

· 基础研究 ·

PCNA 泛素化对 HeLa 细胞苯并芘损伤敏感性的影响 *

朱 琼¹ 常宇骁¹ 孙维娜² 杨 劲³ 位全芳^{3△}

(1 第三军医大学学员旅十队 重庆 400038; 2 第三军医大学学员旅十二队 重庆 400038 ;

3 第三军医大学基础部细胞生物学教研室 重庆 400038)

摘要 目的:观察 PCNA 泛素化修饰对 HeLa 细胞损伤敏感性的影响。方法:Western blot 法检测 His-PCNA 及 His-mutant PCNA (mPCNA, K164R)在 HeLa 细胞中的表达。DNA 损伤剂苯并芘(BaP)和依托泊苷(VP-16)分别处理 HeLa 细胞后,MTT 法检测不同细胞系对 DNA 损伤药物的敏感性;Western blot 法检测细胞 PCNA 的泛素化修饰。结果:Western blot 结果显示 His-PCNA 和 His-mPCNA 在 HeLa 细胞中稳定高表达。MTT 结果显示,苯并芘损伤后,稳定高表达 mPCNA 的细胞系与野生型及高表达 PCNA 细胞系相比,其细胞存活率呈明显下降趋势,而 VP-16 作用后,三种细胞存活率无明显差异。Western blot 结果显示苯并芘损伤可特异性诱导 PCNA 发生泛素化修饰。结论:苯并芘损伤能够诱导 PCNA 发生泛素化修饰,从而降低 HeLa 细胞对苯并芘损伤的敏感性。

关键词 PCNA 泛素化;苯并芘(BaP);依托泊苷(VP-16);HeLa 细胞

中图分类号 Q75, R730.231 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)05-815-03

Effects of PCNA Ubiquitination on Benzopyrene(BaP)-Induced Cytotoxicity in HeLa Cells*

ZHU Qiong¹, CHANG Yu-xiao¹, SUN Wei-na², YANG Jin³, WEI Quan-fang^{3△}

(1 10th student brigade, Third Military Medical University, Chongqing 400038 ;

2 12th student brigade, Third Military Medical University, Chongqing 400038 ;

3 Department of Cell Biology, College of Basic Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT **Objective:** To investigate the effect of ubiquitinated PCNA on BaP induced DNA damage response. **Method:** The expression of the His-PCNA and His-mPCNA (mPCNA, K164R) in HeLa cells were detected by Western blot. The HeLa cells were dealt by using the DNA damaging agents Benzopyrene (BaP) and Etoposide (VP-16), and the sensitivity of different cell lines was detected with MTT assay. **Results:** His-PCNA and His-mPCNA had stably expression in HeLa cells. mPCNA-HeLa cells were more sensitive to BaP induced cytotoxicity compared with the wild type HeLa cells and PCNA-HeLa cells. While the survival of the three kinds of HeLa cells treated with VP-16 didn't appear significant difference. DNA Damaging agents BaP could induce PCNA ubiquitination specially. **Conclusions:** PCNA ubiquitination even plays an important role in BaP induced damage response. Ubiquitinated PCNA may improve the survival of HeLa cells treated by BaP cytotoxicity.

Key words: PCNA ubiquitination; Benzopyrene(BaP); Etoposide(VP-16); HeLa cell

Chinese Library Classification(CLC): Q75, R730.231 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)05-815-03

前言

增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA), 是一种表达水平随细胞周期波动的细胞周期调节蛋白,由 3 个 PCNA 单体首尾相接组成的一个闭合环状三聚体,可环形围绕 DNA 链并沿其滑动,是多种 DNA 聚合酶(polymerase, pol)的辅助因子^[1,2]。研究表明,在 DNA 发生损伤时,泛素结合酶 E2 (Rad6)和泛素连接酶 E3(Rad18)形成的复合物可以介导 PCNA 赖氨酸 164 位点(K164)的泛素化修饰^[3],且当 PCNA K164

位点泛素化后,会增加其对某些 DNA 聚合酶的亲和性,如 pol η 等,并介导其参与 DNA 的损伤应答过程,从而提高细胞损伤后的存活率^[4,5]。

作为外源性化学致癌物的代表,苯并(a)芘[B(a)P]是广泛存在的环境污染物,对人体多个系统都有着广泛的毒性,其代谢活化产物可直接对基因组 DNA 造成损伤^[6]。目前,对苯并芘的研究多注重于其对生物体的毒害作用,但是对其具体的致畸、致突变、致癌的分子机理还尚缺乏深入、系统的认识。现已证实,在紫外线 DNA 损伤条件下,PCNA 的 K164 位点单泛素化修

* 基金项目:国家自然科学基金项目(No 30901220)

作者简介:朱琼(1990-),女,本科生, E-mail:zhouh2010@yahoo.com.cn

△通讯作者:位全芳,主要研究方向:DNA 损伤修复与肿瘤, E-mail: jiaxiang6000@yahoo.com.cn

(收稿日期:2011-10-06 接受日期:2011-10-31)

饰可调控与 PCNA 结合的 DNA 聚合酶从 Pol δ 到 Pol η 转换,从而终止经典 DNA 复制,转而启动 Pol η 介导的易误行性跨损伤复制(translesion)过程,并最终可能导致肿瘤的发生^[7]。但是这种机制是否具有损伤特异性仍未知。其他 DNA 损伤剂如环境致癌物苯并芘(BaP),化疗药物依托泊苷(VP-16)等引起的 DNA 损伤中,PCNA 的泛素化修饰是否也发挥了重要的作用,其作用机制是什么也不清楚。为了进一步拓展认识 PCNA 泛素化在 DNA 损伤应答中的作用,本实验选择了 BaP 和 VP-16 做为损伤因素,观察这两种 DNA 损伤剂是否可特异性引起细胞内 PCNA 泛素化修饰,以及细胞损伤后,PCNA 泛素化对细胞存活率的影响。同时本研究还可为进一步深入了解苯并芘诱导肿瘤发生、发展机制,提供一定线索。

1 材料与方法

1.1 材料

稳定高表达 His-PCNA 及 His-mutant PCNA (mPCNA, K164R) 的 HeLa 细胞由第三军医大学细胞生物教研室保存。鼠抗人 His 抗体购自 Santa Cruz 公司;羊抗鼠 IgG-HRP 购自北京中杉公司;免疫增强化学发光试剂购自 PIERCE 公司;苯并芘(BaP)和依托泊苷(VP-16)购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 PCNA 高表达细胞系的鉴定 复苏 HeLa、PCNA-HeLa 和 mPCNA-HeLa 三种细胞并扩大培养,在对数生长期的细胞中加入细胞裂解液,使细胞完全裂解。裂解物移入离心管中,再用 Bio-RAD DC 蛋白定量试剂盒将蛋白进行定量。经 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳后,将蛋白转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1h,然后以鼠抗人 His 抗体为一抗,4℃ 振荡孵育过夜。取出后用 PBST 洗 3 次,每次 15min;以标记了 HRP 的羊抗鼠 IgG 为二抗室温孵育 30min, PBST 洗 3 次,每次 15min,最后用 HRP-ECL 发光法进行显色分析,观察并鉴定目的蛋白在三种细胞系中的表达情况。

1.2.2 MTT 法检测细胞存活率 将对数生长期的 HeLa、PCNA-HeLa 和 mPCNA-HeLa 三种细胞用胰酶消化后,以适当浓度接种于 96 孔板中。37℃ 培养 24h 后,在不同的细胞中分别加入不同浓度的 BaP 和 VP-16,设立阳性对照组及试验组。药物作用 4 小时后倒掉培养液, PBS 洗涤三遍, 换入不含药物的培养基继续培养至 24 小时。然后加入 MTT(5mg/ml)20 μ l/孔。继续培养 4 小时,倒尽孔内液体,每孔再加入 150 μ l DMSO,充分混匀, A492nm 值,计算细胞存活率:细胞存活率 = 实验组 A 值 / 对照组 A 值 $\times$ 100%

1.2.3 Western blot 检测 PCNA 的泛素化 将生长良好的 HeLa 细胞,分别用 20 μ M、30 μ M 的 BaP 和 5 μ M、10 μ M 的 VP-16 进行处理。培养 4 小时后,更换培养液继续培养至 24 小时,提取总蛋白。定量后,通过 SDS-PAGE 凝胶电泳,将目的蛋白转移至 PVDF 膜上,并封闭。以鼠抗人 PCNA 抗体为一抗,以标记了 HRP 的羊抗鼠 IgG 为二抗,进行 Western blot 显色分析。

2 结果

2.1 PCNA 高表达细胞系的鉴定

HeLa、PCNA-HeLa 和 mPCNA-HeLa 三种细胞总蛋白经

Western blot 显色分析后,结果显示 PCNA-HeLa 和 mPCNA-HeLa 两种细胞比较野生型 HeLa 细胞在约 36KD 处有明显的特异性条带出现(图 1)。说明带有 His 标签的 PCNA 以及 mPCNA 质粒在 HeLa 细胞中高表达(图 1)。

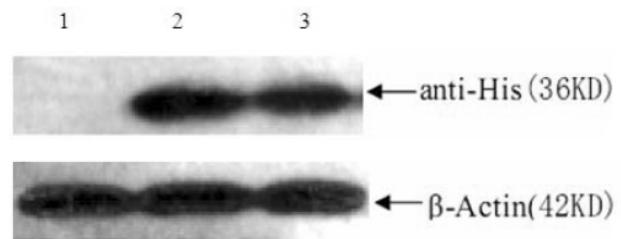


图 1 PCNA 高表达细胞系的鉴定

Fig.1 Expressed recombination plasmids analyzed by Western blot :

1.wild-type HeLa 2.His-PCNA-HeLa 3. His-mPCNA-HeLa

2.2 MTT 法检测细胞存活率

不同浓度的 BaP 损伤后,HeLa 和 PCNA-HeLa 细胞存活率从 100% 降到约 72%, mPCNA-HeLa 细胞存活率从 100% 降到 35%,并呈剂量效应关系(图 2);不同浓度 VP-16 作用后,三种细胞存活率无明显差别(图 3)。结果表明, mPCNA-HeLa 细胞系比 HeLa 细胞和 PCNA-HeLa 细胞对 BaP 损伤更敏感。

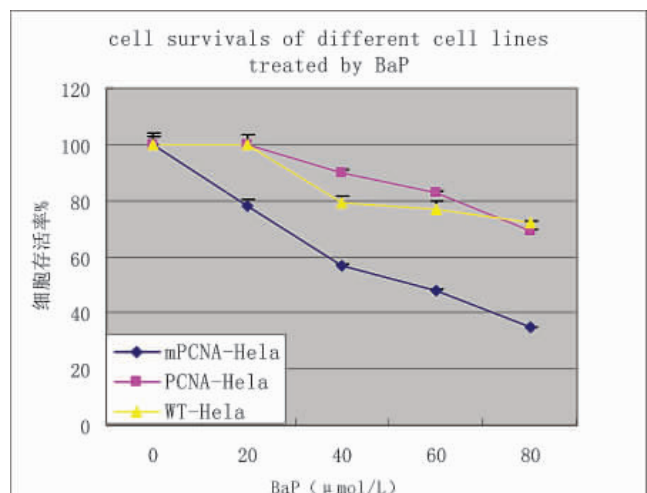


图 2 苯并芘处理后 MTT 法检测不同细胞存活率

Fig.2 Cell survivals of different cell lines treated by BaP

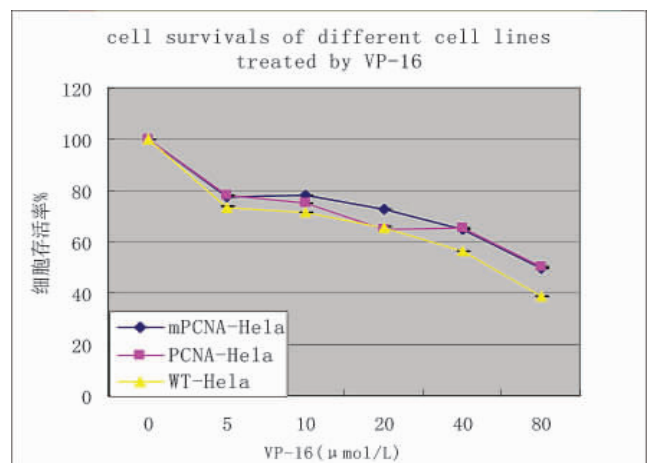


图 3 依托泊苷处理后 MTT 法检测不同细胞存活率

Fig.3 Cell survivals of different cell lines treated by VP-16

2.3 PCNA 的泛素化检测结果

分别用不同浓度的 BaP 和 VP-16 处理 HeLa 细胞后, Western blot 显色分析结果显示, BaP 处理组在 44KD 处出现一条泛素化修饰的目的条带, 而 VP-16 处理组在 44KD 处未出现此特异性条带(图 4)。结果提示 PCNA 泛素化的诱导具有损伤特异性, BaP 能特异性的引起 PCNA 的泛素化修饰。

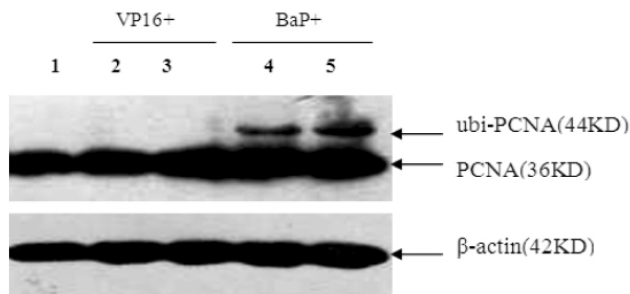


图 4 western blot 检测 PCNA 泛素化

Fig.4 Analysis of PCNA ubiquitination by western blot 1. HeLa ; 2. HeLa(VP16+ 5uM) ; 3. HeLa(VP16+ 10uM) ; 4. HeLa(BaP+ 20uM) ; 5. HeLa(BaP+ 30uM)

3 讨论

细胞在各种内外环境及化学物质不断攻击下通常会发生 DNA 损伤, 为维持遗传物质的稳定性, 则需要各种损伤应答过程对 DNA 进行损伤修复。研究表明, 在 UV 和顺铂损伤下, 可以诱导 PCNA K164 位点的泛素化修饰, 进而提高细胞对损伤的耐受^[89]。本实验发现当 DNA 发生损伤后, BaP 处理组在 44KD 处出现一条泛素化修饰目的条带, 而 VP-16 处理组在 44KD 处未出现特异性的目的条带, 说明 BaP 能够引起 PCNA 的泛素化修饰, 并且这种修饰是具有损伤特异性的。分析原因可能是因其 DNA 损伤机制不同。环境致癌物苯并芘可与鸟嘌呤共价结合成 DNA 加合物, 从而会导致核苷酸的替代、缺失和染色体的重排, 引起 DNA 突变^[10], 而化疗药物 VP-16 为细胞周期特异性抗肿瘤药物, 作用于 DNA 拓扑异构酶, 形成药物-酶-DNA 稳定的可逆性复合物, 阻碍 DNA 修复, 并最终可导致双链 DNA 的断裂, 进而破坏 DNA 结构^[11,12]。因此可以推测 DNA 解旋酶的活性和 DNA 复制酶的迁移有可能是 PCNA 泛素化的激活信号, 但是具体的调控机制还需要进一步研究和探索。

现已证实 PCNA 是 DNA 损伤应答不同效应转换的重要信号转导环节, 即 PCNA 参与 DNA 损伤后细胞应激的一系列重要事件^[13-15]。PCNA 作为关键分子, 影响 DNA 损伤应答中诸多关键事件启动、转换, 包括 DNA 修复、细胞凋亡以及细胞周期阻滞等^[16,17]。现已发现 PCNA 能与 30 余种蛋白结合, 如 P21, XPG, GADD45, CDK2, 以及多种 DNA 聚合酶等^[18]。本实验 MTT 法结果提示稳定高表达 PCNA 突变体的细胞系比野生型及高表达 PCNA 细胞系其对苯并芘损伤更敏感, 细胞存活率呈明显下降趋势。其作用机制可能与稳定高表达 PCNA 突变体有关, 初步表明 PCNA 泛素化修饰在介导苯并芘损伤应答中同样也发挥了重要的作用, 可显著提高细胞对苯并芘损伤的耐受。但是, 目前有关 PCNA 泛素化的研究在哺乳细胞中才刚刚起步, 同时现有研究仍大多集中于探讨 PCNA 泛素化在募集、转

换错配倾向 DNA 聚合酶及在启动跨损伤复制中的作用^[19,20]。鉴于 30 余种不同蛋白能竞争结合 PCNA, 可以推测 PCNA 泛素化在指导 DNA 损伤诱发的细胞应激反应各条通路作用是否仅限于启动跨损伤复制? 在其它细胞应激反应中, 如细胞周期阻滞、细胞凋亡或其它 DNA 修复过程中是否同样发挥协同或拮抗作用? 其中的分子作用机制如何? 这些问题的阐明, 将有助于拓展对 PCNA 泛素化修饰及其相关机制的认识。

参考文献(References)

- [1] Das-Bradoo S, Nguyen HD, Bielinsky AK. Damage-specific modification of PCNA[J]. Cell Cycle, 2010, 15, 9(18):3674-3679
- [2] Giovanni M, Ulrich H. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners[J]. Journal of Cell Science, 2003, 116(15): 3051-3060
- [3] Zhang WW, Qin ZS, Zhang XJ, et al. Roles of sequential ubiquitination of PCNA in DNA-damage tolerance [J]. FEBS Letters, 2011, 585: 2786-2794
- [4] Hibbert RG, Huang A, Boelens R. E3 ligase Rad18 promotes monoubiquitination rather than ubiquitin chain formation by E2 enzyme Rad6 [J]. Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A, 2011, 108(14): 5590-5595
- [5] Chen J, Bozza W, Zhuang Z. Ubiquitination of PCNA and its essential role in eukaryotic translesion synthesis [J]. Cell Biochem Biophys, 2011, 60(1-2):47-60
- [6] Huc L, Rissel M, Solhaug A, et al. Multiple apoptotic pathways induced by p53-dependent acidification in benzo (a)pyrene-exposed hepatic F258 cells[J]. J Cell Physiol, 2006, 208:527-537
- [7] Masuda Y, Piao J, Kamiya K. DNA replication-coupled PCNA monoubiquitination and polymerase switching in a human in vitro system[J]. J-Mol-Biol, 2010, 396(3): 487-500
- [8] Lehmann AR. DNA polymerases and repair synthesis in NER in human cells. [J]. DNA Repair (Amst), 2011, 10(7):730-733
- [9] Niimi A, Ogi T, Brown S, et al. Translesion synthesis Y-family polymerases and the polymerase switch[J]. DNA Repair (Amst), 2007, 6(7): 891-899
- [10] Goyal PK, Preeti V, Priyanka S, et al. Evaluation of anti-cancer and anti-oxidative potential of Syzygium Cumini against benzo[a]pyrene (BaP) induced gastric carcinogenesis in mice [J]. Asian Pac J Cancer Prev. 2010, 11(3): 753-758
- [11] Lage HH, Dietel M. Modulation of DNA topoisomerase activity and expression in melanoma cell with acquired drug resistance[J]. Br J Cancer, 2000, 82 (2):488-491
- [12] Pietrzak M, Smith SC, Gerald JT, et al. Nucleolar disruption and apoptosis are distinct neuronal responses to etoposide-induced DNA damage[J]. J-Neurochem, 2011, 117(6): 1033-1046
- [13] Koundrioukoff S, Jonsson ZO, Hasan S, et al. A Direct Interaction between Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) and Cdk2 Targets PCNA-interacting Proteins for Phosphorylation [J]. J Biol Chem. 2000, 275(30):22882-22887
- [14] Soria G, Gottifredi V. PCNA-coupled p21 degradation after DNA damage: The exception that confirms the rule [J]. DNA Repair (Amst). 2010, 9(4):358-364
- [15] Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the maestro of the replication fork[J]. Cell, 2007, 129(4):665-679

(下转第 814 页)

- Pathophysiology, 2009, 16: 157-177
- [4] 王伟, 左红艳, 王德文, 等. 不同波段电磁辐射对淋巴细胞的损伤效应[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2009, 27(2): 95-97
Wang Wei, Zuo Hong-yan, Wang De-wen, et al. Injury effects of electromagnetic wave in different band on lymphocytes [J]. Chin J Ind Hyg Occup Dis, 2009, 27(2): 95-97
- [5] 郭庆功, 马雪莲, 张弘. 瞬态电磁脉冲对淋巴细胞遗传及免疫功能的影响[J]. 重庆邮电学院学报, 2002, 14(4): 65-68
Guo Qing-gong, Ma Xue-lian, Zhang Hong. The effects of weak transient electromagnetic pulses on heredity and immunity of the lymphocytes[J]. Journal of Chongqing University of Posts and Telecommunications, 2002, 14(4): 65-68
- [6] 满其航, 张超, 杜丽, 等. 微波辐射对 T 细胞作用的研究进展[J]. 感染、炎症、修复, 2009, 10(1): 62-64
Man Qi-hang, Zhang Chao, Du Li, et al. Major recent developments of microwave radiation on T lymphocyte[J]. Infect Inflamm Rep, 2009, 10(1): 62-64
- [7] 金华, 王德文, 彭瑞云, 等. 电磁脉冲辐射后小鼠免疫器官损伤的病理研究[J]. 军事医学科学院院刊, 2004, 28(6): 337-340
Jin Hua, Wang De-wen, Peng Rui-yun, et al. Pathological study of immune organ of the mouse after electromagnetic pulse[J]. Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences, 2004, 28(6): 337-340
- [8] 孙侠, 张文辉, 牛玉杰, 等. 不同强度微波辐射对小鼠胸腺的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2004, 22(2): 108-111
Sun Xia, Zhang Wen-hui, Niu Yu-jie, et al. Effects of microwave radiation on thymocytes in mice at different power densities [J]. Chin J Ind Hyg Occup Dis, 2004, 22(2): 108-111
- [9] Thrall DE, Prescott DM, Samulski TV, et al. Serious toxicity associated with annular microwave array induction of whole-body hyperthermia in normal dogs[J]. Int J Hyperthermia, 1992, 8: 23-32
- [10] 朱世忠. 极低频电磁场对 BALB/c 小鼠免疫功能影响的实验研究[J]. 中国辐射卫生, 2010, 19(2): 145-146
Zhu Shi-zhong. Experiment research of effects of extremely low frequency electromagnetic fields on immune function of BALB/c mice [J]. Chin J Radiol Health, 2010, 19(2): 145-146
- [11] 孟旭英, 高春记, 张怡堃, 等. 电磁辐射对小鼠免疫功能的抑制作用[J]. 军医进修学院学报, 2009, 30(2): 215-217
Meng Xu-ying, Gao Chun-ji, Zhang, et al. Inhibitory effect of electromagnetic radiation on immune function of mice [J]. Acad J Chinese PLA Postgrad Med Sch, 2009, 30(2): 215-217
- [12] Antonopoulos A, Yang B, Stamm A, et al. Cytological effects of 50Hz electromagnetic fields on human lymphocytes in vitro[J]. Mutat Res, 1995, 346(3): 151-157
- [13] 陈慰峰, 金伯泉等. 医学免疫学[M]. 第 4 版. 人民卫生出版社, 2005
Chen Wei-feng, Jin Bo-quan. Medical Immunology [M]. People's Medical Publishing House, 2005
- [14] Boscolo P[J]. Sci Total Environ, 2001, 270: 13-20
- [15] 金华, 王德文, 唐晓敏, 等. 高场强电磁脉冲对 Jurkat 细胞 IFN- γ , IL-4 蛋白表达的定量分析 [J]. 中国体视学与图像分析, 2007, 12(3): 172-175
Jin Hua, Wang De-wen, Tang Xiao-min, et al. The influence of IFN- γ and IL-4 expression in the Jurkat cell by high power electromagnetic pulse[J]. Chin J Stereology and Image Analysis, 2007, 12(3): 172-175
-
- (上接第 817 页)
- [16] Pfander B, Moldovan GL, Sacher M, et al. SUMO modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase [J]. Nature, 2005, 436: 428-433
- [17] Edmunds CE, Simpson LJ, Sale JE. PCNA ubiquitination and REV1 define temporally distinct mechanisms for controlling translesion synthesis in the avian cell line DT40[J]. Mol-Cell, 2008, 30(4): 519-529
- [18] Hoegge C, Pfander B, Moldovan GL, et al. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO[J]. Nature, 2002, 419: 135-141
- [19] Gohler T, Munoz IM, Rouse J, et al. PTIP/Swift is required for efficient PCNA ubiquitination in response to DNA damage[J]. DNA-Repair-(Amst), 2008, 7(5): 775-787
- [20] Freudenthal BD, Gakhov L, Ramaswamy S, et al. Structure of mono-ubiquitinated PCNA and implications for translesion synthesis and DNA polymerase exchange[J]. Nat-Struct-Mol-Biol, 2010, 17(4): 479-484