文章编号:1000-5404(2011)14-1497-05

论著

沉默 Ku70 促进 PARP1、ligase3 和 XRCC1 在 DNA 双链断裂染色质聚集

程 巧[1,2], 厉红元[1], 王小毅[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、ligase3 和 XRCC1 在 Ku70 缺失的条件下与 DNA 双链断裂(double-strand break,DSB)所在染色质的结合及抑制 PARP1 所产生的影响。**方法** 采用可经药物诱导 Ku70 shRNA 的细胞株,以高效的 DNA 双链断裂诱导剂刺孢霉素 calicheamicin 诱导 DSB。分离不同组分蛋白联合稳定同位素标记定量差异蛋白组分析法鉴定 Ku70 下调后在损伤染色质聚集增多的蛋白,Western blot 进行验证并检测 PARP1 抑制剂 DIQ 对其染色质聚集的影响。**结果** 在药物 Doxy 作用下,Ku70 明显下调,其余蛋白的表达不受影响。稳定同位素标记定量蛋白组学方法鉴定出 PARP1、ligase3 和 XRCC1 在 Ku70 下调后在损伤染色质聚集增多。Western blot 进行了验证并显示 PARP1、ligase3 和 XRCC1 在损伤染色质的聚集随 DSB 程度增加而增加。施加 PARP1 抑制剂 DIQ,随着 DIQ 浓度的上升,ligase3 在损伤染色质的聚集逐渐减少。**结论** 沉默 Ku70 后,PARP1、ligase3 和 XRCC1 在 DSB 染色质聚集增加,这种聚集与 DSB 程度变化一致,并且 ligase3 的染色质聚集具有一定程度的 PARP1 依赖性。

[关键词] DNA 双链断裂;Ku70;PARP1;ligase3;XRCC1
[中图法分类号] R394-33;R394.3 [文献标志码] A

Silencing Ku70 promotes recruitment of PARP1, ligase 3 and XRCC1 at chromatin with DNA double-strand break

Cheng Qiao[1,2], Li Hongyuan[1], Wang Xiaoyi[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 investigate the recruitment of base excision repair (BER) key factors, poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1), ligase 3 and X-ray repair cross-complementing protein 1 (XRCC1) at chromatin with DNA double-strand break (DSB) after silencing Ku70, and the effect of PARP1 inhibition on the protein recruitment. **Methods** A cell line capable of inductively expressing Ku70 shRNA was treated with calicheamicin to induce DSB. Proteins recruited at the damaged chromatin after down-regulation of Ku70 expression were identified through stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) and Western blotting, and the influence of PARP1 inhibitor, 1,5-dihydroxyisoquinolin (DIQ), on the protein recruitment was analyzed. **Results** Ku70 was down-regulated significantly by virtue of doxycycline, while the expression of other proteins was not influenced. The SILAC and Western blotting results showed that the recruitment of PARP1, ligase 3 and XRCC1 at the damaged chromatin increased after Ku70 down-regulation, and the recruitment of PARP1, ligase 3 and XRCC1 at the damaged chromatin increased with the increase of DSB degree. The recruitment of ligase 3 at the damaged chromatin decreased when the DIQ concentration increased. **Conclusion** Silencing Ku70 promotes the recruitment of PARP1, ligase 3 and XRCC1 at chromatin with DSB, and the protein recruitment is correlated positively to DSB degree. The recruitment of ligase 3 depends on PARP1 to some extent.

[**Key words**] DNA double-strand break;Ku70;PARP1;ligase3;XRCC1

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

DNA 双链断裂(double-strand break, DSB)是诸多 DNA 损伤类型中对基因组的完整、稳定性影响最大的一种损伤形式。真核细胞主要依赖于非同源末端连接(nonhomologous end joining, NHEJ)[1]修复途径进行修复,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

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

等,对断端进行处理,连接,Ku蛋白被视为NHEJ的基石。多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶1[poly(ADP-ribose)polymerase1,PARP1]、ligase3和XRCC1是碱基切除修复途径(base excision repair,BER)的关键因子,在修复DNA单链断裂(SSB)中发挥着重要作用。近年来的研究大多认为PARP1参与了不依赖于Ku蛋白的DSB修复途径——替代性末端连接(alternative-NHEJ,Alt-NHEJ)[2]。其作用机制不同于NHEJ,也不同于修复DSB的另一条途径——同源重组(homologous recombination,HR)[3]。本研究通过沉默Ku70而解除Alt-NHEJ的抑制状态,分离不同组分蛋白,结合细胞培养氨基酸稳定同位素标记(SILAC)差异蛋白组鉴定的方法寻找Alt-NHEJ候选因子,Western blot验证候选因子以及检测PARP1的催化活性对其染色质聚集的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

稳定转染tet-on/off-Ku70 shRNA系统的人类纤维肉瘤细胞株HT1080kk(KRAB-Ku70 shRNA)由法国国家科学研究中心CNRS IPBS构建,是将靶向人类Ku70的双链DNA片段(shKu70-1:5′-CGCGTCCCCGAGTGAAGATGAGTTGACATTCAAGAGATGTCAACTCATCTTCACTCTTTTTGGAAAT-3′;shKu70-2:5′-CGATTTCCAAAAAGAGTGAAGATGAGTTGACATCTCTTGAATGTCAACTCATCTTCACTCGGGGA-3′)插入到慢病毒pLVTHM载体,并与慢病毒pLV-tTR-KRAB-Red载体(Tronolab,瑞士)共转染HT1080细胞所得,可在doxycyclin(doxy)作用下诱导Ku70 shRNA表达。双链断裂诱导剂刺孢霉素(calicheamycin,cali)来源于法国CRNS IPBS;其余抗体和主要试剂:小鼠抗人单克隆抗体anti-XRCC1(LabVision&Neomarkers),anti-ligase3(BD transduction laboratories),磷酸化组蛋白(anti-γ-H_2AX,Upstate Biotechnology),anti-PAR(Trevigen),兔抗人多克隆抗体anti-PARP1和anti-Ku70(R and D system),辣根过氧化物酶偶联羊抗鼠和羊抗兔二抗(Jackson ImmunoResearch laboratories),doxy(Sigma),PARP1抑制剂(1,5-Dihydroxyisoquinolin,DIQ,Sigma,以二甲基亚砜溶解,分装后保存于-20 ℃),SILAC试剂盒(Pierce)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 培养细胞于DMEM培养液,添加10%胎牛血清及125 U青霉素和125 μg/ml链霉素,37 ℃,5% CO_2条件下培养。为诱导Ku70 shRNA,加入5 μmol/L doxy于培养液中继续培养细胞0、3、5、7、9 d。在进行DSB诱导前,调整Ku70正常及Ku70下调组细胞数相同,然后施加以cali 44 nm,孵育1 h,立即吸干培养液,置培养皿于冰上,4 ℃ PBS 10 ml洗2次,将细胞刮下,悬液收集于1.5 ml Eppendorf管,4 ℃下离心1 000 r/min,5 min,去上清,分段提取蛋白。若为提取总蛋白,则不作诱导DSB处理。

1.2.2 稳定同位素标记细胞 C^{12}-Lys-DMEM及C^{13}-Lys-DMEM培养液配置严格按照Pierce SILAC试剂盒说明书进行。将细胞分别在同位素标记培养液中预先培养2 d后,在C^{13}培养液中加入doxy 5 μmol/L以诱导Ku70 shRNA,继续培养9 d,以保证细胞进行同位素标记达5个倍增周期以上。调整2组细胞数相同,cali 44 nm处理细胞1 h,立即收集细胞,进行不同组份蛋白的提取。

1.2.3 细胞不同组份蛋白的提取及总蛋白的提取 细胞不同组份蛋白的提取方法同文献[4],用200 μl提取液提取约5×10^6个细胞(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10 min,离心同fraction1,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)。若为SILAC差异蛋白鉴定,则在fraction2后继续抽提离心沉淀,提取液添加0.5% NP40及300 mmol/L NaCl,充分混匀,置于冰上40 min,间插振荡以保证充分混匀。4 ℃下离心12 000 r/min,15 min,收集上清液,标记为fractionP,弃沉淀。为提取总蛋白,则直接在基础提取液中加入1% Triton X-100和450 mmol/L NaCl,并超声处理直至溶液澄清。

1.2.4 shotgun混合蛋白鉴定 将2组(Ku70下调及Ku70正常组)fractionP蛋白进行等量混合。行12.5% SDS-PAGE电泳后,将整条泳道切成19个条带,每个条带经脱色消化后进入Surveyor HPLC(ThermoQuest)蛋白分离:HPLC系统色谱柱为反相C18毛细管柱(0.15 mm×150 mm);二元梯度洗脱,流动相A为0.1%甲酸水溶液,流动相B为含0.1%甲酸的84%乙腈水溶液,梯度洗脱条件:150 min内使流动相B的比例由4%线性增加到50%,然后在4 min内增加到100%,并保持26 min;流速为150 μl/min。肽段经HPLC分离后,直接导入质谱仪进行鉴定。

质谱分析在复合型线性离子阱静电场轨道阱质谱仪(LTQ-Orbitrap,Thermo Electron, San Jose)上完成,质谱分析模式是在Orbitrap中进行Full MS扫描(一级质谱模式,测量扫描)后,选取5个在Full MS扫描中最高强度的离子导入LTQ进行MS2扫描(二级质谱模式,串联质谱扫描)和1个在Full MS扫描中最高强度的离子在Orbitrap中进行MS2扫描。其中Full MS扫描分辨率设置为60 000(m/z=400),扫描范围m/z 400~2 000;Orbitrap中MS2扫描分辨率设置为7 500(m/z=400)。质谱离子源为动态的在线纳升喷雾离子化器(nano-ESI)。质谱仪在一级质谱模式(测量扫描)与二级质谱模式(串联质谱扫描)的转换运行为数据依赖模式。测量扫描的自动增益控制(AGC)目标值为3e5、串联质谱扫描的AGC为1e5。质谱仪工作条件的设置为:喷雾电压3.2 kV;毛细管温度200 ℃;标准碰撞能量,串联质谱扫描30%;串联质谱扫描离子选择阈值1 000,激活电荷0.25,激活时间30 ms。

原始文件(raw file)用MaxQuant分析定量数据,有两段以上(含两段)唯一肽段得到定量的蛋白质分子被计入蛋白质定量结果,并用MASCOT 2.2鉴定多肽分子。最后,使用Max-

Quant 对全部原始文件进行合并处理,得到定量和鉴定结果。搜索使用的数据库为 IPI. HUMAN. v3. 53. decoy 蛋白库,MASCOT 结果过滤参数为 peptide FDR≤0.01;protein FDR≤0.01。

1.2.5 PARP1 抑制实验 取 doxy 处理 9 d 后的细胞,分别以不同浓度 PARP1 抑制剂 DIQ (0、10、20、40、80 μmol/L)处理细胞 2 h,随后 cali 处理细胞(44 nm)1 h 致 DNA 双链断裂。收集及提取不同组分细胞蛋白同 1.2.3。检测 PARP1、ligase3 和 XRCC1 在 fraction3 中的分布情况。

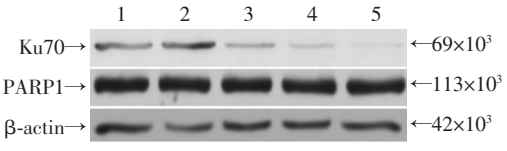
1.2.6 修复蛋白染色质聚集的时间过程 取 doxy 处理 9 d 后的细胞,cali 处理细胞(44 nm)分别作用不同时间(0、5、15、30、60 min),致不同程度 DNA 双链断裂。收集及提取细胞蛋白同 1.2.3。检测 PARP1、ligase3 和 XRCC1 在 fraction3 中的分布情况。

1.2.7 蛋白浓度测定及 Western blot 检测 用 Bradford 蛋白定量试剂盒(Bio-Rad)测定蛋白浓度,调整各样本蛋白量相等,加入 Laemmli 上样缓冲液并变性 100 ℃,5 min。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。5% 脱脂牛奶封闭膜 1 h,一抗常温下孵育印迹后,PBST 洗 3 次,每次 5 min,孵育二抗(1∶1 000)30 min,PBST 仍洗 3 次,ECL 激活,显影。

2 结果

2.1 doxy 诱导 Ku70 下调

doxy 作用稳定转染 tet-on/off-Ku70 shRNA 系统的细胞不同时间,通过对总蛋白的检测发现随着细胞在 doxy 环境中培养时间的延长,Ku70 相应的逐渐下调。而 PARP1 及 β-actin 的表达并未有明显改变(图 1)。



1:doxy 处理 0 d;2:doxy 处理 3 d;3:doxy 处理 5 d;4:doxy 处理 7 d;5:doxy 处理 9 d

图 1 Western blot 检测 doxy 诱导 Ku70 下调

2.2 Alt-NHEJ 候选因子鉴定

在 doxy 处理前后的两组 fractionP 混合物中,质谱分析原始数据采用 MaxQuant 软件进行定量分析,结果有 771 种蛋白获得了定量信息,其 Ratio 值分布见图 2,大部分蛋白质的轻重蛋白比例(H/L)Ratio 值在 1.0 附近,说明两组 fractionP 蛋白为等量混合并且 C^{13}-Lysine 标记充分。根据以往关于 SILAC 的报道和标准样品等量混合时的标准差,选定 1.5 倍以上变化的蛋白质为差异蛋白。在所有差异蛋白中,Ku70 的 H/L 约为 0.1,说明在 doxy 处理细胞 9 d 后,Ku70 表达下调了 90%;PARP1、ligase3 和 XRCC1 在 Ku70 下调的情况下在 fractionP 聚集增加,H/L 值均 >1.5,即 Alt-NHEJ 候选因子。见表 1。

2.3 PARP1、XRCC1、ligase3 的验证

γ-H_2AX 作为 DSB 的特异性指标,在 cali 处理后的细胞提取物中被检测到。在 cali 处理后,Ku70 在 F3 段的分布明显增多,即使在被 doxy 诱导下调后,剩余少量的 Ku70 也仍集中在 F3。PARP1、XRCC1、ligase3 在 F3 段的分布在 doxy 处理前后,即 Ku70 正常和 Ku70 不足的情况下明显不同,Ku70 正常时以及没有 cali 处理时,PARP1、XRCC1 和 ligase3 在 F3 中分布很少。而当 Ku70 不足,并且被 cali 处理后,PARP1、XRCC1 和 ligase3 在 F3 中的分布明显增加(图 3)。

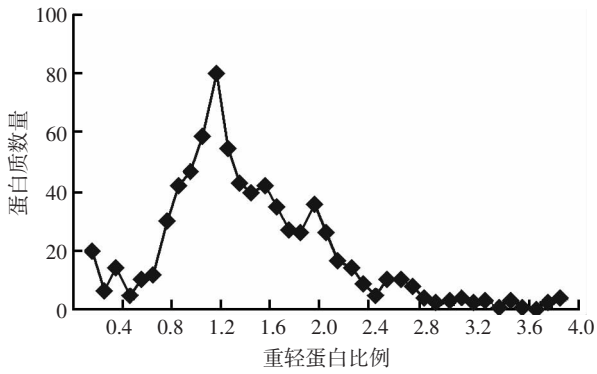
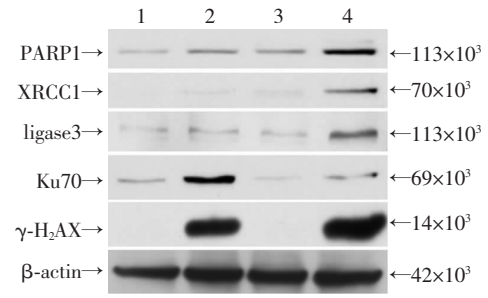


图 2 SILAC 定量差异蛋白分析重轻蛋白比例分布图

表 1 SILAC 定量差异蛋白分析结果

蛋白质 ID	蛋白名称	基因名称	相对分子质量 (×10³)	肽段数(唯一)	H/L
IPI00644712	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1(Ku70)	XRCC6	69.842	33	0.106 0
IPI00029081	DNA ligase 3;DNA ligase Ⅲ	LIG3	112.910	16	1.806 7
IPI00002564	DNA repair protein XRCC1	XRCC1	69.525	6	1.884 2
IPI00449049	Poly (ADP-ribose) polymerase 1	PARP1	113.08	36	3.229 8



1:doxy 未处理,cali 未处理;2:doxy 未处理,cali 处理;3:doxy 处理,cali 未处理;4:doxy 处理,cali 处理

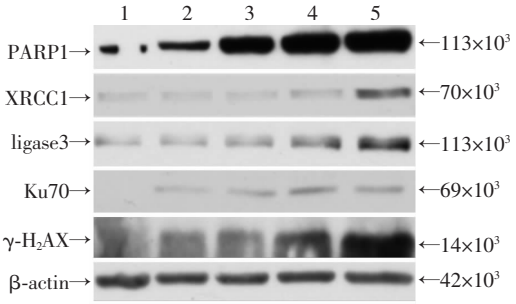
图 3 Western blot 检测不同处理条件下 PARP1、XRCC1、ligase3 在 F3 中的分布

2.4 PARP1、XRCC1、ligase3 染色质聚集的时间过程

对 cali 作用不同时间后的细胞 F3 提取物的检测发现,随着 cali 作用时间的增加(0、5、15、30、60 min),γ-H_2AX 的生成逐渐增多。与 γ-H_2AX 变化趋势一致,PARP1、XRCC1 和 ligase3 在 F3 中的分布也逐渐增加。相反地,细胞内残余的 Ku70 在 F3 的聚集没有明显的增多趋势(图 4)。

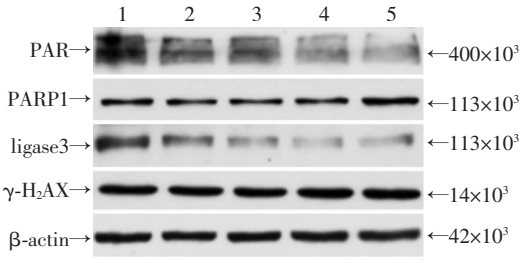
2.5 ligase3 染色质聚集的 PARP1 依赖性

在 Ku70 下调的细胞,经 DIQ 处理后,对细胞 F3 提取物的检测发现,随着 DIQ 浓度的上升(0、10、20、40、80 μmol/L),多聚腺苷二磷酸核糖[Poly(ADP-ribose), PAR]的生成逐渐减少,与之一致,ligase3 在 F3 中的分布也逐渐减少(图 5)。



1：cali 处理0 min；2：cali 处理5 min；3：cali 处理15 min；4：cali 处理30 min；5：cali 处理60 min

图4 Western blot 检测 Ku70 下调后修复蛋白在损伤染色质聚集的时间过程



1：DIQ 0 μmol/L；2：DIQ 10 μmol/L；3：DIQ 20 μmol/L；4：DIQ 40 μmol/L；5：DIQ 80 μmol/L

图5 Western blot 检测 DIQ 对 ligase3 在 F3 中聚集的影响

3 讨论

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 DSB 发生。正常情况下，细胞通过 HR 和 NHEJ 两条途径对其进行修复。近来人们发现真核细胞中存在着不同于 NHEJ，亦不同于 HR 的替代性末端连接 Alt-NHEJ，Ku 蛋白对该途径起着抑制作用[5]。人们在遗传学及生化领域对其进行了大量的研究，包括对细胞外修复效率、连接活性等。研究成果大致可以概括为：①其修复 DSB 的效率远远低于 NHEJ[6]；②Ku 蛋白对抑制 Alt-NHEJ 发挥了关键作用；③在 DNA 末端被切割处理以后，依赖于一种微同源互补的方式进行两断端的连接修复[7]。但是，目前对于其组成因子的了解仍非常有限，揭示 Alt-NHEJ 的组成成员是了解其作用机制乃至癌症发生的重要环节。本课题通过沉默 Ku70 从而解除对 Alt-NHEJ 的抑制，为了得到稳定的下调 Ku70 的人类细胞株，我们采用了稳定转染 tet-on/off-Ku70 shRNA 系统的人类细胞株。该系统包含人类 Kox1 基因上的 KRAB 转录抑制模块，来源于大肠杆菌的 TetR(tetracycline repressor)和 TetO(tetracycline operater)。当 TetR 与 KRAB 融合后的杂化蛋白，特异性的结合 TetO，KRAB 便可抑制邻近 3 kb 范围内的启动子的转录，从而影响 TetO 连接的转录单位 Ku70 shRNA。当 doxycyclin 作用时，TetR-KRAB 不能与 TetO 结合，因此 Ku70 shRNA 被转录出来。由此实现 doxy 控制的 Ku70 的表达[8]。采用细胞不同组分的蛋白提取方法联合质谱鉴定在沉默 Ku70 前后被 DSB 募集的修复蛋白，筛选出差异蛋白，获得 Alt-NHEJ 侯选因子。在结果的差异蛋白中，我们发现了 PARP1、XRCC1 和 ligase3，并且 ratio 值显示出它们在 Ku70 沉默后在 DSB 染色质聚集增多，随后 Western blot 也验证了这一结果。

PARP1 是真核细胞中广泛存在的核酶。PARP1 由 DNA 链断裂激活后，将尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)裂解成尼克酰胺和 ADP-核糖单体，同时又将 ADP-核糖单体共价结合到不同的核蛋白上，形成 PAR，完成 ADP 核糖基化过程。在生理状况下，此过程调节 DNA 修复、转录控制、基因组稳定性等多种细胞进程[9]。在 DNA 修复领域，它是碱基切除修复途径的关键因子，能够迅速地结合于 SSB 断端，在修复 SSB 的模型中，PARP1 主要发挥信号转导的功能。在结合 SSB 后，PARP1 对包括自身在内的靶蛋白进行 ADP 核糖化，募集下游的 XRCC1(X-ray repair cross-complementing protein 1)和 ligase3[10]。在文献[4]的基础上，本研究进一步发现在 Ku70 蛋白沉默且 DNA 双链断裂发生的情况下，ligase3、XRCC1 在受损染色质的聚集较 Ku70 正常情况下也明显增多，说明ligase3、XRCC1 也极有可能参加到 Alt-NHEJ 修复 DSB。

本研究采用高效的 DSB 诱导剂 calicheamicin 诱导 DSB，以及细胞不同组分蛋白提取法，通过不同浓度有机溶剂盐溶液，逐步分离出与 DSB 损伤染色质亲和力不同的蛋白，fraction1、2 为相对易溶的蛋白，包括细胞质核浆蛋白以及与 DNA 亲和力较低的蛋白；fraction3 为难溶蛋白，包括与损伤染色质紧密结合的蛋白。可以看出，与质谱鉴定结果相符，当 DSB 发生后，Ku70 沉默的细胞中，PARP1、ligase3 和 XRCC1 在 fraction3 聚集的量远远多于 Ku70 正常或无 DSB 的情况下，并且，我们进一步进行了这些蛋白染色质聚集的时间过程检测，随着 cali 处理时间的延长，γ-H_2AX 逐渐增多，与之一致，PARP1、ligase3 和 XRCC1 在 fraction3 聚集呈逐渐增多趋势。说明 PARP1、ligase3 和 XRCC1 在损伤染色质的聚集与 DSB 的程度呈正相关。而残余的 Ku70 全部被 DSB 募集到损伤灶，因此不再随着 DSB 程度的增大而增多。

在施加 PARP1 抑制剂 DIQ 后，PAR 的生成减少，说明 DIQ 有效地抑制了 PARP1 的催化活性，同时，我们发现 ligase3 在 fraction3 的聚集随着 DIQ 的浓度增加而逐渐减少。在 SSB 修复过程中，ligase3 与损伤

DNA的结合依赖于PARP1活性[11-12]。与之相似,本研究显示在DSB情况下,ligase3向受损染色质的聚集仍具有一定程度的PARP1依赖性。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,经过一系列的信号传导,募集下游修复蛋白对断端进行处理,最后募集连接酶ligase3到断裂灶对其进行连接。然而要揭开Alt-NHEJ途径的全貌,还需要更加深入研究。

参考文献:

[1] Caldecott K W. XRCC1 and DNA strand break repair[J]. DNA Repair (Amst), 2003, 2(9): 955-969.
[2] 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.
[3] Weinstock D M, Brunet E, Jasin M, *et al*. Formation of NHEJ-derived reciprocal chromosomal translocations does not require Ku70[J]. Nat Cell Biol, 2007, 9(8): 978-981.
[4] 程巧, 厉红元, 刘胜春, 等. 沉默Ku70后PARP1参与DNA双链断裂修复[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(3): 286-289.
[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] Bennardo N, Cheng A, Huang N, *et al*. Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair[J]. PLoS Genet, 2008, 4(6): e1000110.
[7] McVey M, Lee S E. MMEJ repair of double-strand breaks(director's cut): deleted sequences and alternative endings[J]. Trends Genet, 2008, 24(11): 529-538.
[8] Wiznerowicz M, Trono D. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference[J]. J Virol, 2003, 77(16): 8957-8961.
[9] Virag L, Szabo C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors[J]. Pharmacol Rev, 2002, 54(3): 375-429.
[10] Okano S, Lan L, Caldecott K W, *et al*. Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(11): 3974-3981.
[11] Godon C, Cordelieres F P, Biard D, *et al*. PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility[J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(13): 4454-4464.
[12] Mortusewicz O, Ame J C, Schreiber V, *et al*. Feedback-regulated poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(22): 7665-7675.

(**收稿**:2010-12-23;**修回**:2011-01-14)
(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2011)14-1501-01

个案与短篇

单支开放前降支闭塞并休克的介入治疗1例及循证证据

黄 雄,曹雪滨,江明宏,王俊岭,罗 军 (071000 河北 保定,解放军252医院心血管内科,全军老年心血管病中心)

[**关键词**] 冠状动脉疾病;急性心肌梗死;心源性休克;主动脉气囊反搏;介入治疗
[**中图法分类号**] R543.3 [**文献标志码**] B

1 临床资料

患者男性,55岁。糖尿病史6年,持续性胸痛4 h于2009年10月13日入院。血压95/64 mmHg,心肺无阳性体征。心电图示:V1~V3导联ST段抬高呈单相曲线,V4~V6、Ⅱ、Ⅲ、avF ST段水平压低0.1~0.4 mV,aVRST段抬高0.1 mV。入院诊断:冠心病,急性前间壁心肌梗死(考虑前降支近段或左主干病变)。行急诊冠脉造影,有创血压监测为70/40 mmHg。立即予主动脉内气囊反搏(Datascope CS100)支持。造影示:左主干无明显狭窄,前降支中段闭塞,TIMI 0级,回旋支中段闭塞,第一对角支予钝缘支提供3级逆灌注,右冠脉近段闭塞,自身桥侧支形成血流TIMI 2级。以PT GRAPHIX导丝通过前降支闭塞段,MAVERIC 2.0 mm×20 mm球囊扩张后植入3.0 mm×18 mm垠艺紫杉醇支架,支架远段残余狭窄20%,未进行后扩张。术后血压恢复至90/60 mmHg。入院至球囊扩张时间72 min。手术时间2 h。肌酸激酶(CK) 1 435 U/L,肌酸激酶同工酶(CK-MB) 121 U/L。次日心脏彩超示:左室舒张末期前后径54 mm,左室射血分数(EF)58%,前壁及侧壁中段至心尖段运动幅度减低。于术后第4天撤去主动脉气囊反搏。住院14 d出院。于2010年3月5日劳累后出现胸闷、气短再次入院。9日心脏彩超示:左室舒张期前后径59 mm,EF 47%,各壁心尖段运动幅度明显减低,后侧壁中上段心内膜回声增强、运动消失。于入院第11天行右冠脉造影及经皮冠状动脉介入治疗(PCI)。造影示:前降支中段支架远段再狭窄80%,前降支予右冠脉远段提供3级逆灌注。建议患者进行冠脉搭桥术,患者家属不同意。尝试开通右冠脉,BMW、PT GRAPHIX、PILOT 50导丝通过右冠脉闭塞段至远端,以MAVERIC2.0 mm×20 mm球囊扩张后,右冠脉血流恢复,中远段弥漫性狭窄90%,闭塞段夹层形成,导管深置,调整导管时导丝弹出,导丝再次进入时反复进入

(下转1505页)

[**通信作者**] 江明宏,E-mail:jiangmh007@yahoo.com.con