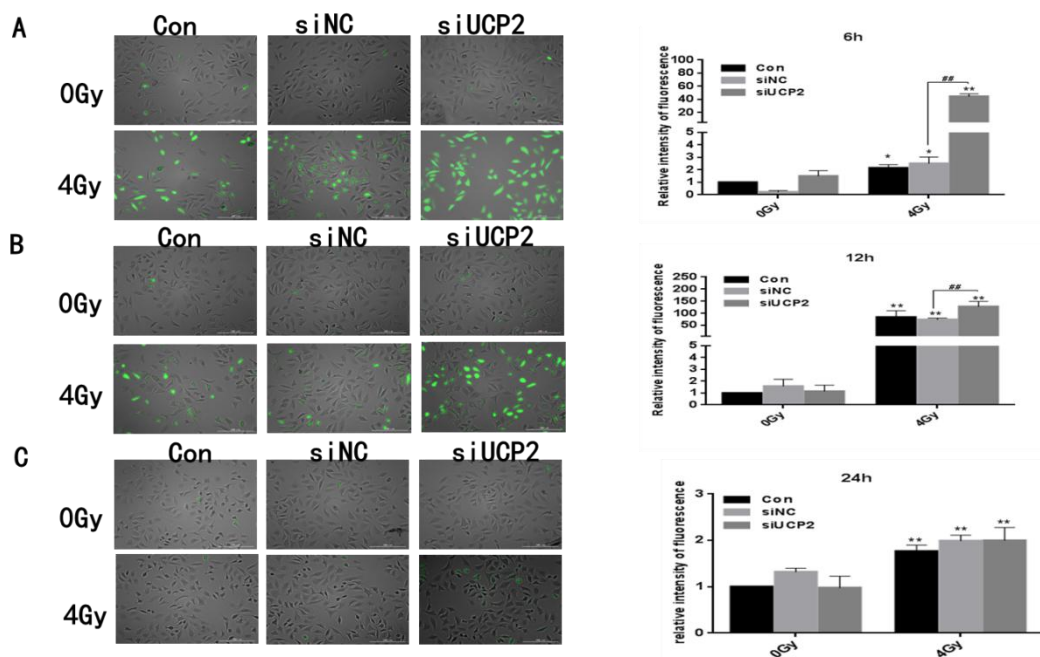


Figure3.6 Effect of UCP2 on apoptosis related protein expression of cervical cancer cells
 (A) Western blots of Bcl-2, Bcl-xl, caspase-3, caspase-9, cytochrome c, Apaf-1, and the β -actin protein loading Control of HeLa cells.(B) Western blots of Bcl-2, Bcl-xl, caspase-3, caspase-9, cytochrome c, Apaf-1, and the β -actin protein loading Control of Caski cells.(C) Relative protein amount of Bcl-2, Bcl-xl, caspase-3, caspase-9, cytochrome c, and Apaf-1 of HeLa cells(D) Relative protein amount of Bcl-2, Bcl-xl, caspase-3, caspase-9, cytochrome c, and Apaf-1 of Caski cells($n=3$, $\bar{x} \pm s$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Con, # $P<0.05$ vs 4Gy siNC or 8Gy Vector)

3.2.3 UCP2 对辐射诱导的宫颈癌细胞内 ROS 的影响

UCP2 作为一种线粒体内膜阴离子转运体, 其表达变化可能会引起线粒体氧化呼吸链发生改变, 进而导致线粒体产生 ROS 发生变化。我们使用 DCFH-DA 探针检测在 HeLa 和 Caski 细胞经过照射后的 6 h、12 h、24 h 时的 ROS 变化, 结

果如图 3.7 A、B、C 所示, 未经 X 线照射的各组 Hela 细胞 ROS 产量并无较大差异, 但辐照组细胞 ROS 却明显增加 ($P<0.05$), 并且随着辐照后时间的延长, ROS 产生量逐渐降低, 在辐照后 6 h、12 h 产生量都较高, 并且在辐照后 12 h 与未辐照组差异最为明显, 虽在辐照后 24 h 趋于消散, 但还是可以看出辐照组 ROS 产量相较于未辐照组高, 而且我们还发现辐照后 6 h、12 h 时, 辐照组中 UCP2 沉默后 Hela 细胞 ROS 生成量明显多于阴性对照组 ($P<0.05$), 表明 UCP2 沉默后可以促进辐射诱导的 Hela 细胞内 ROS 的生成; 在 Caski 细胞中, 辐照后细胞中的 ROS 相较于未辐照组有所增加 ($P<0.05$), 并且于辐照后 6 h 差异最为明显。但辐照后 12 h 就趋于消散, 持续时间较短, 24 h 时辐照组与未辐照组已无明显差别, 此结果可以从部分程度上解释上述的 Caski 细胞凋亡率差异不明显。但在辐照后 6、12 h 时 UCP2 过表达组的 ROS 产量相较于阴性对照组有一定程度的降低, 虽不如 Hela 细胞变化明显, 但具有统计学意义 ($P<0.05$) (图 3.7 E、F、G), 即 UCP2 会影响辐射诱导的宫颈癌细胞内 ROS 的产生情况。



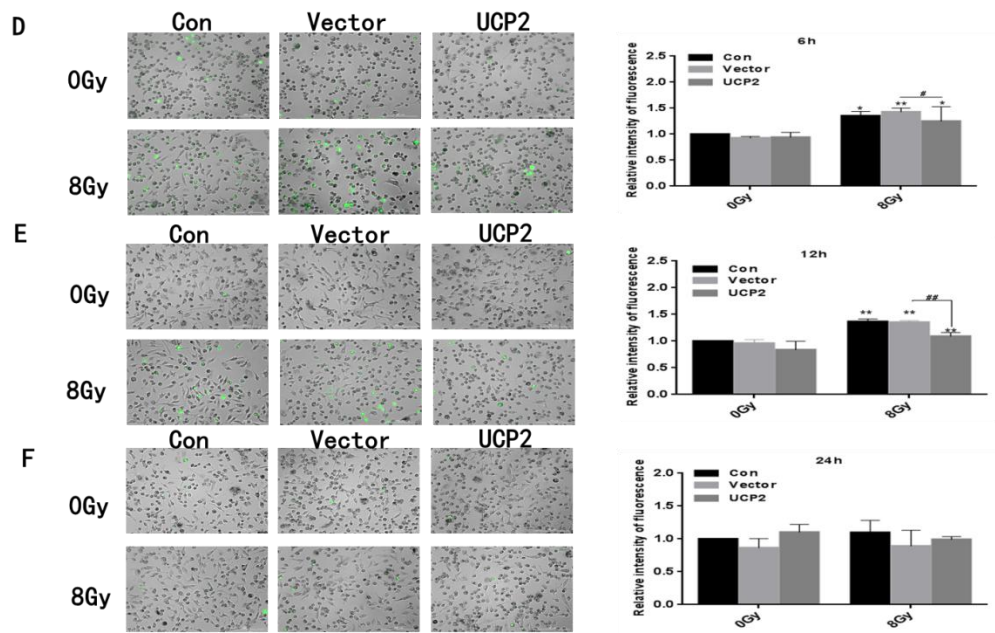


Figure3.7 Effects of UCP2 on ROS in radiation-induced cervical cancer cells

(A、B、C) Change in intracellular ROS at 6 h ,12 h and 24 h of Hela cells after irradiation
 (D、E、F) Change in intracellular ROS at 6 h ,12 h and 24 h of Caski cells after irradiation
 (n=3, $\bar{x} \pm s$; *P<0.05, **P< 0.01 vs Con, # P< 0.05 vs 4Gy siNC or 8Gy Vector)

3.2.4 UCP2 对辐射诱导的宫颈癌细胞的线粒体膜电位的影响

UCP2 作为质子转运载体可以增强线粒体内膜质子渗漏过程，而此过程与线粒体膜电位的形成息息相关。我们使用罗丹明 123 检测了两种细胞不同处理组间的膜电位变化，图 3.8 中纵坐标所示荧光强度与膜电位成反比。如图 3.8 A 所示，Hela 细胞在经过辐照后 6、12、24 h，辐照组线粒体膜电位相较于未辐照组均有较为明显下降($P<0.05$)。并且在辐照后 6 h，辐照组中，UCP2 沉默后线粒体膜电位相较于阴性对照组有较大程度的增高($P<0.05$)，我们推测此时为 UCP2 被沉默后质子渗漏过程减弱所致，但在辐照后 12 h 以及 24 h，以上趋势被逆转，此时应该与沉默 UCP2 后早期膜电位升高促进 ROS 的生成，生成的 ROS 作用于线粒体内膜，使内膜通透性增强，质子回流导致的膜电位降低有关。与此同时，我们也检测了经过照射后 6、12、24 h Caski 细胞的膜电位，结果如图 3.8 B 所示，辐照后的 Caski 细胞相较于未辐照组膜电位明显降低($P<0.05$)，并且辐照后各时间

点 UCP2 过表达组相较于阴性对照组都一直处于降低状态($P<0.05$), 关于流式原始图片见附图 S1, S2。即 UCP2 过表达增强了细胞的质子渗漏过程, 降低了线粒体内膜两侧的势能差, 即降低了膜电位。

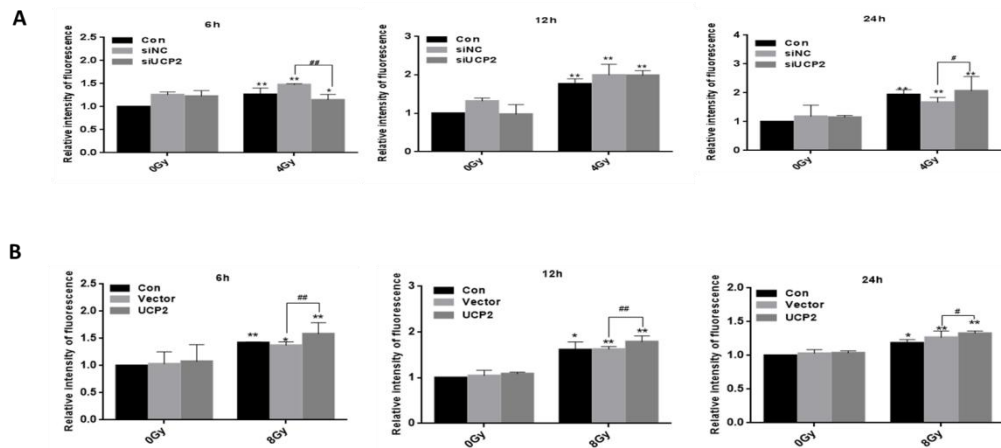


Figure3.8 Change in mitochondrial membrane potential after irradiation in cervical cancer cells

(A) Change in imitochondrial membrane potentia at 6 h ,12 h and 24 h of HeLa cells after irradiation (B) Change in imitochondrial membrane potentia at 6 h ,12 h and 24 h of Caski cells after irradiation($n=3$, $\bar{x} \pm s$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Con, # $P<0.05$ vs 4Gy siNC or 8Gy Vector)

3.2.5 UCP2 对辐射诱导的宫颈癌细胞线粒体膜完整性的影响

以上结果证明宫颈癌细胞中 UCP2 表达改变后, 线粒体膜电位发生了变化, 为探究是否会引起线粒体结构的改变, 我们使用 Mito-tracker Green^{FM} 对细胞进行染色后, 来检测细胞的线粒体膜的完整性, 线粒体膜完整性与图 3.9 中的荧光强度成正比。结果如图 3.9 A 所示, 未照射组细胞的荧光强度较强, 即未辐照组的细胞线粒体膜均较为完整, 照射组细胞荧光强度相较于未照射组荧光强度明显降低 ($P<0.05$), 即辐照后细胞线粒体膜完整性降低, 并且辐照组沉默 UCP2 后的 HeLa 细胞的线粒体膜完整性相较于阴性对照组明显降低, 即 UCP2 沉默后增强辐射对于 HeLa 细胞线粒体结构的损伤; 经染色后发现, 照射组的 Caski 细胞荧光强度相较于未照射组明显降低, 即辐照对于 Caski 细胞有较为明显的杀伤作用, 然而照射组中, UCP2 过表达的 Caski 细胞的荧光强度相较于阴性对照组有较为

明显的升高,即UCP2过表达后辐射诱导的Caski细胞线粒体膜完整性相较于阴性对照组有所提高(图3.9B),即UCP2的过表达可能减弱了辐射对于宫颈癌细胞的杀伤作用,产生了辐射抵抗,减弱了Caski细胞的辐射敏感性。

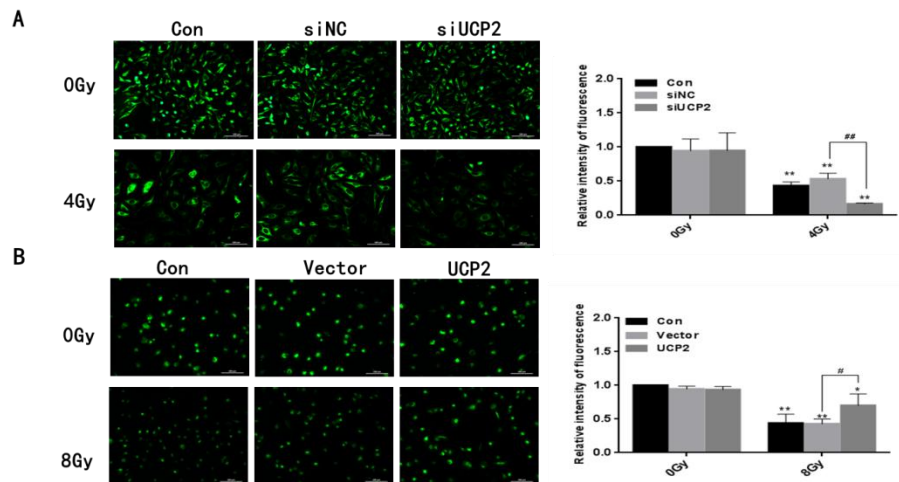


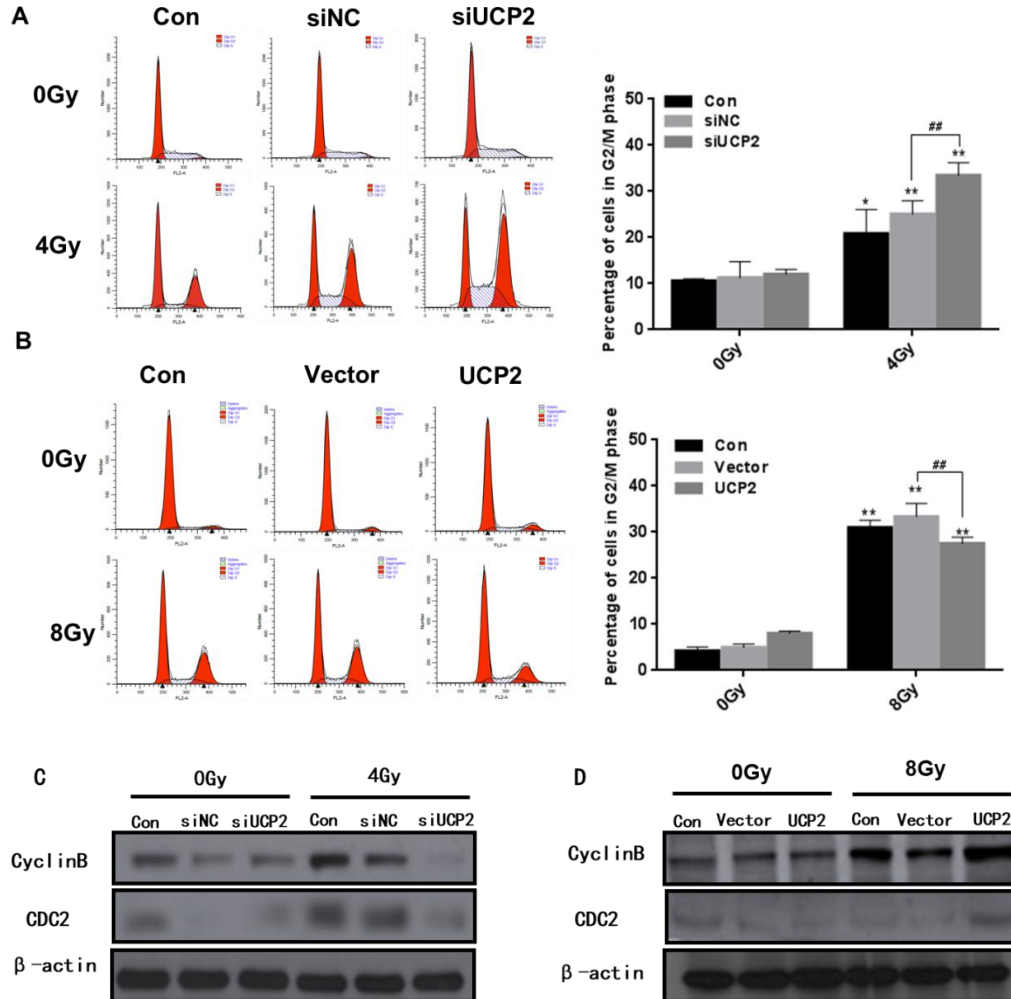
Figure3.9 Effect of UCP2 on mitochondrial membrane integrity of radiation-induced cervical cancer cells

(A) Changes of mitochondrial membrane integrity of HeLa cells (B) Changes of mitochondrial membrane integrity of Caski cells($n=3$, $\bar{x} \pm s$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Con, # $P<0.05$ vs 4Gy siNC or 8Gy Vector)

3.3 UCP2 对辐射诱导的宫颈癌细胞周期影响及相关机制

利用流式细胞术检测细胞周期发现,HeLa 细胞在经过照射后,辐照组细胞相较于未辐照组细胞会出现较为明显的 G2 期阻滞($P<0.05$),并且发现在辐照组中,G2 期阻滞在沉默组相较于阴性对照组更为明显 ($P<0.05$),即沉默 UCP2 增强了辐射诱导的 HeLa 细胞的 G2 期阻滞 (图 3.10 A); 并且经过照射后的 Caski 细胞相较于未辐照组 G2 期也有较大程度增高 ($P<0.05$),并且辐照后的 UCP2 过表达组细胞的 G2 期阻滞相较于辐照后阴性对照组有所降低 ($P<0.05$) (图 3.10 B)。Western Blot 检测 G2 期检查点相关蛋白 CyclinB、CDC2 在辐照前后的变化时也发现,二者的蛋白水平在 HeLa 细胞辐照组中 UCP2 沉默后较阴性对照组降低(图 3.10 C 和 E)。并且辐照后 UCP2 过表达的 Caski 细胞中的 CyclinB、CDC2 蛋白

水平相较于辐照后阴性对照组有一定程度的增加（图 3.10 D 和 F），即 UCP2 会通过影响辐射诱导的宫颈癌细胞周期来影响细胞的辐射敏感性。



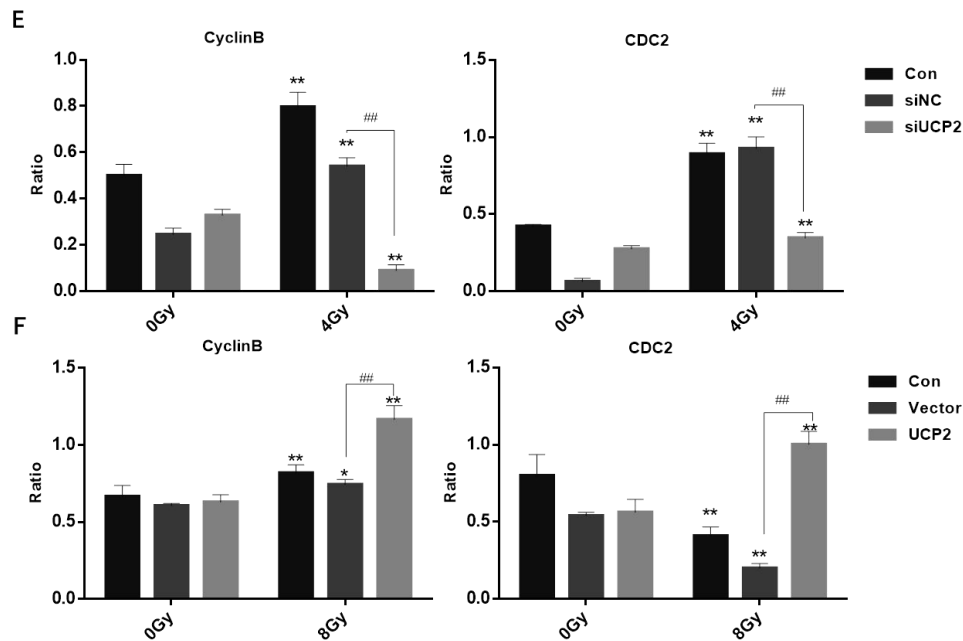


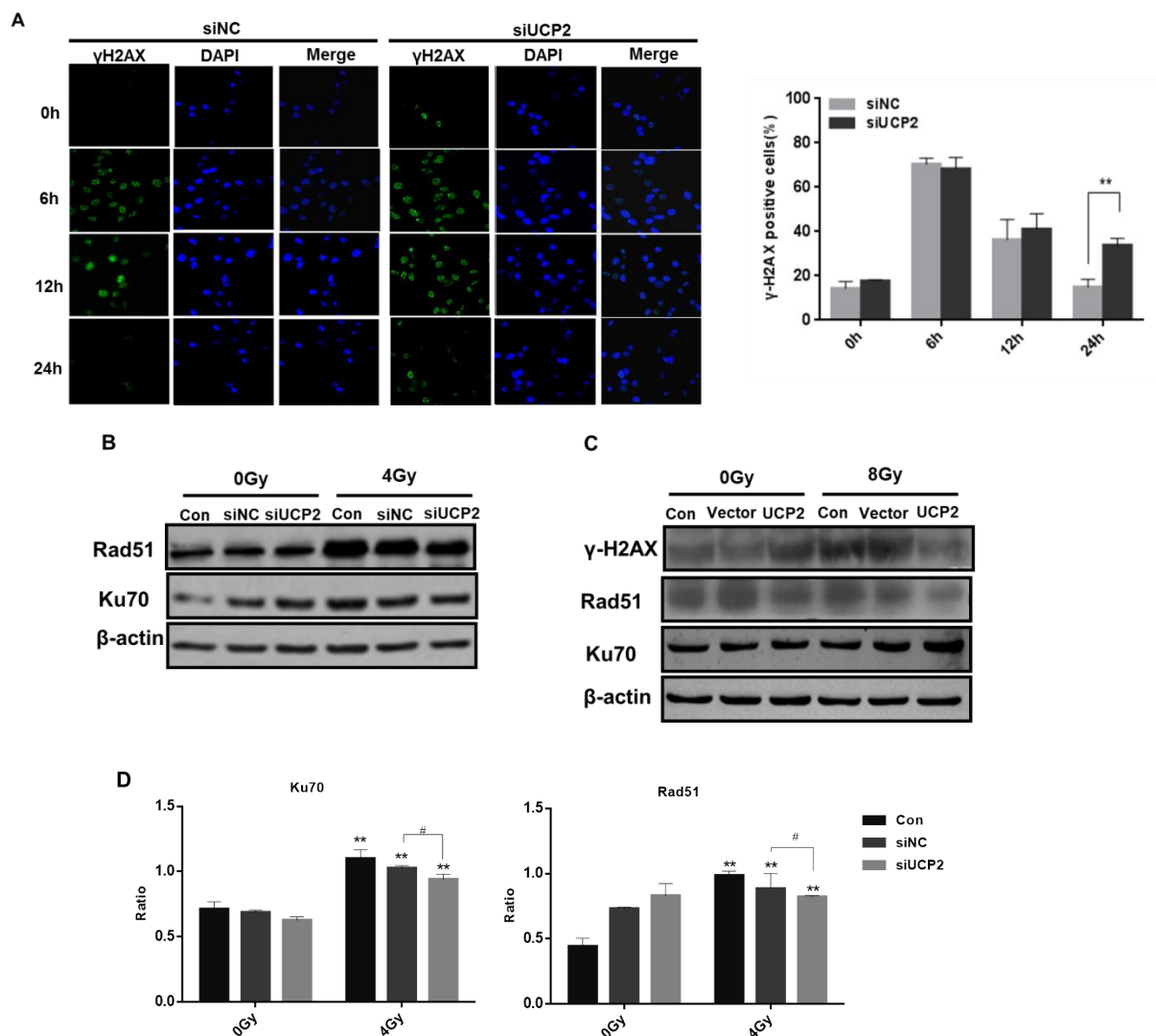
Figure 3.10 Effect of UCP2 on the cycle of radiation-induced cervical cancer cells

(A) Flow cytometry of HeLa cells after UCP2 knockdown with or without irradiation (B) Flow cytometry of Caski cells after UCP2 knockdown with or without irradiation (C) Western blots of cyclin B, CDC2, and the β -actin loading control expression of HeLa cells (D) Western blots of cyclin B, CDC2, and the β -actin loading control expression of Caski cells (E) Relative protein amount of cyclin B, CDC2 of HeLa cells (F) Relative protein amount of cyclin B, CDC2 of Caski cells ($n=3$, $\bar{x} \pm s$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Con, # $P < 0.05$ vs 4 Gy siNC or 8 Gy Vector)

3.4 UCP2 对辐射诱导的宫颈癌细胞 DNA 损伤修复影响及相关机制

为进一步探究 UCP2 影响宫颈癌细胞辐射敏感性的机制, 我们利用免疫荧光实验对 HeLa 细胞辐照后不同时间点的与 DNA 损伤相关蛋白 γ -H2AX 进行检测, 结果如图 3.11 A 所示, 在辐照后 6、12、24 h 时间点的 γ -H2AX 焦点形成相较于未照射组明显增加, 并且在辐照后 6、12 h 增加最为明显, 但辐照后 6 h 时 UCP2 沉默组与阴性对照组的 γ -H2AX 焦点形成无较大差异, 12 h 时沉默 UCP2 组 γ -H2AX 焦点形成相较于阴性对照组增多, 但并无统计学意义, 而辐照后 24 h γ -H2AX 焦点形成虽相较于 6 h 和 12 h 有所减少, 但可以观察到, 沉默 UCP2

后的焦点形成明显多于阴性对照组 ($P<0.05$), 并且 Western Blot 实验也发现与 DNA 修复相关蛋白 Ku70、Rad51 在辐照后的 HeLa 细胞中沉默组中相较于阴性对照组有所降低, 即 UCP2 沉默增强了辐射诱导的 HeLa 的 DNA 损伤, 并且延迟了 DNA 损伤后的修复 (图 3.11 B 和 D); 与此同时 Western Blot 结果也发现 Caski 细胞在辐照后 12 h γ -H2AX 的蛋白水平在 UCP2 过表达后相较于阴性对照组有所降低, 即 UCP2 过表达可能减弱了辐射对于 Caski 细胞的损伤, 与 DNA 修复相关蛋白 Ku70 的表达在辐照后 UCP2 过表达组相较于阴性对照组有所升高, 而 Rad51 蛋白表达却在辐照后 UCP2 过表达组降低, 需进一步探究产生相关现象产生的机制 (图 3.11 C 和 E)。综上所述, UCP2 会影响辐射诱导的宫颈癌细胞的 DNA 损伤及修复。



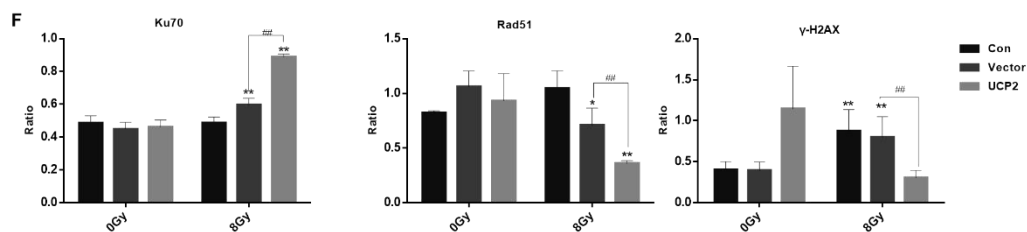


Figure3.11 Effects of UCP2 on DNA damage repair and related proteins induced by radiation in cervical cancer cells

(A) γ H2AX expression assayed by immunofluorescence (B) Western blots of Ku70, Rad51, and the β -actin loading control of Hela cells (C) Western blots of Ku70, Rad51, and the β -actin loading control of Caski cells (D) Relative protein amount of Ku70 and Rad51 of Hela cells (E) Relative protein amount of γ H2AX, Ku70 and Rad51 of Caski cells($n=3$, $\bar{x} \pm s$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Con, # $P<0.05$ vs 4Gy siNC or 8Gy Vector)

附图

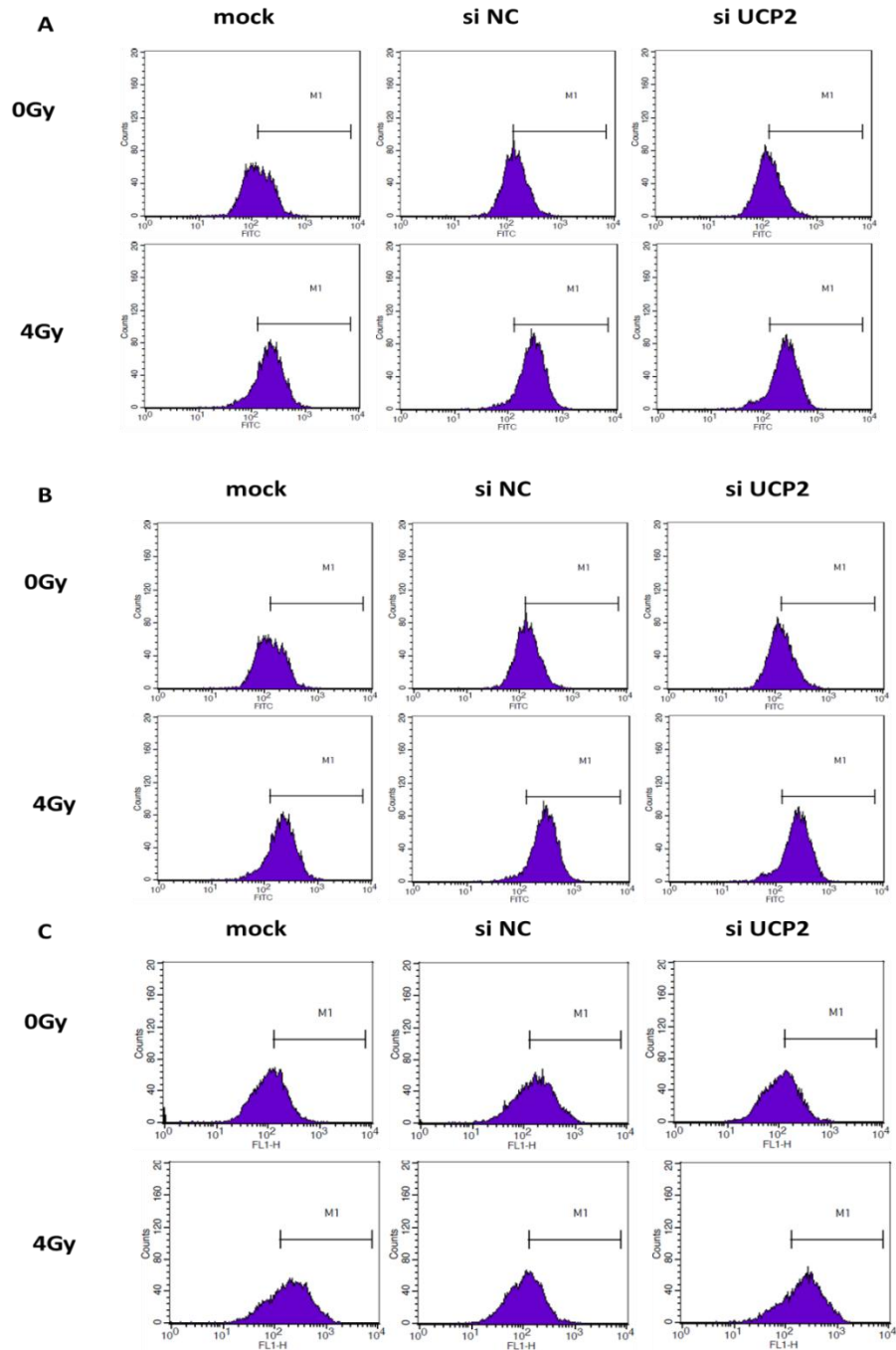


图 S1 辐照后不同时间点 HeLa 细胞各处理组线粒体膜电位的变化

(A) 辐照后 6 h HeLa 细胞线粒体膜电位的变化

(B) 辐照后 12 h HeLa 细胞线粒体膜电位的变化

(C) 辐照后 24 h HeLa 细胞线粒体膜电位的变化

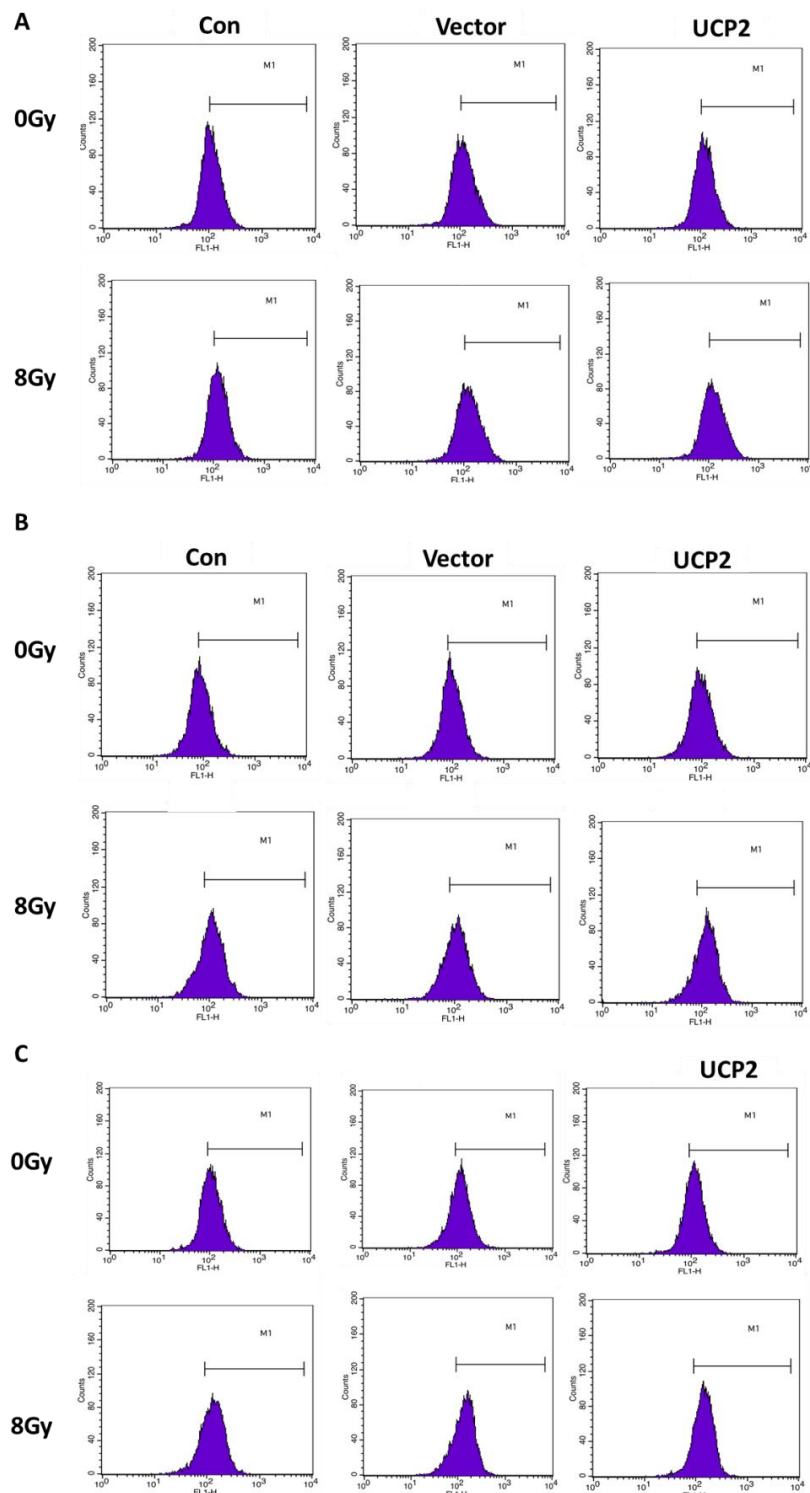


图 S2 辐照后不同时间点 Caski 细胞各处理组线粒体膜电位的变化

(A)辐照后 6 h Caski 细胞线粒体膜电位的变化

(B)辐照后 12 h Caski 细胞线粒体膜电位的变化

(C)辐照后 24 h Caski 细胞线粒体膜电位的变化

第4章 讨论

宫颈癌是全世界女性中最常见的癌症之一，每年约有 52 万名女性被诊断出患有宫颈癌，其中 26 万人死于这种疾病。宫颈癌的发病率和病死率在发展中国家较高，原因多数是医疗服务不足，医疗资源有限等^[79]。而放疗是治疗宫颈癌的主要手段之一，虽然可以显著提高患者的生存率，但由于放抵抗的存在，即患者的放疗敏感性降低，并且局部复发仍很常见，导致预后较差^[80]。因此探究辐射敏感性相关机制及寻找相关标志物对提高宫颈癌放疗效果显得尤为重要。

UCP2 作为一种线粒体质子转运载体，可以促使细胞中线粒体内膜质子发生渗漏过程。正常细胞通过氧化糖类分子释放出供应细胞活动所需能量，此过程中产生的 NADH 和 FADH 释放出电子进入电子传递链，在电子传递过程中产生的质子可以被泵出线粒体内膜进入线粒体膜间隙，使线粒体内膜两侧形成势能差，即线粒体膜电位，随着膜电位的升高，可以促进线粒体内 ROS 的生成。而在肿瘤细胞中由于 UCP2 高表达，可以促进质子渗漏过程的产生，使产生势能差的质子泵入线粒体内膜内，膜电位降低，导致 ROS 生成减少，使肿瘤细胞达到抗氧化的作用。

本研究以两种宫颈癌细胞 Hela 和 Caski 作为主要研究对象，分别探究 UCP2 沉默或过表达联合电离辐射后对其辐射敏感性的影响及线粒体相关机制，旨在为优化宫颈癌个体治疗方案，使 UCP2 成为宫颈癌临床治疗的新靶点提供可靠基础数据支持。

4.1 UCP2 对辐照前后宫颈癌细胞的增殖存活能力的影响

UCP2 常在各种病理条件下表达升高，肿瘤细胞一般存在较高的氧化应激，而肿瘤细胞内 ROS 水平在一定范围内的升高在肿瘤的进展、增殖和分化中起着重要作用。由于 UCP2 可以影响细胞内 ROS 的水平，因此推测它可能与肿瘤的发生有关^[81]。有一项研究表明，UCP2 基因敲除通过增加 ROS 产生来促使乳腺癌细胞对化疗药物敏感，从而提示 UCP2 表达水平与氧化应激之间存在相互作用^[82]。并且有研究发现，敲除 UCP2 可以抑制皮肤癌的形成，提示 UCP2 可能是一

种肿瘤促进因子,促进肿瘤细胞的生长与增殖。UCP2 在肿瘤细胞中高表达的原因可能会促进细胞生长,诱导化疗耐药的形成,也可能与肿瘤细胞新陈代谢之间存在联系^[54, 83-85]。Z.Derdak 和 Dalla Pozza 等人分别在 2008 年和 2012 年证明了 UCP2 的过表达促进了化疗耐药性的产生^[50, 86]。以上报道可以看出,UCP2 的表达与癌细胞的化疗耐药之间存在着和较为密切的关系,化疗和放疗同为癌症治疗的主要手段,而 UCP2 在放疗中的作用及机制却鲜有报道。

因此,本研究首先通过集落形成实验发现了 UCP2 沉默后的 HeLa 细胞的辐射敏感性相较于阴性对照组明显增强,并且 CCK-8 实验也证明 UCP2 沉默后联合 X 线照射的 HeLa 细胞的增殖活性明显降低,由此说明 UCP2 与宫颈癌细胞的辐射敏感性之间存在相关关系。

4.2 UCP2 与辐射诱导的宫颈癌细胞凋亡关系及线粒体相关机制

有许多研究表明 UCP2 在癌细胞中高表达,例如在结肠癌细胞中表达显著增高^[87],可能与 UCP2 减少 ROS 的产生有关,ROS 产生减少导致细胞内线粒体的氧化应激减弱^[88],保护肿瘤细胞免受损伤,促进肿瘤的进展。并且也已有研究发现 UCP2 在肿瘤发展某些阶段呈活跃或过度表达的状态,通过负调控线粒体 ROS 的生成来保护癌细胞免受氧化应激导致的凋亡^[87]。后来也有相关文献支持此结论:Kuai 等人通过过表达 UCP2 后验证了 UCP2 可以减少人结肠癌细胞中线粒体超氧离子的产生^[86, 89]。

细胞凋亡是细胞为维持自身内环境稳态,由基因控制的自主有序的细胞死亡程序。目前发现的细胞凋亡主要由两种通路介导:一种是膜受体介导的凋亡通路,一种是线粒体介导的凋亡通路,由于 UCP2 是一种线粒体内膜蛋白以及其主要功能为介导线粒体质子渗漏过程,本文着重探讨线粒体相关的凋亡通路。线粒体介导的凋亡通路可以由多种因素启动,如高水平的细胞质 Ca^{2+} , ROS, 促凋亡的 Bcl-2 家族蛋白的激活, Cyt-c 等凋亡诱导因子的释放,并且这些因子在随后的凋亡级联反应中起着重要作用,并且可以使线粒体外膜非特异性解体,从而导致的膜通透性增加,即线粒体膜完整性减弱,导致凋亡相关因子的释放^[90]。膜通透性改变调节细胞凋亡的关键是促凋亡和抗凋亡的 Bcl-2 家族蛋白之间的平衡,已经

证明, 促凋亡蛋白占优势时, 线粒体膜外膜(OMM)上可以形成释放细胞色素的孔结构。如果抗凋亡蛋白占优势, 这种现象则可以逆转, 此外, UCP2 的过表达有助于 Bcl-2 在线粒体上的富集^[91]。UCP2 是一种抗氧化的线粒体蛋白, 抑制其表达则会导致氧化应激^[92], 对于癌细胞来说, 氧化应激的增强无疑是一场灾难。并且也有相关实验表明 UCP2 被抑制后, 线粒体膜电位会呈现出短暂的上升^[92]。Qiao 等人发现抑制 UCP2 表达后会促进 caspase 级联和线粒体通透性转变诱导细胞凋亡, 并且观察到细胞色素 c (Cyt-c) 从线粒体向胞浆的释放^[53]。

本文首先发现沉默 UCP2 后可以促进辐射诱导的 Hela 细胞的凋亡以及 UCP2 过表达的可以促使 Caski 细胞对电离辐射产生抗凋亡作用, 进一步探究相关机制发现沉默 UCP2 后线粒体的膜电位出现暂时的升高并快速崩溃, 并且导致线粒体膜完整性减弱, 从而导致辐射诱导的 Hela 细胞的促凋亡相关蛋白 Cleaved-Caspase3 和 Cleaved-Capase9 的增加, 降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 以及 Bal-x1 的水平, 同样也检测到与凋亡小体形成相关蛋白 Cyt-c 和 Apaf-1 的增加, 过表达组的 Caski 细胞也观察到 UCP2 过表达后降低线粒体膜电位, 减弱了电离辐射对于线粒体膜的破坏。未观察到以上相关蛋白的预期全部变化, 但部分结果具有一定的参考价值, 综合来看, UCP2 的确会直接或间接影响辐射对于细胞内线粒体凋亡通路的激活。

4.3 UCP2 对辐射诱导的宫颈癌细胞周期影响及相关机制

许多细胞毒剂或微管靶向剂, 也包括电离辐射通过导致细胞周期 G0 期、S 期或 G2/M 期阻滞来抑制肿瘤细胞的增殖^[93-95]。使用 ¹²⁵I 可以增加细胞凋亡和 G2/M 期阻滞, 同样, 使用高剂量率 ¹²⁵I 作用于 V79 细胞的应用超分割的体外模型已经证明产生 G2 积聚并降低细胞存活率。G2/M 期阻滞细胞, 随后增殖率显著下降, 因为在这种情况下, 有丝分裂可能由于 Chk2 促进的损伤检查点的延迟而受损, 以帮助受辐射的细胞触发 DNA 修复机制, 若及时而准确的修复, 则会使细胞恢复到健康状态, 若损伤细胞经历了不完整的 DNA 修复, 则损伤会随细胞分裂逐渐积累, 进而导致细胞走向死亡, 这反过来又会损害肿瘤细胞的发展^[16, 96-98]。

当 DNA 受损时, G2 期检查点防止细胞进入有丝分裂,并确保基因组的无差错拷贝传播到每个子细胞。Cdk1 (CDC2) /Cyclin B1 复合体通过调节蛋白的磷酸化或去磷酸化来控制细胞周期从 G2 期到 M 期的进程^[99]。UCP2 作为阴离子载体蛋白可以减弱细胞内 ROS 的生成, ROS 水平的不同可以通过影响肿瘤细胞的细胞周期来改变细胞的生存。Wang 等人于 2016 年发现毛兰素可以通过通过 ROS/JNK 信号通路在体外和体内诱导人骨肉瘤细胞的 G2/M 期阻滞达到治疗效果^[100], 2017 年 Shi 等人发现喹唑啉类药物可以通过促进 A549 肺癌细胞内 ROS 的产生来增强 G2/M 细胞周期阻滞的新型治疗机制^[55], 同年 Li 等人发现小豆蔻素可以通过抑制鼻咽癌 NF-kappaB 通路, 诱导 ROS 介导的 G2/M 期阻滞^[55], 可见 ROS 对细胞周期影响不容忽视。

本研究中,发现电离辐射作用于宫颈癌细胞后会促进线粒体以及其他细胞器内 ROS 的产生,而在沉默 UCP2 后又会进一步促进 ROS 的生成,造成 ROS 存于细胞的时间增长,使电离辐射诱导 G2 期阻滞增强;反之,在辐射诱导的过表达 UCP2 的 Caski 细胞中观测到,ROS 生成量相较于阴性对照组有所减少,并且电离辐射诱导的 G2 期阻滞呈现出一定程度的减弱,并且在两组细胞中分别观察到了 CDC2/CyclinB 的相应变化。即 UCP2 可以通过影响细胞周期来调节宫颈癌细胞对于电离辐射的敏感性,并且 UCP2 参与调节辐射诱导的宫颈癌细胞的 G2 期阻滞的现象极大可能依赖于细胞内 ROS 的水平变化。

4.4 UCP2 对辐射诱导的宫颈癌细胞 DNA 损伤修复影响及相关机制

细胞内的 DNA 能够受到多种环境因素和细胞内代谢产物的持续破坏。修复 DNA 损伤的能力是有机体生存的基础,生物体的基因组稳定性由几种修复机制共同维持,包括碱基切除修复(BER)、核苷酸切除修复(NER)、错配修复(MMR)、非同源末端连接(NHEJ)、同源重组(HR)和直接逆转(DR)修复^[101]。除细胞核内 DNA 之外,线粒体 DNA 是 ROS 的主要攻击靶标,由于线粒体 DNA 内的组蛋白缺乏以及 DNA 修复能力有限,线粒体 DNA 损伤比和细胞核内 DNA 损伤更广泛,从而会导致线粒体出现一系列结构与功能的改变^[102, 103]。有些研究发现抗癌

药物阿霉素、顺铂、紫杉醇均通过诱导 ROS 生成来抑制癌细胞的生长，从而引起 DNA 氧化损伤，最终导致细胞凋亡。ROS 诱导的 DNA 的氧化损伤，包括链断裂和碱基和核苷酸修饰，特别是在鸟苷含量较高的序列中^[104]，ROS 诱导的氧化损伤更为明显。NER 途径可以去除紫外线诱导的损伤，以及由环境诱变剂和一些化疗药物引起的 DNA 中的巨大损伤^[105]。而 DNA 双链断裂(DSB)由于暴露在紫外线、电离辐射或烷化剂的极端损伤下而产生，可由 HR 或 NHEJ 修复。HR 过程修复是一条无错误的途径，因为受损的链和模板链之间需要同源序列，而 NHEJ 是一种替代的容易出错的途径，因为修复过程中未使用同源模板链^[106]，而组蛋白去乙酰化酶则可以通过促进双链断裂修复来调节染色质并参与 DNA 损伤反应(DDR)^[107]。因此，DNA 的损伤与修复在机体内中起着非常重要的作用，并且有研究已经证明 DNA 损伤与许多疾病，包括人类的一些遗传性疾病、神经退行性疾病、癌症和衰老等有关^[108-110]。若 DNA 修复机制不完善，则会导致机体细胞走向衰老或死亡。

本次研究中发现电离辐射对于沉默 UCP2 后的 Hela 细胞 DNA 损伤能力相较于阴性对照组的 Hela 细胞更强，即沉默 UCP2 后增强了电离辐射对细胞的 DNA 损伤，并且减弱了 DNA 修复能力，由此加重了电离辐射对于 Hela 细胞的损伤；而过表达的 Caski 细胞也有部分实验结果可以证明 UCP2 减弱了电离辐射对于宫颈癌细胞的杀伤作用。这就更加明确了一点，UCP2 的确在宫颈癌细胞的辐射敏感性中存在着举足轻重的作用。

总之，UCP2 作为宫颈癌细胞中的一种辐射诱导基因，在细胞的增殖、凋亡、周期以及 DNA 损伤中起着重要的作用，希望本研究可以为宫颈癌的临床放疗新思路提供一定的理论支持。

第5章 结 论

1. 电离辐射可以诱导宫颈癌细胞中UCP2 的表达；

2. UCP2 可以影响电离辐射诱导宫颈癌细胞内ROS的产生，即沉默UCP2 会促进辐射诱导的Hela细胞的ROS生成，UCP2 过表达则会一定程度减弱辐射诱导的Caski细胞的ROS生成能力；

3. UCP2 可以引起辐射诱导的宫颈癌细胞内线粒体部分结构与功能的变化，以线粒体膜电位和膜完整性为主，即UCP2 沉默后在辐照后前期会增高线粒体膜电位，在辐照后期降低线粒体膜电位，并且增强电离辐射对于细胞的线粒体膜的损伤，促进线粒体诱导的凋亡通路的激活；UCP2 过表达后会降低辐射诱导的宫颈癌细胞的线粒体膜电位，并且减弱电离辐射对于线粒体膜的损伤，减弱线粒体诱导的凋亡通路的激活；

4. UCP2 可以引起电离辐射诱导的宫颈癌细胞细胞周期发生改变，以G2 期阻滞最为显著，即UCP2 沉默可以促进辐射诱导的宫颈癌细胞G2 阻滞，UCP2 过表达则会相应减弱阻滞作用；

5. 以上凋亡通路的激活的机制大部分可以归结于UCP2 对宫颈癌细胞内ROS的生成变化，并且生成的ROS产生间接影响了辐射诱导的宫颈癌细胞的DNA损伤及修复，即UCP2 沉默会增强电离辐射对于宫颈癌细胞的DNA损伤，减弱其修复能力；UCP2 过表达会减弱电离辐射对于DNA的损伤，部分增强DNA损伤修复能力。

总之，UCP2 在宫颈癌细胞的辐射敏感性中起着非常重要的作用，有望成为宫颈癌放射治疗的新靶点。

参考文献

- [1] Bartelink H., Horiot J.C., Poortmans P., et al. Recurrence rates after treatment of breast cancer with standard radiotherapy with or without additional radiation[J]. N Engl J Med, 2001, 345(19): 1378-1387.
- [2] Bernier J., Hall E.J., Giaccia A. Radiation oncology: a century of achievements[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(9): 737-747.
- [3] Bernier J., Poortmans P.M. Surgery and radiation therapy of triple-negative breast cancers: From biology to clinics[J]. Breast, 2016, 28: 148-155.
- [4] Delaney G., Jacob S., Featherstone C., et al. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines[J]. Cancer, 2005, 104(6): 1129-1137.
- [5] Hubenak J.R., Zhang Q., Branch C.D., et al. Mechanisms of injury to normal tissue after radiotherapy: a review[J]. Plast Reconstr Surg, 2014, 133(1): 49e-56e.
- [6] Huber S.M., Butz L., Stegen B., et al. Ionizing radiation, ion transports, and radioresistance of cancer cells[J]. Front Physiol, 2013, 4: 212.
- [7] Dauer L.T., Brooks A.L., Hoel D.G., et al. Review and evaluation of updated research on the health effects associated with low-dose ionising radiation[J]. Radiat Prot Dosimetry, 2010, 140(2): 103-136.
- [8] Saha S., Woodbine L., Haines J., et al. Increased apoptosis and DNA double-strand breaks in the embryonic mouse brain in response to very low-dose X-rays but not 50 Hz magnetic fields[J]. J R Soc Interface, 2014, 11(100): 20140783.
- [9] Thopan P., Yu L., Brown I.G., et al. Low-Energy Ion-Species-Dependent Induction of DNA Double-Strand Breaks: Ion Energy and Fluence Thresholds[J]. Radiat Res, 2017, 188(4): 426-432.
- [10] Van Der Schans G.P. Gamma-ray induced double-strand breaks in DNA resulting from randomly-inflicted single-strand breaks: temporal local denaturation, a new radiation phenomenon?[J]. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med, 1978, 33(2): 105-120.

- [11] Collis S.J., Schwaninger J.M., Ntambi A.J., et al. Evasion of early cellular response mechanisms following low level radiation-induced DNA damage[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(48): 49624-49632.
- [12] Sak A., Stuschke M. Use of gammaH2AX and other biomarkers of double-strand breaks during radiotherapy[J]. *Semin Radiat Oncol*, 2010, 20(4): 223-231.
- [13] Lewanski C.R., Gullick W.J. Radiotherapy and cellular signalling[J]. *Lancet Oncol*, 2001, 2(6): 366-370.
- [14] Lowndes N.F. DNA-damage signaling and apoptosis[J]. *Genome Biol*, 2001, 2(11): Reports4028.
- [15] Villanueva M.T. DNA repair: a new tool to target DNA repair[J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(3): 136.
- [16] Geraldo J.M., Scalzo S., Reis D.S., et al. HDR brachytherapy decreases proliferation rate and cellular progression of a radioresistant human squamous cell carcinoma in vitro[J]. *Int J Radiat Biol*, 2017, 93(9): 958-966.
- [17] Kim J.G., Yi J.M., Park S.J., et al. Histone demethylase JMJD2B-mediated cell proliferation regulated by hypoxia and radiation in gastric cancer cell[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1819(11-12): 1200-1207.
- [18] Li W., Zhao L., Zang W., et al. Histone demethylase JMJD2B is required for tumor cell proliferation and survival and is overexpressed in gastric cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 416(3-4): 372-378.
- [19] Pawlik T.M., Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, 59(4): 928-942.
- [20] Brenner D.J., Hlatky L.R., Hahnfeldt P.J., et al. A convenient extension of the linear-quadratic model to include redistribution and reoxygenation[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1995, 32(2): 379-390.
- [21] Qu J., Lu W., Li B., et al. WWOX induces apoptosis and inhibits proliferation in cervical cancer and cell lines[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(5): 1139-1147.
- [22] Wu S.F., Zhang J.W., Qian W.Y., et al. Altered expression of survivin, Fas and FasL contributed to cervical cancer development and metastasis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2012, 16(15): 2044-2050.

- [23] Gustafsson L., Ponten J., Bergstrom R., et al. International incidence rates of invasive cervical cancer before cytological screening[J]. *Int J Cancer*, 1997, 71(2): 159-165.
- [24] Obel J., Souares Y., Hoy D., et al. A systematic review of cervical cancer incidence and mortality in the Pacific Region[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(21): 9433-9437.
- [25] Piver M.S., Marchetti D.L., Patton T., et al. Radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy versus radiation therapy for small (less than or equal to 3 cm) stage IB cervical carcinoma[J]. *Am J Clin Oncol*, 1988, 11(1): 21-24.
- [26] Robbins M.E., Zhao W. Chronic oxidative stress and radiation-induced late normal tissue injury: a review[J]. *Int J Radiat Biol*, 2004, 80(4): 251-259.
- [27] Rose P.G., Bundy B.N., Watkins E.B., et al. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer[J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(15): 1144-1153.
- [28] Aquila H., Link T.A., Klingenberg M. Solute carriers involved in energy transfer of mitochondria form a homologous protein family[J]. *FEBS Lett*, 1987, 212(1): 1-9.
- [29] Kuan J., Saier M.H., Jr. The mitochondrial carrier family of transport proteins: structural, functional, and evolutionary relationships[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1993, 28(3): 209-233.
- [30] Palmieri F. The mitochondrial transporter family SLC25: identification, properties and physiopathology[J]. *Mol Aspects Med*, 2013, 34(2-3): 465-484.
- [31] Sreedhar A., Petruska P., Miriyala S., et al. UCP2 overexpression enhanced glycolysis via activation of PFKFB2 during skin cell transformation[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(56): 95504-95515.
- [32] Rial E., Gonzalez-Barroso M.M., Fleury C., et al. The structure and function of the brown fat uncoupling protein UCP1: current status[J]. *Biofactors*, 1998, 8(3-4): 209-219.
- [33] Fleury C., Neverova M., Collins S., et al. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia[J]. *Nat Genet*, 1997, 15(3): 269-272.
- [34] Cadenas S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection[J]. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 2018, 1859(9): 940-950.

- [35] de Souza B.M., Michels M., Sortica D.A., et al. Polymorphisms of the UCP2 Gene Are Associated with Glomerular Filtration Rate in Type 2 Diabetic Patients and with Decreased UCP2 Gene Expression in Human Kidney[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0132938.
- [36] Ji F., Shen T., Zou W., et al. UCP2 Regulates Embryonic Neurogenesis via ROS-Mediated Yap Alternation in the Developing Neocortex[J]. Stem Cells, 2017, 35(6): 1479-1492.
- [37] Mori S., Yoshizuka N., Takizawa M., et al. Expression of uncoupling proteins in human skin and skin-derived cells[J]. J Invest Dermatol, 2008, 128(8): 1894-1900.
- [38] Boss O., Samec S., Paoloni-Giacobino A., et al. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression[J]. FEBS Lett, 1997, 408(1): 39-42.
- [39] McBride S., Wei-LaPierre L., McMurray F., et al. Skeletal muscle mitoflashes, pH, and the role of uncoupling protein-3[J]. Arch Biochem Biophys, 2019, 663: 239-248.
- [40] Mao W., Yu X.X., Zhong A., et al. UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells[J]. FEBS Lett, 1999, 443(3): 326-330.
- [41] Yu X.X., Mao W., Zhong A., et al. Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation[J]. Faseb j, 2000, 14(11): 1611-1618.
- [42] Ramsden D.B., Ho P.W., Ho J.W., et al. Human neuronal uncoupling proteins 4 and 5 (UCP4 and UCP5): structural properties, regulation, and physiological role in protection against oxidative stress and mitochondrial dysfunction[J]. Brain Behav, 2012, 2(4): 468-478.
- [43] Li J., Jiang R., Cong X., et al. UCP2 gene polymorphisms in obesity and diabetes, and the role of UCP2 in cancer[J]. FEBS Lett, 2019, 593(18): 2525-2534.
- [44] Ledesma A., de Lacoba M.G., Rial E. The mitochondrial uncoupling proteins[J]. Genome Biol, 2002, 3(12): Reviews3015.
- [45] Warburg O., Wind F., Negelein E. THE METABOLISM OF TUMORS IN

- THE BODY[J]. *J Gen Physiol*, 1927, 8(6): 519-530.
- [46] Li W., Nichols K., Nathan C.A., et al. Mitochondrial uncoupling protein 2 is up-regulated in human head and neck, skin, pancreatic, and prostate tumors[J]. *Cancer Biomark*, 2013, 13(5): 377-383.
- [47] Oleksiewicz U., Liloglou T., Tasopoulou K.M., et al. COL1A1, PRPF40A, and UCP2 correlate with hypoxia markers in non-small cell lung cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017, 143(7): 1133-1141.
- [48] Pitt M.A. Overexpression of uncoupling protein-2 in cancer: metabolic and heat changes, inhibition and effects on drug resistance[J]. *Inflammopharmacology*, 2015, 23(6): 365-369.
- [49] Donadelli M., Dando I., Dalla Pozza E., et al. Mitochondrial uncoupling protein 2 and pancreatic cancer: a new potential target therapy[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(11): 3232-3238.
- [50] Derdak Z., Mark N.M., Beldi G., et al. The mitochondrial uncoupling protein-2 promotes chemoresistance in cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(8): 2813-2819.
- [51] Robbins D., Zhao Y. New aspects of mitochondrial Uncoupling Proteins (UCPs) and their roles in tumorigenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(8): 5285-5293.
- [52] Su W.P., Lo Y.C., Yan J.J., et al. Mitochondrial uncoupling protein 2 regulates the effects of paclitaxel on Stat3 activation and cellular survival in lung cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(11): 2065-2075.
- [53] Qiao C., Wei L., Dai Q., et al. UCP2-related mitochondrial pathway participates in oroxylin A-induced apoptosis in human colon cancer cells[J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(5): 1054-1063.
- [54] Li W., Zhang C., Jackson K., et al. UCP2 knockout suppresses mouse skin carcinogenesis[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2015, 8(6): 487-491.
- [55] Bartolak-Suki E., Imsirovic J., Nishibori Y., et al. Regulation of Mitochondrial Structure and Dynamics by the Cytoskeleton and Mechanical Factors[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(8):
- [56] Chen X.J., Butow R.A. The organization and inheritance of the mitochondrial genome[J]. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(11): 815-825.
- [57] Sherratt H.S. Mitochondria: structure and function[J]. *Rev Neurol (Paris)*, 1991,

- 147(6-7): 417-430.
- [58] Poljsak B., Dahmane R. Free radicals and extrinsic skin aging[J]. *Dermatol Res Pract*, 2012, 2012: 135206.
- [59] Acharya A., Das I., Chandhok D., et al. Redox regulation in cancer: a double-edged sword with therapeutic potential[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2010, 3(1): 23-34.
- [60] Paulsen C.E., Carroll K.S. Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery[J]. *Chem Rev*, 2013, 113(7): 4633-4679.
- [61] Klaunig J.E., Xu Y., Isenberg J.S., et al. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis[J]. *Environ Health Perspect*, 1998, 106 Suppl 1: 289-295.
- [62] Prasad S., Yadav V.R., Ravindran J., et al. ROS and CHOP are critical for dibenzylideneacetone to sensitize tumor cells to TRAIL through induction of death receptors and downregulation of cell survival proteins[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(2): 538-549.
- [63] Barjaktarovic Z., Schmaltz D., Shyla A., et al. Radiation-induced signaling results in mitochondrial impairment in mouse heart at 4 weeks after exposure to X-rays[J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e27811.
- [64] Bentzen S.M. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(9): 702-713.
- [65] Feinendegen L.E. Reactive oxygen species in cell responses to toxic agents[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2002, 21(2): 85-90.
- [66] Kam W.W., Banati R.B. Effects of ionizing radiation on mitochondria[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 65: 607-619.
- [67] Leach J.K., Van Tuyle G., Lin P.S., et al. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(10): 3894-3901.
- [68] Spitz D.R., Azzam E.I., Li J.J., et al. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2004, 23(3-4): 311-322.
- [69] Tulard A., Hoffschir F., de Boisferon F.H., et al. Persistent oxidative stress after ionizing radiation is involved in inherited radiosensitivity[J]. *Free Radic*

- Biol Med, 2003, 35(1): 68-77.
- [70] Yoshida T., Goto S., Kawakatsu M., et al. Mitochondrial dysfunction, a probable cause of persistent oxidative stress after exposure to ionizing radiation[J]. Free Radic Res, 2012, 46(2): 147-153.
- [71] Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome[J]. Nature, 1981, 290(5806): 457-465.
- [72] Clayton D.A. Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs[J]. Int Rev Cytol, 1992, 141: 217-232.
- [73] Singh G., Hauswirth W.W., Ross W.E., et al. A method for assessing damage to mitochondrial DNA caused by radiation and epichlorohydrin[J]. Mol Pharmacol, 1985, 27(1): 167-170.
- [74] Guliaeva N.A., Abdullaev S.A., Malakhova L.V., et al. [Reduction of the number of mutant copies of mitochondrial DNA in tissues of irradiated mice in the postradiation period][J]. Genetika, 2009, 45(7): 949-956.
- [75] Rogounovitch T.I., Saenko V.A., Shimizu-Yoshida Y., et al. Large deletions in mitochondrial DNA in radiation-associated human thyroid tumors[J]. Cancer Res, 2002, 62(23): 7031-7041.
- [76] Morales A., Miranda M., Sanchez-Reyes A., et al. Oxidative damage of mitochondrial and nuclear DNA induced by ionizing radiation in human hepatoblastoma cells[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1998, 42(1): 191-203.
- [77] Narayanan P.K., Goodwin E.H., Lehnert B.E. Alpha particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells[J]. Cancer Res, 1997, 57(18): 3963-3971.
- [78] Wu L.J., Randers-Pehrson G., Xu A., et al. Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(9): 4959-4964.
- [79] Laengsri V., Kerdpin U., Plabplueng C., et al. Cervical Cancer Markers: Epigenetics and microRNAs[J]. Lab Med, 2018, 49(2): 97-111.
- [80] Powell M.E. Modern radiotherapy and cervical cancer[J]. Int J Gynecol Cancer, 2010, 20(11 Suppl 2): S49-51.
- [81] Baffy G. Uncoupling protein-2 and cancer[J]. Mitochondrion, 2010, 10(3): 243-252.

- [82] Dan Dunn J., Alvarez L.A., Zhang X., et al. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis[J]. *Redox Biol*, 2015, 6: 472-485.
- [83] Pecqueur C., Alves-Guerra C., Ricquier D., et al. UCP2, a metabolic sensor coupling glucose oxidation to mitochondrial metabolism?[J]. *IUBMB Life*, 2009, 61(7): 762-767.
- [84] Samudio I., Fiegl M., McQueen T., et al. The warburg effect in leukemia-stroma cocultures is mediated by mitochondrial uncoupling associated with uncoupling protein 2 activation[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(13): 5198-5205.
- [85] Vozza A., Parisi G., De Leonardis F., et al. UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(3): 960-965.
- [86] Dalla Pozza E., Fiorini C., Dando I., et al. Role of mitochondrial uncoupling protein 2 in cancer cell resistance to gemcitabine[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(10): 1856-1863.
- [87] Derdak Z., Fulop P., Sabo E., et al. Enhanced colon tumor induction in uncoupling protein-2 deficient mice is associated with NF-kappaB activation and oxidative stress[J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27(5): 956-961.
- [88] Derdak Z., Garcia T.A., Baffy G. Detection of uncoupling protein-2 (UCP2) as a mitochondrial modulator of apoptosis[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 559: 205-217.
- [89] Lee K.U., Lee I.K., Han J., et al. Effects of recombinant adenovirus-mediated uncoupling protein 2 overexpression on endothelial function and apoptosis[J]. *Circ Res*, 2005, 96(11): 1200-1207.
- [90] McCommis K.S., Baines C.P. The role of VDAC in cell death: friend or foe?[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1818(6): 1444-1450.
- [91] Kroemer G., Reed J.C. Mitochondrial control of cell death[J]. *Nat Med*, 2000, 6(5): 513-519.
- [92] Dando I., Fiorini C., Pozza E.D., et al. UCP2 inhibition triggers ROS-dependent nuclear translocation of GAPDH and autophagic cell death in pancreatic adenocarcinoma cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(3): 672-679.
- [93] Mukhtar E., Adhami V.M., Mukhtar H. Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy[J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(2): 275-284.

- [94] Osawa T., Davies D., Hartley J.A. Mechanism of cell death resulting from DNA interstrand cross-linking in mammalian cells[J]. *Cell Death Dis*, 2011, 2: e187.
- [95] Rohrer Bley C., Furmanova P., Orlowski K., et al. Microtubule stabilising agents and ionising radiation: multiple exploitable mechanisms for combined treatment[J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(1): 245-253.
- [96] Fritz P., Weber K.J., Frank C., et al. Differential effects of dose rate and superfractionation on survival and cell cycle of V79 cells from spheroid and monolayer culture[J]. *Radiother Oncol*, 1996, 39(1): 73-79.
- [97] Heuskin A.C., Michiels C., Lucas S. Toward computer simulation of high-LET in vitro survival curves[J]. *Phys Med Biol*, 2013, 58(18): 6495-6510.
- [98] Wang Z.M., Lu J., Zhang L.Y., et al. Biological effects of low-dose-rate irradiation of pancreatic carcinoma cells in vitro using ¹²⁵I seeds[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(8): 2336-2342.
- [99] Stark G.R., Taylor W.R. Analyzing the G2/M checkpoint[J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 280: 51-82.
- [100] Wang H., Zhang T., Sun W., et al. Erianin induces G2/M-phase arrest, apoptosis, and autophagy via the ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(6): e2247.
- [101] Hoeijmakers J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer[J]. *Nature*, 2001, 411(6835): 366-374.
- [102] Kang D., Hamasaki N. Maintenance of mitochondrial DNA integrity: repair and degradation[J]. *Curr Genet*, 2002, 41(5): 311-322.
- [103] Kazak L., Reyes A., Holt I.J. Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(10): 659-671.
- [104] Burney S., Niles J.C., Dedon P.C., et al. DNA damage in deoxynucleosides and oligonucleotides treated with peroxynitrite[J]. *Chem Res Toxicol*, 1999, 12(6): 513-520.
- [105] Rastogi R.P., Richa, Kumar A., et al. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair[J]. *J Nucleic Acids*, 2010, 2010: 592980.
- [106] Chatterjee N., Walker G.C. Mechanisms of DNA damage, repair, and

- mutagenesis[J]. *Environ Mol Mutagen*, 2017, 58(5): 235-263.
- [107] Miller K.M., Tjeertes J.V., Coates J., et al. Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17(9): 1144-1151.
- [108] Baretti M., Le D.T. DNA mismatch repair in cancer[J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 189: 45-62.
- [109] Wilson D.M., 3rd, Bohr V.A. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2007, 6(4): 544-559.
- [110] Wojtczyk-Miaskowska A., Presler M., Michajlowski J., et al. Gene Expression, DNA Methylation and Prognostic Significance of DNA Repair Genes in Human Bladder Cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(6): 2404-2417.

机制研究，2015/1-2018/12，申延男，吉林大学

致 谢

三年时光说长不长，说短不短，仿佛自己还站在刚来学院的那个门口，看着这并不熟悉但又满是憧憬的地方，还有老师们面带微笑的脸庞，和当时面试的时候心情完全不同，现在只有对知识以及科研的一腔热血，准备在毕业之际能够有一技之长能够让着这三年无悔。转眼之间，这个时刻将要或已经到来，而三年前许下的一些诺言今天大部分已经实现，但有些虽然不如人意，那些经历也时时刻刻催促着我不断前进。在这里学到了不少实验以及写作技能，对于不善社交的自己也在这三年里认识并且结交了几个知心好友。回顾起来，这几年还算没有虚度。

感谢我的导师申延男在三年来的鞭策与指导，让我能够独立完成一件件或大或小的事情。同时感谢科室里的其他老师的帮助与支持。感谢李鑫和李远航师姐在学习和生活上的关心与帮助。感谢我的室友衣峻萱、扈月阳、白微，三年的友情，见证了彼此成长，一起分享喜悦，互相倾诉烦恼，在即将分别之际，更多的是不舍，愿每个人都有更加光明的未来。感谢我的家人在我生活上的支持，是你们让我在绝望之余还能重拾信心，不断前行。