论著

文章编号:1000-5404(2011)03-0286-04

沉默 Ku70 后 PARP1 参与 DNA 双链断裂修复

程 巧[1,2],厉红元[1],刘胜春[1],李 凡[1],任国胜[1,2] (400016 重庆,重庆医科大学 附属第一医院内分泌乳腺外科[1],肿瘤分子生物及表观遗传学实验室[2])

【摘要】 **目的** 研究碱基切除修复途径(base excision repair,BER)关键因子 PARP1 在 Ku70 缺失的条件下是否参加 DNA 双链断裂(double-strand break, DSB)的修复。**方法** 针对人类 Ku70 构建编码 shRNA 序列的重组表达载体并转染细胞,建立 Ku70 蛋白表达沉默的细胞株。以高效的 DNA 双链断裂诱导剂刺孢霉素 calicheamycin 诱导 DSB 形成,在 Ku70 沉默或联合 PARP1 抑制剂条件下,通过结晶紫染色法检测 DSB 对细胞存活率的影响,以及 Western blot 检测 H_2AX 的磷酸化状态。根据与染色质相互作用的差别,分段提取细胞蛋白组分,Western blot 检测 PARP1 在各组分的分布变化。**结果** 细胞 Ku70 蛋白水平在 Ku70 shRNA 干扰后显著下调。Ku70 沉默和 PARP1 抑制剂明显降低细胞在 calicheamycin 处理后的存活率($P<0.01$),两者有明显协同效应。在 Ku70 沉默的细胞诱导 DSB 后,PARP1 主要分布在与染色质紧密结合的组分。**结论** 在 Ku70 缺陷时,PARP1 可与染色质结合,且抑制其功能影响细胞生存,说明 PARP1 可能参与了不依赖于 Ku 的 DNA 双链断裂修复的替代途径。

【关键词】 DNA 双链断裂;Ku70;PARP1

【中图法分类号】 R394.3;R730.2 【文献标志码】 A

Involvement of PARP1 in repair of DNA double strand breaks when Ku70 is silenced

Cheng Qiao[1,2], Li Hongyuan[1], Liu Shengchun[1], Li fan[1], Ren Guosheng[1,2] ([1]Department of Endocrinology and Breast Surgery, [2]Laboratory of Molecular Oncology and Epigenetics, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study if the key factor PARP1 for base excision repair (BER) is involved in repair of DNA double strand breaks (DSB) when Ku70 is silenced. **Methods** A shRNA expression vector against human Ku70 was constructed and then were transfected to produce silent Ku70 cell line. DSB were induced with calicheamycin, a high efficient inductor of DNA DSB. Effect of DSB on cell survival rate was detected when Ku70 was silent or PARP1 was inhibited with crystal violate staining. Phosphorylation of H2AX was detected by Western blotting. Cell fractions were extracted according to the difference in interactions of chromatin. Distribution of PARP1 in cell fractions was assayed by Western blotting. **Results** The protein level in Ku70 was significantly down-regulated by Ku70 shRNA. Silent Ku70 and PARP inhibitor significantly decreased the survival rate of cells ($P<0.01$). PARP1 was mainly distributed in fractions of cells closely bound to chromatin. **Conclusion** PARP1 can bind to chromatin in the absence of Ku70 and decrease the survival time of cells, indicating that PARP1 may participate in repair of DNA DSB independent of Ku70.

【**Key words**】 DNA double strand break; Ku70; PARP1

Corresponding author: Ren Guosheng, Tel: 86-23-89012511, E-mail: rgs726@163.com

双链断裂(double-strand break,DSB)及 DNA 单链断裂(single-strand break,SSB)是 DNA 骨架损伤最常见的形式,严重威胁着基因组的完整、稳定性。对于 DSB,真核细胞主要依赖于非同源末端连接(nonhomologous end joining,NHEJ)修复途径[1]进行修复,该途径以 Ku70/Ku80 二聚体首先结合于 DSB,继而募集下游修复蛋白 DNA-PKcs、XRCC4、ligase4 等,对断端进行处理,连接。对于 SSB,则主要通过 PARP1 依赖的碱基切除修复途径(base excision repair,BER)来修复。近来,有研究认为 PARP1 也参与了不依赖于 Ku 蛋白的 DSB 修复途径—替代性末端连接(alternative-NHEJ,Alt-NHEJ),其作用机制不同于 NHEJ,也不同于同源重组(homologous recombination,HR),往往伴随着碱基对的丢失,染色体的易位、倒位[2],与癌症的发生

【通信作者】 任国胜,电话:(023)89012511,E-mail:rgs726@163.com

密切相关[3]。本研究以人宫颈癌细胞为研究模型，通过分段提取蛋白，Western blot 检测的手段了解 Ku70 沉默前后 PARP1 在受损染色质聚集情况的改变，并检测在 DNA 双链断裂之后 PARP1 抑制剂对细胞存活率的影响，进而为 PARP1 参与不依赖于 Ku 的 Alt-NHEJ 修复途径提供新的证据。

1 材料与方法

1.1 材料

人宫颈腺癌 Hela 细胞株由重庆医科大学附属第一医院肿瘤分子生物及表观遗传学实验室提供 anti-PARP1、anti-γ-H_2AX、anti-Ku70 兔抗人多克隆抗体（R and D system），anti-γ-H_2AX 小鼠抗人单克隆抗体（Upstate Biotechnology），anti-β-actin 小鼠抗人单克隆抗体（Santa Cruz 公司），山羊抗小鼠和抗兔辣根过氧化物酶标记二抗（北京中杉金桥公司），ECL 曝光试剂盒（碧云天），Lipofectamine™ 2000（Invitrogen 公司），双链断裂诱导剂刺孢霉素 calicheamycin 来源于法国 CRNS IPBS 研究所，PARP1 抑制剂（1,5-Dihydroxyisoquinolin，DIQ）（Sigma 公司），以二甲基亚砜溶解，分装后保存于 -20℃。其他常用试剂由本实验室提供。shRNA 载体为 pGPU6/GFP/Neo（GenePharma 公司，上海），针对人类 Ku70 基因合成 3 对能形成发夹结构的转录模板，其特异性靶序列分别为：shKu70-1，GTCAGGGTGGGAGTCATATTA；shKu70-2，GGTTGAAGCAATGAATAAAAG；shKu70-3，CCGGACCTTTAATACAAGTAC。

1.2 方法

1.2.1 质粒转染细胞 6 孔板中 Hela 细胞常规种板培养，待 90% 融合后，将 pGPU6/GFP/Neo-Ku70shRNA 质粒经 Lipofectamine™2000 介导转染 Hela 细胞，Lipofectamine™2000 与质粒用量比为 8 μl∶4 μg。转染 6 h 后换液，24 h 后加入 0.6 mg/ml G418 进行筛选。8 d 后提取总蛋白行 Western blot 检测 Ku 蛋白表达抑制情况。实验分 6 组：空白细胞组、空质粒组（shNC）、不相干对照组（shGAPDH）、Ku70 shRNA-1、Ku70 shRNA-2、Ku70 shRNA-3。取 Ku 蛋白表达抑制效果最佳的细胞进行以下实验。

1.2.2 结晶紫染色法检测细胞存活率 种 Ku70 沉默细胞或 Ku70 正常细胞于 6 孔板中，每孔 2 000 个，贴壁后，预先以 PARP1 抑制剂 DIQ（40 μmol/L）处理 2 h 或不处理，得到 Ku70 shRNA（Ku70 下调）、空白（Ku70 正常）、空白 + DIQ 及 Ku70 shRNA + DIQ 4 组，随后各组分别以不同浓度 calicheamycin（0、2、4、8、16 pmol/L）进行双链断裂诱导 24 h，换液后在普通条件下继续培养 7 d 使存活细胞继续生长。加入结晶紫染液室温下染色 20 min，洗净烘干后 33% 醋酸脱色，充分振荡后在 570 nm 处测定光密度值[*D*(570)]，根据光密度值得出细胞相对存活率。测定前根据需要将样品进行稀释。实验重复 3 次。设未经 calicheamycin 处理的细胞存活率为 100%，各处理组分光光度值与未处理组相比即为各组细胞存活率。

1.2.3 γ-H_2AX 的去磷酸化测试 取相同数目转染及未转染 Ku70shRNA 的细胞种于直径 5 cm 培养皿中，贴壁后，预先以 PARP1 抑制剂 DIQ（40 μmol/L）处理 2 h 或不处理，随后以 calicheamycin 8 pmol/L 处理 1 h，立即更换新鲜培养液，继续培养 0、0.5、1 h；收集细胞，提取总蛋白，得到 Ku70 正常情况下的 6 组蛋白：①不加 DIQ，培养 0 min，②不加 DIQ，培养 30 min，③不加 DIQ，培养 60 min，④加 DIQ，培养 0 min，⑤加 DIQ，培养 30 min，⑥加 DIQ，培养 60 min 以及 Ku70 下调情况下的 6 组（处理因素同前）。另取转染 Ku70shRNA 的细胞同前培养，并预处理以 PARP1 抑制剂 DIQ 或不处理，calicheamycin 处理同前，更换新鲜培养液后仍添加等浓度 DIQ，继续培养 0、4、8 h。收集细胞，提取总蛋白，再得到 Ku70 下调情况下的 6 组蛋白：①不加 DIQ，培养 0 h，②不加 DIQ，培养 4 h，③不加 DIQ，培养 8 h，④加 DIQ，培养 0 h，⑤加 DIQ，培养 4 h，⑥加 DIQ，培养 8 h。Western blot 检测 γ-H2AX 水平。

1.2.4 蛋白 Western blot 检测 用 Bradford 蛋白定量试剂盒（Bio-Rad）测定蛋白浓度，对于总蛋白，调整各样本蛋白量相等，对于分段蛋白，确保蛋白来源于相同数目细胞（取相同体积样本）。10% SDS-PAGE 常规分离蛋白；15% SDS-PAGE 分离 γ-H_2AX。90 V 电压转 PVDF 膜 1.5 h。

1.2.5 诱导细胞 DSB 形成及分段提取蛋白 取相同数目各组细胞种于直径 10 cm 的培养皿中，贴壁后，施加以 calicheamycin 44 nm 1 h 以诱导 DNA DSB 形成，随后立即终止，吸干培养液，置培养皿于冰上，4 ℃ PBS 10 ml 洗 2 次，将细胞刮下，收集于 1.5 ml Eppendorf 管，进行蛋白的分段提取。同时，取未经 calicheamycin 处理的细胞，同样方法收集细胞及提取蛋白。分段提取蛋白参照文献[4]方法并加以改进：用 200 μl 提取液提取约 5×10^6 细胞：（Hepes KOH pH = 7.5，50 mmol/L；NaCl 150 mmol/L；EDTA 1 mmol/L；NP40 0.05%；蛋白酶和磷酸化酶抑制剂）充分混匀后，置于冰上 5 min；离心 3 000 r/min 5 min，收集上清液，标记为 fraction1（F1），提取液中添 RNAse A 0.1 mg/ml；NP40 0.1%。取 200 μl，加入上述沉淀物中，25 ℃ 下孵育 10 min，离心同上，收集上清，标记为 fraction2（F2）。最后，在离心沉淀物上加入 200 μl 提取液（添加 1% Triton X-100 和 450 mmol/L NaCl），充分混匀，超声处理直至溶液澄清，标记为 fraction3（F3），分别得到无 DNA 损伤前后并 Ku70 下调前后的 F1、F2、F3。

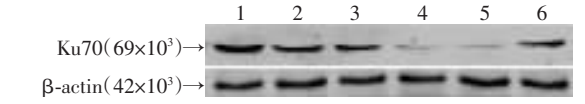
1.3 统计学方法

每组资料均用 SPSS 11.5 统计软件计算均数及标准差，进行完全随机方差分析及两两比较。

2 结果

2.1 Western blot 测定 Ku70 蛋白水平

shKu70-1 和 shKu70-2 组细胞的 Ku70 蛋白的表达较空白质粒组，shNC 组及 shGAPDH 组明显下调，内参照 β-actin 蛋白的表达没有改变（图 1）。

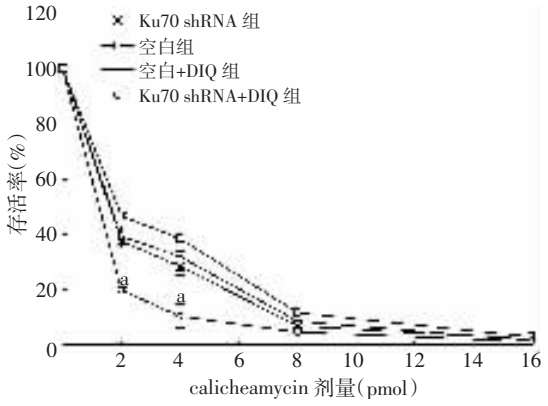


1：空白细胞组；2：shNC 组；3：shGAPDH 组；4：Ku70shRNA-1 组；5：Ku70shRNA-2 组；6：Ku70shRNA-3 组

图 1 RNA 干扰后细胞 Ku70 蛋白的表达

2.2 抑制 PARP1 对细胞耐受 DSB 诱导剂 calicheamycin 的影响

在 Ku70 正常细胞 DIQ 作用后细胞存活率有所下降，但无统计学差异（$P>0.05$）；同时，在没有施加 DIQ 的情况下，Ku70 沉默前后，细胞对 calicheamycin 的耐受有所下降，但也没有统计学差异（$P>0.05$）；然而，在沉默 Ku70 后，同样施加 PARP1 抑制剂，发现细胞对 calicheamycin（2、4 pmol/L）的耐受显著降低（$P<0.01$）；当剂量大于 8 pmol/L 后，存活率低且不能表现出显著性差异（$P>0.05$，图 2）。

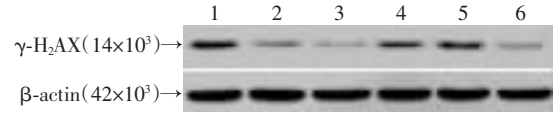


a：$P<0.01$，与 Ku70 shRNA 组比较

图 2 不同条件下细胞的存活率分析

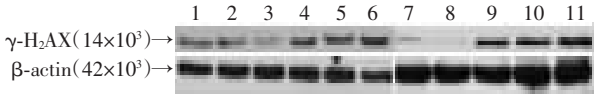
2.3 PARP1 抑制剂 DIQ 对 γ-H_2AX 去磷酸化的影响

在 Ku70 正常的细胞，无论 PARP1 抑制剂 DIQ 作用与否，γ-H_2AX 水平均在 60 min 内明显下降，即明显去磷酸化（图 3）。对于 Ku70 下调的细胞，诱导 DSB 后再培养 60 min，γ-H_2AX 稍有下降。再培养 4 h 和 8 h 后下降明显；然而在 DIQ 作用后，损伤后再培养 4 h 和 8 h，γ-H_2AX 亦没有下降，即不能去磷酸化（图 4）。



1：未加 DIQ，再培养 0 min；2：未加 DIQ，再培养 30 min；3：未加 DIQ，再培养 60 min；4：加 DIQ，再培养 0 min；5：加 DIQ，再培养 30 min；6：加 DIQ，再培养 60 min

图 3 Wester blot 检测 Ku 正常细胞 γ-H2AX 的表达

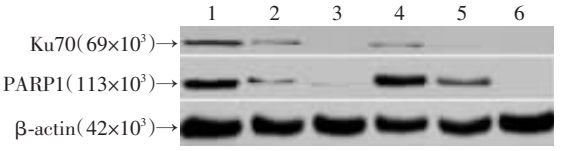


1：未加 DIQ，再培养 0 min；2：未加 DIQ，再培养 30 min；3：未加 DIQ，再培养 60 min；4：加 DIQ，再培养 0 min；5：加 DIQ，再培养 30 min；6：加 DIQ，再培养 60 min；7：未加 DIQ，再培养 4 h；8：未加 DIQ，再培养 8 h；9：加 DIQ，再培养 0 h；10：加 DIQ，再培养 4 h；11：加 DIQ，再培养 8 h

图 4 Wester blot 检测 Ku 下调细胞 γ-H2AX 的表达

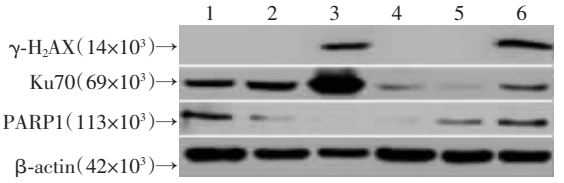
2.4 DSB 发生后 Ku70 与受损染色质的结合

在无 DNA 损伤的情况下，绝大多数的 Ku70 分布在 Ku70 正常组 F1、F2 或 Ku70 下调组 F1（图 5）。而在诱导 DSB 后，在两组细胞，γ-H_2AX 形成，且均分布于 F3（图 6），同时，绝大多数 Ku70 也聚集在 F3（图 6）。



1：Ku70 正常组 F1；2：Ku70 正常组 F2；3：Ku70 正常组 F3；4：Ku70 下调组 F1；5：Ku70 下调组 F2；6：Ku70 下调组 F3

图 5 Ku 下调前后修复蛋白在无 DNA 损伤染色质的聚集



1：Ku70 正常组 F1；2：Ku70 正常组 F2；3：Ku70 正常组 F3；4：Ku70 下调组 F1；5：Ku70 下调组 F2；6：Ku70 下调组 F3

图 6 Ku 下调前后修复蛋白在 DNA 双链断裂染色质的聚集

2.5 DSB 发生后 PARP1 与受损染色质的结合

当 Ku70 正常或 Ku70 下调但无 DNA 损伤发生时，PARP1 主要聚集在 F1、F2（图 5、6）；当 Ku70 下调且合并 DSB 时，PARP1 在 F3 中的聚集明显增多（图 6）。

3 讨论

DNA 双链断裂（DSB）是对基因组完整性影响最大的一种 DNA 损伤形式，众多内源性及外源性因素如活性氧自由基、V(D)J 重组、离子射线及某些 DNA 损伤试剂均能导致其产生，若不迅速修复，则会引起细胞死亡，若没有正确修复，则导致基因变异，癌症发生。

对于 DSB，真核细胞主要通过两条途径对其进行修复，其一是 HR，以同源序列为模板合成新 DNA 从而修复损伤，只发生在 DNA 复制的 S 后期和 G_2 期。另一是 NHEJ，贯穿整个细胞周期，是细胞修复 DSB 的主要途径，该途径首先由 Ku70、Ku80 二聚体结合于 DNA 断端，然后募集下游修复蛋白 DNA-PKcs、XRCC4、ligaseⅣ在断端聚集，对断端进行处理，连接。因此 Ku 蛋白被视为 NHEJ 的基石。

近来，人们发现真核细胞中还存在着不依赖于 Ku 的 DSB 修复机制，亦不同于 HR，无需 RAD52 家族成员参与，被称为替代性末端连接 Alternative-NHEJ（Alt-NHEJ），该修复机制往往伴随着碱基对的丢失，染色体的易位，倒位，与癌症的发生密切相关。正常情况下，Ku 蛋白对该途径起着抑制作用[5-6]。因此本课题以沉默 Ku70 来解除对 Alt-NHEJ 的抑制。

本课题采用高效的 DSB 诱导剂 calicheamycin[7] 处理细胞，比离子射线和其他诱导剂更有效，更特异的诱导 DSB 的形成，在细胞内产生 DSB：SSB 的比例

可达到1:3;而离子射线产生DSB:SSB的比例约为1:20。在细胞存活实验中,我们发现单纯沉默Ku70并没有显著降低细胞的耐受,这可能是因为其他修复方式的参与:当NHEJ被阻断后,处于S后期及G_2期的细胞可以通过HR修复DSB,另外,不依赖于Ku的Alt-NHEJ被激活。尽管Alt-NHEJ修复效率远远低于NHEJ,为其1/20~30[8],但在损伤没有超过其承受极限的情况下,始终能够连接断裂的DNA,所以在本实验低浓度DSB诱导剂作用条件下,细胞获得修复损伤DNA的机会。单纯施加PARP1抑制剂也不能显著增加细胞对calicheamycin的敏感性,因为抑制PARP1的功能不能影响NHEJ发挥作用。然而当Ku70沉默后再施加PARP1抑制剂便使得细胞对calicheamycin的耐受显著下降,我们认为其原因在于同时阻断了NHEJ和Alt-NHEJ,即使HR功能正常,大多数细胞也不能及时修复DSB而进入DNA复制,大量遗传信息丢失,以致其存活率下降。为了证明PARP1抑制剂影响了DSB的修复,我们进行了γ-H_2AX去磷酸化实验,γ-H_2AX是DSB敏感而特异的指示蛋白,并且其磷酸化程度随着DSB的增加而增加,反之,随着DSB的修复,也逐渐去磷酸化[9],实验中我们发现,在Ku70正常的情况下,无论抑制PARP1与否,γ-H_2AX在60 min内明显去磷酸化,而在Ku70下调的情况下,DSB发生后的60 min内γ-H_2AX去磷酸化程度较低,可能是由于Alt-NHEJ效率低于NHEJ所造成的;于是我们延长损伤后修复时间到4 h和8 h,发现在4 h后,γ-H_2AX明显去磷酸化;但是,对于施加DIQ的细胞,即使是修复时间达8 h,γ-H_2AX也没能明显去磷酸化,说明细胞内双链断裂损伤灶未能修复,再继续培养后,我们观察到细胞形态进一步变化,死亡细胞增加。然而,当DNA受损过于严重,超过修复阈值,细胞便不可逆的凋亡,因此在细胞存活实验中,当calicheamicin 24 h作用浓度超过8 pmol/L后,细胞存活率降低并且不能表现出统计学差异。

虽然长期以来,人们不认为PARP1参与了DSB的修复,但近年来,有人在体外实验中发现PARP1能够与Ku70竞争结合DSB[10],更有报道发现Alt-NHEJ需要PARP1的参与[11]。但是迄今并没有实验结果展示在细胞内,PARP1在Ku缺陷情况下与DSB亲和力的变化情况。本实验采用分段提取蛋白的方法,旨在按照蛋白质与染色质亲和力从小到大的顺序将其逐步提取出来:F1,F2为易溶解的组分,包含与染色质结合松散的核蛋白及游离于细胞质核浆的蛋白,另外,由于RNA的降解而释放出的蛋白(核中RNA被RNAse降解)存在于F2中。F3为难溶解的组分,包括与染色质紧密结合的蛋白及一些骨架蛋白。Western blot结果发现在正常情况下,Ku70在受损染色质大量聚集;然而在Ku70沉默后,PARP1在受损染色质大量聚集。与损伤DNA的紧密结合是修复因子参与DNA修复的前提条件,我们可以推测,类似于NHEJ修复过程,Alt-NHEJ的作用过程也可能包括启动因子的DSB末端结合,断端处理以及最后的连接。首先PARP1识别并结合损伤DNA,经过一系列的信号转导,募集下游修复蛋白对断端进行处理,最后募集连接酶到断裂灶对其进行连接。进一步探讨PARP1在Alt-NHEJ中所起的作用以及鉴定其上下游因子,可促进人们对癌症发生机制的认识。

参考文献:

[1] Lieber M R. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining[J]. J Biol Chem, 2008, 283(1):1-5.

[2] Weinstock D M, Brunet E, Jasin M. Formation of NHEJ-derived reciprocal chromosomal translocations does not require Ku70[J]. Nat Cell Biol, 2007, 9(8):978-981.

[3] Zhu C, Mills K D, Ferguson D O, *et al*. Unrepaired DNA breaks in p53-deficient cells lead to oncogenic gene amplification subsequent to translocations[J]. Cell, 2002, 109(7):811-821.

[4] Drouet J, Delteil C, Lefrancois J, *et al*. DNA-dependent protein kinase and XRCC4-DNA ligase IV mobilization in the cell in response to DNA double strand breaks[J]. J Biol Chem, 2005, 280(8):7060-7069.

[5] Decottignies A. Microhomology-mediated end joining in fission yeast is repressed by pku70 and relies on genes involved in homologous recombination[J]. Genetics, 2007, 176(3):1403-1415.

[6] Perrault R, Wang H, Wang M, *et al*. Backup pathways of NHEJ are suppressed by DNA-PK[J]. J Cell Biochem, 2004, 92(4):781-794.

[7] Elmroth K, Nygren J, Martensson S, *et al*. Cleavage of cellular DNA by calicheamicin gamma1[J]. DNA Repair (Amst), 2003, 2(4)363-374.

[8] Wang H, Perrault A R, Takeda Y, *et al*. Biochemical evidence for Ku-independent backup pathways of NHEJ[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(18):5377-5388.

[9] Fanny Bouquet, Catherine Muller and Bernard Salles. The loss of gammaH2AX signal is a marker of DNA double strand breaks repair only at low levels of DNA damage[J]. Cell Cycle, 2006, 5(10):1116-1122.

[10] Wang M, Wu W, Wu W, *et al*. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(21):6170-1682.

[11] Mansour W Y, Rhein T, Dahm-Daphi J. The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(18):6065-6077.

(收稿:2010-09-13 修回:2010-11-10)
(编辑 王小宴)