

肝癌及不同发育阶段小鼠肝组织中 DNA-PKcs 的表达及其对细胞增殖作用的研究

黄越承¹,周平坤³,蔡建明¹,徐勤枝³,李百龙¹,高 福¹,钟玉芳²,安 静^{2*}

1. 第二军医大学海军医学系放射医学教研室,上海 200433
2. 上海大学环境污染与健康研究所,上海 200444
3. 军事医学科学院放射毒理学研究室,北京 100850

[摘要] **目的:**研究 DNA 依赖蛋白激酶催化亚基(DNA dependent protein kinase catalytic subunit,DNA-PKcs)在小鼠不同发育阶段肝脏组织和肿瘤组织中的表达,明确其促细胞增殖和在肿瘤发生发展中的作用及机制。**方法:**采用免疫组织化学方法和蛋白印迹检测小鼠不同发育阶段肝脏组织和肿瘤组织中 DNA-PKcs 的蛋白表达。通过干扰 RNA 技术沉默肝肿瘤 HepG2 细胞中 DNA-PKcs 的表达,通过细胞增殖实验和裸鼠致瘤实验观察肿瘤细胞增殖和致瘤能力的变化。蛋白印迹法检测细胞增殖相关信号通路蛋白 p-GSK3 β 和 c-myc 的表达水平。**结果:**在发育过程中,随着细胞增殖能力降低,肝组织中 DNA-PKcs 表达水平下降,在成年鼠肝组织中 DNA-PKcs 只有微弱表达。而在肿瘤组织细胞中 DNA-PKcs 表达显著增高($P<0.01$)。细胞生长曲线结果显示,DNA-PKcs 表达抑制后,HepG2 细胞增殖能力受到明显抑制($P<0.01$),致瘤能力也显著降低。信号通路蛋白分析发现 DNA-PKcs 抑制导致 GSK3 β 磷酸化水平和 c-myc 蛋白水平降低($P<0.01$)。**结论:**DNA-PKcs 表达水平与肝脏细胞的增殖能力密切相关。DNA-PKcs 的高表达可能通过调节细胞的增殖,参与肝脏肿瘤的发生和发展过程,作用机制和 Wnt/GSK/c-myc 信号通路相关。

[关键词] DNA-PKcs;肝肿瘤;肝;生长和发育;细胞增殖;GSK3 β ; c-myc

[中图分类号] R 730.231 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)11-1217-04

DNA-PKcs expression in hepatoma and normal mouse liver tissues of various developmental stages and its influence on cell proliferation

HUANG Yue-cheng¹,ZHOU Ping-kun³,CAI Jian-ming¹,XU Qin-zhi³,LI Bai-long¹,GAO Fu¹,ZHONG Yu-fang²,AN Jing^{2*}

1. Department of Radiation Medicine,Faculty of Navy Medicine,Second Military Medical University,Shanghai 200433,China
2. Environmental Pollution and Health Institute,Shanghai University,Shanghai 200444
3. Department of Radiation Toxicology,Academy of Military Medical Sciences,Beijing 100850

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the expression of DNA dependent protein kinase catalytic subunit(DNA-PKcs) in the hepatoma tissues and mouse liver tissues of different developmental stages,so as to understand the role of DNA-PKcs in cell proliferation and tumorigenesis. **Methods:** Immunohistochemistry and Western blotting assay were used to observe the protein expression of DNA-PKcs in liver tissues and hepatoma tissues. The siRNA technique was used to silence the expression of DNA-PKcs in the HepG2 cells; cell proliferation assay and tumor transplantation test in nude mice were performed to evaluate the changes of the proliferation ability and tumorigenesis. Western blotting assay was also conducted to examine the expression of proliferation related proteins p-GSK3 β and c-myc. **Results:** DNA-PKcs expression decreased in the liver tissues with the decrease of cell proliferation ability during the development of mice,and the expression level of DNA-PKcs was weak in liver tissues of adult mouse; but the DNA-PKcs protein level in the hepatoma tissues was significantly elevated ($P<0.01$). Cell growth curve showed that the proliferation of HepG2 cells was significantly decreased after suppression of DNA-PKcs with siRNA($P<0.01$),accompanied by a suppressed tumorigenesis ability. The expression of signal pathway related protein p-GSK3 β and c-myc was inhibited after DNA-PKcs silencing in HepG2 cells($P<0.01$). **Conclusion:** DNA-PKcs expression level is closely related to

[收稿日期] 2009-05-11

[接受日期] 2009-09-14

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(“973”计划,2008CB418205);上海市重点学科资助项目(S30109). Supported by National Basic Research Program of China (“973” Program,2008CB418205) and Shanghai Leading Academic Discipline Project(S30109).

[作者简介] 黄越承,博士,讲师.E-mail:huangyuecheng369@sina.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-66137736,E-mail:peace74839@shu.edu.cn

the proliferation ability of liver cells. Overexpression of DNA-PKcs may participate in the development and progression of hepatoma through mediating cell proliferation *via* the Wnt/GSK/c-myc related signal pathway.

[KEY WORDS] DNA-PKcs; liver neoplasms; liver; growth and development; cell proliferation; GSK3 β ; c-myc

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(11): 1217-1220]

DNA-PKcs (DNA dependent protein kinase catalytic subunit) 属磷脂酰肌醇-3 激酶相关蛋白激酶(PIKK)家族的成员,具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性,在DNA双链断裂(DSB)非同源末端重组修复(NHEJ)、V(D)J重组、端粒维护和G₂周期检测点反应中发挥重要的作用^[1-3]。目前关于DNA-PKcs在肿瘤发生、发展过程中确切的作用机制还未被阐明。研究报道,在肿瘤组织细胞中DNA-PKcs常存在高表达状态^[4-5],而且DNA-PKcs的表达水平与肿瘤的恶性程度和治疗预后密切相关。Um等^[6]发现在转移性肿瘤细胞中DNA-PKcs的活性和蛋白表达高于肿瘤母细胞,推测DNA-PKcs可能与肿瘤转移有关。Ortiz等^[7]发现DNA-PKcs高表达的膀胱癌细胞对X线有明显的辐射抗性,采用DNA-PKcs抑制剂wortmannin处理后,其辐射敏感性显著提高。DNA-PKcs的表达下调还有助于提高人宫颈癌细胞对顺铂治疗的敏感性^[8]。考虑到过度增殖和异常分化是恶性肿瘤组织的主要特征,本研究通过观察DNA-PKcs在具有不同增殖和分化状态下的胚胎肝组织和肝癌组织中的表达情况,探讨DNA-PKcs在细胞增殖和肿瘤发生发展中的意义,并且通过细胞增殖作用通路相关因子的表达分析,探讨DNA-PKcs促增殖作用的机制。

1 材料和方法

1.1 细胞培养 人肝癌细胞HepG2和通过干扰RNA技术沉默DNA-PKcs表达的HepG2-H1(稳定转染DNA-PKcs 11637~11655位点siRNA)及转染对照质粒的HepG2-NC细胞(由军事医学科学院放射毒理学研究室建立),用含10%胎牛血清的DMEM培养液(Gibco公司),于5%CO₂孵箱37℃、饱和湿度条件下培养。

1.2 动物、试剂与材料 BALB/c小鼠,雄性,4~6周龄,购自北京实验动物研究中心,同系裸鼠购自上海动物中心。细胞总蛋白裂解液购自Pierce公司,0.45 μ m NC膜购自Pharmacia公司;p-GSK3 β 抗体购自CST公司;DNA-PKcs抗体(H-163)、c-myc抗体(9E10)、 β -actin抗体(I-19)和ECL显色检测试剂盒购自Santa Cruz公司;辣根过氧化物酶标记的二抗购自北京中山公司;其他试剂均为分析纯产品。DNA-PKcs鼠源性SABC(strept avidinbiotin complex method)免

疫组化试剂盒购于武汉博士德生物技术公司。

1.3 免疫组化染色 不同时期小鼠胚胎、幼鼠和成鼠肝组织通过石蜡包埋法制作组织切片。切片经常规脱蜡,室温孵育,消除内源性过氧化物酶活性,蒸馏水冲洗,PBS浸泡,抗原修复后,滴加1:100抗DNA-PKcs抗体,4℃过夜,次日滴加1:100生物素标记的山羊抗小鼠IgG及1:100 HIGH2 SABC, DAB显色,苏木精复染。以不加一抗的组织切片作阴性对照,以已知阳性反应片作阳性对照。胞质中出现明显棕黄色颗粒为DNA-PKcs蛋白阳性。

1.4 蛋白质印迹法检测蛋白表达 分别抽提不同发育阶段小鼠肝组织及HepG2培养细胞总蛋白,经考马斯亮蓝法定量,取40 μ g总蛋白上样,经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后将蛋白转移到NC膜上,15%脱脂奶粉室温封闭1~2 h,与一抗室温作用1~2 h,辣根过氧化物酶标记的二抗室温作用1 h后显影。分别检测DNA-PKcs、p-GSK3 β 和c-myc的蛋白表达水平,并以 β -actin为内参。

1.5 细胞生长曲线测定 HepG2细胞、HepG2-H1细胞及HepG2-NC细胞以每孔 1×10^4 接种于24孔板中,于CO₂培养箱中常规培养,待细胞贴壁后次日起,每天取3个孔,消化后用锥虫蓝染色,细胞计数求均值,连续5 d,以每孔每剂量活细胞均值绘制生长曲线,重复实验3次。

1.6 裸鼠致瘤实验 分别收集HepG2细胞、HepG2-H1细胞及HepG2-NC细胞(1×10^7 /样品),接种到裸鼠颈背部皮下,常规饲养4周,观察成瘤率和裸鼠肿瘤生长情况。

1.7 统计学处理 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.5软件包,以单因素方差分析处理实验数据, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DNA-PKcs在不同发育阶段小鼠肝组织和肿瘤细胞中的表达 随着发育过程中细胞增殖能力的下降和分化水平的升高,DNA-PKcs蛋白在组织中的表达水平不断下降。在1个月龄以后的幼鼠和成鼠肝组织中,DNA-PKcs的表达水平非常微弱(图1)。蛋白印迹法检测结果显示,与成鼠肝组织相比,增殖能力强的早期胚胎肝组织和肝癌组织细胞中的DNA-PKcs表达水平显著增高($P < 0.01$,图2)。

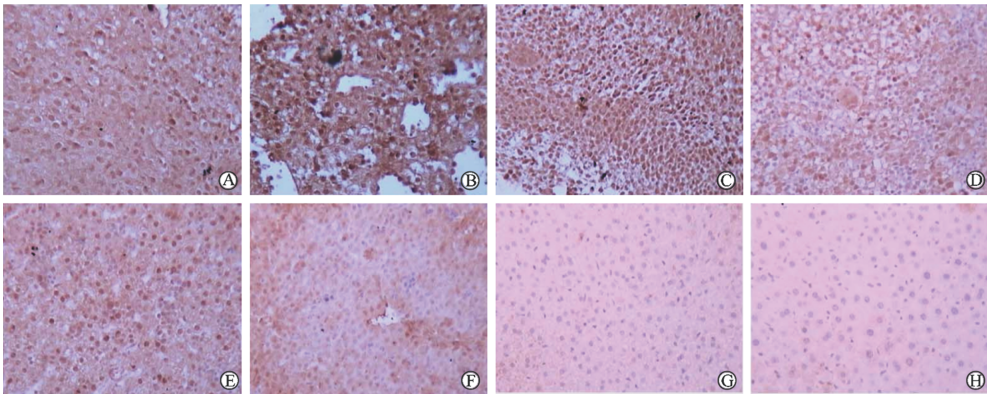


图 1 免疫组化染色检测 DNA-PKcs 蛋白在不同发育阶段小鼠肝组织中的表达

Fig 1 Expression of DNA-PKcs in mouse liver tissues of different developmental stages as detected by IHC

A; Embryo 7 d; B; Embryo 9 d; C; Embryo 14 d; D; Embryo 17 d; E; Young mice 1 d; F; Young mice 1 week; G; Young mice 1 month; H; Adult mice

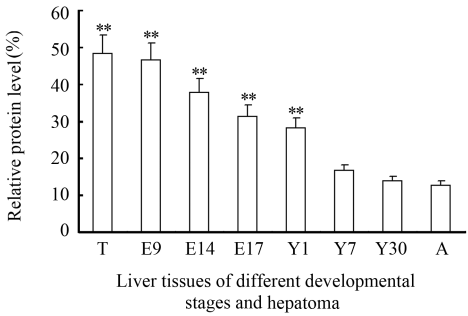


图 2 DNA-PKcs 在不同发育阶段小鼠肝组织和肿瘤细胞中的表达

Fig 2 DNA-PKcs protein level in different developmental liver tissues and hepatoma tissues

T; Hepatoma; E9-E17; Embryonic phase (d); Y1-Y30; Young mice (d); A; Adult mice. * $P < 0.01$ vs adult mice

2.2 DNA-PKcs 表达沉默抑制 HepG2 细胞增殖 细胞生长曲线测定结果显示, siRNA 介导的 DNA-PKcs 表达沉默后的 HepG2-H1 细胞与未转染 siRNA 的 HepG2 细胞相比, 细胞生长速度明显减慢 ($P < 0.01$); 而转染对照质粒的 HepG2-NC 细胞与 HepG2 细胞生长速度无明显差异, 见图 3。这说明 DNA-PKcs 的表达状态与恶性细胞的增殖能力相关。

2.3 DNA-PKcs siRNA 转染对 HepG2 细胞致癌的影响 选取转染 siRNA 的 HepG2-H1 细胞与对照的 HepG2 细胞, 进行裸鼠致瘤试验, 结果显示, 对照的 HepG2 细胞致瘤率达 80% (8/10), 而转染 DNA-PKcs siRNA 后的 HepG2-H1 细胞致瘤率仅 30% (3/10)。而且在肿瘤细胞移植后 4 周, 接种 HepG2-H1 细胞的裸鼠生长肿瘤明显小于接种对照 HepG2 细胞组, 肿瘤直径分别为 (1.8 ± 0.35) cm 和 (4.5 ± 0.74) cm。

2.4 DNA-PKcs 沉默细胞中 p-GSK3 β 和 c-myc 的蛋白表达 蛋白质印迹法检测结果显示, 在转染 DNA-PKcs siRNA 的 HepG2-H1 细胞中, p-GSK3 β

蛋白的表达水平显著下降, c-myc 的蛋白表达明显降低, 与对照的 HepG2 细胞相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 而转染空质粒的 HepG2-NC 细胞与 HepG2 细胞相比, p-GSK3 β 和 c-myc 蛋白的表达水平均无明显差别 (图 4)。

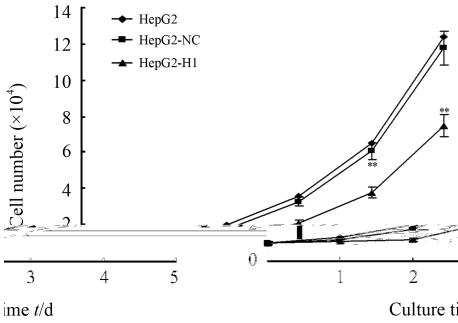


图 3 DNA-PKcs 表达沉默对 HepG2 细胞生长的影响

Fig 3 DNA-PKcs silencing inhibited cell proliferation of HepG2 cells

* $P < 0.01$ vs HepG2 cell; $n = 9, \bar{x} \pm s$

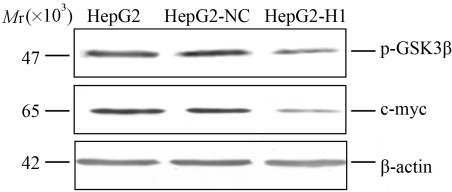


图 4 转染 DNA-PKcs siRNA 的 HepG2-H1 细胞中 p-GSK3 β 和 c-myc 蛋白表达

Fig 4 Expression of p-GSK3 β and c-myc protein in HepG2-H1 cells transfected with DNA-PKcs siRNA

3 讨 论

DNA-PKcs 作为磷脂酰肌醇激酶家族成员, 可以磷酸化 SP1、p53、有机阳离子转运体 Oct1 等与转录相关的蛋白质, 是一个具有多种功能的转录调控因子。研究发现在多种肿瘤组织如结肠癌^[9]、肝癌^[10]、脑

癌^[4]等组织中,DNA-PKcs 活性以及蛋白和 mRNA 水平平均高于正常组织。而且在成熟发育的不同时期,DNA-PKcs 的表达水平有显著差异,如生殖细胞减数分裂前 DNA-PKcs 表达水平明显高于分裂后;而一些没有增殖能力的细胞根本不表达 DNA-PKcs 或 DNA-PKcs 蛋白表达非常微弱^[9]。这说明 DNA-PKcs 的表达状态与细胞增殖分化有关。我们通过在小鼠胚胎和幼鼠及成鼠比较 DNA-PKcs 的表达分析,DNA-PKcs 蛋白在增殖能力旺盛的胚胎早期组织表达最高,发现随着发育过程中细胞增殖能力的下降和分化水平的升高,DNA-PKcs 在组织中的表达水平不断下降。在晚期幼鼠和成年鼠肝组织中,DNA-PKcs 的表达水平非常微弱。而在细胞增殖能力异常增强肝癌组织中,DNA-PKcs 明显提高。我们的结果进一步证明 DNA-PKcs 的表达与细胞增殖能力密切相关。

细胞生长曲线结果表明,siRNA 介导的 DNA-PKcs 表达沉默后的 HepG2-H1 细胞与未转染 siRNA 的 HepG2 细胞相比,细胞生长速度明显减慢;而且细胞的裸鼠致瘤能力显著降低,表现为细胞致瘤率下降和裸鼠移植肿瘤的生长速度降低,提示 DNA-PKcs 表达变异可能通过调节恶性细胞的生长能力,影响肿瘤细胞的恶性表型。

在 DNA-PKcs 沉默后的 HepG2-H1 中进行相关蛋白因子分析发现,转染 DNA-PKcs 表达抑制后导致 GSK3 β 蛋白的磷酸化水平和 c-myc 的蛋白表达明显降低,与对照的 HepG2 细胞相比有显著差异。由于 GSK3 是 Akt 的负调控底物,DNA-PKcs 表达下降的同时,使得 Akt 磷酸化水平下降,活性降低,从而使 GSK3 磷酸化水平降低,活性增强,促进了 c-myc 蛋白的泛素化降解,c-myc 蛋白表达下降。提示 DNA-PKcs 调控细胞增殖的作用可能与 Wnt/GSK/c-myc 信号通路有关。在正常情况下,细胞质中的 β -catenin 和许多蛋白,如大肠腺瘤息肉蛋白(APC)、酪蛋白激酶(casein kinase,CK)、糖原合成激酶(GSK-3 β)等形成蛋白复合物^[11]。在肿瘤细胞中,Wnt 蛋白与跨膜受体 frizzelds 以及共同受体低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP-5,LRP-6)结合,激活 Wnt 通路,抑制 β -catenin-CK-APC-GSK3 复合物形成,使细胞内游离的 β -catenin 增多。 β -catenin 进入核内与转录因子结合启动转录过程,激活通路下游靶癌基因 c-myc 的表达^[12-13]。而 c-myc 原癌基因的异常激活将使细胞脱离正常生长调节的限制而处于高度异常增殖状态,最终导致恶性转化^[14]。我们的前期研究发现 DNA-PKcs 参与 DNA 修复的作用与 AKT/GSK3/c-myc 通路有关^[15]。本研究结果进

一步证实 DNA-PKcs 的异常表达能通过 AKT/GSK3/c-myc 途径,调节细胞增殖,参与肿瘤的发生和发展过程,以 DNA-PKcs 为靶点的分子调控手段有望成为新的抗癌措施。

[参 考 文 献]

- [1] Jackson S P. Sensing and repairing DNA double-strand breaks [J]. *Carcinogenesis*,2002,23:687-696.
- [2] Williams E S,Klingler R,Ponnaiya B,Hardt T,Schrock E,Lees-Miller S P,et al. Telomere dysfunction and DNA-PKcs deficiency: characterization and consequence[J]. *Cancer Res*,2009,69:2100-2107.
- [3] Shi M,Vivian C J,Lee K J,Ge C,Morotomi-Yano K,Manzl C, et al. DNA-PKcs-PIDDosome: a nuclear caspase-2-activating complex with role in G₂/M checkpoint maintenance[J]. *Cell*, 2009,136:508-520.
- [4] Moll U,Lau R,Sypes M A,Gupta M M,Anderson C W. DNA-PK, the DNA-activated protein kinase, is differentially expressed in normal and malignant human tissues[J]. *Oncogene*,1999,18: 3114-3126.
- [5] Holgersson A,Erdal H,Nilsson A,Lewensohn R,Kanter L. Expression of DNA-PKcs and Ku86, but not Ku70, differs between lymphoid malignancies[J]. *Exp Mol Pathol*,2004,77:1-6.
- [6] Um J H,Kwon J K,Kang C D,Kim M J,Ju D S,Bae J H, et al. Relationship between antiapoptotic molecules and metastatic potency and the involvement of DNA-dependent protein kinase in the chemosensitization of metastatic human cancer cells by epidermal growth factor receptor blockade[J]. *J Pharmacol Exp Ther*,2004,311:1062-1070.
- [7] Ortiz T,Burguillos M A,López-Lluch G,Navas P,Herrador M, González I, et al. Enhanced induction of apoptosis in a radio-resistant bladder tumor cell line by combined treatments with X-rays and wortmannin[J]. *Radiat Environ Biophys*,2008,47:445-452.
- [8] Tian X,Chen G,Xing H,Weng D,Guo Y,Ma D, et al. The relationship between the down-regulation of DNA-PKcs or Ku70 and the chemosensitization in human cervical carcinoma cell line HeLa[J]. *Oncol Rep*,2007,18:927-932.
- [9] Hosoi Y,Watanabe T,Nakagawa K,Matsumoto Y,Enomoto A,Mori-ta A. Up-regulation of DNA-dependent protein kinase activity and Spl in colorectal cancer[J]. *Int J Oncol*,2004,25:461-468.
- [10] Liu L X,Jiang H C,Liu Z H,Zhu A L,Zhou J,Zhang W H, et al. Gene expression profiles of hepatoma cell line BEL-7402[J]. *Hepatogastroenterology*,2003,50:1496-1501.
- [11] Dierick H,Bejsovec A. Cellular mechanisms of Wingless/Wnt signal transduction[J]. *Curr Top Dev Biol*,1999,43:153-159.
- [12] 环 奕. WNT 信号通路与肿瘤[J]. *基础医学与临床*,2006,26: 922-925.
- [13] Terstappen G C,Gaviraghi G,Caricasole A. The WNT signaling path way as a target for the treatment of neurodegenerative disorders[J]. *Drugs*,2006,9:35-38.
- [14] Claassen G F,Hann S R. A role for transcriptional repression of p21 CIP1 by c-myc in overcoming transforming growth factor beta-induced cell-cycle arrest [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000,97:9498-9503.
- [15] An J,Yang D Y,Xu Q Z,Zhang S M,Huo Y Y,Shang Z F, et al. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit modulates the stability of c-Myc oncoprotein[J]. *Mol Cancer*,2008,22;7:32-44.

[本文编辑] 尹 茶