

下调SMU1表达对细胞增殖和DNA双链断裂损伤反应的影响

任来峰^{1*} 郭莲娣² 石新丽³ 李莎²

(¹山西医科大学汾阳学院医学检验系, 汾阳 032200; ²四川大学华西第二医院发育与干细胞研究所, 成都 610041;

³河北中医学院微生物与免疫教研室, 石家庄 050200)

摘要 *SMU1*是一个与细胞基因组复制和RNA剪切过程相关的新基因。该研究为进一步调查SMU1对细胞增殖及DNA双链断裂(DNA double-strand breaks, DNA DSBs)损伤应答的影响, 设计合成针对SMU1基因的小分子siRNA, 并与对照siRNA(scramble)分别转染HEK 293T或U2OS细胞。通过免疫印迹(Western blot)检测证实, siSMU1转染细胞中SMU1的表达显著下降, 采用台盼蓝染色细胞计数检测显示, SMU1表达下调显著降低细胞增殖能力。免疫荧光和免疫印迹法检测结果表明, SMU1表达下调显著增加细胞内源性DSBs损伤(γ H2AX foci和蛋白水平均升高); 而进一步用X-ray处理细胞造成外源性DSBs损伤后, SMU1沉默细胞显示出延长的DSBs损伤修复动力学(减缓的 γ H2AX foci和蛋白水平消退)。以上结果提示, SMU1在细胞DSBs损伤修复反应中扮演重要角色, 积极参与细胞基因组完整性的维持。

关键词 DNA损伤; RNA干扰; DNA双链断裂; 基因组稳定性

Down-regulation of SMU1 Expression Influence Cell Proliferation and Cellular Response to DNA Double-Strand Breaks

Ren Laifeng^{1*}, Guo Liandi², Shi Xinli³, Li Sha²

(¹Department of Medical Laboratory Science, Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China;

²Developmental & Stem Cell Institute, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China;

³Department of Microbiology and Immunology, Hebei University of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China)

Abstract *SMU1* is a novel gene, which implicated in both DNA replication and RNA splicing events. In this study, in order to investigate the role of SMU1 in cellular proliferation and response to DNA double-strand breaks (DSBs), SMU1-specific siRNA was designed and synthesized, and *SMU1* siRNA or control siRNA (scramble) was transfected into HEK 293T or U2OS cells, respectively. Western blot was used to assess the expression level of SMU1 and γ H2AX; the cellular proliferation ability was determined by cell counting after trypan blue stains. After treating cells with X-ray, the recruitment of γ H2AX to DNA damage site was determined by immunofluorescence (IF). The results showed that the expression of SMU1 protein was remarkably decreased in SMU1 siRNA-transfected cells, and knockdown of SMU1 in 293T cells caused obvious growth inhibition. The results also showed that down-regulation of SMU1 led to elevated endogenous DSBs (increased γ H2AX foci and protein level) and

收稿日期: 2013-09-13 接受日期: 2013-11-06

*通讯作者。Tel: 0358-7235075, E-mail: rlaifeng@163.com

Received: September 13, 2013 Accepted: November 6, 2013

*Corresponding author. Tel: +86-358-7235075, E-mail: rlaifeng@163.com

网络出版时间: 2013-12-23 11:10

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.01.0298.html>

prolonged DSBs repair kinetics (prolonged existence of the γ H2AX foci and protein level) after treating cells with X-ray. Together, these results show that SMU1 plays an important role in the response of cells to DSBs damage and actively participates in the protection of genomic integrity.

Key words DNA damage; RNA interference; DNA double-strand breaks; genomic stability

机体细胞时刻遭受各种内源性和外源性的DNA损伤,如碱基二聚体形成、DNA单链断裂和DNA双链断裂(DNA double-strand breaks, DNA DSBs)等,其中DNA DSBs是最为严重的DNA损伤类型,如不及时修复将造成基因组不稳定、细胞死亡、突变和各种人类疾病如癌症等严重后果^[1]。针对普遍存在于整个细胞周期中的DNA损伤,高等动物细胞已进化出一系列调控机制,统称为DNA损伤应答(DNA damage response, DDR),以检测和修复DNA损伤、维持细胞基因组稳定性,包括:(1)激活DNA损伤检验点(checkpoint),使细胞周期阻滞,以便细胞有充分的时间进行修复,避免该损伤遗传至后代细胞;(2)激活DNA修复系统,修复受损的DNA,使DNA复制继续进行;(3)激活p53等凋亡通路,消除损伤严重、修复无望的细胞;(4)转录某些特定的基因,以利于细胞的生存^[2]。

SMU1是一个进化上保守的基因(存在于大多数真核细胞基因组),编码蛋白为含WD40重复结构域蛋白家族的一员。遗传学和细胞生物学研究发现,秀丽隐线虫SMU1能调控unc-52/perlecan蛋白前信使RNA的替代剪切^[3-5],表明SMU1可能在RNA剪切过程中发挥作用。此外,SMU1还参与高等真核生物基因组稳定性的维持。在中国仓鼠卵巢细胞(CHO)中分离的SMU1基因突变的温度敏感性(temperature-sensitive, ts)突变株tsTM18,在非容许温度培养时呈现出增加的染色体断裂、异常的纺锤体组装及DNA单链断裂等基因组不稳定的表型^[6-7]。目前,有关SMU1对细胞DNA DSBs损伤及其修复的研究仍鲜见报道,因此,本研究拟采用X-ray作为DSBs损伤诱导剂,研究SMU1对细胞DNA DSBs损伤应答动力学变化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人骨肉瘤细胞株(U2OS)和表达SV40大T抗原的人胚肾细胞株(293T)为本实验室保存,

DMEM(高糖)培养基和胎牛血清均购自GIBICO公司。针对SMU1的siRNA(siSMU1)和阴性对照siRNA(scramble)均由广州锐博生物科技有限公司设计并合,针对人SMU1基因三个位点的siRNA序列分别为:01#: 5'-GCA CGA GAA GGA UGU GAU UdTdT-3'(sense); 02#: 5'-GGA CAA UGU UUA AGG AGA UdTdT-3'(sense); 03#: 5'-GGA CAG AUA UUA CCG UCA AdTdT-3'(sense); 阴性对照siRNA序列为: 5'-GUA CGC CAA AAG UUA AAC CdTdT-3'(sense)。siRNA转染试剂Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司。抗139位丝氨酸磷酸化的组蛋白H2AX(γ H2AX)抗体、HRP标记的羊抗兔二抗及兔抗鼠二抗均购自Millipore公司,抗 α -tubulin抗体和FITC荧光标记抗鼠二抗均购自Sigma公司,抗SMU1抗体购自Abnova公司, Cy3荧光标记抗兔二抗购自DAKO公司。细胞核染料DAPI购自Vector公司, ECL化学发光试剂盒购自Millipore公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞培养在DMEM(高糖)培养基中,内含10%胎牛血清、1%的双抗,置5% CO₂孵箱中37 °C连续培养。每隔2~3 d更换培养液。待细胞生长至约80%~90%汇合度时,使用0.25%的胰蛋白酶消化进行细胞传代。

1.2.2 RNA干扰实验 将长至对数分裂期的细胞以合适的浓度接种于细胞培养板或皿中,置5% CO₂孵箱中37 °C培养过夜;第二天,待细胞贴壁并生长至约30%~50%时,吸弃培养基,更换经预先复温的无抗生素的培养基,并继续培养细胞使其恢复2~3 h;然后,参照Lipofectamine RNAiMax试剂转染说明书进行siRNA转染操作。设置SMU1 siRNA组和阴性对照scrmble组,转染48 h后,进行后续相关实验。

1.2.3 DNA DSBs损伤诱导 将前期处理并长至约80%~90%汇合度的细胞置于科研X光机(DWX100,北京万东软件技术有限公司)下照射预定剂量,空白对照组不照射,继续培养细胞并在合适的时间点收样。

1.2.4 细胞增殖活力分析 将经siRNA转染48 h后的细胞接种到24孔细胞培养板中(30 000细胞/孔), 置5% CO₂孵箱中37 °C连续培养, 每隔24 h各取3孔siSMU1和对照siRNA组细胞进行消化, 吹打均匀, 经台盼蓝染色后计数各孔细胞数, 连续计数四次(96 h), 然后以时间为横坐标, 细胞数为纵坐标, 绘制生长曲线。

1.2.5 蛋白提取和Western blot分析 收集细胞用1×PBS清洗两次, RIPA细胞裂解液在冰上裂解30 min后, 14 000 r/min于4 °C离心15 min, 收集上清液, 采用BCA法测定蛋白浓度, 95 °C煮裂解液7 min。然后经SDS-PAGE电泳分离细胞总蛋白, 将蛋白转移至PVDF膜, 电转后的膜在含5%脱脂奶粉的封闭液中室温封闭1 h。使用一抗室温孵育2 h或4 °C过夜, PBST清洗3次, 然后使用HRP标记的二抗稀释液室温孵育1~1.5 h, PBST洗3次。最后采用ECL发光试剂盒检测, 经凝胶分析系统(Chemidoc XRS, BIO-Rad)曝光, 分析并存储图片。

1.2.6 免疫荧光(IF)检测 将生长在细胞爬片上并经siRNA转染48 h后的细胞进行DNA损伤诱导处理, 同时设置空白对照, 处理后继续培养并在合适的时间点收样。吸弃培养液, 用PBS洗2次, 加入4%多聚甲醛(PFA)室温固定10 min, PBS洗2次。加入0.25% Triton X-100(PBS配制), 室温下通透5~10 min, PBS洗2次。加入IF封闭液室温30 min, 吸弃封闭液, 加入特异性一抗(封闭液稀释), 置于湿盒中37 °C孵育30 min或4 °C过夜, PBS洗3次。避光加入荧光物质标记的二抗(封闭液稀释), 置于湿盒中37 °C孵育30 min, PBS洗3次。滴加含有DAPI的封片液于载玻片上, 镊子夹取经二抗孵育的小玻片, 细胞面向下覆盖到封片剂上封片, 荧光显微镜观察并拍照记录。每组细胞均需计数100个细胞的foci数, 并经三次独立实验后求其平均值。

1.2.7 统计分析 实验数据以均数±标准差的形式表示, 显著性差异分析用SPSS 18.0软件进行, 两组间比较采用双尾t检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异极其显著。

2 结果

2.1 SMU1基因敲减效率检测

293T细胞瞬时转染siRNA 48 h后采用Western blot检测SMU1蛋白的表达水平。结果显示, 与阴性

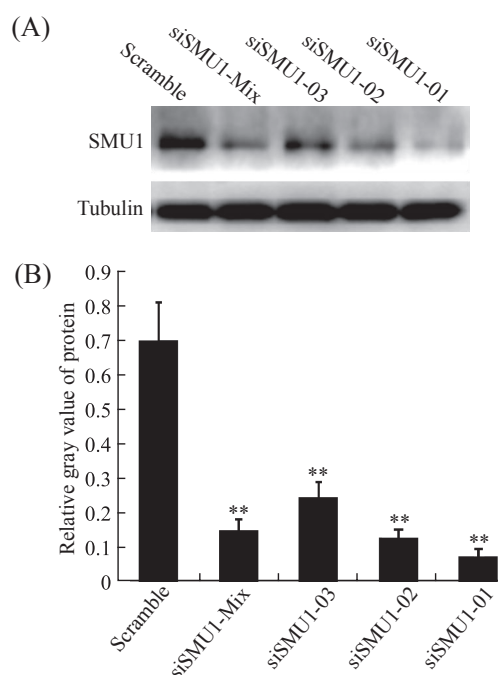
对照siRNA(scramble)组相比, 针对SMU1基因三个位点的siRNA单独或混合使用均可显著降低细胞SMU1蛋白表达水平; 其中siSMU1-01的基因沉默效率最佳, 可达90%以上(图1)。表明本实验使用的所有SMU1 siRNA均能有效抑制细胞内源性SMU1的表达, 以siSMU1-01最有效, 故后续SMU1基因沉默实验均用该序列。

2.2 SMU1降低293T细胞增殖活力

细胞生长曲线显示, 与对照组比较, SMU1基因沉默组细胞在生长72 h后其细胞数量明显减少($P < 0.05$); 随着时间推移, 到96 h后, 其细胞数量进一步下降, 与对照组有极显著差别($P < 0.01$)(图2)。

2.3 γ H2AX染色证实SMU1影响细胞DNA DSBs损伤反应

用X-ray(主要产生DNA DSBs)处理siRNA转染的U2OS细胞, 并用间接免疫荧光法检测细胞 γ H2AX



A: 293T细胞分别瞬时转染scramble RNA和siSMU1 48 h后, 提取细胞总蛋白, 经Western blot检测SMU1蛋白表达水平; B: 统计分析SMU1蛋白的相对表达水平($n=3$), ** $P < 0.01$, 与scramble RNA转染组比较。

A: 293T cells were transiently transfected with the scramble RNA and siSMU1, respectively. Total proteins were extracted 48 h after transfection and used to detect the expression levels of protein; B: statistical analysis of relative levels of SMU1($n=3$), ** $P < 0.01$ compared to the scramble siRNA-transfected group.

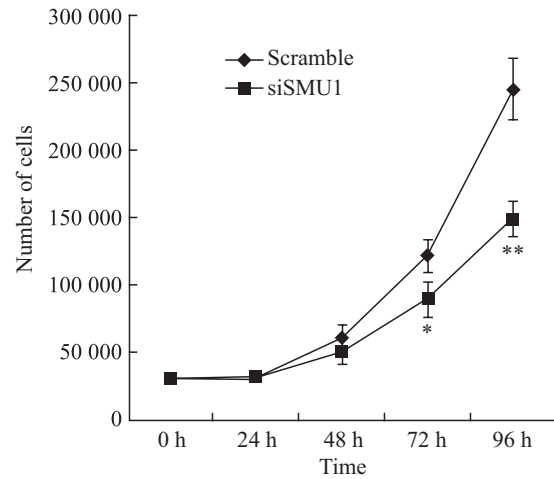
图1 siRNA介导的SMU1敲减效率检测

Fig.1 The efficiency analysis of RNAi-mediated SMU1 depletion

foci(反应DSBs的指标)来分析细胞的DSBs损伤修复应答。结果显示,未照射的细胞仅有极少数 γ H2AX foci形成,但SMU1沉默组细胞呈现更多的foci,与对照siRNA组有明显差异($P<0.05$);经X-ray处理1 h后,两组细胞 γ H2AX和53 bp1 foci均达到最大值且无明显差异;而处理4 h后,对照siRNA组细胞 γ H2AX foci急剧减少,而SMU1沉默组细胞 γ H2AX foci下降趋势明显慢于对照组,两组之间存在显著差异($P<0.05$);处理8 h后,对照siRNA组细胞 γ H2AX foci基本消退,SMU1沉默组细胞则仍有较多 γ H2AX foci,两组之间差异极为显著($P<0.01$)(图3)。

2.4 免疫印迹证实SMU1影响细胞DNA DSBs损伤反应

为证实免疫荧光的结果,进一步采用Western blot方法检测了各组细胞在DNA DSBs损伤处理后 γ H2AX蛋白表达水平变化情况。与IF的结果基本吻合,SMU1沉默组细胞内源性 γ H2AX蛋白表达水平明显高于对照siRNA组细胞,且DSBs形成后,其 γ H2AX蛋白消退明显慢于对照组细胞(图4)。

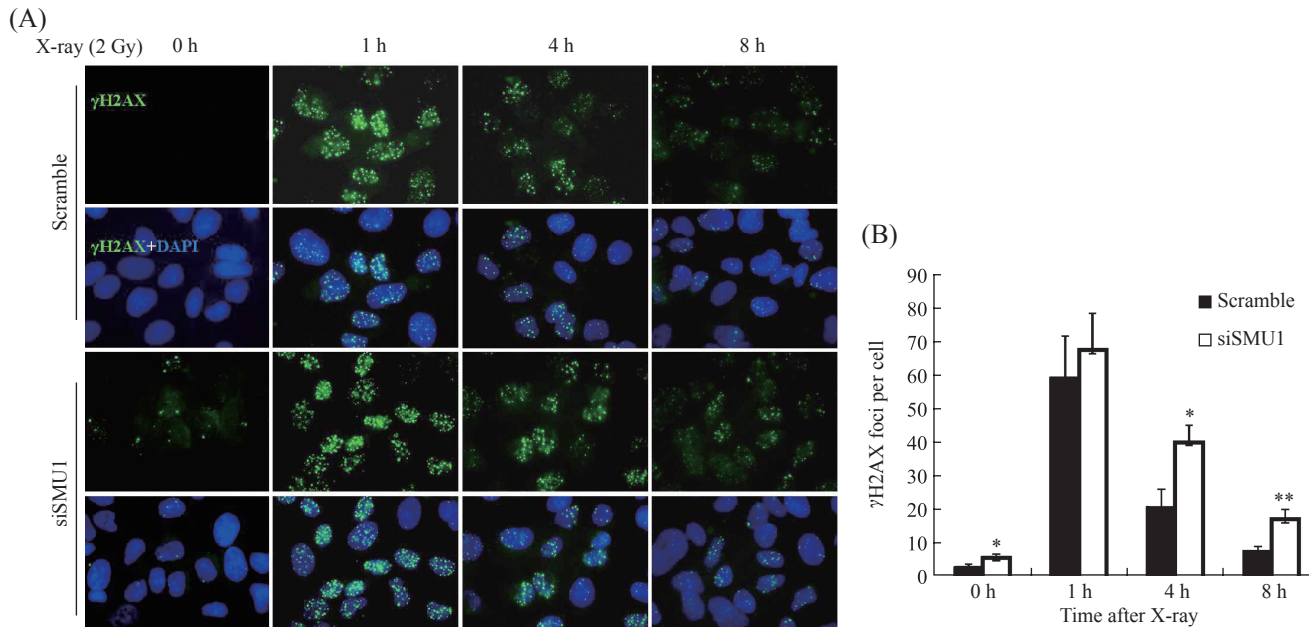


293T细胞沉默SMU1基因表达后,每隔24 h收样,台盼蓝染色并计数各组细胞数;误差线代表标准差($n=3$), $*P<0.05$, $**P<0.01$,与scramble RNA转染组比较。

After down-regulation of SMU1 expression, the cells were harvested every 24 h and counted after trypan blue stains ($n=3$), $*P<0.05$, $**P<0.01$ compared to the scramble siRNA-transfected group.

图2 各处理组细胞的增殖活力

Fig.2 Proliferation activities of cells in various groups

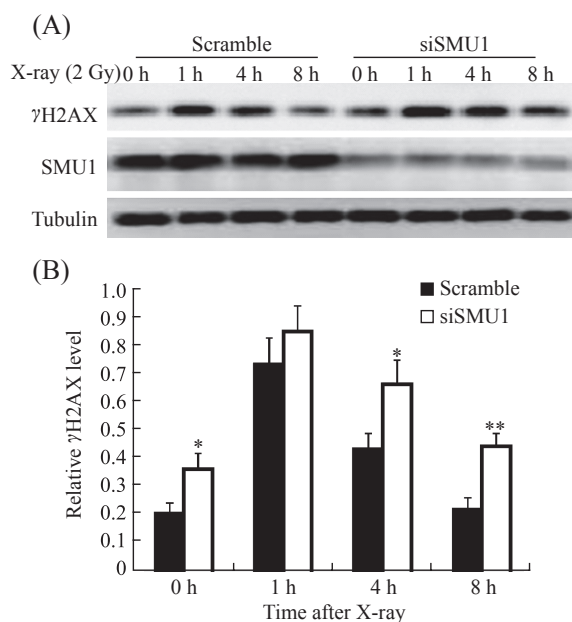


A: siRNA转染的U2OS细胞生长在载玻片上,经X-ray (2 Gy)或空白处理后在预示的时间点收样并用 γ H2AX抗体进行免疫荧光染色,然后计数细胞的 γ H2AX foci; B: 统计分析 γ H2AX foci数($n=3$), $*P<0.05$, $**P<0.01$,与scramble RNA转染组比较。

A: siRNA-treated U2OS cells grown on coverslips were treated with or without X-ray (2 Gy) and immunostained with γ H2AX antibody after fixation at indicated time points, and punctuated foci were detected in cells; B: statistical analysis of the number of γ H2AX foci ($n=3$), $*P<0.05$, $**P<0.01$ compared to the scramble RNA-transfected group.

图3 免疫荧光检测细胞DNA DSBs损伤反应

Fig.3 The test of cellular response to DNA double-strand breaks by IF assay



A: siRNA转染的293T细胞经X-ray(2 Gy)或空白处理后在预示的时间点收样提取细胞总蛋白,并用免疫印迹分析 γ H2AX蛋白表达水平; B: 统计分析 γ H2AX蛋白水平($n=3$), * $P<0.05$, ** $P<0.01$,与scramble RNA转染组比较。

A: siRNA-treated U2OS cells were treated with or without X-ray (2 Gy), total proteins were extracted at indicated time points and used to detect the expression levels of γ H2AX by Western blot; B: statistical analysis of relative levels of γ H2AX ($n=3$), * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared to the scramble RNA-transfected group.

图4 免疫印迹检测细胞DNA DSBs损伤反应

Fig.4 The test of cellular response to DNA DSBs by Western blot

3 讨论

人体每个细胞每天都会产生成千上万的DNA损伤,其中DNA DSBs是机体最致命的DNA损伤,如果细胞不能及时修复,将最终导致细胞死亡或恶性转化等严重后果^[8]。高等真核细胞已进化出一系列机制来修复DNA DSBs损伤,当DSBs形成后,DNA损伤应答通路被激活,相继征召多种修复蛋白到断裂位点,启动DNA损伤修复过程。H2AX(组蛋白H2A变体)就是参与DNA损伤反应的较早期蛋白,可在30 min内即可征召到双链断裂点,其139位丝氨酸被上游激酶ATM/ATR等磷酸化形成pH2AXs139(γ H2AX),30~60 min内其激活可达顶点^[9]。 γ H2AX协同其他修复蛋白逐渐完成对损伤DNA的修复过程,随着DSBs修复完成, γ H2AX逐渐从损伤部位消退。 γ H2AX用相应抗体染色后形成在荧光显微镜下可见的灶点(foci),其foci数与细胞DSBs数量密切相关,因此 γ H2AX是检测细胞DSBs

的敏感指标,可通过检测其动态变化来评价细胞DNA DSBs损伤应答反应的动力学变化过程^[10]。

SMU1是一个含WD40重复结构域的蛋白,WD40结构域可介导蛋白质之间的相互作用,在蛋白质的功能发挥方面具有重要作用。tsTM18细胞的温度敏感性突变体型就是由SMU1 WD40重复区的第489位精氨酸被甘氨酸取代(G489R)引起的,该突变导致细胞在非容许温度时呈现出增加的染色体断裂、异常的纺锤体组装及DNA单链断裂及细胞增殖活力的下降等基因组不稳定的表型^[6-7]。本研究采用siRNA介导的基因沉默的方法,发现SMU1基因表达下调可显著影响细胞的增殖能力,这与上述研究结果基本一致。

X-ray辐射是造成DNA双链断裂的最主要原因之一^[11]。 γ H2AX分析的所需的损伤剂量及敏感性因不同的细胞而异,肿瘤细胞系往往采用0.5 Gy以上剂量来分析 γ H2AX变化,参考相关文献^[10]并经预实验我们发现,2 Gy X-ray不仅可诱导细胞产生明显的 γ H2AX表达,而且其修复过程中的变化也比较明显。因此,我们采用2 Gy X-ray作为DSBs损伤诱导剂,并以 γ H2AX为DSBs的评价指标,系统研究了SMU1对细胞的DNA DSBs损伤应答反应的影响。我们的结果显示,未照射的细胞仅有极少数 γ H2AX形成,但SMU1沉默组细胞明显呈现更多的foci;经X-ray处理1 h后,两组细胞 γ H2AX foci均达到最大值且无明显差异;而从处理后1 h开始至8 h的时间段,对照组细胞 γ H2AX foci急剧减少,而SMU1沉默组细胞 γ H2AX foci下降趋势明显慢于对照组。进一步的免疫印迹研究发现, γ H2AX表达水平的动力学变化过程与免疫荧光 γ H2AX foci的变化过程基本一致。这些现象提示:(1)SMU1功能缺陷可能引起基因组不稳定造成更多内源性DSBs,导致内源性 γ H2AX活化;(2)在X-ray处理后短时间(1 h)内细胞产生大量的DSBs,活化细胞DSBs修复信号,正常情况下可在数小时内迅速修复损伤的DNA,而SMU1缺陷细胞则因修复功能受损而导致DSBs长期存在。

综上所述,本研究通过细胞计数、免疫印迹和免疫荧光等方法探讨SMU1在细胞增殖及DNA DSBs损伤应答中的作用,初步阐明siRNA介导的SMU1敲低可引起细胞增殖缺陷和DNA DSBs损伤应答反应动力学过程改变,接下来我们将通过过表达一系列突变的SMU1来进一步研究确定其参与细

胞DNA DSBs损伤应答的关键基因区段, 继续研究其具体的分子机制。

参考文献 (References)

- 1 Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009; 461(7267): 1071-8.
- 2 Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 39-85.
- 3 Spike CA, Shaw JE, Herman RK. Analysis of *smu-1*, a gene that regulates the alternative splicing of *unc-52* pre-mRNA in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol* 2001; 21(15): 4985-95.
- 4 Sugaya K, Ishihara Y. Enlargement of speckles of SF2/ASF due to loss of function of Smu1 is characterized in the mammalian temperature-sensitive mutant. *RNA Biol* 2011; 8(3): 488-95.
- 5 Spartz AK, Herman RK, Shaw JE. SMU-2 and SMU-1, *Caenorhabditis elegans* homologs of mammalian spliceosome-associated proteins RED and fSAP57, work together to affect splice site choice. *Mol Cell Biol* 2004; 24(15): 6811-23.
- 6 Tsuji H, Matsudo Y, Tsuji S, Hanaoka F, Hyodo M, Hori T. Isolation of temperature-sensitive CHO-K1 cell mutants exhibiting chromosomal instability and reduced DNA synthesis at nonpermissive temperature. *Somat Cell Mol Genet* 1990; 16(5): 461-76.
- 7 Sugaya K, Hongo E, Tsuji H. A temperature-sensitive mutation in the WD repeat-containing protein Smu1 is related to maintenance of chromosome integrity. *Exp Cell Res* 2005; 306(1): 242-51.
- 8 Lindahl T, Barnes DE. Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2000; 65: 127-133.
- 9 Huen MS, Grant R, Manke I, Minn K, Yu X, Yaffe MB, *et al.* RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell* 2007; 131(5): 901-14.
- 10 Lobrich M, Shibata A, Beucher A, Fisher A, Ensminger M, Goodarzi AA, *et al.* gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* 2010; 9(4): 662-9.
- 11 Ward JF. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: Identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1988; 35: 95-125.