DOI:10.16016/j.1000-5404.201506152

# APE1 乙酰化调节电离辐射诱导的 HeLa 细胞自噬

张志敏,杨镇洲,何 昊,蓝保华,李 钱,吴 艳,王 帅,李 娟 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心)

[**摘要**] **目的** 探讨脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子(apurinic/aprimidinic endonuclease/redox factor-1,APE1/Ref-1)乙酰化对电离辐射诱导 HeLa 细胞自噬的调节作用。**方法** 给予 Elekta precise 直线加速器处理 HeLa 细胞及子系细胞 $APE1^{WT}$ 和 $APE1^{K6R/K7R}$,应用免疫共沉淀(co-immunoprecipitation,Co-IP)的方法检测 APE1 乙酰化修饰及 Beclin1/Bcl2 的结合,流式细胞仪检测细胞自噬的水平,免疫荧光激光共聚焦检测 LC3 的聚集,Western blot 检测 APE1、LC3 和 p62 的表达。**结果** HeLa 细胞 APE1 乙酰化水平随着照射剂量的增加和照射后时间的延长而逐渐升高($P<0.05$)。HeLa 细胞 LC3Ⅱ的表达与照射剂量呈正相关,而与 p62 呈负相关($P<0.05$);电离辐射促进细胞的自噬水平和 LC3 的聚集。电离辐射后,LC3Ⅱ上调;与对照组 $APE1^{WT}$ 相比,$APE1^{K6R/K7R}$ 细胞 Beclin1/Bcl2 结合增强,LC3Ⅱ/LC3Ⅰ比值降低,p62 表达上调($P<0.05$)。**结论** APE1 乙酰化通过 Beclin1/Bcl2 途径调节电离辐射诱导的 HeLa 细胞自噬。

[**关键词**] 电离辐射;APE1 乙酰化;自噬;宫颈癌
[**中图法分类号**] R341;R730.23;R737.33 [**文献标志码**] A

# APE1 acetylation regulates autophagy induced by ionizing radiation in HeLa cells

Zhang Zhimin, Yang Zhenzhou, He Hao, Lan Baohua, Li Qian, Wu Yan, Wang Shuai, Li Juan (Cancer Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the relationship between apurinic/aprimidinic endonuclease/redox factor-1 (APE1) acetylation and autophagy induced by ionizing radiation in HeLa cells. **Methods** HeLa cells, $APE1^{K6R/K7R}$ cells and $APE1^{WT}$ cells underwent radiation treatment with Elekta precise linear accelerator, and APE1 acetylation and interaction of Beclin1 and Bcl2 were detected by co-immunoprecipitation (Co-IP). Flow cytometry was used to analyze HeLa cell autophagy level, LC3 accumulation was observed by immunofluorescence assay, and Western blotting was adopted to measure the expression of APE1, LC3 and p62. **Results** The APE1 acetylation was increased along with the increase of the radiation dose and the time after radiation in HeLa cells, and the increase of APE1 acetylation was in a time- and dose-dependent manner ($P<0.05$). LC3Ⅱ expression was positively correlated with the radiation dose in HeLa cells, while p62 expression was opposite ($P<0.05$). LC3 accumulation and autophagy increased after ionizing radiation, and the LC3Ⅱ expression was up-regulated ($P<0.05$). Compared with $APE1^{WT}$ cells, the interaction of Beclin1 and Bcl2 was enhanced in $APE1^{K6R/K7R}$ cells, LC3Ⅱ/LC3Ⅰ ratio was decreased, and p62 expression was up-regulated after ionizing radiation ($P<0.05$). **Conclusion** APE1 acetylation is increased after ionizing radiation, which can promote radiation-induced autophagy *via* Beclin1/Bcl2 pathway in HeLa cells.

[**Key words**] ionizing radiation; APE1 acetylation; autophagy; cervical cancer

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81272499). Corresponding author: Yang Zhenzhou, E-mail: yangzz1970@163.com

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81272499)
[**通信作者**] 杨镇洲,E-mail:yangzz1970@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151202.1623.010.html(2015-12-02)

放射治疗是晚期肿瘤主要的治疗手段,但放疗抵抗的现象普遍存在。APE1/Ref-1,DNA 损伤修复和氧化还原(redox)双功能基因,作为提高放射治疗敏感性的靶点已经被广泛证实,但具体机制还在探索中[1]。APE1 是一个多功能蛋白,具有氧化还原一些转录因子(如 p53、AP-1、PTEN、NF-κb 等)和 DNA 碱基损伤修复的功能。乙酰化、磷酸化、泛素化都是 APE1 翻译后修饰的方式,但 APE1 乙酰化修饰尤为重要。APE1 的 N 末端有多个位点能被乙酰化转移酶修饰[2],尤其 K6/K7 位点的乙酰化修饰与 APE1 多种活性密切相关,如与 nCaRE 序列、YB-1 介导的 MDR1 基因激活和 BER 功能密切相关[3]。自噬是细胞的一种适应性反应,应激刺激时细胞自我吞噬和降解细胞内的长寿蛋白和细胞器,从而维持细胞存活。细胞自噬与肿瘤的发生、发展、治疗存在密切的关系。为了探索 APE1 乙酰化与电离辐射(ionizing radiation,IR)诱导的细胞自噬之间的关系,本研究采用 IR 处理,观察 HeLa 细胞 APE1 乙酰化水平、细胞自噬水平的变化及可能的机制,为 APE1 作为放射治疗的靶点提供进一步的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

人宫颈癌 HeLa 细胞、$APE1^{WT}$ 和 $APE1^{K6R/K7R}$ 细胞由第三军医大学大坪医院野战外科研究所胸外科实验室惠赠,大坪医院肿瘤中心实验室传代保存。免疫兔血清 IgG、免疫小鼠血清 IgG 购自 Sigma 公司,protein A/G-agaroseresin 购自 Beyotime 公司,自噬检测染色试剂盒购自 ENZO 公司,ECL 检测试剂盒、HRP 标记羊抗小鼠 IgG 抗体、HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体购自 Santa Cruz 公司,兔抗人 LC3、p62 和 AC-APE1(APE1 乙酰化 APE1 acetylation AC-APE1)多克隆抗体,兔抗人 APE1 多克隆抗体、鼠抗人 APE1 单克隆抗体购自 Abcom 公司。

### 1.2 细胞培养和电离辐射

用含 10% 胎牛血清,100 μg/mL 青、链霉素的 DMEM 培养基,37 ℃、5% $CO_2$,常规传代培养 HeLa 细胞、$APE1^{WT}$ 和 $APE1^{K6R/K7R}$ 细胞,用 1 μg/mL doxycycline(DOX)的 α-MEM 培养基诱导 $APE1^{WT}$ 和 $APE1^{K6R/K7R}$ 细胞。培养细胞贴壁密度约 80%,用 Elekta pricise 直线加速器(Elekta,瑞典)照射细胞。

### 1.3 流式细胞术检测细胞周期

接种处于对数生长期 HeLa 细胞,给予 0、2、4 Gy 剂量的 IR,用 ENZO 自噬检测试剂盒染色后流式细胞仪检测。重复实验 3 次。

### 1.4 Western blot 检测蛋白表达

用上样缓冲液稀释蛋白样品,电泳 165 V 在聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白,用 NC 膜湿法 400 mA 转印,分别与单克隆抗体及 HRP 偶联二抗孵育,用 Super Signal West Pico Chem I luminescent Substrate 试剂盒化学发光,胶片显影。重复实验 3 次。

### 1.5 免疫共沉淀(Co-IP)

用 IP 细胞裂解液冰上裂解细胞,测定蛋白浓度。取蛋白样品和种属相同的 IgG 与重悬的 protein A + G agarose,4 ℃摇动 30 min,上清加入一抗,4 ℃过夜,次日吸取 protein A + G agarose 上清。上样缓冲液重悬,100 ℃蛋白变性。重复实验 3 次。

### 1.6 免疫荧光标记结合激光共聚焦显微镜观察

接种 $APE1^{WT}$ 和 $APE1^{K6R/K7R}$ 细胞,固定,打孔,漂洗,封闭;附 LC3 抗体,4 ℃过夜;FITC 绿光标记,37 ℃孵育 1 h,含有 DAPI 的封片剂封片,第三军医大学中心实验室激光共聚焦室照相。重复实验 3 次。

### 1.7 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件,IR 后 A549 细胞内 AC-APE1、LC3、p62 蛋白表达水平以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析比较多组间均数。

## 2 结果

### 2.1 电离辐射促进 HeLa 细胞 APE1 乙酰化修饰

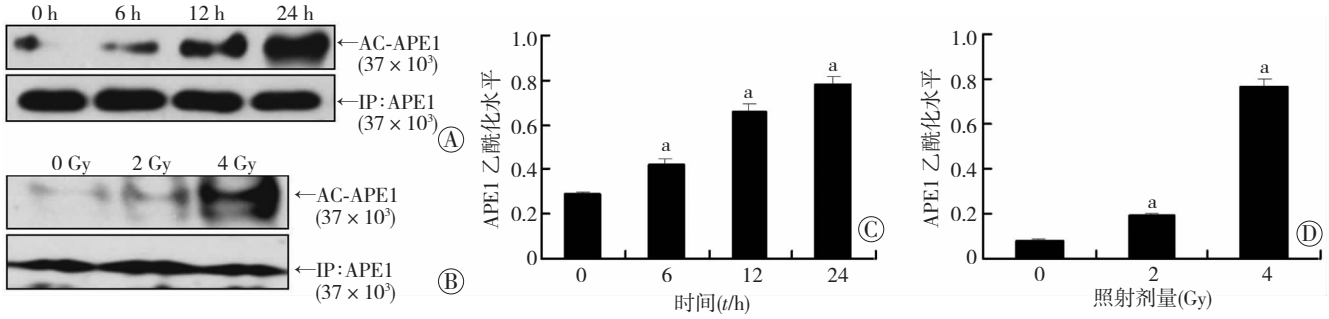
为了探索电离辐射与 APE1 乙酰化修饰之间的关系,以 2 Gy 剂量照射 HeLa 细胞后 0、6、12、24 h 和 0、2、4 Gy 剂量照射 2 h 后,发现 HeLa 细胞 AC-APE1 随着照射后时间的推移和照射剂量的增加而逐渐上调,各时间段与 0 h 比较,各剂量与 0 Gy 剂量比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$),呈现出时间依赖性和剂量依赖性。见图 1。

### 2.2 电离辐射促进 HeLa 细胞自噬

照射 HeLa 细胞 0、2、4 Gy 剂量 2 h 后,LC3Ⅱ的表达与照射剂量呈正相关,而 p62 与 LC3Ⅱ趋势相反,与 0 Gy 剂量比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)(图 2A~D),流式细胞仪检测结果显示,0、2、4 Gy 剂量相应的自噬诱导百分数:1.4%、3.5%、8.4%(图 2E),与 Western blot 的结果相吻合。免疫荧光激光共聚焦证实电离辐射后,LC3 的聚集(绿色)明显增加(图 3)。这些结果显示电离辐射诱导细胞自噬,具有剂量依赖性。

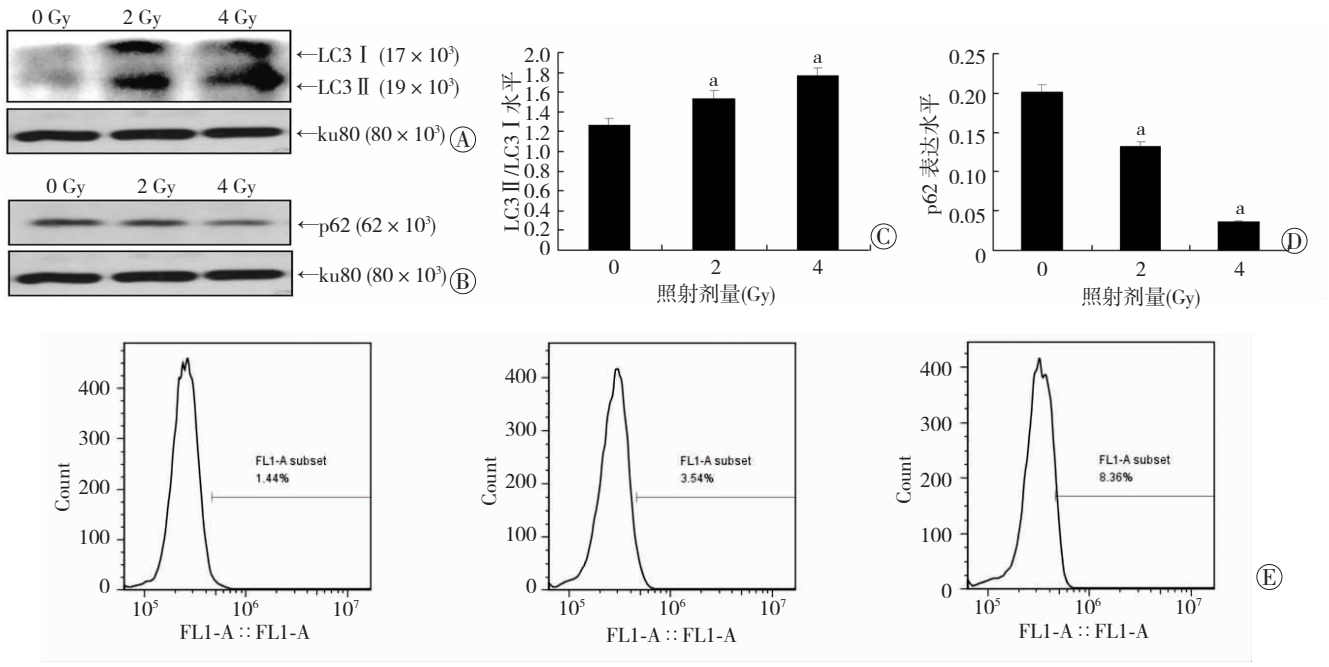
### 2.3 APE1 乙酰化修饰调控 HeLa 细胞自噬水平

为了证明 APE1 乙酰化调节电离辐射诱导的细胞自噬,利用 APE1 内源性敲低组(CL3)和对照组(SCR)的 HeLa 细胞,并在此基础上构建 HeLa 子系细胞,K6/K7 位点突变的 $APE1^{K6R/K7R}$ 和对照组 $APE1^{WT}$,$APE1^{K6R/K7R}$ 乙酰化水平明显低于 $APE1^{WT}$ 组。$APE1^{K6R/K7R}$ 细胞 LC3 Ⅱ 表达水平低于对照组,与 $APE1^{WT}$ 组比较,差异有统计学意义($P<0.01$);电离辐射后,LC3 Ⅱ 表达上调;而 p62 的表达始终与 LC3 Ⅱ 呈负相关,与照射后的 $APE1^{WT}$ 组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。同上述处理,CO-IP 结果显示,$APE1^{K6R/K7R}$ 细胞促进 Beclin1/Bcl2 的相互结合,电离辐射抑制 Beclin1/Bcl2 的结合。见图 4。



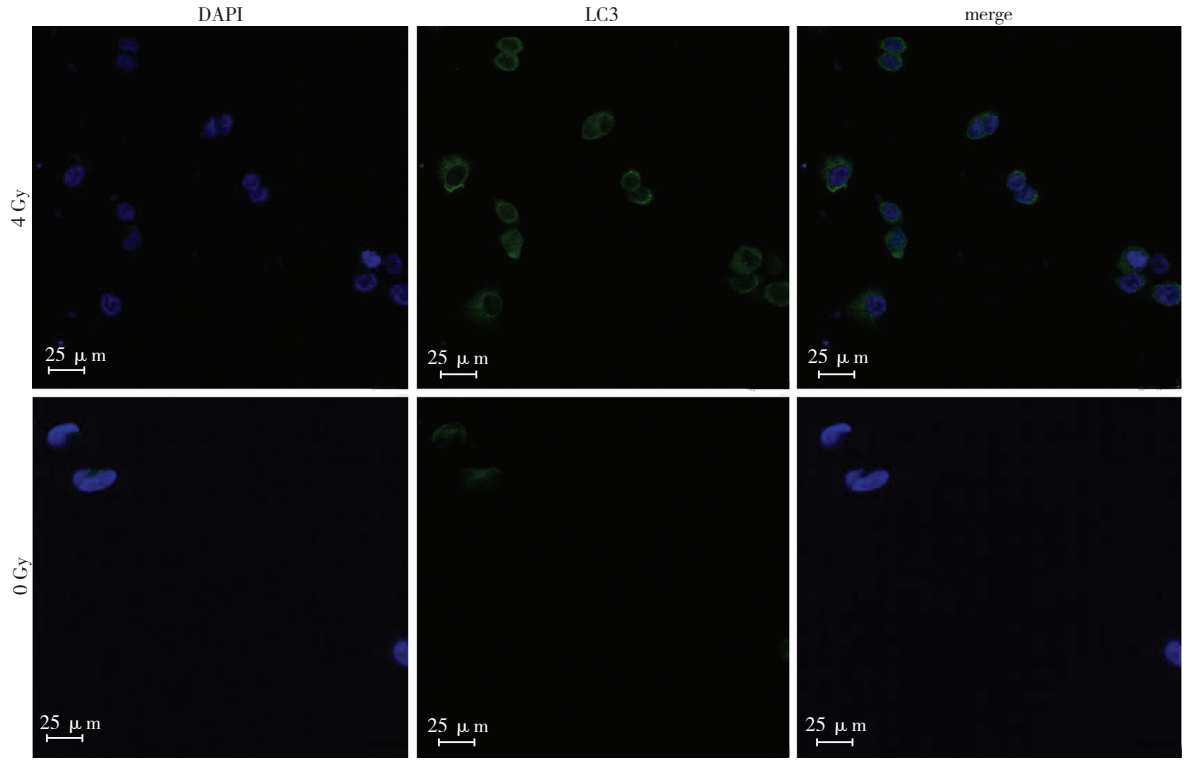

A:2 Gy 剂量照射处理 HeLa 细胞 0、6、12、24 h 后 Co-IP 检测 APE1 乙酰化水平;B:0、2、4 Gy 剂量照射 HeLa 细胞 2 h 后 Co-IP 检测 APE1 乙酰化水平;C:不同时间 APE1 乙酰化水平半定量分析;a:$P<0.01$,与 0 h 比较;D:不同剂量 APE1 乙酰化水平半定量分析;a:$P<0.01$,与 0 Gy 剂量比较

**图 1 电离辐射促进 HeLa 细胞 APE1 乙酰化修饰**



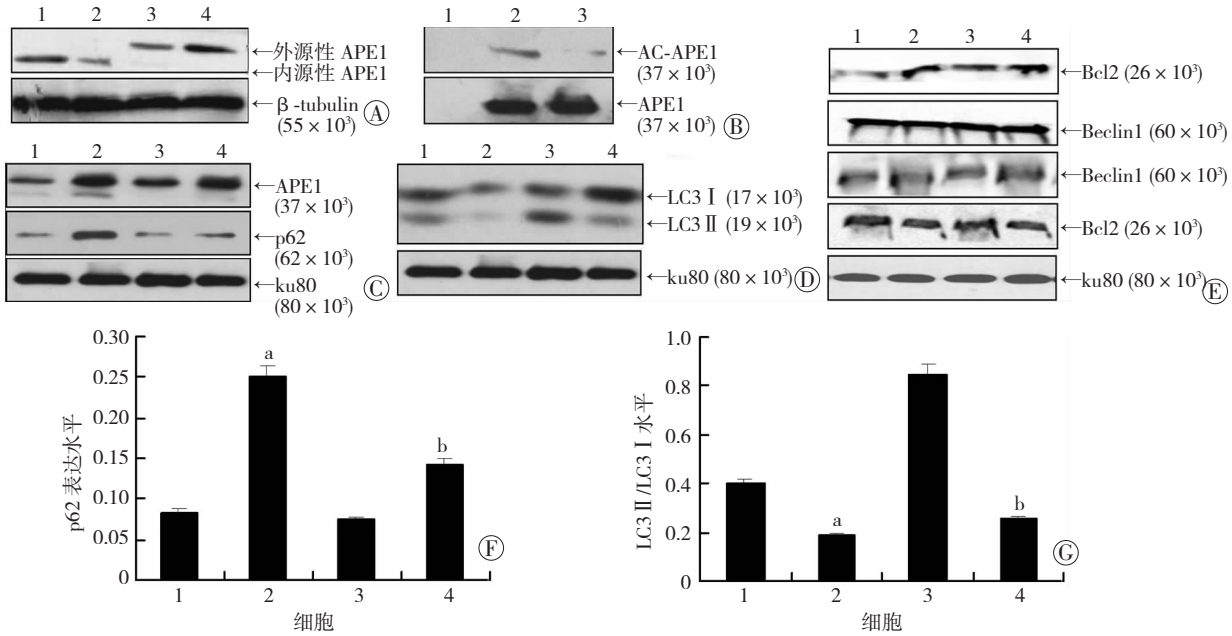

A、B:0、2、4 Gy 剂量照射 HeLa 细胞 2 h 后 Western blot 检测 LC3 和 p62 的表达;C:LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ 半定量分析 a:$P<0.01$,与 0 Gy 剂量比较;D:p62 表达半定量分析 a:$P<0.01$,与 0 Gy 剂量比较;E:0、2、4 Gy 剂量照射 HeLa 细胞 24 h 后流式细胞仪检测细胞自噬水平

**图 2 电离辐射促进 HeLa 细胞自噬**




利用 LC3 抗体和 FITC-Green-标记的二抗检测 LC3 的聚集(绿色),DAPI 作为细胞核染料(蓝色),merge 为融合图

**图 3 0、4 Gy 剂量照射 HeLa 细胞 2 h 后激光共聚焦显微镜观察 LC3 的聚集**




A:Western blot 检测 APE1 表达 1:APE1 敲低(CL3)细胞;2:对照(SCR)细胞;3:APE1$^{K6R/K7R}$细胞;4:对照 APE1$^{WT}$细胞;B:CO-IP 检测 AC-APE1 水平 1:IGg;2:APE1$^{WT}$细胞;3:APE1$^{K6R/K7R}$细胞;C、D: Western blot 检测 APE1、LC3 和 p62 表达;E:CO-IP 检测 Beclin1/Bcl2 的相互作用;F:p62 表达半定量;G:LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ蛋白半定量 1:APE1$^{WT}$细胞;2:APE1$^{K6R/K7R}$细胞;3:4 Gy 剂量照射 APE1$^{WT}$细胞;4:4 Gy 剂量照射 APE1$^{K6R/K7R}$细胞;a:$P<0.01$,与 APE1$^{WT}$细胞比较;b:$P<0.01$,与 4 Gy 剂量照射 APE1$^{WT}$细胞比较

**图 4 APE1 乙酰化修饰调控 HeLa 细胞自噬水平**

## 3 讨论

APE1 是小鼠胚胎存活不可或缺的基因,APE1 的表达水平与肿瘤放化疗抵抗之间存在密切的联系,如抑制 APE1 氧化还原功能增强细胞对氧化应激的敏感性[4],而 APE1 又是碱基切除修饰(base excision repair,BER)的限速酶,APE1 的高表达抵抗肿瘤治疗

诱导的 DNA 损伤[2]。APE1 乙酰化修饰是 APE1 最重要的翻译后修饰形式,与 APE1 氧化还原和碱基切除修复功能密切相关[5]。APE1-K6/K7 位点的乙酰化调节 APE1 蛋白的 AP 内切酶活性,并通过改变 APE1 与 BER 相关蛋白(如 XRCC1)的相互作用调节细胞 BER 活性[6]。最近的研究提出,氧化应激和 DNA 损伤反应诱导细胞自噬[7],但 APE1 乙酰化与细胞自噬之间的关系还不清楚。

本实验首先通过 Co-IP 的方法检测 APE1 乙酰化,发现 APE1 乙酰化水平随着电离辐射剂量的增加和照射后时间的延长而增加(图 1)。Lirussi 等[8]认为,基因毒性应激促进 APE1 乙酰化,并参与调节 BER 活性。接着,本实验通过观察 LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ 和 p62 的表达检测自噬活性,发现随着电离辐射剂量的增加 LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ不断增加,而 p62 表达下调,然后通过流式细胞仪和免疫荧光的方法进一步证实,电离辐射促进细胞自噬水平(图 2、3)。电离辐射后释放大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)对细胞造成广泛和持久的 DNA 氧化性损伤,从而激活细胞自噬。Liang 等[9]在多种细胞中报道了相同的结果。最后,本实验通过 APE1-K6/K7 位点突变的 $APE1^{K6R/K7R}$ 细胞调控 APE1 乙酰化,发现 $APE1^{K6R/K7R}$ 细胞自噬活性明显抑制,电离辐射后,$APE1^{K6R/K7R}$ 细胞自噬活性明显低于对照组(图 4)。APE1-K6/K7 位点突变抑制 BER 活性,促进 DNA 损伤,为了维持 DNA 合成、稳定,BER 活性在自噬的启动上发挥关键的作用[10]。但 Shan 等[11]报道了 APE1 主要乙酰化位点突变明显的增加细胞 ROS 水平,在饥饿诱导的细胞自噬中 ROS 是最佳的诱导剂。然而 $APE1^{K6R/K7R}$ 细胞自噬水平却低于对照组,可能因为 APE1 乙酰化主要通过调控 DNA 损伤反应调控细胞自噬。本实验发现 $APE1^{K6R/K7R}$ 细胞促进 Bcl2/Beclin1 的相互作用(图 4),Bcl2/Beclin1 的结合是自噬主要的负向调控途径。Zhao 等[12]报道 APE1/Bcl2 通过 BH 位点相互作用抑制 BER 活性,进一步验证了 APE1 乙酰化通过调节 BER 活性,改变 DNA 损伤反应诱导的细胞自噬。本研究结果显示,电离辐射促进 APE1 乙酰化,通过抑制 BER 活性促进 DNA 损伤诱导的细胞自噬。以上结果表明,APE1-K6/K7 位点突变通过促进 Bcl2/Beclin1 的结合抑制细胞自噬。

总之,本研究结果提示电离辐射促进 APE1 乙酰化修饰,并提高细胞自噬水平。应用 APE1 乙酰化关键位点的突变可以抑制电离辐射诱导的细胞自噬水平。今后,APE1 乙酰化调节细胞自噬的机制需要进一步深入研究。

**参考文献:**

[1] Raffoul J J, Banerjee S, Singh-Gupta V, *et al*. Down-regulation of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1/redox factor-1 expression by soy isoflavones enhances prostate cancer radiotherapy *in vitro* and *in vivo*[J]. Cancer Res, 2007, 67(5): 2141 - 2149. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-06-2147

[2] Robertson K A, Bullock H A, Xu Y, *et al*. Altered expression of Ape1/ref-1 in germ cell tumors and overexpression in NT2 cells confers resistance to bleomycin and radiation[J]. Cancer Res, 2001, 61(5): 2220 - 2225.

[3] Poletto M, Di-Loreto C, Marasco D, *et al*. Acetylation on critical lysine residues of Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) in triple negative breast cancers [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 424(1): 34 - 39. DOI:10.1016/j.bbrc.2012.06.039

[4] Wang Y T, Tzeng D W, Wang C Y, *et al*. APE1/Ref-1 prevents oxidative inactivation of ERK for G1-to-S progression following lead acetate exposure[J]. Toxicology, 2013, 305: 120 - 129. DOI:10.1016/j.tox.2013.01.010

[5] Yamamori T, DeRicco J, Naqvi A, *et al*. SIRT1 deacetylates APE1 and regulates cellular base excision repair [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(3): 832 - 845. DOI:10.1093/nar/gkp1039

[6] Bhakat K K, Izumi T, Yang S H, *et al*. Role of acetylated human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) in regulation of the parathyroid hormone gene[J]. EMBO J, 2003, 22(23): 6299 - 6309. DOI:10.1093/emboj/cdg595

[7] Munoz-Gamez J A, Rodriguez-Vargas J M, Quiles-Perez R, *et al*. PARP-1 is involved in autophagy induced by DNA damage[J]. Autophagy, 2009, 5(1): 61 - 74.

[8] Lirussi L, Antoniali G, Vascotto C, *et al*. Nucleolar accumulation of APE1 depends on charged lysine residues that undergo acetylation upon genotoxic stress and modulate its BER activity in cells[J]. Mol Biology Cell, 2012, 23(20): 4079 - 4096. DOI:10.1091/mbc.E12-04-0299

[9] Liang N, Jia L, Liu Y, *et al*. ATM pathway is essential for ionizing radiation-induced autophagy[J]. Cell Signal, 2013, 25(12): 2530 - 2539. DOI:10.1016/j.cellsig.2013.08.010

[10] Pan Y Z, Wang X, Bai H, *et al*. Autophagy in drug resistance of the multiple myeloma cell line RPMI8226 to doxorubicin[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(2): 5621 - 5629. DOI:10.4238/2015.May.25.14

[11] Shan J L, He H T, Li M X, *et al*. APE1 promotes antioxidant capacity by regulating Nrf-2 function through a redox-dependent mechanism[J]. Free Radic Biol Med, 2015, 78: 11 - 22. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.007

[12] Zhao J, Gao F, Zhang Y, *et al*. Bcl2 inhibits abasic site repair by down-regulating APE1 endonuclease activity[J]. J Biol Chem, 2008, 283(15): 9925 - 9932. DOI:10.1074/jbc.M708345200

(**收稿**:2015-06-30;**修回**:2015-08-17)

(编辑 汪勤俭)