

DNA-PKcs 基因组不稳定性 和 辐射超敏感性

杨康¹ 朱佳贇² 李君红^{2,3} 丁楠² 胡文涛^{2,3}
何进鹏⁴ 苏锋涛^{2,3} 李莎⁵

¹ (武汉大学东湖分校生命科学与化学学院 武汉 430212)

² (中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

³ (中国科学院研究生院 北京 100049)

⁴ (兰州大学生命科学学院 兰州 730000)

⁵ (兰州军区总医院放疗科 兰州 730050)

摘要 本研究旨在揭示 DNA-PKcs (DNA 损伤修复的关键酶之一) 与基因组不稳定性、辐射超敏感性的关系。以人神经胶质瘤细胞系 M059K (DNA-PKcs 野生型) 和 M059J (DNA-PKcs 缺陷型) 为实验模型, 用常规克隆形成法测定细胞存活率、cytochalasin-B (细胞松弛素 B) 阻断-微核法跟踪克隆形成过程中基因组不稳定性变化。实验结果表明, 存在辐射超敏感性的 DNA-PKcs 野生型细胞 M059K 在 0.2 Gy 辐照后随着培养时间的延长基因组不稳定性与 0.6 Gy 辐照水平一致; 不存在辐射超敏感性的 DNA-PKcs 缺失型细胞 M059J 经 0.6 Gy 辐照后, 基因组不稳定性水平明显高于 0.2 Gy 辐照。这些结果提示, DNA-PKcs 可能是导致辐射超敏感性的关键因素之一。

关键词 基因组不稳定性, 辐射超敏感性, X 射线, DNA-PKcs

中图分类号 Q691.5, Q274

低剂量辐射超敏感性因其有望为肿瘤放射治疗提供全新的剂量分割方式, 以提高治疗增益比而倍受关注。其发生机理涉及细胞凋亡、周期调控以及 DNA 双链断裂 (DNA double-strand break, DSB) 修复等多个方面^[1]。哺乳动物细胞存在两种重要的 DSB 修复方式: 同源重组 (Homologous Recombination, HR) 和非同源末端连接 (Nonhomologous end-joining, NHEJ), DNA 依赖的蛋白激酶 (DNA-PK) 是一种 DNA 活化的核丝氨酸苏氨酸蛋白激酶^[2], 在 NHEJ 修复方式中起主要作用^[3], 其核心蛋白是 DNA-PKcs。虽然有研究表明 DNA-PK 可能与辐射超敏感性有关^[4], 但尚未见研究报告。另外, DNA DSB 是导致基因组不稳定性的重要因素之一^[5], 基因组不稳定性在生物体内表现为多种形式的延迟效应, 如延迟的基因突变、延迟的染色体畸变、延迟的细胞凋亡和增殖性死亡等^[6], 因此, 基因组不稳定性也可能与辐射超敏感性相关。

本研究选用具有不同 DNA-PKcs 表达水平的细胞为实验模型, 在受到低剂量辐照后利用

cytochalasin-B (细胞松弛素 B) 阻断-微核法, 跟踪单个细胞在克隆形成过程中基因组不稳定性水平, 以揭示 DNA-PKcs 与基因组不稳定性、低剂量辐射超敏感性之间的关系。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人神经胶质瘤细胞系 M059K (DNA-PKcs 野生型) 和 M059J (DNA-PKcs 缺陷型) 分别购自美国 ATCC。用含 10% 胎牛血清 (Hyclone)、100U / mL 青霉素、100U / mL 链霉素的 DMEM / F12 培养基培养在 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中。

1.2 照射条件

取对数生长期的 M059K 细胞和 M059J 细胞, 计数后按 300 cells / mL 接种于 35 mm 培养皿中 (1 mL / 皿)。接种后培养 4 h, 然后进行 X 射线照射。辐照在兰州军区陆军总医院放疗科 BJ-6B 型医

中国科学院百人计划 (0760140BRO) 资助

第一作者: 杨康, 男, 1989 年 5 月出生, 武汉大学东湖分校生命科学与化学学院, 生物技术专业, 本科在校生

通讯作者: 朱佳贇, E-mail: zhujiajun2005@yahoo.com.cn

收稿日期: 初稿 2009-11-09, 修回 2009-12-07

用直线加速器上进行, 6 MV, 0.8 Gy/min, 照射剂量分别为 0 Gy、0.2 Gy、0.6 Gy。

1.3 微核实验

照射后每剂量组立即取出一培养皿, 加入 3 $\mu\text{g/mL}$ 终浓度的 cytochalasin-B (细胞松弛素 B) 于培养箱中继续培养 24 h, 然后用酒精/醋酸 (体积比 9:1) 固定 10 min, 70% 酒精保存。每隔 24 h 取出一组培养皿重复以上操作。收获细胞经吖啶橙染色后于荧光显微镜下统计每皿克隆总数, 每个克隆中双核细胞数、含微核的双核细胞数及微核总数^[7]。双核细胞率为 (43.0 \pm 0.8)%, 每组实验独立重复 4 次。

1.4 存活实验

M059K 和 M059J 细胞分别计数, 稀释后种到 T25 的塑料培养瓶中, 每瓶接种 100 个细胞。接种 7 h 后进行照射, 剂量分别为 0 Gy、0.2 Gy、0.6 Gy, 照射后细胞放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中继续培养 12 d 后用 70% 的酒精固定、1% 的结晶紫染色。统计含有大于 50 个细胞的克隆数。然后按照公式: 存活率=照射后细胞形成的集落数/(接种细胞数 \times 未照射对照细胞集落形成率) 计算出细胞存活率。

2 结果与讨论

M059K 和 M059J 细胞经 X 射线照射后, 不同细胞之间的存活率表现出一定的差异性。图 1 所示为两种细胞在不同剂量照射下的存活率。M059J 细

胞经 0.6 Gy 辐照后细胞存活率显著低于 0.2 Gy 的辐照 ($p=0.02$), 而 M059K 在两剂量辐照下存活率基本一致 ($p=0.98$)。说明 M059J 细胞对辐射敏感, 细胞存活率随着辐照剂量的增加显著下降; M059K 细胞对辐射具有超敏感性和诱导的辐射抗性, 0.6 Gy 辐照反而使得细胞的存活率略有上升, 与 0.2 Gy 辐照时存活水平相当。由于两种细胞系的差别在于 DNA-PKcs 的有无, 本实验中 M059J 为 DNA-PKcs 缺陷型细胞, 说明 DNA-PKcs 与细胞辐射敏感性之间存在关联。

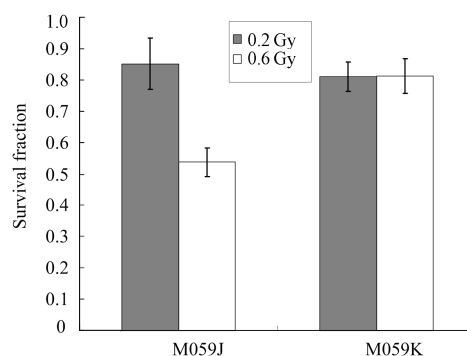


Fig.1 Survival of two cell lines exposed to X-rays

图 2 为单细胞克隆随培养时间的变化曲线。剩余单细胞克隆的比例反映细胞分裂受抑制的程度。M059J 的细胞分裂水平与剂量呈负相关, 辐照剂量大, 则细胞分裂受到的抑制更显著; M059K 的细胞分裂水平与辐照剂量没有发现明显的相关性, 0.2 Gy 与 0.6 Gy 辐照对分裂的抑制能力相似。

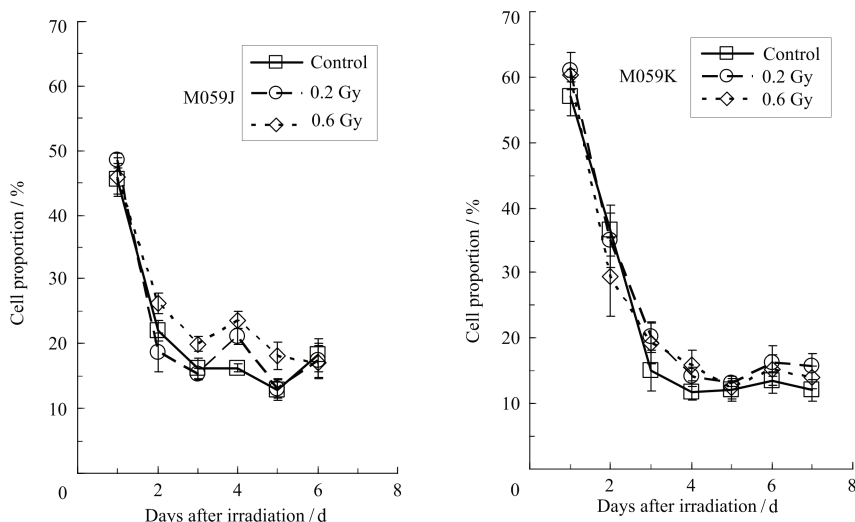


Fig.2 Proportion of mono-cell colonies

如图 3 所示, 辐照后第 4 天, 细胞分裂次数与细胞类型有一定的相关性。未经辐照的 M059J 细胞

分裂比 M059K 细胞快, M059J 细胞有 (24.0 \pm 1.4)% 完成了 3 次分裂 (8 \leq 1 个细胞克隆中的细胞核总数

<16); M059K 仅有 (18.1±2.7)%完成了 3 次分裂, 两者差异显著 ($p=0.048$)。辐照后, M059J 细胞的分裂受抑制, 完成两次以上分裂的细胞低于对照, 两剂量之间没有差异; M059K 细胞的分裂反而受刺

激, 0.2 Gy 与 0.6 Gy 辐照后完成 3 次分裂的细胞数反而高于对照, 0.6 Gy 辐照后完成 4 次分裂的细胞数显著高于 0.2 Gy 辐照的细胞。

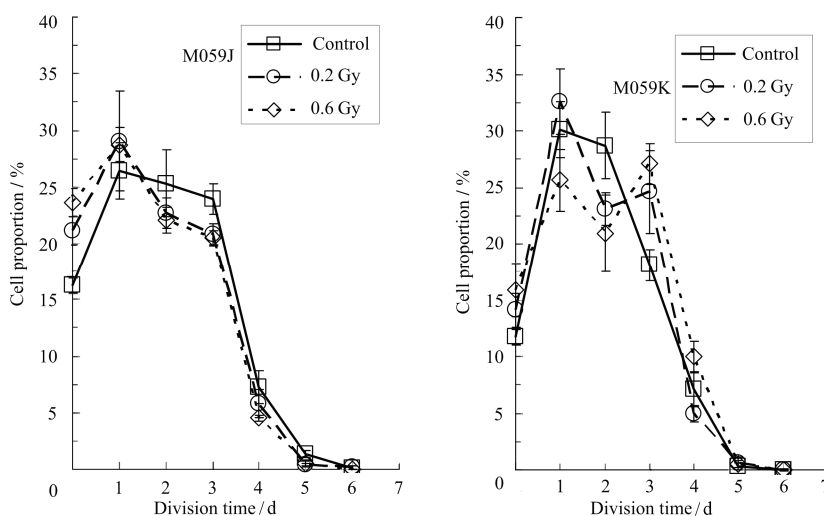


Fig.3 Distribution of cell numbers in each colony on the fourth day after irradiation

细胞因外界损伤因素作用使染色体发生断裂, 细胞进入下一次分裂时, 染色体片段不能随有丝分裂进入子细胞, 而在细胞浆中形成直径小于主核 1/3 的微核, 其嗜色与主核一致、完全与主核分开、呈现圆形或椭圆形。正常细胞中微核的发生率很低;

当细胞受到外界损伤因素刺激时, 微核发生率与剂量表现为较明显的量效关系, 是较易被观察到并显示特定损伤类型的染色体损伤指标。图 4 为细胞克隆照片。

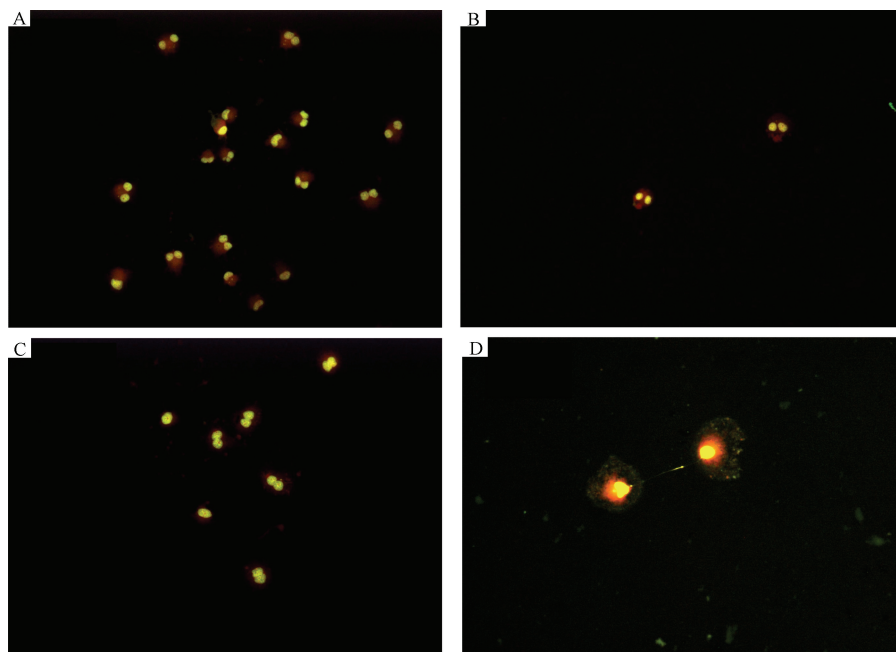


Fig.4 Typical binucleated cells

A. An 18-cell colony with 11 binucleated cells, among which there are 4 binucleated cells with micronuclei; B. a 2-cell colony with 2 binucleated cells; C. a 7-cell colony with 5 binucleated cells, among which there is 1 binucleated cells with micronuclei; D. a 2-cell colony with a plasmodesmata between two mononucleated cells

微核也是基因组不稳定性的重要生物学指标^[8], 因为微核是由 DNA 发生双链断裂而形成的染色体片断; 同时, 微核也是反映细胞辐射敏感性的重要参数, 因为微核率与细胞死亡率之间存在良好的线性关系^[9]。如图 5 所示, M059J 细胞的微核率本底水平较高 (24.2 ± 1.4)%, 并在随后的培养过程中几

乎不变。对于 M059K 而言, 培养第 1 天后细胞的微核率水平几乎为零, 很可能是由于有微核的 M059K 细胞贴壁能力弱; 培养第 2 天后 M059K 对照细胞的微核率增加到 (30.6 ± 4.6)%, 然后基本维持在一定水平, 推测其原因可能在于培养基中叶酸等成分的消耗^[10]。

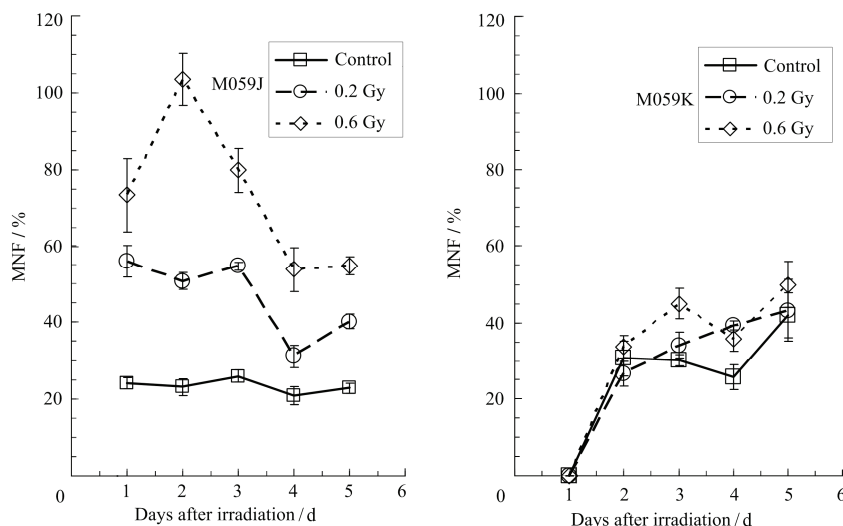


Fig.5 Frequency of micronuclei varies along post-incubation time (MNF means the frequency of micronuclei presenting in binucleated cells)

Oliveira 等^[11]2003 年发现 DNA-PK 的抑制剂 Wortmanin 能够增加哺乳动物在被低或者高 LET 射线照射后的微核形成率。Rapp 等^[12]2004 年利用人的角质化细胞通过 UV-A 照射后发现, HR 和 NHEJ 两个修复系统会相互配合对 DSB 进行修复。而 Vral 等^[13]2001 年报道经过低剂量的 γ 射线照射后 B 细胞与 T 细胞相比具有较高的微核率, 这与 DNA-PK 的活性无关。我们的实验结果与 Oliveira 等^[11]的一致, DNA-PK 缺陷型的 M059J 细胞比 M059K 具有更高的微核形成率。受照射的 M059J 细胞中微核率随着培养时间的延长始终高于对照, 而且剂量越大, 微核率越高, 说明电离辐射导致细胞 DNA 损伤, 而又由于 M059J 细胞是 DNA-PK 缺陷型, DNA 损伤不能被修复所以导致了基因组不稳定性。M059K 与之不同, 受照细胞的微核率与对照细胞几乎没有差别, 而且剂量之间也没有显著差别, 一方面说明随着培养时间延长而上升的微核率主要来自于叶酸消耗等辐射以外的因素; 另一方面也反映 M059K 细胞中存在诱导的辐射抗性, 这与细胞存活实验结果是一致的。相同剂量辐照后前 3 d, M059J 细胞的微核率水平显著高于 M059K 细胞, 显然是由 DNA-PK 功能缺陷所引起。

3 结论

本研究跟踪统计辐照后细胞克隆存活实验过程中每个克隆的细胞总数、细胞分裂和微核形成, 发现 DNA-PKcs 缺失的 M059J 细胞的分裂抑制和微核率都与辐照剂量成正相关, 而 DNA-PKcs 功能完整的 M059K 细胞分裂与微核率与对照组基本一致, 与剂量无关。以上结果支持了 M059K 细胞对辐射具有超敏感性这一现象, 并揭示了 DNA-PKcs 与基因组不稳定性密切相关。

参考文献

- 1 陶丹, 程晶. 肿瘤防治研究, 2008, **35**(5): 367-370
TAO Dan, CHENG Jing. Cancer Research on Prevention and Treatment, 2008, **35**(5): 367-370
- 2 Collis S J, Dewese T L, Jeggo P A, et al. Oncogene, 2005, **24**(6): 949-961
- 3 Mi J, Dziegielewski J, Bolesta E, et al. Plos One, 2009, **4**(2): e4395
- 4 Vaganay-Juery S, Muller C, Marangoni E, et al. Br J Cancer, 2000, **83**(4): 514-518
- 5 沈波. 中华放射医学与防护杂志, 2003, **23**(6): 474-476
SHEN Bo. Chin J Radiol Med Prot, 2003, **23**(6): 474-476

- 6 Simons J W. *Int J Radiat Biol*, 2000, **76**(11): 1533-1543
- 7 Fenech M, Morley A. *Cytobios*, 1985, **43**(172-173): 233-246
- 8 Smith L E, Nagar S, Kim G J, *et al.* *Health Phys*, 2003, **85**(1): 23-29
- 9 Midander J, Revesz L. *Int J Radiat Biol*, 1980, **38**(2): 237-242
- 10 Fenech M. *Mutat Res*, 2001, **475**(1-2): 57-67
- 11 Oliveira NG, Castro M, Rodrigues A S, *et al.* *Mutagenesis*, 2003, **18**(1): 37-44
- 12 Rapp A, Greulich K O. *J Cell Sci*, 2004, **117**(21): 4935-4945
- 13 Vral A, Thierens H, Bryant P, *et al.* *Int J Radiat Biol*, 2001, **77**(3): 329-339

Study on the relationship between DNA-PKcs and genomic instability & hyper-radiosensitivity

YANG Kang¹ ZHU Jiayun² LI Junhong^{2,3} DING Nan² HU Wentao^{2,3}
HE Jinpeng⁴ SU Fengtao^{2,3} LI Sha⁵

¹(School of Biology and Chemistry, Donghu College, Wuhan University, Wuhan 430212, China)

²(Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

³(Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

⁴(School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

⁵(General Hospital of Lanzhou Command in Lanzhou, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT To investigate the relationship between DNA-PKcs and genome instability & hyper-radiosensitivity, human glioma cell lines M059K and M059J, as a model expressing wild-type DNA-PKcs and a model defective in DNA-PKcs activity, were exposed to low doses of X-rays. Cells survival fractions were assessed by colony-forming assay and Cytochalasin-B micronucleus assay was employed to detect the genomic instability happening in each single irradiated colony. It has been found that as the post-incubation time increased, M059K cells expressing wild-type DNA-PKcs exhibited low-dose hyper-radiosensitivity and showed a similar genomic instability after 0.2 Gy and 0.6 Gy irradiations, but the M059J cells lacking in DNA-PKcs didn't present low-dose hyper-radiosensitivity and showed a higher genomic instability of 0.6 Gy than that of 0.2 Gy. The results indicate that DNA-PKcs may act as one of the key factors that lead to low-dose hyper-radiosensitivity.

KEYWORDS Genomic instability, Hyper-radiosensitivity, X-rays, DNA-PKcs

CLC Q691.5, Q274