

DNA-PKcs 在细胞辐射超敏感性中的作用研究

马季 叶才勇 丁楠 朱佳贇 胡文涛

215123 苏州大学医学部放射医学与防护学院(马季、胡文涛);730000 兰州,中国科学院近代物理研究所空间辐射生物研究室(叶才勇、丁楠、朱佳贇)

通信作者:胡文涛,Email:wthu@suda.edu.cn

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-5098.2018.07.002

【摘要】 目的 研究 DNA-PKcs 在细胞辐射超敏感性中的作用。方法 X 射线照射 M059K 和 M059J 细胞后,克隆形成法实验检测其存活分数;微核分析法和 γ -H2AX 焦点形成实验检测 DNA 损伤;Western blot 实验检测 M059K、M059J 细胞中磷酸化 Chk1、Chk2 和总 Chk1、Chk2 蛋白的表达。结果 在 X 射线照射剂量 < 1 Gy 时,M059K 细胞呈现出辐射超敏感性;DNA 损伤水平不能用于表征低剂量区的 HRS/IRR;0.2 Gy X 射线照射后,M059K 细胞中 pChk1/Chk1 在 20 ~ 60 min 内显著高于 M059J 细胞 ($t = 14.157, 13.661, 14.177, 11.317, 14.512, P < 0.05$);0.2 Gy X 射线照射后,M059K 细胞中 pChk2/Chk2 在 20 ~ 50 min 内显著高于 M059J 细胞 ($t = 13.182, 13.868, 14.155, 14.477, P < 0.05$)。结论 DNA-PKcs 野生型的人胶质瘤 M059K 细胞中存在着低剂量辐射超敏感性现象,其发生可能与 DNA-PKcs 介导的 G_2/M 期检验点相关蛋白激活有关。

【关键词】 肿瘤细胞; 低剂量辐射超敏感性; 细胞周期检测点激酶 2; DNA 依赖蛋白激酶催化亚基

基金项目:国家自然科学基金(11405235)

DNA-PKcs functions in cellular hyper-radiosensitivity Ma Ji, Ye Caiyong, Ding Nan, Zhu Jiayun, Hu Wentao

School of Radiation Medicine and Protection, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China (Ma J, Hu WT); Department of Space Radiobiology, Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China (Ye CY, Ding N, Zhu JY)

Corresponding author: Hu Wentao, Email: wthu@suda.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the functions of DNA-PKcs in cellular low dose hyper-radiosensitivity. **Methods** Colony-formation assay was used to detect the survival fractions of M059K and M059J cell lines treated by X-ray irradiation. Micronucleus assay and γ -H2AX foci assay were used to measure the radiation-induced DNA damage. Western blot was used to detect the relative expression levels of phospho-Chk1, total Chk1, phospho-Chk2 and total Chk2 of M059K and M059J cells. **Results** The hyper-radiosensitivity was observed in M059K cells irradiated with X-ray of doses lower than 1 Gy. DNA damage levels did not show HRS/IRR in the cell lines we used. pChk1/Chk1 in M059K cells was significantly increased during 20 min to 60 min after 0.2 Gy X-ray irradiation ($t = 14.157, 13.661, 14.177, 11.317, 14.512, P < 0.05$); pChk2/Chk2 in M059K cells was markedly increased during 20 min to 50 min after 0.2 Gy X-ray irradiation ($t = 13.182, 13.868, 14.155, 14.477, P < 0.05$).

Conclusions M059K cells show the phenomenon of low dose hyper-radiosensitivity, which may be related to activation of proteins in G_2/M phase checkpoints regulated by DNA-PKcs.

【Key words】 Tumor cells; Low dose hyper-radiosensitivity; Chk2 kinase; DNA-PKcs

Fund program: National Natural Science Foundation of China (11405235)

1993 年 Marples 和 Joiner^[1]在对 X 射线照射后的仓鼠 V79-379 A 细胞存活的研究中发现,辐射剂量 < 1 Gy 时细胞辐射敏感性增强的现象,并将其命

名为低剂量辐射超敏感性 (low dose hyper-radiosensitivity, HRS),同时把 HRS 之后出现较低的辐射敏感性命名为辐射抗性增强 (increased

radioresistance, IRR)。迄今 40 余种细胞被证实存在 HRS 现象^[1-2]。HRS 的发现在放化疗结合、放疗的低剂量分割以及分次超低剂量分割等方面意义重大^[3-6]。目前关于 HRS 的机制并不是非常清楚,已有的研究表明其与细胞凋亡、自噬、细胞周期调控以及细胞 DNA 损伤等密切相关。DNA-PK 作为 DNA 损伤修复和细胞周期调控过程中的关键激酶之一^[7-9],其在 HRS 中的作用机制尚不明确。本研究以 DNA-PKcs 基因型不同的两株细胞 M059J (DNA-PKcs 突变型)和 M059K (DNA-PKcs 野生型)为研究对象,探究 DNA-PKcs 在辐射诱导神经胶质瘤细胞 HRS 中可能的机制。

材料与方 法

1. 材料:人神经胶质瘤细胞系 M059J 和 M059K 为本实验室保存。胎牛血清、青霉素-链霉素混合液、DMEM 高糖培养基均购于美国 GIBCO 公司。Trypsin-EDTA 混合液、二喹啉甲醛(BCA)蛋白定量试剂盒均购于上海碧云天生物技术公司。结晶紫(crystal violet)购于安徽 BioSHARP 生物科技公司。 γ -H2AX、Chk1、Chk2、p-Chk1、p-Chk2 抗体购于美国 CST 公司。b-肌动蛋白抗体、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG、HRP 标记的山羊抗兔 IgG、Alex Fluor 555 二抗和一抗稀释液均购于上海碧云天生物技术公司。

2. 细胞培养与照射:M059K 和 M059J 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖全培养基于 5% CO₂、37℃ 恒温饱和湿度培养箱中培养。X 射线照射采用美国 RAD SOURCE RS-2000 X 射线辐照仪,剂量率为 1.2 Gy/min,细胞均培养于直径 60 mm 的平皿进行照射。

3. 细胞克隆形成实验以及存活曲线的绘制:取对数生长期的两种细胞分别按照不同的照射剂量组接种,待接种完成后用 X 射线照射后置于 37℃ 恒温饱和湿度培养箱中培养 14 d,取出细胞固定染色后计数细胞克隆的数目,克隆形成率(PE) = 照射后克隆数/接种细胞数 × 100%,存活分数 = 照射组 PE/对照组 PE。重复 3 次实验后,按照线性平方模型存活分数(SF) = $\exp(-m_1 \times M_0 - m_2 \times M_0^2)$ 拟合存活曲线。式中, M_0 为细胞的受照剂量, Gy; m_1 、 m_2 分别为单击、双击所致细胞死亡的常数,按文献[10]方法计算得出。

4. 蛋白质免疫印迹技术:提取总蛋白并定量,

进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。将蛋白转至聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜)上,用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,4℃ 孵育一抗过夜,磷酸盐吐温缓冲液(PBS-T)清洗后室温孵育二抗 1 h,再次洗膜后加入显影液显影,用化学发光成像系统显影成像、拍照。实验后采用 Image J 软件进行灰度定量分析。实验重复 3 次。

5. γ -H2AX 焦点形成实验:取受照后 1 h 的细胞用 4% 多聚甲醛固定后冰乙醇 -20℃ 过夜保存,第 2 天取出,以 0.1% Triton X-100 进行打孔,20 min 后以 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,一抗室温 2 h,荧光 Alex Fluor 555 二抗室温避光孵育 1.5 h,封片后用扫描型激光共聚焦显微镜拍照,统计 γ -H2AX 焦点的数量。实验重复 3 次,取其均值。

6. 微核形成实验:取对数生长期的细胞接种于直径为 35 mm 的平皿中,每个平皿内接种 10^4 个细胞,根据不同的处理方式处理细胞,制片并用新鲜配置的姬姆萨染色液进行染色,将玻片标本放在倒置荧光显微镜下观察,并计数微核数目。实验重复 3 次,取其均值。

7. 统计学处理:用 SPSS16.0 进行数据录入和统计分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。不同组间比较方差齐性检验后采用方差分析,同一指标两组间比较,经正态性检验后符合正态分布,两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 细胞存活曲线:如图 1 所示, M059K 细胞在 0.2 和 0.4 Gy 的实际存活率低于存活曲线上的拟

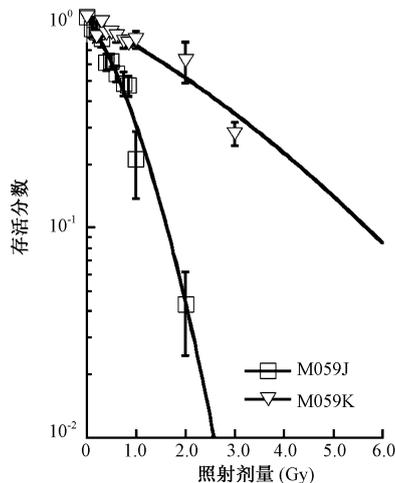


图 1 M059K 和 M059J 细胞的存活曲线

Figure 1 Survival curves of M059K and M059J cells

合值,提示 M059K 细胞在 0 ~ 0.5 Gy 的剂量区间内存在 HRS/IRR,而 M059J 细胞在相同剂量区间内未见 HRS/IRR。

2. 细胞实验微核实验和 γ H2AX 焦点形成实验: 微核实验的结果示于图 2。由图 2 可见,两种细胞在 0 ~ 1 Gy 受照后微核率与拟合值一致。 γ -H2AX 焦点形成实验的结果用单位细胞中的 γ -H2AX 焦点数量随照射剂量的变化表示并进行拟合两种细胞在 0 ~ 1 Gy 的剂量区间内 γ -H2AX 焦点数量均符合拟合值,见图 3。上述结果提示 DNA 损伤水平不能用于表征低剂量区的 HRS/IRR。

3. Chk1 和 Chk2 的表达检测:经 0.2 Gy 的 X 射线照射后 20 ~ 60 min 内,Western blot 结果见图 4, 5。由图 4 可见,受照后 20、30、40、50、60 min, M059K 细胞与 M059J 细胞中 pChk1/Chk1 均显著增加($t = 14.157、13.661、14.177、11.317、14.512$,

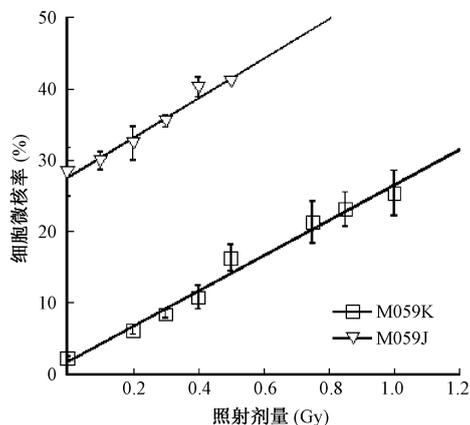


图 2 两种细胞受照后 1 h 细胞微核实验
Figure 2 Dose response of micronucleus induction in two cell lines at 1 h post-irradiation

$P < 0.05$)。提示经 0.2 Gy X 照射后 M059K 细胞中 Chk1 激酶的活化增强。

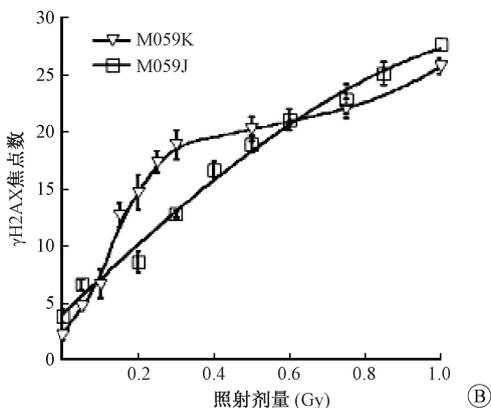
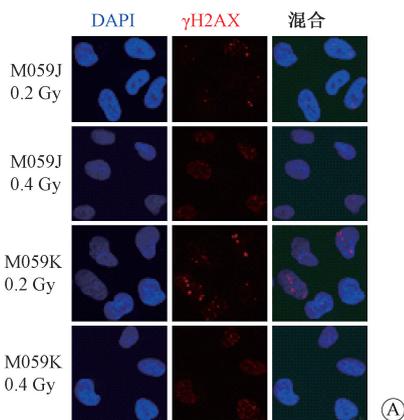
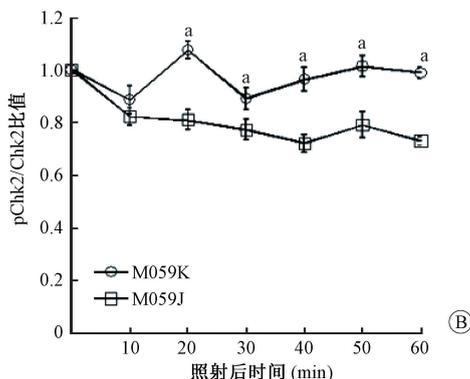
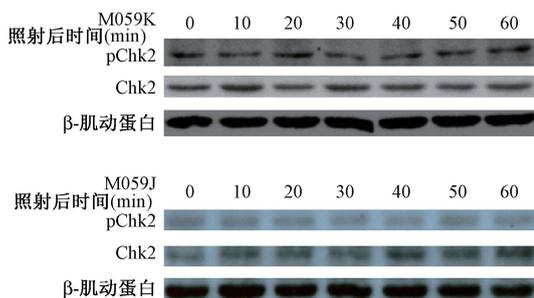


图 3 两种细胞受照后 1 h γ -H2AX 焦点形成 A. 免疫荧光染色;B. 定量分析

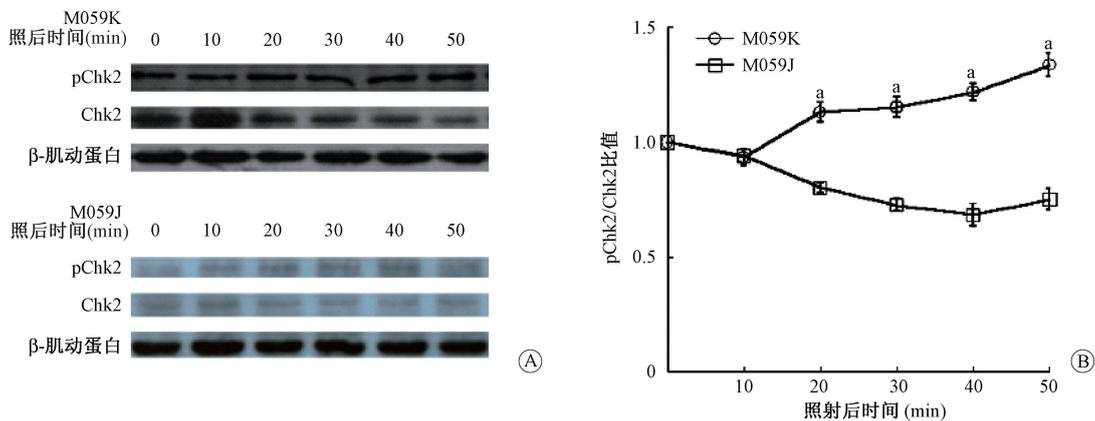
Figure 3 Dose response of γ -H2AX foci formation in two cell lines at 1 h post-irradiation A. Immunofluorescence staining; B. Quantitative analysis



注: ^a 与 0 min 组相比, $t = 14.157、13.661、14.177、11.317、14.512, P < 0.05$

图 4 Chk1 蛋白表达的检测 A. 照射后不同时间 pChk1 和 Chk1 蛋白的表达变化;B. 灰度定量分析 pChk1/ Chk1 比值

Figure 4 Expressions of Chk1 protein in two cell lines after irradiation A. Expressions of pChk1 and total Chk1 detected by Western blot; B. Quantitative analysis of pChk1/Chk1 by gray scale values



注：^a 与 0 min 相比, $t = 13.182、13.868、14.155、14.477, P < 0.05$

图 5 Chk2 蛋白表达的检测 A. 照射后不同时间检测 pChk2 和 Chk2 蛋白的表达变化; B. 灰度定量分析 pChk2/Chk2 比值

Figure 5 Expressions of Chk2 protein in two cell lines after irradiation A. Expressions of pChk2 and total Chk2 detected by Western blot; B. Quantitative analysis of pChk2/Chk2 by gray scale values

由图 5 可见,经 0.2 Gy 的 X 射线照射后 20 ~ 50 min 内, Western blot 结果显示 M059K 细胞中 Chk2 激酶的磷酸化水平呈升高趋势,而在相同时间内 M059J 细胞中 Chk2 激酶的磷酸化水平则呈降低趋势;经 0.2 Gy 的 X 射线照射后 20、30、40、50 min, M059K 细胞与 M059J 细胞中 pChk2/Chk2 均显著增加 ($t = 13.182、13.868、14.155、14.477, P < 0.05$)。提示经 0.2 Gy X 射线照射后 M059K 细胞中 Chk2 激酶的活化增强。

讨 论

在辐射生物学效应研究中, HRS/IRR 一直备受关注,无论是体外细胞实验还是在体研究均发现了 HRS/IRR 现象的存在^[11-12]。Krueger 等^[13]发现在淋巴细胞中 HRS 与 p53 依赖的细胞凋亡有关; Wang 等^[14]发现在肺癌细胞中自噬可以通过调控 MLH1 来影响 HRS; Xue 等^[15]发现在肝癌细胞中 HRS 和 G₂/M 期检验点相关。Marples 等^[16]发现 DNA 依赖性蛋白激酶 (DNA-dependent protein kinase, DNA-PK) 参与 HRS 的形成。其对于低剂量辐射生物学效应的确定及低剂量辐射风险评估有着不言而喻的意义。同时, HRS/IRR 在临床肿瘤放疗中具有良好的应用前景及重要的指导意义。为了实现最大化肿瘤组织的损伤以及最小化正常组织的损伤并兼顾肿瘤的早、晚期反应性,临床中常将放疗的时间和总剂量进行分割,基本分为两种分割方式:其一是常规分割 (conventional fractionation, CF); 其二是非常规分割,又可以细分为加速放疗 (accelerated radiotherapy, AR)、大分割、超分割

(hyper-fraction, HF)、加速超分割 (accelerated hyper-fraction, AHF), 后两种分割方式单次照射的剂量均较小,故低剂量 HRS/IRR 有望应用于优化临床肿瘤放疗剂量分割。然而,如何解决“靶区组织的特异性”以及分次的次数和间隔时间的问题,需对低剂量 HRS/IRR 的机制进行更深入的研究。

关于 HRS/IRR 机制的探讨主要集中在细胞周期以及 DNA 损伤这两个方面。本研究证实了在 DNA-PKcs 野生型的 M059K 细胞中存在着低剂量 HRS/IRR 的现象,而在 DNA-PKcs 突变的 M059J 细胞中则没有这种现象,这与本组前期研究结果一致^[17]。由于 γ -H2AX 被认为是 DNA 损伤的标志^[18-19],微核实验与 γ -H2AX 焦点形成实验的结果提示 DNA 损伤不可以用于表征 HRS/IRR。考虑到细胞周期也很有可能是影响 DNA-PKcs 介导 HRS/IRR 的原因之一,本研究利用 Western blot 技术检测了细胞周期检验点相关蛋白的表达水平,发现经 0.2 Gy 的 X 射线照射后 M059K 细胞比 DNA-PKcs 突变的 M059J 细胞中 pChk1/Chk1、pChk2/Chk2 的比值显著增高。这一结果表明经 0.2 Gy 的 X 射线照射后 M059K 细胞激活了 G₂/M 期检验点相关蛋白 Chk1 与 Chk2。这有可能是 DNA-PKcs 介导产生低剂量 HRS/IRR 的原因之一,详细机制还有待进一步研究。如前所述, DNA-PKcs 是影响细胞周期的重要蛋白之一, Chk1 与 Chk2 在 G₂/M 期检验点的通路中发挥重要作用。随着 DNA-PKcs 在细胞 G₂/M 期检验点研究的不断深入, DNA-PKcs 与 Chk1、Chk2 相关的更多研究被相继的报道出来,比如 Shang 等^[20]发现在有丝分裂中 DNA-PKcs 是导致

Chk2 活化的必要原因之一, Tu 等^[21]证实了 DNA-PKcs 失活的细胞中 Chk2 的磷酸化水平也将显著降低。上述实验均可以说明 DNA-PKcs 是导致 Chk2 活化的原因之一。结合本实验的结果, 不难得出 Chk1 和 Chk2 的活化是神经胶质瘤 M059K 细胞中 DNA-PKcs 介导产生低剂量 HRS/IRR 的机制之一。

利益冲突 本文研究者及家属, 未因进行该研究而接受任何不正当的职务或经费利益, 在此对研究的独立性和科学性予以保证

作者贡献声明 马季负责蛋白免疫印迹实验和撰写论文; 叶才勇负责克隆存活实验; 丁楠和朱佳赞负责 DNA 损伤检测, 胡文涛负责实验设计及论文修改

参 考 文 献

- [1] Marples B, Joiner MC. The response of Chinese hamster V79 cells to low radiation doses: evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population[J]. *Radiat Res*, 1993, 133(1):41-51.
- [2] Short SC, Woodcock M, Marples B, et al. Effects of cell cycle phase on low-dose hyper-radiosensitivity [J]. *Int J Radiat Biol*, 2003, 79(2):99-105.
- [3] Dey S, Spring PM, Arnold S, et al. Low-dose fractionated radiation potentiates the effects of Paclitaxel in wild-type and mutant p53 head and neck tumor cell lines[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(4):1557-1565.
- [4] Spring PM, Arnold SM, Shajahan S, et al. Low dose fractionated radiation potentiates the effects of taxotere in nude mice xenografts of squamous cell carcinoma of head and neck [J]. *Cell Cycle*, 2004, 3(4):479-485.
- [5] Adkison JB, Tomé W, Seo S, et al. Reirradiation of large-volume recurrent glioma with pulsed reduced-dose-rate radiotherapy [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011, 79(3):835-841. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2009.11.058.
- [6] Cannon GM, Tomé WA, Robins HI, et al. Pulsed reduced dose-rate radiotherapy: case report; a novel re-treatment strategy in the management of recurrent glioblastoma multiforme [J]. *J Neurooncol*, 2007, 83(3):307-311. DOI: 10.1007/s11060-007-9329-z.
- [7] Davis AJ, Chen BP, Chen DJ. DNA-PK: a dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2014, 17:21-29. DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.02.020.
- [8] Finzel A, Grybowski A, Strasen J, et al. Hyperactivation of ATM upon DNA-PKcs inhibition modulates p53 dynamics and cell fate in response to DNA damage [J]. *Mol Biol Cell*, 2016, 27(15):2360-2367. DOI: 10.1091/mbc.E16-01-0032.
- [9] Nagasawa H, Lin YF, Kato TA, et al. Coordination of the Ser2056 and Thr2609 Clusters of DNA-PKcs in regulating gamma rays and extremely low fluencies of alpha-particle irradiation to G0/G1 phase cells [J]. *Radiat Res*, 2017, 187(2):259-267. DOI: 10.1667/RR14679.1.
- [10] Zhu J, Hu W, Ding Nan, et al. An optimized colony forming assay for low-dose-radiation cell survival measurement [J]. *Int Res J Biotechn*, 2011, 2(8):164-172.
- [11] Gordon JJ, Snyder K, Zhong H, et al. Extracting the normal lung dose-response curve from clinical DVH data: a possible role for low dose hyper-radiosensitivity, increased radioresistance [J]. *Phys Med Biol*, 2015, 60(17):6719-6732.
- [12] Nguyen DM, Parekh PR, Chang ET, et al. Contribution of dual oxidase 2 (DUOX2) to hyper-radiosensitivity in human gastric cancer cells [J]. *Radiat Res*, 2015, 184(2):151-160.
- [13] Krueger SA, Joiner MC, Weinfeld M, et al. Role of apoptosis in low-dose hyper-radiosensitivity [J]. *Radiat Res*, 2007, 167(3):260-267. DOI: 10.1667/RR0776.1.
- [14] Wang Q, Xiao Z, Lin Z, et al. Autophagy influences the low-dose hyper-radiosensitivity of human lung adenocarcinoma cells by regulating MLH1 [J]. *Int J Radiat Biol*, 2017, 93(6):600-606. DOI: 10.1080/09553002.2017.1286052.
- [15] Xue J, Zong Y, Li PD, et al. Low-dose hyper-radiosensitivity in human hepatocellular HepG2 cells is associated with Cdc25C-mediated G₂/M cell cycle checkpoint control [J]. *Int J Radiat Biol*, 2016, 92(10):543-547. DOI: 10.1080/09553002.2016.1206235.
- [16] Marples B, Cann NE, Mitchell CR, et al. Evidence for the involvement of DNA-dependent protein kinase in the phenomena of low dose hyper-radiosensitivity and increased radioresistance [J]. *Int J Radiat Biol*, 2002, 78(12):1139-1147. DOI: 10.1080/09553000210166606.
- [17] 杨康, 朱佳赞, 李君红, 等. DNA-PKcs 基因组不稳定性 and 辐射超敏感性 [J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2010, (2):114-118. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3436.2010.02.011. Yang K, Zhu JY, Li JH, et al. Study on the relationship between DNA-PKcs and genomic instability & hyper-radiosensitivity [J]. *J Radia Res Radiat Proc*, 2010, (2):114-118. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3436.2010.02.011.
- [18] Sánchez-Flores M, Pásaro E, Bonassi S, et al. γ H2AX assay as DNA damage biomarker for human population studies: defining experimental conditions [J]. *Toxicol Sci*, 2015, 144(2):406-413. DOI: 10.1093/toxsci/kfv011
- [19] Cervena T, Rossnerova A, Sikorova J, et al. DNA damage potential of engine emissions measured *in vitro* by micronucleus test in human bronchial epithelial cells [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2017, 121(Suppl 3):102-108. DOI: 10.1111/bcpt.12693.
- [20] Shang Z, Yu L, Lin YF, et al. DNA-PKcs activates the Chk2-Brcal pathway during mitosis to ensure chromosomal stability [J]. *Oncogenesis*, 2014, 3:e85. DOI: 10.1038/onsis.2013.49.
- [21] Tu WZ, Li B, Huang B, et al. γ H2AX foci formation in the absence of DNA damage: mitotic H2AX phosphorylation is mediated by the DNA-PKcs/CHK2 pathway [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(21):3437-3443. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.08.028.