

## EGFR和NRF2对电离辐射导致的DNA损伤修复的影响

### The effects of EGFR and NRF2 on DNA damage repair induced by ionizing radiation

Gao Yu, Xu Chang, Liu Qiang

引用本文:

高宇, 徐畅, 刘强. EGFR和NRF2对电离辐射导致的DNA损伤修复的影响[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2023, 47(4): 211–219. DOI: 10.3760/cma.j.cn121381–202303015–00294

Gao Yu, Xu Chang, Liu Qiang. The effects of EGFR and NRF2 on DNA damage repair induced by ionizing radiation[J]. *International Journal of Radiation Medicine and Nuclear Medicine*, 2023, 47(4): 211–219. DOI: 10.3760/cma.j.cn121381–202303015–00294

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121381–202303015–00294>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### PET分子显像在非小细胞肺癌表皮生长因子受体突变检测中的研究进展

The progresses in PET molecular imaging in the detection of epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer

国际放射医学核医学杂志. 2019, 43(6): 576–581 <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1673–4114.2019.06.013>

#### KGF对电离辐射后十二指肠中CTGF和Bcl-2基因表达的影响

The influence of KGF on CTGF and Bcl-2 gene in duodenal tissue induced by radiation

国际放射医学核医学杂志. 2017, 41(2): 108–112 <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1673–4114.2017.02.006>

#### 靶向表皮生长因子受体小分子类PET显像剂研究进展

PET imaging agents of small molecules inhibitors targeting EGFR

国际放射医学核医学杂志. 2017, 41(1): 50–58 <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1673–4114.2017.01.010>

#### 环状RNA在DNA损伤修复中作用的研究进展

Research progress on the role of circular RNA in DNA damage repair

国际放射医学核医学杂志. 2021, 45(9): 597–603 <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121381–202103020–00097>

#### 电离辐射损伤相关长链非编码RNA研究进展

Research advancement on long non-coding RNAs in ionizing radiation-induced damage

国际放射医学核医学杂志. 2018, 42(2): 161–166 <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1673–4114.2018.02.011>

#### 肺癌细胞A549和H460对<sup>137</sup>Cs γ射线辐射敏感性差异的研究

Difference of radiosensitivity for <sup>137</sup>Cs -radiation between A549 and H460 lung cancer cell lines

国际放射医学核医学杂志. 2018, 42(4): 346–351 <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1673–4114.2018.04.011>

· 基础研究 ·

# EGFR 和 NRF2 对电离辐射导致的 DNA 损伤修复的影响

高宇 徐畅 刘强

中国医学科学院北京协和医学院放射医学研究所, 天津市放射医学与分子核医学重点实验室, 天津 300192

通信作者: 徐畅, Email: [xuchang@irm-cams.ac.cn](mailto:xuchang@irm-cams.ac.cn)

**【摘要】** 目的 探讨表皮生长因子受体(EGFR)和核转录因子 E2 相关因子 2(NRF2)对人宫颈癌 HeLa 细胞受到电离辐射损伤后的 DNA 损伤响应及修复作用。方法 将人宫颈癌 HeLa 细胞按 2 种处理方式分组: (1)采用小干扰 RNA 敲降 HeLa 细胞中的 EGFR, 采用<sup>137</sup>Cs  $\gamma$  射线照射源照射细胞。将 HeLa 细胞分为对照组(HeLa siCtrl)、敲降 EGFR 组(HeLa siEGFR)、照射组(HeLa siCtrl+8 Gy)、敲降 EGFR+照射组(HeLa siEGFR+8 Gy)。采用免疫荧光实验(8 Gy 照射后 6、12、24 h)检测细胞中磷酸化组蛋白 H2A 变异体( $\gamma$ -H2AX) foci 的数量; 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测 NRF2 下游靶基因; 采用流式细胞术检测 EGFR 对 HeLa 细胞周期的影响; 采用核质分离实验分离 HeLa 细胞的胞质蛋白和胞核蛋白; 采用蛋白质免疫印迹法检测 NRF2、EGFR、血红素氧合酶 1(HO-1)、共济失调毛细血管扩张突变基因 Rad3 相关激酶(ATR) Thr1989 位点的磷酸化水平、检查点激酶 1(CHK1)在 Ser345 位点的磷酸化水平。(2)采用小干扰 RNA 敲降 HeLa 细胞中的 NRF2, 采用<sup>137</sup>Cs  $\gamma$  射线照射源照射细胞。将 HeLa 细胞分为对照组(HeLa siCtrl)、敲降 NRF2 组(HeLa siNRF2)、照射组(HeLa siCtrl+8 Gy)、敲降 NRF2+照射组(HeLa siNRF2+8 Gy)。采用免疫荧光实验检测细胞中  $\gamma$ -H2AX foci 的数量。符合正态分布的计量资料的组间比较采用两独立样本 *t* 检验(方差齐)。结果 (1)8 Gy 照射 6、12、24 h 后, HeLa siEGFR+8 Gy 组细胞中  $\gamma$ -H2AX foci 的数量均多于 HeLa siCtrl 组 [(94.00 $\pm$ 1.00)% 对 (89.67 $\pm$ 2.03)%、(72.33 $\pm$ 1.76)% 对 (60.00 $\pm$ 1.73)%、(43.00 $\pm$ 2.31)% 对 (26.33 $\pm$ 1.20)%], 且差异有统计学意义( $t=3.919$ 、 $4.919$ 、 $6.402$ , 均  $P<0.05$ )。与 HeLa siCtrl 组比较, HeLa siEGFR+8 Gy 组的细胞 G2/M 期阻滞显著受损 [(46.53 $\pm$ 3.06)% 对 (37.90 $\pm$ 4.61)%], 且差异有统计学意义( $t=4.384$ ,  $P<0.05$ )。与 HeLa siCtrl 组比较, HeLa siEGFR+8 Gy 组的 HO-1 表达下降 66.66%(1.35 $\pm$ 0.10 对 0.45 $\pm$ 0.02), 且差异有统计学意义( $t=8.782$ ,  $P<0.05$ )。敲降 EGFR 后细胞核内的 NRF2 蛋白水平降低, 辐射引起的 NRF2 下游 ATR-CHK1 信号通路活化水平及 HO-1 蛋白水平均降低。(2)8 Gy 照射 6、12、24 h 后, 与 HeLa siCtrl 组相比, HeLa siNRF2+8 Gy 组细胞中  $\gamma$ -H2AX foci 的数量均多于 HeLa siCtrl 组 [(96.67 $\pm$ 0.88)% 对 (89.67 $\pm$ 2.03)%、(77.33 $\pm$ 1.20)% 对 (60.00 $\pm$ 1.73)%、(54.33 $\pm$ 2.19)% 对 (26.33 $\pm$ 1.20)%], 且差异均有统计学意义( $t=3.166$ 、 $4.919$ 、 $11.220$ , 均  $P<0.05$ )。结论 电离辐射条件下, 敲降 EGFR 可以减少 NRF2 蛋白入核, 抑制 ATR-CHK1 信号通路激活及下游基因 HO-1 的表达, 降低人宫颈癌 HeLa 细胞的 DNA 损伤修复能力。

**【关键词】** 宫颈肿瘤; DNA 损伤; DNA 修复; 表皮生长因子受体; 核转录因子 E2 相关因子 2

基金项目: 国家自然科学基金(32171239)

DOI: [10.3760/cma.j.cn121381-202303015-00294](https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121381-202303015-00294)**The effects of EGFR and NRF2 on DNA damage repair induced by ionizing radiation**

Gao Yu, Xu Chang, Liu Qiang

Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300192,

China

Corresponding author: Xu Chang, Email: [xuchang@irm-cams.ac.cn](mailto:xuchang@irm-cams.ac.cn)

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of epidermal growth factor receptor (EGFR) and nuclear factor-E2-related factor 2(NRF2) on DNA damage response and repair in human cervical cancer HeLa cells after exposure to ionizing radiation. **Methods** Human cervical cancer HeLa cells were treated in two groups. (1) EGFR was knocked down in HeLa cells using a small interfering RNA, and the cells were irradiated using a  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$ -ray irradiation source. HeLa cells were divided into control group (HeLa siCtrl), knockdown EGFR group (HeLa siEGFR), irradiation group (HeLa siCtrl+8 Gy), and knockdown EGFR+irradiation group (HeLa siEGFR+8 Gy). The number of phosphorylated histone 2A variant ( $\gamma$ -H2AX) foci in the cells was detected by immunofluorescence assay (6, 12, and 24 h after 8 Gy irradiation); the NRF2 downstream target genes were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) assay; the expression levels of flow cytometry were used to detect the effect of EGFR on HeLa cell cycle; nucleoplasmic separation assay was used to isolate cytoplasmic and cytosolic proteins from HeLa cells; protein immunoblotting was used to detect the phosphorylation levels of NRF2, EGFR, HO-1, ataxia-telangiectasia mutated gene and Rad3-related kinase (ATR) Thr1989 locus, cell cycle checkpoint kinase 1 (p-CHK1), and Ser345 site phosphorylation level. (2) A small interfering RNA was used to knock down NRF2 in HeLa cells, and the cells were irradiated with a  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$ -ray irradiation source. HeLa cells were divided into control group (HeLa siCtrl), knockdown NRF2 group (HeLa siNRF2), irradiation group (HeLa siCtrl+8 Gy), and knockdown NRF2+ irradiation group (HeLa siNRF2+8 Gy). An immunofluorescence assay was used to detect the number of  $\gamma$ H2AX foci in HeLa cells. Inter-group comparisons of measures conforming to normal distribution were performed by two independent sample *t*-tests (chi-squared). **Results** (1) After 8 Gy irradiation for 6, 12, and 24 h, the number of  $\gamma$ H2AX foci in HeLa siEGFR+8 Gy were more than that HeLa siCtrl ((94.00 $\pm$ 1.00)% vs. (89.67 $\pm$ 2.03)%, (72.33 $\pm$ 1.76)% vs. (60.00 $\pm$ 1.73)%, (43.00 $\pm$ 2.31)% vs. (26.33 $\pm$ 1.20)%), and the differences were statistically significant ( $t=3.919, 4.989, 6.402$ ; all  $P<0.05$ ). The HeLa siEGFR+8 Gy impaired radiation-induced G2/M phase cell cycle block compared with the HeLa siCtrl, ((46.53 $\pm$ 3.06)% vs. (37.90 $\pm$ 4.61)%), and the difference was statistically significant ( $t=4.384, P<0.05$ ). Compared with the HeLa siCtrl, HeLa siEGFR+8 Gy inhibited the radiation induced decrease in HO-1 expression by 66.66%(1.35 $\pm$ 0.10 vs. 0.45 $\pm$ 0.02), and the difference was statistically significant ( $t=8.782, P<0.05$ ). The level of NRF2 protein in the nucleus was reduced after knocking down EGFR, and the radiation-induced activation level of the ATR-CHK1 signaling pathway downstream of NRF2 and the level of HO-1 protein were reduced. (2) After 8 Gy irradiation for 6, 12, and 24 h, the number of  $\gamma$ H2AX foci in HeLa siNRF2+8 Gy was more than that HeLa siCtrl ((96.67 $\pm$ 0.88)% vs. (89.67 $\pm$ 2.03)%, (77.33 $\pm$ 1.20)% vs. (60.00 $\pm$ 1.73)%, (54.33 $\pm$ 2.19)% vs. (26.33 $\pm$ 1.20)%), and all differences were statistically significant ( $t=3.166, 4.989, 11.220$ ; all  $P<0.05$ ). **Conclusions** Under ionizing radiation conditions, knocking down EGFR can reduce the nuclear translocation of NRF2 protein, inhibit the activation of the ATR-CHK1 signaling pathway and the downstream expression of the HO-1 gene, and decrease the DNA damage repair capacity of human cervical cancer HeLa cells.

**【 Key words 】** Uterine cervical neoplasms; DNA damage; DNA repair; Epidermal growth factor receptor; Nuclear factor-E2-related factor 2

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (32171239)

DOI: [10.3760/cma.j.cn121381-202303015-00294](https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121381-202303015-00294)

在全球女性恶性肿瘤中，宫颈癌的发病率和病死率均居第 4 位<sup>[1]</sup>。2020 年，全球有 60.4 万宫颈癌新发病例和 34.2 万宫颈癌死亡病例；中国约有 11.0 万例宫颈癌患者，其中包括 5.9 万死亡病例<sup>[2]</sup>。

目前, 宫颈癌的治疗方法包括手术、化疗和放疗等<sup>[3]</sup>。宫颈癌 IB3~IVB 期患者均需行放疗, 然而约 30% 接受放疗的患者会出现肿瘤复发<sup>[4]</sup>。因此, 研究影响宫颈癌细胞在放疗后 DNA 损伤修复的分子机制对提高宫颈癌的放疗效果具有重要意义。

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是由原癌基因 c-erbB1 编码的 I 型跨膜酪氨酸激酶受体(TKR), 其由 1 210 个氨基酸构成, 相对分子质量约为 170 000。EGFR 分为 3 个部分: 与配体结合的细胞外结构域、跨膜结构域和含有酪氨酸激酶活性的细胞内结构域。EGFR 被认为与多种癌症的预后有关, 如头颈癌、肺癌、食道癌和胃癌<sup>[5]</sup>。有研究报道, EGFR 信号通路在细胞的生长、增殖和分化等生理过程中发挥重要作用, 其过表达或扩增在宫颈癌中发挥调控细胞放射抗性的作用<sup>[6]</sup>。

核转录因子 E2 相关因子 2(nuclear factor-E2-related factor 2, NRF2)在保护细胞免受氧化、亲电等多种环境因素威胁, 维持暴露在辐射或药物下的细胞内的氧化还原动态平衡方面具有重要作用。有研究结果证明, 肿瘤细胞中 NRF2 的过表达通常与辐射和化学耐药性有关<sup>[7]</sup>。有文献报道, 在黑色素瘤细胞中, NRF2 可以促进 EGFR 的激活, 而在口腔癌细胞中 EGFR 可以促进 NRF2 的激活<sup>[8-9]</sup>。但在宫颈癌细胞中, 关于 EGFR 和 NRF2 在辐射诱导的 DNA 损伤修复中的关系目前鲜见报道。本研究旨在探讨辐射后的宫颈癌 HeLa 细胞中 EGFR 和 NRF2 对 DNA 损伤修复的影响及其二者之间的相互关系, 为指导宫颈癌的放疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 EGFR 与宫颈癌患者生存率的关系

通过 cBioPortal(<http://www.cbioportal.org>)对癌症基因组图谱(TCGA)数据库中宫颈癌患者的数据进行分析。

### 1.2 试剂与仪器

甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体、 $\beta$ -Tubulin 抗体、Lamin B 抗体、NRF2 抗体、辣根过氧化物酶偶联亲和山羊抗小鼠和兔免疫球蛋白 G、Cy3 标记的山羊抗鼠免疫球蛋白 G 购于美国 Proteintech 公司; EGFR 抗体购于美国 Santa Cruz Biotechnology

公司; p-共济失调毛细血管扩张突变基因 Rad3 相关激酶(ataxia telangiectasia mutated gene and Rad3-related kinase, ATR)(Thr1989)抗体购于美国 GeneTex 公司; p-细胞周期检查点激酶 1(checkpoint kinase 1, CHK1)(Ser345)和血红素氧合酶 1(heme oxygenase-1, HO-1)抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司; 磷酸化组蛋白 H2A 变体(phosphorylated histone 2A variant,  $\gamma$ -H2AX)(Ser139)抗体购自英国 Abcam 公司; 小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)购于苏州吉玛基因股份有限公司; RNaimax 转染试剂、NE-PER 细胞核和细胞质提取试剂购自美国 Thermo Fisher 公司; 胎牛血清(FBS)购于日本 HAKATA 公司; DMEM 液体培养基购于美国 HyClone 公司; 4% 组织固定液、牛血清白蛋白(BSA)、Opti MEM 培养基购自美国 Gibco 公司; PBS 缓冲液、Loading buffer、Tween-20、碘化丙锭(PI)溶液多聚甲醛、聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)和胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)消化液(0.25%)购自北京索莱宝科技有限公司; 快速 RNA 提取试剂盒购于湖南艾科瑞生物工程有限公司; 逆转录试剂盒购自北京宝日生物技术公司; 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)封片剂购于北京 Vectorlabs 公司; 三乙醇胺缓冲液(tris buffered saline, TBS)为天津市放射医学与分子核医学重点实验室自制; 微型离心管(ependorf, EP)购于天津本生健康科技公司; 低温台式离心机(5424R 型)购于德国 Eppendorf 公司; DMI3000B 倒置荧光显微镜购自德国徕卡公司; 37°C 恒温培养箱购自上海力申科学仪器有限公司; CFXConnect 实时定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司; Gammacell<sup>®</sup> 40 Exactor <sup>137</sup>Cs  $\gamma$  射线照射源购自加拿大 Best Theratronics 公司。

### 1.3 细胞的培养、照射处理和分组

人宫颈癌 HeLa 细胞由中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心提供。人宫颈癌 HeLa 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 置于 5% CO<sub>2</sub>、37°C 的培养箱培养。每隔 48 h 传代 1 次, 细胞消化液为胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)消化液(0.25%)。

细胞经<sup>137</sup>Cs  $\gamma$  射线照射源进行单次 8 Gy 照射, 吸收剂量率为 0.875 Gy/min。

将人宫颈癌 HeLa 细胞按 2 种处理方式分组:

(1)采用 siRNA 敲降 HeLa 细胞中的 EGFR, 采用  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  射线照射源照射细胞。将 HeLa 细胞分为对照组(HeLa siCtrl)、敲降 EGFR 组(HeLa siEGFR)、照射组(HeLa siCtrl+8 Gy)、敲降 EGFR+照射组(HeLa siEGFR+8 Gy)。采用免疫荧光实验检测细胞中  $\gamma$ -H2AX foci 的数量; 采用流式细胞术检测细胞周期; 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测 NRF2 下游靶基因; 采用核质分离实验分离胞质、胞核蛋白; 采用蛋白质免疫印迹法检测 NRF2、EGFR、HO-1 和 ATR 在 Thr1989 位点的磷酸化水平, CHK1 在 Ser345 位点的磷酸化水平。(2)采用 siRNA 敲降 HeLa 细胞中的 NRF2, 采用  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  射线照射源照射细胞。将 HeLa 细胞分为对照组(HeLa siCtrl)、敲降 NRF2 组(HeLa siNRF2)、照射组(HeLa siCtrl+8 Gy)、敲降 NRF2+照射组(HeLa siNRF2+8 Gy)。采用免疫荧光实验检测细胞中  $\gamma$ -H2AX foci 的数量。

#### 1.4 siRNA 的转染

EGFR 的 siRNA 序列为: 5'-GGAGAUAAAGU GAUGGAGAUTT-3'

NRF2 的 siRNA 序列为: 5'-GGCAUUUCACU AAACACAATT-3'

转染前 1 d, 将处于对数生长期的 HeLa 细胞按  $5 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中, 待细胞密度为 50% 左右时, 更换为 1 ml 新的含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。取 4  $\mu\text{l}$  siRNA 和 4  $\mu\text{l}$  RNAimax 转染试剂分别稀释于 200  $\mu\text{l}$  Opti MEM 培养基中, 将 2 种溶液混合, 使用移液器缓慢吹打混匀, 室温放置 5 min。将混合液加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 缓慢晃动培养皿使其分布均匀。培养基在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱中孵育 8 h, 加入 1 ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基(不含抗生素), 继续培养至 24 h, 收集细胞用于后续实验。

#### 1.5 核质分离实验

照射后 6 h, 收集 HeLa 细胞至 EP 管, 使用预冷的 PBS 洗 2 次, 吸干 PBS, 加入含蛋白酶抑制剂的细胞质提取试剂 I (CER I), 涡旋 EP 管 15 s, 使细胞颗粒完全悬浮。将 EP 管放在冰上孵育 10 min, 向 EP 管中加入细胞质提取试剂 II (CER II), 涡旋 EP 管 5 s; 再将 EP 管在冰上孵育 1 min, 涡旋 5 s。将 EP 管在离心机(16 000 $\times$ g,

4 $^{\circ}\text{C}$ )中离心 5 min, 立即将上清液(细胞质提取液)转移到另一个干净的 EP 管中, 加入 1/3 体积的 4 $\times$ Loading buffer, 混匀, 100 $^{\circ}\text{C}$  裂解变性 10 min。将产生的含核的不溶性(球团)部分悬浮于含有蛋白酶抑制剂的核提取试剂(NER)中, 将涡旋调至最高, 涡旋 15 s。将样本放在冰上孵育, 每 10 min 涡旋 15 s, 共涡旋 5 次。将样本在离心机中以最大速度(16 000 $\times$ g)离心 10 s, 立即将上清液(核提取液)转移到一个干净的预冷 EP 管中, 加入 1/3 体积的 4 $\times$ Loading buffer, 于 100 $^{\circ}\text{C}$  下进行 10 min 裂解变性。

#### 1.6 细胞免疫荧光实验

将对数生长期的 HeLa 细胞按  $1 \times 10^5$  个/孔接种到 12 孔板中的载玻片上, 待细胞完全贴壁后进行 8 Gy 照射, 分别在照射 6、12、24 h 后取出载玻片, 用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 加入 4% 组织固定液, 室温固定 20 min, 之后再用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 使用预冷的 0.3% 聚乙二醇辛基苯基醚(Trinton X-100)室温处理载玻片 30 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min。使用 1% BSA(PBS 配置)4 $^{\circ}\text{C}$  封闭载玻片 2 h, 在  $\gamma$ -H2AX 抗体中 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育 12 h, 用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。用 Cy3 标记的山羊抗鼠和兔免疫球蛋白 G 室温避光孵育载玻片 1 h; 用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。用含 4, 6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)的封片剂封片, 将载玻片转移至倒置荧光显微镜下拍照并记录细胞中  $\gamma$ -H2AX foci 的数量。

#### 1.7 蛋白质免疫印迹实验

采用 Western blot 法检测 EGFR、NRF2、ATR、p-ATR、CHK1、p-CHK1 的蛋白表达水平。分别提取各组 HeLa 细胞的总蛋白, 检测蛋白浓度, 取 30  $\mu\text{g}$  蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)电泳分离, 转膜, 封闭 2 h, 加入 p-ATR (Thr1989)(1 : 1 000)、p-CHK1(Ser345)(1 : 1 000)、EGFR(1 : 1 000)、NRF2(1 : 2 000)、GAPDH(1 : 5 000)、 $\beta$ -Tubulin(1 : 5 000)、Lamin B(1 : 5 000)一抗稀释液, 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 使用 TBST(tris buffered saline with Tween-20)洗涤 30 min, 加入二抗(HRP 偶联亲和山羊抗小鼠和兔免疫球蛋白 G)(1 : 5 000), 室温孵育 2 h, TBST 洗涤 30 min 后显影。

#### 1.8 RT-PCR

采用快速 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA, 用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为互补 DNA(cDNA),

检测 EGFR、HO-1 基因的表达，同时检测 GAPDH 基因的表达，作为内参。扩增条件：95℃ 激活 10 min；95℃ 变性 15 s、60℃ 退火 1 min，循环 35 次。应用 RT-PCR 仪分析荧光强度，采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法对数据进行分析。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成，序列如下。

GAPDH 引物序列：

正向 5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3'

反向 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'

EGFR 引物序列：

正向 5'-AGGCACGAGTAACAAGCTCAC-3'

反向 5'-ATGAGGACATAACCAGCCACC-3'

HO-1 引物序列：

正向 5'-CTTCTTCACCTTCCCCAACA-3'

反向 5'-AGCTCCTGCAACTCCTCAAA-3'

### 1.9 细胞周期的检测

将对数生长期的 HeLa 细胞按  $5 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中。待细胞完全贴壁后，对细胞进行 8 Gy 照射，6 h 后收集细胞，用 PBS 清洗 2 次，去除 PBS 后用预冷的 70% 乙醇 4℃ 固定细胞 2 h，4℃ 离心 (2 000 r/min，离心半径为 10 cm，5 min) 去除乙醇，使用预冷的 PBS 清洗细胞 1 次，去除 PBS，使用碘化丙啶 (PI) 缓冲液重悬细胞，37℃ 避光染色 30 min，使用流式细胞仪检测细胞周期。

### 1.10 统计学方法

应用 IBM SPSS Statistics 22.0 软件对数据进行

统计学分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示，组间比较采用两独立样本 *t* 检验 (方差齐)。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 EGFR 与宫颈癌患者生存率的关系

宫颈癌患者中存在 5% 的 EGFR 基因突变，其中扩增型突变是主要的突变类型 (图 1A)。与未发生 EGFR 基因突变的宫颈癌患者相比，突变患者的生存期更短 (图 1B)。以上结果提示 EGFR 对宫颈癌患者的生存率至关重要，可作为宫颈癌的潜在治疗靶标。

### 2.2 EGFR、NRF2 对 HeLa 细胞 DNA 损伤修复能力的影响

细胞免疫荧光实验结果显示，在 8 Gy 照射后 6、12、24 h，HeLa siEGFR 组细胞中  $\gamma$ -H2AX foci 的数量均多于 HeLa siCtrl 组 [(94.00±1.00)% 对 (89.67±2.03)%、(72.33±1.76)% 对 (60.00±1.73)%、(43.00±2.31)% 对 (26.33±1.20)%]，且差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 2A)。8 Gy 照射后 6、12、24 h，HeLa siNRF2 组细胞中  $\gamma$ -H2AX foci 的数量均多于 HeLa siCtrl 组 [(96.67±0.88)% 对 (89.67±2.03)%、(77.33±1.20)% 对 (60.00±1.73)%、(54.33±2.19)% 对 (26.33±1.20)%]，且差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 2B)。上述实验结果表明，敲降 EGFR 或者 NRF2 均可降低人宫颈癌 HeLa 细胞的

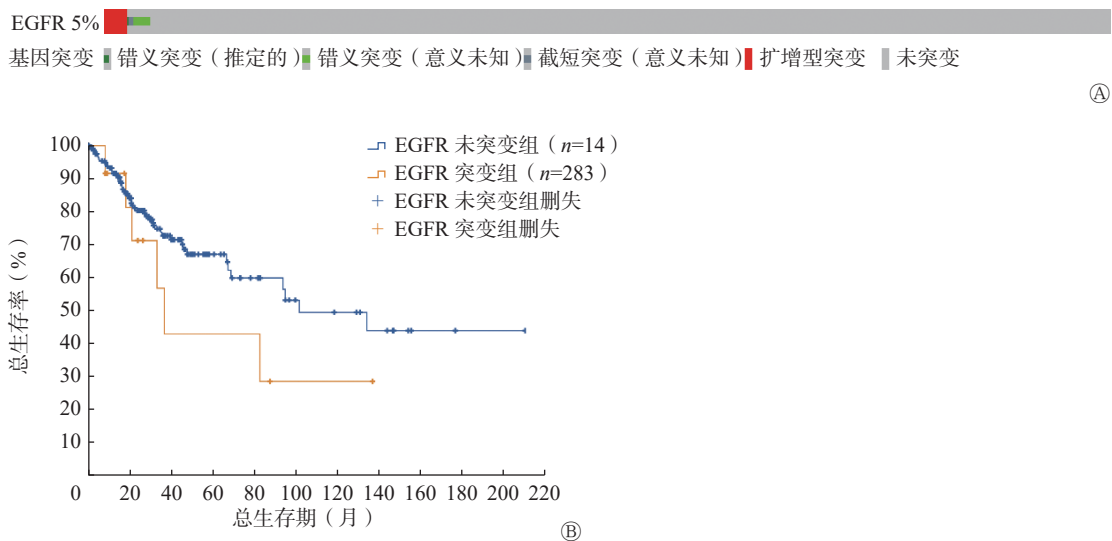
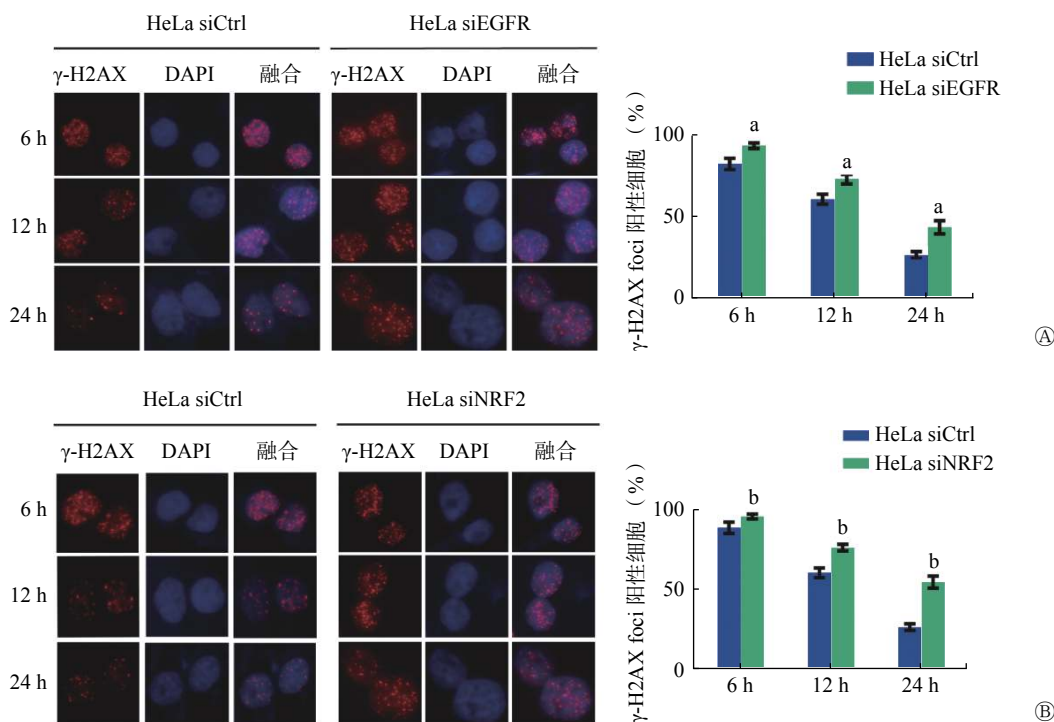


图 1 宫颈癌患者的 EGFR 遗传改变及与生存率的关系 A 为宫颈癌患者 EGFR 基因突变的统计图；B 为 EGFR 基因突变与宫颈癌患者生存率相关性的统计图。EGFR 为表皮生长因子受体

Figure 1 Genetic alterations of epidermal growth factor receptor in cervical cancer patients and its relationship with survival rate



**图 2** EGFR、NRF2 对人宫颈癌 HeLa 细胞 DNA 损伤修复的影响 A 为 HeLa siCtrl 和 HeLa siEGFR 组细胞经 8 Gy 照射后不同时间  $\gamma$ -H2AX foci 的形成图及比较；B 为 HeLa siCtrl 和 HeLa siNRF2 组细胞经 8 Gy 照射后不同时间  $\gamma$ -H2AX foci 的形成图及比较。<sup>a</sup> 表示与 HeLa siCtrl 组细胞比较，差异均有统计学意义 ( $t=3.919$ 、 $4.919$ 、 $6.402$ ，均  $P<0.05$ )；<sup>b</sup> 表示与 HeLa siCtrl 组细胞比较，差异均有统计学意义 ( $t=3.166$ 、 $4.989$ 、 $11.220$ ，均  $P<0.05$ )。EGFR 为表皮生长因子受体；NRF2 为核转录因子 E2 相关因子 2；DNA 为脱氧核糖核酸；HeLa siCtrl 为对照组；HeLa siEGFR 为小干扰 RNA 敲降 EGFR 组； $\gamma$ -H2AX 为磷酸化组蛋白 H2A 变异体；HeLa siNRF2 为小干扰 RNA 敲降 NRF2 组；DAPI 为 4, 6-二脒基-2-苯基吡啶

**Figure 2** Effect of epidermal growth factor receptor and nuclear factor-E2-related factor 2 on DNA damage and repair of cervical cancer HeLa cells

DNA 损伤修复能力。

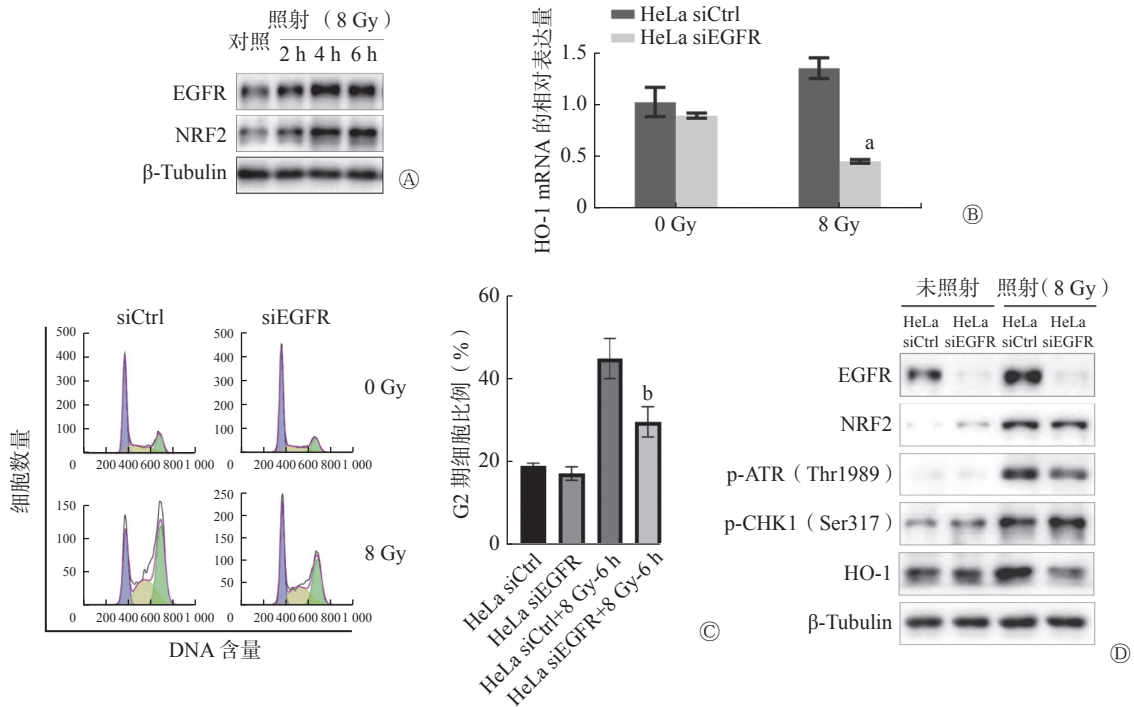
### 2.3 EGFR 对 NRF2 功能的影响

Western blot 实验结果显示，HeLa 细胞经 8 Gy 照射后，EGFR 和 NRF2 蛋白水平均升高，在 6 h 时达到最大值(图 3A)，提示在 HeLa 细胞中 EGFR 和 NRF2 可能在调控 DNA 的损伤修复过程中发挥了重要作用。RT-qPCR 实验结果显示，正常条件下敲降 EGFR 对 HO-1 表达无明显影响，且差异无统计学意义( $t=0.925$ ， $P>0.05$ )。与 HeLa siCtrl 组细胞比较，HeLa siEGFR+8 Gy 的 HO-1 表达下降 66.66% ( $1.35\pm 0.10$  对  $0.45\pm 0.02$ )，且差异有统计学意义( $P<0.05$ )，辐射可以导致 NRF2 靶基因 HO-1 的表达水平升高(图 3B)。流式细胞术结果显示，HeLa siCtrl、HeLa siEGFR、HeLa siCtrl+8 Gy、HeLa siEGFR+8 Gy 组细胞的 G2 周期细胞比例分别是  $(18.83\pm 0.44)\%$ 、 $(17.07\pm 0.94)\%$ 、 $(44.90\pm 2.81)\%$ 、 $(29.53\pm 2.10)\%$ ，与 HeLa siCtrl+8 Gy 组细胞相比，HeLa siEGFR+8 Gy 组的 HeLa 细胞 G2/M 期阻滞

明显受损，且差异有统计学意义( $P<0.05$ )(图 3C)。Western blot 实验结果显示，敲降 EGFR 显著抑制了辐射导致的 CHK1 的磷酸化和 HO-1 蛋白水平的升高(图 3D)。以上实验结果表明，电离辐射可以引起 NRF2 和 EGFR 蛋白水平升高、NRF2 下游的 DNA 损伤响应信号通路和靶蛋白的激活以及 G2/M 期阻滞。敲降 EGFR 会抑制电离辐射导致的 NRF2 下游的 ATR-CHK1 信号通路的活化和 HO-1 的激活，并且 G2/M 期阻滞受损。

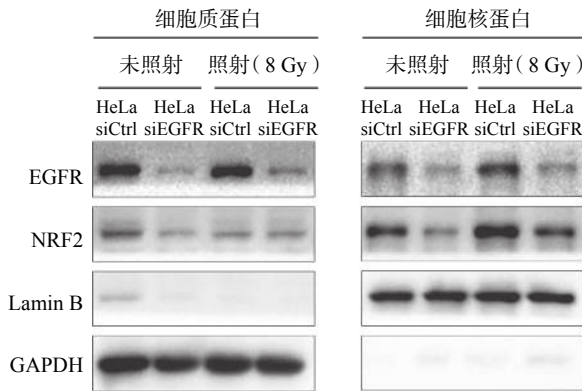
### 2.4 敲降 EGFR 对 NRF2 核定位的影响

NRF2 进入细胞核中才能发挥辐射抵抗的作用，NRF2 的核定位对于响应电离辐射至关重要，我们采用核质分离实验来检测 EGFR 对 NRF2 核定位的影响，结果如图 4 所示，敲降 EGFR 会导致 NRF2 蛋白水平下降；辐射使在细胞核内定位的 NRF2 蛋白增加，而敲降 EGFR 会减少辐射导致的 NRF2 蛋白在细胞核中的定位，说明 EGFR 很可能通过促进 NRF2 的核定位来调控辐射诱导的 DNA



**图3** 敲降EGFR对HeLa细胞中NRF2下游信号通路及靶蛋白的影响 A为Western blot实验检测HeLa细胞8 Gy照射后2、4、6 h时EGFR和NRF2蛋白的表达水平；B为RT-qPCR实验检测HeLa细胞敲降EGFR后HO-1基因的相对表达变化；C为细胞周期实验检测EGFR对辐射引起的HeLa细胞G2/M周期阻滞的影响；D为Western blot实验检测EGFR对CHK1-ATR信号通路及HO-1的影响。<sup>a</sup>表示与HeLa siCtrl+8 Gy组细胞比较，差异有统计学意义 ( $t=8.782, P<0.05$ )；<sup>b</sup>表示与HeLa siCtrl+8 Gy组细胞比较，差异有统计学意义 ( $t=4.384, P<0.05$ )。EGFR为表皮生长因子受体；NRF2为核转录因子E2相关因子2；RT-qPCR为实时荧光定量聚合酶链式反应；HO-1为血红素氧合酶1；CHK1为细胞周期检查点激酶1；ATR为共济失调毛细血管扩张突变基因Rad3相关激酶；siCtrl为对照组； $\beta$ -Tubulin为 $\beta$ -微管蛋白；siEGFR为小干扰RNA敲降EGFR组；mRNA为信使核糖核酸；DNA为脱氧核糖核酸

**Figure 3** Effects of epidermal growth factor receptor knockdown on nuclear factor-E2-related factor 2 downstream signaling pathway and target protein in HeLa cells



**图4** 照射和未照射条件下敲降EGFR后HeLa细胞中EGFR、NRF2蛋白在细胞质和细胞核中表达水平的比较 EGFR为表皮生长因子受体；NRF2为核转录因子E2相关因子2；siCtrl为对照组；siEGFR为小干扰RNA敲降EGFR组；Lamin B为核纤层蛋白B；GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶

**Figure 4** Comparison of epidermal growth factor receptor and nuclear factor-E2-related factor 2 protein expression levels in cytoplasm and nucleus of HeLa cells after knocking down epidermal growth factor receptor under irradiation and non-irradiation conditions

损伤修复。

### 3 讨论

放疗是宫颈癌的主要治疗方法之一，一半以上的宫颈癌患者需要接受放疗<sup>[10]</sup>。近年来，随着放疗技术的发展，以三维体外照射及三维腔内照射为主的放疗新技术被广泛应用，宫颈癌患者的治疗取得了良好的效果，但辐射抗性仍是导致肿瘤复发或持续的主要因素，因此抑制肿瘤细胞DNA的损伤修复仍非常必要<sup>[11]</sup>。有研究报道，大约70%的宫颈癌患者中存在EGFR过表达的情况，并且EGFR过表达与疾病特异性生存期(DSS)的缩短相关<sup>[12]</sup>。本研究对癌症基因组图谱(TCGA)数据库中宫颈癌患者的数据进行分析，发现EGFR突变的宫颈癌患者比例仅为5%，远低于之前的研究结果<sup>[12]</sup>，但疾病特异性生存期(DSS)的缩短确实与EGFR过表达相关，所以EGFR的过表达可能更多发生在



mRNA 或者蛋白水平。本研究的结果表明,照射后 HeLa 细胞中 EGFR 蛋白的表达水平明显升高。为了进一步评估 EGFR 对宫颈癌细胞 DNA 损伤修复的影响,我们通过免疫荧光实验观察敲降 EGFR 后受照 HeLa 细胞中的 DNA 损伤情况,结果表明敲降 EGFR 会降低 HeLa 细胞的 DNA 损伤修复能力。

辐射通过直接导致 DNA 双链断裂或者产生活性氧间接对 DNA 造成损伤。为了减轻对遗传物质的伤害,细胞会启动 DNA 损伤反应(DDR)促进对损伤 DNA 的修复,使细胞周期进程停滞,为修复受损的 DNA 提供足够的时间<sup>[13-14]</sup>。通过 Western blot、RT-qPCR 和流式细胞术实验,我们发现敲降 EGFR 后,受照射 HeLa 细胞中 ATR-CHK1 信号通路的激活受到抑制,HO-1 的表达水平降低、细胞 G2/M 期阻滞受损。这提示 EGFR 可能通过影响 NRF2 的功能发挥辐射抵抗作用。

NRF2 是基础亮氨酸拉链家族的成员,通过抗氧化反应元件(ARE)激活细胞内编码抗氧化酶和 II 期解毒酶的基因转录。一般情况下,Keap1 样 ECH 关联蛋白 1(Keap1)通过泛素介导的蛋白酶体降解负向调节 NRF2 活性<sup>[15]</sup>。当细胞暴露于氧化、亲电或外来生物刺激时,NRF2 会摆脱 Keap1 样 ECH 关联蛋白 1(Keap1)的控制,转位到细胞核中,与 Maf 家族的一个小蛋白形成异源二聚体,调控含有抗氧化反应元件(ARE)的下游基因的转录<sup>[5,15]</sup>。有研究报道,NRF2 的细胞保护功能也可导致对肿瘤细胞的保护,从而促进肿瘤细胞的转化、生长、转移和化疗耐药的形成<sup>[16]</sup>。有研究结果表明,NRF2 通过促进 ATR 激活和 G2/M 期阻滞来保持基因组的完整性,DNA 发生损伤时,ATR 调控的一个主要应答过程是细胞周期阻滞。ATR 可通过自身活化并磷酸化蛋白激酶 CHK1 引起细胞周期阻滞<sup>[17]</sup>。通过核质分离实验结果,我们发现敲降 EGFR 明显减少了辐射诱导的细胞核内 NRF2 蛋白水平的增加。通过免疫荧光实验结果,我们发现敲降 NRF2 后,HeLa 细胞的 DNA 损伤修复能力降低,表明敲降 EGFR 会导致 NRF2 下游信号通路受阻,即电离辐射诱导 HeLa 细胞 DNA 损伤修复有赖于 EGFR 的表达。但目前我们还不确定 EGFR 是如何调控 NRF2 在胞内的分布,在今后的研究中,将进一步探索 EGFR 对 NRF2 作用的具体机制。

综上所述,本研究采用人宫颈癌 HeLa 细胞,

从细胞及分子水平证实电离辐射后 EGFR 可促进 NRF2 蛋白向细胞核内转移,从而激活 NRF2 下游的 ATR/CHK1 信号通路及靶基因 HO-1 的表达,提高细胞的 DNA 损伤修复能力。因此,我们发现了 EGFR 在人宫颈癌 HeLa 细胞辐射抗性中发挥作用的一种可能机制,为靶向 EGFR 在宫颈癌临床治疗中的应用提供了分子基础及理论依据。

**利益冲突** 所有作者声明无利益冲突

**作者贡献声明** 高宇负责实验的实施、论文的撰写与修订;徐畅负责方法的建立、数据的分析、论文的审阅;刘强负责研究命题的设计、论文的修订

## 参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2022[J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(1): 7-33. DOI: 10.3322/caac.21708.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [3] Dueñas-González A, Cetina L, Coronel J, et al. The safety of drug treatments for cervical cancer[J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2016, 15(2): 169-180. DOI: 10.1517/14740338.2016.1130127.
- [4] Tewari KS, Monk BJ. Evidence-based treatment paradigms for management of invasive cervical carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(27): 2472-2489. DOI: 10.1200/JCO.18.02303.
- [5] Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy[J]. *Oncologist*, 2002, 7(Suppl 4): S2-8. DOI: 10.1634/theoncologist.7-suppl\_4-2.
- [6] Gaffney DK, Haslam D, Tsodikov A, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) negatively affect overall survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2003, 56(4): 922-928. DOI: 10.1016/S0360-3016(03)00209-8.
- [7] Singh A, Bodas M, Wakabayashi N, et al. Gain of Nrf2 function in non-small-cell lung cancer cells confers radioresistance[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13(11): 1627-1637. DOI: 10.1089/ars.2010.3219.
- [8] Kreß JKC, Jessen C, Marquardt A, et al. NRF2 enables EGFR signaling in melanoma cells[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 3803[2023-03-08]. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/8/3803>. DOI: 10.3390/IJMS22083803.
- [9] Carrillo-Beltrán D, Muñoz JP, Guerrero-Vásquez N, et al. Human papillomavirus 16 E7 promotes EGFR/PI3K/AKT1/NRF2 signaling pathway contributing to PIR/NF-κB activation in oral cancer cells[J/OL]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(7): 1904

- [2023-03-08]. <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/7/1904>. DOI: 10.3390/cancers12071904.
- [10] Cao LJ, Wen H, Feng Z, et al. Distinctive clinicopathologic characteristics and prognosis for different histologic subtypes of early cervical cancer[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2019, 29(8): 1244–1251. DOI: 10.1136/ijgc-2019-000556.
- [11] Krause M, Dubrovskaja A, Linge A, et al. Cancer stem cells: radioresistance, prediction of radiotherapy outcome and specific targets for combined treatments[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 109: 63–73. DOI: 10.1016/j.addr.2016.02.002.
- [12] Schrevel M, Gorter A, Kolkman-Uljee SM, et al. Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor overexpression in patients with cervical cancer[J]. *Mod Pathol*, 2011, 24(5): 720–728. DOI: 10.1038/modpathol.2010.239.
- [13] Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease[J]. *Nature*, 2009, 461(7267): 1071–1078. DOI: 10.1038/nature08467.
- [14] Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives[J]. *Mol Cell*, 2010, 40(2): 179–204. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.09.019.
- [15] Chung HC, Ros W, Delord JP, et al. Efficacy and safety of pembrolizumab in previously treated advanced cervical cancer: results from the phase II KEYNOTE-158 study[J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(17): 1470–1478. DOI: 10.1200/JCO.18.01265.
- [16] Wang YY, Wang Y, Zhang ZB, et al. Mechanism of progesterin resistance in endometrial precancer/cancer through Nrf2-AKR1C1 pathway[J/OL]. *Oncotarget*, 2016, 7(9): 10363–10372 [2023-03-08]. <https://www.oncotarget.com/article/7004/text>. DOI: 10.18632/oncotarget.7004.
- [17] Sun XH, Wang Y, Ji KH, et al. NRF2 preserves genomic integrity by facilitating ATR activation and G2 cell cycle arrest [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(16): 9109–9123. DOI: 10.1093/nar/gkaa631.

(收稿日期: 2023-03-09)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 2023 年本刊可直接使用缩写形式的常用词汇

- ATP**(adenosine-triphosphate), 三磷酸腺苷  
**AUC**(area under curve), 曲线下面积  
**CI**(confidence interval), 置信区间  
**CT**(computed tomography), 计算机断层摄影术  
**CV**(coefficient of variation), 变异系数  
**DNA**(deoxyribonucleic acid), 脱氧核糖核酸  
**DTC**(differentiated thyroid cancer), 分化型甲状腺癌  
**DTPA**(diethylene-triaminepentaacetic acid), 二亚乙基三胺五乙酸  
**DWI**(diffusion weighted imaging), 弥散加权成像  
**FDG**(fluorodeoxyglucose), 氟脱氧葡萄糖  
**MDP**(methylenediphosphonate), 亚甲基二膦酸盐  
**MIBI**(methoxyisobutylisonitrile), 甲氧基异丁基异腈  
**MRI**(magnetic resonance imaging), 磁共振成像  
**MTT**(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide), 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐  
**PBS**(phosphate-buffered solution), 磷酸盐缓冲液  
**PCR**(polymerase chain reaction), 聚合酶链反应  
**PET**(positron emission tomography), 正电子发射断层显像术  
**RBC**(red blood cell), 红细胞  
**RNA**(ribonucleic acid), 核糖核酸  
**ROC**(receiver operating characteristic), 受试者工作特征  
**ROI**(region of interest), 感兴趣区  
**SER**(sensitization enhancement ratio), 放射增敏比  
**SPECT**(single photon emission computed tomography), 单光子发射计算机断层摄影术  
**SUV**(standardized uptake value), 标准化摄取值  
**SUV<sub>max</sub>**(maximum standardized uptake value), 最大标准化摄取值  
**SUV<sub>mean</sub>**(mean standardized uptake value), 平均标准化摄取值  
**SUV<sub>min</sub>**(minimum standardized uptake value), 最小标准化摄取值  
**T1WI**(T1 weighted image), T1加权成像  
**T2WI**(T2 weighted image), T2加权成像  
**T3**(triiodothyronine), 三碘甲腺原氨酸  
**T4**(thyroxine), 甲状腺素  
**TNF**(tumor necrosis factor), 肿瘤坏死因子  
**TNM**(tumor, node, metastasis), 肿瘤、淋巴结、转移  
**T/NT**(the ratio of target to non-target), 靶/非靶比值  
**TSH**(thyroid-stimulating hormone), 促甲状腺激素  
**WBC**(white blood cell), 白细胞  
**WHO**(world health organization), 世界卫生组织

本刊编辑部