

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00909

• 短篇论著 •

Wip1 联合 Bmi1 参与人椎间盘髓核细胞放射性损伤 DNA 修复

俞蕾¹, 何奖图², 王勤婉², 于永春², 潘秋辉², 李晶华^{2*}

1. 同济大学附属第十人民医院检验科, 上海 200072

2. 同济大学附属第十人民医院中心实验室, 上海 200072

[摘要] **目的** 探讨野生型 p53 诱导的蛋白磷酸酶 1(Wip1)在人椎间盘髓核细胞放射性损伤 DNA 修复中的可能作用,为椎间盘退行性变的临床诊治提供参考。**方法** 取人椎间盘髓核细胞体外培养,小干扰(siRNA)技术干扰细胞 Wip1 表达,放射性照射(4、10、15、25 Gy)髓核细胞,采用彗尾实验观察 DNA 损伤及损伤修复反应(DNA damage repair, DDR)情况,并与未干扰 Wip1 髓核细胞作对照;采用免疫共沉淀(Co-IP)技术检测 Wip1 潜在结合蛋白;根据筛选结果采用实时定量 RT-PCR 技术检测病变椎间盘组织 Wip1 及潜在结合蛋白的表达情况。**结果** 彗尾实验表明:干扰 Wip1 表达后,25 Gy 剂量射线导致髓核细胞 DNA 损伤的修复并不受影响,但 DDR 持续激活,对照组在照射后 24 h 已经检测不到 DNA 损伤修复的标识分子,但 siRNA 干扰 Wip1 表达组细胞照射后 48 h 仍可检测到标识分子。Co-IP 实验表明:放射性照射正常对照细胞后,Wip1 与 Bmi1 在细胞核内分布重合,而且聚集在 DNA 损伤位点,而 siRNA 抑制 Wip1 表达后,这种结合随即消失。实时定量 RT-PCR 结果表明:与正常椎间盘组织相比,椎间盘退变组织 Wip1、Bmi1 基因表达下降,且两者呈正相关($P < 0.05$)。**结论** Wip1 通过调控 DDR 时限参与了人椎间盘髓核细胞放射性损伤 DNA 修复,Bmi1 可能参与此过程。

[关键词] 椎间盘退行性疾病;辐射损伤;DNA 修复;Wip1;Bmi1

[中图分类号] R 681.533 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)08-0909-05

Wild-type p53-induced phosphatase 1 combined with Bmi1 in repairing ion radiation-induced DNA damage in nucleus pulposus cells

YU Lei¹, HE Jiang-tu², WANG Qin-wan², YU Yong-chun², PAN Qiu-hui², LI Jing-hua^{2*}

1. Department of Clinical Laboratory, The Tenth Peoples' Hospital of Shanghai, Tongji University, Shanghai 200072, China

2. Central Laboratory, The Tenth Peoples' Hospital of Shanghai, Tongji University, Shanghai 200072, China

[Abstract] **Objective** To investigate the possible role of wild-type p53-induced phosphatase 1 (Wip1) in repairing radiation-induced DNA damage in nucleus pulposus (NP) cells, so as to provide reference for treatment of intervertebral disc degeneration. **Methods** Human NP cells were cultured *in vitro* and the expression of Wip1 was knocked down by small interfering (siRNA) technology; the NP cells were exposed to radiation (4, 10, 15 and 25 Gy). DNA damage and repair were observed by comet assay, and the results were compared with NP cells not treated by siRNA. Co-immunoprecipitation (Co-IP) was used to detect the potential binding protein of Wip1, and based on the screening results, qRT-PCR was used to examine Wip1 expression and expression of potential binding protein. **Results** Comet assay showed that the repair of DNA damage in Wip1 knockdown NP cells was not affected when exposed to 25 Gy radiation, but DNA damage repair was persistently reactivated. The marker molecules of DNA damage repair were not detectable 24 h after radiation in the control group, but they could be detected 48 h after radiation in Wip1 knockdown group. Co-IP results showed that the distribution of Wip1 and Bmi1 coincided in the nuclei of normal cells exposed to radiation, aggregating at the DNA damage site, and the coincidence disappeared after knockdown of Wip1. qRT-PCR results showed that, compared with the normal intervertebral tissues, degenerated intervertebral tissues had significantly decreased Wip1 and Bmi1 expression, and the expression of Wip1 was positively correlated with Bmi1 expression ($P < 0.05$). **Conclusion** Wip1 plays an important role in the DNA damage repair of NP cells by regulating DNA damage repair phase, and Bmi1 may also participate in this process.

[收稿日期] 2013-01-05

[接受日期] 2013-06-04

[基金项目] 国家自然科学基金(81171778,31171086). Supported by National Natural Science Foundation of China (81171778, 31171086).

[作者简介] 俞蕾,主管检验师. E-mail: healthwww@sina.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-66313245, E-mail: jinghuali96@163.com

[Key words] intervertebral disc degeneration; radiation injuries; DNA repair; Wip1; Bmi1

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(8): 909-913]

椎间盘退行性疾病是成年人腰痛和伤残的主要原因,是当前主要健康问题之一。髓核(nucleus pulposus, NP)细胞的衰老是椎间盘退行性变的根源,各种因素引发的DNA损伤可能在其中发挥重要作用^[1-2]。野生型p53诱导的蛋白磷酸酶1(wild-type p53-induced phosphatase 1, Wip1)是一种原癌基因,参与调控DNA的损伤修复,与肿瘤细胞的放射抵抗及抗衰老密切相关^[3]。我们的前期研究发现, Wip1参与了人NP细胞放射性损伤DNA修复,与椎间盘退行性变可能有关^[4],但具体机制尚不明确。因此,本研究进一步以人NP细胞放射性损伤为模型,观察小干扰(siRNA)技术干扰Wip1表达对DNA损伤修复的影响,探讨可能的作用机制,为后续研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 实验所需TRIzol试剂、DNA染料购自上海赛百盛基因技术有限公司。一抗:BRG1、p53、HDAC1、ATM、SNF2H、 γ H2AX购自Abcam公司;p-p53、p21、p-Chk2(Thr68)、pATM购自Cell Signaling Technology公司;Bmi1、P300、 β -actin、BAF155、Wip1购自Santa Cruz公司。二抗:偶联绿色荧光的抗鼠IgG、偶联绿色荧光的抗兔IgG购自Cell Signaling Technology公司;羊抗兔IgG(IRDye 800CW)、羊抗鼠IgG(IRDye 800CW)购自LI-COR公司。酶标仪和real-time PCR仪(ABI 7500)购自Bio-Rad公司;CO₂培养箱(HERAcell 150i)购自Heraeus公司。Wip1 siRNA购自Sigma-Aldrich公司。NP细胞为原代培养。病变椎间盘组织取自40例椎间盘退行性疾病患者,平均发病年龄(35±2)岁,25例正常椎间盘组织取自外伤患者,平均年龄(33±3)岁,上述取材均来自广东药学院第一附属医院骨科。

1.2 人椎间盘NP细胞的原代培养及处理 用外科刀片切碎人正常椎间盘组织,置入DMEM-F12培养液中于37℃、5% CO₂培养箱中孵育。然后用含0.2%链霉蛋白酶和0.025%胶原酶的培养液进行消化。细胞悬液300×g离心5 min,然后用培养液重悬细胞。将细胞接种至底面积为100 mm²的培养

瓶,放入37℃、5% CO₂培养箱中孵育。P3 NP细胞用4种不同的照射剂量(4、10、15、25 Gy)处理8 h,以造成NP细胞的DNA损伤。采用Lipofectamine 2000(Invitrogen公司)对NP细胞进行Wip1 siRNA的瞬时转染,终浓度为50 nmol/L,转染步骤和程序参照试剂盒说明书进行。以未干扰Wip1 NP细胞作对照。

1.3 细胞凋亡检测 为了后续研究选择合适的照射剂量,进行了细胞凋亡检测。细胞按照 $2.5 \times 10^4/cm^2$ 的密度接种于6孔板上,处理后,0.25%胰酶消化细胞,用PBS重悬细胞置于10 mL的离心管中,300×g室温离心5 min,弃上清,回流约50 μ L残余PBS,轻弹离心管使细胞重悬,加入5 μ L Annexin V轻弹管混匀,室温(25℃)避光孵育20 min,加入300 μ L 1×结合缓冲液和10 μ L PI染液,上机检测。

1.4 彗尾实验 采用彗尾实验了解DNA损伤修复情况。细胞照射损伤处理后,制备细胞悬液,取30 μ L细胞悬液在200 μ L 0.6%的低熔点琼脂糖凝胶中充分混匀,将混合液轻轻滴加于铺有1%普通琼脂糖的载玻片上,待胶凝固后,4℃解旋液中放置20 min,然后1 V/cm的电场强度电泳20 min,预冷的去离子水清洗载玻片35次,再用预冷的70%乙醇4℃固定5 min,风干后,加入SYBR Green I染料,室温放置10 min。最后,去离子水将载玻片清洗干净后,在荧光显微镜下拍照。

1.5 细胞免疫荧光检测 4%多聚甲醛室温固定玻片,PBS充分清洗玻片,0.5% Triton-X室温穿膜打孔15 min,再用1% BSA室温封闭1 h,一抗室温孵育90 min,PBS充分清洗后,二抗室温孵育60 min,PBS充分清洗后,5 μ g/mL DAPI室温染色2 min后,抗荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜下拍照。

1.6 免疫共沉淀及蛋白质印迹检测 采用免疫共沉淀(Co-IP)技术筛选Wip1结合蛋白。加入1% NP40[含苯甲基磺酰氟(PMSF)、蛋白酶抑制剂混合物、磷酸酶抑制剂复合物]冰上裂解40 min,将细胞转至预冷EP管内,4℃ 300×g离心5 min,取部分上清(1/20)作为总对照蛋白,剩余蛋白内加入2 μ g相应的抗体或相应的IgG抗体,4℃摇床过夜孵育抗体,第2天各EP管内加入25 μ L Protein G磁珠,并

增设无抗体 IP 对照组,4℃摇床孵育 4 h,含蛋白酶抑制剂的 1% NP40 裂解液充分清洗磁珠,最后使用 15 μ L 2 \times SDS 上样缓冲液重悬磁珠,并于沸水锅内煮沸变性 5 min,取上清进行后期蛋白质印迹实验,检测 Chk2-p53-p21 信号通路蛋白的表达。

1.7 实时定量 RT-PCR 检测 液氮研磨及 TRIzol 法提取正常及退变椎间盘组织 RNA,Superscript III 进行反转录,42℃反应 30 min,反转录引物采用 Oligo (dT)与随机 6 碱基引物。*Wip1* 引物序列:上游 5'-TAC CTG AAC CTG ACT GAC AG-3',下游 5'-CCT TAG AAT TCA CCC TTG GC-3';*Bmi1* 引物序列:上游 5'-TGA TGT CAT GTA TGA GGA GG-3',下游 5'-CAA TGG AAG TGG ACC ATT CC-3'。PCR 反应体系:2 \times PCR 预混合液 10 μ L,引物 0.8 μ L, cDNA 1 μ L, H₂O 补平体积至 20 μ L;反应条件:95℃ 10 min, 95℃ 15 s, 60℃ 60 s, 读板,共 40 个循环;熔解曲线分析:温度 55~95℃,每升高 0.4℃读 1 次。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 干扰 *Wip1* 的表达能够延长损伤修复反应 (DDR) 时限 在原代培养 P3 代的 NP 细胞中,采用 4、10、15、25 Gy 剂量照射,发现均有部分细胞产生凋亡,凋亡率分别为 (11.0 \pm 0.9)%、(14.4 \pm 0.6)%、(15.9 \pm 0.6)% 和 (20.5 \pm 0.8)%。为了增强 DNA 损伤程度,后续实验采用 25 Gy 的较强剂量进行处理,此剂量下仍有近 70% 的细胞没有发生凋亡,因此不会因为过度的细胞凋亡影响 DNA 损伤修复的研究。siRNA 干扰 *Wip1* 的表达水平,并用 25 Gy 处理细胞,彗尾实验表明 DNA 损伤修复并不受影响(图 1A),但 DDR 持续激活(图 1B),对照组在 24 h 后已经检测不到 γ H2AX 与 pATM 在 DNA 断点的聚集,但 siRNA 干扰 *Wip1* 的表达后 48 h 还可以检测到 γ H2AX 与 pATM 在 DNA 断点的结合。结果说明抑制 *Wip1* 的表达会影响 DDR 的终止。

2.2 *Wip1* 结合 *Bmi1* 蛋白参与 DNA 损伤修复 对 8 种染色质结构调控相关蛋白进行 Co-IP 检测,结果发现:*Wip1* 结合 *Bmi1* 蛋白;放射性损伤

NP 细胞后期,*Wip1* 与 *Bmi1* 在细胞核内的分布重合,而且是聚集在 DNA 损伤位点,因为 *Bmi1* 的荧光信号聚集成点状,而且与损伤位点的标识信号 γ H2AX 重合,说明 *Bmi1* 参与 DNA 损伤修复。而抑制 *Wip1* 的表达,这种结合随即消失。见图 2。

2.3 NP 细胞在 siRNA 干扰 *Wip1* 后能够持续激活 Chk2-p53-p21 途径 一般认为,DNA 损伤可以通过激活 ATM 提高 Chk2 的磷酸化水平,而磷酸化的 Chk2 可以直接诱导 p53 磷酸化,导致 p53 被激活,并进一步上调 p21 的表达。结果如图 3 所示,25 Gy 放射性损伤处理 P4 NP 细胞后,*Wip1* 干扰细胞在 24 h 和 48 h 时间点,pChk2、p-p53 及 p21 表达仍处于高水平,而对照组已经下调,表明干扰 NP 细胞 *Wip1* 表达后,DNA 损伤修复不能及时终止,Chk2-p53-p21 持续激活,这可能是导致 NP 细胞衰老的直接原因。

2.4 *Wip1*、*Bmi1* 在病变椎间盘组织中异常低表达 以正常椎间盘组织为对照,40 例椎间盘退变患者的病变椎间盘组织中 12 例的 *Wip1* 表达水平下降,10 例 *Bmi1* 表达水平也下调,且两者表达呈正相关($P<0.05$)。见表 1。

3 讨论

DNA 损伤修复过度是造成体内外细胞衰老的重要原因。当各种因素导致 DNA 双链断裂(double-strand breaks, DSB)时,会引发 DNA 损伤修复信号的级联反应:DSB 可以招募并激活激酶 ATM,激活的 ATM 可以磷酸化 DSB 局部组蛋白 H2AX, γ H2AX(磷酸化形式)可以招募更多的 DDR 蛋白,如 ATM、ATR、Chk1、Chk2,并导致其磷酸化,激活 p53,导致细胞周期的 G₁ 阻滞发生^[5]。*Wip1* 是磷酸酶,其作用是对 DNA 损伤修复进行终止,一旦修复完成,*Wip1* 会去磷酸化抑制 ATM、ATR、Chk1、Chk2、p53、 γ H2AX 的活性,及时终止 DDR^[6-13]。

DNA 修复完毕,理论上 *Wip1* 能够解除 DDR 反应复合体,但不能保证 DDR 反应复合体不会重新聚集,因此很可能需要染色质结构的压缩、组蛋白的特征标识化(如甲基化修饰),以防止 DDR 重新启动,即 DNA 损伤的“包扎处理”。多梳家族(PcG)蛋白与干细胞命运的决定、X 染色体失活、细胞分化和细胞癌变密切相关^[14]。PcG 蛋白复合体是染色质结构

调控蛋白,能够通过组蛋白的甲基化修饰对染色质进行压缩,抑制各种蛋白分子(包括转录、复制装置)

与染色质的结合^[15-17]。Bmi1 属 PcG 蛋白重要成员之一。

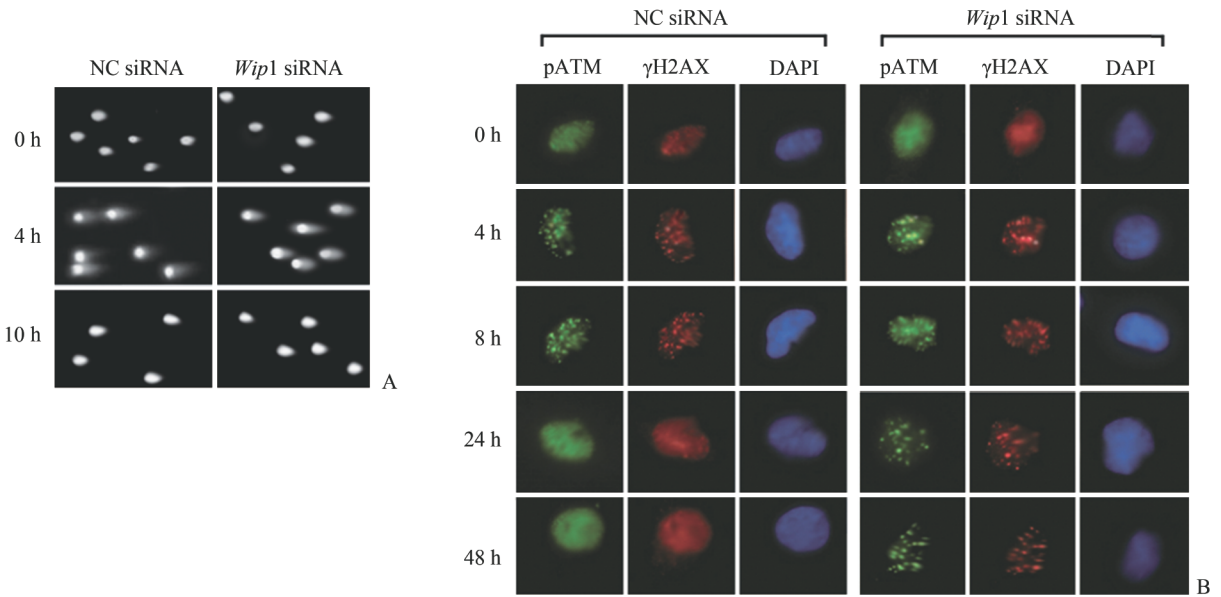


图 1 抑制 Wip1 表达对 DNA 修复的影响

A: 彗尾实验检测 DNA 损伤修复情况(25 Gy); B: 25 Gy 处理后不同时间点,免疫荧光共聚焦显微镜检测损伤修复反应标识分子在 DNA 双链断裂后细胞中的分布. Original magnification: ×63(油镜)

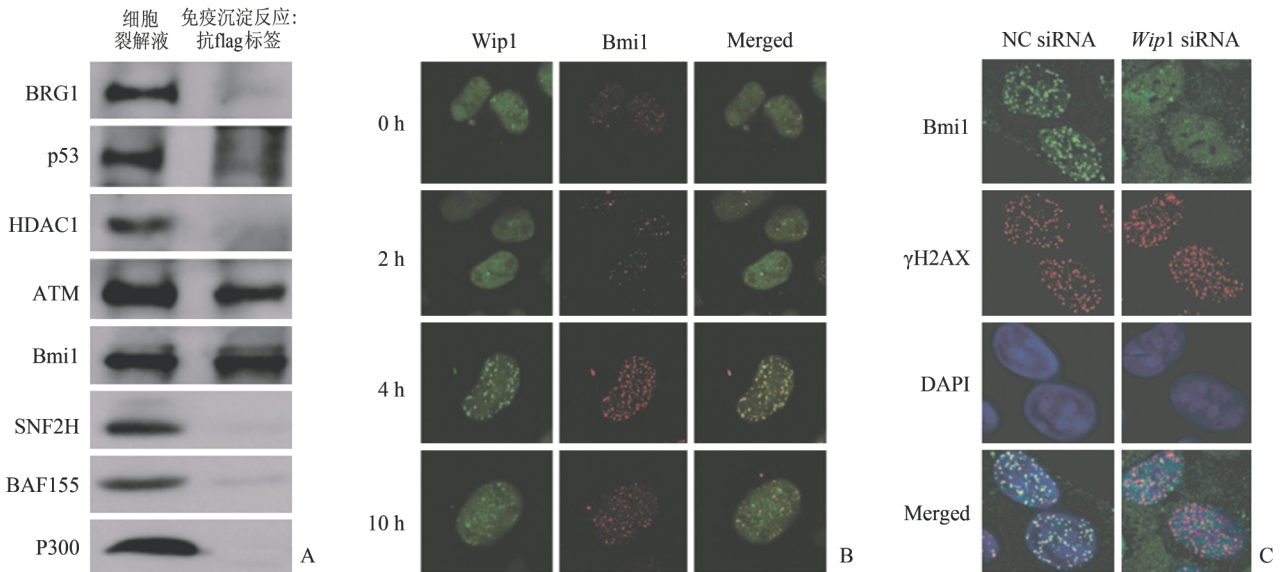


图 2 Wip1 结合并招募 Bmi1 蛋白至 DNA 损伤位点

A: 在 P4 髓核细胞中过表达 Wip1-Flag, Co-IP 检测 Wip1 的潜在结合蛋白; B: P3 髓核细胞用 25 Gy 处理后不同时间点,免疫荧光共聚焦显微镜检测 Bmi1 与 Wip1 的核内分布; C: P3 髓核细胞用 siRNA 干扰 Wip1 的表达, 25 Gy 处理后 4 h, 免疫荧光共聚焦显微镜检测 Bmi1 与 γH2AX 的核内分布. Original magnification: ×63(油镜)

本研究对 NP 细胞放射性损伤进行分析,发现 Wip1 通过调控 DDR 时限参与了人椎间盘 NP 细胞放射性损伤 DNA 修复, Wip1 结合并招募 Bmi1 至 DNA 损伤位点参与 DNA 损伤修复,这一过程可能与 p53 有关,也可能通过其他途径发挥作用,仍有待

进一步研究。本研究还发现部分椎间盘退变组织存在 Wip1、Bmi1 低表达,且两者呈正相关,提示 Wip1、Bmi1 低表达可能与椎间盘退行性变有关,但具体作用程度及作用机制尚不明确,需要进一步的深入研究。

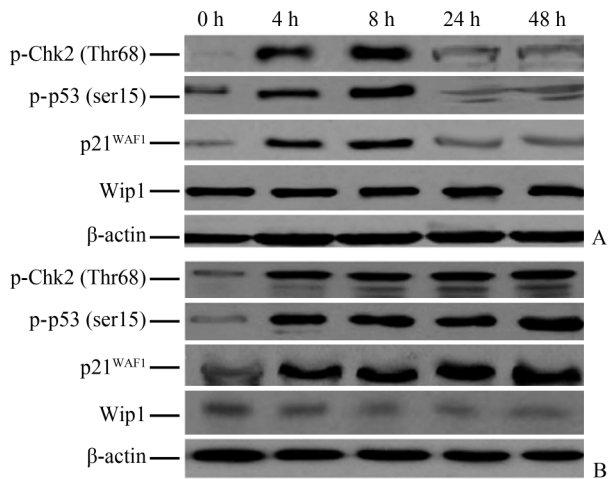


图3 siRNA 干扰 *Wip1* 表达导致
Chk2-p53-p21 途径的持续激活
A: NC siRNA; B: *Wip1* siRNA

表1 *Wip1*、*Bmi1* 在椎间盘退变中的表达变化

<i>Wip1</i>	<i>Bmi1</i>			<i>n</i>
	升高	无变化	下调	
升高	1	2	1	
无变化	1	22	1	
下调	1	3	8	

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

(志谢 感谢广东药学院第一附属医院骨外科董群伟主任为本课题提供所需的组织标本!)

[参考文献]

- [1] Gopal D, Ho A L, Shah A, Chi J H. Molecular basis of intervertebral disc degeneration[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 760: 114-133.
- [2] Nasto L A, Wang D, Robinson A R, Clauson C L, Ngo K, Dong Q, et al. Genotoxic stress accelerates age-associated degenerative changes in intervertebral discs[J]. *Mech Ageing Dev*, 2013, 134: 35-42.
- [3] Moon S H, Lin L, Zhang X, Nguyen T A, Darlington Y, Waldman A S, et al. Wild-type p53-induced phosphatase 1 dephosphorylates histone variant gamma-H2AX and suppresses DNA double strand break repair[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 12935-12947.
- [4] 俞 蕾, 马 纪, 王勤婉, 于永春, 潘秋辉, 李晶华. 基因 *Wip1* 低表达与椎间盘退行性变的关系[J]. *同济大学学报: 医学版*, 2013, 34: 6-10.
- [5] Liang C, Guo E, Lu S, Wang S, Kang C, Chang L, et al. Over-expression of wild-type P53-induced phosphatase 1

confers poor prognosis of patients with gliomas[J]. *Brain Res*, 2012, 1444: 65-75.

- [6] Lewis G. Nucleus pulposus replacement and regeneration/repair technologies: present status and future prospects[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2012, 100: 1702-1720.
- [7] d'Adda di Fagagna F. Living on a break; cellular senescence as a DNA-damage response[J]. *Nature Review Cancer*, 2008, 8: 513.
- [8] Boboila C, Alt F W, Schwer B. Classical and alternative end-joining pathways for repair of lymphocyte-specific and general DNA double-strand breaks[J]. *Adv Immunol*, 2012, 116: 1-49.
- [9] Vo N, Seo H Y, Robinson A, Sowa G, Bentley D, Taylor L, et al. Accelerated aging of intervertebral discs in a mouse model of progeria[J]. *J orthop Res*, 2010, 28: 1600-1607.
- [10] Thompson L H. Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography [J]. *Mutat Res*, 2012, 751: 158-246.
- [11] Lu X, Nguyen T A, Moon S H, Darlington Y, Sommer M, Donehower L A. The type 2C phosphatase *Wip1*: an oncogenic regulator of tumor suppressor and DNA damage response pathways[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2008, 27: 123-135.
- [12] Le Guezennec X, Bulavin D V. WIP1 phosphatase at the crossroads of cancer and aging[J]. *Trends Biochem Sci*, 2010, 35: 109-114.
- [13] Salminen A, Kaarniranta K. Control of p53 and NF- κ B signaling by WIP1 and MIF: role in cellular senescence and organismal aging[J]. *Cell Signal*, 2011, 23: 747-752.
- [14] Terranova R, Yokobayashi S, Stadler M B, Otte A P, van Lohuizen M, Orkin S H, et al. Polycomb group proteins *Ezh2* and *Rnf2* direct genomic contraction and imprinted repression in early mouse embryos [J]. *Dev Cell*, 2008, 15: 668-679.
- [15] Macurek L, Benada J, Müllers E, Halim V A, Krejčíková K, Burdová K, et al. Downregulation of *Wip1* phosphatase modulates the cellular threshold of DNA damage signaling in mitosis[J]. *Cell Cycle*, 2013, 12: 251-262.
- [16] Smith L J, Fazzalari N L. The elastic fibre network of the human lumbar annulus fibrosus: architecture, mechanical function and potential role in the progression of intervertebral disc degeneration [J]. *Eur Spine J*, 2009, 18: 439-448.
- [17] Wang Y T, Wu X T, Wang F. Regeneration potential and mechanism of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for treating intervertebral disc degeneration[J]. *J Orthop Sci*, 2010, 15: 707-719.