

论著

文章编号:1000-5404(2014)09-0856-04

XPC 蛋白促进膀胱癌细胞 DNA 损伤修复的作用

王欢欢¹, 黄亚琴¹, 余瑾¹, 石家仲¹, 陈志文², 杨劲¹ (400038 重庆, 第三军医大学: 基础医学部细胞生物学教研室¹, 西南医院全军泌尿外科研究所²)

[摘要] **目的** 探讨着色性干皮病基因 C(xeroderma pigmentosum group C, XPC)对膀胱癌 T24 细胞紫外线(ultraviolet ray, UV)介导的 DNA 损伤修复的作用及机制。**方法** 利用 shRNA 策略, Western blot 鉴定 XPC 沉默效果, 建立稳定抑制 XPC 的膀胱肿瘤 T24 细胞模型; CCK-8 法检测 UV 对细胞增殖的影响; 宿主反应实验检测细胞 DNA 损伤修复能力的差异; 免疫荧光检测 UV 损伤处理、XPC 干扰前后 p-ATM 蛋白分子向细胞核 DNA 损伤部位募集情况。**结果** 成功建立稳定抑制 XPC 的膀胱肿瘤 T24 细胞模型, 干扰 XPC 后, 细胞对 UV 损伤敏感性出现显著差异($P < 0.01$), 干扰组 DNA 损伤修复能力较对照组降低($P < 0.01$), p-ATM 向损伤区域的募集作用降低($P < 0.01$)。**结论** UV 损伤条件下, 膀胱癌 T24 细胞通过 XPC 介导 p-ATM 向损伤区域的募集, 以降低细胞 UV 损伤修复能力。

[关键词] 着色性干皮病基因 C; 膀胱癌; DNA 损伤; 紫外线; p-ATM

[中图分类号] R394.3; R730.23; R737.14

[文献标志码] A

XPC protein promotes UV DNA damage response of human bladder cancer cells

Wang Huanhuan¹, Huang Yaqin¹, Yu Jin¹, Shi Jiazhong¹, Chen Zhiwen², Yang Jin¹ (Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, ²Institute of Urinary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To determine the role and the underlying mechanisms of xeroderma pigmentosum group C (XPC) in ultraviolet (UV) DNA damage response of human bladder cancer cell line T24. **Methods** XPC siRNA was used to induce T24 cells with stable XPC knockdown, and the obtained cells were confirmed by Western blotting. CCK-8 kit was employed to detect the inhibitory effects of UV on the T24 cells and T24 cells with XPC knockdown. The ability of DNA repair was evaluated by host-cell reactivation (HCR) assay. The nuclear recruitment of p-ATM towards the damaged DNA was determined by immunofluorescence staining. **Results** The T24 cells with stable XPC knockdown were successfully established. Compared to the normal T24 cells, the XPC knockdown cells were more sensitive to UV treatment ($P < 0.01$), showed declined ability of DNA repair ($P < 0.01$), and reduced nuclear concentration of p-ATM towards the damaged DNA ($P < 0.01$). **Conclusion** XPC play a major role in DNA repair *via* affecting the nuclear recruitment of p-ATM in T24 cells.

[Key words] xeroderma pigmentosum group C; bladder cancer; DNA damage; ultraviolet rays; p-ATM

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China(30972979). Corresponding author: Yang Jin, E-mail: zhiwen@hotmail.com

DNA 损伤应答是维持细胞遗传稳定性及高保真性的重要机制,其发生改变将导致损伤的 DNA 不能修复或者不能正确修复从而引发突变,最终导致许多生理过程的改变及肿瘤的发生^[1]。在众多的 DNA 修复途径和机制中,核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)因其修复损伤 DNA 类型最为广泛成为机

体主要的修复途径^[2];同时, DNA 修复的启动有赖于 DNA 损伤应答检测点(checkpoint)的级联信号转导,其中磷酸化 ATM(p-ATM)募集至 DNA 损伤位点是诸多 DNA 损伤应答信号转导的关键早期环节与限速反应^[3]。作为 NER 途径中最早的损伤识别蛋白,着色性干皮病基因 C(xeroderma pigmentosum group C, XPC)可通过与 RAD23B centrin2 形成复合物从而感知、识别损伤 DNA,进一步募集下游修复蛋白完成修复^[4-5],故其表达缺失或功能异常往往使 DNA 不能正常修复,导致突变甚至肿瘤的发生^[6]。有关 XPC 最新

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30972979)

[通信作者] 杨劲, E-mail: zhiwen@hotmail.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140124.1021.004.html> (2014-01-24)

的机制研究提示,除在经典 NER 中发挥重要作用外, XPC 可促进 P53 激活,提示在 DNA 损伤应答中还可能发挥了重要的早期损伤检测点的信号作用^[7]。但是, XPC 如何激活 P53,是否通过影响 P53 的上游信号 ATM 等,均有待进一步阐明。膀胱癌在我国男性泌尿生殖肿瘤中发病率第一,明显高于西方国家,已经较为明确的发生膀胱癌的危险因素为吸烟、化工染料(如苯胺)、药物(如环磷酰胺)等,这些危险因素均为 DNA 损伤剂,而大部分 DNA 化学损伤由 NER 完成^[2]。目前研究显示,膀胱癌与 XPC 缺陷密切相关,国外和我们课题组的研究均发现, XPC 外显子 15 (A2920C, Lys939→Gln) 多态性和内含子 9 的双等位基因多态性是膀胱癌发生的高危易感因素^[8];同时,我们前期研究还发现, XPC 表达沉默是膀胱癌中的高频事件之一,强烈提示 XPC 缺陷可能是膀胱癌发生的早期重要事件之一^[8]。但是, XPC 的缺陷或异常在膀胱癌发生、发展中的具体作用与机制尚不得知,有待进一步研究。本研究选择膀胱癌中 XPC 表达正常的 T24 细胞,通过建立 XPC 沉默的细胞模型,模拟膀胱癌 XPC 缺失的事实,采用经典的 NER 损伤模型——紫外线 (ultraviolet ray, UV) 损伤,分析 XPC 对膀胱癌细胞 DNA 损伤应答及修复能力的影响,通过观察 XPC 是否影响磷酸化 ATM (p-ATM) 募集于 DNA 损伤位点,初步探讨 XPC 在促进膀胱癌细胞 DNA 损伤应答中的新型信号转导作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人膀胱癌 T24 细胞系,由第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室保存。

1.1.2 试剂 胎牛血清、胰酶和 DMEM 高糖细胞培养基为美国 HyClone 公司产品; CCK-8 试剂盒为日本 Dojindo Laboratories 产品; DC Protein Assay 蛋白浓度测定试剂盒为美国 Bio-Rad 产品; DAPI 染色液、抗荧光淬灭剂、细胞裂解液、青链霉素溶液和 Tubulin 抗体购自江苏碧云天生物技术公司; 蛋白酶抑制剂为 Roche 公司产品; XPC (ab6264)、p-ATM (ab81292) 抗体为美国 Abcam 公司产品; 二抗、化学发光底物试剂盒以及细胞培养板为美国 Thermo 公司产品; PVDF 膜购自 Millipore 公司; Luciferase 检测试剂盒购自美国 Sigma 公司, 阳离子脂质体购自美国 Invitrogen 公司, 牛血清白蛋白 (BSA) 购自 USB 公司, 4% 多聚甲醛、封闭脱脂奶粉购自武汉博士德公司; 感染病毒购自吉凯公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 T24 细胞培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 RPMI1640 培养基中,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养,待其贴壁生长,常规换液和传代后,待细胞进入对数生长期,即可接种于细胞培养板中进行实验。

1.2.2 建立稳定抑制 XPC 的膀胱肿瘤 T24 模型 利用

shRNA 策略,将处于对数生长期的 T24 细胞以每孔 5 000 个接种于 96 孔板,分为对照组 (NC) 和干扰组 (shXPC),病毒感染 48 h 后换液,72 h 后免疫荧光镜下观察感染效果并倍比稀释感染细胞,待稀释的单细胞长成克隆 (约 200 个细胞) 时,挑选荧光较强的克隆扩大培养并验证干扰效果。

1.2.3 CCK-8 法检测 UV 对细胞增殖的影响 取对数生长期的 NC、shXPC 2 组细胞接种于 96 孔板,用细胞计数板计数,置每孔约 4 000 个细胞于 200 μL 培养基中,待其完全贴壁后进行损伤处理。2 组细胞分别进行空白处理及不同剂量的 UV 处理 (2、4、8、10、15、20 J/m²),每种处理设 3 个复孔,处理 48 h,待对照孔细胞长满后,将培养基弃去,各加入含 5 μL CCK-8 检测试剂的 1640 溶液 100 μL,于 37 °C、5% CO₂ 孵箱内孵育 1~2 h,最后,在 450 nm 波长下测定光密度值 [D(450)],计算不同剂量的 UV 对 2 组细胞增殖的抑制率。细胞抑制率 = [对照孔 D(450) 值 - 加药孔 D(450) 值] / 对照孔 D(450) × 100%。

1.2.4 细胞总蛋白的提取和 Western blot 检测 UV 照射结束后,胰酶消化细胞并经 PBS 洗涤后用 RIPA 细胞裂解液于冰上裂解 15 min。于 4 °C、14 800 r/min 离心 10 min,取上清并用 DC Protein Assay 法测量蛋白浓度,经浓度标准化后进行 Western blot 检测。取 20 μg 总蛋白,经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,将蛋白转至 PVDF 膜上。用 1% BSA 常温封闭 2 h,然后用 1:1 000 稀释的一抗 4 °C 孵育过夜,用含 0.1% Tween20 的 PBST 洗膜 3 次,每次 10 min,之后用 1:10 000 稀释的二抗常温孵育 2 h, PBST 洗涤后用化学发光底物法将 PVDF 膜用 X 线片曝光。

1.2.5 宿主反应实验 取对数生长期的 NC、shXPC 2 组细胞接种于 24 孔板中,贴壁 12 h 之后,将 UV (1 000 J/m²) 随机损伤的含有 Luciferase 报告基因的 PUG15 质粒瞬时转染至 2 组细胞,继续培养 48 h,使质粒在细胞内得以充分修复,48 h 后裂解细胞,每孔加入 200 μL Luciferase 报告基因专用裂解液,4 °C 裂解 30 min,将细胞吹下转移至 EP 管中 4 °C 离心 2 min,取裂解上清液 20 μL,加入 100 μL Luciferase 检测试剂,快速混匀后检测报告基因的表达计算相对修复率, DNA 相对损伤修复率 = 损伤质粒 Luc RLU 值 / 未损伤质粒 Luc RLU 值 × 100%。

1.2.6 免疫荧光实验 将处于对数生长期的 NC、shXPC 2 组细胞接种于底部有盖玻片的 6 孔板中,24 h 后 UV (6 J/m²) 处理,2 h 后取细胞爬片, PBS 漂洗 2 次/3 min,室温 4% 多聚甲醛固定 5 min, PBS 漂洗 2 次/3 min, 0.2% NP40 室温透膜 5 min, PBS 漂洗 2 次/3 min,室温 1% BSA (牛血清白蛋白) 封闭 1 h,一抗 p-ATM 1:500 稀释,4 °C 孵育过夜后 PBS 漂洗 3 次/10 min,荧光二抗 (1:500 稀释) 室温孵育 1 h 后 PBS 漂洗 3 次/10 min,之后 DAPI 复染室温孵育 5 min 后 PBS 漂洗 2 次/3 min。抗荧光淬灭剂封片,荧光显微镜下观察 p-ATM 募集至损伤 DNA 的情况。

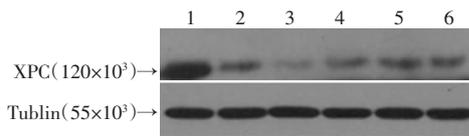
1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行组间单因素方差分析和独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 建立稳定抑制 XPC 的膀胱肿瘤细胞模型

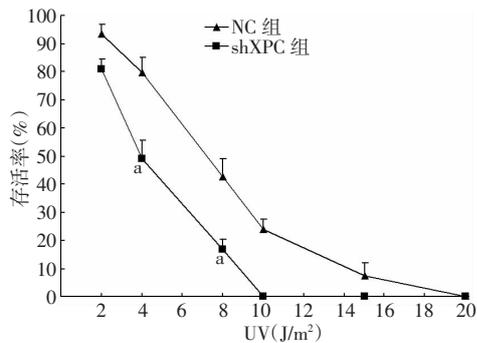
选取干扰效果较好的克隆 1 (泳道 2),进行后续的实验研究 (图 1)。



1:病毒感染对照组;2~6:病毒感染后挑选的不同干扰组细胞克隆
图1 Western blot 检测病毒感染 T24 细胞后不同 shXPC 克隆的 XPC 表达

2.2 shXPC 细胞对 UV 的敏感性增加

结果见图2, shXPC 细胞对 UV 的敏感性较 NC 细胞显著增加($P < 0.01$)。



a: $P < 0.01$, 与 NC 组比较

图2 不同剂量 UV 处理对 2 组细胞存活率的影响

2.3 shXPC 细胞的 DNA 损伤修复能力降低

NC 细胞的 DNA 相对修复率高达 $(75.13 \pm 7.25)\%$, 而 shXPC 细胞仅为 $(46.43 \pm 12.39)\%$, 修复能力明显降低 ($P = 0.013$)。

2.4 shXPC 细胞 p-ATM 向损伤 DNA 的募集降低

NC 细胞中出现 p-ATM 募集细胞比例为 $(68.47 \pm 14.13)\%$, 而 shXPC 细胞为 $(25.5 \pm 12.19)\%$, 两者比较差异具有统计学意义 ($P = 0.008$, 图3)。

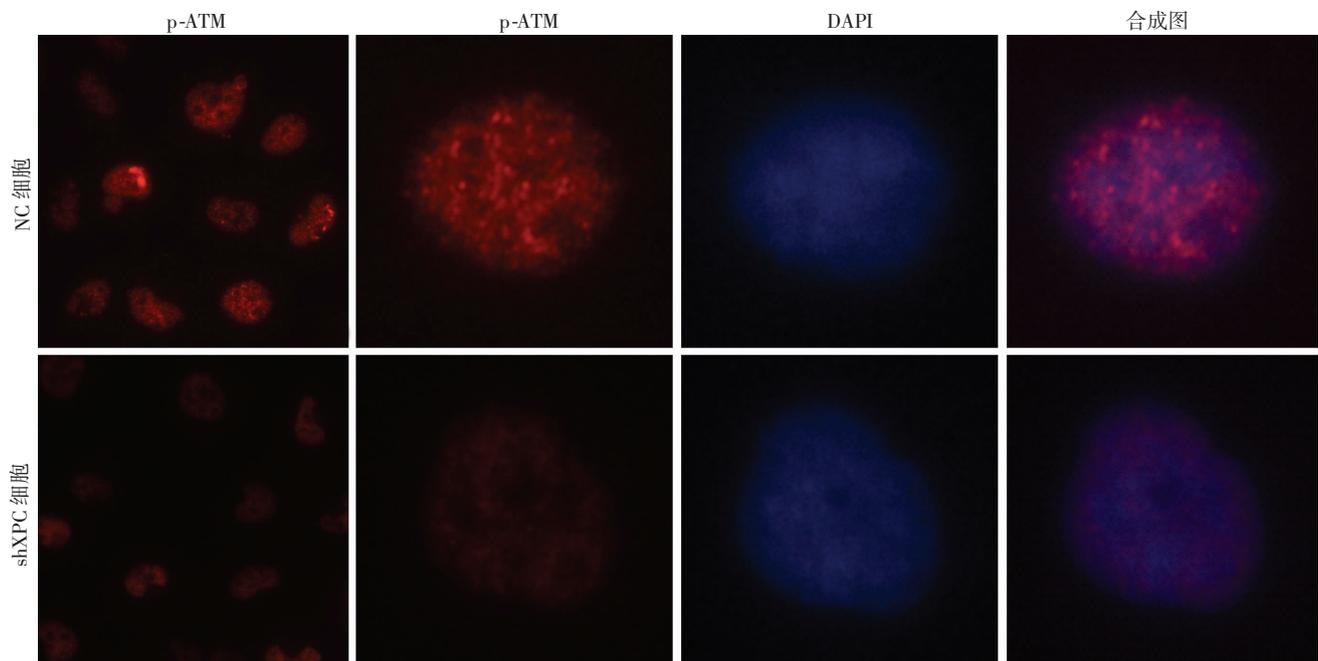


图3 6 J/m^2 UV 处理 2 组细胞 2 h 后免疫荧光染色观察 p-ATM (红色) 细胞核募集表达 (DAPI 复染细胞核 $\times 400$)

3 讨论

本研究选用 XPC 表达正常的膀胱癌 T24 细胞, 首先通过慢病毒感染策略成功构建稳定抑制 XPC 表达的细胞模型, 在 UV 作为 DNA 损伤剂的作用下发现 DNA 损伤应答的生物学效应发生了显著改变, 细胞增殖实验提示 XPC 被抑制后对 UV 损伤的敏感性显著增加, 而宿主细胞反应实验表明其修复能力显著下降。鉴于肿瘤的发生是在致癌环境中长期作用的结果, DNA 修复能力的下降使损伤的 DNA 不能正确地修复, 继而产生 DNA 的突变, 虽然严重的 DNA 损伤使细胞中 DNA 无法复制导致细胞不能生存从而敏感性增加, 但是生存下来的细胞累积的突变最终将导致高遗传不稳定性的发生甚至癌变。

最近在人源 XPC 遗传性缺陷细胞中通过基因芯片技术 (microarray) 研究发现, XPC 不仅直接参与 DNA 的损伤修复, 而且其在 DNA 损伤应答过程中 (如周期监测点) 起着早期信号转导的作用^[8]。由于 ATM 自身磷酸化是 DNA 损伤应答反应的早期关键的核心事件^[9], 通过免疫荧光技术发现 UV 损伤下, XPC 影响 p-ATM 向损伤 DNA 的募集, 即对照组细胞在损伤处理之后 p-ATM 分子快速向损伤 DNA 募集进一步形成 foci 结构, 从而募集下游的修复蛋白完成损伤修复; 而 XPC 干扰组细胞几乎没有 p-ATM 募集形成, 无法启动下游的修复传导通路。提示在膀胱癌细胞中, XPC 除了直接参与由 UV 损伤引起的 DNA 损伤的修复, 而且通过影响 p-ATM 的募集在损伤应答发挥新的信号功能。

在DNA损伤的早期,ATM的磷酸化启动了包括CHK1、P53、P21等信号转导的级联反应从而决定了细胞生物学行为及命运^[9-13]。XPC影响p-ATM向损伤DNA的募集提示XPC在DNA损伤应答中可能还会有新功能,本研究未就XPC与ATM之间如何相互作用的分子机制深入探索,且只采用了紫外线损伤较为单一的损伤形式。最近,本课题组已展开顺铂损伤下的相关研究,相信通过更多的努力能帮助人们更好地理解XPC在损伤应答及修复中的新作用新角色。

参考文献:

[1] Tian K, Rajendran R, Doddanajiah M, et al. Dynamics of DNA damage induced pathways to cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e72303.
[2] Schärer O D. Nucleotide excision repair in eukaryotes[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013, 5(10): a012609.
[3] Shiloh Y, Ziv Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, 14(4): 197-210.
[4] Renaud E, Miccoli L, Zacal N, et al. Differential contribution of XPC, RAD23A, RAD23B and CENTRIN 2 to the UV-response in human cells[J]. DNA Repair (Amst), 2011, 10(8): 835-847.
[5] Lans H, Martejijn J A, Schumacher B, et al. Involvement of global genome repair, transcription coupled repair, and chromatin remodeling in UV DNA damage response changes during development[J]. PLoS

Genet, 2010, 6(5): e1000941.
[6] Sugawara K. XPC: its product and biological roles[J]. Adv Exp Med Biol, 2008, 637: 47-56.
[7] Chen Z, Yang J, Wang G, et al. Attenuated expression of xeroderma pigmentosum group C is associated with critical events in human bladder cancer carcinogenesis and progression[J]. Cancer Res, 2007, 67(10): 4578-4585.
[8] Wang G, Chuang L, Zhang X, et al. The initiative role of XPC protein in cisplatin DNA damaging treatment-mediated cell cycle regulation[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(7): 2231-2240.
[9] Xu Y, Xu C, Price B D. Mechanistic links between ATM and histone methylation codes during DNA repair[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2012, 110: 263-288.
[10] Johnson N, Cai D, Kennedy R D, et al. Cdk1 participates in BRCA1-dependent S phase checkpoint control in response to DNA damage[J]. Mol Cell, 2009, 35(3): 327-339.
[11] Xu N, Libertini S, Black E J, et al. Cdk-mediated phosphorylation of Chk1 is required for efficient activation and full checkpoint proficiency in response to DNA damage[J]. Oncogene, 2011, 31(9): 1086-1094.
[12] Cerqueira A, Santamaria D, Martinez-Pastor B, et al. Overall Cdk activity modulates the DNA damage response in mammalian cells[J]. J Cell Biol, 2009, 187(6): 773-780.
[13] Bergink S, Toussaint W, Luijsterburg M S, et al. Recognition of DNA damage by XPC coincides with disruption of the XPC-RAD23 complex[J]. J Cell Biol, 2012, 196(6): 681-688.

(收稿:2013-11-01;修回:2013-12-17)

(编辑 龙亮)

文章编号:1000-5404(2014)09-0859-01

个案与短篇

104例Achillon微创跟腱吻合器治疗急性跟腱断裂的疗效观察

张渝 (400038 重庆,第三军医大学西南医院急救部)

[关键词] 跟腱断裂;微创;跟腱吻合器

[中图分类号] R686.105 [文献标志码] B

急性跟腱断裂是临床上常见的急性损伤,跟腱的血供较少,愈合困难,术后并发症较多^[1]。目前常规治疗采用广泛切开手术使跟腱断端充分对合,但术后常出现伤口皮肤坏死感染,跟腱愈合差等问题^[2]。西南医院创伤急救中心从2006-2012年共收治急性跟腱断裂104例,采用Achillon微创缝合的方法行一期微创手术吻合,取得较好的疗效,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

本组闭合性跟腱断裂56例,其中男33例,女23例;左侧25例,右侧31例;平均年龄29.3(19~55)岁;间接暴力损伤

43例,直接暴力损伤11例,不明原因损伤2例。开放性跟腱断裂48例,其中男30例,女18例,左侧22例,右侧26例;平均年龄32.5(21~66)岁;玻璃割伤21例,瓷片割伤15例,电锯割伤8例,刀砍伤4例;完全断裂42例,不完全断裂(大于1/3)6例。断裂部位:断端距跟骨结节3cm以上,所有病例断裂部位均位于腱、肌腹交界部以远,从受伤到就诊的时间为0.5~16h,均在入院后1h内行手术。

1.2 手术方法及术后处理

对于闭合性跟腱断裂患者,根据术前MR确定手术切口,切口位于断裂处内侧,打开跟腱鞘后不游离跟腱鞘,清理断端血肿。按照前期报道的方式进行吻合操作^[3]。对于开放性跟腱断裂患者,首先进行彻底清创,注意保护周围组织,不做过多剥离,适当行锐性修整,不过多切除。同上法行吻合手术。

术后切口无引流,踝关节跖屈30°石膏外固定1周后换为管型石膏,跟腱处开窗换药。术后6周拆除石膏后部分负重活

(下转877页)

[通信作者] 张渝, E-mail: 21865455@qq.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140417.1543.003.html> (2014-04-17)