

Ku70对同源重组修复蛋白 Rad51的调节作用

杜利清 刘强 王彦 徐畅 曹嘉 付岳 陈凤华 樊飞跃

【摘要】目的 研究非同源末端连接(NHEJ)蛋白 Ku70对同源重组(HR)修复蛋白 Rad51的调节作用,初步探讨HR与NHEJ间协同作用的机制。**方法** 采用Western blot法观察特异性增高和降低Ku70蛋白水平后Rad51蛋白表达水平的变化情况。**结果** 靶向Ku70基因小干扰RNA(siRNA)单纯转染组Rad51蛋白的表达水平较空白对照组明显下降;Ku70高表达载体PGCsi3.0-hKu70转染肿瘤细胞后,随着Ku70表达水平的升高,Rad51水平也随之升高。**结论** Ku70可能对Rad51有正调控作用,NHEJ可能通过Ku70对Rad51的调节来实现其与HR的协同作用。

【关键词】 DNA修复; Rad51重组酶; RNA,小分子干扰; Ku70

Regulation of homologous recombination repair protein Rad51 by Ku70 DU Li-qing, LIU Qiang, WANG Yan, XU Chang, CAO Jia, FU Yue, CHEN Feng-hua, FAN Fei-yue. Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China

Corresponding author: FAN Fei-yue, Email: fan_feiyue@yeah.net

【Abstract】 Objective To explore the regulative effect of non-homologous end joining (NHEJ) protein Ku70 on homologous recombination repair protein Rad51, and to investigate the synergistic mechanism of homologous recombination repair in combination with NHEJ. **Methods** Observed Rad51 protein expression after transfect Ku70 small interfering RNA or Ku70 plasmid DNA into tumor cells using Western blot. **Results** Expression of Rad51 was obviously reduced after pretreated with Ku70 small interfering RNA. And with the increasing expression of Ku70 protein after transfection of Ku70 plasmid DNA PGCsi3.0-hKu70 into tumor cell lines, the Rad51 protein expression was increased. **Conclusion** Ku70 protein has regulating effect on gene expression of Rad51, and it might participate in the collaboration between homologous recombination repair and NHEJ.

【Key words】 DNA repair; Rad51 recombinase; RNA, small interfering; Ku70

DNA双链断裂(double-strand break, DSB)是射线等外源性因素致DNA损伤中最严重的一种类型,机体为维护基因组的完整性,可启动两种不同的途径对DSB进行修复^[1]:非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)途径和同源重组(homologous recombination, HR)途径。虽然两者在修复DSB中均发挥着重要作用,但也存在着竞争和协同作用^[2]。Ku70(一种NHEJ蛋白)和Rad51(一种HR修复蛋白)分别是NHEJ和HR中的重要组成蛋白。

本研究以Ku70为靶点,通过调控Ku70蛋白表达水平来观察其对Rad51蛋白表达的影响,以期与研究NHEJ与HR的相互作用提供帮助。

1 材料与方法

1.1 细胞系和质粒

人胃腺癌细胞系SGC7901和人食管癌细胞系EC109为本实验室保存,人非小细胞肺癌细胞系H460由中国医学科学院生物技术研究所白利平博士惠赠,以上3种细胞系均采用含10%胎牛血清的RPMI1640培养基(美国Gibco公司)在37℃、5%CO₂条件下常规培养。真核细胞Ku70表达质粒PGCsi3.0-hKu70由本实验室构建,采用Lipofectamine™ 2000转染试剂(美国Invitrogen公司)进行肿瘤细胞瞬时转染。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2013.05.005

基金项目:教育部高等学校博士学科点专项基金(20121106-120043);中国医学科学院放射医学研究所学科发展基金(SF1208),专项基金(1335)

作者单位:300192天津,中国医学科学院放射医学研究所,天津市分子核医学重点实验室

通信作者:樊飞跃(Email: fan_feiyue@yeah.net)

1.2 细胞照射条件

肿瘤细胞均置于 ¹³⁷Cs γ 源(加拿大原子能有限公司)下照射, 源靶距为 30 cm, 剂量率为 0.793 Gy/min, 照射吸收剂量为 4 Gy。照射后细胞继续培养。

1.3 实验分组

为观察 Ku70 蛋白对 Rad51 蛋白表达水平的影响, 实验分为 4 组, 分别为空白对照组、单纯照射组(经 4 Gy γ 射线照射后 48 h 的细胞)、靶向 Ku70 基因小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)单纯转染组(靶向 Ku70 基因 siRNA 转染 48 h 后的细胞)、靶向 Ku70 基因 siRNA 转染联合照射组(先经靶向 Ku70 基因 siRNA 预处理 48 h, 再经 4 Gy γ 射线照射后 48 h 的细胞)。

为证实 Ku70 蛋白对 Rad51 蛋白的调控作用, 按照 PGCsi3.0-hKu70 分别瞬时转染 EC109、H460 和 SGC7901 3 种肿瘤细胞后持续时间的不同, 分为转染后 6 h 组、48 h 组、72 h 组和空白对照组。

1.4 Western blot 实验

当细胞生长至亚融合状态时收集细胞, 用细胞裂解液(美国 Pierce 公司)裂解细胞。蛋白定量操作按二喹啉甲酸蛋白定量试剂盒(日本 Takara 公司)说明书进行。取 50 μg 蛋白进行不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将蛋白电转移至聚偏二氟乙烯膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 tris-buffered saline and tween 20 (TBST) 缓冲液中 4 ℃ 封闭过夜, 加入一抗 Anti-Ku70(英国 abcam 公司, 1:1000 稀释)、Anti-Rad51(美国 sant cruz 公司, 1:1000 稀释), 室温下孵育 2 h, 洗膜, 加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗(武汉博士德生物工程有限公司, 1:3000 稀释), 室温下孵育 1 h, 采用电致化学发光法检测蛋白表达情

况。以 β-actin 作为内参蛋白。采用 Quantity One 软件分析条带灰度值。

2 结果

2.1 靶向 Ku70 基因 siRNA 对肿瘤细胞 Rad51 蛋白表达水平的影响

靶向 Ku70 基因 siRNA 对肿瘤细胞 Rad51 蛋白表达水平的影响结果见图 1, SGC7901、EC109 和 H460 3 种肿瘤细胞经 γ 射线照射后 Rad51 蛋白表达水平均较空白对照组明显升高; 靶向 Ku70 基因 siRNA 单纯转染组 Rad51 蛋白表达水平较空白对照组明显下降; 靶向 Ku70 基因 siRNA 转染联合照射组肿瘤细胞的 Rad51 蛋白表达水平较靶向 Ku70 基因 siRNA 单纯转染组没有升高。

2.2 Ku70 蛋白高表达对 Rad51 蛋白表达水平的影响

Ku70 蛋白高表达对 Rad51 蛋白表达水平的影响结果见图 2, 随着 PGCsi3.0-hKu70 质粒转染后时间的延长, Ku70 蛋白的表达水平也逐渐升高, 而 Rad51 蛋白表达水平也随之升高, 且 3 种细胞系均表现相同。

3 讨论

DSB 修复与放射敏感性密切相关, 抑制 DSB 修复是肿瘤放疗增敏的主要手段之一。因此, 明确 HR 与 NHEJ 2 种修复方式间的相互作用, 对于靶向增强肿瘤的放射敏感性具有一定的指导作用。

HR 与 NHEJ 间既存在着相互竞争, 也存在着相互协同作用。这种协同作用最突出的表现就是二者在胚胎脑发育中的作用, Orii 等^[3]的研究表明, 干扰 HR 将促进增殖早期神经细胞的凋亡, 而干扰

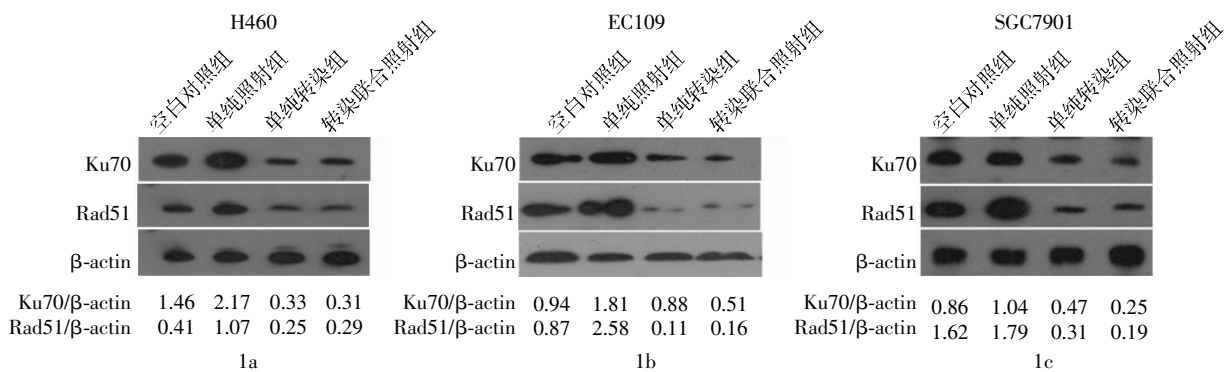


图 1 靶向 Ku70 基因小干扰 RNA 对 Rad51 蛋白表达水平的影响 图中, 1a: 人非小细胞肺癌 H460 细胞系; 1b: 人食管癌 EC109 细胞系; 1c: 人胃腺癌 SGC7901 细胞系。其中, Ku70: 一种非同源末端连接蛋白; Rad51: 一种同源重组修复蛋白。

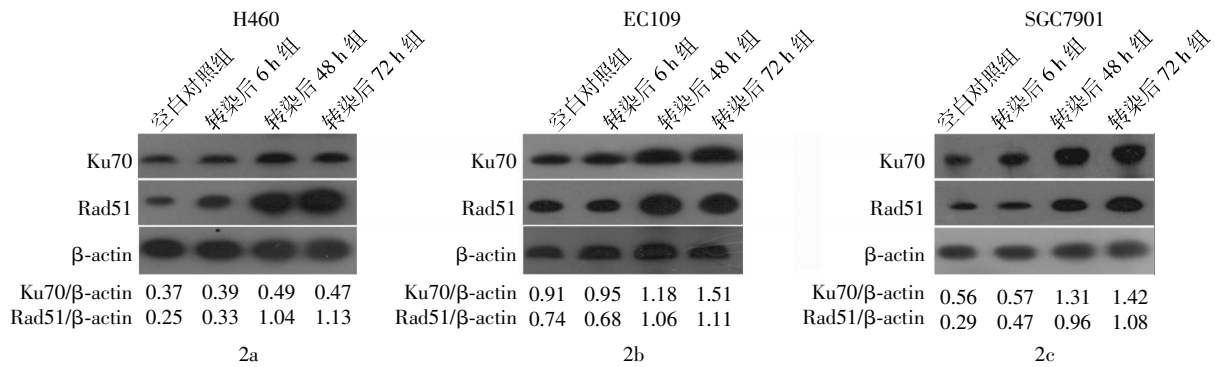


图2 转染真核细胞 Ku70 表达质粒 PGCsi3.0-hKu70 后不同时间 Ku70 蛋白高表达对 Rad51 蛋白表达水平的影响 图中, 2a: 人非小细胞肺癌 H460 细胞系; 2b: 人食管癌 EC109 细胞系; 2c: 人胃腺癌 SGC7901 细胞系。其中, Ku70: 一种非同源末端连接蛋白; Rad51: 一种同源重组修复蛋白。

NHEJ 则导致有丝分裂后期细胞凋亡的增加; 对 HR 和 NHEJ 双突变分析的结果显示, 分属 HR 和 NHEJ 2 种蛋白(Rad54 和 Ku80^[4]、Rad54 和 ligase IV^[5])双缺失所引起表象的改变程度要远远大于其中一种蛋白的单缺失。以上研究表明, HR 和 NHEJ 在 DSB 修复中发挥着协同作用。但具体的协同作用机制目前尚不明确。

在真核细胞中, NHEJ 首先由 Ku70/Ku80 异二聚体结合到断裂处, 然后招募其他蛋白完成断裂处的连接。在 HR 过程中, 必须由 Rad51 蛋白结合到产生的单链上才能寻找到配对的同源序列完成修复。因此, Rad51 和 Ku70 蛋白分别是 HR 和 NHEJ 的重要蛋白。本研究以 Ku70 和 Rad51 蛋白为靶点, 研究了 NHEJ 对 HR 的调控作用, 结果表明, 靶向 Ku70 基因 siRNA 可抑制 Rad51 蛋白的表达, 并对辐射诱导的 Rad51 蛋白表达水平的升高也具有抑制作用。Ku70 对 Rad51 具有正调控作用。但本研究也存在一定的局限性, 因为 Rad51 蛋白的表达是受细胞周期调控的^[6-7], 因此, 笔者的后期研究将观察在不同细胞周期中 Ku70 对 Rad51 的调节作用, 以期进一步明确两者间的相互作用。

参 考 文 献

- [1] Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, et al. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle*, 2008, 7(18): 2902-2906.
- [2] Kass EM, Jasin M. Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Lett*, 2012, 584(17): 3703-3708.
- [3] Orii KE, Lee Y, Kondo N, et al. Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(26): 10017-10022.
- [4] Couëdel C, Mills KD, Barchi M, et al. Collaboration of homologous recombination and nonhomologous end-joining factors for the survival and integrity of mice and cells. *Genes Dev*, 2004, 18(11): 1293-1304.
- [5] Mills KD, Ferguson DO, Essers J, et al. Rad54 and DNA Ligase IV cooperate to maintain mammalian chromatid stability. *Genes Dev*, 2004, 18(11): 1283-1292.
- [6] Deckbar D, Jeggo PA, Löbrich M. Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2011, 46(4): 271-283.
- [7] Suwaki N, Klare K, Tarsounas M. RAD51 paralogs: roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 2011, 22(8): 898-905.

(收稿日期: 2012-11-07)