论著

文章编号:1000-5404(2007)15-1458-04

电离辐射诱导骨肉瘤细胞DNA损伤修复蛋白APE1线粒体定位研究

李梦侠[1],王 东[1],向德兵[1],张云嵩[1,2],杨宇馨[1],龙在云[3] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]肿瘤中心、病理科,[2]胸心外科,[3]第三研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨电离辐射诱导骨肉瘤细胞脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶(apurinic/aprimidinic endonuclease 1, APE1)线粒体定位表达情况,为进一步研究线粒体DNA修复在骨肉瘤放射治疗抵抗中的作用提供依据。**方法** 应用激光共聚焦显微术和Western blot观察正常对照组和12 Gy X线照射后不同时相点骨肉瘤细胞株HOS细胞中APE1线粒体定位情况。**结果** 对照组、12 Gy X射线处理后1、2、3 h APE1和线粒体有共定位现象,APE1细细胞质/细胞核荧光强度比值分别为:(0.78±0.04)、(1.04±0.03)、(1.14±0.05)、(1.80±0.38)。Western blot亦证实线粒体内APE1蛋白表达增高。**结论** 放射后早期APE1向细胞质线粒体移位,从1~3 h逐渐增高,提示APE1可能在电离辐射后骨肉瘤细胞线粒体DNA损伤修复中发挥重要作用。

关键词:骨肿瘤;APE1;线粒体;放射治疗

中图法分类号:R730.55;R730.23;R738.1 **文献标识码**:A

Mitochondrial translocation of DNA damage and repair protein APE1 in human osteosarcoma cell after ionizing radiation

LI Meng-xia[1], WANG Dong[1], XIANG De-bing[1], ZHANG Yun-song[1,2], YANG Yu-xin[1], LONG Zai-yun[3] ([1]Cancer Center and Department of Pathology, [2]Department of Thoracic Surgery, [3]Department 3, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate mitochondrial localization of apurinic/aprimidinic endonuclease/redox factor-1 (APE1) in human osteosarcoma cells after ionizing radiation (IR), shedding light on further study of the role of mitochondrial DNA repair in resistance to radiotherapy for osteosarcoma. **Methods** The mitochondrial localization of APE1 in untreated human osteoblast sarcoma (HOS) cells and HOS cells exposed to 12 Gy X-ray was observed by laser confocal microscopy, then confirmed by Western blot. **Results** APE1 in untreated HOS cells and HOS cells exposed to 12 Gy X-ray for 1, 2, 3 h could translocate to mitochondria, and the cytoplasm/nucleus fluorescent intensity values were (0.78±0.04), (1.04±0.03), (1.14±0.05), (1.80±0.38), respectively. Mitochondrial APE1 protein increasing in time course was also confirmed by Western blot. **Conclusion** APE1 can shift from nuclus to mitochondria at early stage after IR treatment, and increase within time-course, suggesting APE1 may play a crucial role in mitochondrial DNA repair of osteosarcoma cells after IR.

Key words: bone tumor; APE1; mitochondria; radiotherapy

脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶(apurinic/aprimidinic endonuclease 1, APE1)是一个双功能生物大分子,它不仅是DNA碱途径的主要限速酶,而且是一种重要的氧化基切除损伤修复(base excision repair, BER)还原因子,能够调控多种转录因子氧化还原状态[1]。APE1除分布于细胞核外,还定位于线粒体,很可能在线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)损伤修复中发挥重要作用。线粒体是重要的细胞器之一,典型的细胞包含有多至上千个线粒体,而每个线粒体又含有2~10拷贝的mtDNA。mtDNA为闭环超螺旋结构,由16 569个碱基对组成,编码22种tRNA,2种rRNA和13种多肽,后者决定了线粒体电子转运链(electron transport chain, ETC)和ATP合成酶的功能。由于线粒体基因组缺乏组蛋白保护,基因密度较大以及位于线粒体内

基金项目:国家自然科学基金(30472004、30670628)和全军医学科研"十一五"计划面上项目(06MA188)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30472004, 30670628) and the General Program of the General Program of "Eleventh Five-Year Plan" of PLA (06MA188)

作者简介:李梦侠(1981-),男,重庆市人,硕士研究生,主要从事DNA损伤修复及肿瘤放化疗分子机制方面的研究。电话:(023)68757374

通讯作者:王 东,电话:(023)68757706, E-mail: dongwang64@hotmail.com

收稿日期:2006-08-28;**修回日期**:2006-11-02

膜邻近 ETC 等特点，mtDNA 比核 DNA 更容易受到电离辐射（ionizing radiation，IR）等因素损伤而启动凋亡途径[2]。因此，我们提出放射治疗过程中，在电离辐射的作用下，mtDNA 损伤修复的机制可能与肿瘤放射敏感性密切相关。为此，本研究通过对 X 线照射后骨肉瘤 HOS 细胞进行激光共聚焦显微镜观察及 Western blot 检测，研究电离辐射诱导的 DNA 损伤蛋白 APE1 线粒体定位，为进一步阐明 mtDNA 损伤修复的机制，以及今后可能的以线粒体 APE1 为靶点的基因放射治疗提供实验基础。

1　材料与方法

1.1　细胞培养和电离辐射

人骨肉瘤细胞株 HOS 引自美国 ATCC。在含有 10% 新生牛血清的 MEM 培养基（Hyclone，美国）中，37 ℃ 5% CO_2 恒温培养箱中体外培养。培养细胞传代后 12 h 细胞贴壁生长，覆盖培养瓶底壁约 90%，移除培养基，用 Elekta pricise 直线加速器（Elekta，瑞典）照射细胞，剂量 12 Gy，能量 8 MeV，距放射源 100 cm，剂量率约 350 cGy/min，分为对照组，照射后 1、2、3 h 组，每组重复 3 次。

1.2　线粒体提取物的制备

常规收集 5×10^7 个细胞，按照 Frossi 等[3]的方法提取线粒体蛋白。具体步骤如下：用 10 ml 裂解缓冲液（250 mmol/L 蔗糖，2 mmol/L EDTA，1 mg/ml BSA，pH 7.4）洗涤细胞 2 次后，加入 1 ml 4 ℃ 预冷裂解缓冲液重悬细胞后，用超声破碎仪处理细胞 10 s，使约 60% 细胞破碎。4 ℃ 800 × g 离心 12 min 沉淀细胞核及未破碎细胞，上清于 4 ℃ 8 500 × g 离心 20 min 沉淀线粒体，并用 100 μl S 缓冲液（150 mmol/L 蔗糖，40 mmol/L KCl，25 mmol/L Tris-HCl，1 mg/ml BSA，pH 7.4）重悬后超声破碎仪处理 30 s 后，4 ℃ 10 000 × g 离心，取上清用 Bradford 法测定蛋白含量。

1.3　Western blot 检测

加入 2 × 上样缓冲液（10% 甘油，0.1 mol/L Tris-HCl，0.2 mol/L DTT，4% β-巯基乙醇，5% SDS，0.5% 溴酚蓝）稀释蛋白样品至 1 mg/ml，用 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 120 V 分离蛋白，并用湿法 400 mA 转印至 PVDF 膜（Sigma，美国）上，分别与 APE1 单克隆抗体（Novus，美国）及 HRP 偶联二抗（中杉金桥，中国）孵育，用 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate 试剂盒（Pierce，美国）化学发光，在 X 线胶片（Agfa，美国）上曝光显影。

1.4　激光共聚焦显微术定位蛋白分布

2×10^3 个细胞消化后接种于 35 mm 直径培养皿（Corning，美国）后 12 h 完全贴壁，不处理或用 X 射线照射细胞，弃去培养基，加入新鲜配制的含有 200 nmol/L Mitotracker Red 线粒体探针（Molecular Probe，Invitrogen，美国）的培养基 37 ℃ 孵育 30 min，PBS 洗涤培养皿 2 ~ 3 次，加入 95% 乙醇固定细胞 20 min。PBS 洗涤培养皿 2 ~ 3 次，加入 0.2% TritonX-100 处理 20 min 增强细胞通透性。PBS 洗涤培养皿后分别与 APE1 单克隆抗体及 Alexa Fluor 488 荧光二抗（Molecular Probe，Invitrogen，美国）于湿盒中 37 ℃ 孵育 1 h，用激光共聚焦显微镜（Leica TCS SP2，德国）分别于 579 nm 和 488 nm 激发并接收荧光信号通过计算机采集图片。

1.5　图像处理

在每个处理组的细胞照片中任意选取 6 ~ 7 个细胞，通过线粒体探针区分细胞质与细胞核区域形状并在 APE1 荧光示踪图片中选定对应区域，用 Image Pro Plus 5.0 软件（Media Cybernetics，美国）测量细胞核及细细胞质区域荧光强度，并用 EXCEL 2003（Microsoft Office，美国）计算出质/核荧光强度比值，此外，用 Image Pro Plus 5.0 软件测量 Western blot 条带灰度值，分析相对蛋白含量变化趋势。

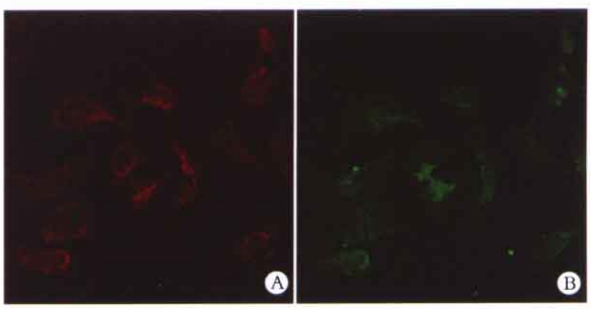
1.6　统计学处理

用 SPSS 10.0 中独立样本 t 检验分析各处理组之间差别。

2　结果

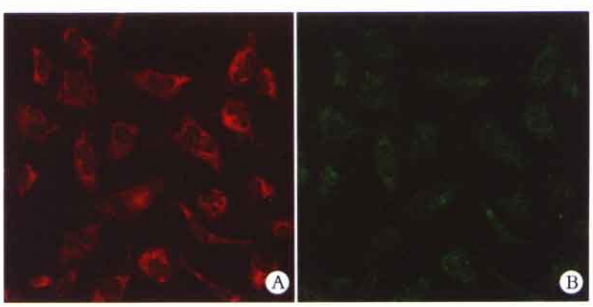
2.1　激光共聚焦显微镜观察照射后 APE1 在线粒体中的定位

为了解电离辐射促进 APE1 线粒体转位，用 Mitotrack Red 标记线粒体，荧光标记二抗标记 APE1，利用激光共聚焦显微技术显示 APE1 在线粒体中的聚积。如图 1 ~ 4 所示，APE1 与线粒体存在共定位现象，对照组中即有少量叠加产生的橙色荧光，随着放射照射后时间延长橙色荧光信号逐渐增强，提示定位于线粒体中的 APE1 量逐渐增加。



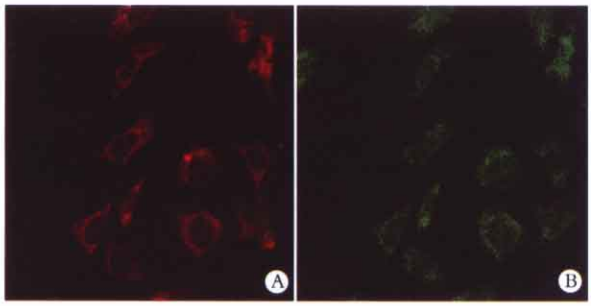
A：Mitotrack Red 显示线粒体，红色荧光即为线粒体染色；B：APE1 在细胞内分布，呈绿色荧光

图 1　对照组 HOS 细胞激光共聚焦显微镜观察



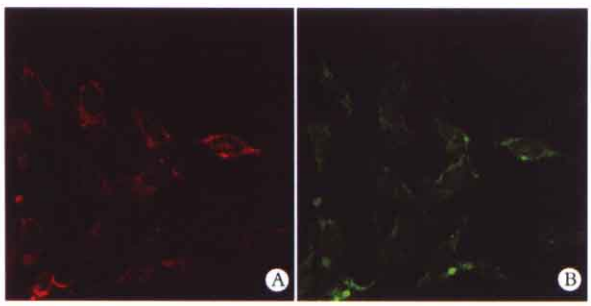
A：Mitotrack Red 显示线粒体，红色荧光即为线粒体染色；B：APE1 在细胞内分布，呈绿色荧光

图 2　12 Gy X 线照射后 1 h 组 HOS 细胞激光共聚焦显微镜观察



A：Mitotrack Red 显示线粒体，红色荧光即为线粒体染色；B：APE1 在细胞内分布，呈绿色荧光

图3 12 Gy X 线照射后 2 h 组 HOS 细胞激光共聚焦显微镜观察



A：Mitotrack Red 显示线粒体，红色荧光即为线粒体染色；B：APE1 在细胞内分布，呈绿色荧光

图4 12 Gy X 线照射后 3 h 组 HOS 细胞激光共聚焦显微镜观察

2.2 利用 Image Pro Plus 5.0 软件分析照射后 APE1 亚细胞定位半定量改变

为进一步对放射诱导 APE1 在线粒体中的聚积进行半定量分析，用 Image Pro Plus 5.0 软件测量细胞核及细细胞质区域荧光强度。实验中，为了排除激光共聚焦显微镜采集数据时参数设置差异，未将细胞质荧光强度作为表达强度的指标，而是通过比较细胞质与细胞核荧光强度比值作为其亚细胞定位改变趋势的指标。结果显示，对照组、12 Gy 放射照射后 1、2、3 h 细细胞质/细胞核荧光强度比值分别为：(0.78 ± 0.04)，(1.04 ± 0.03)，(1.14 ± 0.05)，(1.80 ± 0.38)（图5）。结果各组间有显著性差异（$P < 0.01$），而且细细胞质/细胞核荧光强度比值对照组 < 照射后 1 h 组 < 照射后 2 h 组 < 照射后 3 h 组。结果表明放射照射后 APE1 细胞核分布减弱或/和细细胞质分布增强，APE1 呈由细胞核至细胞质移位的趋势。

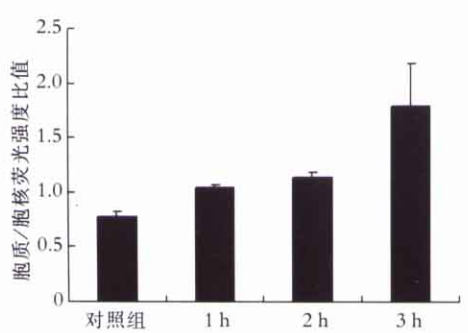
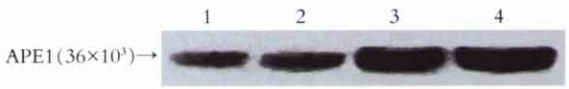


图5 照射后 APE1 细胞质/细胞核荧光强度比值变化

2.3 Western blot 检测 APE1 在照射后 HOS 细胞线粒体中的表达情况

对未处理及照射后 HOS 细胞线粒体提取物进行 Western blot 检测，结果显示照射组 HOS 细胞线粒体中 APE1 表达强于未处理组，且随着时间延长逐渐增高（图6）。应用 Image Pro Plus 5.0 软件测量表明各条带灰度值逐渐降低，亦说明各条带蛋白含量逐渐增高（表1）。



1：对照组；2：照射后 1 h 组；3：照射后 2 h 组；4：照射后 3 h 组

图6 Western blot 检测 APE1 在放射后 HOS 细胞线粒体中的表达

表1 Western blot 条带灰度值分析

组别	灰度值
对照组	74.46 ± 26.65
照射后 1 h	70.72 ± 29.35
照射后 2 h	48.60 ± 30.51
照射后 3 h	30.96 ± 33.21

3 讨论

放射治疗是恶性肿瘤综合治疗的主要方法之一，在目前的肿瘤治疗中发挥着越来越重要的作用。细胞 DNA 是放射治疗中 IR 最主要的靶分子，肿瘤细胞接受放射治疗时，能产生大量的活性氧分子（reactive oxygen species，ROS），造成 DNA 氧化性损伤，并由于这种致突变损伤的聚积而最终导致细胞死亡。线粒体是除细胞核外唯一具有独立基因组 DNA 的亚细胞结构，mtDNA 由于缺乏组蛋白保护、基因密度高而且紧邻产生 ROS 的 ETC，非常容易受到 ROS 攻击而导致氧化性损伤。mtDNA 损伤将进一步导致 ETC 氧化还原能力降低，引起线粒体外膜电位改变，最终通过释放细胞色素 C 等前凋亡物质而启动凋亡，因此 mtDNA 损伤可能是 IR 引起细胞凋亡的主要因素。人体乃至所有生物的细胞都存在着 DNA 修复系统，这是细胞维持基因组稳定性最重要的防御机制。但是对于肿瘤细胞，DNA 损伤修复则很可能是导致其对放射治疗不敏感的重要机制之一。IR 可引起线粒体多种形式的 DNA 损伤，包括缺失、突变和碱基损伤等，然而与细胞核不同，线粒体中很可能仅存在一种 DNA 修复机制——BER[4]，主要负责氧化性 DNA 损伤的修复[5]，因此线粒体 BER（mitochondrial BER，mtBER）活性很可能决定肿瘤细胞对 IR 的敏感性。

APE1 是一个多个重要的生物学过程中必需的多功能分子，目前仍然无法在体外培养出 Ape1 基因完

全缺陷的细胞系[6]。首先，APE1 在 BER 途径中发挥着极其重要的作用，能够在 AP 位点的 5′端切断 DNA 主链，为进一步的修复提供 3′末端，是 BER 途径的主要限速酶。其次，它通过调控转录因子氧化还原状态而发挥重要作用，这些转录因子包括 p53，AP-1，NF-κB，HIF 等，它们分别控制着如凋亡、增殖和分化等重要的生物学过程。最近有研究显示 APE1 还可以下调 Ras 相关 GTP 酶 Rac1 活性来控制细胞内 ROS 产量[7]。

ROS 可以作为一种细胞内信号调控包括 APE1 在内的一系列基因在氧化应激状态下的表达水平及亚细胞定位。Tell 等[3,8]的一系列研究发现在 ROS 诱导的氧化应激状态下细胞内 APE1 mRNA 和蛋白水平上调，而且亚细胞定位发生明显的变化，从细胞核向细胞质线粒体移位，而且这种移位不伴随细胞凋亡，表明 APE1 在 mtDNA 氧化损伤修复中发挥重要作用。APE1 是 BER 途径中主要的限速酶，其线粒体表达的水平与 mtBER 修复活性直接相关[2]，因此很可能是决定肿瘤细胞对 IR 敏感性的主要靶分子。我们前期的工作表明，APE1 与骨肉瘤的放射敏感性有关，应用 RNA 干扰技术敲低 APE1 的表达能显著提高 HOS 对 IR 的敏感性[9,10]。这固然与 APE1 在细胞核中的表达和作用有关，但其与 APE1 在线粒体中的定位于作用是否相关，国内外尚少见相关报道。本研究通过形态学观察和 Western blot 验证提示对照组 HOS 细胞中 APE1 大部分定位于细胞核内，当用 IR 处理后出现明显的线粒体移位，并随时间延长呈递增趋势。结果表明 APE1 向线粒体移位很可能加强了 mtDNA 氧化性损伤的修复，从而导致对常规放射治疗抵抗。

综上所述，由于放射治疗等常规肿瘤治疗通过破坏肿瘤细胞 DNA 发挥治疗效应，且 mtDNA 对 DNA 损伤物质更为敏感，同时也是启动细胞凋亡的关键因素，因此有研究认为线粒体可能是比细胞核更有效的肿瘤治疗靶点[11]。同时由于 APE1 在 mtBER 途径中的中心作用，因此 APE1 线粒体定位及其修复活性很可能是调节肿瘤细胞放射治疗敏感性的关键因素，可能是今后可能的以提高肿瘤放射治疗敏感性为目的的“基因放疗”中一个有前途的分子靶点。

参考文献：

[1] Evans A R, Limp-Foster M, Kelley M R. Going APE over ref-1[J]. Mutat Res, 2000, 461(2): 83 - 108.

[2] Stuart J A, Hashiguchi K, Wilson D M, 3rd., *et al*. DNA base excision repair activities and pathway function in mitochondrial and cellular lysates from cells lacking mitochondrial DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(7): 2181 - 2192.

[3] Frossi B, Tell G, Spessotto P, *et al*. H_2O_2 induces translocation of APE/Ref-1 to mitochondria in the Raji B-cell line[J]. J Cell Physiol, 2002, 193(2): 180 - 186.

[4] Bohr V A, Stevnsner T, De-Souza-Pinto N C. Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells[J]. Gene, 2002, 286(1): 127 - 134.

[5] Sung J S, Demple B. Roles of base excision repair subpathways in correcting oxidized abasic sites in DNA[J]. FEBS J, 2006, 273(8): 1620 - 1629.

[6] Demple B, Sung J S. Molecular and biological roles of Ape1 protein in mammalian base excision repair[J]. DNA Repair (Amst), 2005, 4(12): 1442 - 1449.

[7] Tell G, Damante G, Caldwell D, *et al*. The intracellular localization of APE1/Ref-1: more than a passive phenomenon? [J]. Antioxid Redox Signal, 2005, 7(3 - 4): 367 - 384.

[8] Tell G, Crivellato E, Pines A, *et al*. Mitochondrial localization of APE/Ref-1 in thyroid cells[J]. Mutat Res, 2001, 485(2): 143 - 152.

[9] Wang D, Luo M, Kelley M R. Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition[J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(6): 679 - 686.

[10] 卿　毅，王　东，李增鹏，等. 人骨肉瘤细胞 HOS 锎-252 中子放射敏感性的研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(2)：117 - 120.

[11] Santos J H, Hunakova L, Chen Y, *et al*. Cell sorting experiments link persistent mitochondrial DNA damage with loss of mitochondrial membrane potential and apoptotic cell death[J]. J Biol Chem, 2003, 278(3): 1728 - 1734.

（编辑　陈聪连）

血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神，血压计量单位恢复使用毫米汞柱（mmHg），但首次使用时应注明 mmHg 与千帕[斯卡]（kPa）的换算系数（1 mmHg = 0.133 kPa）。

本刊编辑部