DOI:10.16016/j.2097-0927.202212085

DVC1 在氮芥致人支气管上皮细胞 DNA-蛋白交联损伤修复中的作用

程 晋,余文珮,叶 枫,董训虎,赵远鹏,但国蓉,邹仲敏 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系防化医学教研室,创伤与化学中毒全国重点实验室

[摘要] **目的** 探讨蛋白水解酶 DVC1 在氮芥诱导人支气管上皮细胞 DNA-蛋白交联损伤修复中的作用。**方法** 利用 siRNA 干预 DVC1 表达,50 μmol/L 氮芥染毒细胞后,采用 Western blot 检测 DNA 损伤修复蛋白的表达;荧光酶标仪测定 1~24 h DNA-蛋白交联总量;Slot blot 检测 DNA 与 O^6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(O^6-methylguanine-DNA methyltransferase,MGMT)的共价交联;免疫沉淀检测 MGMT 泛素化水平。构建 GST-DVC1 融合蛋白,GST 下拉实验检测 DVC1 与 MGMT、泛素的结合。**结果** si-DVC1 干预后,DNA-蛋白交联总量升高。氮芥降低交联蛋白 MGMT 原型的水平,但增强其泛素化水平;DVC1 可结合泛素,si-DVC1 可进一步增强 MGMT 的泛素化及 DNA-MGMT 的交联量,与泛素结合酶抑制剂 NSC697923 和蛋白酶体抑制剂 MG132 引起的交联结果类似。si-DVC1 引起 DNA 损伤修复蛋白 Rad51 表达降低、Ku70 表达升高。**结论** DNA-蛋白交联的清除依赖于交联蛋白的泛素化;DVC1 通过与泛素相互作用,促进氮芥诱导的 DNA-蛋白交联的清除,并维持 DNA 以同源重组方式修复损伤的能力。

[关键词] 氮芥;DVC1;DNA 蛋白交联;O^6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶;人支气管上皮细胞
[中图法分类号] R394.3; R977.3; R994.7 [文献标志码] A

Role of DVC1 in repair of nitrogen mustard-induced DNA protein crosslink in human bronchial epithelial cells

CHENG Jin, YU Wenpei, YE Feng, DONG Xunhu, ZHAO Yuanpeng, DAN Guorong, ZOU Zhongmin State Key Laboratory of Trauma and Chemical Poisoning, Department of Chemical Defense, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of DNA damage protein targeting VCP (DVC1) in DNA protein crosslink repair induced by nitrogen mustard in human bronchial epithelial cells (16HBE). **Methods** DVC1 siRNA was used to interfere its expression in 16HBE. Then the cells were exposed to 50 μmol/L nitrogen mustard, and the expression levels of DNA damage repair proteins were detected by Western blotting. The total content of DNA-protein crosslink was determined by fluorescence microplate analyzer from 1 to 24 h. The crosslink content of DNA with O^6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), a methyltransferase, was detected by Slot blotting. The level of ubiquitinated MGMT was detected by immunoprecipitation. After GST-DVC1 fusion protein was constructed, GST pull-down was used to detect the binding of DVC1 with MGMT and ubquitin. **Results** After si-DVC1 intervention, the total content of DNA-protein crosslink was increased, and exposure to nitrogen mustard decreased the level of prototype of MGMT, but increased the level of ubiquitinated MGMT. DVC1 could bind to ubquitin, and si-DVC1 intervention further enhanced the ubiquitination of MGMT, as well as the crosslink between MGMT and DNA, which was similar with NSC697923 (an E2 ubiquitin-conjugating inhibitor) and MG132 (a proteasome inhibitor) treatment. The expression of Rad51 and Ku70, 2 DNA repair proteins, were increased and decreased respectively by si-DVC1 interference. **Conclusion** Clearance of DNA-protein crossslink is depend

[基金项目] 陆军军医大学青年培育项目(2018XQN03);军队医学科技青年培育计划(20QNPY001)
[通信作者] 邹仲敏,E-mail:zmzou@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

on ubiquitination of MGMT. DVC1 promotes the clearance of nitrogen mustard induced DNA-protein crossslink by interacting with ubiquitin, and maintain the ability of homologous recombination repair.

[**Key words**] nitrogen mustard; DVC1; DNA-protein crosslink; O^6-methylguanine-DNA methyltransferase; human bronchial epithelial cells

Supported by the Young Talent Cultivation Program of Army Medical University (2018XQN03) and the Project of Youth Training Program of Military Medical Science and Technology (20QNPY001). Corresponding author: ZOU Zhongmin, E-mail: zmzou@tmmu.edu.cn

氮芥(nitrogen mustard,NM)属于军用糜烂性毒剂[1-2],其渗透性强,靶器官众多,可迅速造成皮肤、呼吸道、眼等的急性损伤[3]。有研究显示,与NM结构类似的糜烂性毒剂硫芥造成呼吸系统损伤的远后效应在所有损伤中排首位,提示应重视糜烂性毒剂对呼吸系统的影响[4-5]。NM引起机体损伤的机制复杂,其中备受关注的机制之一是:NM分子中含有2个活跃的亲电氯乙基,可作为2个烷化位点,与细胞中含有亲核基团的大分子(如DNA、蛋白质等)进行烷化反应[6]。DNA是NM最为敏感的靶分子;正是由于对DNA的烷化损伤,使NM及其衍生物也作为一类化疗药物在临床上广泛应用[7]。然而,NM对正常细胞的DNA损伤依然值得关注,这关系到研发特效抗毒药物以及减轻临床应用的副作用。目前,关于NM引起的DNA损伤、修复作用及其机制尚未完全阐明。

研究表明,NM除了可以引起DNA的链内和链间交联,还可引起DNA-蛋白交联(DNA-protein crosslink,DPC),即NM通过其2个氯乙基分别烷化DNA和蛋白质,并在二者之间形成稳定的共价交联[8]。例如,本实验室前期发现O^6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(O^6-methylguanine-DNA methyltransferase,MGMT)可在NM的作用下与DNA形成DPC(MGMT-DPC,mDPC)[9],该蛋白可作为研究NM致DPC损伤的靶蛋白。因此,修复DPC是对抗NM损伤的重要方式之一。DVC1是近来发现的蛋白水解酶,可能参与DPC的蛋白水解修复[10-11]。本实验室前期研究发现DVC1参与了NM的损伤修复[9],然而,其具体作用尚未深入阐明。本研究通过体外实验,利用人支气管上皮细胞16HBE建立NM染毒模型,结合DVC1 siRNA干扰,以MGMT为DPC的代表性靶蛋白,初步探讨DVC1在NM致DPC损伤修复中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

人支气管上皮细胞16HBE为本室保存。胎牛血清(无支原体)和RPMI1640培养基购自美国HyClone公司;lipofectamine 2000脂质体转染试剂盒购自美国Sigma公司;DVC1过表达质粒购自中国义翘神州公司、si-DVC1购自中国吉玛公司。小鼠抗人MGMT、Ub抗体购自美国Santa Cruz公司;兔抗人DVC1抗体购自美国Abcam公司;兔抗人p-H2AX、ERCC1、Rad51、Ku70、β-actin、GAPDH、H3抗体购自美国CST公司。细胞总蛋白、细胞核浆蛋白提取试剂盒购自中国碧云天公司。BCA蛋白定量试剂盒购自美国Fisher Scientific公司。DNAiso购自日本TaKaRa公司。SYBR Green荧光染料购自中国瑞楚生物。NM盐酸盐、FITC购自美国Sigma公司。NSC697923购自美国Selleck公司。

1.2 细胞处理

16HBE细胞用含10%胎牛血清的RPMI1640培养基传代培养。细胞长至融合度为70%~80%时进行实验。NM盐酸盐用PBS溶解后即进行细胞染毒1 h,维持染毒终浓度为50 μmol/L。根据不同实验进行分组及处理,(1)总DPC(total DPC,tDPC)随时间变化趋势检测:对照组为正常培养的细胞;1 h组:50 μmol/L NM染毒1 h后结束培养;6 h组:染毒后更换正常培养基并持续至6 h;24 h组:染毒后更换正常培养基并持续至24 h;si-DVC1组:用si-DVC1进行细胞转染2 d(si-DVC1序列为:5′-GCACUGUUUGUUCAGUUUAAC-3′);si-DVC1+NM组:si-DVC1进行细胞转染2 d后进行NM染毒,根据实验需要培养至相应时间;NSC697923+NM组:1 μmol/L NSC697923预处理1 h后进行NM染毒,根据实验需要培养至相应时间。(2)MGMT、mDPC变化及影响因素、DNA损伤修复通路检测:对照组、NM组、si-DVC1组、si-DVC1+NM组同前述;si-NC组:转染随机对照siRNA 2 d(si-NC寡核苷酸序列为:5′-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3′);si-NC+NM组:转染随机对照siRNA 2 d后进行NM染毒;pcDNA组:转染随机对照pcDNA 2 d;pcDNA+NM组:转染随机对照pcDNA 2 d后进行NM染毒;DVC1组:转染DVC1过表达质粒2 d;DVC1+NM组:转染DVC1过表达质粒2 d后进行NM染毒;MG132组:10 μmol/L MG132处理细胞2 h;MG132+NM组:10 μmol/L MG132处理细胞2 h后进行NM染毒。

1.3 Western blot检测蛋白表达

细胞培养结束后,加入细胞裂解液收集细胞总蛋白,或利用细胞质/核蛋白提取试剂盒分别收集胞质/胞核蛋白。测定蛋白浓度后,取40 μg蛋白样品加入

上样缓冲液后煮沸变性上样。用质量分数为 10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳,将蛋白应用湿性转膜法转印至 PVDF 膜上,用含 1% BSA 封闭液封闭 2 h 后,用 MGMT、DVC1、p-H2AX、ERCC1、Rad51、Ku70、β-actin、GAPDH、H3 抗体 4 ℃过夜孵育。洗膜后加入二抗稀释液室温孵育 1 h。再次洗膜后加入 ECL 发光液,用 VILBER FUSION FX7 成像系统曝光。

1.4 总 DPC(tDPC)含量测定

细胞裂解及 DPC 提取参照 KIIANITSA 等[12]报道的方法并加以改进。DNAiso 裂解细胞后,用无水乙醇将 DNA 沉淀并清洗 DNA。TE 缓冲液溶解 DNA 后,利用 SYBR Green 标记 DNA 并通过测定荧光值对 DNA 进行定量。取含 10 μg DNA 的样品,加入 1 μL FITC 母液避光孵育 1 h 以结合交联蛋白,利用无水乙醇将 DNA 沉淀并清洗。TE 缓冲液重新溶解 DNA 后,利用酶标仪在 495 nm 激发光波长处测量各样本 FITC 的荧光值。

1.5 Slot blot 检测

取 30 μg 前述利用 SYBR Green 定量的 DNA 样品,用 TBS 补充体积至 200~500 μL 并过滤。向 Slot blot 装置各上样孔中加入样品,利用真空泵将样品吸附至装置中的 NC 膜上。用 1% BSA 封闭液封闭 NC 膜 1 h,MGMT 一抗 4 ℃孵育过夜。洗膜后加入二抗稀释液室温孵育 1 h。再次洗膜后加入 ECL 发光液,用 VILBER FUSION FX7 成像系统曝光。

1.6 免疫沉淀实验

在吸附柱中加入树脂并用 PBS 清洗 1 次。加入 1 mg 蛋白样品,4 ℃混匀孵育 1 h。离心收集蛋白滤过液。向蛋白滤过液中加入 10 μg Ub 一抗,用 IP 裂解/清洗缓冲液补充混合液体积至 300 μL,4 ℃下孵育过夜。将样品加入新的含蛋白 A/G 琼脂糖的吸附柱,4 ℃下缓慢旋转混匀孵育 1 h,离心去除缓冲液。用 IP 裂解/清洗缓冲液清洗复合物后,向吸附柱中加入 2×SDS 上样缓冲液煮沸变性,离心收集滤过蛋白。采用 Western blot 检测方法,经 MGMT 一抗孵育、洗膜、二抗孵育,ECL 化学发光检测泛素化的 MGMT 蛋白表达。

1.7 GST 下拉实验

将 DVC1 cDNA 序列构建到 pet-GST 载体上并测序验证。将质粒转入大肠杆菌系统,经细菌培养小量表达 GST-DVC1 蛋白,超声法提取细菌总蛋白。经 SDS-PAGE 电泳鉴定 GST-DVC1 融合蛋白的表达后,将总蛋白加入 50~70 μL GST-Beads,4 ℃摇床上反应 30~60 min,离心弃上清,重复上述步骤以使凝胶珠上结合更多 GST-DVC1 融合蛋白。用 200 μL PBS 洗涤 GST-Beads,离心弃上清。用 500 μL NETN 缓冲液悬浮 GST-Beads,加入 20 μL 16HBE 细胞裂解提取的总蛋白,4 ℃摇床上反应 4~8 h,经离心、洗涤,Western blot 检测 MGMT 和 Ub 表达。

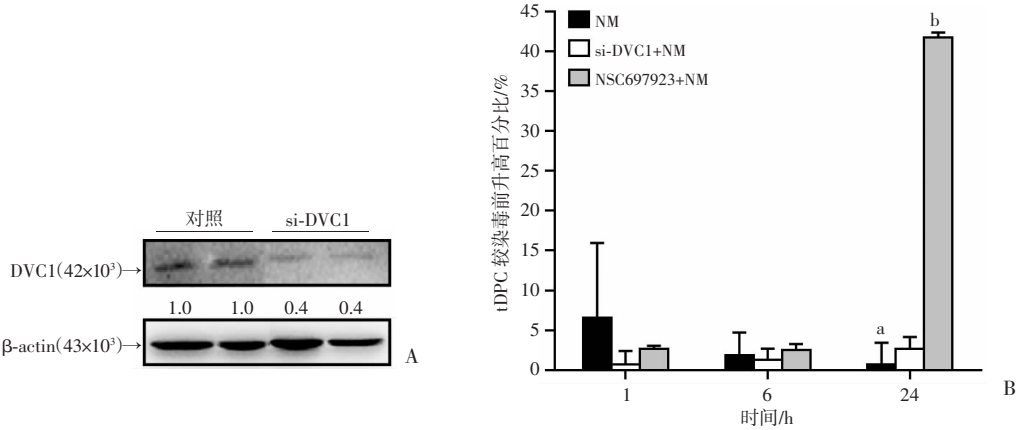
1.8 统计学分析

各组样本均独立重复 3 次。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行单因素方差分析。检验水准:$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 DVC1 对 tDPC 含量的影响

用 si-DVC1 构建 DVC1 表达缺陷细胞模型,结果显示 DVC1 蛋白的表达被显著抑制(图 1A)。为观察 DVC1 在清除 DPC 过程中是否发挥泛素酶作用,以 E2 泛素结合酶抑制剂 NSC697923 作为对照,发现 si-DVC1+NM 组 1、6、24 h 的 tDPC 变化趋势与 NSC697923+NM 组类似,24 h 与 1、6 h 相比有更多 tDPC 累积(图 1B),提示 DVC1 在泛素被激活之后发挥作用,可能与 E2 泛素结合酶类似或晚于 E2 酶作用。



A:si-DVC1 的干扰效果;B:细胞在染毒后 1、6、24 h tDPC 含量相对染毒前增长的百分比 NM:仅 NM 染毒;si-DVC1+NM:NM 合并 si-DVC1 处理;NSC697923+NM:NM 合并 NSC697923 处理;a:$P<0.05$,与 NM 处理 1 h 比较;b:$P<0.01$,与 NSC697923+NM 处理 1、6 h 比较

图 1 si-DVC1 及泛素结合酶抑制剂处理下 tDPC 的时间变化趋势

2.2　DVC1 对 DNA-MGMT 交联(mDPC)含量的影响

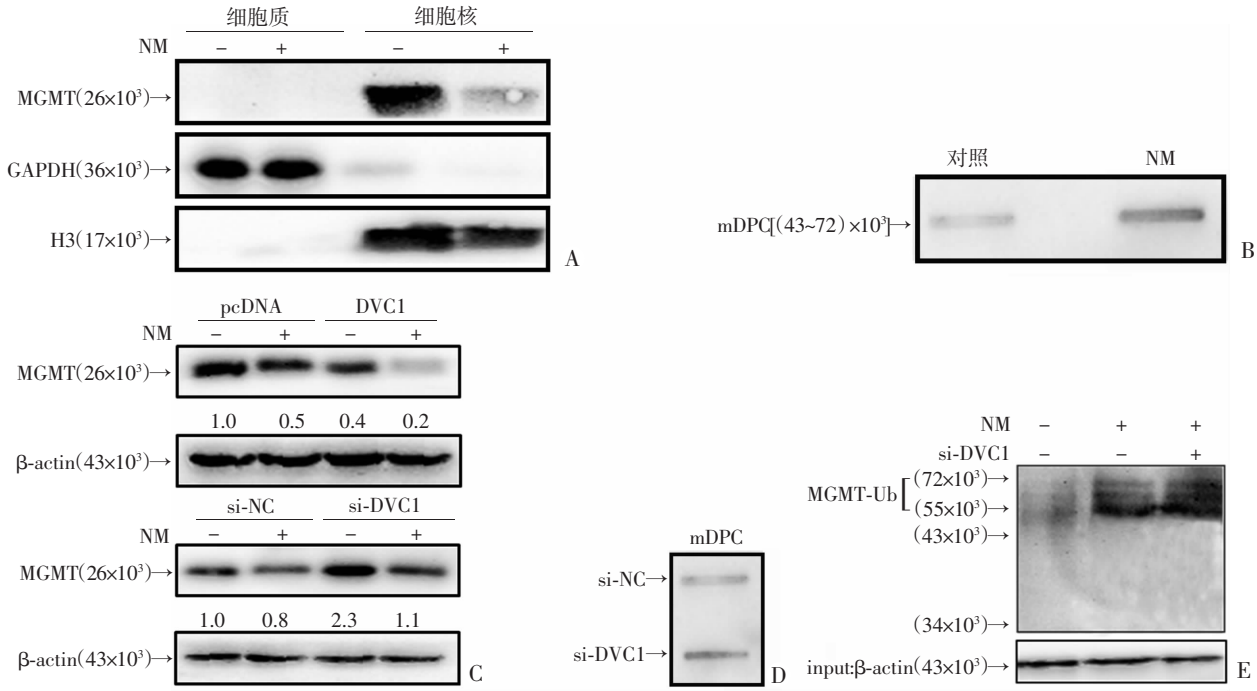
为进一步研究 DVC1 对 DPC 的影响,选取 MGMT 作为形成 DPC 的代表性交联蛋白进行后续实验。NM 染毒后 1 h,Western blot 检测 26 kD 原型 MGMT 蛋白(26 kD-MGMT)表达水平降低,且 MGMT 主要表达于细胞核(图 2A)。然而,MGMT 在染毒后与 DNA 形成交联(mDPC)(图 2B)。DVC1 过表达可降低 26 kD-MGMT 水平,相反,si-DVC1 干预后,可提高 26 kD-MGMT 水平;在 NM 暴露后仍然可以看到各自的类似表现(图 2C)。si-DVC1 干预可导致 mDPC 含量升高(图 2D),且(55~72)×10^3 处多泛素化 MGMT 水平升高(图 2E)。上述结果提示,NM 染毒造成泛素化 MGMT 水平升高及非泛素化 MGMT 水平降低,同时引起 MGMT 与 DNA 的交联。DVC1 缺失加重交联和泛素化,提示抑制 DVC1 妨碍泛素化 MGMT 从交联复合体上清除。

2.3　DVC1 通过泛素途径影响 DPC 含量

采用 GST 下拉实验明确 DVC1 是否对 MGMT 有特异性识别作用。结果证实,DVC1 和 MGMT 没有直接结合的相互作用,然而 DVC1 可以结合泛素分子(图 3A),提示 DVC1 对 mDPC 的影响与结合 MGMT 上的泛素有关。蛋白酶体抑制剂 MG132 处理细胞可降低核内 26 kD-MGMT 的水平(图 3B),与 si-DVC1 作用类似的是,MG132 也可引起 mDPC 的显著升高(图 3C、D),提示通过抑制蛋白酶体阻止泛素化 MGMT 水解将导致交联于 DNA 的 MGMT 无法移除。

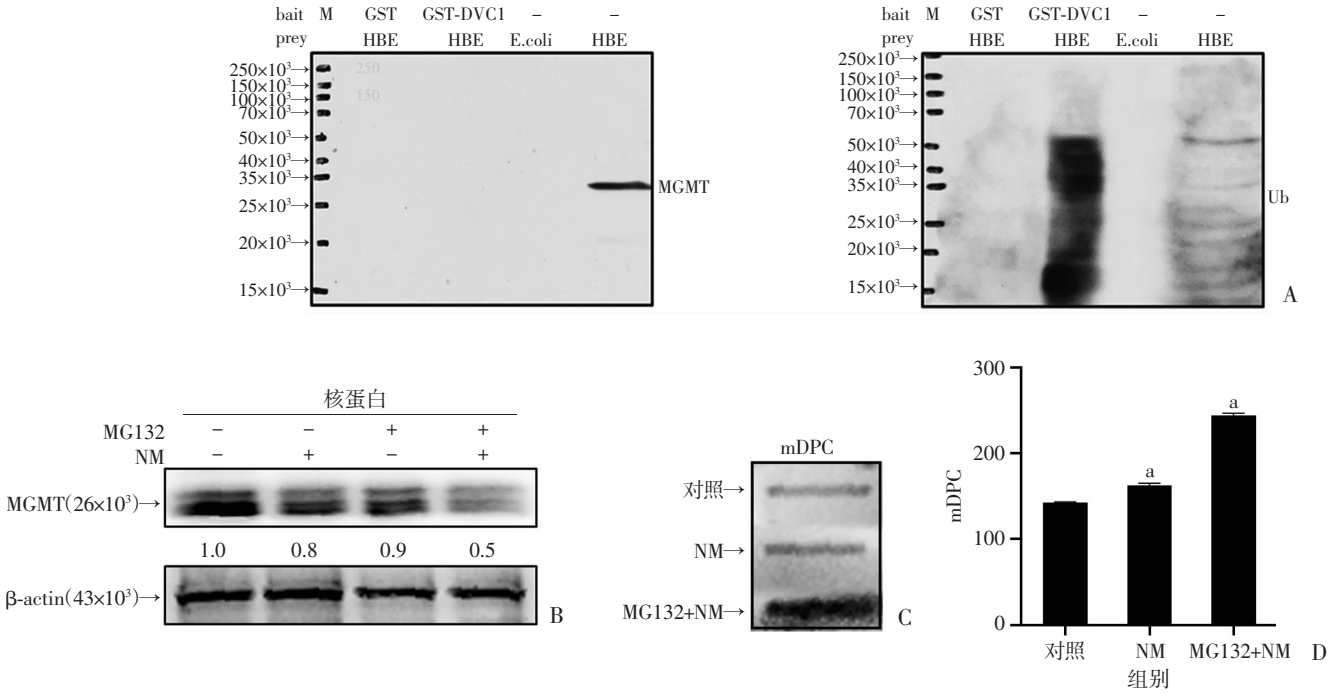
2.4　DVC1 对 DNA 损伤修复的影响

考虑到 NM 本身和 DPC 修复过程可能引起多种形式的 DNA 损伤,本研究选择 ERCC1、Ku70、Rad51 作为核苷酸切除修复、非同源末端连接和同源重组修复方式的代表蛋白,检测了 DVC1 对其他 DNA 损伤修复的影响。结果显示,NM 染毒可造成 ERCC1 蛋白表达轻微升高,si-DVC1 提高了 ERCC1 蛋白在非染毒状态下的本底表达。合并 NM 染毒后,ERCC1 表达较染毒前轻微升高,与 si-NC 组升高趋势类似。NM 染毒造成 Rad51 表达升高,si-DVC1 也造成 Rad51 本底表达升高(P<0.05),但与 si-NC 相比,si-DVC1 处理降低了 Rad51 的相对表达水平(P<0.05)。与此同时,si-DVC1 处理较 si-NC 组升高了 Ku70 的相对表达水平(P<0.05,图 4),提示 DVC1 缺失对细胞 DNA 损伤修复的方式有影响。



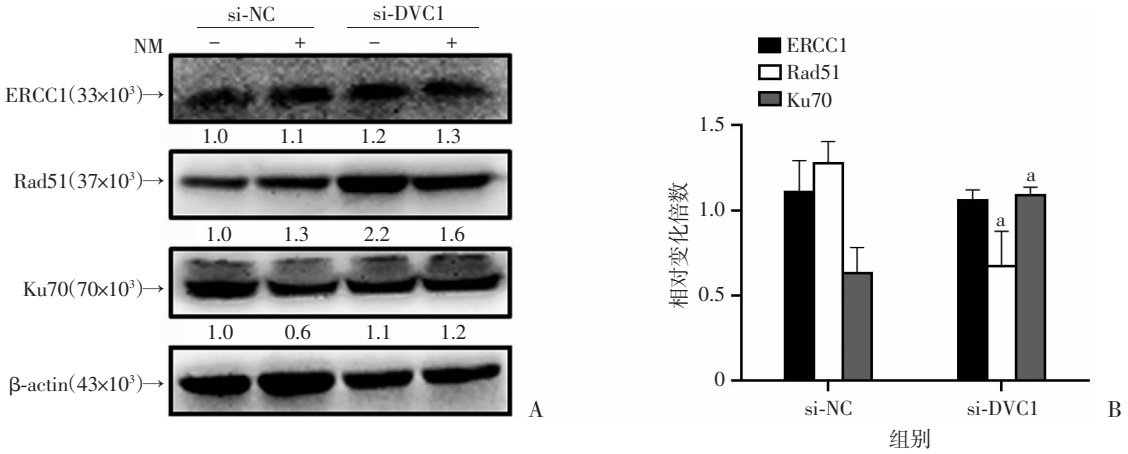
A:Western blot 检测 26 kD 原型 MGMT 蛋白在 16HBE 细胞质及细胞核内的表达;B:Slot blot 检测 NM 染毒后 MGMT 与 DNA 形成 mDPC;C:pcDNA-DVC1 过表达质粒及 si-DVC1 处理对 26 kD 原型 MGMT 蛋白表达水平的影响;D:Slot blot 检测 si-DVC1 处理后 mDPC 的含量　si-NC 组为转染 siRNA 随机对照寡核苷酸的细胞;E:免疫共沉淀检测 si-DVC1 处理后 MGMT 的泛素化水平

图 2　MGMT 在染毒后的变化及 DVC1 对其的影响



A:GST 下拉实验检测 DVC1 与 MGMT 蛋白(左)和泛素(Ub,右)的直接结合能力;B:蛋白酶体抑制剂 MG132 处理后 26 kD 原型 MGMT 在细胞核中的表达变化;C:MG132 处理后 mDPC 的含量变化;D:C 图的灰度定量分析结果 a:$P<0.05$,与对照组比较

图 3 DVC1 参与 MGMT 泛素化过程



A:si-DVC1 处理后 ERCC1、Rad51 及 Ku70 在 NM 染毒后的表达水平;B:蛋白相对染毒前的变化倍数 a:$P<0.05$,与 si-NC 组比较

图 4 DVC1 对 DNA 损伤修复通路的影响

3 讨论

作为一种军用糜烂性毒剂和肿瘤化疗药物,NM 可对细胞 DNA 造成严重损伤。这在抗肿瘤方面是有益作用,可干扰肿瘤细胞的增殖[13-14],但在正常细胞中,就成为触发正常细胞损伤的因素。因此,其致糜烂作用强,也能在化疗时引起严重的副作用。目前有多种学说尝试阐明 NM 的损伤机制,其中,NM 对 DNA 的损伤是重要的学说之一[15]。DNA 受损增加了细胞增殖、蛋白质合成的风险,这也是增殖旺盛的细胞对 NM 更为敏感的原因。

烷化剂对靶分子造成的烷化反应与烷化剂分子内

的烷化基团个数有关。仅有 1 个烷化基团的烷化剂,即单功能烷化剂,仅能与 DNA 上 1 个碱基位点反应[16]。NM 分子中含有 2 个亲电的氯乙基基团,属于双功能烷化剂[17],因而对 DNA 造成的损伤形式更为多样且严重,包括仅利用一个氯乙基造成 DNA 上单碱基/核苷酸位点的烷化,而另一个氯乙基仍游离,以及利用 2 个氯乙基同时对 2 个靶位点交联。DPC 即 DNA 和蛋白质之间发生的交联,是 NM 作为双功能烷化剂引起的交联种类之一,只是 2 个烷化靶点并非全部位于 DNA,而是分别位于 DNA 和蛋白质[15]。因为蛋白质共价、稳定地结合于 DNA,不易移除[8],从而使交联蛋白对 DNA 正常的解旋、复制和转录产生阻碍作用,也可能引起继发的链断裂[18]。

在酵母中发现的一种 DPC 加工蛋白酶 Wss1,可降解酶(TOP1 交联)及非酶(甲醛诱导)交联 DPC[19-20]。这使得 DPC 的蛋白水解修复途径被关注。通过生物信息学比对,发现 Wss1 在高等真核生物中的同源蛋白为 DVC1[21]。因为交联蛋白能阻止 DNA 复制酶的移动,其水解也势必需要通过 DNA 复制受阻引发复制压力而触发[22]。巧合的是,有研究发现 DVC1 的表达及功能与 DNA 复制及细胞周期密切相关[23],这些都提示 DVC1 可能参与修复 DPC 的作用。本研究结果显示,正常细胞在 NM 损伤之后,随时间进展有清除 DPC 的趋势;但 DVC1 缺失后,DPC 含量却随时间上升,说明在修复阶段,DVC1 的缺失影响了清除 DPC 的过程。NSC697923 抑制 E2 泛素结合酶后有类似的 DPC 持续上升的结果。E2 泛素结合酶在泛素链的延长和识别特异的 E3 泛素连接酶并将泛素链转移到靶蛋白上有重要作用[24],E2 泛素结合酶的抑制可能在一定程度上影响了交联蛋白泛素化的最后步骤,从而使交联蛋白无法被 E3 酶识别并被转移。研究发现 DVC1 可通过泛素化信号被招募[20]。si-DVC1 的作用与 NSC697923 类似,提示 DVC1 参与修复 NM 诱导的 DPC 的作用,可能发生在泛素链形成之后。

为进一步阐明 DVC1 的作用及其与泛素化过程的关系,本研究以 MGMT 作为交联蛋白的代表,观察 DVC1 对 MGMT 蛋白本身及 mDPC 的影响。MGMT 是此前已被证实的能被 NM 交联到 DNA 链上的蛋白,本课题组此前证实 MGMT 被移除是依赖于泛素化的[25],但尚不清楚 DVC1 对 MGMT 的具体影响。MGMT 主要存在于细胞核,与形成 DPC 的位置一致,且 mDPC 在 NM 染毒后升高。但如仅通过 Western blot 检测 MGMT 蛋白在 26×10^3 的位置,却发现在 NM 损伤之后有显著降低。考虑到这可能由于 MGMT 在被交联后,需被泛素化,而泛素化将导致 MGMT 分子量变化,从而使其在 SDS-PAGE 上的位置升高,本研究检测 si-DVC1 干预后 MGMT 的泛素化表达,结果证实 DVC1 的抑制使 MGMT 泛素化增强,说明 MGMT 的泛素化并不受 DVC1 缺失的影响,但 mDPC 清除过程却发生阻滞。这可能是因为 DVC1 的抑制干扰了 MGMT 泛素化后的水解,从而使泛素化 MGMT 累积。

本实验证实 DVC1 无法与 MGMT 结合,却能够结合泛素分子,说明 DVC1 对 DPC 的清除并非依赖交联蛋白本身的特异性,而是广泛的作用,其机制可能与结合泛素分子有关。这也佐证了干预 DVC1 的效果与干预 E2 泛素结合酶类似,当泛素分子无法通过 E2 泛素结合酶形成泛素链并聚集于 DPC 时,也无法募集 DVC1 到 DPC 处,从而限制了 DPC 的清除。

被泛素链标记的蛋白最后将被转移到蛋白酶体,蛋白酶体是蛋白质泛素化降解的最后环节[26-27]。利用蛋白酶体抑制剂 MG132 处理细胞显著降低了 Western blot 检测到的 MGMT 原型的水平,但 mDPC 含量却升高,提示 MGMT 原型降低的同时,可能存在更多的 MGMT 交联于 DNA 并且被泛素化,但却因蛋白酶体被抑制,即使被泛素化也无法完成降解。MG132 对 mDPC 的影响与 si-DVC1 引起 MGMT 泛素化水平升高相吻合,提示 DVC1 发挥作用的时段主要在交联蛋白已被泛素化标记到被转移至蛋白酶体之间。

DPC 的长时间存在势必作为 DNA 复制和翻译的阻遏物,解旋和复制的压力可能会继发更严重的 DNA 损伤,如单链甚至双链断裂[20]。DNA 损伤有多种修复方式[28],通过检测 DVC1 缺失条件下各修复蛋白的改变情况,发现未染毒条件下,DVC1 缺失可造成细胞生理状态下的 DNA 损伤,并导致 ERCC1 和 Rad51 升高,提示此时主要通过核苷酸切除、同源重组进行修复。但 DVC1 缺失对染毒引起的 ERCC1 变化影响并不显著,而是促使染毒条件下 Ku70 相对上调,以及 Rad51 相对下调。ERCC1、Ku70、Rad51 分别是核苷酸切除修复、非同源末端连接和同源重组的关键蛋白[29-32],三者的表达变化提示 DVC1 的缺失可能促进 DNA 修复方式的改变,同源重组弱化,非同源末端连接增强。二者都是修复双链断裂的重要方式[33],不同之处在于,同源重组以姐妹染色单体的另一条未受损 DNA 链为模板,其修复过程保守,属无错修复;而非同源末端连接通过修复蛋白直接将断裂的 DNA 双链连接,属易错修复[34]。DVC1 缺失造成二者在修复 DNA 上的平衡发生改变,提示细胞此时以一种更易错的方式进行 DNA 修复,虽然不利于保持基因组的稳定,但

可以维持细胞的基本生物活动。有研究报道 DVC1 与 PCNA 共定位,其缺失将造成细胞周期阻滞[23],我们推测此时细胞无法正常进入 S 期,因而不满足同源重组的条件,故只能以非同源末端连接进行修复。

综上所述,本研究发现 DVC1 可与泛素分子结合,并参与 NM 诱导的 DPC 损伤的修复。DVC1 缺失将导致交联蛋白泛素化和 DPC 含量升高,与抑制 E2 泛素结合酶和蛋白酶体的作用类似。该结果进一步揭示了 DVC1 在 NM 致 DPC 损伤修复中的作用,为研究 NM 防治措施提供了潜在靶点。

参考文献:

[1] YUE L J, WEI Y X, CHEN J, *et al*. Abundance of four sulfur mustard-DNA adducts *ex vivo* and *in vivo* revealed by simultaneous quantification in stable isotope dilution-ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chem Res Toxicol, 2014, 27(4): 490-500. DOI: 10.1021/tx4003403.

[2] ZHANG Y J, YUE L J, NIE Z Y, *et al*. Simultaneous determination of four sulfur mustard-DNA adducts in rabbit urine after dermal exposure by isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2014, 961: 29-35. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.04.050.

[3] LIN Y, DONG Y, CHEN J, *et al*. Gas chromatographic-tandem mass spectrometric analysis of β-lyase metabolites of sulfur mustard adducts with glutathione in urine and its use in a rabbit cutaneous exposure model [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2014, 945/946: 233-239. DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.11.058.

[4] NIE Z Y, ZHANG Y J, CHEN J, *et al*. Monitoring urinary metabolites resulting from sulfur mustard exposure in rabbits, using highly sensitive isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry [J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(21): 5203-5212. DOI: 10.1007/s00216-014-7916-3.

[5] DARCHINI-MARAGHEH E, BALALI-MOOD M. Delayed complications and long-term management of sulfur mustard poisoning: recent advances by Iranian researchers (part I of II)[J]. Iran J Med Sci, 2018, 43(2): 103-124.

[6] STEINRITZ D, LÜLING R, SIEGERT M, *et al*. Alkylated epidermal creatine kinase as a biomarker for sulfur mustard exposure: comparison to adducts of albumin and DNA in an *in vivo* rat study[J]. Arch Toxicol, 2021, 95(4): 1323-1333. DOI: 10.1007/s00204-021-03005-3.

[7] IQUBAL A, IQUBAL M K, SHARMA S, *et al*. Molecular mechanism involved in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity: old drug with a new vision [J]. Life Sci, 2019, 218: 112-131. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.12.018.

[8] GROEHLER A 4th, VILLALTA P W, CAMPBELL C, *et al*. Covalent DNA-protein cross-linking by phosphoramide mustard and nornitrogen mustard in human cells[J]. Chem Res Toxicol, 2016, 29(2): 190-202. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.5b00430.

[9] CHENG J, YE F, DAN G R, *et al*. Bifunctional alkylating agent-mediated MGMT-DNA cross-linking and its proteolytic cleavage in 16HBE cells[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2016, 305: 267-273. DOI: 10.1016/j.taap.2016.06.022.

[10] STINGELE J, BELLELLI R, ALTE F, *et al*. Mechanism and regulation of DNA-protein crosslink repair by the DNA-dependent metalloprotease SPRTN[J]. Mol Cell, 2016, 64(4): 688-703. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.09.031.

[11] REINKING H K, KANG H S, GOTZ M J, *et al*. DNA structure-specific cleavage of DNA-protein crosslinks by the SPRTN protease[J]. Mol Cell, 2020,80(1):102-113.e6. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.08.003.

[12] KIIANITSA K, MAIZELS N. A rapid and sensitive assay for DNA-protein covalent complexes in living cells[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(9): e104. DOI: 10.1093/nar/gkt171.

[13] BRAYBOY L M, CLARK H, KNAPIK L O, *et al*. Nitrogen mustard exposure perturbs oocyte mitochondrial physiology and alters reproductive outcomes[J]. Reproductive Toxicol, 2018, 82: 80-87. DOI: 10.1016/j.reprotox.2018.10.002.

[14] PUYO S, MONTAUDON D, POURQUIER P. From old alkylating agents to new minor groove binders[J]. Crit Rev Oncol, 2014, 89(1): 43-61. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2013.07.006.

[15] JAN Y H, HECK D E, LASKIN D L, *et al*. DNA damage signaling in the cellular responses to mustard vesicants[J]. Toxicol Lett, 2020, 326: 78-82. DOI: 10.1016/j.toxlet.2020.03.008.

[16] SOSIC A, ZURAVKA I, SCHMITT N K, *et al*. Direct and topoisomerase Ⅱ mediated DNA damage by bis-3-chloropiperidines: the importance of being an earnest G[J]. ChemMedChem, 2017, 12(17): 1471-1479. DOI: 10.1002/cmdc.201700368.

[17] GOSWAMI D G, KANT R, AMMAR D A, *et al*. Acute corneal injury in rabbits following nitrogen mustard ocular exposure[J]. Exp Mol Pathol, 2019, 110: 104275. DOI: 10.1016/j.yexmp.2019.104275.

[18] NAKAMURA J, NAKAMURA M. DNA-protein crosslink formation by endogenous aldehydes and AP sites[J]. DNA Repair, 2020, 88: 102806. DOI: 10.1016/j.dnarep.2020.102806.

[19] BALAKIREV M Y, MULLALLY J E, FAVIER A, *et al*. Wss1 metalloprotease partners with Cdc48/Doa1 in processing genotoxic SUMO conjugates[J]. eLife, 2015, 4: e06763. DOI: 10.7554/eLife.06763.

[20] VAZ B, POPOVIC M, RAMADAN K. DNA-protein crosslink proteolysis repair[J]. Trends Biochem Sci, 2017, 42(6): 483-495. DOI: 10.1016/j.tibs.2017.03.005.

[21] STINGELE J, BELLELLI R, BOULTON S J. Mechanisms of DNA-protein crosslink repair[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017, 18(9): 563-573. DOI: 10.1038/nrm.2017.56.

[22] STINGELE J, HABERMANN B, JENTSCH S. DNA-protein crosslink repair: proteases as DNA repair enzymes[J]. Trends Biochem Sci, 2015, 40(2): 67-71. DOI: 10.1016/j.tibs.2014.10.012.

[23] MÓROCZ M, ZSIGMOND E, TÓTH R, *et al*. DNA-dependent protease activity of human Spartan facilitates replication of DNA-protein crosslink-containing DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(6): 3172-3188. DOI: 10.1093/nar/gkw1315.

[24] CARLA B, MARCO T. Identification and characterization of physiological pairing of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and E3 ubiquitin ligases[J]. Methods Mol Biol Clifton N J, 2023, 2581: 13-29.

[25] CHENG J, YE F, DAN G R, *et al*. Formation and degradation of nitrogen mustard-induced MGMT-DNA crosslinking in 16HBE cells[J]. Toxicology, 2017, 389: 67-73. DOI: 10.1016/j.tox.2017.07.007.

[26] BARD J A M, GOODALL E A, GREENE E R, *et al*. Structure and function of the 26S proteasome[J]. Annu Rev Biochem, 2018, 87: 697-724. DOI: 10.1146/annurev-biochem-062917-011931.

[27] YASUDA S, TSUCHIYA H, KAIHO A, *et al*. Stress- and ubiquitylation-dependent phase separation of the proteasome[J]. Nature, 2020, 578(7794): 296-300. DOI: 10.1038/s41586-020-1982-9.

[28] LEE N S, KIM S, JUNG Y W, *et al*. Eukaryotic DNA damage responses: Homologous recombination factors and ubiquitin modification[J]. Mutat Res Mol Mech Mutagen, 2018, 809: 88-98. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2017.04.003.

[29] FARIDOUNNIA M, FOLKERS G, BOELENS R. Function and interactions of ERCC1-XPF in DNA damage response[J]. Molecules, 2018, 23(12): 3205. DOI: 10.3390/molecules23123205.

[30] SABATELLA M, PINES A, SLYSKOVA J, *et al*. ERCC1-XPF targeting to psoralen-DNA crosslinks depends on XPA and FANCD2[J]. Cell Mol Life Sci, 2020, 77(10): 2005-2016. DOI: 10.1007/s00018-019-03264-5.

[31] GAO C, JIN G X, FORBES E, *et al*. Inactivating mutations of the IK gene weaken Ku80/Ku70-mediated DNA repair and sensitize endometrial cancer to chemotherapy[J]. Cancers, 2021, 13(10): 2487. DOI: 10.3390/cancers13102487.

[32] BONILLA B, HENGEL S R, GRUNDY M K, *et al*. RAD51 gene family structure and function[J]. Annu Rev Genet, 2020, 54: 25-46. DOI: 10.1146/annurev-genet-021920-092410.

[33] MURMANN-KONDA T, SONI A, STUSCHKE M, *et al*. Analysis of chromatid-break-repair detects a homologous recombination to non-homologous end-joining switch with increasing load of DNA double-strand breaks[J]. Mutat Res Toxicol Environ Mutagen, 2021, 867: 503372. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2021.503372.

[34] SCULLY R, PANDAY A, ELANGO R, *et al*. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(11): 698-714. DOI: 10.1038/s41580-019-0152-0.

(收稿:2022-12-12;修回:2023-06-07)

(编辑 邓强庭)