

Ku70 对辐射诱导的 BRCA1 表达的影响

杜利清 王彦 刘强 曹嘉 赵鹏 王宏
陈风华 吴红英 王月英 李德冠 樊飞跃

(中国医学科学院放射医学研究所 天津 300192)

摘要 为探讨核蛋白 Ku70 对经 γ 射线照射后乳腺癌易感基因 BRCA1 表达的影响,本研究通过靶向升高或降低 Ku70,观察了 Ku70 基因对 BRCA1 蛋白和 mRNA 表达水平的影响,以及 Ku70 对照射后 SGC7901、EC109、H460 3 种肿瘤细胞 BRCA1 表达的影响。结果表明:经 siKu70 处理的 3 种肿瘤细胞 BRCA1 的蛋白和 mRNA 表达水平明显下降,并且对辐射诱导的 BRCA1 表达也有抑制作用;转染了 Ku70 高表达质粒的 3 种肿瘤细胞 BRCA1 的表达水平也较对照组明显升高,且转染后照射组 BRCA1 表达水平高于单纯照射组。结果提示, Ku70 对 BRCA1 的表达具有调节作用,可能从转录水平参与了辐射诱导的 BRCA1 升高。

关键词 Ku70, BRCA1, 辐射

中图分类号 R811.5, R146, R73-33

Ku70 是一种非常丰富的核蛋白。研究发现, Ku70 在 DNA 复制、基因转录调控、端粒结构的维持等多种细胞活动中,均扮演着重要角色,同时, Ku70 还是非同源末端连接途径中的重要分子^[1]。

乳腺癌易感基因 (Breast cancer susceptibility gene 1, BRCA1) 是世界上第一个被发现的家族性乳腺癌抑癌基因^[2],该基因表达蛋白不仅能影响细胞生长,参与细胞周期调控、基因转录调节、凋亡等多种细胞活动,还是同源重组修复及错配修复途径的组成分子。体外研究表明,靶向抑制 BRCA1 可以增强肿瘤的辐射敏感性^[3],而辐射本身又可诱导 BRCA1 的表达增加。

本实验拟通过靶向升高或降低 Ku70 来观察 Ku70 对辐射诱导的 BRCA1 表达的调节作用,以期能初步阐明 Ku70 同 BRCA1 间的相互关系。

1 实验材料和方法

1.1 细胞照射条件

肿瘤细胞均置于 ^{137}Cs γ 源(加拿大原子能公司, CAMMA-CELL40)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。

1.2 细胞培养和分组

人胃癌细胞系 SGC7901 和人食管癌细胞系

EC109 为本室保存,人非小细胞肺癌细胞系 H460 由白利平博士惠赠,3 种细胞系均采用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 (美国 Gibco 公司)培养基,在 37℃、5% CO_2 条件下常规培养。

取对数生长期的细胞,弃培养液, PBS 洗两次,加胰酶消化约 1 min,显微镜下观察到细胞变圆后,加少量培养液,吹打混匀成细胞悬液。接种于 25 cm^2 细胞培养瓶中,接种细胞数为 5×10^5 ,在 5% CO_2 、37℃培养箱中过夜培养 24 h,细胞贴壁后,弃培养液,加入目标药物。

细胞实验分为 4 组,即空白对照组 (Control 组)、单纯给药组 (siKu70/Ku70)、单纯照射组 (IR)、给药加照射组 (siKu70+IR/Ku70+IR),每组实验重复 3 次。

1.3 质粒和 siRNA

真核细胞 Ku70 表达质粒 PGCsi3.0-hKu70 由本实验室构建,采用 Lipofectamine™ 2000 进行瞬时转染。转染前将其转入 6 孔板,待肿瘤细胞处于对数生长期时按 Lipofectamine 2000 试剂说明书进行转染,PGCsi3.0-hKu70 表达载体 4 μg ,脂质体 Lipofectamine 2000 10 μL ,转染作用时间 6 h,同时取 pcDNA3 质粒转染作为阴性对照组。

Ku70 siRNA (sc-29383) 为 Santa cruz 生物公司产品,6 μL Ku70 siRNA 与 5 μL lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen code: 13778-150) 分别加入

中国医学科学院放射医学研究所发展基金 (SF1208)、天津市自然科学基金 (12JCYBJC15300) 资助

第一作者:杜利清,女,1973 年 6 月出生,2009 年于北京协和医学院获博士学位、副研究员,放射医学专业

通讯作者:樊飞跃, E-mail: fan_feiyue@yeah.net

收稿日期:初稿 2012-01-16,修回 2012-02-23

250 μL opti-MEM 中后, 两者混匀, 过 20 min 后加入含 2.5 mL 无抗生素培养基, 继续培养。取 control siRNA (Santa cruz sc-36869) 作为阴性对照。

1.4 real-time PCR

提取细胞总 RNA, 用反转录试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA 第一链。反应总体积为 20 μL , 反应条件为: 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min, 99 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 终止反应, 4 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 灭活反转录酶。实时荧光定量 PCR 在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪上进行, 反应总体积 12.5 μL 。以 GADPH 为内参检测目标基因的表达水平。采用 SYBR Green 染料法进行 Real-time PCR 反应, 以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值进行数据分析。BRCA1 引物序列: 上游引物 5' GGCTATCCTCTCAGAGTGACATTT 3', 下游引物 5' GCTTTATCAGGTTATGTTGCATGG 3'; Ku70 引物序列: 上游引物 5' CCACAGGAAGAAGAGTTGGA 3', 下游引物 5' CTGCTCTGGAGTTGCCATGA 3'。

1.5 Western blot

细胞生长至亚融合状态时收集细胞, 以 MER-Pierce 裂解液裂解细胞。蛋白量按 BCA 蛋白定量试剂盒说明书 (日本 Takara 公司) 测定。取 50 μg 蛋白进行不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 电转移至聚偏二氟乙烯膜 (PVDF), 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜, 加入一抗 Anti-Ku70 (abcam ab2172, 1:1000 稀释)、

Anti-BRCA1 (ab16780, 1:1000 稀释), 室温孵育 2 h, 洗膜, 加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:3000), 室温孵育 1 h, ECL 化学发光法检测。以 β -肌动蛋白 (β -actin) 作为内参。

1.6 统计学方法

数据采用 SAS9.1 统计软件进行分析。组间差异采用方差分析, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 siKu70 对 BRCA1 mRNA 水平的影响

为了观察靶向降低 Ku70 对照射后 BRCA1 mRNA 水平的影响, 本研究将 EC109、H460 和 SGC7901 3 种肿瘤细胞先经 siKu70 预处理 48 h, 再经 4 Gy γ 射线照射, 照后 2 h 收集细胞, 提取 RNA, real-time PCR 法检测 Ku70、BRCA1 mRNA 的表达水平, 以 GADPH 为内参。结果如图 1 所示, 辐射可诱导 BRCA1 mRNA 水平的升高; siKu70 单纯处理组 BRCA1 水平较对照组明显下降 ($p < 0.05$); 而经 siKu70 预处理后再照射的肿瘤细胞 BRCA1 较 siKu70 单纯处理组无升高。析因分析表明 siKu70 和 IR 之间存在交互作用 ($p < 0.01$), siKu70 可能对辐射诱导的 BRCA1 的升高有抑制作用, 使 3 种肿瘤细胞均表现出相同的趋势。

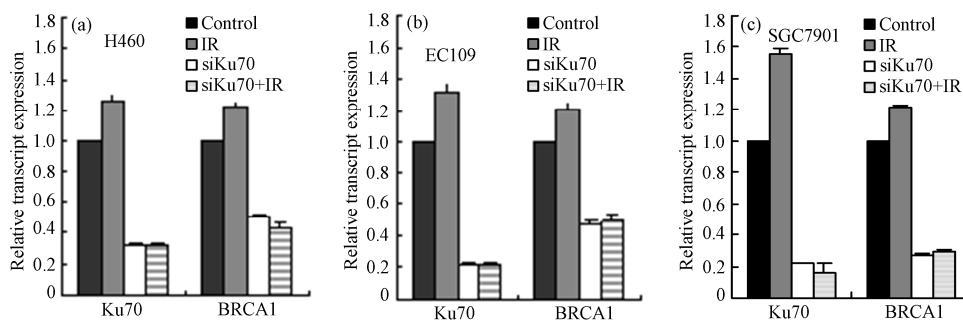


Fig.1 The effect of siKu70 on the expression of BRCA1 mRNA after irradiation (a). H460 cell line; (b). EC109 cell line; (c). SGC7901 cell line

2.2 siKu70 对 BRCA1 蛋白表达水平的影响

为了观察靶向降低 Ku70 对照射后 BRCA1 蛋白表达水平的影响, 本研究将 EC109、H460 和 SGC7901 细胞先经 siKu70 预处理 48 h, 再经 4 Gy γ 射线照射, 照后 48 h 收集细胞, 提取总蛋白, Western-blot 法检测 Ku70、BRCA1 mRNA 的表达水平, 以 β -actin 为内参。结果如图 2 所示, 单纯照射组 BRCA1 mRNA 表达的蛋白水平较对照组明显升

高; siKu70 单纯处理组 BRCA1 mRNA 表达的蛋白水平也较对照组明显下降; 而经 siKu70 预处理后再照射的肿瘤细胞 BRCA1 较 siKu70 单纯处理组无升高, H460 细胞还表现为轻度的降低。表明辐射可诱导 BRCA1 mRNA 的蛋白表达, 而 siKu70 对辐射诱导的 BRCA1 mRNA 的蛋白表达升高具有抑制作用。该结果同 siKu70 抑制 BRCA1 mRNA 水平的结果相一致。

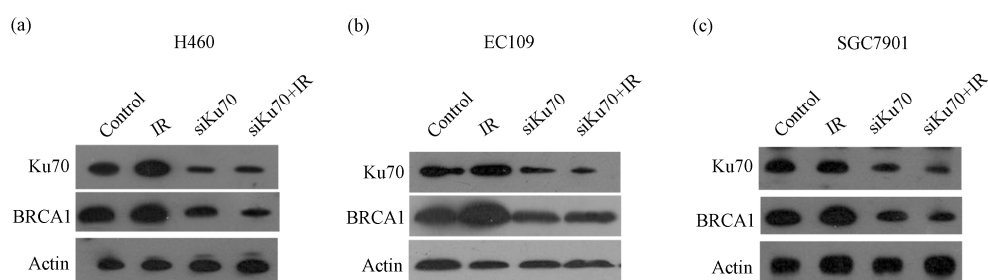


Fig.2 The effect of siKu70 on the expression of BRCA1mRNA after irradiation
(a). H460 cell line; (b). EC109 cell line; (c). SGC7901 cell line

2.3 Ku70 高表达对 BRCA1 表达水平的影响

为了进一步验证 Ku70 对 BRCA1 的调节作用, 本研究采用本室构建的 Ku70 高表达载体 PGCsi3.0-hKu70 分别瞬时转染 EC109、H460 和 SGC7901 3 种肿瘤细胞, Western-blot 法观察 Ku70

高表达 6、48 和 72 h 后 BRCA1mRNA 表达水平的变化。结果见图 3。随着 Ku70 表达水平的升高, BRCA1mRNA 水平也随之升高, 而且 3 种细胞系均表现出相同的趋势。

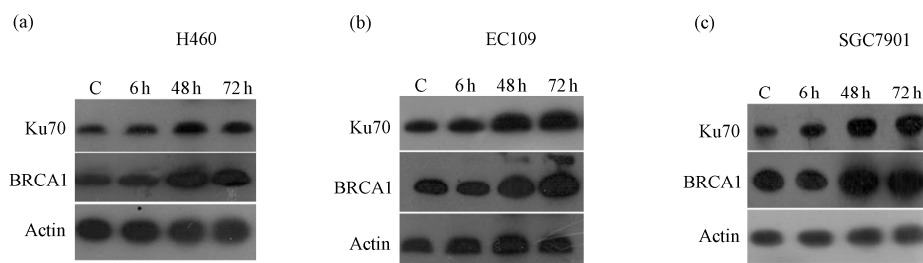


Fig.3 The regulation of BRCA1 mRNA expression by Ku70 over-expression
(a). H460 cell line; (b). EC109 cell line; (c). SGC7901 cell line

2.4 Ku70 高表达对辐射诱导 BRCA1mRNA 水平的影响

将 PGCsi3.0-hKu70 表达载体转染 EC109、H460 和 SGC7901 细胞 48 h 后, 行 4 Gy γ 射线照射, 照后 2 h 提取细胞 RNA, real-time PCR 实验检测 BRCA1mRNA 水平的变化。结果如图 4 所示, 经

Ku70 表达质粒转染后再照射的肿瘤细胞 BRCA1 转录水平明显高于单纯照射组 ($p < 0.05$), 同单纯转染组比较也具有显著性差异 ($p < 0.05$); 且 PGCsi3.0-hKu70 和 IR 之间存在交互作用 ($p < 0.05$), PGCsi3.0-hKu70 和 IR 相互协同作用促进 BRCA1 的升高。

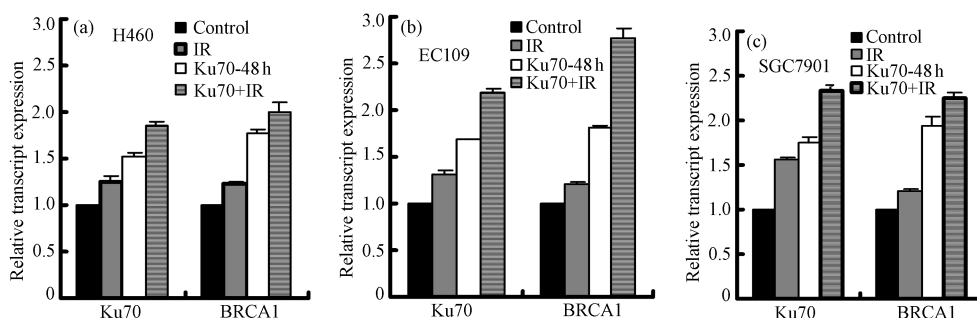


Fig.4 The effect of Ku70 over-expression on the transcription of BRCA1 after irradiation
(a). H460 cell line; (b). EC109 cell line; (c). SGC7901 cell line

3 讨论

BRCA1 自 1994 年发现至今, 一直是肿瘤研究领域的关注点之一, BRCA1 基因定位于人类

17q21, 基因全长约 100 kb, 含有 24 个外显子, 其中有 22 个外显子转录 7.8 kb 的 mRNA, 编码一含有 1,863 个氨基酸。BRCA1 是带有保守氨基酸末端环指结构域和羧基末端转录激活域的核内分子量为

220 kDa 磷酸化蛋白。由于该蛋白有多个功能区,可与许多重要蛋白结合。因此,具有多种生物学功能,参与包括细胞周期,基因和蛋白稳定,中心体复制, DNA 损伤修复,核转录活性,细胞凋亡等众多生物学功能,同时作为肿瘤抑制基因在肿瘤的发生,发展,转移和放化疗中都起着重要的调节功能^[4-6]。基因芯片研究发现,外源性表达 BRCA1 能增强或抑制某些基因的转录表达,如 P21、P27、Gadd45、14-3-3 δ 、R 等^[7-9],但对于 BRCA1 表达的调控因素相关文献报道还很少。而本研究结果表明,抑制或增强 Ku70 的表达对 BRCA1 的转录及蛋白水平的表达具有正调控作用。Ku70 是参与非同源末端连接的门控蛋白^[10], BRCA1 不仅是参与 DNA 双链断裂修复中同源重组修复的重要基因^[11],另外在错配修复中也发挥重要的作用^[12]。因此, Ku70 对 BRCA1 的调控作用,使得非同源末端连接和同源重组修复及碱基缺失修复这 3 种修复方式协调统一起来,该结论对于 DNA 修复的研究具有重要的意义,但对于 Ku70 通过何种方式参与 BRCA1 的调控还需要进一步的研究。

辐射可诱导 BRCA1 表达上调,为探讨 Ku70 是否对辐射诱导的 BRCA1 上调也具有调控作用,本研究采用析因设计同时观察了 Ku70 和 γ 射线对 BRCA1 表达的影响,结果显示 Ku70 和 IR 作用与 BRCA1 变化有明显相关性,其变化程度较单纯调控 Ku70 和单纯照射显著增高,提示 Ku70 可能在射线的诱导下激活其下游基因 BRCA1,使 BRCA1 表达量增加并且相互作用,共同完成辐射损伤后的细胞修复。已有研究表明^[13], BRCA1 的过表达同肿瘤患者的放疗敏感性密切相关,降低 BRCA1 表达可以增强肿瘤的放疗敏感性,而 Ku70 作为参与非同源末端连接的重要蛋白,同 BRCA1 一样也具有参与肿瘤辐射抗性的特性^[14]。因此,根据本研究结论可以做出如下推断:(1) Ku70 可能是辐射诱导 BRCA1 升高的中间环节蛋白;(2) BRCA1 可能参与了 siKu70 的辐射增敏作用,抑制 Ku70 可能具有较 BRCA1 更有效的肿瘤辐射增敏作用,但以上推论还需进一步实验证实。

参考文献

- Rathaus M, Lerrer B, Cohen H Y. DeubiKuitylation: a novel DUB enzymatic activity for the DNA repair protein, Ku70[J]. *Cell Cycle*, 2009, **8**(12): 1843-1852
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1 [J]. *Science*, 1994, **266**(5182): 66-71
- Vandersickel V, Mancini M, Marras E, *et al.* Lenti-virus-mediated RNA interference of Ku70 to enhance radiosensitivity of human mammary epithelial cells [J]. *Int J Radiat Biol*, 2010, **86**(2): 114-124
- Murphy C G, Moynahan M E. BRCA gene structure and function in tumor suppression: a repair-centric perspective [J]. *Cancer J*, 2010, **16**(1): 39-47
- Huen M S, Sy S M, Chen J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, **11**(2): 138-148
- Bordeleau L, Panchal S, Goodwin P. Prognosis of BRCA-associated breast cancer: a summary of evidence [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, **119**(1): 13-24
- MacLachlan T K, Somasundaram K, Sgagias M, *et al.* BRCA1 effects on the cell cycle and the DNA damage response are linked to altered gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**(4): 2777-2785
- Aprelikova O, Pace A J, Fang B, *et al.* BRCA1 is a selective co-activator of 14-3-3 sigma gene transcription in mouse embryonic stem cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(28): 25647-25650
- Somasundaram K, Zhang H, Zeng YX, *et al.* Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/Cip1 [J]. *Nature*, 1997, **389**(6647): 187-190
- Fattah F, Lee E H, Weisensel N, *et al.* Ku regulates the non-homologous end joining pathway choice of DNA double-strand break repair in human somatic cells [J]. *PLoS Genet*, 2010, **6**(2): e1000855
- Ohta T, Sato K, Wu W. The BRCA1 ubiquitin ligase and homologous recombination repair [J]. *FEBS Lett*, 2011, **585**(18): 2836-2844
- Wang Y, Cortez D, Yazdi P, *et al.* BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures [J]. *Genes Dev*, 2000, **14**(8): 927-939
- Huang M Y, Wang J Y, Chang H J, *et al.* CDC25A, VAV1, TP73, BRCA1 and ZAP70 gene overexpression correlates with radiation response in colorectal cancer [J]. *Oncol Rep*, 2011, **25**(5): 1297-1306
- Beskow C, Skikuniene J, Holgersson A, *et al.* Radioresistant cervical cancer shows upregulation of the NHEJ proteins DNA-PKcs, Ku70 and Ku86 [J]. *Br J Cancer*, 2009, **101**(5): 816-821

Study on the regulation of BRCA1 by Ku70 induced by irradiation

DU Liqing WANG Yan LIU Qiang CAO Jia ZHAO Peng WANG Hong
CHEN Fenghua WU Hongying WANG Yueying LI Deguan FAN Feiyue

(Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China)

ABSTRACT To explore the effect of Ku70 on breast cancer susceptibility genes BRCA1 after irradiation, the BRCA1 protein and its mRNA expression after transfecting into tumor cells with siKu70 or Ku70 plasmid DNA, and the impact of Ku70 on BRCA1 expression in SGC7901, EC109 and H460 cell lines were investigated after irradiation. The results indicate that both protein and transcription of BRCA1 were obviously reduced in tumor cell lines after pretreated with siKu70, and siKu70 can reduce radiation-induced BRCA1. Similarly, after transfection of Ku70 plasmid DNA, expression of BRCA1 was higher than that of the control group meanwhile there was a significant increment of BRCA1 in irradiation group compared with that of no irradiated group. The results suggest that Ku70 gene might be relative to BRCA1 expression, and it might be involved in radiation-induced BRCA1 at transcriptional level.

KEYWORDS Ku70, BRCA1, Radition

CLC R811.5, R146, R73-33