

## ·放射生物学·

# $\gamma$ -H2AX 分析及其在监测电离辐射所致 DNA 双链断裂中的应用前景

由莉 赵永成

**【摘要】** 近几年的研究表明, 组蛋白 H2AX 在 DNA 损伤修复、细胞周期检查点调控、基因组稳定的维持和肿瘤抑制中起着重要作用, 而且在放射生物学中具有应用前景。磷酸化的组蛋白 H2AX( $\gamma$ -H2AX)对 DNA 双链断裂快速敏感的反应使其成为 DNA 双链损伤的标志。 $\gamma$ -H2AX 分析也将在监测电离辐射尤其是低剂量电离辐射所致的 DNA 双链损伤中拥有广阔的应用前景。

**【关键词】** 电离辐射; DNA 损伤; DNA 修复;  $\gamma$ -H2AX

**【中图分类号】** Q691.9 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2006)01-0050-03

## $\gamma$ -H2AX assay and its prospect of detecting DNA double-strand breaks caused by ionizing radiation

YOU Li, ZHAO Yong-cheng

(Department of Biology, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

**【Abstract】** Recently, histone H2AX has been proved to play an important role in DNA repair, cell-cycle checkpoints, genomic stability and tumor suppression. The histone variant H2AX is phosphorylated (denoted as  $\gamma$ -H2AX) in response to the induced DNA double-stranded breaks. And  $\gamma$ -H2AX has been shown to have a rapid and sensitive response to DNA double-strand breaks induced by ionizing radiation. Because  $\gamma$ -H2AX is a reliable marker to DNA double-strand breaks,  $\gamma$ -H2AX assay will make great future in detecting DNA double-strand breaks caused by ionizing radiation, especially in low levels of ionizing radiation.

**【Key words】** Ionizing radiation; DNA damage; DNA repair;  $\gamma$ -H2AX

辐射生物效应分子模型的提出者 Leenhouts 和 Chadwick 认为, 电离辐射诱发的许多细胞效应均与 DNA 双链断裂有关, 所以 DNA 双链断裂及其修复一直是研究的热点。美国国立癌症研究所的 Bonner 博士等<sup>[1]</sup>在 1998 年首次鉴定出 H2AX 基因与细胞应答 DNA 损伤有关, 在维持细胞遗传信息的完整性上发挥重要作用, 并因此阻断肿瘤的形成, 是一种重要的抑癌基因。生物体接受电离辐射时, H2AX 基因编码的组蛋白 H2AX 在 DNA 双链断裂处产生的磷酸化形式—— $\gamma$ -H2AX 对 DNA 的这种损伤能够做出快速敏感的反应。目前  $\gamma$ -H2AX 已成为 DNA 双链断裂的标志,  $\gamma$ -H2AX 分析技术也成为监测 DNA 双链断裂及其修复的敏感方法。

## 1 $\gamma$ -H2AX 的形成机制

真核细胞中的 DNA 不是游离存在的, 而是与组蛋白和非组蛋白形成复合物。组蛋白 H2A 是五种组蛋白中的一种, 具有高度的保守性。其中, H2AX 是组蛋白 H2A 家族中的 7 个成员之一。H2AX 基因位于 11q23.2-q23.3。在大多数哺乳动物组织和细胞中, H2AX 的含量占总 H2A 的 2%~10%, 在低等真核生物中 H2AX 的含量较高, 在出芽酵母中几乎可达到 100%。H2AX 多肽链有 142 个氨基酸残基, 包含一个 139 位为丝氨酸残基的丝氨酸-谷氨酰胺-谷氨酸(Ser-Gln-Glu)结构域<sup>[2]</sup>, 该结构域中的 Ser 残基可以被磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 家族成员共济失调毛细血管扩张突变 (ataxia telangiectasia mutated, ATM) 基因、ATM 和 Rad3 相关蛋白 (ATM and Rad3-related protein, ATR)

作者单位: 300192 天津, 中国医学科学院中国协和医科大学放射医学研究所生物学研究室

通讯作者: 由莉 (E-mail: youli\_9902@163.com)

及 DNA 依赖性蛋白激酶(DNA-dependent protein kinase, DNA-PK) 等磷酸化<sup>[2]</sup>。

ATM 表现为对电离辐射敏感和易患癌症。ATM 含有 PI3K 家族保守序列, 参与细胞周期调控、有丝分裂中染色体重组及 DNA 损伤细胞学反应<sup>[3-5]</sup>。实验证明, ATM 是双链断裂后使组蛋白 H2AX 磷酸化的最主要的酶。当正常细胞的 DNA 发生断裂时, ATM 蛋白可激活 DNA 修复机制, 在双链断裂处直接启动组蛋白 H2AX, 使组蛋白 H2AX 迅即发生磷酸化, 形成  $\gamma$ -H2AX, 然后  $\gamma$ -H2AX 依次结合 Brca1、Rad 50 和 Rad 51 等修复因子, 对 DNA 双链断裂进行修复<sup>[6]</sup>。

当前, 在真核细胞中已知主要有两条途径参与 DNA 双链断裂的修复, 即非同源末端连接修复(non-homologous end-joining, NHEJ)和同源重组修复(homologous recombination, HR)<sup>[7]</sup>。组蛋白 H2AX 在 DNA 修复的过程中可能是通过参与 NHEJ 和 HR 来发挥它的作用, 目前认为,  $\gamma$ -H2AX 可能是连接参与 DNA 末端连接的蛋白(Mre11 或 Rad50 等)来募集 DNA 损伤修复因子的, 连接方式或者是直接连接到  $\gamma$ -H2AX 的羧基端, 或者是通过改变染色体的结构间接连接。另外, p53 结合蛋白和  $\gamma$ -H2AX 之间的物理位置也提示我们, 组蛋白 H2AX 完全有能力为 DNA 的损伤修复因子的集合提供必需的场所<sup>[8]</sup>。

在小鼠实验中, 小鼠缺失组蛋白 H2AX 时, 其染色体将出现不稳定甚至异常, 基因定位缺陷, 而且不能将修复因子如 Nbs1, Brca1 等集合到辐射所致的双链断裂处, 导致小鼠对辐射的敏感性增强, 发育迟缓, 免疫缺陷, 并且失去生育能力等<sup>[6,9]</sup>。

综上所述, 在辐射所致的 DNA 双链断裂处, ATM 直接使组蛋白 H2AX 在受损处发生磷酸化而形成  $\gamma$ -H2AX, 然后  $\gamma$ -H2AX 将上述修复因子集合到双链断裂处, 并引起染色质结构改变, 对损伤进行修复。缺失组蛋白 H2AX 和与其相关的  $\gamma$ -H2AX, 将会影响其对基因组失衡等损伤的监测和对下游效应分子如 Nbs1、Brca1 等的调控, 以致影响 DNA 损伤的有效修复。组蛋白 H2AX 与 DNA 损伤发生部位之间的空间关系使  $\gamma$ -H2AX 在监测双链断裂时很敏感, 使  $\gamma$ -H2AX 分析技术在监测电离辐射导致的 DNA 双链损伤上有很大的应用潜力。

## 2 $\gamma$ -H2AX 分析

$\gamma$ -H2AX 分析是将抗体标记细胞核内的  $\gamma$ -H2AX, 通过对  $\gamma$ -H2AX 进行直观计数来监测 DNA 双链断裂的一种方法。实验研究中, 可采用免疫荧光技术或是 Western blotting 实验路线, 根据研究者的需要, 应用  $\gamma$ -H2AX 多克隆抗体或单克隆抗体作为一抗, 结合相应的荧光标记的二抗, 通过染色可以清楚地观察到  $\gamma$ -H2AX 以及染色质中包含 DNA 双链断裂的区域。

实验证明, 采用免疫荧光技术观察 DNA 双链断裂处的  $\gamma$ -H2AX, 其产生数量与双链断裂数量之间成线性正相关的关系<sup>[10,11]</sup>。另有研究表明, 通过由计数  $\gamma$ -H2AX 的数量得出的辐射剂量与 DNA 双链断裂数量的曲线可以推算出, 每单位辐射剂量(Gy)的电离辐射大约可对每个细胞造成 35 个 DNA 双链断裂损伤<sup>[11,12]</sup>。但在实验中应明确, 不同类型的细胞受照后  $\gamma$ -H2AX 达到最大量时所需要的时间是不同的, 所以观察  $\gamma$ -H2AX 的数量时要因细胞类型而异。

## 3 低剂量辐射中组蛋白 H2AX 的磷酸化作用

大量研究证明, 中、高剂量的电离辐射可致癌; 然而对总体人群来讲, 更重要的是研究低剂量辐射对人体的生物学效应。但是, 低剂量电离辐射的生物效应相当复杂, 甚至是相互矛盾的。纵观由低剂量电离辐射所诱发的适应性反应与辐射超敏感性反应这两种现象的分子机制不难发现, DNA 双链断裂的修复是关键问题: ①虽然辐射超敏感性反应的分子机制还有待于进一步阐明, 但 DNA 损伤及修复被认为在其中发挥重要的作用, 特别是 DNA 双链断裂的修复状态; ②适应性反应的分子机制中, 目前认为 DNA 双链断裂的修复是诱导适应性反应的主要因素。所以, 对于 DNA 双链断裂的修复仍是研究的重点。

人们在解释辐射超敏感性反应时提出了一些假说, 其中“诱导修复”模型认为, 只有超过一定剂量阈值的辐射才能诱发细胞中某种(些)可诱导的修复反应, 而低于该临界阈值的低剂量辐射不足以激发细胞内的修复反应, 结果导致细胞高致死性, 即辐射超敏感性反应<sup>[12]</sup>。低剂量照射后的细胞启动其

DNA 损伤监测分子 ATM 蛋白及其下游作用靶组蛋白 H2AX 的能力降低, 造成组蛋白 H2AX 磷酸化作用受到抑制, 从而不能很好地募集修复因子对 DNA 双链断裂进行修复, 导致细胞死亡数量增加或细胞恶性转化。从这个角度讲, 低剂量电离辐射中组蛋白 H2AX 磷酸化的作用情况支持了辐射超敏感反应性现象。但是由于低剂量电离辐射生物效应的复杂性, 这种效应要得到更好的阐明还需要大量的研究。由于  $\gamma$ -H2AX 对双链断裂能够作出快速敏感的反应, 在研究低剂量电离辐射生物效应时, 尤其是在研究双链断裂修复方面,  $\gamma$ -H2AX 分析有很大的应用前景。

#### 4 $\gamma$ -H2AX 分析在研究电离辐射所致 DNA 双链断裂中的应用前景

##### 4.1 $\gamma$ -H2AX 分析与其他方法的比较

以前监测 DNA 双链断裂的许多方法大多局限在它们对监测双链断裂的敏感性上, 即只能对双链断裂与否作出判断; 而用免疫荧光方法监测  $\gamma$ -H2AX 即  $\gamma$ -H2AX 分析, 不仅能够判断双链断裂与否, 还可以知道双链断裂的数量并且能够将双链断裂的修复情况量化<sup>[1]</sup>。这样, 即使是低剂量(1mGy)辐射, 引起的双链断裂也能得以研究。虽然脉冲场电泳实验替代了以前监测 DNA 双链断裂损伤修复的方法, 一直被公认为是对双链断裂的最敏感的测量方法, 但是,  $\gamma$ -H2AX 在监测双链断裂方面, 尤其是对低剂量辐射所致双链断裂的监测上比脉冲场电泳实验更为敏感, 这使  $\gamma$ -H2AX 分析具有直接作为人群接受低剂量电离辐射生物指标的潜力<sup>[1]</sup>。

##### 4.2 $\gamma$ -H2AX 分析的应用前景

通过以上对  $\gamma$ -H2AX 分析的介绍及其与其他方法的比较, 该技术在监测电离辐射尤其是低剂量所致的 DNA 双链断裂方面具有其独特的优势。另外, 在不能直接测量电离辐射或其他致癌因素所致的 DNA 双链断裂数目的情况下, 应用  $\gamma$ -H2AX 分析可以对 DNA 的损伤进行监测, 估算出导致双链断裂的物理或化学因素的剂量, 从而更好地指导人们制定辐射干预措施, 进行辐射防护。

同时, 该技术还可用于控制职业性或诊断性电离辐射的照射剂量<sup>[1]</sup>, 并将在癌症治疗的放疗过程中发挥其独特的作用<sup>[13]</sup>, 使人们得到更有效的诊断

治疗和辐射防护。随着  $\gamma$ -H2AX 技术的进一步完善, 它将被广泛应用于电离辐射尤其是低剂量辐射导致的 DNA 双链断裂中, 从而使低剂量电离辐射的辐射效应机制明朗化。

#### 参 考 文 献

- 1 Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 1998, 273(10): 5858-5868.
- 2 Burma S, Chen BP, Murphy M, et al. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*, 2001, 276(45): 42462-42467.
- 3 Westphal CH, Schmaltz C, Rowan S, et al. Genetic interaction between ATM and p53 influence cellular proliferation and irradiation-induced cell cycle checkpoints. *Cancer Res*, 1997, 57(9): 1664-1667.
- 4 Savitsky K, Sfez S, Tagle D A, et al. The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum Mol Genet*, 1995, 4(11): 2025-2032.
- 5 Zhang N, Chen P, Khanna KK. Isolation of full-length ATM cDNA and correction of the ataxia-telangiectasia cellular phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(15): 8021-8026.
- 6 Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, et al. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol*, 2000, 10(15): 886-895.
- 7 Pastwa E, Blasiak J. Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim Pol*, 2003, 50(4): 891-908.
- 8 Bassing CH, Chua KF, Sekiguchi J, et al. Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(12): 8173-8178.
- 9 Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, et al. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*, 2002, 296(5569): 922-927.
- 10 Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, et al. Quantitative detection of <sup>125</sup>IIdU-induced DNA double-strand breaks with  $\gamma$ -H2AX antibody. *Radiat Res*, 2002, 158(4): 486-492.
- 11 Rothkamm K, Lobrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(9): 5057-5062.
- 12 Chandna S, Dwarakanath BS, Khaitan D, et al. Low-dose radiation hypersensitivity in human tumor cell lines: Effects of cell-cell contact and nutritional deprivation. *Radiat Res*, 2002, 157(5): 516-525.
- 13 Taneja N, Davis M, Choy JS, et al. Histone H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy. *Biol Chem*, 2004, 279(3): 2273-2280.

(收稿日期: 2005-04-24)