

## ·论著·

## Ku70 对同源重组修复蛋白 Rad51 的调节作用

杜利清 刘强 王彦 徐畅 曹嘉 付岳 陈风华 樊飞跃

**【摘要】目的** 研究非同源末端连接(NHEJ)蛋白 Ku70 对同源重组(HR)修复蛋白 Rad51 的调节作用,初步探讨 HR 与 NHEJ 间协同作用的机制。**方法** 采用 Western blot 法观察特异性增高和降低 Ku70 蛋白水平后 Rad51 蛋白表达水平的变化情况。**结果** 靶向 Ku70 基因小干扰 RNA(siRNA)单纯转染组 Rad51 蛋白的表达水平较空白对照组明显下降;Ku70 高表达载体 PGCsi3.0-hKu70 转染肿瘤细胞后,随着 Ku70 表达水平的升高,Rad51 水平也随之升高。**结论** Ku70 可能对 Rad51 有正调控作用,NHEJ 可能通过 Ku70 对 Rad51 的调节来实现其与 HR 的协同作用。

**【关键词】** DNA 修复;Rad51 重组酶;RNA,小分子干扰;Ku70

**Regulation of homologous recombination repair protein Rad51 by Ku70** DU Li-qing, LIU Qiang, WANG Yan, XU Chang, CAO Jia, FU Yue, CHEN Feng-hua, FAN Fei-yue. Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China

Corresponding author: FAN Fei-yue, Email: fan\_feiyue@yeah.net

**【Abstract】 Objective** To explore the regulative effect of non-homologous end joining (NHEJ) protein Ku70 on homologous recombination repair protein Rad51, and to investigate the synergistic mechanism of homologous recombination repair in combination with NHEJ. **Methods** Observed Rad51 protein expression after transfect Ku70 small interfering RNA or Ku70 plasmid DNA into tumor cells using Western blot. **Results** Expression of Rad51 was obviously reduced after pretreated with Ku70 small interfering RNA. And with the increasing expression of Ku70 protein after transfection of Ku70 plasmid DNA PGCsi3.0-hKu70 into tumor cell lines, the Rad51 protein expression was increased. **Conclusion** Ku70 protein has regulating effect on gene expression of Rad51, and it might participate in the collaboration between homologous recombination repair and NHEJ.

**【Key words】** DNA repair; Rad51 recombinase; RNA, small interfering; Ku70

DNA 双链断裂(double-strand break, DSB)是射线等外源性因素致 DNA 损伤中最严重的一种类型,机体为维护基因组的完整性,可启动两种不同的途径对 DSB 进行修复<sup>[1]</sup>:非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)途径和同源重组(homologous recombination, HR)途径。虽然两者在修复 DSB 中均发挥着重要作用,但也存在着竞争和协同作用<sup>[2]</sup>。Ku70(一种 NHEJ 蛋白)和 Rad51(一种 HR 修复蛋白)分别是 NHEJ 和 HR 中的重要组成蛋白。

本研究以 Ku70 为靶点,通过调控 Ku70 蛋白表达水平来观察其对 Rad51 蛋白表达的影响,以期研究 NHEJ 与 HR 的相互作用提供帮助。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系和质粒

人胃腺癌细胞系 SGC7901 和人食管癌细胞系 EC109 为本实验室保存,人非小细胞肺癌细胞系 H460 由中国医学科学院生物技术研究所以利平博士惠赠,以上 3 种细胞系均采用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基(美国 Gibco 公司)在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下常规培养。真核细胞 Ku70 表达质粒 PGCsi3.0-hKu70 由本实验室构建,采用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂(美国 invitrogen 公司)进行肿瘤细胞瞬时转染。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2013.05.005

**基金项目:**教育部高等学校博士学科点专项基金(20121106-120043);中国医学科学院放射医学研究所学科发展基金(SF1208),专项基金(1335)

**作者单位:**300192 天津,中国医学科学院放射医学研究所,天津市分子核医学重点实验室

**通信作者:**樊飞跃(Email: fan\_feiyue@yeah.net)

1.2 细胞照射条件

肿瘤细胞均置于 <sup>137</sup>Cs γ 源(加拿大原子能有限公司)下照射,源靶距为 30 cm,剂量率为 0.793 Gy/min,照射吸收剂量为 4 Gy。照射后细胞继续培养。

1.3 实验分组

为观察 Ku70 蛋白对 Rad51 蛋白表达水平的影响,实验分为 4 组,分别为空白对照组、单纯照射组(经 4 Gy γ 射线照射后 48 h 的细胞)、靶向 Ku70 基因小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)单纯转染组(靶向 Ku70 基因 siRNA 转染 48 h 后的细胞)、靶向 Ku70 基因 siRNA 转染联合照射组(先经靶向 Ku70 基因 siRNA 预处理 48 h,再经 4 Gy γ 射线照射后 48 h 的细胞)。

为证实 Ku70 蛋白对 Rad51 蛋白的调控作用,按照 PGCsi3.0-hKu70 分别瞬时转染 EC109、H460 和 SGC7901 3 种肿瘤细胞后持续时间的不同,分为转染后 6 h 组、48 h 组、72 h 组和空白对照组。

1.4 Western blot 实验

当细胞生长至亚融合状态时收集细胞,用细胞裂解液(美国 Pierce 公司)裂解细胞。蛋白定量操作按二喹啉甲酸蛋白定量试剂盒(日本 Takara 公司)说明书进行。取 50 μg 蛋白进行不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白电转移至聚偏二氟乙烯膜上,用含 5%脱脂奶粉的 tris-buffered saline and tween 20 (TBST)缓冲液中 4 ℃封闭过夜,加入一抗 Anti-Ku70(英国 abcam 公司,1:1000 稀释)、Anti-Rad51(美国 sant cruz 公司,1:1000 稀释),室温下孵育 2 h,洗膜,加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗(武汉博士德生物工程有限公司,1:3000 稀释),室温下孵育 1 h,采用电致化学发光法检测蛋白表达情

况。以 β-actin 作为内参蛋白。采用 Quantity One 软件分析条带灰度值。

2 结果

2.1 靶向 Ku70 基因 siRNA 对肿瘤细胞 Rad51 蛋白表达水平的影响

靶向 Ku70 基因 siRNA 对肿瘤细胞 Rad51 蛋白表达水平的影响结果见图 1,SGC7901、EC109 和 H460 3 种肿瘤细胞经 γ 射线照射后 Rad51 蛋白表达水平均较空白对照组明显升高;靶向 Ku70 基因 siRNA 单纯转染组 Rad51 蛋白表达水平较空白对照组明显下降;靶向 Ku70 基因 siRNA 转染联合照射组肿瘤细胞的 Rad51 蛋白表达水平较靶向 Ku70 基因 siRNA 单纯转染组没有升高。

2.2 Ku70 蛋白高表达对 Rad51 蛋白表达水平的影响

Ku70 蛋白高表达对 Rad51 蛋白表达水平的影响结果见图 2,随着 PGCsi3.0-hKu70 质粒转染后时间的延长,Ku70 蛋白的表达水平也逐渐升高,而 Rad51 蛋白表达水平也随之升高,且 3 种细胞系均表现相同。

3 讨论

DSB 修复与放射敏感性密切相关,抑制 DSB 修复是肿瘤放疗增敏的主要手段之一。因此,明确 HR 与 NHEJ 2 种修复方式间的相互作用,对于靶向增强肿瘤的放射敏感性具有一定的指导作用。

HR 与 NHEJ 间既存在着相互竞争,也存在着相互协同作用。这种协同作用最突出的表现就是二者在胚胎脑发育中的作用,Orii 等<sup>[3]</sup>的研究表明,干扰 HR 将促进增殖早期神经细胞的凋亡,而干扰

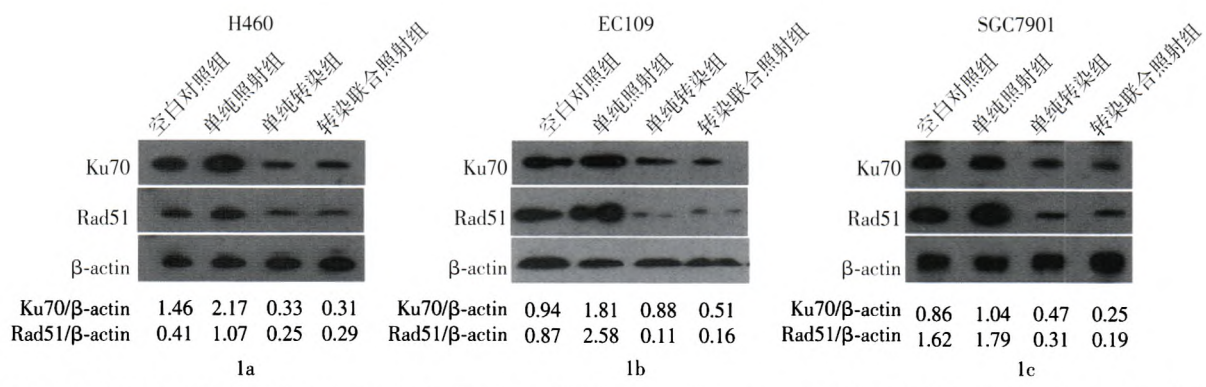


图 1 靶向 Ku70 基因小干扰 RNA 对 Rad51 蛋白表达水平的影响 图中,1a:人非小细胞肺癌 H460 细胞系;1b:人食管癌 EC109 细胞系;1c:人胃腺癌 SGC7901 细胞系。其中,Ku70:一种非同源末端连接蛋白;Rad51:一种同源重组修复蛋白。



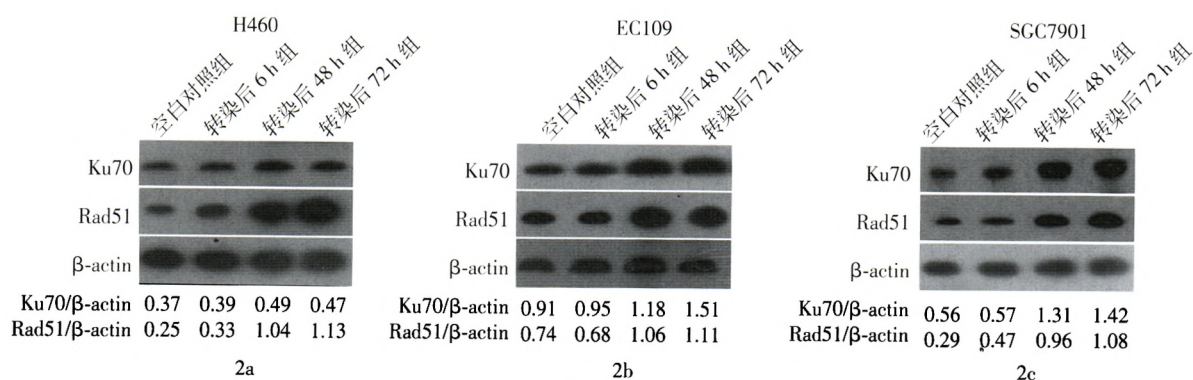


图2 转染真核细胞 Ku70 表达质粒 PGCsi3.0-hKu70 后不同时间 Ku70 蛋白高表达对 Rad51 蛋白表达水平的影响 图中, 2a: 人非小细胞肺癌 H460 细胞系; 2b: 人食管癌 EC109 细胞系; 2c: 人胃腺癌 SGC7901 细胞系。其中, Ku70: 一种非同源末端连接蛋白; Rad51: 一种同源重组修复蛋白。

NHEJ 则导致有丝分裂后期细胞凋亡的增加; 对 HR 和 NHEJ 双突变分析的结果显示, 分属 HR 和 NHEJ 2 种蛋白(Rad54 和 Ku80<sup>[4]</sup>、Rad54 和 ligase IV<sup>[5]</sup>)双缺失所引起表象的改变程度要远远大于其中一种蛋白的单缺失。以上研究表明, HR 和 NHEJ 在 DSB 修复中发挥着协同作用。但具体的协同作用机制目前尚不明确。

在真核细胞中, NHEJ 首先由 Ku70/Ku80 异二聚体结合到断裂处, 然后招募其他蛋白完成断裂处的连接。在 HR 过程中, 必须由 Rad51 蛋白结合到产生的单链上才能寻找到配对的同源序列完成修复。因此, Rad51 和 Ku70 蛋白分别是 HR 和 NHEJ 的重要蛋白。本研究以 Ku70 和 Rad51 蛋白为靶点, 研究了 NHEJ 对 HR 的调控作用, 结果表明, 靶向 Ku70 基因 siRNA 可抑制 Rad51 蛋白的表达, 并对辐射诱导的 Rad51 蛋白表达水平的升高也具有抑制作用。Ku70 对 Rad51 具有正调控作用。但本研究也存在一定的局限性, 因为 Rad51 蛋白的表达是受细胞周期调控的<sup>[6-7]</sup>, 因此, 笔者的后期研究将观察在不同细胞周期中 Ku70 对 Rad51 的调节作用, 以期进一步明确两者间的相互作用。

## 参 考 文 献

- [1] Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, et al. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle*, 2008, 7(18): 2902-2906.
- [2] Kass EM, Jasin M. Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Lett*, 2012, 584(17): 3703-3708.
- [3] Orii KE, Lee Y, Kondo N, et al. Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(26): 10017-10022.
- [4] Couëdel C, Mills KD, Barchi M, et al. Collaboration of homologous recombination and nonhomologous end-joining factors for the survival and integrity of mice and cells. *Genes Dev*, 2004, 18(11): 1293-1304.
- [5] Mills KD, Ferguson DO, Essers J, et al. Rad54 and DNA Ligase IV cooperate to maintain mammalian chromatid stability. *Genes Dev*, 2004, 18(11): 1283-1292.
- [6] Deckbar D, Jeggo PA, Löbrich M. Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2011, 46(4): 271-283.
- [7] Suwaki N, Klare K, Tarsounas M. RAD51 paralogs: roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 2011, 22(8): 898-905.

(收稿日期: 2012-11-07)