

分 类 号: R146

单位代码: 10183

研究生学号: 2015722002

密 级: 公 开



吉 林 大 学

硕士学位论文

(学术学位)

辐射诱导 DNA 损伤修复中 EZH2 与 ATM 调控作用的研究

Study on the Regulation of EZH2 and ATM in

Radiation-induced DNA Damage Repair

作者姓名: 江 阔

专 业: 放射医学

研究方向: 辐射生物效应

指导教师: 孙世龙 副教授

培养单位: 公共卫生学院

2018 年 6 月

辐射诱导 DNA 损伤修复中 EZH2 与 ATM 调控作用的研究

Study on the Regulation of EZH2 and ATM in
Radiation-induced DNA Damage Repair

作者姓名：江阔

专业名称：放射医学

指导教师：孙世龙 副教授

学位类别：学术型硕士

答辩日期：2018 年 5 月 25 日

未经本论文作者的书面授权，依法收存和保管本论文书面版本、电子版本的任何单位和个人，均不得对本论文的全部或部分内容进行任何形式的复制、修改、发行、出租、改编等有碍作者著作权的商业性使用（但纯学术性使用不在此限）。否则，应承担侵权的法律责任。

吉林大学硕士学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交学位论文，是本人在指导教师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：江阔

日期：2018年 6月 6日

中文摘要

辐射诱导 DNA 损伤修复中 EZH2 与 ATM 调控作用的研究

背景:

电离辐射 (ionizing radiation, IR) 引起的 DNA 损伤是辐射损伤效应的重要内容之一,也是放射生物学研究的主要内容之一。在辐射引起的 DNA 损伤修复过程中 ATM/Chk2/p53 通路起重要作用。DNA 损伤后 ATM 立刻被激活,活化 Chk2,从而磷酸化 p53 或直接通过 p53 传递损伤信号,开启 DNA 损伤修复进程。

随着辐射研究的不断深入,表观遗传学的逐渐兴起,人们发现组蛋白修饰在 DNA 损伤修复中起重要作用。Valérie Borde 等研究发现在 IR 照射后,SPR-5 迅速聚集到 DNA 双链断裂 (DNA double-strand breaks, DSBs) 区移除 H3K4me2,从而招募双链断裂修复 (double-strand break repair, DSBR) 蛋白对 DNA 损伤进行修复。Sheema Fnu 等发现 H3K36me2 在辐射诱导的 DSB 中可以通过增强非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 介导的 DSB 损伤修复。H3K9me3 在 IR 诱导的小鼠胚胎成纤维细胞中会与 Tip60 在 DNA 损伤区域相互作用,促使 ATM 激活,进而触发下游 DNA 损伤应答 (DNA-damage response, DDR) 对 DSB 进行修复。

目前 H3K27me3 在 DNA 损伤修复中研究较少,Zhiqing Li 等人对家蚕在紫外线 UV 诱导的 DNA 损伤中发现 PRC2 介导的 H3K27me3 增加,并且发现具有 PcGs 基因缺失的蚕细胞显示出对 UV-C 辐射的高度敏感性。同时,Shu-Bin Gao 等人研究显示通过 EZH2 甲基转移酶抑制剂 GSK126 抑制 HepG2 细胞的 H3K27me3 后会促进化疗药物 MMC 诱导的 DNA 损伤。以上研究证实了组蛋白甲基化在 DNA 损伤修复中的重要作用。

目的:

通过建立干扰 EZH2 和过表达 HepG2 细胞模型,证实 H3K27me3 在辐射诱导 DNA 损伤中的作用,探讨 PcGs 家族成员 EZH2 介导的 H3K27me3 对

ATM/Chk2/p53 调控机制。

方法:

- 1.通过流式细胞术检测不同处理组 HepG2 细胞的细胞周期变化。
- 2.通过免疫荧光方法检测不同处理组 HepG2 细胞 γ H2AX 及 H3K27me3 的表达。
- 3.通过 Real-time PCR 方法检测各处理条件下 HepG2 细胞 EZH2、BMI1 及 ATM、Chk2 和 p53 基因表达水平变化, 再通过 Western blot 方法检测 EZH2、H3K27me3、ATM 和 p53 蛋白表达水平变化。
- 4.采用瞬时转染方法建立干扰 EZH2 和 EZH2 过表达 HepG2 细胞模型, 观察 EZH2 与 ATM/Chk2/p53 通路的调控关系。
- 5.采用免疫共沉淀技术, 检测不同处理组 HepG2 细胞 ATM 启动子区域 H3K27me3 的修饰变化。

结果:

- 1.电离辐射对 HepG2 细胞周期、DNA 损伤及目的基因转录及蛋白表达水平的影响

HepG2 细胞进行不同剂量辐射后 12h 及 24h 细胞发生 G2 期阻滞, 且呈剂量依赖性升高; 各照射组与假照射组比较, γ H2AX 和 H3K27me3 焦点数明显增多, DNA 损伤及 H3K27me3 表达呈剂量依赖性升高; 辐射组中 PcGs 家族成员 EZH2 及 BMI-1 mRNA 表达水平显著高于对照组, EZH2 和 H3K27me3 蛋白表达水平明显高于对照组; 照射后 ATM、Chk2 及 p53 基因 mRNA 表达水平显著高于对照组, 同时 ATM、p53 蛋白表达水平亦明显高于对照组。

- 2.抑制 EZH2 酶活性后辐射对细胞周期、DNA 损伤及目的基因转录及蛋白表达水平的影响

对 HepG2 细胞进行不同剂量的照射后, 加入 3 μ mol/L GSK126 抑制 EZH2 酶活性, HepG2 细胞发生 G2/M 期阻滞, 呈剂量依赖性升高, 而且 IR+GSK126 组与 IR 组相比, G2/M 期阻滞显著降低; 免疫荧光结果显示 IR+GSK126 组与 IR 组相比 H3K27me3 焦点数明显减少, 而 γ H2AX 焦点数明显增多; 基因表达结果显示 IR+GSK126 组与 IR 组相比 EZH2 mRNA 表达水平显著升高, 但 H3K27me3 蛋白表达水平却显著降低; 辐照后 6h IR+GSK126 组与 IR 组相比

ATM 和 p53 mRNA 表达水平显著升高, Chk2 mRNA 表达水平变化不明显; 但辐照后 12h 在 8Gy 剂量条件下 IR+GSK126 组与 IR 组相比 ATM、Chk2 及 p53 mRNA 表达水平显著降低。

3. EZH2 干扰和过表达中辐射对 ATM、Chk2 及 p53 基因表达的影响

免疫荧光结果显示, 干扰 EZH2 后不同照射剂量组中 γ H2AX 的焦点数明显增多, 而 H3K27me3 的焦点数明显减少; 基因表达水平结果显示 EZH2 干扰照射组与单纯照射组比 EZH2 mRNA 表达水平显著下降, 同时 H3K27me3 蛋白表达水平也下降; EZH2 过表达照射组与单纯照射组比, EZH2 mRNA 和 H3K27me3 蛋白表达水平都显著升高; 照射后 6h EZH2 干扰组与单纯照射组比 ATM、Chk2、p53 mRNA 表达水平显著升高; 照射后 12h EZH2 干扰组与单纯照射组比 ATM、p53 蛋白表达水平明显升高; EZH2 过表达后 ATM、Chk2 及 p53 基因在转录及蛋白水平上变化不明显。

4. GSK126 处理组和 EZH2 干扰组中 ATM 启动子区域 H3K27me3 的修饰变化

我们在 ATM 启动子上游-1630 ~ -774 区域及下游 719~3475 区分别选取 3 个 H3K27me3 的结合位点, 采用 ChIP 实验检测 H3K27me3 的表达变化, 发现 siEZH2 组和 GSK126 组, ATM 启动子区 H3K27me3 的表达水平显著降低。且在 PP4 位点上 H3K27me3 的表达变化最为明显。

结论:

1. 在电离辐射诱导的 HepG2 细胞 DNA 损伤反应中 ATM/Chk2/P53 通路被激活。
2. EZH2 甲基转移酶抑制剂 GSK126 通过降低 H3K27me3 表达水平促进电离辐射诱导的 DNA 损伤。
3. PcGs 家族中关键基因 EZH2 通过介导 ATM 启动子区域的 H3K27me3 参与到 DNA 损伤修复中。

关键词:

电离辐射, DNA 损伤, ATM/Chk2/p53, EZH2, H3K27me3

ABSTRACT

Study on the Regulation of EZH2 and ATM in Radiation-induced DNA Damage Repair

BACKGROUND:

DNA damage caused by ionizing radiation (IR) is one of the important contents of radiation damage effect, and it is also one of the main contents of radiation biology research. The ATM/Chk2/p53 pathway plays an important role in the process of radiation-induced DNA damage repair. ATM is activated immediately after DNA damage, and activates Chk2, phosphorylates p53, or directly transmits damage signals through p53, which opens the process of DNA damage repair.

With the deepening of radiation research and the rise of epigenetics, it has been found that histone modifications play an important role in DNA damage repair. Valérie Borde et al. found that after IR irradiation, SPR-5 rapidly aggregated into DNA double-strand breaks (DSBs) to remove H3K4me2, thereby recruiting double-strand break repair (DSBR) proteins. Repair DNA damage. Sheema Fnu et al. found that H3K36me2 in radiation-induced DSB can be repaired by non-homologous end joining (NHEJ)-mediated DSB injury. H3K9me3 interacts with Tip60 in regions of DNA damage in IR-induced mouse embryonic fibroblasts, triggering ATM activation and DNA-damage response (DDR) to repair DSB.

At present, H3K27me3 is rarely studied in DNA damage repair. Zhiqing Li et al found that PRC2-mediated H3K27me3 increased in UV-induced DNA damage in silkworm, and it was found that silkworm cells with deletion of PcGs gene showed UV-C radiation highly sensitive. At the same time, ShuBin Gao et al. showed that inhibition of H3K27me3 in HepG2 cells by the EZH2 methyltransferase inhibitor GSK126 promotes DNA damage induced by the chemotherapeutic drug MMC. The above studies confirmed the important role of histone methylation in DNA damage repair.

PURPOSE:

By establishing EZH2 low-expression and HepG2 over-expression cell model, the role of H3K27me3 in radiation-induced DNA damage was confirmed, and the

regulation mechanism of H3K27me3 on ATM/Chk2/p53 by PcGs family member

1. The cell cycle of HepG2 cells in different treatment groups was detected by flow cytometry.

2. The expression of γ H2AX and H3K27me3 in HepG2 cells of different treatment groups was detected by immunofluorescence.

3. The expression of EZH2, BMI1, ATM, Chk2 and p53 genes in HepG2 cells were detected by Real-time PCR. The expression levels of EZH2, H3K27me3, ATM and p53 proteins were detected by Western blot.

4. Transient transfection method was used to establish the EZH2 low expression and over-expression HepG2 cell model, and observe the regulatory relationship between EZH2 and ATM/Chk2/p53 pathway.

5. The co-immunoprecipitation technique was used to detect the modification of H3K27me3 in the ATM promoter region of HepG2 cells in different treatment groups.

RESULT:

1. Effect of ionizing radiation on HepG2 cell cycle, DNA damage, target gene transcription and protein expression

G₂ phase arrest occurred at doses of 12h and 24h in HepG2 cells irradiated in a dose-dependent manner. The focal numbers of γ H2AX and H3K27me3 were significantly increased in each irradiation group compared with the control group, and DNA damage and H3K27me3 expression increase dependent dose. The expression levels of EZH2 and BMI-1 mRNA in the PcGs family members in the radiation group were significantly higher than those in the control group; The expression levels of EZH2 and H3K27me3 proteins were significantly higher in the radiation group; The expression levels of ATM, Chk2, and p53 mRNAs were significantly higher after irradiation. The expression level of ATM and p53 protein was also significantly higher than that of the control group.

2. Effect of radiation on cell cycle, DNA damage, target gene transcription and protein expression after inhibition of EZH2 enzyme activity

After irradiation with different doses of HepG2 cells, 2 μ mol/L GSK126 was added to inhibit EZH2 enzyme activity, and G₂ arrest of HepG2 cells occurred in a dose-dependent manner, and G₂ arrest was observed in IR+GSK126 group significantly decreased compared with IR group; Immunofluorescence results showed that the number of focal points of H3K27me3 was significantly reduced in

IR+GSK126 group compared with IR group, while the focal number of γ H2AX was significantly increased; Gene expression results showed that the expression level of EZH2 mRNA in IR+GSK126 group was significantly higher than that in IR group. However, the expression level of H3K27me3 protein was significantly decreased. At the 6th hour after irradiation, the expression levels of ATM and p53 mRNA were significantly increased in IR+GSK126 group compared with IR group, but the expression of Chk2 mRNA was not changed significantly; However, the dose was 8Gy after 12h. IR, GSK126 group compared with IR group, ATM, Chk2 and p53 mRNA expression levels were significantly reduced.

3. Effect of radiation on the expression of ATM, Chk2 and p53 in EZH2 interference and over-expression

The results of immunofluorescence showed that the number of focal points of γ H2AX increased significantly in the different irradiation dose groups after interference with EZH2, while the number of focal points of H3K27me3 decreased significantly; the gene expression level results showed that EZH2 mRNA expression level interference irradiation group and the simple irradiation group were significantly decreased. The expression level of H3K27me3 protein was also decreased. The EZH2 mRNA and H3K27me3 protein expression levels were significantly increased in the EZH2 over-expression irradiation group compared with the irradiation group. The expression levels of ATM, Chk2, and p53 mRNA were significantly higher in the EZH2 interference group and the irradiation group than in the irradiation group 6 h after the irradiation; 12h after irradiation, EZH2 interference group ATM, p53 protein expression levels increased significantly than irradiation group; After EZH2 over-expression, ATM, Chk2 and p53 gene transcription and protein levels did not change significantly.

4. Modification of H3K27me3 in ATM promoter region in GSK126 treatment group and EZH2 interference group

We selected three H3K27me3 binding sites in the -1630 ~ -774 region and 719 ~ 3475 region downstream of the ATM promoter and detected the expression of H3K27me3 by using the ChIP assay. We found that the siEZH2 and GSK126 groups and the ATM promoter region H3K27me3 The level of expression is significantly reduced. And the expression of H3K27me3 was the most obvious in PP4 loci.

CONCLUSION:

1. The ATM/Chk2/P53 pathway was activated in ionizing radiation-induced DNA damage response in HepG2 cells.
2. EZH2 methyltransferase inhibitor GSK126 promotes ionizing radiation-induced DNA damage by reducing H3K27me3 level of expression.
3. The key genes EZH2 participates in DNA damage repair by mediating H3K27me3 in the ATM promoter region.

KEY WORDS:

Ionizing radiation ,DNA damage,ATM/Chk2/p53, EZH2,H3K27me3

目 录

第 1 章 文献综述.....	1
1.1 电离辐射	1
1.2 DNA 损伤.....	1
1.3 DNA 损伤修复.....	2
1.3.1 DNA 损伤修复机制.....	2
1.3.2 细胞周期阻滞	3
1.3.3 DNA 损伤修复的相关分子通路.....	4
1.4 ATM.....	5
1.4.1 ATM 结构.....	5
1.4.2 ATM 在 DNA 损伤修复中的作用	6
1.5 组蛋白甲基化与 DNA 损伤.....	7
1.5.1 组蛋白甲基化	7
1.5.2 组蛋白甲基化与 DNA 损伤.....	7
1.6 H3K27me3 生物学作用功能.....	8
1.7 组蛋白甲基化的催化酶系统	9
第 2 章 材料和方法.....	11
2.1 实验材料	11
2.1.1 实验试剂	11
2.1.2 主要实验耗材	13
2.1.3 主要实验仪器	14
2.1.4 试剂配制	15
2.2 实验方法	16
2.2.1 细胞培养	16
2.2.2 X 线照射.....	16
2.2.3 细胞周期检测方法	17

2.2.4	CCK8 法检测抑制剂 GSK126 对 HepG2 细胞的毒性作用	17
2.2.5	免疫荧光	18
2.2.6	EZH2 干扰 RNA 细胞模型建立	18
2.2.7	EZH2 过表达细胞模型建立	19
2.2.8	转录水平检测	21
2.2.9	Western Blot	23
2.2.10	染色质免疫共沉淀技术 (ChIP)	25
第 3 章	实验结果	28
3.1	不同剂量电离辐射对 HepG2 细胞表型的影响	28
3.1.1	对细胞周期进程的影响	28
3.1.2	对细胞 DNA 损伤的影响	28
3.2	电离辐射对 EZH2、BMI-1 及 ATM/Chk2/ p53 通路相关基因 表达水平的影响	29
3.2.1	对 EZH2 mRNA 表达水平的影响	29
3.2.2	对 BMI-1 mRNA 表达水平的影响	30
3.2.3	对 ATM mRNA 表达水平的影响	31
3.2.4	对 Chk2 mRNA 表达水平的影响	31
3.2.5	对 p53 mRNA 表达水平的影响	32
3.3	电离辐射 HepG2 细胞后加入 GSK126 对 PcGs 家族中 EZH2、 BMI-1、H3K27me3 和 ATM/Chk2/p53 表达水平的影响	33
3.3.1	HepG2 细胞中 EZH2 甲基化转移酶抑制剂 GSK126 的 IC50 测定	33
3.3.4	HepG2 细胞加入 GSK126 后对 EZH2 以及 ATM/ Chk2/ p53 通路基因 mRNA 的影响。	36
3.4	辐射诱导的 HepG2 肝癌细胞中加入 GSK126 后对 EZH2、H3K27me3 以 及 ATM/ p53 通路基因蛋白表达水平的影响	38
3.4.1	辐照 HepG2 细胞不同处理组 H3K27me3 蛋白表达水平变化	38
3.4.2	辐照 HepG2 细胞不同处理组 EZH2 蛋白表达水平变化	39
3.4.3	辐照 HepG2 细胞不同处理组 ATM 蛋白表达水平变化	40
3.4.4	辐照 HepG2 细胞不同处理组 p53 蛋白表达水平变化	40

3.5 干扰 EZH2 后 HepG2 细胞在不同辐照剂量下 EZH2、H3K27me3 及 ATM / Chk2/p53 表达水平的变化	41
3.5.1 干扰 EZH2 的 Hep G2 细胞模型的建立及鉴定	41
3.5.2 干扰 EZH2 后不同剂量电离辐射对 Hep G2 细胞 γ H2AX、H3K27me3 的影响	42
3.5.3 干扰 EZH2 后不同剂量电离辐射对 Hep G2 细胞 ATM/ Chk2/ p53 通路基因 mRNA 水平表达的影响	44
3.5.4 干扰 EZH2 后不同剂量电离辐射对 Hep G2 细胞 H3K27me3 及 ATM/ p53 通路基因蛋白表达水平的影响	46
3.6 EZH2 过表达的 293T 细胞不同剂量照射后对 ATM/Chk2/p53 通路基因 mRNA 及蛋白水平表达的影响	49
3.6.1 EZH2 过表达的 293T 细胞模型的建立及鉴定	49
3.6.2 EZH2 转录及蛋白表达水平变化	50
3.6.3 ATM 转录及蛋白表达水平变化	51
3.6.4 Chk2 mRNA 表达水平变化	52
3.6.5 p53 转录及蛋白表达水平变化	52
3.6.6 H3K27me3 蛋白表达水平变化	53
3.7 ChIP 实验结果	53
第 4 章 讨 论	55
第 5 章 结 论	60
参考文献	61
作者简介在学期间所取得的科研成果	69
致 谢	70

英文缩略词

缩略词	英文全称	中文全称
DSBs	DNA doubled-strand breaks	DNA 双键断裂
SSBs	DNA single-strand breaks	DNA 单链断裂
DDR	DNA-damage response	DNA 损伤应答
NHEJ	non-homologous end joining	非同源末端连接
HR	homologous recombination	同源重组
ssDNA	Single-stranded DNA	单链 DNA
CDK	Cyclin-dependent kinase	细胞周期蛋白依赖性激酶
DSBR	doubled-strand break repair	双链断裂修复
IR	ionizing radiation	电离辐射
Gy	gray	吸收剂量
PCGS	polycomb group genes	多梳蛋白复合体
PRC1	polycomb repressive complex 1	多梳抑制复合物 1
PRC2	polycomb repressive complex 2	多梳抑制复合物 2
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase	DNA 蛋白依赖激酶
ATM	ataxia telangiectasia mutated	运动性失调毛细血管扩增突变子
WB	Western Blot	蛋白免疫印迹
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
AT	ataxia telangiectasia	共济失调毛细血管扩张症

第 1 章 文献综述

1.1 电离辐射

电离辐射 (ionizing radiation, IR) 是一种电磁波或粒子, 可以将紧密束缚原子上的电子移除, 引起电离。种类包括 α 粒子、 β 粒子等带电粒子及 X 射线、 γ 射线不带电粒子。具有高频率、高能量、波长短的特征。最常用的辐射测量单位是吸收剂量 gray(Gy), 是指辐射后 1kg 组织或器官吸收 1 焦耳的能量^[1]。电离辐射的来源广泛包括来自太阳的紫外线照射和来自宇宙辐射的电离辐射及利用 X 或 γ 射线的医疗照射。电离辐射作用于机体主要引起 DNA 损伤其种类包括: 碱基的改变或缺失、DNA 单链断裂 (DNA single-strand breaks, SSBs) 和 DNA 双链断裂 (DNA double-strand breaks, DSBs)^[2]。种类不同的 DNA 损伤可以单独发生或相互结合发生, 导致复杂的 DNA 损伤即成簇损害。

1902 年第一次报道了辐射会导致溃烂皮肤区域发生癌变, 1911 年 Upton AC 等人发现暴露于辐射的工作者与白血病的发生显著相关^[3]。现今医疗照射是人们生活中最常接触的辐射方式, Amy 和 Sarah 对英国癌症患者由于 X 射线诊断造成的危险性进行了评估, 发现男性患者中辐射诱导的膀胱癌危险性最高, 其次为骨癌和白血病, 女性中骨癌危险性最高, 肺癌、乳腺癌次之^[4]。辐射致癌效应早已受到人们广泛的关注, “线性无阈”和“线性有阈”学说也是学界长期探讨的重要科学问题, 但由于辐射远期效应的不确定性, “线性无阈”学说是目前多数人坚持的主要观点。同时辐射也是癌症治疗的重要手段, 特别是宫颈癌的治疗, 统计发现 70% 的宫颈癌患者会使用放射治疗来延缓肿瘤生长。辐射治疗癌症的作用机制是引起肿瘤细胞 DNA 双链断裂使肿瘤细胞无法复制, 进而促进肿瘤细胞的凋亡。但电离辐射诱导 DNA 损伤的复杂性机制尚未完全阐明, 还需要大量研究来证实补充^[5]。

1.2 DNA 损伤

DNA 是电离辐射作用的重要靶分子之一, 沿电离辐射径迹能量沉积, 进而产生一系列 DNA 损伤 (包括 DSBs、SSBs 和 DNA 交联等)^[6]。体外试验发现

电离辐射诱导的 DNA 断裂中, 每个细胞接受 1Gy 照射剂量后会导致 1000 个 SSBs 和 35 个 DSBs^[7], 虽然 DSBs 只占电离辐射诱导 DNA 损伤中的一小部分, 但 DSBs 在 DNA 损伤的类型中却是最具有危险性的, 如果不迅速修复 DSBs, 会导致有丝分裂过程中染色体片段的丢失或肿瘤相关基因的杂合性缺失, 进而诱发细胞突变。此外, 错误的 DNA 损伤修复还会导致 DNA 双螺旋末端染色体易位, 引起染色体畸变^[8, 9]。

一项出生队列研究发现在儿童时期头部 CT 扫描可使大脑暴露的剂量高达 40-50mGy, 该剂量诱发脑癌的发生率比非暴露组明显增加^[10-14]。最近报道, 辐射诱导的 DNA 损伤和氧化应激效应会诱导 p53/p21 基因信号通路的激活, 使原代人脐静脉内皮细胞的复制潜能下降从而引起心脏早衰^[15]。研究显示 DNA 损伤修复过程中, 若 DNA 损伤应答 (DNA-damage response, DDR) 过程发生缺陷会引发多种疾病。例如, DSBs 修复错误引起的乳腺癌基因 BRCA1 和 BRCA2 突变, 会导致乳腺癌和卵巢癌发生率显著增加^[16, 17]。另外, 研究者发现核苷酸切除修复错误会使色素性干皮病患皮肤癌的发病率提高 1000 倍^[18]。为了维护基因组的稳定性及完整性, 细胞形成了一套复杂的修复系统。有研究报道, DNA 损伤发生后激活损伤感应器结合蛋白对 DSBs 进行识别, 促发蛋白酶级联反应, 扩大损伤信号, 招募效应因子, 对损伤 DNA 进行快速修复^[19, 20]。

1.3 DNA 损伤修复

既往研究总结发现, DNA 损伤后基因组稳定性的维护主要取决于 DNA 损伤修复系统和细胞周期检查点的协调控制, 若这种调控机制发生紊乱会导致基因组不稳定及基因突变, 进而引发癌症^[21, 22]。

1.3.1 DNA 损伤修复机制

有报道称, DNA 损伤修复是防止人类上皮细胞转变成恶性肿瘤的多种过程中首先发生的反应之一^[23]。DNA 损伤修复机制主要包括: 光修复、DNA 双链断裂修复、错配修复等^[24]。目前研究发现, DSBs 修复方式主要包括两种, 既非同源末端连接 (non-homologous DNA ending joining, NHEJ) 和同源重组 (homologous recombination, HR)^[25-27]。NHEJ 是一种易错配的修复方式, 可发生在细胞周期的各时相。当 DSBs 的末端与 Ku 异源二聚体 (Ku70 和 Ku80)

结合时，NHEJ 启动，Ku 异源二聚体可以招募 DNA 连接酶 IV 将两断裂末端重新连接，从而准确修复 DSB。由于 NHEJ 修复不需要模板，仅基于断裂末端的结构进行修复，所以这种修复方式容易引起 DNA 碱基的缺失、插入及突变，从而导致 DSBs 的错误修复。在 NHEJ 的修复途径中涉及多种效应蛋白，包括 Ku70、Ku80、MRN、DNA ligase IV、MRX、ATM 和 H2AX 等，其中 H2AX、ATM 中尤为重要，H2AX 已经成为 DSBs 的标记，是细胞响应 DNA 损伤中最为敏感分子。

HR 是 DSBs 修复的另一重要机制，主要发生在细胞周期的 S 期和 G2 期，与 NHEJ 不同，HR 修复不会发生 DNA 碱基的缺失、插入及突变。DSB 发生后，MRN 或 MRX 复合体结合 DSB 末端，可以将 DNA 末端转变成 3'单链 DNA (ssDNA) 突出末端—RPA 复合体识别 ssDNA 突出末端，招募 Rad51，形成 ssDNA-Rad51 核蛋白丝—ssDNA-Rad51 核蛋白丝会识别同源 DNA 序列，例如姐妹染色单体，通过 DNA 合成和复制进行遗传信息交换—最终连接断裂末端，完成这个无错修复方式，即 HR。在 HR 修复通路中，主要参与蛋白包括 ATM、MRN/MRX 蛋白复合体、RPA、MDC1、Rad51 等，其中 ATM 信号通路一直是人们研究的焦点。

1.3.2 细胞周期阻滞

DNA 损伤在细胞周期的任一时相都可以发生，各时相阻滞包括 G1、G2 和 S 相延迟，在 DNA 损伤修复过程中起重要作用。细胞周期阻滞的发生大部分依靠 DNA 损伤检查点来实现。当 DNA 损伤发生时，会立刻激活 DSBs 检查点，通过细胞周期蛋白依赖性激酶 CDK 来延迟细胞周期进程，这种延迟使细胞能够以足够的时间对损伤的 DNA 进行修复，确保遗传信息的准确传输^[28, 29]。DNA 损伤检查点主要通过三类蛋白来完成损伤修复，包括传感蛋白 (Xrs2、Rad9 等)，感应激酶 (ATM、ATR)，效应激酶 (Chk1、Chk2 等)。传感器蛋白可检测不同类型的 DNA 损伤，并通过感应激酶激活效应激酶，效应激酶可调节下游靶蛋白的活性，增加损伤修复蛋白的表达，从而有助于损伤 DNA 的修复。当损伤的 DNA 无法修复时，细胞可执行凋亡过程，防止错误的遗传信息传给子代细胞。

1.3.3 DNA 损伤修复的相关分子通路

DNA 损伤反应会通过多种修复途径连续招募蛋白到 DNA 损伤区域^[30, 31], 进而对损伤区域进行修复。蛋白磷脂酰肌醇 3-激酶家族 (PI3ks) DNA 损伤修复过程中起着核心作用, 可通过多种损伤通路参与 DNA 损伤的监测及损伤检查点和细胞周期阻滞的激活^[32], 其成员包括 DNA 依赖蛋白激酶催化亚基 DNA-PKcs, 共济失调毛细血管扩张症突变激酶 ATM 和共济失调毛细血管扩张 Rad3 相关蛋白 ATR^[33]。ATM 是一种丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶, DNA 损伤后激活 ATM, 激活的 ATM 可调节下游靶蛋白, 如 P53、BRCA1、Chk2、RAD17、RAD9 以及 NBS1 等, 进而导致细胞周期阻滞, 促进 DNA 损伤修复及细胞凋亡^[34]。ATR 是另一种丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶, 具有与 ATM 类似的功能, 一旦被激活, 它可以磷酸化下游蛋白激酶 (Chk1), 启动信号转导级联, 最终导致细胞周期阻滞^[35, 36]。然而, ATM 在激活的激酶和响应的损伤类型上与 ATR 是不同的: ATM 是 DSB 的首选, 而 ATR 主要响应持续的 SSBs^[37, 38]; DNA 损伤后 ATM 激活检查点激酶 2 (Chk2), 而 ATR 激活检查点激酶 1 (Chk1), 形成 DNA 损伤修复的两条核心通路, 即 ATM-Chk2 和 ATR-Chk1^[39]。

ATM-Chk2 在 DSB 发生后立刻发挥作用, 首先磷酸化 ATM, 并向下游发送损伤信号激活 Chk2, 随后 Chk2 抑制磷酸酯酶 Cdc25A, 使 Cdc25A 泛素化和蛋白酶破坏, 从而引起 Cdc25A 下调或导致 Cdc25A 无法激活 CDK2-cyclinE 及 CDK4-cyclinD 复合物, 最终阻止细胞进入有丝分裂期^[40, 41]。ATM 也可通过磷酸化 Chk2, 再激活 p53 或直接磷酸化 p53 参与到 DNA 损伤修复中。p53 是一种肿瘤抑制蛋白。在正常细胞中, p53 具有高度不稳定性的特点。由于 Mdm2 (人类中的 Hdm2) 与 p53 结合可以促进 p53 在蛋白酶体中的泛素化和降解, 所以 p53 通常呈现非常低的浓度。DNA 损伤后会引发 p53 的磷酸化, Mdm2 降解的 p53 相对减少, p53 逐渐增多, 当积累到一定浓度时 p53 便会刺激下游基因转录干扰细胞周期进程。p53 通过两种主要机制发挥作用: 第一可以激活 DNA 修复蛋白, 特别是 p21 或促进基因的转录来诱导细胞周期停滞。研究发现, p21 被 p53 激活后可以抑制 G1 / S-Cdk 和 S-Cdk 复合物, 使细胞周期阻滞在 G₁ 期。其次, 如果 DNA 损伤不能被修复, p53 可以启动凋亡信号通路, 导致细胞发生程序性死亡^[42], 如下图 1。

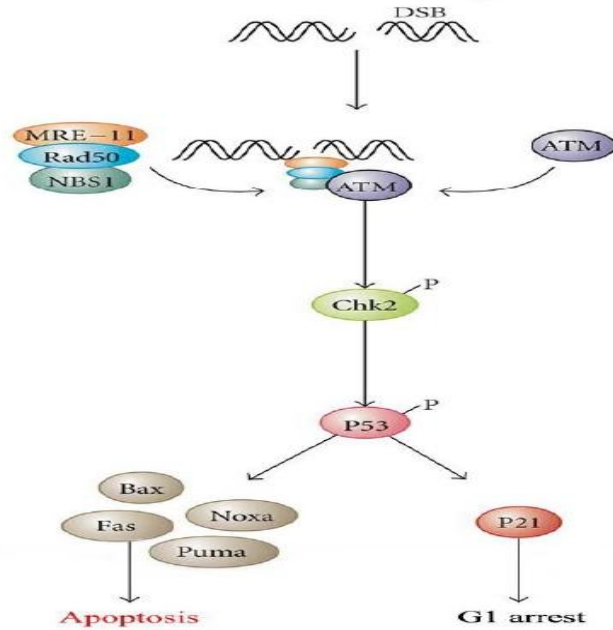


Fig1.3.3 电离辐射作用下 ATM-Chk2 通路图

ATR- Chk1 在 SSBs 产生后发挥作用，SSBs 发生后，ATR 被激活进而磷酸化 Chk1^[43]，Chk1 通过磷酸化 Cdc25C 的 Ser216 位点对其进行负向调控^[44, 45]，从而引发细胞周期阻滞^[46, 47]；另外，磷酸化的 Chk1 还可以通过激活 WEE1 激酶对 Cdc25C 进行调控，使细胞周期阻滞在 G2/M 期^[48]。

在发生 DNA 损伤的几分钟内，DNA 损伤部位积累了大量的修复和信号蛋白，涉及了多种细胞途径，其中以 ATM 来调节损伤修复的途径尤为重要。最近的研究表明，在早期细胞周期检查点对电离辐射诱导的损伤反应中，ATM 是主要的决定因素，而 ATR 发挥作用要迟于 ATM^[49, 50]。

1.4 ATM

1.4.1 ATM 结构

ATM 编码翻译分子量 350kDa 的蛋白，由 3056 个氨基酸组成，位于染色体 11q22.3 位置上，属于磷脂酰肌醇 3-激酶相关激酶家族（PIKKs）成员^[51]。ATM 拥有五个结构域：它们是从 N 端到 C 端的 HEAT 重复域、FRAP-ATM-TRRAP（FAT）域、激酶域（KD）、PIKK 调节域（PRD）和 FAT-C 端（FATC）域。HEAT 重复域直接绑定到 NBS1 的 C 端；FAT 结构域与 ATM 的激酶结构域相互

作用,以稳定 ATM 自身的 C 端区域; KD 结构域与 ATM 激酶的活性恢复有关;而 PRD 和 FATC 结构域用于调节 KD 结构域。尽管 ATM 的构象还未确定,但是目前认为 ATM 的构象与 DNA-PKcs 非常相似,由头和长臂组成并且环绕双链 DNA^[52]。

1.4.2 ATM 在 DNA 损伤修复中的作用

Louis-Bar 综合征,是由于 ATM 基因突变导致的,是一种发生在常染色体上的隐性遗传病。患者表现出多种异常,如共济失调、毛细血管扩张、辐射敏感性增加及癌症易感性增高等^[53]。1963 年 Boder and Sedgwick 发现 AT 患者及基因携带者基本上无症状,但存在该疾病的两个主要特征,即癌症易感性和辐射灵敏度增加^[54]。随后,通过遗传连锁分析等方法发现 Louis-Bar 综合征是由 ATM 基因突变直接导致地^[55, 56]。

ATM 在识别和传递 DNA 损伤信号及启动 DNA 损伤修复中起着重要作用,其活化程度依赖于 DNA 损伤程度^[57]。通常 ATM 主要依靠三种方式参与损伤 DNA 的修复: A. ATM 可活化细胞周期检测点,这条途径的信号通路主要有两条,一是激活 Chk2^[40,41], Chk2 通过磷酸化 p53,导致细胞无法通过检查点进而发生细胞周期阻滞;二是激活 Chk1,活化后的 Chk1 磷酸化 CDC25 的 Ser216 位点,从而降低 CDC25 的活性,最终抑制 M-CDK 的表达,使细胞周期中断^[43]。 B. ATM 也可调节损伤 DNA 的死亡受体间的信号来传输他们之间的相互作用进而导致细胞凋亡^[42]。 C. ATM 还可以磷酸化下游的相关靶蛋白如: Chk2、c-Abl、和 p53 等,调节细胞周期检验点,使损伤 DNA 停留于检测点,对损伤 DNA 进行修复^[34]。

在 DNA 损伤修复中, ATM 的表观遗传学调控机制逐渐受到学者的重视。 ATM 启动子区域 DNA 经常发生甲基化, 42% 的头颈部鳞状细胞癌肿瘤显示 ATM 启动子区发生不同程度的 DNA 甲基化^[58], 超过 73% 的脑胶质瘤中发现 ATM 基因启动子区出现 DNA 甲基化,而且这种甲基化水平与 ATM mRNA 及蛋白表达水平呈显著负相关 ($p < 0.001$)^[59]。同时, 53% 的乳腺癌中发现 ATM 基因启动子甲基化水平亦明显升高^[60], 而且在 II 期及晚期的乳腺癌中 78% 呈现 ATM 基因甲基化水平升高。

DNA 损伤可以说是癌症发生的主要潜在因素之一^[61, 62], 因此 DNA 修复缺陷被推断为许多癌症发生的基础要素。如果 DNA 修复缺陷, DNA 损伤逐渐积累, 这种过量的 DNA 损伤会增加 DNA 复制期间的突变错误, 增加分子表观遗传学上的调控变化^[63, 64]。所以我们推测 ATM 启动子区域发生的 DNA 甲基化在 DNA 损伤修复中起着重要作用。

1.5 组蛋白甲基化与 DNA 损伤

1.5.1 组蛋白甲基化

组蛋白修饰最先是由 Strahl 和 Allis 提出的“组蛋白编码”假说开始形成的, 其描述为: 在一个或多个组蛋白尾部上的不同化学修饰, 这种化学修饰可以形成可读的编码, 同时可以被特定的蛋白质识别以引发不同的下游事件如转录激活、基因沉默及 DNA 修复等, 从而决定细胞命运和组织发育的生物学后果^[65]。组蛋白是核小体的核心组成部分, 是一类主要含有精氨酸及赖氨酸的碱性蛋白, 可分为四种, 分别为 2A (H2A), H2B, H3 和 H4。目前, 组蛋白修饰包括甲基化修饰、乙酰化修饰、磷酸化修饰和泛素化修饰等。

组蛋白甲基化是最稳定的组蛋白修饰。DNA 激活或失活很大程度上取决于甲基化尾部的特定残基及其甲基化程度。组蛋白只在赖氨酸 (K) 和精氨酸 (R) 残基上发生甲基化, 最常见于组蛋白 H3 和 H4 的赖氨酸残基上^[66]。与基因活化有关的组蛋白甲基化位点包括 H3K4、H3K48 和 H3K79; 与基因失活有关的组蛋白甲基化位点包括 H3K9 和 H3K27。已有研究发现, 不同残基的组蛋白甲基化可作为招募各种蛋白质或蛋白质复合物的标志, 有助于调节染色质活化或失活。从组蛋白甲基化程度上来区分, 赖氨酸和精氨酸可以发生单甲基化 (me1)、二甲基化 (me2) 和三甲基化 (me3)^[67, 68]。同时, 不同组蛋白甲基化的程度对基因表达影响作用也存在本质差异, 如 H3K9 的 me2 和 me3 被发现与基因沉默相关; 相反, H3K9 的 me1 被发现与基因激活相关^[69, 70]。

1.5.2 组蛋白甲基化与 DNA 损伤

组蛋白甲基化已被证实广泛参与了各种基因表达调控。Valérie Borde 等研究发现在电离辐射诱导下 SPR-5 会迅速被招募到 DNA 损伤区域并将 H3K4me2

移除, 通过改变染色体结构使更多 DSB 修复蛋白在 DSBs 区域形成, 从而促进 DNA 损伤修复^[71]。Williamson 研究表明, 电离辐射诱导的 DSBs 可增加 H3K36me2 的表达, 从而招募 DSB 蛋白通过 NHEJ 修复途径进行 DSBs 损伤修复^[72]。在小鼠胚胎成纤维细胞中电离辐射可诱导 H3K9me3 与 Tip60 结合, 促使 ATM 激活, 进而触发下游 DNA 损伤应答对 DSB 进行修复^[73]。H3K27me3 在 DNA 损伤修复中的变化及作用还鲜有报道, 我们将以电离辐射诱导的细胞 DNA 损伤修复为研究前提, 探讨 H3K27me3 在 DNA 损伤修复中的生物学作用及机制。

1.6 H3K27me3 生物学作用功能

H3K27 可存在多种甲基化修饰方式, 如单甲基化、双甲基化和三甲基化修饰, 甲基化修饰程度不同, 其相应生物学功能也截然不同: A. H3K27me1 与促进基因转录有关, 目的基因启动子区域 H3K27me1 的高表达, 可促进该目的基因的转录表达^[74]。B. H3K27me2 广泛分布在核心组蛋白 H3 内, 通过抑制非特异性细胞类型增强子 (non-cell-type-specific enhancers, NCTSE), 从而防止细胞非特异性基因表达^[75]。C. H3K27me3 是在核心组蛋白 H3 的氨基 (N) 末端发生的组蛋白甲基化, 这种三甲基化与目的基因的下调相关, 是抑制基因转录的表观遗传修饰标记之一。

有研究表明, H3K27me3 是 P16 基因沉默的早期现象。同时, 流行病学调查发现, H3K27me3 的表达与肝细胞癌术后生存期密切相关, 可应用于肝细胞癌的预后标志物^[76]。在肝细胞癌中发现 IFN α 可将 EZH2 募集到致癌基因 P2p73 启动子区域, 通过催化 H3K27me3 表达增加引起 P2p73 转录抑制增加, 从而抑制肝癌细胞的增殖^[77]。De Santa 等人^[78]发现炎性细胞因子可触发巨噬细胞的转移分化, 这种转移分化与 H3K27me3 的减少显著相关。近年来人们开始关注 H3K27me3 在 DNA 损伤修复中的作用, 有研究报道, 当发生 DSBs 时, H3K27me3 与 RPA32 共定位于 DNA 损伤区域^[79], 提示 H3K27me3 是 DSBs 的分子标志物, 同时可能通过某种机制参与到 DSBs 中, 但这种机制尚未明确。

1.7 组蛋白甲基化的催化酶系统

组蛋白甲基转移酶 (Histone methyltransferase, HMT) 是组蛋白修饰酶中的一种, 其可催化一个, 两个或三个甲基基团转移至组蛋白的赖氨酸或精氨酸残基上^[80]。目前研究较多的组蛋白修饰酶之一是混合谱系白血病蛋白 (MLLs), 它是一种 H3K4 特异性组蛋白甲基转移酶 (HMTase), 经常在急性髓性白血病中发生突变^[81, 82]。MLLs 主要催化 H3K4 三甲基化, 从而激活 HOXs 基因的转录, 促进细胞的恶性转化^[83]。MLLs 也可与转录因子 Pax7 结合, 再通过 H3K4 甲基化激活肌源性基因^[84]。G9a 是比较经典的赖氨酸组蛋白甲基转移酶, 主要参与 H3K9 的甲基化, G9a 可催化肿瘤抑制因子 RUNX3 启动子区域的 H3K9me2, 进而抑制 RUNX3 的转录, 促进肿瘤的发生^[85]。SETD2 是 H3K36me3 唯一的组蛋白甲基转移酶, SETD2 的突变会导致 H3K36me3 水平下降, 导致目的基因转录异常^[86]。现今, PRC2 被认为哺乳动物细胞中 H3K27 最重要的甲基转移酶。PRC2 复合物包括 EZH2 (或 EZH1)、SUZ12、EED 和 RbAp46 / 48。Pasini 等人发现在 SUZ12 缺失的胚胎细胞中 H3K27me2 和 H3K27me3 也明显的缺失, 揭示了 SUZ12 的 PRC2 复合物在催化组蛋白 H3K27 甲基化中的重要作用^[87]。相继 Montgomery 等人发现, PRC2 组分 EED 的敲除也可诱导 H3K27me2 和 H3K27me3 的全面减少^[88]。EZH2 甲基转移酶是近年来研究的热点, 其在 PRC2 的转录抑制中起着核心作用, 主要参与 H3K27 三甲基化的催化。有研究证实 EED-EZH2 复合物可以特异性的产生 H3K27me3 来发挥沉默目的基因的作用, 影响肿瘤的发生发展^[89,90]。研究发现在 7-22% 的滤泡性淋巴瘤和弥漫性 B 细胞淋巴瘤中发现编码 EZH2 SET 结构域基因发生突变, 导致 EZH2 甲基转移酶活性升高, 致使 H3K27me3 水平升高, 进而促进肿瘤细胞的突变^[91, 92], 进一步研究发现这种突变与 BCL2 和 TP53 的表达失调显著相关, 可加速淋巴瘤恶性进展^[93]。之前我们已经表述过 DNA 损伤时, 发现组蛋白 H3K27me3 与 RPA32 共定位于 DNA 损伤区域, 还发现 EZH2 也出现在 DNA 损伤区域, 并且表达水平与 H3K27me3 呈正相关^[79], 提示 DNA 损伤发生后 EZH2 酶活性升高, 增加损伤区域 H3K27me3 表达, 通过调控细胞损伤修复相关基因, 从而参与 DNA 损伤修复进程。

综上所述, A. 当细胞发生 DNA 双链断裂时, ATM-Chk2-p53 通路在 DNA 损伤修复中起重要作用。B. 当细胞发生 DNA 双链断裂时, PcGs 家族成员在 DNA 损伤区域被招募, 并且可能通过催化 H3K27me3 参与 DNA 损伤修复过程。可以看出, 无论在基因功能、信号通路还是表观调控机制等方面, 学者们对 DSBs 修复过程都进行了大量研究工作, 但它们的各自独立作用间是否存在相互依赖或调控作用还未明确。虽然研究证实, 肝细胞癌中 PcGs 抑制 p53 的表达, 并且在多种肿瘤中 PcGs 表达增加均与 p53 的下调相关^[94, 95]。但有趣的是, 在 DNA 损伤时 PcGs 还可以通过非依赖 H3K27me3 方式抑制 p53 的表达。DNA 损伤过程中 DNA 损伤修复相关基因, 特别是 ATM 的表观遗传学调控机制, 仍不十分明确。因此我们提出假设, 电离辐射诱导 DSBs 中 PcGs 家族成员可通过依赖或非依赖 H3K27me3 方式对 ATM-Chk2-p53 通路进行表观遗传学调控, 进而参与 DNA 损伤修复。我们的研究结果将为电离辐射诱导的 DNA 损伤研究提供新的思路、研究视角并积累大量研究数据。

第2章 材料和方法

2.1 实验材料

2.1.1 实验试剂

MEM 培养基	美国 GIBCO 公司
胎牛血清(FBS)	美国 MRC 公司
胰蛋白酶 (Trypsin-EDTA Solution)	北京 Solarbio 科技有限公司
青链霉素 (双抗)	北京 Solarbio 科技有限公司
PBS	美国 Sigma 公司
二甲基亚砷 (DMSO)	美国 Amresco 公司
抗荧光衰减封片剂	北京 Solarbio 科技有限公司
4%多聚甲醛通用型组织固定液	合肥 Biosharp 科技有限公司
Triton(TM)X-100	上海昂一生物科技有限公司
氯化钠, NaCl	北京化工厂
碳酸氢钠, NaHCO ₃	北京化工厂
异丙醇	北京化工厂
甲醇	北京化工厂
无水乙醇	北京化工厂
浓盐酸	北京化工厂
冰醋酸	北京化工厂
氯仿	北京化工厂
苯甲基磺酰氟, PMSF	美国 Sigma 公司
RIPA 裂解液	北京 Solarbio 科技有限公司
蛋白定量分析试剂盒	碧云天生物技术研究
丙烯酰胺,Acrylamide	合肥 Biosharp 科技有限公司
甘氨酸, Glycine	合肥 Biosharp 科技有限公司
十二烷基硫酸钠, SDS	合肥 Biosharp 科技有限公司

过硫酸铵, AP	合肥 Biosharp 科技有限公司
三羟甲基氨基甲烷, Tris-base	北京博奥拓科技有限公司
MEM 培养基	美国 GIBCO 公司
胎牛血清(FBS)	美国 MRC 公司
青链霉素 (双抗)	北京 Solarbio 科技有限公司
PBS	美国 Sigma 公司
二甲基亚砷 (DMSO)	美国 Amresco 公司
1M Tris-HCl,PH8.8	北京 Solarbio 科技有限公司
1M Tris-HCl,PH6.8	北京 Solarbio 科技有限公司
20×TBS	北京 Solarbio 科技有限公司
30%丙烯酰胺 (29:1)	北京 Solarbio 科技有限公司
吐温 20, TWEEN20	美国 Amresco 公司
四甲基二乙胺, TEMED	北京博奥拓科技有限公司
10×丽春红	北京 Solarbio 科技有限公司
脱脂奶粉	美国 BD 公司
结晶紫	美国 Sigma 公司
噻唑蓝, MTT	美国 Sigma 公司
显影粉、定影粉	天津市世纪奥博商贸有限公司
ECL 发光试剂盒	美国 Santa Cruz 公司
Western Blot 膜再生液	北京 Solarbio 科技有限公司
Trizol	美国 Invitrogen 公司
抑制剂 GSK126	美国 Selleck 公司
蛋白 Marker	北京 Solarbio 科技有限公司
Real-time PCR 试剂盒, TAKARA	宝生物工程 (大连) 有限公司
逆转录试剂盒, TAKARA	宝生物工程 (大连) 有限公司
细胞周期检测试剂盒	江苏凯基生物技术股份有限公司
DAPI 溶液	北京 Solarbio 科技有限公司
鼠抗人 λ -H2AX 抗体	美国 Bioworld 公司
FITC 标记羊抗鼠二抗	美国 Bioworld 公司

TRITC 标记羊抗鼠二抗	美国 Bioworld 公司
TRITC 标记羊抗兔二抗	美国 Bioworld 公司
兔抗人 H3K27me3 抗体	美国 CellSignaling Technology 公司
兔抗人 EZH2 抗体	美国 CellSignaling Technology 公司
兔抗人 p53 抗体	美国 CellSignaling Technology 公司
兔抗人 ATM 抗体	美国 CellSignaling Technology 公司
鼠抗人 β -actin 抗体	美国 Santa Cruz 公司
HRP 羊抗鼠二抗	美国 Bioworld 公司
HRP 羊抗兔二抗	美国 Bioworld 公司
Lipofectamine2000	美国 Reagent
质粒大提试剂盒	北京天根生化科技有限公司
RFect 小核酸转染试剂	常州百代生物科技有限公司

2.1.2 主要实验耗材

离心管	无锡耐思生物科技有限公司
冻存管	无锡耐思生物科技有限公司
EP 管	无锡耐思生物科技有限公司
培养皿	无锡耐思生物科技有限公司
培养瓶	无锡耐思生物科技有限公司
吸管	无锡耐思生物科技有限公司
移液器	美国 Gilson 公司
载玻片	江苏飞舟玻塑有限公司
盖玻片	江苏飞舟玻塑有限公司
细胞刮	美国 Corning 公司
一次性滤器	美国 Corning 公司
6 孔板	无锡耐思生物科技有限公司
96 孔板	无锡耐思生物科技有限公司
24 孔板	无锡耐思生物科技有限公司

PVDF 膜	德国 Millipore 公司
医用胶片	中国 Carestream 公司
流式管	美国 BD 公司
200 目尼龙过滤网	美国 Corning 公司
注射器	长春白求恩医疗器械有限公司
定性滤纸	江苏泰州市奥克滤纸厂

2.1.3 主要实验仪器

高压灭菌器	日本 Yamato 公司
水平摇床	江苏海门其林贝尔公司
迷你离心机	江苏海门其林贝尔公司
4℃冰箱	青岛海尔公司
-20℃低温冰箱	青岛海尔公司
-80℃低温冰箱	日本 Sanyo 公司
无菌超净工作台	江苏净化设备厂
CO ₂ 培养箱	日本 Sanyo 公司
光学显微镜	日本 Olympus 公司
荧光显微镜	日本 Olympus 公司
垂直电泳仪	美国 Bio-rad 公司
倒置显微镜	日本 Olympus 公司
制冰机	日本三洋公司
Vortex-Genie2 涡旋振荡器	美国 Scientific Industries 公司
Pico&Fresco 台式离心机	德国 Heraeus 公司
流式细胞检测仪	美国 BD FACS Aria 公司
酶标仪	美国 Bio Tek 公司
Epoch 核酸蛋白浓度测定仪	美国 Bio Tek 公司仪
干式恒温器	中国杭州奥盛仪器有限公司
恒温水浴锅	中国常州润华电器有限公司

荧光定量 PCR 仪	美国 Bio-rad 公司
PCR 仪	美国 Applied Biosystems 公司
X 射线摄影暗匣	中国奥华公司
ACCMLAB 电子天平	德国 Sartorius 公司
X 射线辐照仪 X-RAD 320i X	美国 Precision X-ray, Inc 公司
金属浴	大龙兴创实验仪器（北京）有限公司

2.1.4 试剂配制

2.1.4.1 细胞培养相关试剂配制:

(1) PBS

200mL 超纯水加入 1 片 PBS, 混匀, 120 °高压 30min, 4℃ 保存。

(2) MEM 培养基

向 1L 超纯水中加入 1 袋 MEM 粉末培养基及 2.2g NaHCO₃, 搅拌混匀, 操作台里过滤, 4℃ 保存。

2.1.4.2 免疫荧光实验相关试剂配制:

(1) 0.2%Triton(TM)X-100

向 50mL PBS 中加入 100μL Triton(TM)X-100, 溶解后室温保存。

(2) 2%BSA

向 10mL PBS 中加入 0.2gBSA, 颠倒混匀, 4℃ 保存。

(3) 一抗、二抗

用 PBS 稀释, 稀释浓度按说明书推荐的比例进行稀释, 4℃ 保存, 二抗避光保存。

2.1.4.3 Western Blot 实验相关试剂配制:

(1) 上样缓冲液 (5×SDS)

PH 为 6.8 的 0.5mol/L Tris-HCL2.5mL;DTT 0.39g;SDS 0.5g; 溴酚蓝 0.025g; 甘油 2.5mL; 混匀后用双蒸水定容至 10mL, 分装到 1.5mL EP 管中, 4℃ 保存。

(2) 电泳缓冲液

甘氨酸 14.4g; SDS 1g; Tris-base 3g; 1000mL 双蒸水, 室温保存。

(3) 转膜缓冲液

3g Tris-base ; 14.4g 甘氨酸; 800mL 双蒸水; 200mL 甲醇, 4℃保存。

(4) TBST

先用超纯水将 20×TBS 稀释成 1×TBS, 1000mL 1×TBS 加 1mL 吐温 20。

(5) 封闭液

1×TBS 100mL 加入脱脂奶粉 5g, 配成 5%封闭液, -20℃保存。

(6) 10% 过硫酸铵

0.2mL 超纯水加 0.02g 过硫酸铵, 现用现配。

2.1.4.4 细菌实验试剂配置

(1) LB 固体培养基配置

向 500mL 的超纯水中分别加入 5.00g NaCl、5.00g 胰蛋白胨、2.50g 酵母、5.00g 琼脂粉, 混匀, 高压灭菌, 待温度下降到 55℃时加入适量 Amp, 至最终浓度为 100μg/mL。

(2) LB 液体培养基

向 500mL 超纯水中加入 5.00g NaCl、5.00g 胰蛋白胨、2.50g 酵母, 混匀, 高压灭菌, 待温度下降到 55℃时加入适量 Amp, 至最终浓度为 100μg/mL。

2.2 实验方法

2.2.1 细胞培养

人肝癌细胞 HepG2 购自上海市科佰生物公司, 使用 MEM 培养基 (包含 10% 的胎牛血清及 1%青/链霉素双抗), 在 5% CO₂、37℃条件下恒温培养箱中培养。

2.2.2 X 线照射

采用 X-RAD320 生物辐照仪 (美国 PXI) 对细胞进行照射, 照射条件: 电压 180Kv, 电流 12.0mA, 靶皮距 70cm, 剂量率 1.0Gy/min。选取 4Gy 和 8Gy 为最终辐照剂量。

2.2.3 细胞周期检测方法

(1) 照射前一天种板, 使用 10cm 的培养皿, 每个培养皿接种的细胞数为 5×10^5 个. 分两个大组, 一个单独照射组, 一个照射+ GSK126 组, 每组两个时间点 12h、24h; 6 个照射剂量点分别为 0 Gy、0.5 Gy、1 Gy、2 Gy、4 Gy、8 Gy, 照射+ GSK126 组加入 GSK126 的量为 $2 \mu\text{mol}$ 。

(2) 收集细胞: 在培养箱中培养 12h 和 24h 后分别收集细胞, 吸出培养基, 用 PBS 洗 1 次, 加入 2mL 无 EDTA 的酶消化, 收集到离心管中, 1500r/min, 5min。再加入 2mL PBS 重悬并洗细胞两遍。

(3) 留液重悬后加入预冷的 75%乙醇 6mL 固定 (2 小时至过夜), 4°C 保存;

(4) 将所有固定的样本离心 2000 r/min, 5min, 之后用预冷 PBS 洗一次;

(5) 加 $200 \mu\text{L}$ PBS 重悬, 重悬液经过 200 目滤网过滤到流式管中。

(6) 之后按照细胞周期检测试剂盒说明书的步骤进行, 向流式管中加 $100 \mu\text{L}$ RNaseA, 水浴锅中水浴 37°C 30min, 再加 PI $300 \mu\text{L}$ 混匀, 4°C 避光 30min; 上机检测, 激发波长 488nm, 红色荧光。

2.2.4 CCK8 法检测抑制剂 GSK126 对 HepG2 细胞的毒性作用

(1) 将处于对数生长期的 HepG2 细胞按 4000 个/孔的密度接种于 4 个 96 孔板中, 保证没孔细胞液 $200 \mu\text{L}$, 于恒温培养箱中培养 24h。

(2) 配制含有 GSK126 不同浓度的培养基, 浓度分别为: $0.5 \mu\text{mol}$ 、 $1 \mu\text{mol}$ 、 $2 \mu\text{mol}$ 、 $4 \mu\text{mol}$ 、 $8 \mu\text{mol}$ 、 $16 \mu\text{mol}$ 、 $32 \mu\text{mol}$, 每组设置三个重复孔, 一个空白对照组, 吸出上清, 加入 $200 \mu\text{L}$ 已配置好含有 GSK126 的培养基, 恒温培养箱培养 72h。

(3) 吸出 $100 \mu\text{L}$ 上清, 每孔加 $10 \mu\text{L}$ CCK8, 混匀, 培养箱中孵育, 于 1h、2h、3h 后用酶标仪以 570nm 波长测其吸光度值。最后根据各组吸光度(OD 值) 计算抑制率及 IC_{50} 值。

2.2.5 免疫荧光

(1) 将新购买 20mm×20mm 的玻片自来水下冲洗干净之后浸泡在 75%的酒精中过夜，用二蒸水清洗 5 次，高压灭菌、烤干，使用前 30min 先将玻片浸泡在 PBS 中，备用；

(2) 将浸泡在 PBS 中的玻片取出分别放在 6 孔板培养皿的每个孔中，用灭过菌的镊子轻轻按压玻片使其与板底之间无气泡，每孔接种 4000 个细胞，恒温培养箱中培养；

(3) 24h 后采用 X-RAD320 生物辐照仪对细胞进行 4 Gy、8 Gy 的辐照剂量，照射后尽快加入 2μmol/L 的 GSK126；

(4) 处理后的细胞每孔用 2mLPBS 清洗 3 次，每次 3min；

(5) 每孔 2mL 4%多聚甲醛固定，30min；

(6) 每孔用 2mLPBS 清洗 3 次，每次 3min，之后每孔加 500μL Triton-X100 透化，室温 10-20min；

(7) 每孔用 2mLPBS 清洗 3 次，每次 3min，加入 1mL 2%BSA 室温封闭 20-30min；

(8) 分别加入已经稀释好的一抗 γH2AX 和 H3K27me3 200μL，4℃过夜；

(9) 每孔用 2mLPBS 清洗 3 次，每次 3min，加入相对应的有荧光标记的二抗 200μL，室温避光 1h；

(10) 每孔用 2mLPBS 清洗 3 次，每次 3min，每孔加 DAPI 染液 200μL，室温避光放置 5min；

(11) 每孔用 2mLPBS 清洗 3 次，每次 3min，将玻片取出，用抗荧光衰减封片剂将其固定在载玻片上，4℃放置 30min 后在正置荧光显微镜下观察。

2.2.6 EZH2 干扰 RNA 细胞模型建立

干扰 RNA 序列：

hEZH2-siRNA1	GAGGTTTCAGACGAGCTGAT
hEZH2-siRNA2	GCAAATTCTCGGTGTCAAA
hEZH2-siRNA3	GAGGGAAAGTGTATGATAA

(1) 细胞接种：6孔培养板，细胞数 $1-1.2 \times 10^5$ /孔，加入 2.5mL 无抗生素的培养基，培养 24h 后细胞密度大概 40%；

(2) siRNA-RFect 转染液的制备

siRNA 稀释液：250 μ L 无血清培养基+3 μ L siRNA

RFect 稀释液：250 μ L 无血清培养基+10 μ L RFect



轻轻混匀，室温 5min；将 siRNA 稀释液与 RFect 稀释液混合，缓慢颠倒混匀，室温 20min；

(3) 每个孔内加入 500 μ L siRNA-RFect 转染液，轻轻晃动培养板，混匀，恒温培养箱培养 36h，注意观察细胞状态，检测转染效率，为后续实验准备。

2.2.7 EZH2 过表达细胞模型建立

2.2.7.1 过表达质粒的扩增（过表达质粒为 pLNCX2,来源于厦门大学金光辉课题组）

(1) 制备 LB 平板（包含 Amp 抗生素）；

(2) 向 1.5mL EP 管中加入 50 μ L 感受态细胞，置于冰上，再加已经稀释好倍数的质粒 20 μ L，混匀，冰上静置 30min；

(3) 42℃ 水浴，热休克 90s，快速放置冰上 3-5min；

(4) 加入不含抗生素 LB 液体培养基 1mL，混匀，37℃、180r1h，使细菌状态恢复正常并表达质粒编码的抗生素抗性基因；

(5) 向含有 Amp 抗生素的 LB 平板上加 100 μ L 菌液，均匀涂布；

(6) 待菌液浸入培养基后，37℃倒置培养 12h-16h，出现菌落；

(7) 选取长势好的单克隆菌落于 4mL 含有 Amp 抗生素的 LB 液体培养基中，37℃，150rpm/5h；

(8) 向 200mL 含 Amp 的 LB 液体培养液中加入 50 μ L 菌液，37℃，150rpm 过夜。取出部分菌种保存备用，其余的用做质粒的提取。

2.2.7.2 过表达质粒的大提

DAY 1:

(1) 向 50mL 离心管中加 200mL 菌液，5000rpm 离心 10min，去上清收集菌体；

(2) 加入 10mL Solution I 重悬，涡旋震荡；再加入新配的 Solution II 20mL，缓慢颠倒混匀，室温静止 8min；继续加入 15mL 提前预冷的 Solution III，颠倒混匀，冰上放置 10min；

(3) 4℃，8000rpm 离心 15min，用高压灭菌后底部塞有棉花的 50mL 注射器收集过滤上清；加入 0.6~1 倍体积的异丙醇，颠倒混匀，-20℃沉淀 30min；

(4) 4℃，10000rpm，离心 15min，去上清；加 2mL 70%乙醇漂洗，4℃，离心 10000rpm 15min，去上清，倒扣空干，置于菌培超净台中挥发 15min；加 3mL DDW 溶解 DNA 沉淀，转移到预冷的 50mL 离心管中；加等体积预冷的 5M LiCl 混匀；

(5) 4℃，离心 10000rpm 10min，将上清吸取到新的 50mL 离心管中，加等体积（6mL）异丙醇，混匀，-20℃沉淀 30min

(6) 4℃，离心 10000rpm 10min，去上清，2mL 70%乙醇清洗管壁及沉淀，4℃，10000rpm，离心 10min，去上清，倒扣控干，用细菌超净台挥发 15min；

(7) 用 500μL DDW 溶解沉淀；转移到 1.5mL EP 管中，加入终浓度为 20μg/mL 的 RNase A（各加 1μL 10mg/mL RNase A），37℃水浴，反应 30min；各加 500μL PEG8000-MgCl₂，混匀，4℃沉淀过夜。

DAY 2:

(8) 4℃ 离心 12000rpm 20min，去上清，倒扣控干；

(9) 重悬沉淀物，加 500μL 70%乙醇，4℃，12000rpm，离心 5min，再重复一次，去上清，室温挥发 10min，用 400μL DDW 溶解沉淀，吹打散匀；

(10) 用酚/氯仿/异戊醇（25:24:1）抽提蛋白，剧烈混匀，4℃12000rpm 离心 15min；收集上清于另一管中，重复上一步两次，第三次吸取 2/3 体积上清即可；

(11) 加入 1/10 体积的 3mol NaAc（PH5.2），再加两倍体积冰预冷的无水乙醇沉淀 DNA，冰浴 30min；

(12) 4℃, 13000rpm, 离心 10min, 去上清; 加 500μL 预冷的 70%乙醇, 洗涤两次; 4℃离心 13000rpm 5min, 去上清, 倒扣控干, 室温晾 10min, 加 200μL TE 溶解质粒。

2.2.7.3 EZH2 过表达质粒转染 293T 细胞

DAY 1:

(1) 接种细胞: 6 孔板、细胞数约 8×10^4 个/孔、2mL 培养基, 使第二天的细胞数占板底面积 40%为宜;

(2) 制备转染液

A 液: 250μL 无血清培养基+8 μL LipofectamineTM2000 转染液

B 液: 250μL 无血清培养基+4μg 质粒



静置 5min, 将 A 液与 B 液混合, 用枪头轻轻吹吸, 混匀, 室温静置 20min;

(3) 将混合液加到待转染的 293T 细胞, 注意观察细胞状态, 恒温培养箱培养 24h-36h, 检测转染效率, 为后续实验准备。

2.2.8 转录水平检测

2.2.8.1 RNA 的提取

(1) 实验耗材准备: 高压灭菌 120℃, 2h;

(2) 六孔板接种的细胞, 先用预冷的 PBS 每孔 2mL 轻轻的洗 2 次, 之后每孔加入 500μL Trizol, 用移液器反复吹打并移至 1.5mL EP 管中;

(3) 每管加入 100μL 的氯仿, 剧烈震荡 15s, 静止 3min。4℃12000r/min 离心 15min, 静止 5min, 吸取上清液至新的 1.5mL EP 管中, 避免吸入蛋白层;

(4) 加入与上清液同等体积的异丙醇, 颠倒混匀, 室温静止 15min, 沉淀 RNA;

(5) 4℃12000r/min 离心 15min;

(6) 倒尽上清, 每管加入 75%的乙醇 1.2mL, 洗涤沉淀两次, 每次 8000r/min, 5min;

(7) 倒尽乙醇, 于滤纸上倒置干燥 5min;

(8) 加入 20μLRNase-free 水重新溶解;

(9) 使用 Bio-Tek 的 Epoch 微孔板核酸蛋白分析仪，定量检测 RNA 浓度；

2.2.8.2 逆转录

(1) 配制去除基因组 DNA 的反应液

5×gDNA Eraser Buffer	2μL
gDNA Eraser	1μL
RNA	1μg
H ₂ O	up to 10μL

(2) 反应条件 42℃ 2min → 4℃ ∞

(3) 配制逆转录反应液

RT mix	1μL
RT Primer	1μL
5×PS Buffer	4μL
H ₂ O	4μL
去除基因组 DNA 的反应液	10μL

(4) 反应条件 37℃ 15min → 85℃ 5s → 4℃ ∞，得到 cDNA 供后续实验使用（可-20℃保存）

2.2.8.3 Real-time PCR 反应

(1) 反应体系 25μL

SYBR pmix Ex Taq	12.5μL
Forward primer (10μmol/L)	1.0μL
Reverse primer (10μmol/L)	1.0μL
DNA 模板	2.0μL
dd H ₂ O	8.5μL

(2) 反应条件：变性 95℃ 2min → 退火 95℃ 5s → 延伸 60℃ 30s，共 40 个循环。

2.2.9 Western Blot

2.2.9.1 蛋白提取

- (1) 取平皿于冰上操作，清洗两次，每次沿板壁加入 1mL PBS；
- (2) 吸除 PBS 再加入 1mL PBS，用细胞刮刮下细胞，将其吸入到 1.5mLEP 管中，离心 12000r/min，5min，吸除上清；
- (3) 依据细胞量，加入其 5 倍体积的裂解液（如：200 μ L RIPA+2 μ L PMSF），置于冰上裂解，每 5min 在振荡器上震荡 15s，共裂解 30min-60min。
- (4) 4℃离心 12000r/min 5min，取上清于 1.5m LEP 管中，用于后续实验，-80℃保存。

2.2.9.2 蛋白浓度测定

采用 BCA 试剂盒测定方法：

- (1) 25mg/mL 的蛋白标准溶液配制：向蛋白标准管中加 1.2mL 标准配制液，混匀即可；
- (2) 0.5mg/mL 蛋白标准液配制：向新的 1.5mL EP 管中加 980 μ L PBS，20 μ L 25mg/mL 蛋白标准液混匀备用，-20℃长期保存；
- (3) BCA 工作液配制：根据样品数量，按 50 μ L 试剂 A+1 μ L B(50:1)配制适量 BCA 工作液，充分混匀。
- (4) 将 0.5mg/mL 蛋白标准液按 0、1、2、4、8、12、16、20 μ L 顺序加到 96 孔板中，PBS 补足到 20 μ L；
- (5) 向样品孔中加 2 μ L 蛋白样，再加 18 μ L PBS 补足到 20 μ L；
- (6) 每孔加 200 μ L BCA 工作液，37℃放置 30min；
- (7) 用酶标仪测定 A562 波长下的吸光度，根据数据制作标准曲线，计算样品蛋白浓度；

2.2.9.3 SDS-PAGE 的配制

(1) 分离胶、浓缩胶液配方:

	12%分离胶		5%浓缩胶		10%分离胶	
总体积	5mL	10mL	2mL	4mL	5mL	10mL
水(mL)	1.6	3.3	1.4	2.7	2.0	4.0
30%丙烯酰胺(mL)	2.0	4.0	0.33	0.67	1.7	3.3
1.5mmol/L Tris 溶液(pH8.8)(mL)	1.3	2.5	—	—	1.3	2.5
1.0mmol/L Tris 溶液(pH6.8)(mL)	—	—	0.25	0.5	—	—
10%SDS(mL)	0.05	0.1	0.02	0.04	0.05	0.1
10%过硫酸铵溶液(mL) (催凝剂)	0.05	0.1	0.02	0.04	0.05	0.1
TEMED(mL)	0.002	0.004	0.002	0.004	0.002	0.004

(2) 制胶程序

1)装板

2)制备分离胶: 根据所要蛋白分子量配制相应百分比的分离胶, 按照配方中的试剂顺序向烧杯中依次加入相应试剂, 混匀, 在玻璃板间隙缓慢注入, 直到胶与顶端距离约 1cm 即可停止。

3)缓慢从左往右均匀加入去离子水, 待分离胶凝固。

4)20min 后观察分离胶凝固后, 倒掉去离子水, 用滤纸吸干。

5)制备浓缩胶, 按照配方所示试剂顺序及量依次加到小烧杯中, 混匀, 从玻璃板间隙的一侧缓慢加入浓缩胶大概 1.5mL, 选取合适的梳子插到两块玻璃板缝隙中, 避免产生气泡, 室温放置待凝固。

6)凝固后, 缓慢均匀用力将梳子拔出, 准备电泳或 4℃ 备用。

2.2.9.4 电泳

(1) 蛋白样的准备: 保证每个样的上样量一致, 将样品与上样缓冲液混匀, 最终上样缓冲液稀释成 1×, 之后蛋白质变性 100℃ 3-5min;

(2) 将凝胶装到电泳槽中, 向内槽加满新配的电泳缓冲液, 外槽加大概 400mL;

(3) 按顺序上样, 上样时注意缓慢匀速加样, 不要有气泡。

(4) 电泳(恒压)开始时电压 80V, 约 20min; 样品进入分离胶后, 增加到 120V, 直到染料到达分离胶底端时停止电泳, 约 40min;

(5) 卸下玻璃板, 切取需要的凝胶部分, 为下一步实验使用。

2.2.9.5 转膜

(1) 配制转膜液, 裁剪适当大小的 PVDF 膜;

(2) 转膜前 30min 将剪好的 PVDF 膜浸泡在甲醇溶液中, 使其激活; 并将二层滤纸和海绵浸泡在转膜缓冲液中;

(3) 做夹层: 塑料夹板(黑)→海绵→二层滤纸→凝胶→PVDF 膜→二层滤纸→海绵→塑料夹板(白)。装到转膜槽中, 并在两侧加冰冰袋防止转膜热量过大。

(4) 接通电源 90V, 90-120min;

(5) 转膜结束, 关闭电源, 将膜取出, 用丽春红染色 2min, 确定转移效率。回收丽春红, 裁剪需要的条带, 然后用蒸馏水洗去背景染料颜色。

2.2.9.6 封闭和免疫反应

(1) 用 5%的封闭液封闭蛋白膜在室温摇床上 1-2h;

(2) 吸出封闭液, 用已经稀释好的一抗孵育, 室温摇床上 1h 后于 4℃过夜;

(3) 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10min, 之后加入相应的二抗, 室温轻摇 1h;

(4) TBST 洗膜 3 次, 每次 10min;

2.2.9.7 ECL 显影

在暗室中操作, 取适量 ECL 发光液于蛋白条带上, 静止 2min, 用吸水纸将过多发光液吸出, 采用暗板夹及柯达 X 光胶片进行曝光。

2.2.9.8 图像及定量分析

Western Blot 条带结果采用 Image J 软件进行灰度分析。

2.2.10 染色质免疫共沉淀技术(ChIP)

Day1

(1) 将培养皿中的细胞收集到 50mL 离心管中, 1600rpm 离心 5min, 移除培养基;

- (2) 加入 19mL 1%的甲醛 (1mL37%甲醛+36mL PBS) ,进行交联;
- (3) 37℃孵育 10min;
- (4) 加入 1mL 2.5mol 甘氨酸, 停止交联,室温孵育 5min, 摇动;
- (5) 吸除甲醛;
- (6) 冷的 PBS 洗两次, 之后完全移除 PBS;
- (7) 加入 Szak's RIPA buffer, 转移悬浮液到新的 15mL 管中;
- (8) 4mL 悬液进行超声, 每超声 15 秒, 停止 59 秒, 功率 30%, 总时间为 8 分 30 秒。注意: 在冰上操作。
- (9) 转移超声后样品至 1.5mL 管中,12000rpm, 10min 离心;
- (10) 将上清液转移到新管中, 保持样品在冰上;
- (11) BCA 测浓度, BSA 标准品, 以及 RIPA buffer 作为对照组;
- (12) 将样品稀释到终浓度为 500μg, 加入 RIPA 使样品达到 1mL。其中 1% 样品作为 Input 组, 保存在-20℃中。
- (13) 用 RIPA 洗 Protein G magnetic beads 4 次, 每个样品 30μL beads, 加入 30μL RIPA;
- (14) 每个样品加入 5μg 抗体和 5μg IgG, 4℃ 旋转 1-2 小时;
- (15) 加入 30 μL Protein G magnetic beads, 4℃ 旋转过夜。

Day2

- (1) Put samples on magnetic beads, 移除上清。
- (2) 洗 beads : RIPA 两次, Szak's IP wash buffer 洗 4 次, RIPA 再洗两次, 4℃ 旋转 5min, 1mL 洗液;
- (3) 冷的 TE 洗两次,不需要旋转;
- (4) 移除上清, 100 μL TE , 每个样品加入 200 μL Talianidis Elution buffer ;
- (5) 65℃ 孵育 20min, 每隔 5min 涡旋样品一次;
- (6) 将上清液移到新的管中, 做好标记, 加入 12μL 5mol 的 NaCl;
- (7) 颠倒解交联 65℃, 5 小时;
- (8) 加入 20μg proteinase K , 45℃ 孵育 30min。

(9) 准备 PLG 管，12000rpm 离心 1min。将样品转移至 PLG 管中，加 300μL Phenol:Chloroform:Isoamylalcohol，剧烈震荡，12000rpm，10min 离心；

(10) 转移上清至新的 EP 管中，加入 30μL 3mol/L AcNa，750μL 无水乙醇，混匀，12000rpm，离心 20min；

(11) 移除上清，用 70%乙醇洗一次，12000rpm，离心 10min，移除 990μL，其余用 10μL 枪移除。

(12) 晾干 DNA，加入 30μL 高压灭菌后的 nuclease free water

(13) 37℃ 放置 10min 后震荡。

(14) Realtime-PCR 分析

ChIP 实验中引物序列：

Target name	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
ATM PP1	GAACGGGTGTCCTACTGTAATC	GAGCTATCCTGTGCTCAAACA
ATM PP2	TTTGAGCTTTACCTGGCTCTC	ACTTGTCTGTCAGGGTGTATTG
ATM PP3	CTCTACACTGGACGACGTATTG	CCTTCTAATAACCCGCCCTTAT
ATM PP4	GCTTGGGCTCTGGAATCATA	GCTCACCACAGGTCAAGATTA
ATM PP5	TGCCAAGGGCAGAGTTATTT	CTTCCTACGAGCCTCTGAATTG
ATMPP6	TGAGGCTTGGTGTACGAATG	TTGGAAAGAAAGGGAGGTATGG

2.2.11 统计学方法

实验中涉及的数据处理采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析，各个实验中组间数据的均值比较采用 t 检验，当 p 值小于 0.05 时则认为差异具有统计学意义。

第3章 实验结果

3.1 不同剂量电离辐射对 HepG2 细胞表型的影响

3.1.1 对细胞周期进程的影响

HepG2 细胞分别给予 0Gy、0.5 Gy、1 Gy、2 Gy、4 Gy、8 Gy 的电离辐射，分别在照射后的 12h 和 24h 收集细胞，然后采用流式细胞术检测细胞的周期变化。结果显示，随着照射剂量的增加，G₂ 期细胞比例明显增多；12h 时 G₁ 期细胞比例随照射剂量的增加明显减少，S 期无明显变化；24h 时 S 期细胞比例随照射剂量的增加明显减少，而 G₁ 期无明显变化（Fig 3.1.1A、B）。

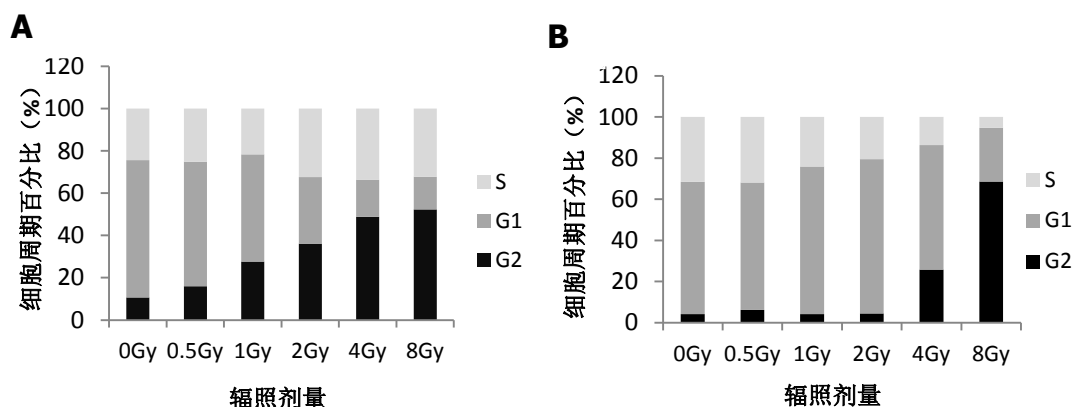


Fig3.1.1 不同剂量电离辐射对 HepG2 细胞周期进程的影响

注：A.辐照后 12h 不同剂量组细胞周期变化；B.HepG2 细胞辐照后 24h 不同剂量组细胞周期变化。

3.1.2 对细胞 DNA 损伤的影响

HepG2 细胞分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射，照射后 30min，免疫荧光检测 DNA 双链断裂标志 γ H2AX 以及 H3K27me3，采集的荧光图像，以假照组（0Gy 组）为正常对照组，观察不同剂量组呈现的荧光的点数及范围。结果显示，与假照组比较，4Gy、8 Gy 照射组 γ H2AX 的荧光强度明显高于假照组，且 8 Gy 照射组荧光强度高于 4Gy 照射组。表明电离辐射诱导 HepG2 细胞发生

DNA 双链断裂，且在一定的照射剂量范围内，随着辐照剂量的增加，发生 DNA 双链断裂的位点越多，统计分析发现照射组与对照组比 γ H2AX 焦点数显著增加（Fig 3.1.2A）；同样发现，与假照组比较，4Gy、8 Gy 照射组 H3K27me3

荧光强度明显升高，且 8 Gy 照射组荧光强度高于 4Gy 照射组，且这种变化在一定的照射剂量内呈剂量依赖性增加，差异有统计学意义（Fig 3.1.2B）。

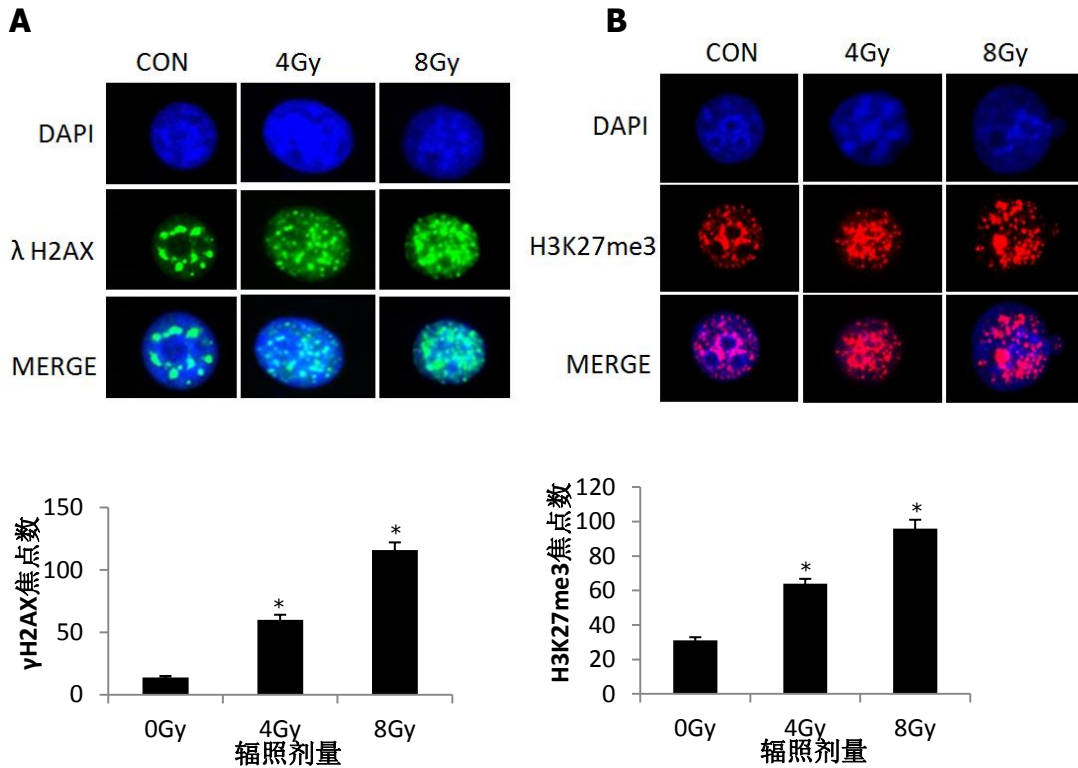


Fig3.1.2 不同剂量电离辐射对 HepG2 细胞 DNA 损伤的影响

注：A. γH2AX 的变化及焦点数统计分析；B. H3K27me3 的变化及焦点数统计分析

* $p < 0.05$ ，照射组 VS 对照组。

3.2 电离辐射对 EZH2、BMI-1 及 ATM/Chk2/ p53 通路相关基因表达水平的影响

3.2.1 对 EZH2 mRNA 表达水平的影响

HepG2 细胞分别进行 0Gy、4 Gy 和 8 Gy 的电离辐射，照射后 6h、12h 收集细胞，采用 Real-Time PCR 检测 EZH2 mRNA 的表达。Real-Time PCR 结果显示，在照射后 6h，与假照组相比，EZH2 的 mRNA 水平呈现明显的剂量依赖性增加，且差异据有统计学意义 $p < 0.05$ ，而照射后 12h 的 EZH2 mRNA 水平无明显变化规律（Fig 3.2.1 A、B）。

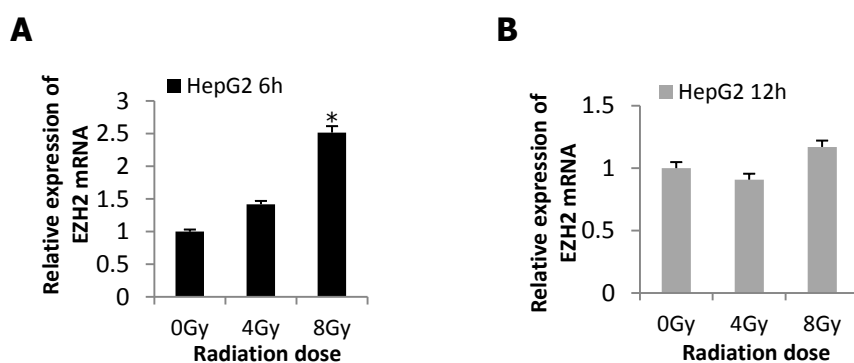


Fig 3.2.1 电离辐射对 HepG2 细胞 EZH2 mRNA 表达水平的影响

注：A. 6h EZH2 mRNA 表达水平变化； B. 12h EZH2 mRNA 表达水平变化；* $p < 0.05$ ，照射组 VS 对照组。

3.2.2 对 BMI-1 mRNA 表达水平的影响

HepG2 细胞分别进行 0 Gy、4 Gy 和 8 Gy 的电离辐射，照射后 6h、12h 收集细胞，Real-Time PCR 检测 BMI-1 mRNA 表达。结果如图，Real-Time PCR 结果显示，在照射后 6h，与假照组相比，BMI-1 的 mRNA 水平呈现明显的剂量依赖性增加，且 0 Gy 与 8 Gy 组的差异据有统计学意义 $p < 0.05$ （Fig 3.2.2 A）；而照射后 12h 的无剂量依赖性关系，但 8 Gy 组 BMI-1 mRNA 水平显著增加（Fig 3.2.2 B）。

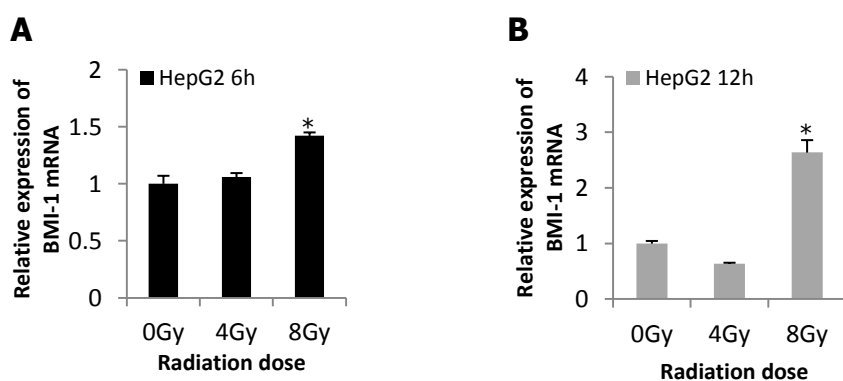


Fig3. 2.2 电离辐射对 HepG2 细胞 BMI-1 mRNA 表达水平的影响

注：A. 6h BMI-1 mRNA 表达水平变化； B. 12h BMI-1 mRNA 表达水平变化；* $p < 0.05$ ，照射组 VS 对照组。

3.2.3 对 ATM mRNA 表达水平的影响

HepG2 细胞分别进行 0 Gy、4 Gy 和 8 Gy 的电离辐射，照射后 6h、12h 收集细胞，Real-Time PCR 检测 ATM mRNA 及蛋白的表达水平。结果如图所示，与假照组相比，6h ATM mRNA 的表达水平与电离辐射具有明显的剂量依赖性增加的趋势（Fig 3.2.3 A）；与假照组相比，12h 的 ATM mRNA 在 8Gy 是显著升高（Fig 3.2.3B）。

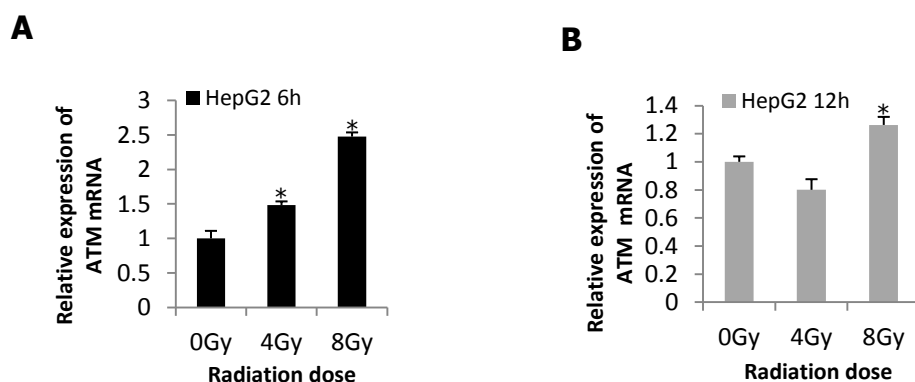


Fig3.2.3 电离辐射对 HepG2 细胞 ATM mRNA 表达水平的影响

注：A. 6h ATM mRNA 表达水平变化；B. 12h ATM mRNA 表达水平变化；* $p < 0.05$ ，照射组 VS 对照组。

3.2.4 对 Chk2 mRNA 表达水平的影响

对 HepG2 细胞分别进行 0 Gy、4 Gy 和 8 Gy 的电离辐射，6h 和 12h 后采用 Real-Time PCR 检测 Chk2 mRNA 表达。结果如图（Fig 3.2.4A.B）所示，6h 和 12h Chk2 mRNA 变化规律趋向一致，与假照组相比，均在 8Gy 时 Chk2 mRNA 表达水平表现明显增加，且差异有统计学意义($p < 0.05$)。

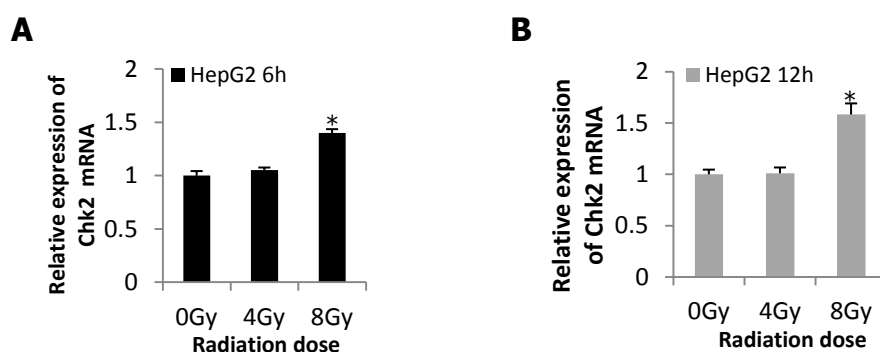


Fig3.2.4 电离辐射对 HepG2 细胞 Chk2 mRNA 表达水平的影响

注：A. 6h Chk2 mRNA 表达水平变化； B. 12h Chk2 mRNA 表达水平变化； * $p < 0.05$ ，照射组 VS 对照组。

3.2.5 对 p53 mRNA 表达水平的影响

HepG2 细胞分别进行 0 Gy、4 Gy 和 8 Gy 的电离辐射，照射后 6h、12h 收集细胞，Real-Time PCR 检测。结果如图所示，与假照组相比，6h 和 12h 的 p53 mRNA 水平均与辐射剂量之间表现出剂量依赖性增加（Fig 3.2.5 A、B）。

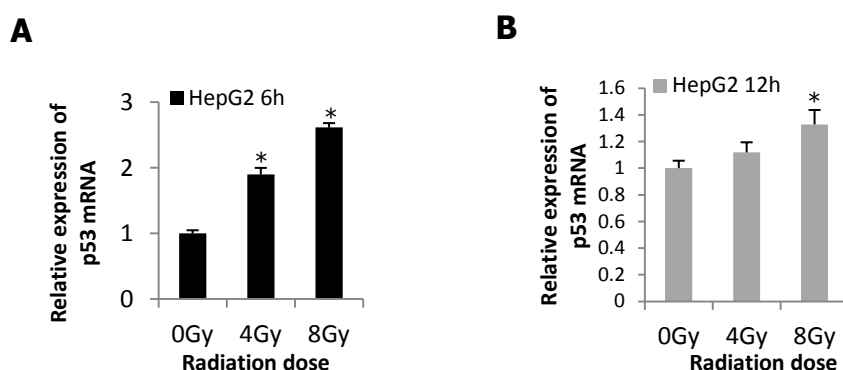


Fig3.2.5 电离辐射对 HepG2 细胞 p53 mRNA 表达水平的影响

注：A. 6h p53 mRNA 表达水平变化； B. 12h p53 mRNA 表达水平变化； * $p < 0.05$ ，照射组 VS 对照组。

3.3 电离辐射 HepG2 细胞后加入 GSK126 对 PcGs 家族中 EZH2、BMI-1、H3K27me3 和 ATM/Chk2/p53 表达水平的影响

3.3.1 HepG2 细胞中 EZH2 甲基化转移酶抑制剂 GSK126 的 IC₅₀ 测定

HepG2 细胞给予不同剂量 GSK126 进行处理, 培养 9h 后, 观察 GSK126 对细胞生长的抑制情况。为排除由于氧化作用造成结果不稳定, 我们分别检测了加入 CCK8 后 1-3h 内的吸光度值, 根据 HepG2 细胞生长抑制率达 50% 所对应的 GSK126 使用浓度, 进行后续实验浓度的选择。下图结果显示, 加入 CCK8 孵育后的结果趋向, HepG2 细胞生长抑制率为 50% 时, GSK126 使用剂量为 5.63 μ mol/L。在细胞增殖不受明显影响且达到最佳的 EZH2 生物学抑制效果下, 选择 3 μ mol/L GSK126 作为后续实验用量(Fig 3.3.1)。

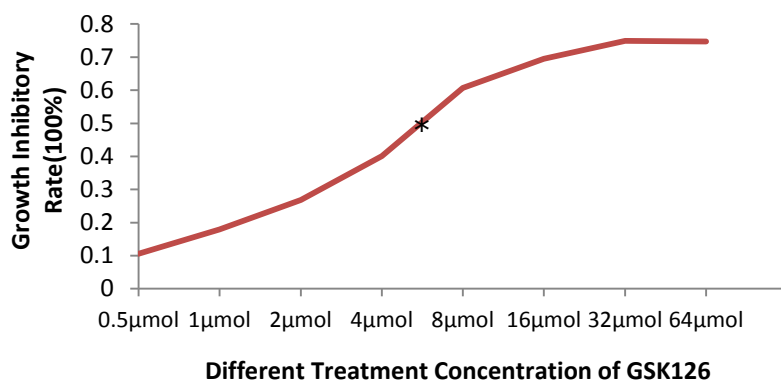


Fig3.3.1 不同浓度 GSK126 处理的 HepG2 细胞增殖程度

3.3.2 HepG2 肝癌细胞中加入 GSK126 后细胞周期变化

HepG2 细胞分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射, 照射后立即加入 GSK126, 30min 后处理细胞, 免疫荧光检测 DNA 双链断裂标志 γ H2AX 及 H3K27me3, 采集荧光图像, 以假照组 (0Gy 组) 为对照组, 观察不同剂量组呈现的荧光的点数及范围。结果显示, 从整体趋势来看, 随着辐射剂量的升高, IR+GSK126 组 G1 期细胞百分比逐渐下降, G2 期逐渐升高, S 期变化不明显(Fig 3.3.2A、B、C、D、E、F); 相同剂量下, 比较加入 GSK126 后的细胞周期变化, 12h IR+GSK126 组的 G1 期阻滞较 IR 组有所减少 (Fig 3.3.2A); 而相同照射剂量

下, IR+GSK126 组的 G2 期阻滞较 IR 组有所减少, 12h 和 24h 均表现此规律 (Fig 3.3.2 C、F)。

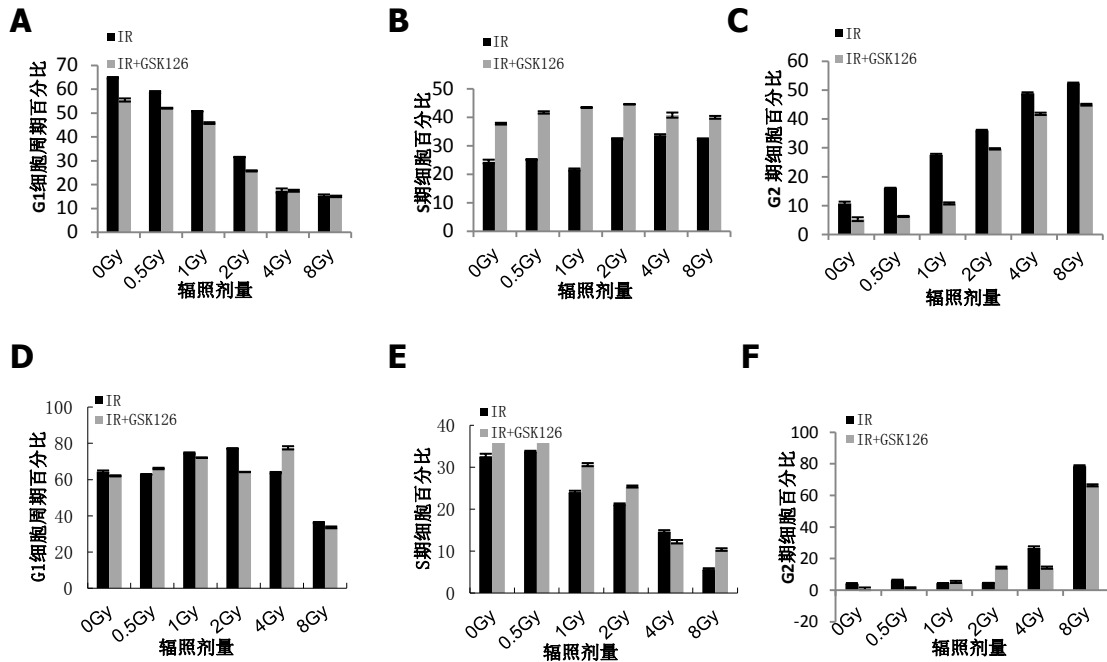


Fig3.3.2 HepG2 肝癌细胞给予 GSK126 处理后 12h 和 24h 细胞周期变化

注: A. 12h G1 期变化; B. 12h S 期变化; C. 12h G2 期变化; D. 24h G1 期变化; E. 24h S 期变化; F. 24h G2 期变化; * $p < 0.05$, IR 组 VS IR+GSK126 组。

3.3.3 DNA 损伤变化

HepG2 细胞分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射, 照射后立即加入 GSK126, 30min 后处理细胞, 免疫荧光检测 DNA 双链断裂标志 γ H2AX 及 H3K27me3, 采集荧光图像, 以假照组 (0Gy 组) 为对照组, 观察不同剂量组呈现的荧光的点数及范围。结果显示, 与假照组比较, 4Gy、8 Gy 照射组 γ H2AX、H3K27me3 荧光强度明显高于假照组, 且 8Gy 照射组荧光强度高于 4Gy 照射组; 但在相同的照射剂量下, IR+GSK126 组与 IR 组荧光强度对比发现, IR+GSK126 组的 γ H2AX 表达量明显高于 IR 组, 而 IR+GSK126 组的 H3K27me3 表达量明显低于 IR 组, 差异有统计学意义 (Fig 3.3.3 A、B、C、D)。

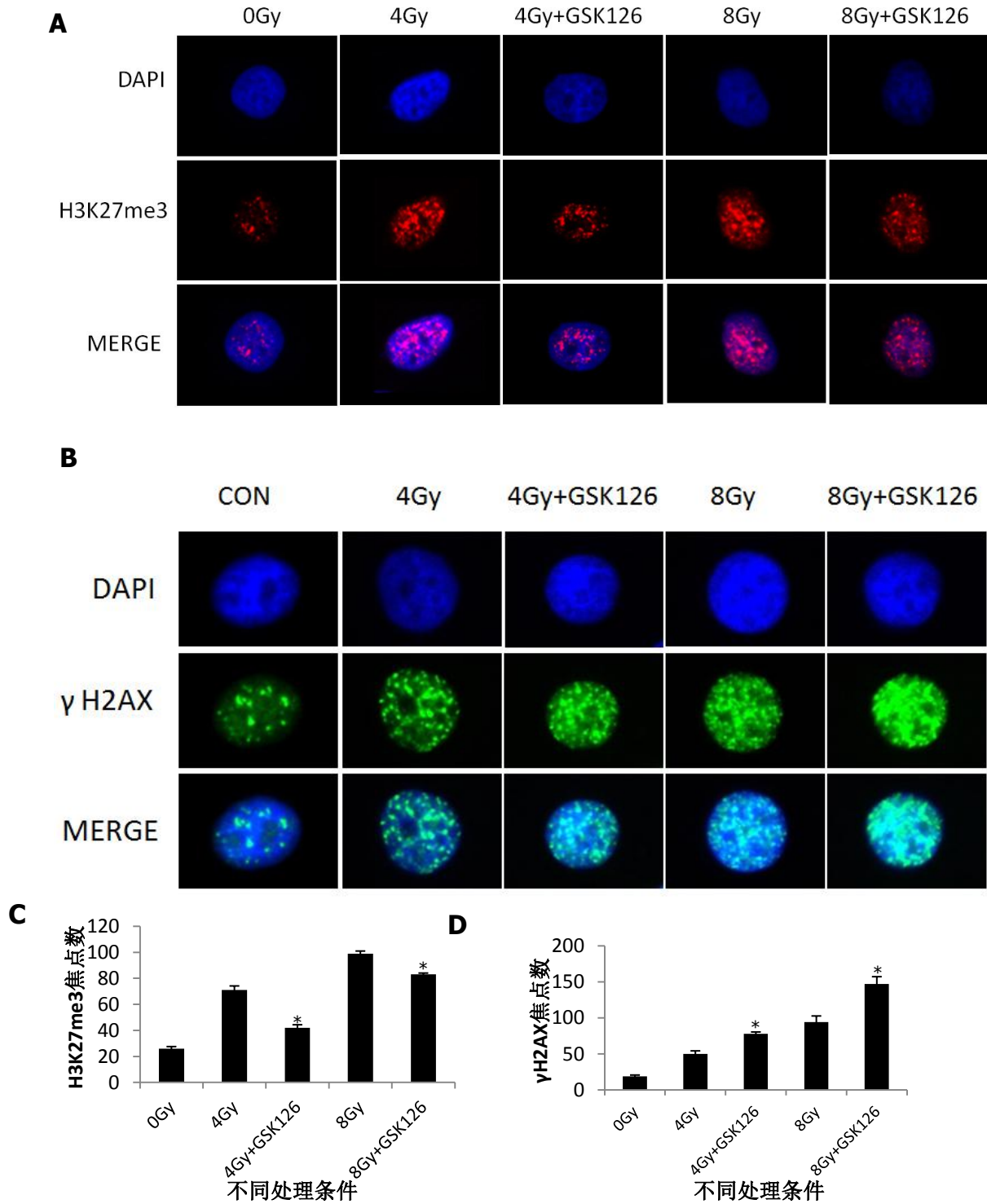


Fig3.3.3 HepG2 细胞不同处理组 γ H2AX 及 H3K27me3 的荧光检测

注：A.加入 GSK126 后 H3K27me3 免疫荧光结果；B.加入 GSK126 后 γ H2AX 免疫荧光结果

C. H3K27me3 焦点数统计分析结果 D. γ H2AX 焦点数统计分析结果；* $p<0.05$, IR 组 VS

IR+GSK126 组。

3.3.4 HepG2 细胞加入 GSK126 后对 EZH2 以及 ATM/ Chk2/ p53 通路基因 mRNA 的影响。

3.3.4.1 对 EZH2 mRNA 表达水平的影响

HepG2 细胞分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射处理后, IR+GSK126 处理组立即加入 3uM GSK126, 继续培养 6h、12h 收集细胞, 采用 Real-Time PCR 方法检测 EZH2mRNA 表达水平。结果显示, 相同照射剂量下, 6h 和 12h 均表现 IR+GSK126 组较 IR 组 EZH2 mRNA 表达水平明显升高, 差别具有统计学意义 $p<0.05$ (Fig 3.3.4.1A、B)。

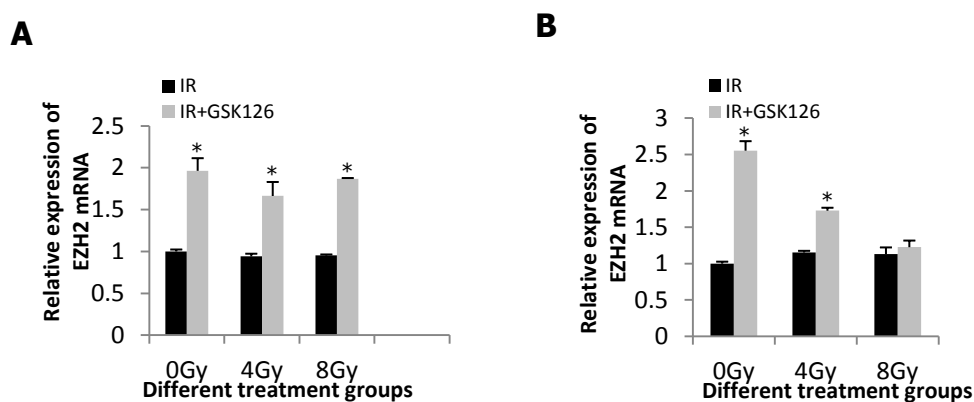


Fig 3.3.4.1 辐射诱导的 HepG2 肝癌细胞中加入 GSK126 后 EZH2 mRNA 水平的变化

注: A. 6h EZH2 mRNA 水平的变化; B. 12h EZH2 mRNA 水平的变化; * $p<0.05$, IR 组 VS IR+GSK126 组。

3.3.4.2 对 ATM mRNA 表达水平的影响

HepG2 细胞分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射处理后, IR+GSK126 处理组立即加入 3 μ mol GSK126, 继续培养 6h、12h 收集细胞, 采用 Real-Time PCR 方法检测 ATM mRNA 表达水平。结果显示, 相同照射剂量下, 结果显示 IR+GSK126 组较 IR 组 ATM mRNA 表达水平明显升高, 但 12h 8Gy 组 ATM mRNA 表达水平显著下降 (Fig 3.3.4.2 A、B)。

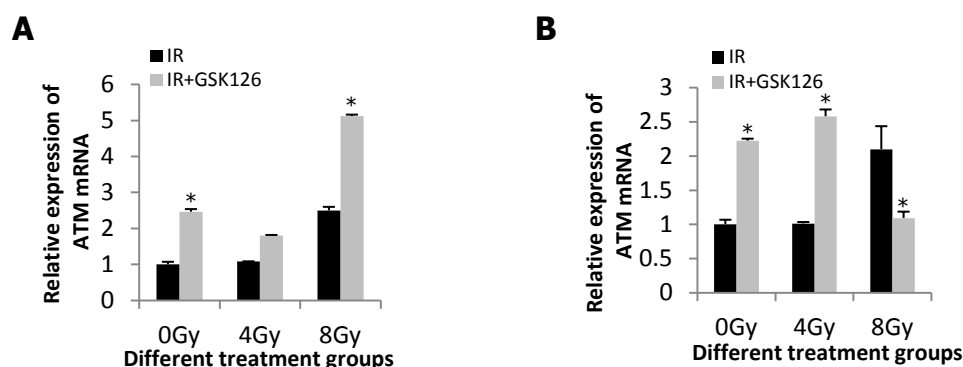


Fig 3.3.4.2 辐射诱导的 HepG2 肝癌细胞中加入 GSK126 后 ATM mRNA 水平的变化

注：A. 6h ATM mRNA 水平的变化；B. 12h ATM mRNA 水平的变化；* $p < 0.05$, IR 组 VS IR+GSK126 组。

3.3.4.3 对 Chk2 mRNA 表达水平的影响

HepG2 细胞分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射处理后，IR+GSK126 处理组立即加入 3 μ mol GSK126，继续培养 6h、12h 收集细胞，采用 Real-Time PCR 方法检测 Chk2 mRNA 表达水平。结果显示，IR+GSK126 组较 IR 组均未见明显变化（Fig 3.3.4.3 A、B）。

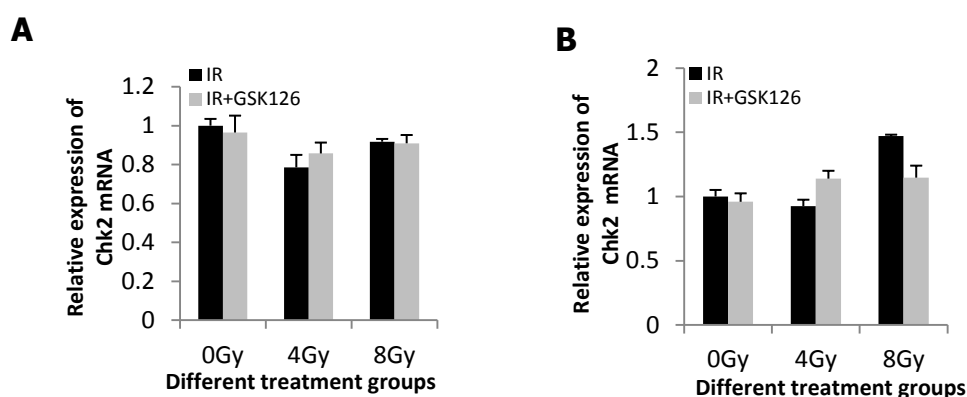


Fig 3.3.4.3 辐射诱导的 HepG2 肝癌细胞中加入 GSK126 后 Chk2 mRNA 水平的变化

注：A. 6h Chk2 mRNA 水平的变化；B. 12h Chk2 mRNA 水平的变化；* $p < 0.05$, IR 组 VS IR+GSK126 组。

3.3.4.4 对 p53 mRNA 表达水平的影响

HepG2 细胞分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射处理后，IR+GSK126 处理组立即加入 3 μ mol GSK126，继续培养 6h、12h 收集细胞，采用 Real-Time PCR

方法检测 p53 mRNA 表达水平。结果显示，相同照射剂量下，6h 组在 0Gy、8 Gy 照射下，IR+GSK126 组 p53 mRNA 表达水平较 IR 组明显升高（Fig 3.3.4.4 A）；12h 在 4Gy、8 Gy 照射下，IR+GSK126 组 p53 mRNA 表达水平较 IR 组明显降低（Fig 3.3.4.4 B）。

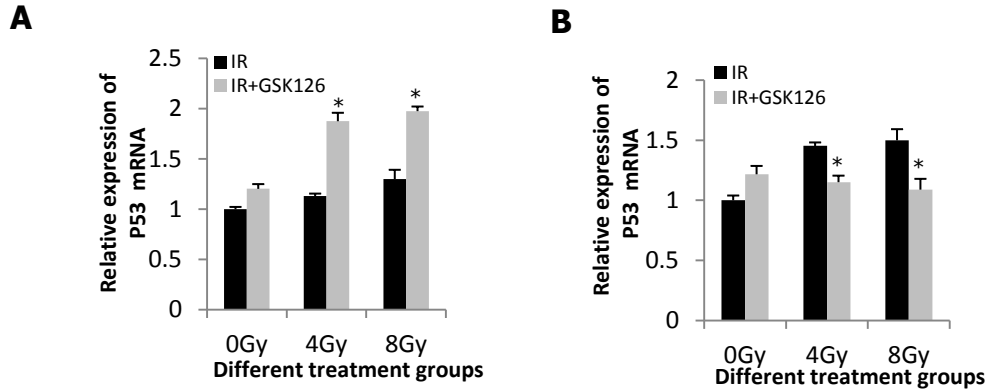


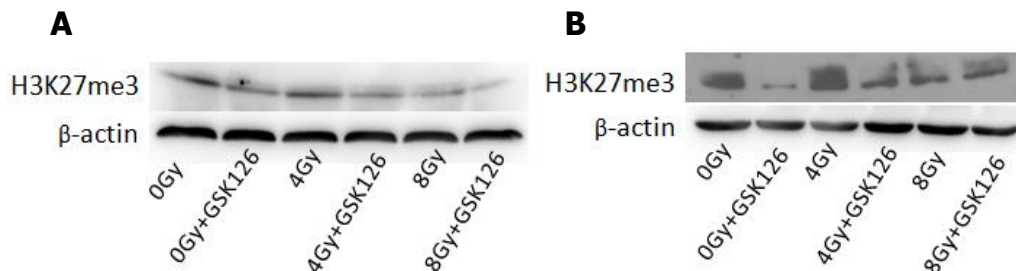
Fig 3.3.4.4 辐射诱导的 HepG2 肝癌细胞中加入 GSK126 后 p53 mRNA 水平的变化

注：A. 6h p53 mRNA 水平的变化；B. 12h p53 mRNA 水平的变化；* $p < 0.05$, IR 组 VS IR+GSK126 组。

3.4 辐射诱导的 HepG2 肝癌细胞中加入 GSK126 后对 EZH2、H3K27me3 以及 ATM/ p53 通路基因蛋白表达水平的影响

3.4.1 辐照 HepG2 细胞不同处理组 H3K27me3 蛋白表达水平变化

HepG2 细胞分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射处理后，IR+GSK126 处理组加入 3 μ mol/L GSK126，培养 6h、12h 收集细胞，采用 Western blot 实验检测 H3K27me3 蛋白水平的改变。结果如下图（Fig 3.4.1A、B）所示，在相同的照射剂量下，IR+GSK126 组 H3K27me3 蛋白表达水平较 IR 组显著降低，差异有统计学意义 $p < 0.05$ 。



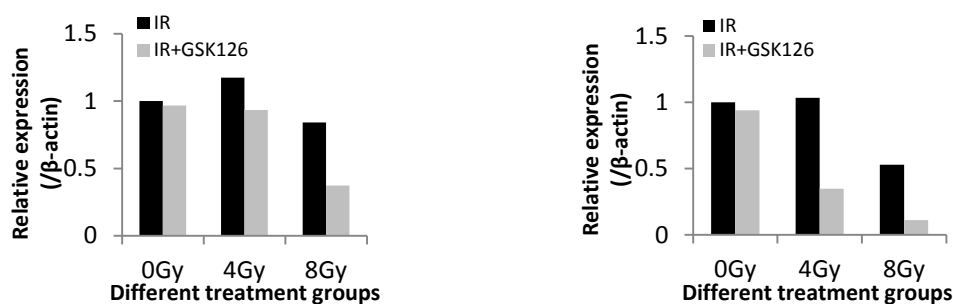


Fig 3.4.1 辐射诱导的 HepG2 肝癌细胞中加 GSK126 后 H3K27me3 蛋白表达水平的变化

注：A. 6h H3K27me3 蛋白表达变化；B. 12h H3K27me3 蛋白表达变化。

3.4.2 辐照 HepG2 细胞不同处理组 EZH2 蛋白表达水平变化

HepG2 细胞分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射处理后，IR+GSK126 处理组加入 3μmol GSK126，培养 6h、12h 收集细胞，采用 Western blot 实验检测 EZH2 蛋白水平的改变。结果如图（Fig 3.4.2A、B）所示，在 0Gy、4 Gy 照射下，6h IR+GSK126 组 EZH2 蛋白表达水平较 IR 组明显升高；在 0Gy、8 Gy 照射下，12 h IR+GSK126 组 EZH2 蛋白表达水平较 IR 组明显降低。

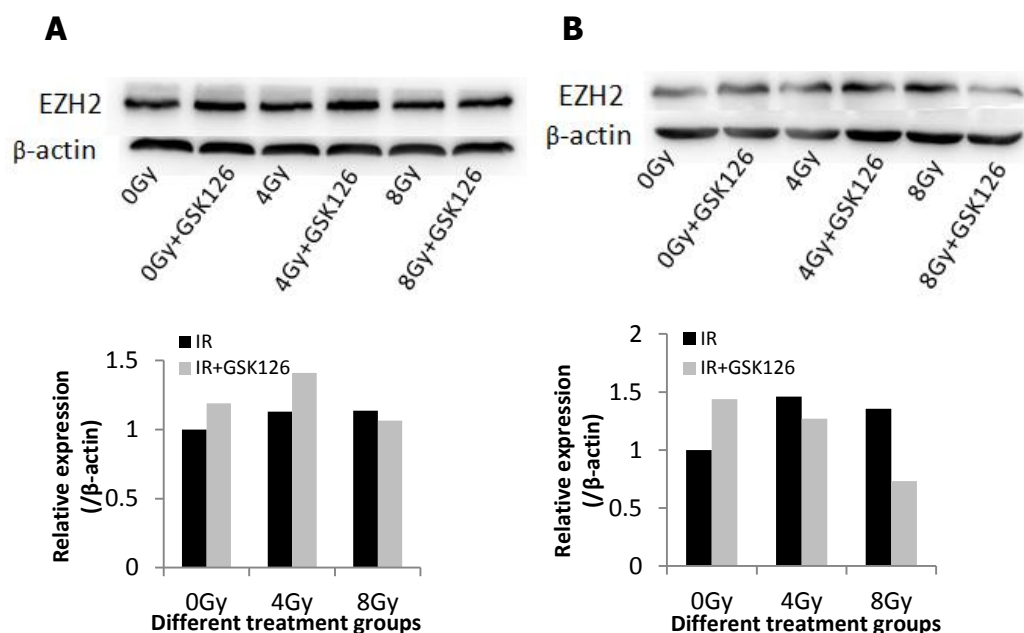


Fig 3.4.2 辐射诱导的 HepG2 肝癌细胞中加入 GSK126 后 EZH2 蛋白表达水平的变化

注：A. 6h EZH2 蛋白变化；B. 12h EZH2 蛋白变化。

3.4.3 辐照 HepG2 细胞不同处理组 ATM 蛋白表达水平变化

HepG2 细胞分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射处理后, IR+GSK126 处理组加入 3 μ mol GSK126, 培养 6h、12h 收集细胞, 采用 Western blot 实验检测 ATM 蛋白水平的改变。结果如图所示, 在 0Gy、4Gy 照射下, 6h IR+GSK126 组的 ATM 蛋白表达水平比 IR 组明显升高 (Fig 3.4.3A); 而在 0Gy、4Gy、8Gy 照射下, 12h IR +GSK126 组 ATM 蛋白表达水平比 IR 组高 (Fig 3.4.3B)。

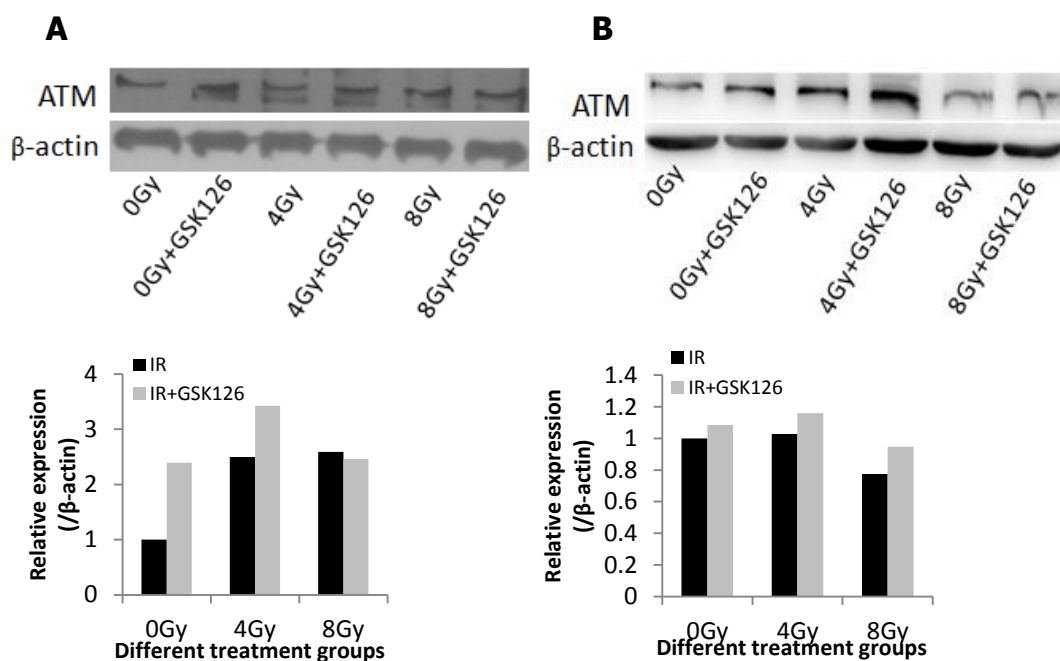


Fig 3.4.3 辐射诱导的 HepG2 肝癌细胞中加入 GSK126 后 ATM 蛋白表达水平的变化

注: A. 6h ATM 蛋白变化; B. 12h ATM 蛋白变化。

3.4.4 辐照 HepG2 细胞不同处理组 p53 蛋白表达水平变化

HepG2 细胞分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射处理后, IR+GSK126 处理组加入 3 μ mol GSK126, 培养 6h、12h 收集细胞, 采用 Western blot 实验检测 p53 蛋白水平的改变。结果如图所示, 在 4Gy、8Gy 照射下, 6h 及 12h IR+GSK126 组 p53 蛋白表达水平随着照射剂量的增高而升高 (Fig 3.4.4 A、B)。

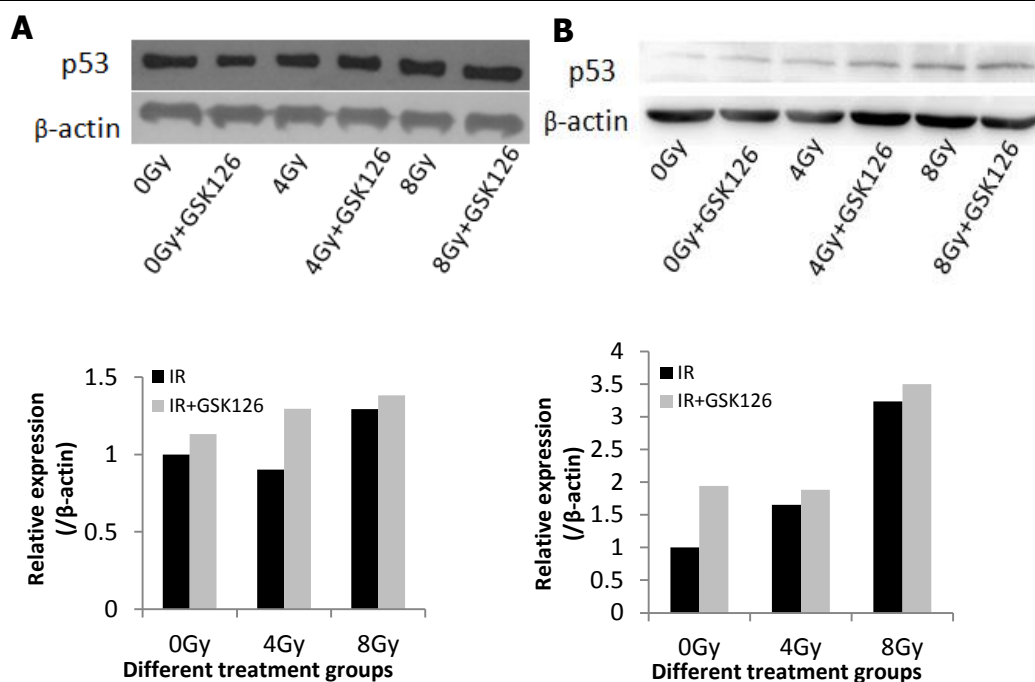


Fig 3.4.4 辐射诱导的 HepG2 肝癌细胞中加入 GSK126 后 p53 蛋白表达水平的变化

注：A. 6h p53 蛋白变化；B. 12h p53 蛋白值变化。

3.5 干扰 EZH2 后 HepG2 细胞在不同辐照剂量下 EZH2、H3K27me3 及 ATM / Chk2/p53 表达水平的变化

3.5.1 干扰 EZH2 的 Hep G2 细胞模型的建立及鉴定

采用瞬时转染方法将 siRNA 转入 HepG2 细胞，干扰 EZH2 表达。表 3.5. 1 为 siRNA 的序列。通过 Real-Time PCR 验证两条 siRNA 效果，通过 Real-Time PCR 和 Western Blot 方法对 EZH2 的表达水平进行检测。结果如图 3.5.1 所示，用 siEZH2-1 干扰的结果与对照组相比，转染细胞的 EZH2 在 mRNA 水平上降低了 3.01 倍，蛋白水平降低了 4.05 倍；用 siEZH2-2 干扰的结果与对照组相比，EZH2 在 mRNA 水平上降低了 2.125 倍，蛋白水平降低 1.04 倍。siEZH2-1 干扰效果更明显，我们选用 siEZH2-1 来建立干扰 EZH2 的 Hep G2 细胞模型。

表 3.5.1 siRNA 序列

基因	siRNA Sequence
siEZH2-1	GAGGTTTCAGACGAGCTGAT
siEZH2-2	GCAAATTCTCGGTGTCAAA

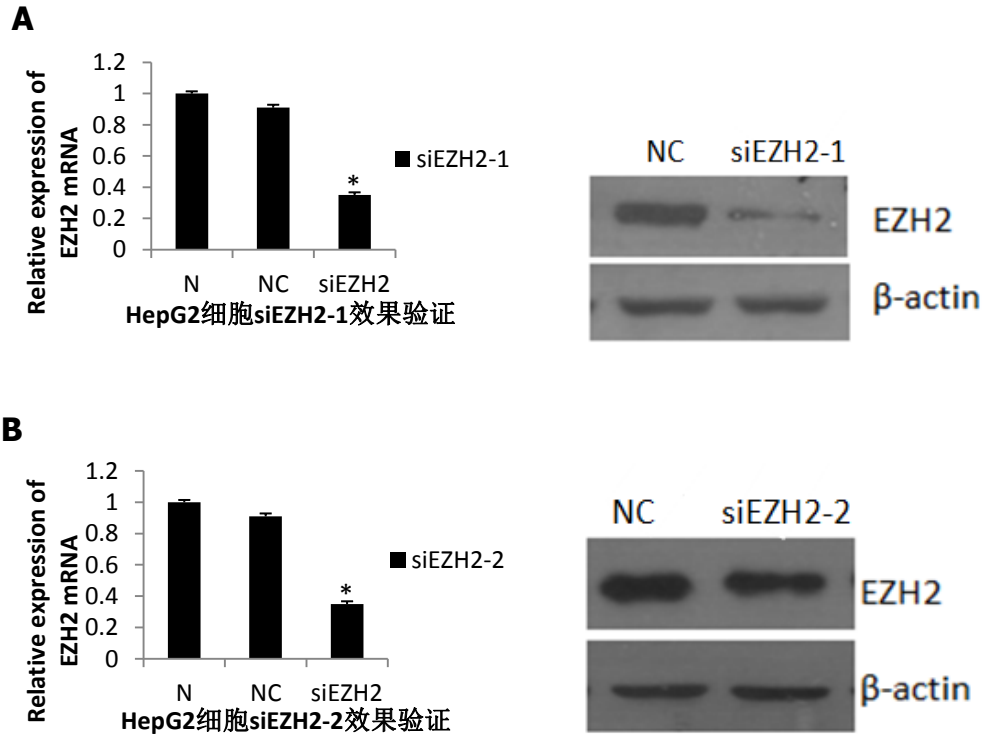


Fig 3.5.1 干扰 EZH2 后 Hep G2 细胞 EZH2 表达的变化

注 A. siEZH2-1 干扰后的 EZH2mRNA 及蛋白表达水平； B. siEZH2-2 干扰后的 EZH2 mRNA 及蛋白表达水平； * $p < 0.05$, siEZH2 VS NC。

3.5.2 干扰 EZH2 后不同剂量电离辐射对 Hep G2 细胞 γ H2AX、H3K27me3 的影响

采用瞬时转染方法将 siEZH2 转入 HepG2 细胞，干扰 EZH2 表达。转染成功后，分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射，照射后 30min 处理细胞，免疫荧光检测 DNA 双链断裂标志 γ H2AX 及 H3K27me3 的表达，采集荧光图像，以假照组（0Gy 组）为对照组，观察不同剂量组呈现的荧光的点数及范围。与假照组（N 组）比较，4Gy、8 Gy 照射组 γ H2AX、H3K27me3 荧光强度明显高于假照组，8 Gy 照射组较 4Gy 照射组更为明显，且呈剂量依赖性增加；在相同照射剂

量下, IR+siEZH2 组较 IR 组 γ H2AX 荧光强度明显升高, 而 H3K27me3 荧光强度表现为 IR+siEZH2 组较 IR 组明显减弱 (Fig 3.5.2A、B)。

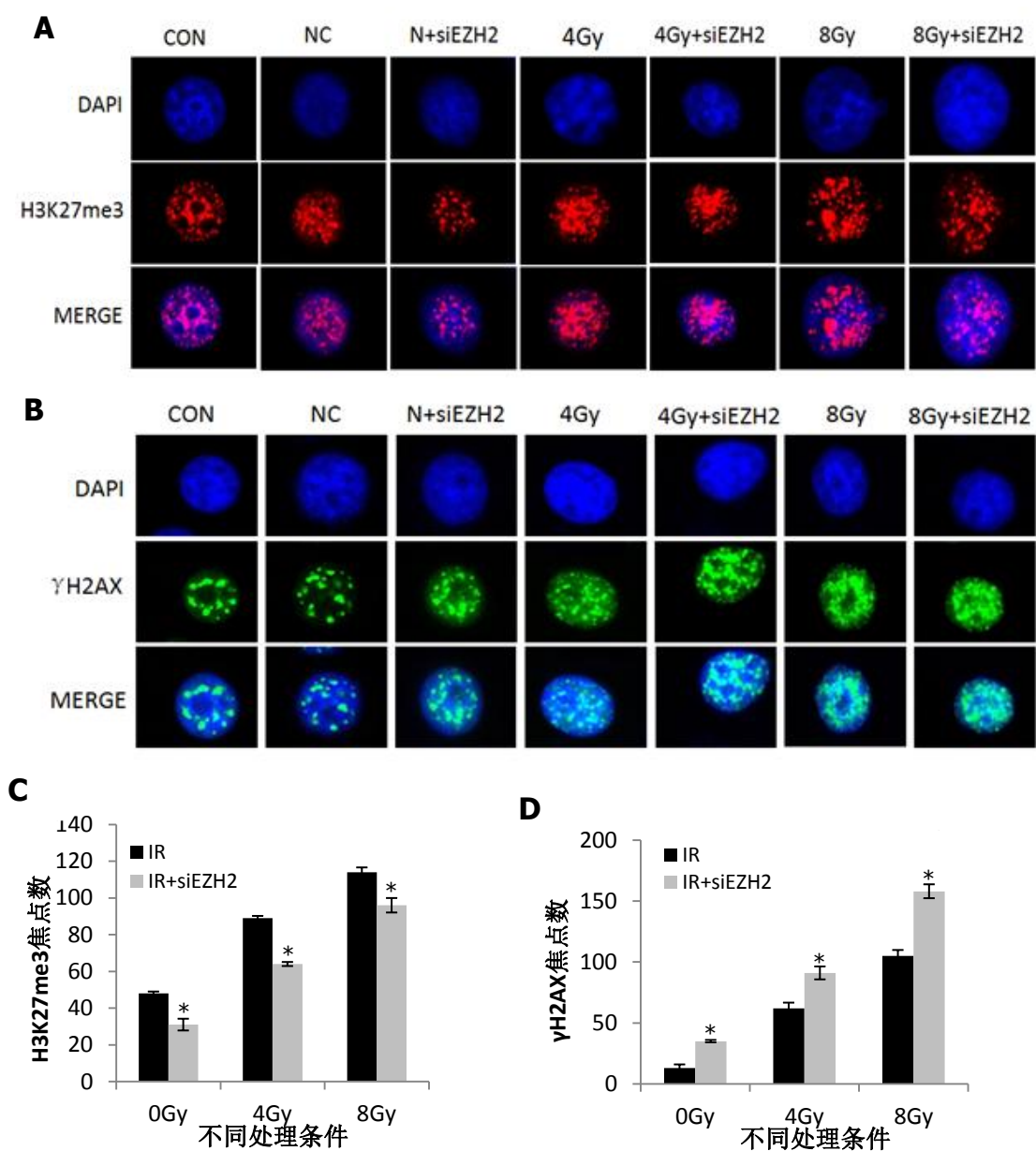


Fig 3.5.2 不同处理组 Hep G2 细胞 γ H2AX、H3K27me3 的变化

注:A. H3K27me3 的免疫荧光结果; B. γ H2AX 的免疫荧光结果 C. H3K27me3 焦点数统计分析结果 D. γ H2AX 焦点数统计分析结果; * $p < 0.05$, IR VS IR+siEZH2。

3.5.3 干扰 EZH2 后不同剂量电离辐射对 Hep G2 细胞 ATM/ Chk2/ p53 通路基因 mRNA 水平表达的影响

3.5.3.1 对 EZH2 mRNA 水平表达的影响

采用瞬时转染方法将 siRNA 转入 HepG2 细胞，干扰 EZH2 表达。转染成功后，分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射，照射后 6h、12h 收集细胞，采 Real-Time PCR 方法检测 EZH2 mRNA 水平，结果显示，在相同的照射剂量下 IR+siEZH2 组 EZH2 mRNA 水平明显低于 IR 组，且 6h、12h 均表现这一规律。

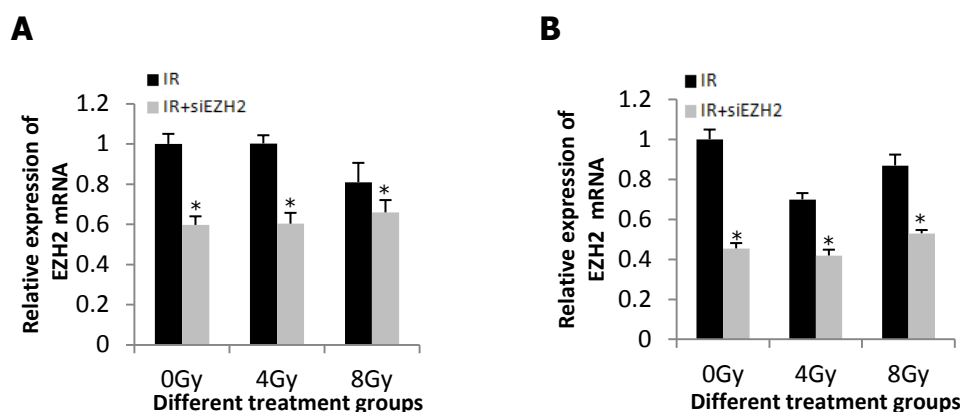


Fig 3.5.3.1 干扰 EZH2 的 Hep G2 细胞照射后对 EZH2 mRNA 水平表达的影响

注：A. 6h EZH2 mRNA 表达；B. 12h EZH2 mRNA 表达；* $p < 0.05$ ，IR VS IR+siEZH2。

3.5.3.2 对 ATM mRNA 水平表达的影响

采用瞬时转染方法将 siRNA 转入 HepG2 细胞，干扰 EZH2 表达。转染成功后，分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射，照射后 6h、12h 收集细胞，采 Real-Time PCR 方法检测 ATM mRNA 表达水平。结果显示，在相同的照射剂量下，6h 和 12h IR+siEZH2 组 ATM mRNA 水平都高于 IR 组，且都有升高的趋势(Fig 3.5.3.2A. B)。

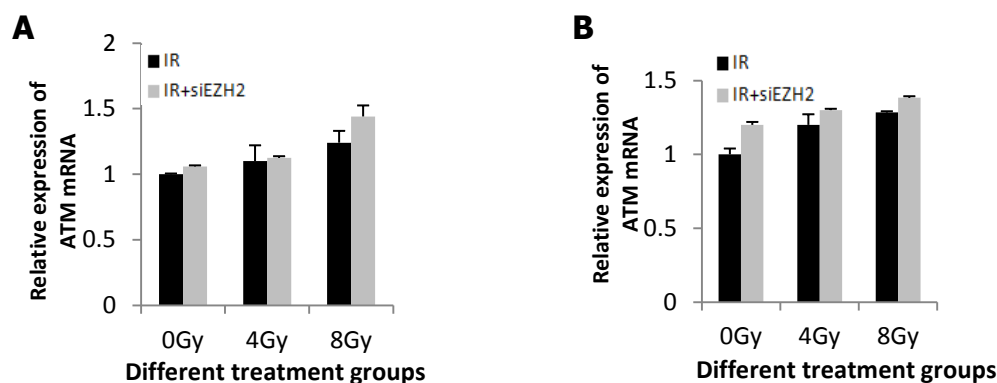


Fig 3.5.3.2 干扰 EZH2 的 Hep G2 细胞照射后对 ATM mRNA 水平表达的影响

注：A. 6h ATM mRNA 表达；B. 12h ATM mRNA 表达；* $p < 0.05$, IR VS IR+siEZH2。

3.5.3.3 对 Chk2 mRNA 水平表达的影响

采用瞬时转染方法将 siRNA 转入 HepG2 细胞，干扰 EZH2 表达。转染成功后，分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射，照射后 6h、12h 收集细胞，采 Real-Time PCR 方法检测 Chk2 mRNA 表达水平。结果如下图(Fig 3.5.3.3)显示，6h IR+siEZH2 组 Chk2 mRNA 水平呈明显升高趋势，12h 未发现明显变化规律。

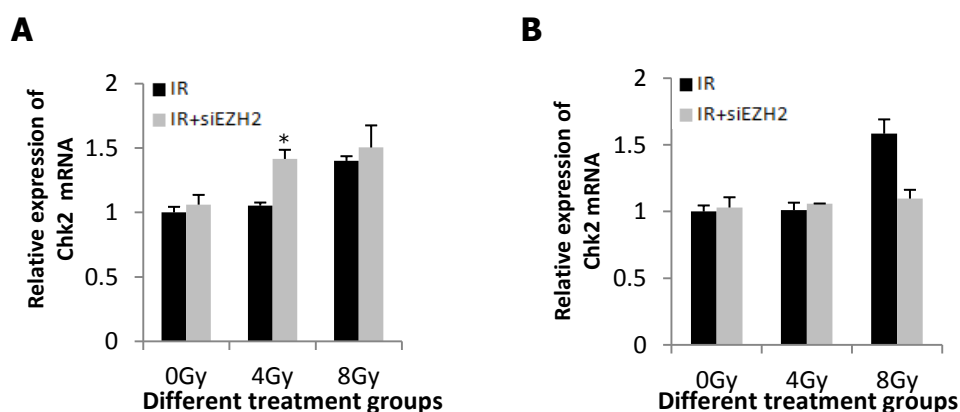


Fig 3.5.3.3 干扰 EZH2 的 Hep G2 细胞照射后对 Chk2 mRNA 水平表达的影响

注：A. 6h Chk2 mRNA 表达；B. 12h Chk2 mRNA 表达；* $p < 0.05$, IR VS IR+siEZH2。

3.5.3.4 对 p53 mRNA 水平表达的影响

采用瞬时转染方法将 siRNA 转入 HepG2 细胞，干扰 EZH2 表达。转染成功后，分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射，照射后 6h、12h 收集细胞，采 Real-Time PCR 方法检测 p53 mRNA 表达水平。结果显示，相同照射剂量下，6h IR+siEZH2 组 p53 mRNA 水平明显高于 IR 组（Fig 3.5.3.4 A）；在 4Gy、8Gy 照射下，12h IR+siEZH2 组 p53 mRNA 水平明显高于 IR 组（Fig 3.5.3.4 B）。

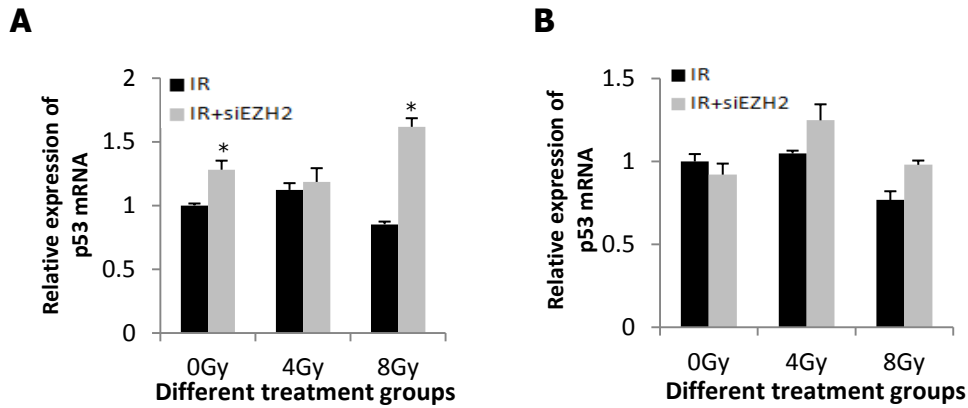


Fig 3.5.3.4 干扰 EZH2 的 Hep G2 细胞照射后对 p53 mRNA 水平表达的影响

注：A. 6h p53 mRNA 表达； B. 12h p53 mRNA 表达； * $p < 0.05$, IR VS IR+siEZH2。

3.5.4 干扰 EZH2 后不同剂量电离辐射对 Hep G2 细胞 H3K27me3 及 ATM/p53 通路基因蛋白表达水平的影响

3.5.4.1 对 EZH2 蛋白表达的影响

采用瞬时转染方法将 siRNA 转入 HepG2 细胞，干扰 EZH2 表达。分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射，照射后 6h、12h 收集细胞，采用 Western blot 方法检测 EZH2 蛋白表达水平。结果显示，在相同的照射剂量下，IR+siEZH2 组较 IR 组 EZH2 的蛋白表达量明显减少，且这种变化在 6h、12h 规律一致（Fig 3.5.4.1A.B）。

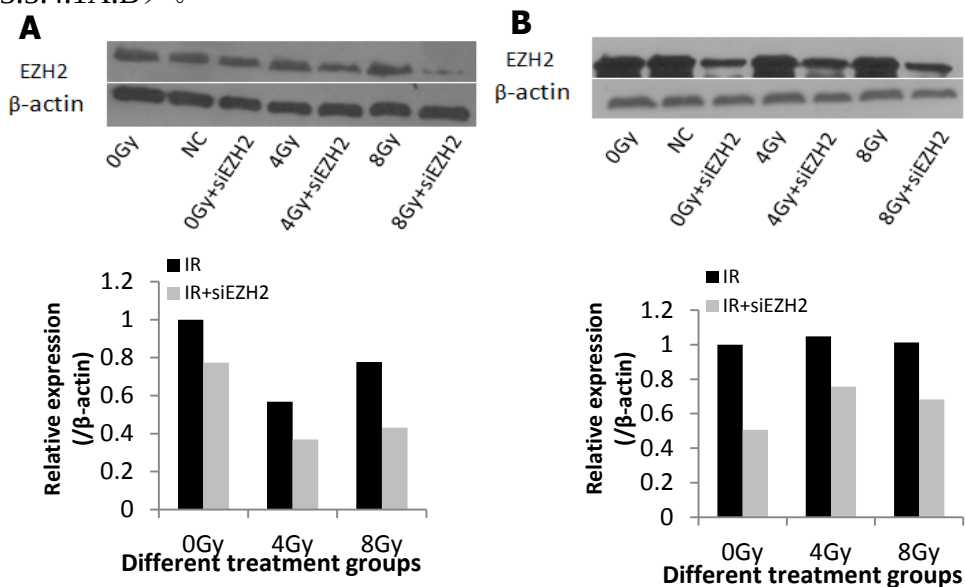


Fig 3.5.4.1 EZH2 低表达的 HepG2 细胞照射后对其蛋白表达的影响

注：A. 6h EZH2 蛋白变化； B. 12h EZH2 蛋白变化。

3.5.4.2 对 H3K27me3 蛋白表达的影响

采用瞬时转染方法将 siRNA 转入 HepG2 细胞, 干扰 EZH2 表达。分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射, 照射后 6h、12h 收集细胞, 采用 Western blot 方法检测 H3K27me3 的蛋白表达情况。结果发现, 相同的照射剂量下, 6h、12h IR+siEZH2 组较 IR 组 H3K27me3 蛋白表达水平明显降低 (Fig 3.5.4.2 A.B)。

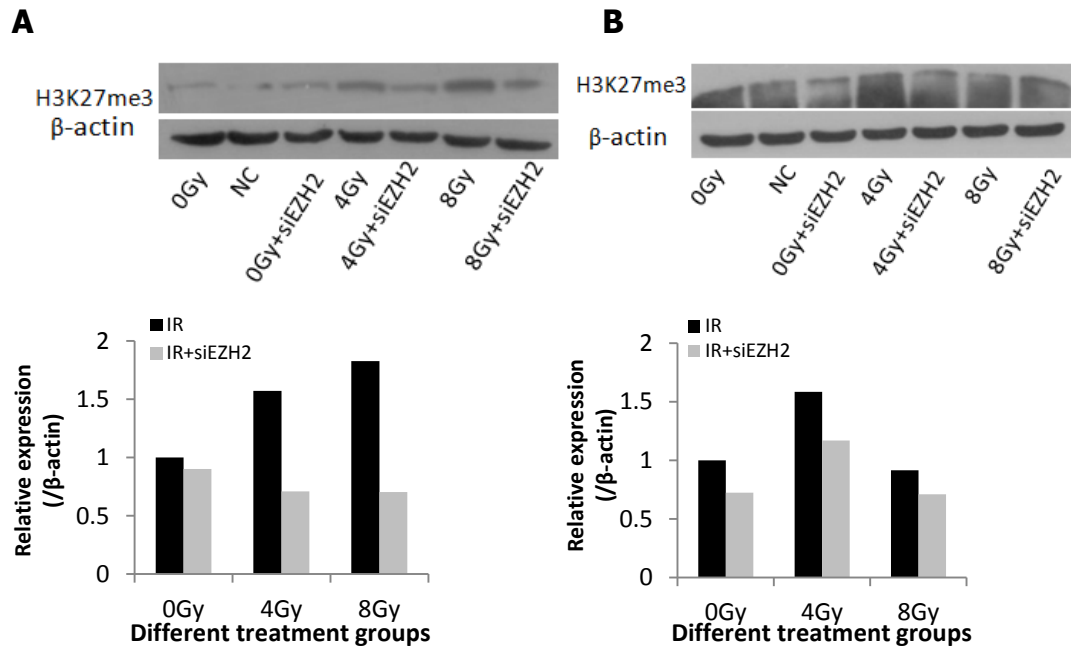


Fig 3.5.4.2 干扰 EZH2 的 Hep G2 细胞照射后对 H3K27me3 蛋白表达的影响

注: A. 6h H3K27me3 蛋白变化; B. 12h H3K27me3 蛋白变化。

3.5.4.3 对 ATM 蛋白表达的影响

采用瞬时转染方法将 siRNA 转入 HepG2 细胞, 干扰 EZH2 表达。分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射, 照射后 6h、12h 收集细胞, 采用 Western blot 方法检测 ATM 的蛋白表达情况。结果发现, 在 0Gy 照射下, 6h 组 IR+siEZH2 组较 IR 组 ATM 蛋白表达水平呈升高趋势, 而 12h ATM 蛋白表达变化在 0Gy、4Gy、8Gy 剂量下 IR+siEZH2 组与 IR 组比 ATM 蛋白表达水平明显升高, 且随着照射剂量的升高, 逐渐升高 (Fig 3.5.4.3 A、B)。

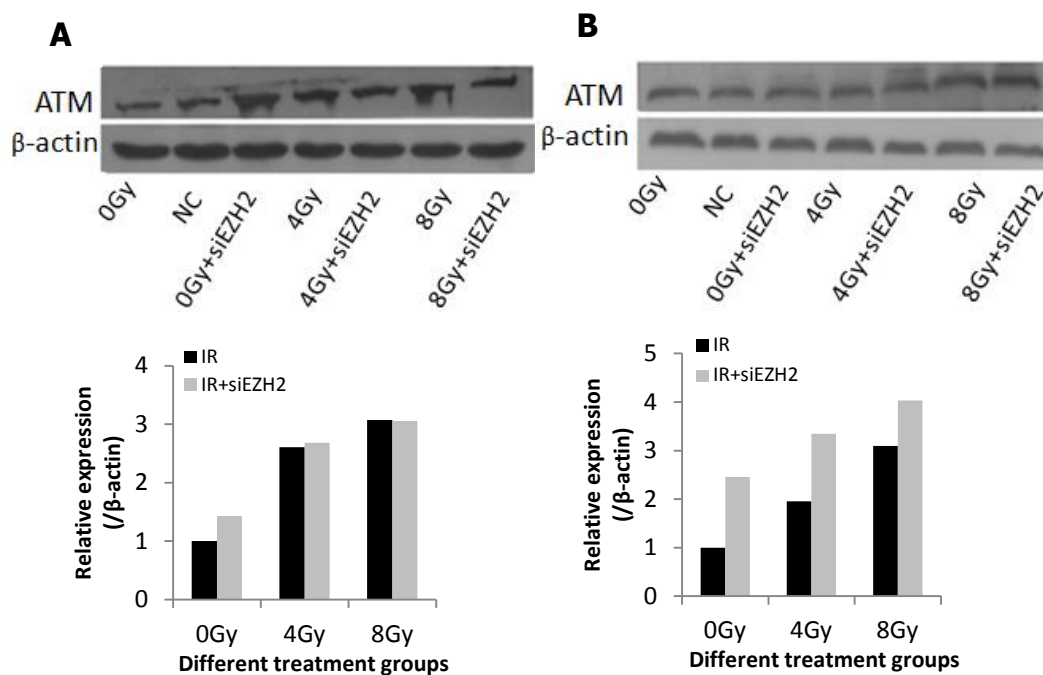


Fig 3.5.4.3 干扰 EZH2 的 Hep G2 细胞照射后对 ATM 蛋白表达的影响

注: A. 6h ATM 蛋白变化; B. 12h ATM 蛋白变化

3.5.4.4 对 p53 蛋白水平表达的影响

采用瞬时转染方法将 siRNA 转入 HepG2 细胞, 干扰 EZH2 表达。分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射, 照射后 6h、12h 收集细胞, 采用 Western blot 方法检测下 p53 的蛋白表达情况。结果如图所示, 在相同的照射剂量下, 6h IR+siEZH2 组较 IR 组 p53 蛋白表达水平明显升高, IR+siEZH2 组 p53 蛋白表达呈现剂量依赖性增加 (Fig 3.5.4.4 A); 在 0Gy 照射下, 12h 0Gy 组 IR+siEZH2 组较 IR 组 p53 蛋白表达水平明显升高 (Fig 3.5.4.4 B)。

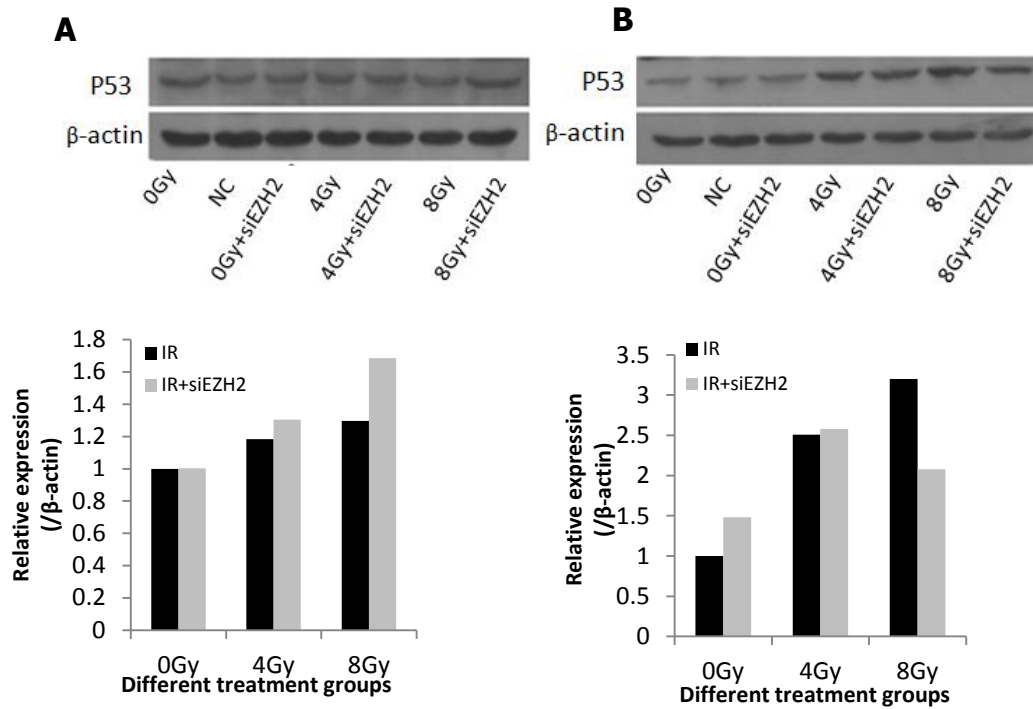


Fig 3.5.4.4 干扰 EZH2 的 Hep G2 细胞照射后对 p53 蛋白表达的影响

注：A. 6h p53 蛋白变化；B. 12h p53 蛋白变化

3.6 EZH2 过表达的 293T 细胞不同剂量照射后对 ATM/Chk2/p53 通路基因 mRNA 及蛋白水平表达的影响

3.6.1 EZH2 过表达的 293T 细胞模型的建立及鉴定

采用瞬时转染的方法，采用 EZH2 过表达质粒 pLNCX2，A 为质粒图谱，其浓度为 0.904μg/μL，我们对三种质粒浓度进行验证，I 组：4μL 质粒+5μL 转染试剂、II 组：4μL 质粒+8μL 转染试剂、III 组：5μL 质粒+8μL 转染试剂。转染后采用 Real-Time PCR 和 Western Blot 方法对 EZH2 的表达水平进行验证，结果发现 II、III 两组 EZH2 mRNA 表达水平显著高于 293T 空质粒组，II 组蛋白表达水平最高，我们最终选取 II 组：4μL 质粒+8μL 转染试剂进行转染。

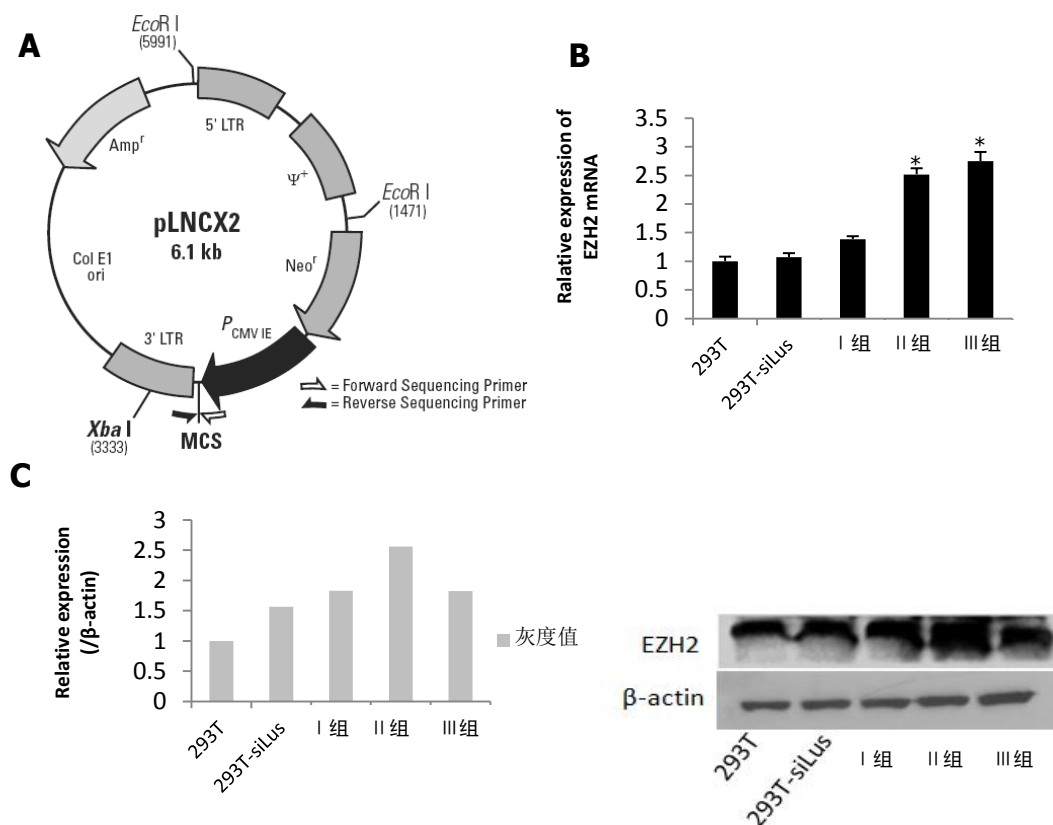


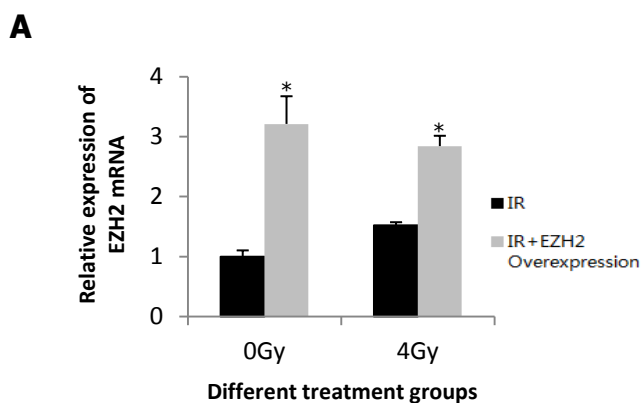
Fig 3.6.1 293T 细胞 EZH2 过表达效果验证

注：A.pLNCX2 质粒图谱；B. EZH2 mRNA 表达水平；C. EZH2 蛋白表达水平；

* $p < 0.05$, EZH2 过表达组 VS 293T 组。

3.6.2 EZH2 转录及蛋白表达水平变化

EZH2 过表达 293T 细胞辐照 0Gy 和 4Gy 剂量后，采用 Real-Time PCR 及 Western Blot 方法对 EZH2 mRNA 及蛋白表达进行检测，结果发现过表达组与 IR 组比，EZH2 mRNA 表达水平明显升高，差异有统计学意义，蛋白表达水平也显著升高（Fig 3.6.2 A、B）。



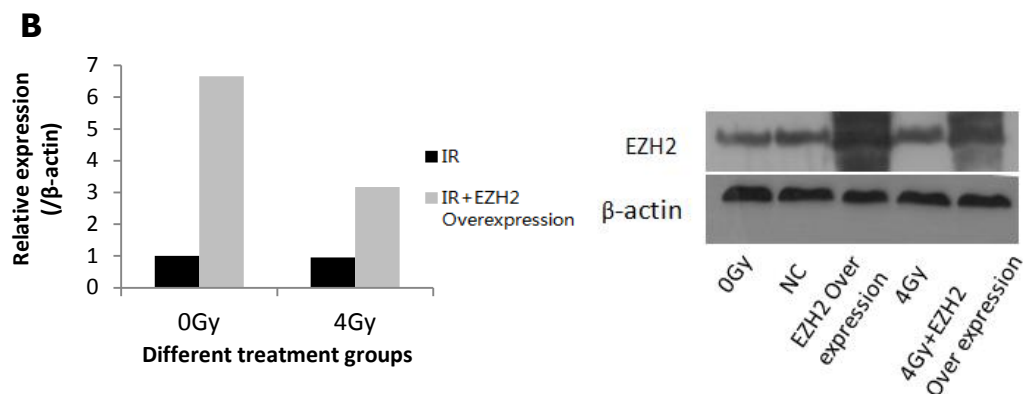


Fig 3.6.2 EZH2 过表达 293T 细胞辐照后 EZH2 转录及蛋白表达水平变化

注：A. 6h EZH2 mRNA 表达水平变化；B. 12h EZH2 蛋白表达水平变化；

* $p < 0.05$, IR VS IR+EZH2 Over-expression。

3.6.3 ATM 转录及蛋白表达水平变化

EZH2 过表达 293T 细胞辐照 0Gy 和 4Gy 剂量后，采用 Real-Time PCR 及 Western Blot 方法对 ATM mRNA 及蛋白表达进行检测，图(Fig 3.6.3A、B)结果显示 EZH2 过表达组与单纯照射组比，ATM mRNA 及蛋白变化都不明显。

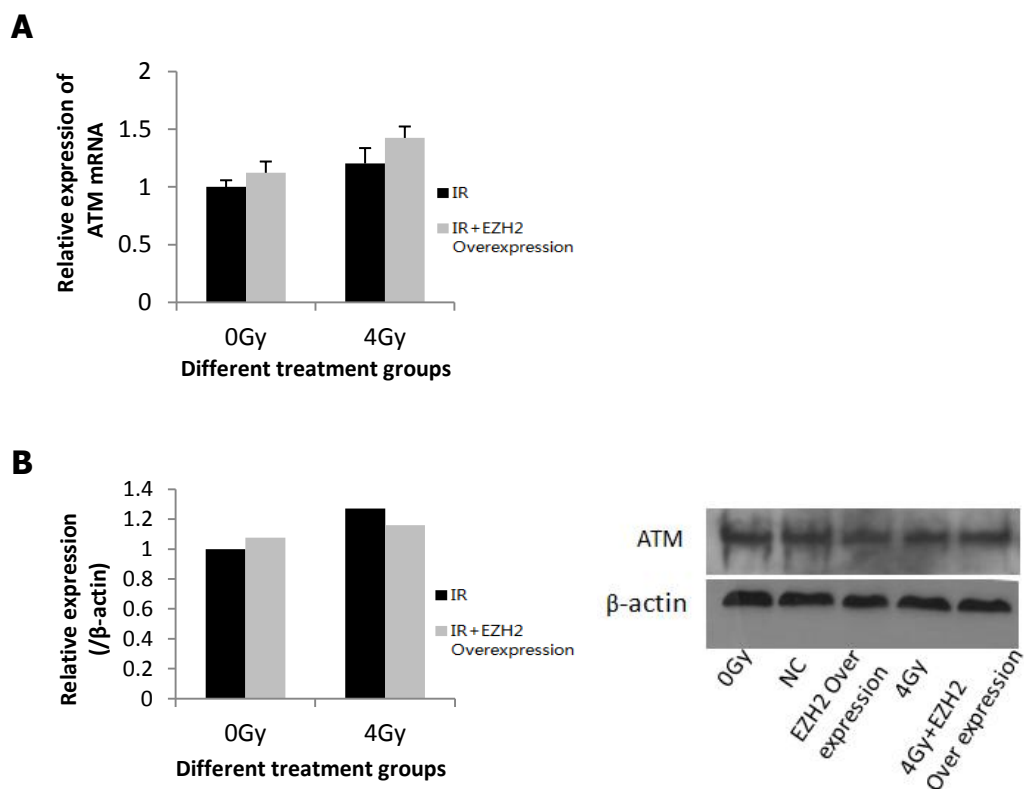


Fig 3.6.3 EZH2 过表达 293T 细胞辐照后 ATM 转录及蛋白表达水平变化

注：A. 6h ATM mRNA 表达水平变化；B. 12h ATM 蛋白表达水平变化；

* $p < 0.05$, IR VS IR+EZH2 Over-expression。

3.6.4 Chk2 mRNA 表达水平变化

EZH2 过表达 293T 细胞辐照后采用 Real-Time PCR 对 Chk2 mRNA 表达水平进行检测, 结果发现 EZH2 过表达辐射组与单纯照射组比 Chk2 mRNA 表达水平无明显变化(Fig 3.6.4)。

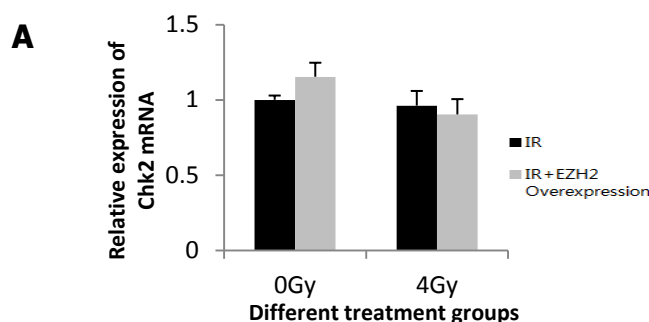


Fig 3.6.4 EZH2 过表达 293T 细胞辐照后 Chk2 转录水平变化

注: A. 6h Chk2 mRNA 表达水平变化; * $p < 0.05$, IR VS IR+EZH2 Over-expression。

3.6.5 p53 转录及蛋白表达水平变化

EZH2 过表达 293T 细胞辐照 0Gy 和 4Gy 剂量后, 采用 Real-Time PCR 及 Western Blot 方法对 p53 mRNA 及蛋白表达进行检测, Fig 3.6.5A、B 结果显示 EZH2 过表达组与单纯照射组比, p53 mRNA 及蛋白变化都不明显。

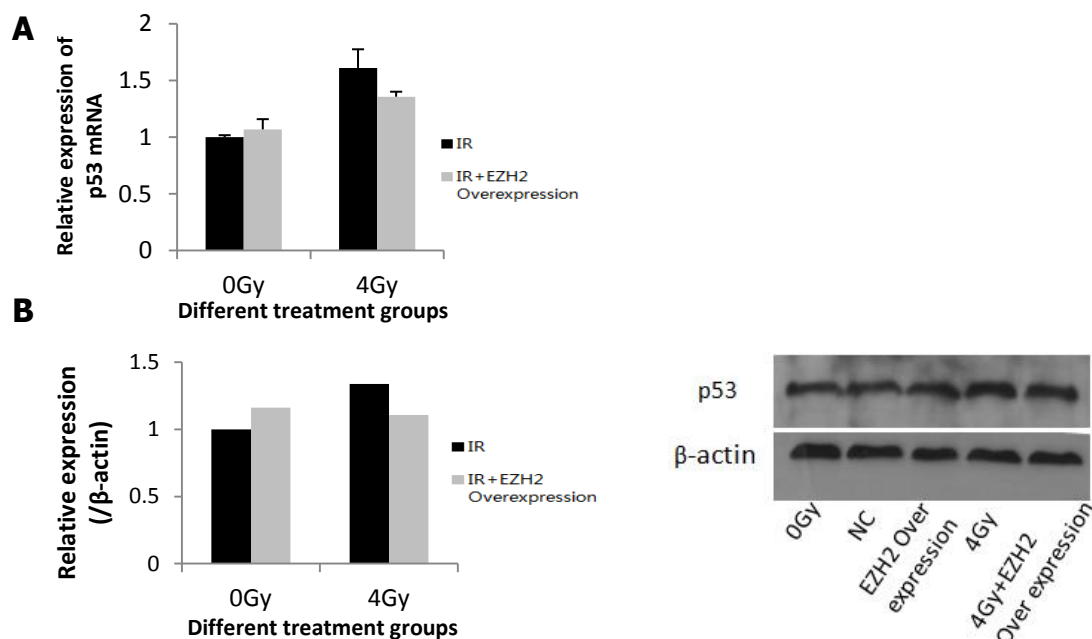


Fig 3.6.5 EZH2 过表达 293T 细胞辐照后 p53 转录及蛋白表达水平变化

注: A. 6h p53 mRNA 表达水平变化; B. 12h p53 蛋白表达水平变化;

* $p < 0.05$, IR VS IR+EZH2 Over-expression。

3.6.6 H3K27me3 蛋白表达水平变化

EZH2 过表达 293T 细胞辐照 0Gy 和 4Gy 剂量后, 采用 Western Blot 方法对 H3K27me3 蛋白表达水平进行检测, 结果显示 EZH2 过表达组与单纯照射组比, H3K27me3 蛋白变化不明显。

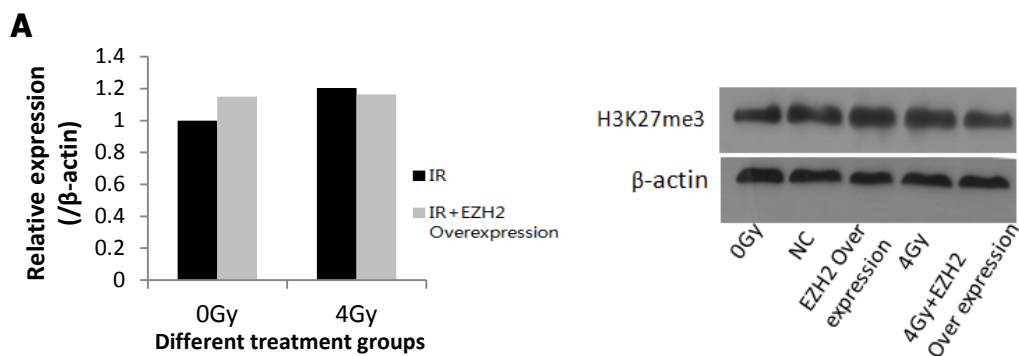


Fig 3.6.5 EZH2 过表达 293T 细胞辐照后 H3K27me3 蛋白表达水平变化

注: A. 12h H3K27me3 蛋白表达水平变化。

3.7 ChIP 实验结果

我们在 ATM 启动子上游-1630 ~ -774 区域及下游 719~3475 区分别选取 3 个 H3K27me3 的结合位点(Fig 3.7A), 在 siEZH2 和加入 GSK126 两种条件下, 采用 ChIP 实验检测 H3K27me3 的表达变化, 结果发现 siEZH2 组, ATM 启动子区 H3K27me3 的表达水平显著降低, 且在 PP4 位点上 H3K27me3 的表达变化最为明显(Fig 3.7 B); 加 GSK126 组 ATM 启动子区 H3K27me3 的表达水平也显著降低, 且在 PP5 位点上 H3K27me3 的表达变化最为明显(Fig 3.7 B)。

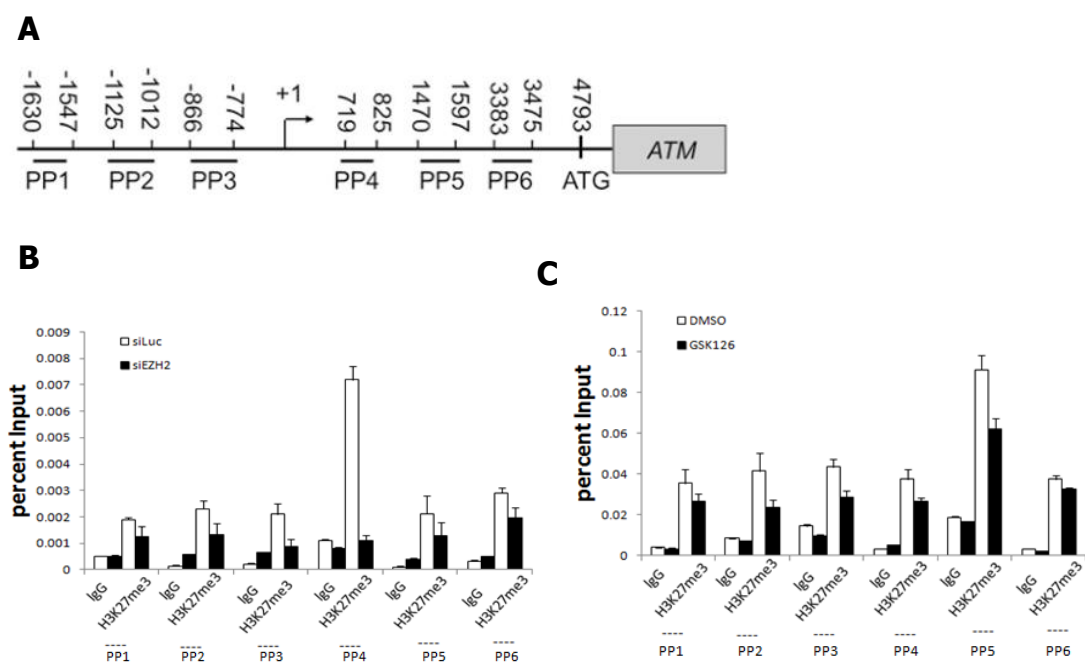


Fig 3.7 EZH2 通过 H3K27me3 调节 HepG2 细胞中的 ATM

注：A. ATM 启动子区引物对（PPs）示意图；B.在携带 siLuc 和 siEZH2 的 HepG2 细胞中使用针对 H3K27me3 的抗体进行 ChIP 测定；C.在用 3 μ mol GSK126 处理的 HepG2 细胞中使用针对 H3K27me3 的抗体进行 ChIP 测定,IgG 为阴性对照。

第4章 讨论

分子生物学研究积累表明,人类多种病理学条件下包括癌症、早衰和慢性炎症中 DNA 损伤都是不可忽视的研究范畴。电离辐射是引起的 DNA 辐射损伤效应的重要内容之一。在电离辐射引起的 DNA 损伤修复过程中 ATM-Chk2-p53 通路起重要作用。DNA 损伤后 ATM 立刻被激活,活化 Chk2,从而磷酸化 p53 或直接通过 p53 传递损伤信号,开启 DNA 损伤修复进程[42]。已有研究发现 PcGs 家族在 DNA 损伤区域被招募,但是否通过 H3K27me3 介导 DNA 损伤修复还鲜有报道。

γ H2AX 目前被认为是监测 DNA 损伤和修复通路中的重要标志物,当细胞发生 DNA 双链断裂时会伴随 γ H2AX 的聚集,理论上一个 γ H2AX 焦点对应一个 DNA 双链断裂[96]。为了观察 H3K27me3 在辐射诱导的 DNA 损伤中的作用,我们选取三种细胞模型即单纯电离辐射、电离辐射加 GSK126 和干扰 EZH2 照射组,采用免疫荧光方法对 γ H2AX 进行检测。结果发现:(1)电离辐射条件下会导致 HepG2 细胞会发生 DNA 双链断裂,且在一定的照射剂量范围内, γ H2AX 焦点数呈剂量依赖性增加;(2)电离辐射诱导的 HepG2 细胞加入 GSK126 即 EZH2 甲基转移酶抑制剂后,照射组与假照射组比 γ H2AX 荧光强度明显高于假照射组,且呈剂量依赖性升高;且在相同的照射剂量下,IR+GSK126 组与 IR 组荧光强度对比发现,IR+GSK126 组的 γ H2AX 表达量明显高于 IR 组。(3)干扰 EZH2 后,与假照射组比较,4Gy、8 Gy 照射组 γ H2AX 荧光强度明显高于假照射组,8 Gy 照射组较 4Gy 照射组更为明显,呈剂量依赖性增加;在相同照射剂量下,IR+siEZH2 组较 IR 组 γ H2AX 荧光强度明显升高。说明无论加入 GSK126 还是干扰 EZH2 都会增强 DNA 损伤的作用。

GSK126 是一种有效的,高选择性 EZH2 甲基转移酶活性的小分子抑制剂。在体外,EZH2 野生型和突变型 DLBCL 细胞中,GSK126 可有效抑制 H3K27me3,其次是 H3K27me2。GSK126 也能对 EZH2 突变型 DLBCL 细胞系的增殖进行抑制,并且在敏感细胞系中诱导 EZH2 目标基因的转录激活[97]。我们采用 0Gy、4Gy 和 8 Gy 剂量照射 HepG2 细胞,照射后加入 3 μ mol 的 GSK126,

培养 6h 和 12h 后分别收集细胞检测 EZH2 mRNA 和 H3K27me3 蛋白表达水平的变化,发现相同剂量下 IR+GSK126 组与 IR 组比 EZH2 mRNA 表达水平明显升高,但 H3K27me3 蛋白表达水平显著降低。总结出照射后加 GSK126 可增强电离辐射对 DNA 损伤的作用。

沉默 RNA(silencing RNA, siRNA),是由 20~25 个核苷酸组成的小 RNA 分子。主要涉及 RNA 干扰现象,激发与之互补的目标 mRNA 的沉默,以特定的方式调节基因表达沉默,从而产生相应的功能表型缺陷。通过查阅文献,我们设计了 3 条 siRNA 来干扰 EZH2 的表达,并从中选取 siEZH2-1 和 siEZH2-2 进行验证,结果发现加入 siEZH2-1 干扰效果更为明显,我们选用 siEZH2-1 来建立 EZH2 沉默的 Hep G2 细胞模型,给予 0Gy、4Gy 和 8Gy 电离辐射,照射后 6h、12h 收集细胞,采 Real-Time PCR 方法检测 EZH2 mRNA 水平,结果显示,在相同的照射剂量下 IR+siEZH2 组 EZH2 mRNA 水平明显低于 IR 组。同时,发现 IR+siEZH2 组 EZH2 蛋白表达水平也明显低于 IR 组。更重要的是我们发现 IR+siEZH2 组 H3K27me3 蛋白表达水平明显低于 IR 组。以上表明干扰 EZH2 后在不同条件下 EZH2 mRNA 及蛋白表达水平均出现显著降低。同时 H3K27me3 蛋白表达明显降低,更重要的是,辐射可明显增加 EZH2 干扰组的 DNA 损伤。

上述我们已经阐明, GSK126 及干扰 siEZH2 对电离辐射引起 DNA 损伤的影响。同时我们还对单纯电离辐射、电离辐射加 GSK126 和干扰 EZH2 三种细胞模型的 H3K27me3 进行了检测。我们发现:(1)单纯照射条件下, H3K27me3 在 4Gy、8 Gy 照射组荧光强度明显高于假照组;(2)照射 HepG2 细胞后加入 GSK126,相同剂量下 IR+GSK126 组与 IR 组比, H3K27me3 的荧光强度明显减弱。(3)转染 siEZH2 后,分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射,照射后 30min 处理细胞,发现在相同照射剂量下, IR+siEZH2 组与 IR 组比 H3K27me3 荧光强度明显降低。综合以上结果我们得出:无论是加入 GSK126 还是干扰 EZH2 都可以引起 H3K27me3 的表达水平下降,使 γ H2AX 表达增多, DNA 损伤增多。

2010 年, Chou 等人首次通过使用 10 μ mol BrdU 培养小鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblasts, MEFS) 24h 后,采用 UV 激光微辐射细胞,诱导 DNA 特异位点损伤, 10 分钟后固定,采用免疫荧光方法检测 EZH2 和 γ H2AX,发现 EZH2 在 DNA 损伤区域被招募,且与 γ H2AX 共定位于 DNA 损

伤点；同时也检测了 H3K27me3 和 RPA32，发现 H3K27me3 在 DNA 损伤区域被招募，且与 RPA32 共定位于 DNA 损伤点 (Fig4.1) [79]。与之相符，Zhiqing Li 等人在家蚕紫细胞外线 UV 诱导的 DNA 损伤中发现 PRC2 介导的 H3K27me3 明显增加，并且在 PcGs 家族基因缺失的蚕细胞中显示，细胞对 UV-C 辐射的敏感性显著增高[98]。另外，Jin 等人用 5 μ M GSK126 处理的 HepG2 细胞 12h 后进行了 γ H2AX 免疫荧光检测和细胞增殖实验，结果显示 GSK126 处理后 γ H2AX 的荧光强度显著增多，而且应用 GSK126 和化疗药物 MMC 联合处理 HepG2 细胞后发现 MMC 与 GSK126 联合处理组与单独采用 MMC 组比，细胞增殖效应明显减弱，说明 GSK126 通过降低 H3K27me3 的表达，增加了细胞对 MMC 化疗药物的敏感性。哺乳动物细胞中 H3K27me3 主要由 PcGs 家族催化形成，是表观遗传学重要修饰形式之一。PcGs 家族成员中的 EZH2 是 H3K27me3 的重要甲基转移酶，其通过 SET 结构域来催化 H3K27me3，从而抑制基因的转录。已有研究证实 EED-EZH2 复合物可以特异性的产生 H3K27me3 来发挥沉默目的基因的作用，影响肿瘤的发生发展[89]。还有研究发现干扰 EZH2 后，引起 H3K27me3 的降低，从而促进化疗药物 EPB 和 MMC 诱导的 DNA 损伤，导致细胞对化疗药物的敏感性提高[93]。总结上述，我们得到两个结论：1.辐射诱导的 DNA 损伤区域发现 H3K27me3 升高，PcGs 家族缺失会增加细胞辐射敏感性。2.通过干扰 EZH2，可降低 H3K27me3 的表达，促进 DNA 损伤，从而增加化疗药物的敏感性。

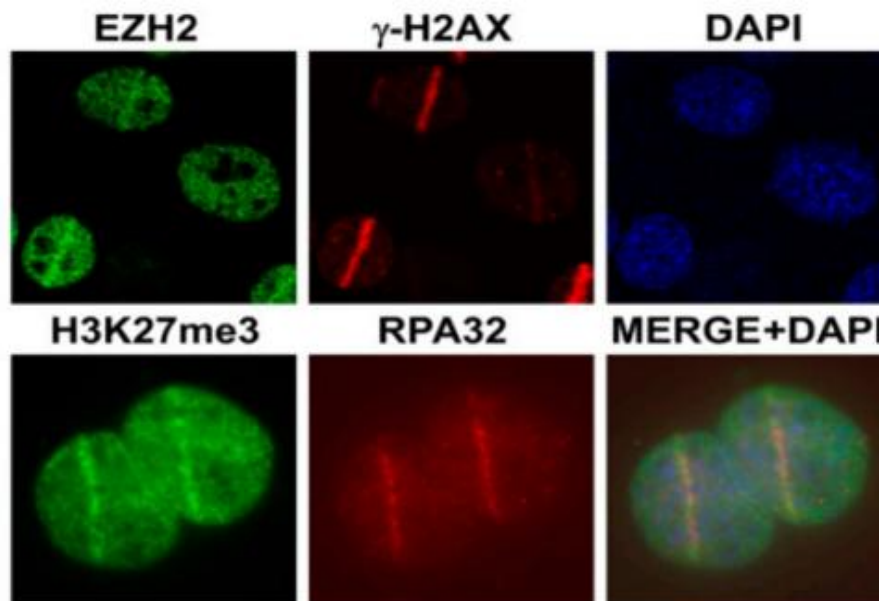


Fig4.1 EZH2 及 H3K27me3 在 DNA 损伤处免疫荧光结果

我们实验结果中发现, 电离辐射可诱导的 H3K27me3 蛋白表达增加; 同时, 加入 GSK126 和干扰 EZH2 都会抑制 H3K27me3 的活性, 从而增加电离辐射对 DNA 的损伤作用。同时我们发现一个有趣的现象, 电离辐射会促进 DNA 损伤, 且在一定剂量范围内 DNA 损伤程度呈剂量依赖性升高, 并发生 G2 期细胞阻滞。我们的结果发现, 加 GSK126 组随着照射剂量的升高, G2 期细胞阻滞也逐渐升高, 但与 IR 组比, 同等剂量下 G2 期阻滞明显降低。这种 GSK126 促进 DNA 损伤增加但却使 G2 期阻滞下降的现象成为我们探讨的焦点。反复查阅文献, 我们推测 G2 期阻滞下降的原因是由于 DNA 损伤后细胞由修复程序转为凋亡程序, 从而导致 G2 期细胞减少。这种机制还需进一步的证实。

上述讨论我们已经明确了 H3K27me3 在电离辐射诱导的 DNA 损伤中的作用, H3K27me3 表达水平下降, 会促进 DNA 的损伤; 同时, DNA 损伤后使 H3K27me3 表达升高。但 H3K27me3 与 ATM 之间的关系是我们研究的焦点。

我们结果中已经发现电离辐射会导致 H3K27me3 表达升高, 并且在 Danny M. Chou 等人实验结果中得到了有力支撑。ATM 在识别和传递 DNA 损伤信号及启动 DNA 损伤修复中起着重要作用, Bartek 等研究表明 DNA 损伤后 ATM 被激活, 从而磷酸化 Chk2, 活化的 Chk2 可以通过磷酸化 p53, 使 p53 与 MDM2 的结合蛋白减少, p53 增多, 使细胞发生周期阻滞; 若 DNA 损伤不能被修复, p53 则会启动凋亡程序, 使细胞程序性死亡[50]。我们的结果也证实了上述结论, 当给予细胞不同剂量的电离辐射后, 会引起 DNA 损伤, 从而导致细胞周期阻滞, 这与我们的周期结果相对应。当给予细胞 0Gy、4Gy 和 8 Gy 剂量照射后, 照射组与假照射组比 ATM 和 p53 的 mRNA 及蛋白表达水平明显升高, Chk2 8 Gy 组与假照射组比, mRNA 表达水平明显升高。说明电离辐射会引起 ATM、Chk2 和 p53 水平的升高, 促进 DNA 损伤修复。加 GSK126 显示, IR+GSK126 组与 IR 组比, ATM 和 6h 中 p53 mRNA 表达水平明显升高, 而 H3K27me3 蛋白表达水平明显降低, 提示 GSK126 通过抑制 EZH2 酶活性, 降低 H3K27me3 的表达, 从而引起 ATM 和 p53 表达水平的升高。这与 Gao 等人研究结果一致, 在化疗药物引起的 DNA 损伤中, 通过加入 GSK126 增加了 HepG2 细胞 ATM mRNA 表达水平[93]。为了明确 EZH2 是否可以介导

H3K27me3 参与 ATM 的调控, 我们又采用 siEZH2 干扰细胞, 发现 siEZH2 组与对照组比, ATM、Chk2 和 p53 mRNA 表达水平明显升高, 而且 siEZH2 组中 H3K27me3 的表达水平明显降低。以上结果均证实影响 EZH2 表达或酶活性后, 都会引起 ATM、Chk2 和 p53 目的基因表达的变化; 而且也表明 EZH2 可介导 H3K27me3 调控 ATM 的表达。有趣的是, 在我们建立的 EZH2 过表达 293T 细胞模型中, 发现 EZH2 过表达组与 IR 组比 EZH2 mRNA 和蛋白表达水平明显升高, 但 H3K27me3 蛋白表达变化不明显, 同时, 其他目的基因在转录及蛋白水平上也无显著差异。我们推测引起这种现象的原因是由于: (1) H3K27me3 表达是由 PcGs 家族所有成员决定的, 并不仅仅取决于 EZH2 一个成员; (2) H3K27me3 表达水平的高低主要取决于 PcGs 家族成员中表达水平最低的成员, 所以当 EZH2 过表达, 但 PcGs 家族其他成员无变化时, H3K27me3 的表达水平取决于 PcGs 家族其他成员的表达水平, 从而产生 H3K27me3 及目的基因变化不明显的现象。

为了明确 ATM 启动子区域 H3K27me3 的表达变化。我们在 ATM 启动子上游-1630 ~ -774 区域及下游 719~3475 区分别选取 3 个 H3K27me3 的结合位点, 采用 CHIP 实验检测 H3K27me3 的表达变化, 发现 siEZH2 组和 GSK126 组, ATM 启动子区 H3K27me3 的表达水平显著降低, 且在 PP4 位点上 H3K27me3 的表达变化最为明显。综上所述, 在电离辐射诱导的 DNA 损伤中, PcGs 家族中 EZH2 通过介导 ATM 启动子区域 H3K27me3 对 ATM 进行转录调控, 从而参与 DNA 的损伤修复过程。

第 5 章 结 论

1. 在电离辐射诱导的 HepG2 细胞 DNA 损伤反应中 ATM/Chk2/P53 通路被激活。
2. EZH2 甲基转移酶抑制剂 GSK126 通过降低 H3K27me3 表达水平促进电离辐射诱导的 DNA 损伤。
3. PcGs 家族中关键基因 EZH2 通过介导 ATM 启动子区域的 H3K27me3 参与 DNA 损伤修复。

参考文献

- [1]. Sources and effects of ionizing radiation :United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation : UNSCEAR 2008 report to the General Assembly, with scientific annexes. 2010, New York: United Nations. 2.
- [2]. Nikjoo, H.Uehara, S.Wilson, W E.Hoshi, M.Goodhead, D T. Track structure in radiation biology: theory and applications. *Int J Radiat Biol*, 1998. 73(4): p. 355-64.
- [3]. Calabrese, E.J. The road to linearity: why linearity at low doses became the basis for carcinogen risk assessment. *Arch Toxicol*, 2009. 83(3): p. 203-25.
- [4]. Berrington, D.G.A. and S. Darby, Risk of cancer from diagnostic X-rays: estimates for the UK and 14 other countries. *Lancet*, 2004. 363(9406): p. 345-51.
- [5]. Valko. M,Rhodes.C J,Moncol.J, et al., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 2006. 160(1): p. 1-40.
- [6]. Hoeijmakers, J.H., DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*, 2009. 361(15): p. 1475-85.
- [7]. Nikjoo H, Uehara S, Wilson W E, et al. Track structure in radiation biology: theory and applications. *Int J Radiat Biol*, 1998. 73(4): p. 355-64.
- [8]. Janssen A, Medema R H. Genetic instability: tipping the balance. *Oncogene*, 2013. 32(38): p. 4459-70.
- [9]. Iliakis G, Murmann T, Soni A. Soni, Alternative end-joining repair pathways are the ultimate backup for abrogated classical non-homologous end-joining and homologous recombination repair: Implications for the formation of chromosome translocations. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2015. 793: p. 166-75.
- [10]. Smoll N R, Brady Z, Scurrah K, et al. Exposure to ionizing radiation and brain cancer incidence: The Life Span Study cohort. *Cancer Epidemiol*, 2016. 42: p. 60-5.
- [11]. Wang W, Guo M, Xia X, et al. XRR1 Targets ATM/CHK1/2-Mediated DNA Repair in Colorectal Cancer. *Biomed Res Int*, 2017. 2017: p. 5718968.
- [12]. Foy V, Schenk M W, Baker K, et al. Targeting DNA damage in SCLC. *Lung Cancer*, 2017. 114: p. 12-22.

- [13]. Yu W K, Wang Z, Fong C C, et al. Chemoresistant lung cancer stem cells display high DNA repair capability to remove cisplatin-induced DNA damage. *Br J Pharmacol*, 2017. 174(4): p. 302-313.
- [14]. Di Benedetto A, Ercolani C, Mottolise M, et al. Analysis of the ATR-Chk1 and ATM-Chk2 pathways in male breast cancer revealed the prognostic significance of ATR expression. *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 8078.
- [15]. Mitchel R E, Hasu M, Bugden M, et al. Low-dose radiation exposure and protection against atherosclerosis in ApoE(-/-) mice: the influence of P53 heterozygosity. *Radiat Res*, 2013. 179(2): p. 190-9.
- [16]. Prakash R, Zhang Y, Feng W, et al. Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015. 7(4): p. a016600.
- [17]. Venkitaraman A R. The breast cancer susceptibility gene, BRCA2: at the crossroads between DNA replication and recombination? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2000. 355(1394): p. 191-8.
- [18]. Lehmann A R. The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases. *Genes Dev*, 2001. 15(1): p. 15-23.
- [19]. Ciccio A, Elledge S J. Elledge, The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*, 2010. 40(2): p. 179-204.
- [20]. Lisby M, Barlow J H, Burgess R C, et al. Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell*, 2004. 118(6): p. 699-713.
- [21]. Ambrosio S, Di Palo G, Napolitano G, et al. Cell cycle-dependent resolution of DNA double-strand breaks. *Oncotarget*, 2016. 7(4): p. 4949-60.
- [22]. Wang H, Luo Y, Zhao M H, et al. DNA double-strand breaks disrupted the spindle assembly in porcine oocytes. *Mol Reprod Dev*, 2016. 83(2): p. 132-43.
- [23]. Gorgoulis V G, Vassiliou L V, Karakaidos P, et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature*, 2005. 434(7035): p. 907-13.
- [24]. Fedier A, Fink D. Fink, Mutations in DNA mismatch repair genes: implications for DNA damage signaling and drug sensitivity (review). *Int J Oncol*, 2004. 24(4): p. 1039-47.
- [25]. Hoeijmakers, J.H., Genome maintenance mechanisms for preventing cancer.

- Nature, 2001. 411(6835): p. 366-74.
- [26]. van Attikum, H. and S.M. Gasser, The histone code at DNA breaks: a guide to repair? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. 6(10): p. 757-65.
- [27]. Pardo, B., B. Gomez-Gonzalez and A. Aguilera, DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci*, 2009. 66(6): p. 1039-56.
- [28]. Lobrich, M. and P.A. Jeggo, The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer*, 2007. 7(11): p. 861-9.
- [29]. van Attikum, H. and S.M. Gasser, The histone code at DNA breaks: a guide to repair? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. 6(10): p. 757-65.
- [30]. Chou, D. M. and B. Adamson, et al. A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(43): p. 18475-80.
- [31]. Harper, J.W. and S.J. Elledge, The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell*, 2007. 28(5): p. 739-45.
- [32]. Meek, D.W. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat Rev Cancer*, 2009. 9(10): p. 714-23.
- [33]. Harper, J.W. and S.J. Elledge, The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell*, 2007. 28(5): p. 739-45.
- [34]. Kastan, M.B. and D.S. Lim, The many substrates and functions of ATM. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000. 1(3): p. 179-86.
- [35]. Brown, E.J. and D. Baltimore, Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev*, 2003. 17(5): p. 615-28.
- [36]. Cha, R.S. and N. Kleckner, ATR homolog Mec1 promotes fork progression, thus averting breaks in replication slow zones. *Science*, 2002. 297(5581): p. 602-6.
- [37]. Bartek, J. and J. Lukas, Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*, 2003. 3(5): p. 421-9.
- [38]. Vriend L E, De Witt H P, Van Noorden C J, et al. WEE1 inhibition and genomic instability in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1836(2): p. 227-35.
- [39]. Kitagawa R, Kastan M B. The ATM-dependent DNA damage signaling pathway[J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2005,70:99-109.

- [40]. Horn, H.F. and K.H. Vousden, Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene*, 2007. 26(9): p. 1306-16.
- [41]. Bartek, J. and J. Lukas, Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*, 2003. 3(5): p. 421-9.
- [42]. Hehnlly, H. and S. Doxsey, Polarity sets the stage for cytokinesis. *Mol Biol Cell*, 2012. 23(1): p. 7-11.
- [43]. Guo Z, Kumagai A, Wang S X, et al. Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev*, 2000. 14(21): p. 2745-56.
- [44]. Peng C Y, Graves P R, Thoma R S, et al. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science*, 1997. 277(5331): p. 1501-5.
- [45]. Iguchi T, Miyakawa Y, Saito K, et al. Zoledronate-induced S phase arrest and apoptosis accompanied by DNA damage and activation of the ATM/Chk1/cdc25 pathway in human osteosarcoma cells. *Int J Oncol*, 2007. 31(2): p. 285-91.
- [46]. Graves P R, Lovly C M, Uy G L, et al. Localization of human Cdc25C is regulated both by nuclear export and 14-3-3 protein binding. *Oncogene*, 2001. 20(15): p. 1839-51.
- [47]. Lopez-Girona, A., J. Kanoh and P. Russell, Nuclear exclusion of Cdc25 is not required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Curr Biol*, 2001. 11(1): p. 50-4.
- [48]. Yarden R I, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, et al. BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat Genet*, 2002. 30(3): p. 285-9.
- [49]. Baber-Furnari B A, Rhind N, Boddy M N, et al. Regulation of mitotic inhibitor Mik1 helps to enforce the DNA damage checkpoint. *Mol Biol Cell*, 2000. 11(1): p. 1-11.
- [50]. Banin S, Moyal L, Shieh S, et al. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, 1998. 281(5383): p. 1674-7.
- [51]. Li C, Park S, Zhang X, et al. Nuclear Gene 33/Mig6 regulates the DNA damage response through an ATM serine/threonine kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 2017. 292(40): p. 16746-16759.
- [52]. Guleria A, Chandna S. ATM kinase: Much more than a DNA damage

- responsive protein. DNA REPAIR, 2016. 39: p. 1-20.
- [53]. Kastan M B, Lim D S, Kim S T, et al. ATM--a key determinant of multiple cellular responses to irradiation. *Acta Oncol*, 2001. 40(6): p. 686-8.
- [54]. SEDGWICK, R.P. and E. BODER, Progressive ataxia in childhood with particular reference to ataxia-telangiectasia. *Neurology*, 1960. 10: p. 705-15.
- [55]. Gatti R A, Berkel I, Boder E, et al. Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature*, 1988. 336(6199): p. 577-80.
- [56]. Lange E, Borresen A L, Chen X, et al. Localization of an ataxia-telangiectasia gene to an approximately 500-kb interval on chromosome 11q23.1: linkage analysis of 176 families by an international consortium. *Am J Hum Genet*, 1995. 57(1): p. 112-9.
- [57]. Yamaguchi M, Fujimori-Tonou N, Yoshimura Y, et al. Mutation of DNA primase causes extensive apoptosis of retinal neurons through the activation of DNA damage checkpoint and tumor suppressor p53. *Development*, 2008. 135(7): p. 1247-57.
- [58]. Bolt J, Vo Q N, Kim W J, et al. The ATM/p53 pathway is commonly targeted for inactivation in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) by multiple molecular mechanisms. *Oral Oncol*, 2005. 41(10): p. 1013-20.
- [59]. Mehdi pour, P., et al., Linking ATM Promoter Methylation to Cell Cycle Protein Expression in Brain Tumor Patients: Cellular Molecular Triangle Correlation in ATM Territory. *Mol Neurobiol*, 2015. 52(1): p. 293-302.
- [60]. Delmonico L, Moreira A S, Franco M F, et al. CDKN2A (p14(ARF)/p16 (INK4a)) and ATM promoter methylation in patients with impalpable breast lesions. *Hum Pathol*, 2015. 46(10): p. 1540-7.
- [61]. Kastan, M.B., DNA damage responses: mechanisms and roles in human disease: 2007 G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Mol Cancer Res*, 2008. 6(4): p. 517-24.
- [62]. Rancoule C, Vallard A, Guy J B, et al. [Impairment of DNA damage response and cancer]. *Bull Cancer*, 2017. 104(11): p. 962-970.
- [63]. O'Hagan H M, Mohammad H P, Baylin S B. Mohammad and S.B. Baylin, Double strand breaks can initiate gene silencing and SIRT1-dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter CpG island. *PLoS Genet*, 2008. 4(8): p. e1000155.

- [64]. Cuozzo C, Porcellini A, Angrisano T, et al. Correction: DNA Damage, Homology-Directed Repair, and DNA Methylation. *PLoS Genet*, 2017. 13(2): p. e1006605.
- [65]. Jenuwein, T. and C.D. Allis, Translating the histone code. *Science*, 2001. 293(5532): p. 1074-80.
- [66]. Wang, Y. and S. Jia, Degrees make all the difference: the multifunctionality of histone H4 lysine 20 methylation. *Epigenetics*, 2009. 4(5): p. 273-6.
- [67]. Eissenberg, J.C. and A. Shilatifard, Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation. *Dev Biol*, 2010. 339(2): p. 240-9.
- [68]. Snowden A W, Gregory P D, Case C C, et al. Gene-specific targeting of H3K9 methylation is sufficient for initiating repression in vivo. *Curr Biol*, 2002. 12(24): p. 2159-66.
- [69]. Rogenhofer S, Kahl P, Holzapfel S, et al. Decreased levels of histone H3K9me1 indicate poor prognosis in patients with renal cell carcinoma. *Anticancer Res*, 2012. 32(3): p. 879-86.
- [70]. Vakoc C R, Mandat S A, Olenchock B A, et al. Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell*, 2005. 19(3): p. 381-91.
- [71]. Borde V, Robine N, Lin W, et al. Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites[J]. *EMBO J*, 2009,28(2):99-111.
- [72]. Fnu S, Williamson E A, De Haro L P, et al. Methylation of histone H3 lysine 36 enhances DNA repair by nonhomologous end-joining[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011,108(2):540-545.
- [73]. Sun Y, Jiang X, Chen S, et al. A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(37):13182-13187.
- [74]. Edmunds, J.W., L.C. Mahadevan and A.L. Clayton, Dynamic histone H3 methylation during gene induction: HYPB/Setd2 mediates all H3K36 trimethylation. *EMBO J*, 2008. 27(2): p. 406-20.
- [75]. Moving AHEAD with an international human epigenome project. *Nature*, 2008. 454(7205): p. 711-5.
- [76]. Yao J Y, Zhang L, Zhang X, et al. H3K27 trimethylation is an early epigenetic event of p16INK4a silencing for regaining tumorigenesis in fusion reprogram-

- med hepatoma cells[J]. *J Biol Chem*, 2010,285(24):18828-18837.
- [77]. Testoni B, Schinzari V, Guerrieri F, et al. p53-paralog DNp73 oncogene is repressed by IFNalpha/STAT2 through the recruitment of the Ezh2 polycomb group transcriptional repressor[J]. *Oncogene*, 2011,30(23):2670-2678.
- [78]. De Santa F, Totaro M G, Prosperini E, et al. The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing[J]. *Cell*, 2007,130(6):1083-1094.
- [79]. Chou D M, Adamson B, Dephoure N E, et al. A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010,107(43):18475-18480.
- [80]. Wood, A. and A. Shilatifard, Posttranslational modifications of histones by methylation. *Adv Protein Chem*, 2004. 67: p. 201-22.
- [81]. Gu Y, Nakamura T, Alder H, et al. The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to *Drosophila trithorax*, to the AF-4 gene[J]. *Cell*, 1992,71(4):701-708.
- [82]. Nakamura T, Mori T, Tada S, et al. ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation[J]. *Mol Cell*, 2002,10(5):1119-1128.
- [83]. Issaeva I, Zonis Y, Rozovskaia T, et al. Knockdown of ALR (MLL2) reveals ALR target genes and leads to alterations in cell adhesion and growth[J]. *Mol Cell Biol*, 2007,27(5):1889-1903.
- [84]. Gregory G D, Vakoc C R, Rozovskaia T, et al. Mammalian ASH1L is a histone methyltransferase that occupies the transcribed region of active genes[J]. *Mol Cell Biol*, 2007,27(24):8466-8479.
- [85]. Shankar S R, Bahirvani A G, Rao V K, et al. G9a, a multipotent regulator of gene expression[J]. *Epigenetics*, 2013,8(1):16-22.
- [86]. Carrozza M J, Li B, Florens L, et al. Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription[J]. *Cell*, 2005,123(4):581-592.
- [87]. Pasini D, Bracken A P, Jensen M R, et al. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity[J]. *EMBO J*, 2004,23(20):4061-4071.

- [88]. Montgomery N D, Yee D, Chen A, et al. The murine polycomb group protein Eed is required for global histone H3 lysine-27 methylation[J]. *Curr Biol*, 2005,15(10):942-947.
- [89]. Sims, R.R., K. Nishioka and D. Reinberg, Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet*, 2003. 19(11): p. 629-39.
- [90]. Morin R D, Johnson N A, Severson T M, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin[J]. *Nat Genet*, 2010,42(2):181-185.
- [91]. Yap D B, Chu J, Berg T, et al. Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation[J]. *Blood*, 2011,117(8):2451-2459.
- [92]. Souroullas G P, Jeck W R, Parker J S, et al. An oncogenic Ezh2 mutation induces tumors through global redistribution of histone 3 lysine 27 trimethylation[J]. *Nat Med*, 2016,22(6):632-640.
- [93]. Gao S B, Li K L, Qiu H, et al. Enhancing chemotherapy sensitivity by targeting PcGs via the ATM/p53 pathway[J]. *Am J Cancer Res*, 2017,7(9):1874-1883.
- [94]. Yamada A, Fujii S, Daiko H, et al. Aberrant expression of EZH2 is associated with a poor outcome and P53 alteration in squamous cell carcinoma of the esophagus[J]. *Int J Oncol*, 2011,38(2):345-353.
- [95]. Ciccia, A. and S.J. Elledge, The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*, 2010. 40(2): p. 179-204
- [96]. Pan M R, Peng G, Hung W C, et al. Monoubiquitination of H2AX protein regulates DNA damage response signaling[J]. *J Biol Chem*, 2011,286(32):28599-28607.
- [97]. Gao S B, Li K L, Qiu H, et al. Enhancing chemotherapy sensitivity by targeting PcGs via the ATM/p53 pathway[J]. *Am J Cancer Res*, 2017,7(9):1874-1883.
- [98]. Li Z, Mon H, Mitsunobu H, et al. Dynamics of polycomb proteins-mediated histone modifications during UV irradiation-induced DNA damage[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2014,55:9-18.

致 谢

时光荏苒，在读硕士研究生的这三年里，我不仅收获了专业知识技能、还收获了很多无形的宝贵财富，这都归功于帮助过我、教育过我及爱护过我的人，在这里向你们表示最真心的感谢。

首先感谢我的导师孙世龙副教授给予我能够来到放射生物这个大家庭的机会，不仅让我学到了知识，也让我在读研期间对学业、工作及未来有了更高的认识，没有老师给予的每一次历练的机会，就没有今天的我。感谢老师在这三年中传授给我的知识，感谢老师在我每次遇到困难时给予的帮助，感谢老师为我创造的每一次学习的机会，这三年中，您每一次的细心教导，都让我铭记于心。在您的带领下，我才有了质的提高， 谢谢您我的恩师！

感谢刘颖副教授，在研究生的三年里给予我的关怀，您的谆谆教诲我都铭记于心，在我不自信时，您给了我足够的肯定，在我人生迷茫时，您给我指点方向，这对于平凡的我来说是莫大的帮助，感谢您所做的一切。

感谢放射生物教研室的老师们，在你们认真细致的管理下，我们的实验才能顺利进行，感谢金顺子教授、王志成副教授对我学习及实验过程中的指点，培养了我更加严谨的做事态度，感谢赵刚副教授，申延男副教授、刘雨欣老师对我实验的帮助，感谢放射生物的同学，跟你们的每一次探讨，都使我有了更大的进步。

感谢实验室的师姐们，皇甫明美、秦海燕、李思瑶和相琳琳对我学习及生活中的帮助，尤其感谢相琳琳为我的实验及研究生生活增添了一笔色彩。

感谢我的父母、家人对我学习生涯的支持。

感谢肖泽明先生在我学习生活中的陪伴，感谢你一直默默的支持，以及在我低谷时给我的鼓励，你的出现使我的生活充满阳光。

最后再次感谢研究生期间所有给予我帮助的老师、同学、朋友及家人！