

文章编号:1004 - 616X(2002)03 - 0135 - 04

·论著·

## -粒子诱发 BEP2D 细胞恶性转化中 DNA 修复基因 DNA-PK 的表达和突变分析

杨涛<sup>1,2</sup>, 隋建丽<sup>1</sup>, 耿煜<sup>1</sup>, 杨素霞<sup>1</sup>, 周平坤<sup>1\*</sup>, 吴德昌<sup>1\*</sup>

(1. 军事医学科学院放射医学研究所放射毒理研究室, 北京 100850; 2. 海军医学研究所, 上海 200433)

**【摘要】**目的: 研究  $\alpha$ -粒子诱发人支气管上皮细胞 (BEP2D) 恶性转化中 DNA 修复基因 DNA-PK 的结构和表达变化。方法: 用 Northern blot 杂交检测基因转录水平, 聚合酶链式反应-单链构象多态性 (PCR-SSCP) 分析基因编码序列结构变化。结果: 癌变细胞中 DNA 修复基因 Ku70 (XRCC-6) 的编码碱基发生突变, 第 148 ~ 153 位点由 AGGATC 突变为 GAGTAC, 致使编码的氨基酸由 RI 变为 EY; 细胞恶性转化过程中, DNA 修复基因 DNA-PKcs (XRCC-7) 的表达发生改变, 在恶性转化早期即  $\alpha$ -粒子照射后第 21 代就已被抑制, 但发生癌变 (第 35 代) 后, 部分细胞克隆的该基因表达又重新上调。结论: DNA 修复基因 DNA-PK 的结构和表达的变化, 导致细胞 DNA 修复能力缺陷, 基因组不稳定性增加, 是  $\alpha$ -粒子癌变的分子机制之一。

**【关键词】**人支气管上皮细胞 BEP2D;  $\alpha$ -粒子; 癌变; DNA 依赖蛋白激酶 (DNA-PK); DNA 修复

中图分类号: R811.5 文献标识码: A

### MUTATIONS AND EXPRESSION CHANGES OF DNA-PK GENES DETECTED IN THE MALIGNANT TRANSFORMED BEP2D CELLS INDUCED BY $\alpha$ -PARTICLES EXPOSURE

YANG Tao<sup>1,2</sup>, SUI Jian-li<sup>1</sup>, GENG YU<sup>1</sup>, YANG Su-xia<sup>1</sup>, ZHOU Ping-kun<sup>1\*</sup>, WU De-chang<sup>1\*</sup>

(1. Department of Radiation Toxicology, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China; 2. Institute of Naval Medicine, Shanghai 200433)

**【Abstract】 Purpose:** To detect the mutations and expression changes of DNA-PK genes in the transformed human bronchial epithelial cells (BEP2D) induced by  $\alpha$ -particles. **Methods:** Mutations were detected with PCR-SSCP; gene expression was analyzed using Northern blot hybridization. **Results:** Mutations in the encoding sequence of Ku70 (XRCC-6) gene were discovered in the malignant transformed cells. In the process of  $\alpha$ -particle-induced BEP2D transformation, the expression of DNA-PKcs gene was depressed at the early stage of transformation, and was up-regulated again in some of the malignant transformants. **Conclusion:** The mutations and depressed expression of DNA repair genes lead to the deficiency of DNA DSBs repair capacity, which in turn might result in genomic instability. These events could play an important role in the malignant transformation of BEP2D cells induced by  $\alpha$ -particles exposure.

**【Key words】** human bronchial epithelial cell line BEP2D;  $\alpha$ -particles; carcinogenesis; DNA-PK genes; DNA repair

收稿日期: 2002-01-04; 修订日期: 2002-02-05

基金项目: “十五”军队医学杰出中青年基金 (01J006)、国家科委“863”高科技项目 (2001AA221271)、国家重点基础研究发展规划 (973) (G1998051207) 资助项目

作者简介: 杨涛 (1974-) 男, 河南浉池县人, 研究实习员, 医学学士, 从事基因毒理研究。

\*通讯作者, Zhoupk@nic.bmi.ac.cn

DNA 损伤修复是生物体系中高度进化保守的生化代谢系统,在维生生物体的遗传或基因组稳定性中发挥重要作用。DNA 分子既是遗传的物质基础,又是多种环境因子直接作用的靶分子,DNA 损伤修复反应是环境因子与机体交互作用的中心环节之一。针对不同的损伤类型,细胞有多种 DNA 修复反应机制,其中有两类通路修复包括  $\gamma$ -粒子在内的电离辐射所致的 DNA 断裂损伤,即同源重组修复(HR)和非同源末端连接(NHEJ)<sup>1,2</sup>。目前认为,酵母细胞中是以同源重组修复反应为主,而哺乳类细胞是非同源末端连接修复反应途径在发挥主导作用,此修复途径中首先由 DNA-PK 蛋白复合物(由 Ku80/ Ku70 异源二聚体和催化亚单位 DNA-PKcs 构成)识别和结合损伤 DNA 末端,启动相应的信号转导和 DNA 修复反应。

近年来一系列的研究表明,DNA 修复机制异常是人类恶性肿瘤发生的重要易感因素,如大肠癌尤其是遗传性非息肉结肠癌(HNPCC)的发病与 DNA 错配修复缺陷相关<sup>3</sup>,乳腺癌的易感基因 BRCA1 和 BRCA2 就是细胞 DNA 损伤修复信号反应通路中的关键分子<sup>4</sup>。肺癌是人类常见的恶性肿瘤之一,流行病学调查分析表明,除与吸烟有关外,居室内氡的暴露也是人支气管肺癌的一个重要的环境诱因。我国云南的云锡矿矿工因在高氡暴露环境下作业,肺癌发病率和死亡率显著增加<sup>5</sup>。为深入探讨氡暴露下肺癌发病的分子机制,我们实验室建立了  $\gamma$ -粒子照射诱发 HPV-18 永生化的人支气管上皮细胞 BEP2D 恶性转化的实验模型<sup>6,7</sup>。

本研究对 BEP2D 恶性转化过程中 DNA 非同源末端连接修复蛋白 Ku70(XRCC-6)基因的全编码区的序列结构和 DNA-PKcs(XRCC-7)基因的表达进行了分

析,以探讨 DNA 修复机制在辐射致癌中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

BEP2D 细胞是经过 HPV-18 永生化的人支气管上皮细胞<sup>8</sup>,由 NIH 的 Harry CC 博士赠送。 $\gamma$ -粒子照射诱发的恶性转化细胞系 BERP35 T-1、BERP35 T-4 由本实验室建立<sup>6,7</sup>。细胞在 LHC-8 无血清培养液(美国 Biofluids Inc.)中于二氧化碳孵箱内 37 培养。

### 1.2 细胞 RNA 提取

采用 Wizard 基因组 DNA 纯化试剂盒(Promega 公司)提取细胞基因组 DNA,Trizol 试剂(GibcoBRL)提取细胞总 RNA,具体操作按试剂盒说明进行。

### 1.3 PCR-SSCP

1.3.1 cDNA 第一链的合成 以 oligo-dT(36)为引物,分别合成 BEP2D、BERP35 T-1、BERP35 T-4 细胞 cDNA 第一链。反应体系:总 RNA 5  $\mu$ g,oligo-dT(36) 1  $\mu$ g,RT buffer 6.0  $\mu$ l,dNTP(250  $\mu$ mol/L) 6.0  $\mu$ l,DTT 1.5  $\mu$ l,MMLV 逆转录酶 1.5  $\mu$ l(100 U/ $\mu$ l)。37 60 min。

1.3.2 PCR 反应 根据在 Genbank 注册的 Ku70(XRCC-6)基因 mRNA 序列(GI:14249923),共设计了 8 对 PCR 引物,位置相邻的 PCR 产物有部分序列重叠。引物序列和 PCR 反应条件见表 1。PCR 反应体系:上述 cDNA 第一链反应产物 1  $\mu$ l,PCRmix 48  $\mu$ l(含引物、buffer、dNTP、dH<sub>2</sub>O),高保真 Taq 酶 1  $\mu$ l(5 U/ $\mu$ l)。扩增 30~35 个循环后,将 PCR 产物进行 2.0%的琼脂糖凝胶电泳,确认 PCR 产物为单片段并分子大小正确后再进行 SSCP 电泳分析。

表 1. Ku 基因编码区的扩增引物和 PCR 反应条件  
Table 1. The primer pairs and PCR conditions for Ku70 gene mRNA coding sequence amplifications

	primers		PCR conditions			product size
1	F:5' ACATGTCAGGGTGGGAGTC 3' R:5' GCCAAGAGATCTCGATCACTGC 3'	94	for 30 s, 57	for 60 s, 72	for 60 s	253 bp
2	F:5' CCAAAAGTGTACATCAAGTAA 3' R:5' AACAGCATGATCCTCTTATGAC 3'	94	for 30 s, 60	for 30 s, 72	for 60 s	305 bp
3	F:5' GTGATGTCCAAATTCAGATG 3' R:5' GGTCTCCTTGGCGCAACCT 3'	94	for 30 s, 63	for 50 s, 72	for 60 s	270 bp
4	F:5' TCCA GCAAGCTAGAA GACCTG 3' R:5' CTCCA GTA TAA TCTGACGACTCC 3'	94	for 30s, 63	or 30 s, 72	for 60 s	249 bp
5	F:5' CTGCCTAGCGATACCAAGAG 3' R:5' TAA GGA GGA TGTTCCTGCG 3'	94	for 30 s, 60	for 30 s, 72	for 60 s	273 bp
6	F:5' CAGCATTTGTGAGATACACACC 3' R:5' GGGTTCTCAAAGCTGTCACTT 3'	94	for 30 s, 59	for 60 s, 72	for 60 s	242 bp
7	F:5' CAA GATGAA GGCTATCGTTGA 3' R:5' GCTTCCA GAACCTTCATTA TCGT 3'	94	for 30 s, 63	for 30 s, 72	for 60 s	243 bp
8	F:5' CAA TCCTGAA GGGAAA GTTACC 3' R:5' TTTAACTGGCTGAGGACAAAG 3'	94	for 30 s, 62	for 50 s, 72	for 60 s	300 bp

1.3.3 SSCP 电泳分析 配制 6%聚丙烯酰胺凝胶 (50%聚丙烯酰胺 2.4 ml、5×TBE 缓冲液 4 ml、甘油 1 ml、加双蒸馏水至 20 ml 体积),加入 10%过硫酸铵 100 μl、TEMED 15 μl (GibcoBRL),混匀后灌胶、聚合。取 PCR 产物 2 μl,加入上样缓冲液 8 μl,98℃ 加热变性 10 min,冰浴 10 min,快速离心后上样。1×TBE 电泳缓冲液 6/cm V 电压电泳 4~6 h。结束后用 SYBR Green 单链核酸胶染料 (Roche) 染色,紫外灯下观察结果。

1.3.4 测序 对 SSCP 有变化的 PCR 产物进行克隆,送上海基康生物技术有限公司测序。

1.4 Northern blot 杂交

每个样品取 10 μg 总 RNA,用含甲醛的 1%琼脂糖凝胶电泳分离,将 RNA 转移至 Duralon-UV 尼龙膜 (Stratagene),与 <sup>32</sup>P 标记的 DNA-PKcs (XRCC-7) 基因 cDNA 探针杂交。同一张膜再与甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 探针杂交,以排除 RNA 样品上样量不同而引起的分析误差。通过 X 光胶片显影及磷屏 (Phosphorimager, Molecular Dynamics) 检测分析杂交信号。

2 结果

2.1 Ku70 (XRCC-6) 基因编码序列的突变检测

本实验共设计合成了 8 对 PCR 引物,对 Ku70 基因的全编码序列 (mRNA) 进行了扩增和单链构象多态性 (SSCP) 分析,结果发现癌变细胞中第 3 对引物及第 8 对引物 (见表 1) 的扩增产物的 SSCP 电泳图谱,与正常 BEP2D 细胞相比发生改变 (图 1),表明 DNA 碱基发生了突变。

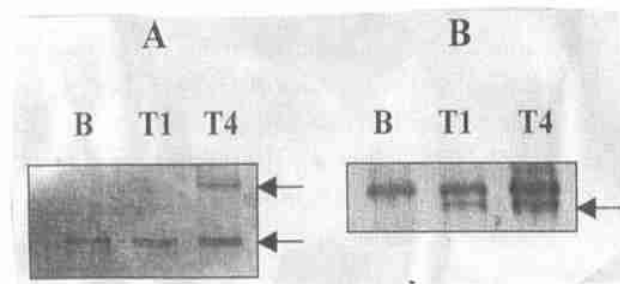


图 1. Ku70 (XRCC-6) 基因单链构象多态性电泳结果

(A)、(B) 分别为第 3 对和第 8 对引物 (见表 1) 的 PCR 产物。箭头所指系差异带。

Figure 1. Screening mutations located in the coding sequence of Ku70 (XRCC-6) gene with PCR-SSCP

(A)、(B): The PCR products produced by the primer pairs 3 and 8 from table 1 respectively. B: BEP2D cells; T1: BERP35 T-1; T4: BERP35 T-4.

对上述 PCR 产物进行克隆并做序列分析,发现第 3 对引物的 PCR 产物中,癌变细胞 BERP35 T-4 的 Ku70 基因序列 (GI: 14249923) 的 1 148~1 153 位点碱基由 A GGATC 突变为 G AGTAC,这将导致编码的氨基酸残基由精氨酸、异亮氨酸突变为谷氨酸和酪氨酸。从第 8 对引物的 PCR 产物中只发现癌变细胞中 Ku70 基因的 2 434 位点由 G 变为 T,但不影响编码氨基酸 (密码子 GGG 和 GGT 都是编码甘氨酸)。

2.2 DNA-PKcs (XRCC-7) 基因的表达分析

DNA-PKcs 基因的全长编码序列长达 12 kb,做突变分析难度较大。本实验采用 Northern 杂交分析该基因在 BEP2D 细胞恶性转化过程中的表达变化。结果显示细胞发生转化的早期阶段,即细胞经  $\alpha$ -粒子照射后的第 21、25 代,DNA-PKcs 基因的 mRNA 表达就明显受到抑制 (图 2),但恶性转化后有的癌变细胞克隆 (BERP35 T-4) 的 DNA-PKcs 基因表达又重新上调甚至超过 BEP2D 细胞。

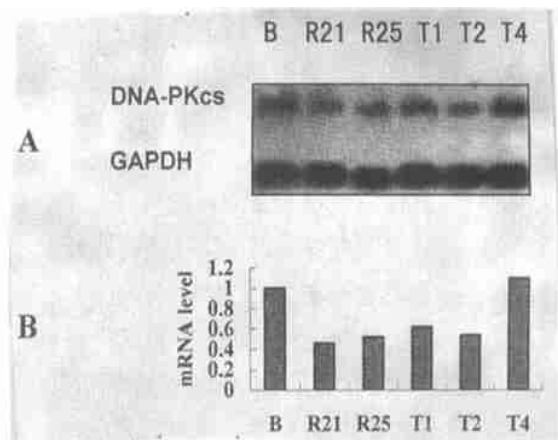


图 2. DNA-PKcs 基因 mRNA 表达分析

(A): Northern 杂交图谱; (B): 磷屏 (Phosphorimager) 定量分析结果,即每个样品中 DNA-PKcs 基因 mRNA 杂交信号强度与 GAPDH 杂交信号强度比值。

Figure 2. mRNA expression analysis

Panel (A): Northern hybridization pattern; Panel (B): Densitometric quantification of mRNA levels measured by Phosphorimager. The relative mRNA level was calculated by the ratio of the hybridization signal densities of DNA-PKcs to GAPDH control for each sample.

B: BEP2D cells; R21: Passage 21 cells of irradiated BEP2D cells; R25: Passage 25 cells of irradiated BEP2D cells; T1, T2, T4: Malignant transformed cell lines BERP35 T-1, BERP35 T-2 and BERP35 T-4 respectively.

3 讨论

肺癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一,我国肺癌的死亡率还在呈现上升趋势。尽管氡暴露与肺

癌发生的密切关系已经明确<sup>5,9,10</sup>,但其诱发肺癌的机制尚不清楚,粒子照射诱发人支气管上皮细胞恶性转化的细胞模型为其提供了很好的研究材料。

氡暴露致癌的分子学基础与氡及其子体发射的

粒子能诱发支气管上皮细胞的DNA损伤直接相关。DNA双链断裂是由包括粒子在内的电离辐射引起的最重要的损伤,它是细胞内多种类型的DNA损伤中最危险的一种;活性氧以及DNA代谢、修复过程中产生的间接效应也可能导致DNA双链断裂。尽管细胞能耐受低水平的损伤,但是如果累及关键基因,即使细胞内存在单个DNA双链断裂也足以杀死一个细胞或导致突变表型。细胞DNA修复缺陷会引起基因组不稳定,在一些遗传和散发性的人类肿瘤中,DNA修复缺陷与肿瘤发生的关系已经得到证实,DNA修复机制的异常已成为评价人类某些癌症发生危险性的遗传标志物之一。

我们先前报道了粒子诱发的BEP2D恶性转化细胞的DNA双链断裂重接修复能力明显降低<sup>7</sup>,本文进一步表明癌变细胞BERP35T-4的修复基因Ku70(XRCC-6)发生突变,编码区中1148~1153位点的碱基由AGGATC突变为GAGTAC,进而导致编码的氨基酸残基由精氨酸、异亮氨酸突变为谷氨酸和酪氨酸,其结果将可能影响所编码蛋白质的生理功能。此外,还发现在细胞转化早期阶段,即粒子照射后的21代细胞修复基因DNA-PKcs(XRCC-7)的mRNA转录水平降低;琼脂克隆形成和裸鼠体内成瘤等实验表明照射后的20代细胞形态已发生改变;琼脂克隆形成率提高,但接种裸鼠不成瘤,直到35代细胞才在裸鼠体内成瘤<sup>6</sup>。本实验结果提示在细胞转化早期阶段DNA修复机制就已发生改变,其后果将加重细胞的基因组不稳定性。最近有文献报道,石棉诱发BEP2D恶性转化细胞中DNA链断裂修复基因Ku70的表达明显受到抑制<sup>11</sup>。本实验室也曾报道了另一个DNA链断裂修复基因Ku80(XRCC-5)发生了碱基突变<sup>12</sup>,随后的序列鉴定表明是在Ku80基因(Genbank注册号:gi10863944)的3073与3074位点间插入了一个核苷酸G,由于该位点是位于3'端的非翻译区,不影响编码的蛋白质序列,但是否影响mRNA的稳定性就值得注意。

Ku70、Ku80和催化亚单位(DNA-PKcs)是组成DNA依赖蛋白激酶(DNA-PK)复合物的三个亚单

位,在DNA双链断裂的非同源末端连接(NHEJ)修复和V(D)J重组中发挥重要作用。在NHEJ途径中,由Ku70和Ku80蛋白形成异源二聚体识别DNA断裂末端并与之相结合,随后使DNA-PKcs聚集在DNA分子末端并被其磷酸化,从而启动DNA双链断裂修复<sup>2</sup>。近来研究表明DNA-PK复合物在维持端粒结构的稳定性中也起着重要作用<sup>13</sup>。DNA-PK基因突变或表达变化,至少是造成细胞DNA修复机制异常和基因组不稳定性的部分原因,其后果将推动细胞恶性转化。

#### 参考文献:

- Hoeijmakers JHJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer J. *Nature*, 2001, 411:366~374.
- Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection J. *Nature Genetics*, 2001, 27:247~254.
- 孙国敬,周平坤,孙志贤. DNA错配修复与大肠癌J. 国外医学·肿瘤学分册,1997,24:272~274.
- 付员根,苏敏,温博贵. BRCA1基因的功能及其上游调控序列结构功能特征J. 癌变·突变·畸变,2002,14(1):47~49.
- 张辅铭. 云锡矿60年代下井矿工肺癌的前瞻性队列研究J. 中国肿瘤,1999,8(11):496~497.
- 楼铁柱,项晓琼,吴德昌. <sup>238</sup>Pu粒子诱发人支气管上皮细胞BEP2D转化的初步研究J. 中国肺癌杂志,2000,3:428~431.
- 隋建丽,刘秀林,胡迎春,金瑾珍,周平坤,吴德昌. 粒子诱发人BEP2D恶性转化细胞的亚克隆及DNA链断裂修复研究J. 癌变·突变·畸变,2002,14(1):5~9.
- Wiley JC, Broussoud A, Sleemi A, et al. Immortalization of normal human bronchial epithelial cells by human papillomaviruses J. *Cancer Res*, 1991, 51:5370~5377.
- Pershagen G, Akerblom G, Axelson O, et al. Residential radon exposure and lung cancer in Sweden J. *New Engl J Med*, 1994, 330:159~164.
- Alavanja MC, Lubin JH, Mahaffey JA, et al. Residential radon exposure and risk of lung cancer in Missouri J. *Am J Public Health* 1999, 89(7):1042~1048.
- Zhao YL, Piao CQ, Wu LJ, et al. Differentially expressed genes in asbestos-induced tumorigenic human bronchial epithelial cells: implication for mechanism J. *Carcinogenesis*. 2000, 21(11):2005~2010.
- 楼铁柱,葛世丽,项晓琼,吴德昌. 粒子诱发转化人支气管上皮细胞系BEP2D中XRCC-5等基因的突变检测J. 癌变·突变·畸变,2002,14(1):10~12.
- Bailey SM, Meyne J, Chen DJ, et al. DNA double-strand breaks repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:14899~14904.