

分 类 号: R114

单位代码: 10183

研究生学号: 2015722036

密 级: 公 开



吉 林 大 学

硕士学位论文

(学术学位)

EZH2 在电离辐射诱导 Hep3B 细胞 DNA 损伤修复中对 ATM/ p53
通路的调控作用研究

EZH2 Regulates ATM/ p53 Pathway in Inducing DNA Damage
Repair of Hep3B Hepatoma Cells by Ionizing Radiation

作者姓名: 相琳琳

专 业: 卫生毒理学

研究方向: 环境毒理学

指导教师: 刘 颖 副教授

培养单位: 公共卫生学院

2018 年 5 月

EZH2 在电离辐射诱导 Hep3B 细胞 DNA 损伤修复中对
ATM/ p53 通路的调控作用研究
EZH2 Regulates ATM/ p53 Pathway in Inducing DNA Damage
Repair of Hep3B Hepatoma Cells by Ionizing Radiation

作者姓名：相琳琳

专业名称：卫生毒理学

指导教师：刘 颖 副教授

学位类别：学术型硕士

答辩日期：2018 年 5 月 29 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: 相琳琳

日期: 2018 年 6 月 7 日

中文摘要

EZH2 在电离辐射诱导 Hep3B 细胞 DNA 损伤修复中对 ATM/ p53 通路的调控作用研究

肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界上病死率最高的恶性肿瘤之一。在我国,每年因肝癌死亡的人数约有 38.3 万人,约占全球肝癌死亡病例的 51%。世界卫生组织曾预计,如果按现有的病例增长速度,从 2015 年至 2030 年中国将有约 1000 万人因肝硬化和肝癌死亡。因此,积极寻求有效的肝癌治疗方式,提高治疗的可行性是现阶段降低肝癌死亡率首要解决的问题。美国国家综合癌症网络(NCCN)肝癌诊治指南自 2013 年就推荐:原发性肝癌病人无论肿瘤位于何处,都适合外照射放疗。我国的肝癌诊治指南中也推荐肝癌放疗。放疗作为一种常用的肿瘤治疗手段,对鼻咽癌和淋巴瘤的治疗效果显著,对皮肤癌、食管癌的放疗基本可以达到手术治疗效果。但是很多癌症在放疗中逐渐出现辐射抗性,达不到预期的治疗效果,这是阻碍放射治疗广泛应用的原因之一。针对这一问题,虽然近些年开发了很多以辐射抗性相关分子为靶点的抑制剂或激活剂作为辐射增敏剂,但是细胞的辐射抗性是一套复杂精密的自我修复网络,针对某一单一分子的药物设计并不能完全消除细胞的代偿机制。因此寻找细胞自我修复机制中与细胞辐射抗性有直接关系的开关分子,是解决现阶段肝癌放疗中普遍出现的辐射抵抗问题的关键所在。

研究背景:

电离辐射对细胞造成的最严重的生物学损伤是 DNA 双链断裂(double-strand breaks, DSBs)。发生 DSBs 后,机体会迅速激活 DNA 损伤反应(DNA-damage response, DDR),细胞周期进程阻滞,为损伤修复提供时间保障,同时 DSBs 位点会聚集多种修复蛋白对断裂的 DNA 位点进行修复。这一机制被认为与肿瘤细胞的辐射抗性有重要联系。ATM 基因是一种重要的细胞周期检测点激酶,能够迅速识别 DSBs,一旦被激活便可启动一系列磷酸化级联反应调控下游基因,如 p53、MDM2、Chk2、NBS1、RAD9 和 BRCA1,

调控细胞周期进程，参与 DDR。

多梳蛋白复合体 (Polycomb group protein complexes, PcG) 介导靶基因发生甲基化修饰实现对目的基因的转录抑制，参与人体多种生物学功能的调控。PcG 由两个核心蛋白复合体组成：多梳抑制复合物 1 (Polycomb repressive complex 1, PRC1) 和多梳抑制复合物 2 (Polycomb repressive complex 2, PRC2)。越来越多的实验证明，PcG 除与调控干细胞分化和癌症发生及进展有关外，还参与哺乳动物 DDR 的调控。PRC2 主要发挥组蛋白 3 赖氨酸 27 的三甲基化 (H3K27me3) 催化作用。EZH2 作为 PRC2 的催化亚基，是一种组蛋白甲基化转移酶，直接参与 H3K27me3 修饰，SUZ12 和 EED 主要起稳定复合物的作用。可以认为 H3K27me3 是 PcG 抑制靶基因转录的标志。总结现有研究成果，可以确定当细胞发生 DNA 双链断裂时，PcG 在 DSBs 位点被招募，可能参与 DNA 损伤修复，但具体的调控机制还鲜见报道。

研究目的：

- 1.探究电离辐射对 Hep3B 细胞的损伤效应；
- 2.观察电离辐射诱导 Hep3B 细胞发生 DNA 损伤时，PcG 蛋白复合体中 EZH2 和 BMI-1 以及 ATM/Chk2/p53 通路中各基因表达变化；
- 3.探究 EZH2 对电离辐射诱导的 Hep3B 细胞损伤效应的影响；
- 4.阐明 PcG 蛋白复合体中 EZH2 对 ATM/Chk2/p53 通路的调控作用；
- 5.验证是否 EZH2 通过 H3K27me3 作用对 ATM/Chk2/p53 通路进行调控。

研究方法：

- 1.采用 CCK8 法，检测 EZH2 抑制剂 GSK126 对 Hep3B 细胞的生长抑制效应。
- 2.通过免疫荧光技术，检测电离辐射对 Hep3B 细胞的损伤作用，及 H3K27me3 的表达情况，验证电离辐射对 Hep3B 细胞的损伤程度与 H3K27me3 的表达呈辐射剂量依赖性增加。
- 3.采用流式细胞术，检测 IR+GSK126 组和 IR 组 Hep3B 细胞受到不同剂量的电离辐射后，细胞周期的变化。
- 4.采用瞬时转染的方法，建立 EZH2 沉默和过表达细胞模型，探究 EZH2 与 ATM、Chk2、p53 之间的调控关系。
- 5.采用 Real-time PCR 和 Western Blot 方法，检测各细胞模型中目的基因的

mRNA 和蛋白表达量,探讨上述基因在调控 Hep3B 细胞辐射抗性中的作用,及 EZH2 与 ATM、Chk2、p53 之间的调控关系。

6.采用染色质免疫共沉淀 (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP) 技术,检测 ATM 基因启动子区域的 H3K27me3 修饰水平,验证 EZH2 通过 H3K27me3 作用对 ATM/Chk2/p53 通路进行调控。

研究结果:

1. 给予 Hep3B 细胞 0.5Gy、1Gy、2Gy、4Gy、8Gy 5 种不同剂量的电离辐射后,检测细胞周期变化。结果发现,与假照组 (0Gy 组) 相比, G2 期细胞比例增加, G1 期和 S 期细胞比例则表现出不同程度的减少,且该规律呈现出明显的剂量依赖性增加;加入 GSK126 抑制 EZH2 生物学功能后,在 5 个不同照射剂量组均观察到,在同一照射剂量下 IR+GSK126 组 G2 期阻滞较 IR 组明显降低。

2. 免疫荧光结果显示,当 Hep3B 细胞分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 照射时,细胞中 γ H2AX 量较假照组 (0Gy 组) 显著升高,且 H3K27me3 的表达量也明显高于对照组, γ H2AX 与 H3K27me3 的表达量呈现出一定的剂量依赖性增加;加入 GSK126 抑制 Hep3B 细胞 EZH2 生物学功能后,分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 照射,结果显示 IR+GSK126 组 γ H2AX 表达量高于 IR 组,而 IR+GSK126 组的 H3K27me3 表达量高于 IR 组,这与沉默 Hep3B 细胞中 EZH2 表达后,给予相同的照射条件所观察到的结果一致。

3. 当 Hep3B 细胞给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射时, EZH2、ATM、及 p53mRNA 和蛋白表达水平、Chk2、BMI-1 的 mRNA 水平以及 H3K27me3 的蛋白水平均较对照组升高;加入 GSK126 抑制 Hep3B 细胞 EZH2 生物学功能后,与对照组 (未经 GSK126 作用的 Hep3B 细胞) 相比, p53mRNA 和蛋白表达水平无明显改变,但 ATM mRNA 和蛋白表达水平均升高;在 EZH2 沉默的 Hep3B 细胞模型中 (Hep3B-siEZH2), Hep3B-siEZH2 组 p53 和 ATM mRNA 和蛋白表达水平较对照组 (未经转染的 Hep3B 细胞) 升高;在 EZH2 过表达细胞模型中 (Hep3B- EZH2^{过表达}), Hep3B- EZH2^{过表达} 组 p53 和 ATM mRNA 和蛋白表达水平较对照组 (未经转染的 Hep3B 细胞) 未见明显改变;

4. ChIP 结果显示,选定 ATM 启动子 6 个 DNA 片段 PP1-6, Hep3B-siEZH2 组和经 GSK126 作用后的 Hep3B 细胞中, H3K27me3 修饰水平较未处理组细胞

表达明显降低，且均在 PP4 片段区域变化最为明显。

结论

1. 电离辐射能够诱导 Hep3B 细胞发生 DNA 双链断裂和细胞 G2 期阻滞；
2. ATM/Chk2/ p53 通路参与了电离辐射诱导的 Hep3B 细胞 DNA 损伤反应；
3. PcG 家族中 EZH2, BMI-1 参与了电离辐射诱导的 Hep3B 细胞 DNA 损伤反应，且 EZH2 表达降低，能够增加 Hep3B 细胞的辐射敏感性；
4. 当电离辐射诱导 Hep3B 细胞发生 DNA 损伤时，EZH2 通过介导 ATM 启动子区发生 H3K27me3 修饰来调控 ATM/Chk2/ p53 通路，进而实现对 Hep3B 细胞辐射效应的影响。

关键词：

肝细胞性肝癌，DDR，ATM/Chk2/ p53，PcG，EZH2，H3K27me3

Abstract

EZH2 Regulates ATM/P53 Pathway in Inducing DNA Damage

Repair of Hep3B Hepatoma Cells by Ionizing Radiation

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignant tumors in the world. About 38.3 million people die of liver cancer each year in China, accounting for 51% of the world's liver cancer deaths. The World Health Organization had expected that according to the current rate of increase in cases, approximately 10 million people will die from cirrhosis and liver cancer from 2015 to 2030 in China. Actively seeking effective treatment of liver cancer and improving the feasibility of treatment are the primary problems to reduce the mortality of liver cancer at the current stage. Radiotherapy is a commonly used method for treatment of cancer, especially for the treatment of nasopharyngeal and lymphoma. The radiotherapy for skin cancer and esophageal cancer can basically achieve the therapeutic effect. The United States National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guideline for the diagnosis and treatment of liver cancer has been recommended since 2013: Patients with primary liver cancer are suitable for external exposure regardless of where the tumor is located. Liver cancer radiotherapy is also recommended in the guidelines for the diagnosis and treatment of liver cancer in China. The resistance of cells to ionizing radiation largely limits the therapeutic effects of tumors. Although in recent years, many inhibitors or activators that target radiation-related molecules have been developed as radiation sensitizers, the radiation resistance of cells is a complex and sophisticated self-healing network targeting a single molecule. Drug design does not completely eliminate the compensatory mechanisms of cells. Therefore, finding the switch molecules that have a direct relationship with cell radiation resistance in the cell self-repairing mechanism is the key to solving the radiation resistance problems commonly

encountered in the current stage of liver cancer radiotherapy.

Research Background:

The most serious biological damage to cells caused by ionizing radiation is DNA double-strand breaks (DSBs). After DSBs occur, the body rapidly activates DDR, blocking cell cycle progression and providing time protection for damage repair. At the same time, the DSBs site will accumulate multiple repair proteins to repair broken DNA sites. This mechanism is thought to have an important link with the radiation resistance of tumor cells. The ATM gene is an important cell cycle checkpoint kinase that rapidly recognizes DSBs and, once activated, initiates a series of phosphorylation cascades that regulate downstream genes such as p53, MDM2, Chk2, NBS1, RAD9, and BRCA1 and participate in regulation. Cell cycle progression, participation in DDR. The ATM/Chk2/p53 pathway has been widely reported.

The polycomb group protein complexes (PcG) protein complex mediates the target gene methylation modification to achieve transcriptional inhibition of the target gene and participate in the regulation of various biological functions of the human body. PcG consists of two core protein complexes: Polycomb repressive complex 1 (PRC1) and Polycomb repressive complex 2 (PRC2). More and more experiments have shown that PcG is involved in mammalian DDR regulation in addition to regulating stem cell differentiation and cancer occurrence and progression. PRC2 mainly exerts the trimethylation of histone 3 lysine 27 (H3K27me3) catalysis. EZH2, as a catalytic subunit of PRC2, is a histone methyltransferase that directly participates in the modification of H3K27me3. SUZ12 and EED mainly function as stable complexes. It is considered that H3K27me3 is a marker of PcG inhibiting transcription of a target gene. Summarizing existing research results, it can be determined that when DNA double-strand breaks occur in cells, PcG is recruited at the DSBs site and may participate in DNA damage repair, but the specific regulatory mechanisms are rarely reported.

Research purposes:

1. When ionizing radiation induces DNA damage in Hep3B cells, the

expression of EZH2 and BMI-1 in PcG increases;

2. When the DNA damage of Hep3B cells was induced by ionizing radiation, the expression level of each gene in ATM/Chk2/p53 pathway was increased;

3. Decreased EZH2 expression level, enhanced Hep3B radiation sensitivity;

4. EZH2 regulates ATM expression by mediating H3K27me3 in the promoter region of ATM, thereby realizing the regulation of ATM/Chk2/p53 pathway.

Research methods:

1. The CCK8 method was used to detect the growth inhibitory effect of Hep3B cells under the action of EZH2 inhibitor GSK126. The appropriate dose of GSK126 was selected for subsequent experiments;

2. The expression of γ H2AX and H3K27me3 in irradiated Hep3B cells was detected by immunofluorescence. It was verified that ionizing radiation caused DNA double-strand breaks in Hep3B cells, and DNA damage and H3K27me3 expression increased with the increase of radiation dose. Explore the relationship between EZH2 and DNA damage.

3. Flow cytometry was used to detect the change of cell cycle after different doses of ionizing radiation in IR+GSK126 group and IR group Hep3B cells. It was confirmed that ionizing radiation can cause cell cycle arrest, and H3K27me3 of EZH2 is involved in the regulation of cell cycle arrest.

4. Hep3B-EZH2^{low} and Hep3B-EZH2^{high} cell models were established using transient transfection method to investigate the regulatory relationship between EZH2 and ATM, Chk2, p53.

5. Real-time PCR and Western Blot methods were used to detect the expression levels of EZH2, BMI-1, ATM, Chk2, and p53 mRNA and protein in each cell model line, to explore the role of these genes in the regulation of radiation resistance of Hep3B cells, and EZH2 The regulatory relationship with ATM, Chk2, p53.

6. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) technique was used to detect H3K27me3 in the promoter region of ATM, and EZH2 was used to regulate the ATM/Chk2/p53 pathway through the action of H3K27me3.

Research result:

1. Hep3B cells were treated with 0.5 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy, and 8 Gy of 5 different doses of ionizing radiation to detect changes in cell cycle. The results showed that compared with the sham group (0Gy group), the proportion of cells in the G2 phase increased, and the proportions of cells in the G1 and S phases showed different degrees of reduction, and the return showed a significant dose-dependent increase; GSK126 was added. After inhibiting the biological function of EZH2, it was observed in 5 different irradiation dose groups that the G2 arrest in IR+GSK126 group was lower than that in IR group at the same irradiation dose.

2. The results of immunofluorescence showed that when Hep3B cells were irradiated with 4Gy and 8Gy respectively, the expression of γ H2AX in the cells was significantly higher than that in the sham group (0G group), and the expression of H3K27me3 was also significantly higher than that of the control group. The expression levels of γ H2AX and H3K27me3 were dose-dependent; GSK126 inhibited the biological function of EZH2 in Hep3B cells, and they were irradiated with 4Gy and 8Gy respectively. The results showed that the expression of γ H2AX in IR+GSK126 group was higher than that in IR group and IR+ The expression of H3K27me3 in the GSK126 group was higher than that in the IR group, which was consistent with the results observed when the same irradiation conditions were given after silencing the EZH2 expression in Hep3B cells;

3. When Hep3B cells were treated with 4Gy and 8Gy ionizing radiation, EZH2, ATM, and p53 mRNA and protein levels, Chk2, BMI-1 mRNA levels and H3K27me3 protein levels were higher than those in the control group; GSK126 was added to inhibit Hep3B cells EZH2 After biological function, compared with the control group (Hep3B cells without GSK126), P53 mRNA and protein expression levels did not change significantly, but ATM mRNA and protein expression levels increased; in the EZH2-silenced Hep3B cell model (Hep3B -SiEZH2), Hep3B-siEZH2 group P53 and ATM mRNA and protein expression levels were higher than the control group (non-transfected Hep3B cells); in the EZH2

overexpression cell model (Hep3B-overexpression EZH2), Hep3B-overexpression Compared with the control group (non-transfected Hep3B cells), the expression levels of P53 and ATM mRNA and protein in EZH2 group were not significantly changed;

4. ChIP results showed that the expression of H3K27me3 in the six DNA fragments of the ATM promoter PP1-6, Hep3B-siEZH2 group and GSK126-expressed Hep3B cells was significantly lower than that of the untreated group, and both were PP4 fragment changes are most obvious.

Conclusion

1. Ionizing radiation can induce DNA double-strand breaks and cell G2 arrest in Hep3B cells;

2. ATM/Chk2/P53 pathway involved in ionizing radiation-induced DNA damage in Hep3B cells;

3. EZH2 and BMI-1 in PcG family are involved in ionizing radiation-induced DNA damage response in Hep3B cells, and EZH2 expression is decreased, which can increase the radiosensitivity of Hep3B cells.

4. When ionizing radiation induces DNA damage in Hep3B cells, EZH2 regulates the ATM/Chk2/P53 pathway by mediating the H3K27me3 modification in the ATM promoter region, which in turn influences the radiation effects on Hep3B cells.

KEY WORDS:

HCC ,DDR, ATM/Chk2/P53, PcG, EZH2, H3K27me3

目 录

第 1 章 前 言	1
1 癌症与 DNA 损伤修复.....	1
1.1 癌症发生 DNA 损伤反应.....	1
1.2 电离辐射与 DNA 损伤反应.....	2
1.3 ATM/Chk2/P53 通路 & DNA 损伤反应.....	3
2 表观遗传学与 DNA 损伤修复.....	4
2.1 表观遗传学	4
2.2 组蛋白甲基化	5
2.3 PcG 家族.....	6
2.4 EZH2 与癌症.....	7
2.5 EZH2 的 H3K27 的三甲基化作用对靶基因的调控.....	7
3 立题依据.....	8
第 2 章 材料与amp;方法	9
2.1 试剂耗材.....	9
2.1.1 主要试剂	9
2.1.2 主要仪器	11
2.1.3 主要耗材	12
2.2 实验方法.....	12
2.2.1 细胞培养	12
2.2.2 X 线照射.....	14
2.2.3 细胞增殖实验	14
2.2.4 细胞周期检测	14
2.2.5 免疫荧光	15

2.2.6	过表达质粒的转化和提取	16
2.2.7	用瞬时转染方法建立细胞模型	18
2.2.8	PCR.....	18
2.2.9	蛋白质免疫印迹法	21
2.2.10	ChIP	22
2.2.11	统计分析.....	24
第 3 章	实验结果	25
3.1	电离辐射对 Hep3B 细胞造成的辐射效应.....	25
3.1.1	电离辐射诱导 Hep3B 细胞发生 DNA 双链断裂	25
3.1.2	电离辐射诱导 Hep3B 细胞发生细胞周期的变化.....	25
3.1.3	电离辐射对 Hep3B 细胞 EZH2、BMI-1mRNA 表达水平的影响..	26
3.1.4	电离辐射对 Hep3B 细胞中目的基因 mRNA 水平的影响 .	27
3.2	探讨 EZH2 生物学效应对 Hep3B 细胞辐射效应的影响	28
3.2.1	明确 GSK126 的使用剂量	28
3.2.2	抑制 EZH2 的生物学效应对 Hep3B 细胞辐射效应影响...	29
3.2.3	抑制 EZH2 生物学效应对 Hep3B 细胞辐射效应相关目的 基因的影响	31
3.2.4	抑制 EZH2 生物学效应对 Hep3B 细胞辐射效应相关目的 基因蛋白水平的影响	33
3.3	EZH2 在 Hep3B 细胞辐射抗性中对 ATM/Chk2/p53 的调控...	36
3.3.1	EZH2 低表达细胞模型的建立.....	36
3.3.2	EZH2 低表达对 Hep3B 细胞辐射效应的影响	36
3.3.3	EZH2 低表达对 Hep3B 细胞中目的基因 mRNA 水平的影响..	37
3.3.4	EZH2 低表达对 Hep3B 细胞中目的基因蛋白水平的影响 .	39
3.3.5	EZH2 过表达细胞模型的建立.....	42
3.3.6	EZH2 高表达对 293T 细胞中目的基因 mRNA 水平的影响	43
3.3.7	EZH2 高表达对 293T 细胞中目的基因蛋白水平的影响...	44
3.4	EZH2 介导 H3K27me3 对 ATM/Chk2/P53 通路进行调控	45

第4章 讨 论	46
4.1 电离辐射对 Hep3B 细胞表型及目的基因 mRNA 和蛋白水平的 改变.....	46
4.1.1 电离辐射对 Hep3B 肝癌细胞中 ATM、Chk2、P53 表达水 平的影响	46
4.1.2 电离辐射对 PcG 家族中 EZH2、BMI-1 表达水平的影响	48
4.2 EZH2 通过 H3K27me3 作用对 ATM/Chk2/p53 通路进行调控	49
第5章 结 论	52
参考文献.....	53
作者简介.....	59
致 谢.....	60

英文缩略词

英文缩写	英文全称	中文全称
ArgBP2	Arg Kinase-binding protein 2	精氨酸激酶结合蛋白 2
ATM	Ataxia telangiectasia mutated	共济失调毛细血管扩张症突变
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related	共济失调毛细血管扩张症和 Rad3 相关激酶
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation	染色质免疫共沉淀
DDR	DNA-damage response	DNA 损伤反应
DSBs	Double-strand breaks	DNA 双链断裂
HP1	Heterochromatin binding protein 1	异染色质结合蛋白 1
lncRNA	Long non-coding RNAs	长链非编码 RNA
MLL	Mixed lineage leukemia	混合系白血病
PcG	Polycomb group protein complexes	多梳蛋白复合物
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
PIKK	Phosphoinositide-3-kinase-related protein kinase	磷酸肌醇-3-激酶相关蛋白激酶
PRCs	Polycomb repressive complexes	多梳抑制复合体

第 1 章 前 言

1 癌症与 DNA 损伤修复

1.1 癌症发生 DNA 损伤反应

DNA 是机体重要的遗传物质,其完整性是维系生命健康的重要基础。然而,人体约 1×10^{13} 个细胞每天都会遭受到数以万计的来自外界环境和生物体内部因素对 DNA 造成的损伤。而这些损伤与多种疾病,如癌症、遗传性疾病、先天性的免疫疾病及一些神经性病变均有紧密的联系。哺乳动物在长期的进化过程中已经形成了一套完备而精确地修复机制--- DNA 损伤反应 (DNA-damage response, DDR) 来应对这些危险因素对遗传物质的损伤。有些 DNA 损伤可被快速修复,无需触发 DDR,但有些损伤,如损伤范围较大很难修复,或大范围的核苷酸序列发生改变时,则需要触发机体的 DDR 进行修复。DDR 首先是由细胞内的感应蛋白对特定区域的基因组结构进行扫描,识别损伤的类型和严重程度,然后由下游的效应因子激活不同的信号转导通路,将损伤信号传递到各种修复相关蛋白,包括与细胞周期检查点相关的蛋白,使细胞发生周期阻滞,与此同时在 DNA 损伤位点会募集大量的损伤修复相关蛋白,执行对 DNA 损伤的修复[1-3]。修复完成后,细胞周期阻滞解除,继续进入下一步有丝分裂。如果损伤不能被及时准确地修复,处于周期停滞状态的细胞将发生凋亡。发生 DNA 损伤后,为保证修复的准确无误,染色质会发生重构或组蛋白修饰,如磷酸化、甲基化、泛素化等,目的是为 DNA 损伤后各种修复因子的招募及功能的发挥提供适宜的反应环境。Elledge 在“DNA 损伤-识别-修复”通路调控机制领域进行了大量研究,他认为 DNA 损伤修复通路并非一一对应,而是一种彼此独立而又相互关联的交互关系,这种交互网络使机体对 DNA 损伤的识别和修复更加灵敏、高效,是维持正常生命活动的重要保障。DDR 的功能一旦紊乱将对机体健康造成巨大的威胁。同时 DDR 也是机体一道重要的抗癌屏障,通常在肿瘤早期病变中被激活,预防肿瘤的发生[4, 5]。研究发现,有些参与 DDR 的因子是机体重要的癌基因或是抑癌基因,如 p53, ATM 等,由于遗传缺陷、

突变或表观遗传学修饰等原因使某一癌基因或抑癌基因激活或失活，这将增加基因组不稳定性 and 突变率，导致癌症发生几率的升高，这也解释了为什么有些癌症患者中 DDR 因子缺陷频率更高[6]。

1.2 电离辐射与 DNA 损伤反应

电离辐射能够造成的多种形式的生物学损伤，DNA 双链断裂(double-strand breaks, DSBs)是其中最为严重的一种。随着电离辐射剂量和被照射频率的增加，细胞受到的损伤程度加深，未被修复的突变基因发生累积，最终可能会引起细胞死亡或恶变[7, 8]。依据这一机制，利用放射线辐照杀伤癌细胞成为了一种有效的肿瘤治疗手段。但随着放射治疗的广泛开展，越来越多的临床病例出现了放射治疗敏感性减低的情况，而产生这种情况的原因除了与辐射造成肿瘤微环境改变有关以外，也与机体本身的 DNA 损伤修复机制有重要联系[9]，因此，DDR 在抑制肿瘤发生的同时也为肿瘤的治疗提出挑战。这一点已经被国内外学者大量的研究报道所证实，例如，神经胶质瘤很难被治愈，有研究表明可能是因为神经胶质瘤细胞有更高的 DDR 水平，导致其对放疗和化疗的不敏感[10]。由此可以推测，抑制 DDR 功能，能在某种程度上增强放疗和化疗对肿瘤细胞的杀伤性，改善放疗的治疗效果。

半个多世纪以来，科学家对 DDR 领域的研究有很多重要突破，不断有新的与 DNA 损伤修复反应有关的基因或蛋白被发现。通过某种干预手段抑制 DNA 损伤修复功能，提高肿瘤的治疗效率在临床研究中的价值也逐渐显露。市场上已有各种 DDR 抑制药物正处于临床前和临床开发阶段[11, 12]，主要是针对某一因子，设计特异性的靶向药抑制 DDR 中某一关键因子的生物学作用或对其相关组分进行修饰，使肿瘤细胞丧失 DNA 损伤修复能力，进而增加肿瘤放、化疗敏感性[13, 14]。这一医学成果转化理念也在我国科学家的实践中得到验证，如罗婧、赵路军等人发现使用 ABT-888(PARP 抑制剂)和低剂量分割全腹照射联合的治疗方法对腹部进展期实体瘤患者尤其是卵巢癌和输卵管癌患者有一定益处[15]。王秋等人提出通过抑制 ATM、DNA-PKcs 蛋白表达，可以提高肿瘤的放射敏感性差异，如宫颈癌[15]。DDR 抑制剂的治疗意义不仅仅在于增强放疗对肿瘤细胞的杀伤性，也可以通过作用于 Chk2 和 p53 等基因阻断正常细

胞的凋亡,减轻对正常组织细胞的毒性作用。虽然有关抑制 DDR 功能能提高肿瘤放射敏感性的研究取得一定成就,但恶性肿瘤是复杂的多基因系统性疾病,仅通过干预某单一靶点很难实现对肿瘤治疗有效性的提高,目前国际上对于 DNA 损伤反应抑制剂应用于实体瘤放射增敏治疗中的临床注册研究有限,尚待进一步发展。

1.3 ATM/Chk2/P53 通路与 DNA 损伤反应

DNA 损伤导致细胞周期阻滞,细胞周期阻滞是细胞完成自身 DNA 损伤修复的必经途径,能够给 DNA 修复提供必需的时间。与 DNA 损伤修复最为密切的是 G2 期、G1 期和 S 期的阻滞。当发生 DNA 损伤时,会伴随着染色体结构的改变,这种结构的改变最先激活磷酸肌醇-3-激酶相关蛋白激酶(Phosphoinositide-3-kinase-related protein kinase,PIKK)的若干成员,如共济失调-毛细血管扩张症突变基因(ataxia telangiectasia mutated, ATM)和共济失调毛细血管扩张症和 Rad3 相关激酶(ataxia telangiectasia and Rad3-related, ATR)[16]。这种具有信息传递功能的蛋白是维持基因组稳定的重要因子,它们将感知到的 DNA 损伤通过级联放大反应传递给下游靶蛋白,其产生的最典型的细胞效应就是减慢或者阻滞细胞周期进程,为接下来的 DDR 相关蛋白的募集及修复获得充分的时间。有传统观点认为,当 DNA 发生双链断裂时,主要激活的是 ATM,但是随着研究的深入发现 ATR 在发生双链断裂时也被激活。这两条信号通路对不同损伤的识别是相互交叉的,但普遍的观点认为 ATM 主要应对被电离辐射或某些药物造成的双链断裂[17],而 ATR 更多是应对紫外照射及复制压力产生的损伤。两种因子介导的信号通路共同完成对 DNA 双链断裂损伤的识别,但并不排除其他活化因素,例如 Watters DJ、Hammond E M 等人发现氧化压力或缺氧条件的刺激也可能激活 ATM 或是 ATR[18, 19]。

ATM 和 p53 同属肿瘤抑制基因,均是诱导细胞发生周期阻滞的重要因子。ATM 编码的蛋白是重要的细胞周期检查点激酶,除特异性识别 DNA 损伤外,还可通过磷酸化作用募集下游多种蛋白到 DNA 损伤位点对损伤进行修复,如 H2AX、MDC1、Rad50、Nbs1、Chk2、p53、和 MDM2 等,是细胞周期关卡机制中的主要成员[20, 21]。ATM 一旦发生基因突变将会导致机体发生进行性神经

退化性疾病、免疫缺陷、辐射敏感性增加等，甚至诱发肿瘤。ATM 能够调控诸多信号反应通路，但至今并未得到全面揭示。就电离辐射损伤而言，p53 是 ATM 重要靶基因。当电离辐射导致 DNA 发生双链断裂时可激活 ATM 激酶，ATM 以 p53 为底物使其发生磷酸化而被激活，活化的 p53 通过对下游靶基因的调控参与细胞周期检查点的激活。由 p53 介导的两条与 DNA 损伤修复有关的信号通路最终会产生两种细胞效应：细胞周期阻滞和凋亡[22]。但是仅从 ATM 是 p53 的上位基因的角度进行考虑是不全面的，因为很多研究已经证实，单纯的 ATM 功能的缺失会增加肿瘤患者对化疗药物的耐药性[23]，与之相同的是 p53 功能的缺失，会产生与 ATM 功能缺陷一样的效应[24]。Hai Jiang 等人用小鼠两种肿瘤模型、多种细胞系以及大量的临床数据发现证实了这一点，他的实验结果显示在 p53 功能缺失的正常细胞和肿瘤细胞中，通过抑制 ATM 的活性能够明显增加细胞对基因毒性的化疗药物的抵抗性，原因是抑制了 p53 依赖性的细胞凋亡。而与之不同的是，在 p53 功能缺陷的细胞系中，抑制 ATM 的活性后，能够提高肿瘤对化疗药物的敏感性。这一点提示我们是否机体内存在一种对两者表达均有调控作用的机制，一旦发现这一通路，我们是否可以利用该机制降低肿瘤对放、化疗的抵抗性，提高肿瘤的治疗率。

2 表观遗传学与 DNA 损伤修复

2.1 表观遗传学

表观遗传学属遗传学的分支学科，作为生命科学领域研究的热点问题，近年来取得了相当丰硕的研究成果。表观遗传学是研究在不改变 DNA 遗传序列的情况下哪些机制能够引起细胞表型和基因表达的可遗传变异。就目前的研究成果来说，这些机制主要包括组蛋白修饰、DNA 甲基化、染色质重塑等，它们的共同特点都是在转录层面对基因的表达进行调控。在这些机制中组蛋白修饰与 DNA 损伤修复关系更为密切，因为染色质的组蛋白上有很多不同的特异性修饰位点，如组蛋白的甲基化、乙酰化、泛素化等，这些经特异的翻译后修饰的组蛋白能够影响染色质的结构，当发生 DNA 损伤后，细胞会通过感知染色体结构的改变来触发 DDR。关于组蛋白修饰的研究最多的是组蛋白赖氨酸的乙

酰化和甲基化。一般来讲，赖氨酸的乙酰化能够使染色质某些区域变得松散，增强基因表达水平，与转录激活有关[25]，虽然组蛋白乙酰化修饰的范围较甲基化修饰更为广泛，但这种修饰是暂时的，而通常认为甲基化修饰比较稳定，能够在较长时间内维持表观遗传学效应。

2.2 组蛋白甲基化

组蛋白的甲基化修饰对基因表达的调控是双向的。目前已经被发现的 24 个组蛋白甲基化位点全部来自于精氨酸（K）和赖氨酸（R）的残基上，其中有 17 个位于赖氨酸上。赖氨酸的甲基化修饰主要发生在组蛋白 H3 和 H4 上，有 H3K4、H3K9、H3K27、H3K36、H3K79 以及组蛋白 H4 20 位赖氨酸残基（H4K20）上。不同的甲基化位点具有不同的生物学功能，H3K4、H3K36、H3K79 甲基化被认为与基因的转录激活有关，H3K9、H3K27 和 H4K20 甲基化多与转录抑制有关[26]。

不同的组蛋白甲基化的产生所需的催化酶并不完全相同，识别不同甲基化位点的效应蛋白也不同，如 H3K4 被认为是基因活化的信号，主要分布在转录活化的基因启动子区域，参与基因的转录激活[27]，其主要的催化酶为 MLL (Mixed lineage leukemia) 家族蛋白，包括 MLL1-4、SET1A、SET1B 以及 ASH1，可与 H3K4 甲基化修饰结合的效应蛋白主要有 TAF3、ING 家族、CHD1、BPTF、WDR5、JMJD2A 和 BHC80 [28-33]；H3K9 的甲基化修饰与异染色质形成有关，促进 DNA 发生甲基化，从而抑制基因转录，可以催化 H3K9 发生甲基化的酶主要有：SUV39H1、SUV39H2、G9a、ESET/SETDB1 以及 EuHMTase/GLP，可以结合的效应蛋白主要有 HP1(Heterochromatin binding protein 1)和 UHRF1(Ubiquitin-like, containing PHD, RING finger domains 1)[34-37]；H3K27 的甲基化修饰则被认为主要与转录抑制有关，主要存在于常染色质区。催化 H3K27me3 的酶为 EZH2，而能够与 H3K27 甲基化结合的效应蛋白为 Polycomb，Polycomb 是 Polycomb group protein complexes (PcG) 家族主要成员 Polycomb repressive complex 1 (PRC1) 中的亚基，因有研究显示 Polycomb 与 H3K27me3 的亲和力较高，提示两者可能结合[38]。

2.3 PcG 家族

近十几年来, 学者们对 PcG 复合体研究的热度仍然不减, 并且不断有新的发现。PcG 蛋白复合体所介导的染色质修饰与细胞命运有重要关系, 参与多种类型细胞生物进程的调控, 包括细胞分化与细胞增殖[39]; PcG 蛋白可与调控细胞增殖相关的基因启动子区结合, 通过表观遗传学修饰沉默细胞周期相关基因的表达[40], 除 Hox 基因外, PcG 参与机体发育过程中诸多关键通路的调控, PcG 蛋白功能的失调与肿瘤的发生发展有重要关系[41]。有研究报道, 在肿瘤细胞中, PcG 表达的下调使肿瘤细胞保持在最初的分化状态, 使肿瘤细胞有更强的侵袭性[42]。PcG 蛋白主要由两组多梳抑制复合体 (Polycomb repressive complexes, PRCs) 组成: PRC1 和 PRC2。PRC1 的构成成分多样, 作用机制也较为复杂 (如图 1)。哺乳动物典型的 PRC1 的生物学功能是通过阻止关键转录因子结合、阻止 RNA 聚合酶结合、阻止转录起始或者延伸、抑制染色质重塑等多种途径, 维持 PRC2 沉默靶基因后的稳定状态[43]; PRC2 则是在转录的起始阶段就发挥转录抑制作用。EZH2 是 PRC1 发挥甲基转移酶作用的主要亚基, 通过使靶基因发生 H3K27me₃, 进而沉默基因表达, 而 SUZ12 和 EED 的功能是维持 EZH2 甲基转移酶活性的稳定。PRC2 与 PRC1 两者相互协调, 共同完成对靶基因的甲基化修饰过程。因此 H3K27me₃ 是 PcG 蛋白复合体抑制靶基因转录的标志。

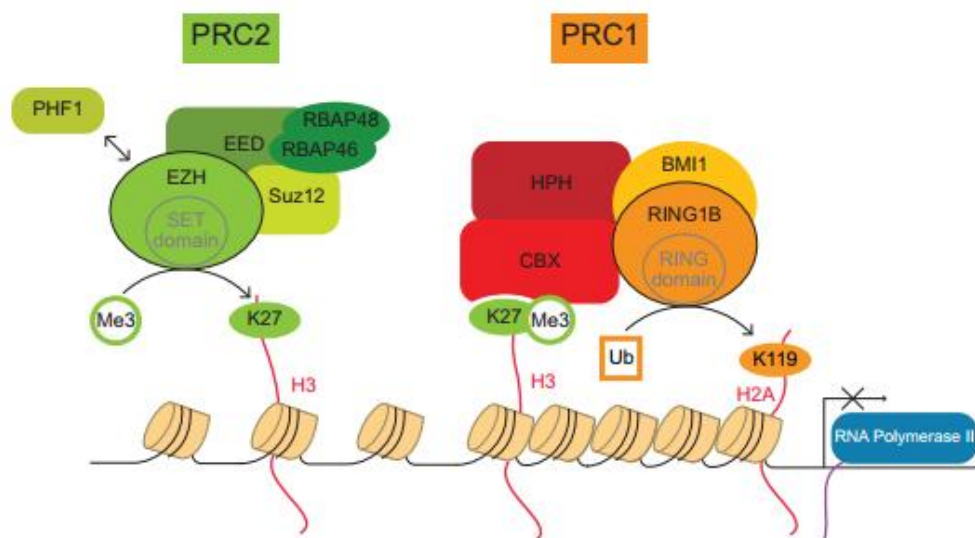


图 1 PcG 蛋白复合物的组成^[44]

2.4 EZH2 与癌症

EZH2 是高度保守的编码产生组蛋白甲基转移酶基因, 是 PcG 蛋白复合体执行对靶基因转录抑制功能的核心成分。有很多报道显示 EZH2 在多种恶性肿瘤中均表达增高, 并且与肿瘤的进展和不良预后关系密切。最初是 Varambally 等人发现 EZH2 在局限性前列腺癌和转移性前列腺癌组织中表达增高。EZH2 表达升高能够促进乳腺上皮的恶性转化, 促进乳腺癌的恶性转移, 可作为检测乳腺癌预后的指标[45, 46]。在国内, Wan 等人定量分析 32 个正常的成人肺组织, 113 个肺癌和 57 个淋巴转移癌样本中 EZH2 的表达情况, 所得到的结论是肺癌患者癌组织中的 EZH2 表达量明显比健康人正常组织高 ($p=0.001$), 淋巴转移癌组织中的 EZH2 表达量较原发性肺癌高 ($p=0.002$), 在国外也有类似的研究结果[47], 这些结果均表明, EZH2 表达升高不仅与肺癌的发生有关, 而且与肿瘤的恶化和转移有重要联系。另外在其他一些实体瘤, 如肝细胞癌、肺癌、子宫内膜癌、胃癌等中也发现 EZH2 表达升高[48-50]。EZH2 与肿瘤的关系不仅仅体现在癌症的发生和进展上, 有相关报道指出 EZH2 与肿瘤耐药性有重要关系, Hu S[51]等人通过体内体外实验发现 EZH2 在发生顺铂抵抗的卵巢癌细胞中的表达水平较顺铂治疗敏感的卵巢癌细胞高, 通过干扰 RNA 技术降低顺铂抵抗的卵巢癌细胞中 EZH2 表达同时伴随 H3K27me3 水平减低, 发现该细胞又重新恢复对顺铂的敏感性, 且实验中发现人 EZH2 表达下调后的卵巢癌耐 DDP 细胞发生 G2/M 细胞周期阻滞, 细胞增殖受到抑制, 这可能与 EZH2 通过 H3K27 三甲基化沉默了与细胞周期相关的基因有关。因此 EZH2 可能成为医学上攻克肿瘤耐药性难题的又一突破点。

2.5 EZH2 的 H3K27 的三甲基化作用对靶基因的调控

虽然有大量文献报道 EZH2 与多种肿瘤的发生都关系密切, 但对于具体的 EZH2 功能与肿瘤发生相关性的机制研究还鲜见报道。当前的主导观点认为, EZH2 作为具有沉默基因表达的因子, 在肿瘤细胞中高度沉默了包括抑癌基因, 细胞增殖相关基因在内的多种靶基因。除上文中 Hu S 对顺铂抵抗的卵巢癌细胞的研究中有提到过这种机制, Choi JH 等人在研究胃癌与 EZH2 的关系时也发现

将干扰 EZH2 表达的 siRNA 转入 MKN-28 细胞系(经检测后为胃癌细胞中 EZH2 表达含量最高的一种胃癌细胞), p53 的表达升高, 这说明 EZH2 表达与 p53 表达有明确的相关性[52]。有研究报道, 在很多疾病的发生机制中均同时发现了长链非编码 RNA (Long non-coding RNAs lncRNA) 低表达和 EZH2 表达增高的情况, 两者均与细胞凋亡、细胞增殖相关[53-55], 这是否可以说明两者存在某种调控关系? 为验证这一推测, Zheng, W 等人经过实验验证发现 EZH2 通过 H3K27me3 作用调控 lncRNA 的表达, 是一种负向调控关系, 这一观点证实了 EZH2 可以通过甲基化修饰作用调控与疾病发生有重要关系的相关靶基因的表达, 进而影响疾病的发生与进展[56]。精氨酸激酶结合蛋白 2 (Arg Kinase-binding protein 2, ArgBP2) 是一种支架蛋白, 能够阻止癌症转移, 是一种重要的抑癌基因。Tong.Y 等人在研究其与胃癌的关系中发现, PRC2 复合物会与 ArgBP2 增强子区结合, 催化发生 H3K27me3, 导致转录抑制, 增加了胃癌迁移、恶化的几率[57]。EZH2 除对与抑、致癌基因有关的靶基因进行调控外, 还有学者通过研究发现当 DNA 发生损伤时, PcG 蛋白复合物中包括 EZH2 在内的多种成分会在 DNA 损伤位点被招募, 通过发挥 H3K27me3 作用参与 DNA 的损伤修复, 这可能与肿瘤治疗中的抗性有一定关系[58]。

3 立题依据

在肿瘤的放射性治疗中, 癌细胞产生的放射线抵抗效应是造成放疗效果不理想的主要原因, 这与 DNA 的损伤修复有直接联系。当 DNA 发生双链断裂时, ATM 首先被激活, ATM 使 p53 发生磷酸化诱导细胞发生周期阻滞为 DNA 损伤修复提供了充足的时间保证。有大量研究证实 PcG 蛋白复合物中的 EZH2 的表达升高与多种癌症的发生和进展有重要关系, 同时有研究发现当 DNA 发生双链断裂时, PcG 蛋白复合物在损伤位点被招募, 参与 DNA 损伤修复。因此, 通过对以上观点的总结提出, EZH2 是否在辐射诱导的 DNA 损伤修复中对 ATM/p53 通路有调控作用? 及在 DNA 损伤修复中起到怎样的作用? 本实验通过对上述问题的探究, 旨在为肿瘤细胞放射线抵抗的基础研究提供一个新思路。

第2章 材料与amp;方法

2.1 试剂耗材

2.1.1 主要试剂

名称	公司	国家
DMEM 高糖培养液	Gibco 公司	美国
进口胎牛血清	Scienccell 公司	美国
胰蛋白酶 0.25% EDTA	Solarbio 公司	中国
青链霉素（双抗）	北京 Solarbio 科技有限公司	中国
二甲基亚砜 DMSO	Sigma 公司	美国
CCK8 试剂盒	上海东仁化学科技公司	中国
细胞周期染色试剂盒	碧云天生物公司	中国
4%多聚甲醛	合肥 Biosharp 科技有限公司	中国
Tween-20	Sigma 公司	美国
DAPI（蓝光）	北京 Solarbio 科技有限公司	中国
荧光抗淬灭剂	北京 Solarbio 科技有限公司	中国
异丙醇	北京化工厂	中国
氯仿	北京化工厂	中国
无水乙醇	北京化工厂	中国
琼脂糖	Amresco 公司	美国
逆转录试剂盒	Thermo 公司	美国
荧光定量 PCR 扩增试剂盒	Takara 公司	美国
siRNA 转染试剂	百代生物	中国
引物/siRNA	上海生工	中国
Trizol	Invitrogen 公司	美国
抑制剂 GSK126	Selleck 公司	美国
苯甲基磺酰氟，PMSF	Sigma 公司	美国

RIPA 裂解液	北京 Solarbio 科技有限公司	中国
蛋白定量分析试剂盒	碧云天生物技术研究	中国
丙烯酰胺,Acrylamide	合肥 Biosharp 科技有	中国
甘氨酸, Glycine	合肥 Biosharp 科技有	中国
十二烷基硫酸钠, SDS	合肥 Biosharp 科技有	中国
过硫酸铵, AP	合肥 Biosharp 科技有	中国
三羟甲基氨基甲烷	北京博奥拓科技有	中国
MEM 培养基	GIBCO 公司	美国
胎牛血清(FBS)	MRC 公司	美国
青链霉素 (双抗)	北京 Solarbio 科技有	中国
PBS	Sigma 公司	美国
二甲基亚砷 (DMSO)	Amresco 公司	美国
1M Tris-HCl,PH8.8	北京 Solarbio 科技有	中国
1M Tris-HCl,PH6.8	北京 Solarbio 科技有	中国
20×TBS	北京 Solarbio 科技有	中国
30%丙烯酰胺 (29:1)	北京 Solarbio 科技有	中国
吐温 20, TWEEN20	Amresco 公司	美国
四甲基二乙胺, TEMED	北京博奥拓科技有	中国
10×丽春红	北京 Solarbio 科技有	中国
脱脂奶粉	BD 公司	美国
结晶紫	Sigma 公司	美国
噻唑蓝, MTT	Sigma 公司	美国
显影粉、定影粉	世纪奥博商贸有限	中国
ECL 发光试剂盒	Santa Cruz 公司	美国
Western Blot 膜再生液	北京 Solarbio 科技有	中国
丽春红	Amresco 公司	美国
质粒大提试剂盒	Invitrogen 公司	美国
Lipofectamine2000 Reagent	天根生化科技	中国
RFect 小核酸转染试剂	常州百代生物	中国

鼠抗人 λ -H2AX 抗体	Bioworld 公司	美国
FITC 标记羊抗鼠二抗	Bioworld 公司	美国
TRITC 标记羊抗鼠二抗	Bioworld 公司	美国
TRITC 标记羊抗兔二抗	Bioworld 公司	美国
兔抗人 H3K27me3 抗体	Cell Signaling Technology	美国
兔抗人 EZH2 抗体	Cell Signaling Technology	美国
兔抗人 p53 抗体	Cell Signaling Technology	美国
兔抗人 ATM 抗体	Cell Signaling Technology	美国
鼠抗人 β -actin 抗体	美国 Santa Cruz 公司	美国
HRP 羊抗鼠二抗	美国 Bioworld 公司	美国
HRP 羊抗兔二抗	美国 Bioworld 公司	美国

2.1.2 主要仪器

名称	公司	国家
高压灭菌器	Yamato	日本
水平摇床	江苏海门其林贝尔	中国
4℃冰箱	青岛海尔公司	中国
-20℃低温冰箱	青岛海尔公司	中国
-80℃低温冰箱	Sanyo	日本
无菌超净工作台	江苏净化设备厂	中国
CO ₂ 培养箱	SANYO	日本
光学显微镜	Olympus	日本
荧光显微镜	Olympus	日本
垂直电泳仪	Bio-rad	美国
倒置显微镜	Olympus	日本
制冰机	三洋公司	日本
Vortex-Genie2 涡旋振荡器	Scientific Industries	美国
TGL-16G 高速台式离心机	飞鸽	中国
Pico&Fresco 台式离心机	Heraeus	德国

流式细胞检测仪	BD FACS Aria 公司	美国
酶标仪	BioTek 公司	美国
自动酶联免疫标记仪	BioTek 公司	美国
干式恒温器	杭州奥盛仪器有限公司	中国
恒温水浴锅	常州润华电器有限公司	中国
荧光定量 PCR 仪	Bio-rad 公司	美国
X 射线摄影暗匣	奥华公司	中国
X 射线辐照仪 X-RAD 320i X	Precision X-ray, Inc 公司	美国

2.1.3 主要耗材

名称	公司	国家
吸管	Nest 公司	中国
15ml 离心管	Nest 公司	美国
T25 细胞培养瓶	LabServ 公司	美国
细胞培养皿	LabServ 公司	美国
细胞冻存管	Nest 公司	中国
6 孔培养板	BD 公司	美国
96 孔培养板	BD 公司	美国
0.5ml/1.5ml/4.0ml EP 管	Eppendorf 公司	德国
流式管	BD 公司	美国
PVDF 膜	Whatman	德国
X 射线胶片	Carestream 公司	中国

2.2 实验方法

2.2.1 细胞培养

细胞传代

实验所需要的人肝癌细胞 Hep3B、人肾上皮细胞 293T 均购置于上海市科佰生物公司。将细胞接种于 10cm 培养皿中，置于 37℃、5%CO₂ 的细胞培养箱

中培养，当细胞密度达到 80%-90% 时，进行传代培养。

操作步骤

- (1) 弃掉培养皿中的旧培养基，用 PBS 冲洗 1 次，去除残留培养基；
- (2) 向瓶内加入胰蛋白酶液和 EDTA 混合液少量，以能覆盖培养瓶底为宜，置于 37℃ 孵箱进行消化，2~5min 后观察细胞状态，当细胞间隙增大，细胞变圆后，加入少量含血清的培养基，终止消化；
- (3) 用吸管吸取培养液，按顺序轻轻吹打培养皿上的细胞，使之脱落成细胞悬液。吹打时，防止用力过猛，损伤细胞；
- (4) 将细胞转移至 15ml 离心管中，800rpm, 离心 5 分钟，弃上清，留少许培养基，轻轻弹散细胞沉淀，加 2-3ml 新鲜培养基，制备细胞悬液；
- (6) 用计数板计数后，分别接种于新的培养皿中，置于 CO₂ 培养箱中进行培养；
- (7) 换液时间应根据细胞生长的状态和实验要求来确定。一般 2~3d 后应换一次生长液。

细胞冻存

镜下观察细胞生长数量及状态，当细胞融合达到 90% 以上时，需将细胞冻存留种，避免因实验过程由于污染等原因细胞损失。

- (1) 预先配制冻存液，配制比例为 10 % DMSO + 90% 胎牛血清, 4℃ 冰箱保存预冷；
- (2) 倒去培养瓶中的培养基，用 PBS 冲洗 1 次后加入用胰酶消化细胞，将细胞转移至 15ml 离心管中，800rpm, 离心 5 分钟，弃上清，留少许培养基，轻轻弹散细胞沉淀；
- (3) 将配好的冻存液加入细胞悬液中轻轻吹打混匀；
- (4) 在每支冻存管中加入 1ml 细胞悬液, 密封后标记冻存细胞名称、冻存日期以及传代次数；
- (5) 将标记好的冻存管放入常温缓冻盒中，再将缓冻盒放入 -80℃ 冰箱中，如需长期保存半年以上，5-4 天后需将细胞转移至液氮罐保存。

2.2.2 X 线照射

细胞照射采用 X-RAD32iX 生物辐照仪(美国 PXI),照射条件:电压 180Kv,电流 20mA,单次源靶距 70cm,剂量率 1.0Gy/min。最终照射剂量为 4Gy 和 8Gy。

2.2.3 细胞增殖实验(CCK8 法)

(1) 将处于对数生长期的人肝癌细胞 Hep3B 用浓度为 0.25%的胰酶进行消化,加入新鲜培养基,制备成细胞悬液,镜下计数。每孔加入 100ul 细胞悬液,细胞接种密度为 4000 个/孔,置于恒温 37℃、5%CO₂ 的细胞培养箱中培养 24h;

(2) 24h 后,配制含有不同药物浓度的新鲜培养基。配制方法:倍比稀释,由高到低,配制成 40 uM, 20 uM, 10 uM, 5 uM, 2.5 uM 5 个浓度梯度的培养基,每组药物浓度设置 4 个平行孔;由于 GSK126 溶液的溶剂为 DMSO,考虑到 DMSO 本身的细胞毒性,阴性对照组设置为含 16%DMSO 培养基;将配置好的加药培养基加入前一天接种好的对应好的细胞中,每孔 100ul,共 200ul,放入培养箱中,继续培养 48h;

(3) 48h 后,轻轻吸去 100ul 上清后,每孔加入 10ulCCK8,混匀,继续在培养箱中孵育 1h、2h、3h,然后测定各孔吸光度值;设置最佳检测波长为 570nm。根据各组吸光度(OD 值)计算抑制率及 IC₅₀。

2.2.4 细胞周期检测

(1) 将细胞接种于 10cm 培养皿中,接种密度约 4×10⁵ 个细胞/皿,3 个重复样品,置于恒温细胞培养箱中培养 24h;按 0Gy、0Gy+GSK126、4Gy、4Gy+GSK126、8Gy、8Gy+GSK126 分 6 组,每组均给予 0.5、1、2、4、8 Gy 的 X 射线照射处理后;照射完成后,0Gy+GSK126、4Gy、4Gy+GSK126、8Gy+GSK126 立即加入 10uM (60ul) GSK126,6 组细胞共同放入培养箱中培养 12h、24h;

(2) 12h 和 24h 后收集细胞,用预冷的 PBS 冲洗细胞 2 次,用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化,用吸管轻轻吹打,收集细胞与 15ml 离心管中,1500r/min 离心 5min,弃上清,保留细胞沉淀;

(3) 加入 5mlPBS 洗涤细胞两遍, 1500r/min 离心 5min, 弃上清, 加入 1mlPBS 重悬, 进行计数, 保证细胞量达到 1×10^6 个/ml; 如需长期保存, 需每个离心管中加入事先预冷的 75% 的乙醇 5mL, 置于 -20°C 保存, 检测前, 2000 r/min.5min 离心收集固定好的细胞, 用事先预冷 PBS 洗 1 次; 无需保存, 可直接进行下一步实验操作。

(4) 向离心管中加入 1mlPBS 制成细胞悬液, 用 200 目滤网进行过滤, 保证细胞尽量为单个状态;

(5) 染色, 按细胞周期检测试剂盒说明书对细胞进行染色, 每个样品中加入 50ulAnnexin V-FITC 稀释液, 50ulPropidium iodide 稀释液, 室温避光 30 分;

(6) 上机检测, 流式细胞仪设定激发波长为 $\text{Ex}=488\text{nm}$, 发射波长为 $\text{Em}=530\text{nm}$ 。结果以各期细胞百分率表示。

2.2.5 免疫荧光

细胞爬片

(1) 处理玻片: 24*24 盖玻片, 泡酸过夜, 第二天先用自来水冲洗, 再置于无水酒精中浸泡 3-6 小时, 用三蒸水冲洗 3 遍, 烘干后进行高压消毒、烤干, 备用;

(2) 细胞接种: 接种前, 在 6 孔板的每个孔中事先滴加少量培养基, 然后放入玻片, 目的防止加细胞悬液时玻片漂起, 造成双层细胞贴片; 然后按 4×10^4 个/孔的密度加入细胞, 接种完成后, 置于细胞培养箱中培养 24h 后, 待染色。

免疫荧光染色

(1) 在细胞皿中将已经爬好细胞的玻片用 PBS 浸洗 3 次, 每次 3min, 清洗过程应尽量轻柔, 以免损失过多细胞;

(2) 在每个玻片加入 500 μl 4%多聚甲醛, 室温下, 固定 15min;

(3) 固定结束后, 用预冷的 PBS 洗涤 3 次, 每次 3~5 分钟;

(4) 清洗完成后, 加入 500ul0.2%的 Triton-X100, 室温孵育 15 分钟, 洗涤, 同上;

(5) 加 200ul 2%BSA 封闭液, 室温封闭 60 分钟, 不用 PBS 进行清洗;

(6) 封闭完成后, 在玻片上滴加 100 μ l 一抗,, 湿盒内 4 $^{\circ}$ C 孵育 24h, 洗涤同上;

(7) 24h 后, 加入 100 μ l 二抗, 室温孵育 60 分钟, 洗涤同上, 避光;

(8) 二抗孵育完成后, 加入 20 μ l DAPI (4'6-二脒基-2-苯基吲哚) 复染, 室温 10 分钟, 洗涤同上;

(9) 封片, 将玻片从 6 孔板中取出, 倒扣在滴加了抗淬灭剂的干净的载玻片, 避光室温静置 15 分钟;

(10) Olympus BX51 正置荧光显微镜下观察, 采集图像。

2.2.6 过表达质粒的转化和提取

实验所需的过表达质粒由厦门大学金光辉课题组提供, 质粒的转化和提取由本课题组完成。

过表达质粒的转化

(1) 制备含有氨苄抗生素的 LB 平板;

(2) 取 50 μ l 感受态细胞于 1.5ml 离心管, 加入稀释好的 20 μ l 质粒,混匀物, 冰上静置 30min;

(3) 42 $^{\circ}$ C 水浴, 热休克 90s, 迅速置于冰上 3-5min, 此过程避免震荡菌液;

(4) 加入 1mlLB 液体培养基 (不含抗生素), 混匀; 摇床 37 $^{\circ}$ C, 180rpm, 1h,使细菌恢复正常生长状态, 表达质粒编码的抗生素抗性基因;

(5) 取 100 μ l 菌液加入含氨苄抗生素的 LB 平板上, 均匀涂摸; 待菌液被培吸收后, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养, 12h-16h 后出现菌落;

(6) 挑取涨势好的单克隆菌落于 4ml 含氨苄抗生素的 LB 液体培养基中, 摇床 37 $^{\circ}$ C, 150rpm,5h;

(7) 吸取 50 μ l 菌液加入含氨苄抗生素的 200mlLB 液体培养液中, 摇床 37 $^{\circ}$ C, 150rpm 过夜。第二天取出部分菌种保存, 余下的进行质粒的提取。

过表达质粒的抽提 (大提)

第一日

(1) 向 50ml 离心管中加入 200ml 菌液, 5000rpm, 离心 15min, 去上清;

(2) 用 10ml Solution I 重悬细胞, 加入 20ml 现配的 Solution II, 轻柔地颠倒混匀, 室温放置 10min。加入 15ml 预冷的 Solution III, 混匀, 置于冰上 10min;

(3) 4℃, 8000rpm, 离心 20min, 用 50ml 注射器(底部塞棉花, 高压灭菌后使用)收集上清; 加入 0.6~1 倍体积的异丙醇, 颠倒混匀, -20℃, 静置 30min;

(4) 4℃, 10000rpm, 离心 20min, 去上清; 加 2ml 70%乙醇漂洗, 10000rpm, 离心 20min, 弃上清, 倒扣控干; 加 3ml DDW 溶解 DNA 沉淀, 转到预冷的 50ml 离心管, 加等体积预冷的 5M LiCl 混匀;

(5) 4℃, 10000rpm, 离心 15min, 取上清置于新的 50ml 离心管中, 加等体积的异丙醇, 混匀, -20℃, 静置 30min

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

(7) 加 500μl DDW 溶解沉淀; 转移置 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℃过夜。

第二日

(8) 4℃, 13000rpm, 离心 20min, 去上清, 倒扣控干;

(9) 重悬沉淀物, 加入 500μl 75%乙醇, 4℃, 12000rpm, 离心 5min, 重复一次, 去上清, 室温挥发 10min, 用 400μl DDW 溶解沉淀, 吹打混匀;

(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; 重复两次, 第三次吸取 2/3 体积上清即可;

(11) 加入 1/10 体积的 3M 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℃, 12000rpm, 离心 10min, 去上清; 加 500μl 预冷的 70%乙醇, 洗涤两次; 4℃, 13000rpm, 离心 5min, 去上清, 倒扣控干, 室温晾 10min, 加 200μl TE 溶解质粒。

2.2.7 用瞬时转染方法建立细胞模型

EZH2 过表达细胞模型建立

(1) 细胞转染前一天, 接种细胞 8×10^4 - 1×10^5 个/孔于 6 孔板中, 保证第二天转染时细胞融合率达 80%-90%。;

(2) 用低血清培养基 250ul 稀释 8uLLipofect18amineTM2000 转染液: 然后用 250uL 低血清培养基稀释 4ug 质粒, 静置 5min 后, 将两者混合, 用枪头轻轻吹吸, 混匀。

(3) 将 500ul 混合液室温静置 20min, 加入待转染的细胞, 4h-6h 后观察细胞状态, 决定是否更换新鲜培养基; 培养 24h-36h, 检测转染效率, 待进行下一步实验处理。

EZH2 低表达 si RNA 细胞模型建立

干扰 RNA 序列

siEZH2-1	GAGGTTTCAGACGAGCTGAT
siEZH2-2	GCAAATTCTCGGTGTCAAA

(1) 细胞接种: 将处于对数期的细胞接种至 6 孔板中, $6-8 \times 10^4$ /孔, 加入 2.5ml 培养基 (不含抗生素), 培养 24h, 使细胞在转染时密度在 30-50%;

(2) 制备 siRNA-RFect 混合物: 取 3ul siRNA 用 250ul 无血清培养基稀释; 取 10ul RFect 用 250ul 无血清培养基稀释。轻轻混匀, 室温孵育 5min; 5min 后, 将 siRNA 稀释液和 RFect 稀释液混合, 混匀, 室温孵育 20min;

(3) 转染: 将 500ul 混合物加到培养孔内。轻轻晃动培养板, 混匀;

(4) 37℃培养, 24h 观察细胞状态, 更换完全培养基。待进行下一步实验处理。

2.2.8 PCR

RNA 的提取

(1) 将细胞用预冷 PBS (经过高压灭菌) 洗 3 次, 加入 500uL Trizol (6 孔板), 室温孵育 5min, 用移液器反复吹打细胞, 使其从皿上脱落, 转移至无

RNA 酶的 1.5m L EP 管;

(2) 加入 0.2 m L 的氯仿, 剧烈震荡 15s, 室温放置 2-3min。12000r / min, 4℃离心 15min, 液体出现分层, RNA 被分离保存在上层的水相, 吸取水相, 转至新的 EP 管, 约 0.5ml, 注意尽量避免吸入蛋白层。

(3) 加入 0.5m L 的异丙醇, 颠倒混匀后, 静置 10min, 沉淀 RNA, 12000r / min, 4℃离心 10min, 弃上清, 部分样品中 RNA 沉淀可以在管底部看到。

(4) 加入 1.2ml 75%的乙醇, 漩涡震荡重悬样品, 4℃, 8000 r / min, 离心 10min; 重复 1 次; 弃上清, 倒扣 EP 管于无 RNA 酶的滤纸上干燥 5min。

(5) 加入 20uLDEPC 用移液器反复吹吸至沉淀溶解, 进行浓度测定。必要时可置于-70℃冰箱保存。

(6) RNA 定量, 充分混匀后, 用酶标仪检测其 260 和 280 nm 波长下的光密度值 (A), A260/A280 在 1.8 ~ 2.0 之间, 表明 RNA 纯度较高, RNA 浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) = A260 $\times$ 稀释倍数 $\times 40$

RNA 逆转为 cDNA

两步法

第一步

成分	用量
5 $\times$ gDNA Eraser Buffer	2ul
gDNA Eraser	1ul
RNA	1ug
H ₂ O	up to 10ul
总体系	10ul

PCR 仪: 42℃2min $\rightarrow$ 4℃ ∞ , 得到去除基因组 DNA

第二步

成分	用量
去除基因组 DNA	10ul
RT mix	1ul
RT Primer	1ul
5 $\times$ PS Buffer	4ul
H ₂ O	4ul
总体系	20ul

37℃15min $\rightarrow$ 85℃ 5s $\rightarrow$ 4℃ ∞ , 得到 cDNA 置于-20℃保存

Real-time PCR 检测目的基因 mRNA 水平表达**引物序列**

基因	上游引物序列 5' -3'	下游引物序列 5' -3'
EZH2	TGGTCTCCCCTACAGCAGAA	TCATCTCCCATATAAGGAATGTTATG
BMI-1	TGGATCGGAAAGTAAACAAAGAC	TGCATCACAGTCATTGCTGCT
P53	ACGACGGTGACACGCTTCCCTG	CGCTAGGATCTGACTGCGGCTC
ATM	GCCAGACAGCCGTGACTTACT	CCAATACCTGTTTCTGAACCTCC
Chk2	TTATCTGCCTTAGTGGGTATCCA	CTGTCTGTAACCGTGCCTTTG

具体实验步骤：按照塔克拉 Real-time PCR 检测试剂盒说明书操作，在冰上进行操作，反应体系为（25μL）：

反应体系

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

反应条件

变性	95 ℃	2min
退火	95 ℃	5s
延伸	60 ℃	30s

共 40 个循环

溶解曲线： 95℃ 5 s →65℃ 5s—95℃ 5s

mRNA 表达水平的定量分析

定量分析采用 PCR 仪自带的分析软件计算标准曲线方程及扩增效率。每个样品至少重复 3 次，以 GAPDH 基因为内参基因,利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量方法计算分析上述基因及各基因选择性剪切产物表达水平。

2.2.9 蛋白质免疫印迹法

总蛋白提取

(1) 收集细胞，弃去培养基，用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次，第三次加 1mLPBS，用细胞刮刮取细胞移入 1.5mL 离心管中，4000 r/min 离心 5min，弃上清；

BCA 法测定蛋白浓度

(1) 配制 BCA 液，配制比例为 A: B=50: 1；将配制好的 BCA 液加入 96 孔板中，每孔放 200ul 液，每种蛋白 2 个孔；

(2) 将蛋白液稀释 10 倍后，分别向 BCA 液中加 8ul 和 12ul,然后再加 12ul 和 8ul 裂解液；

(3) 标准蛋白孔，向 BCA 液中分别加入 0、2、4、8、16、20ul 标准蛋白，加裂解液补足 220ul；

(4) 30℃ 孵育 30min 后，震荡 5min,用酶标仪 490nm 处检测 OD 值，计算标准曲线，根据标准曲线计算蛋白浓度。

蛋白质免疫印迹法 (Western blot)

(1) 将清洗干净的玻璃板，晾干后固定好，加入配制好的 SDS-PAGE 分离胶（按下表比例配制），上层注入蒸馏水，室温静置，出现明显分层线后表示分离胶已凝固；

(2) 配制浓缩胶（按下表比例配制）加入浓缩胶后，立刻插入 10 孔梳子，待浓缩胶凝固后，将玻璃板转入电泳槽内固定，注入电泳液；

(3) 拔下梳子，用进样器冲洗泳道，同时将蛋白样品于 100℃ 金属浴变性 10min；

(4) 用进样器缓慢将样品加入到 SDS-PAGE 胶孔槽内进行电泳，两侧空孔，用 1×SDS Buffer 等量补足；

(5) 电泳条件：电压 80V，约 30min；样品进入分离胶后调整电压到 120V，约 90min，样品跑至底端；

(6) 剪大小合适的 PVDF 膜, 甲醇激活 1min, 与两张厚滤纸、胶固定后浸入转膜液中, 按黑色夹板-海绵-滤纸-胶-膜-滤纸-海绵-白色夹板顺序夹好, 插入转膜槽。转膜条件: 湿转, 250 mA, 90 min; 150k D 以上所在的胶, 转膜;

(7) 5%脱脂奶粉, 封闭 2 h; 一抗孵育, 4℃过夜, 次日用 1×TBST 洗四次, 每次 5min; 二抗孵育, 室温 2 h, 1×TBST 洗 5min 四次;

(8) 在暗室内用 BCL 浸泡 PVDF 膜 3min, 最后用柯达 X 光胶片进行曝光。

(9) SDS-PAGE 凝胶配制:

溶液成分	12%分离胶		5%浓缩胶		10%分离胶	
	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

(10) Western Blot 条带结果采用 Image J 软件进行灰度分析。

2.2.10 ChIP

染色质免疫共沉淀 (Chromatin immunoprecipitation, ChIP)

染色质免疫共沉淀技术主要应用于验证内环境中蛋白质和 DNA 的直接相互作用, 旨在探索特定蛋白质与特定序列的 DNA 结合, 常用于研究转录调控以及组蛋白修饰问题的研究。

实验步骤大致为: 交联-解交联-超声打碎-免疫沉淀-洗涤-DNA 纯化-PCR 检测。

具体实验方法:

第一天

(1) 交联: 分别向待处理的实验组细胞中 (10cm 平皿) 加入 275ul 37% 甲醛, 使甲醛的终浓度为 1% (培养基约有 9ml), 37℃ 孵育 10min;

(2) 终止交联: 加入 0.5ml 2.5M 甘氨酸, 晃动混匀后室温静止 5min, 1000

r / min, 离心 5min,弃上清。加 1ml 预冷 PBS, 用细胞刮反复刮取细胞, 并用预冷 PBS 冲洗, 将细胞收集于 15ml 离心管中; 用预冷的 PBS 洗 2 次, 2000 r / min, 离心 5min, 弃上清, 待用, 也可置于-80℃保存;

(3) 超声打碎: 加入 4mlSzak's RIPA buffer, 混匀, 进行超声破碎, 30% 功率, 冲击 15s,间歇 59s,共 21 次; 破碎完成后 12000 r / min, 离心 15min, 移上清至新的 1.5mlEP 中。将破碎物取出 300ul 做后续实验, 其余保存于-80℃。300ul 破碎产物平均分为 3 组, 每组 100ul: a 组加抗体作为实验组; b 组作为对照组不加抗体; c 组加入 4ul5M 氯化钠(终浓度为 0.2M), 65℃处理 3h 解交联, 跑电泳, 检测超声破碎效果;

(4) 免疫沉淀: 向 a、b 组中加入 900ul ChIP Dilution Buffer 和 20ul 的 50×PIC, 再加入 60ul Protein AA garose/Salmon SpermDNA,4℃磁珠颠转 1h。1h 后, 4℃静置 10min, 700 r / min, 离心 1min, 取上清。各自留取 20ul 作为 input。一管中加入 1ul 抗体, 另一管中不加抗体, 4℃磁珠颠转过夜。

第二天

(5) 洗涤: 孵育过夜后, 每管中加入 60ul Protein AA garose/Salmon SpermDNA,4℃磁珠颠转 2h, 4℃静置 10min, 700 r / min, 离心 1min, 除上清, 依次加入下列溶液清洗沉淀复合物:

a:稀释缓冲液

b:低盐缓冲液

c:高盐缓冲液

d:氯化锂溶液

e:TE 缓冲液

清洗方式: 加入溶液, 4℃颠转 10min, 4℃静置 10min, 700 r / min 离心 1min, 除上清;

(6) 洗脱: 清洗完毕后, 开始洗脱。每管加入 250ul 洗脱液, 室温下磁珠颠转 15min,静置离心后, 收集上清。重复洗涤一次, 最终收集洗脱液 500ul, 每管加入 20ul 5M NaCl(终浓度为 0.2M),混匀, 65℃解交联过夜。

洗脱液成分: 100ul10%SDS,100ul 1M NaHCO₃,800ulddH₂O,共 1ml

第三天

(7) DNA 样品回收: 解交联结束后, 每管加入 1ulRNaseA(MBI),37℃孵育 1h。1h 后每管加入 10ul0.5MEDTA,20ul 1M Tris.HCl(PH6.5)、2ul 10mg/ml 蛋白酶 K,45℃处理 2h, 用 Axygen 凝胶回收试剂盒回收 DNA 片段, 最终将样品溶于 100ulddH₂O。

(8) ChIP-QPCR

1) 引物设计, 根据 Genebank 中提供的基因数据信息, 按 QPCR 引物设计原则, 对目的基因的 ChIP-QPCR 引物进行设计, 引物由上海生工合成。引物序列相关信息如下表所示:

基因	上游引物序列 5' -3'	下游引物序列 5' -3'
ATM PP1	GAACGGGTGTCCTACTGTAATC	GAGCTATCCTGTGCTCAAACA
ATM PP2	TTTGAGCTTTACCTGGCTCTC	ACTTGTCTGTCAGGGTGTATTG
ATM PP3	CTCTACACTGGACGACGTATTG	CCTTCTAATAACCCGCCCTTAT
ATM PP4	GCTTGGGCTCTGGAATCATA	GCTCACCACAGGTCAAGATTA
ATM PP5	TGCCAAGGGCAGAGTTATTT	CTTCCTACGAGCCTCTGAATTG
ATM PP6	TGAGGCTTGGTGTACGAATG	TTGGAAAGAAAGGGAGGTATGG

2) PCR 具体实验步骤同上 2.2.9 (在冰上进行操作)

3) ChIP-QPCR 数据分析: 以 Input 对照组为内参对 ChIP 后的样本 DNA 进行标准化, 计算 ChIP 样本中目的 DNA 片段占 Input 对照组中的百分比。

4) GraphPad Prism 5 软件对统计数据进行图像化处理。

2.2.11 统计分析

用 SPSS19.0 对实验数据进行分析, $P<0.05$ 被认为有统计学差异。

第3章 实验结果

3.1 电离辐射对 Hep3B 细胞造成的辐射效应。

3.1.1 电离辐射诱导 Hep3B 细胞发生 DNA 双链断裂

Hep3B 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，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 Hep3B 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（图 1）。

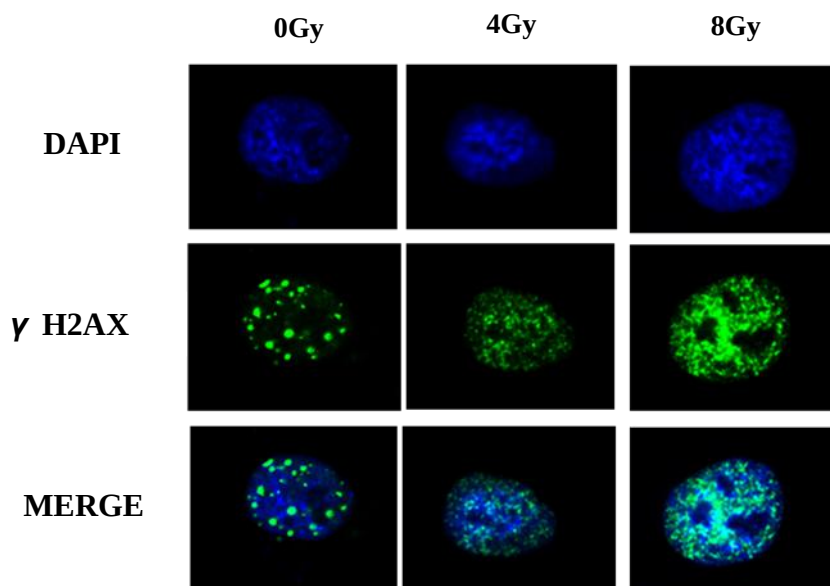


图 1 不同剂量的电离辐射对 Hep3B 细胞的损伤

3.1.2 电离辐射诱导 Hep3B 细胞发生细胞周期的变化

对 Hep3B 细胞给予不同的照射剂量 0Gy、0.5Gy、1Gy、2Gy、4Gy、8Gy，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 期细胞比例明显增加,而 G1 期和 S 期均有不同程度的减小,12h 组(图 2 A)和 24h 组(图 2 B)周期变化规律一致。

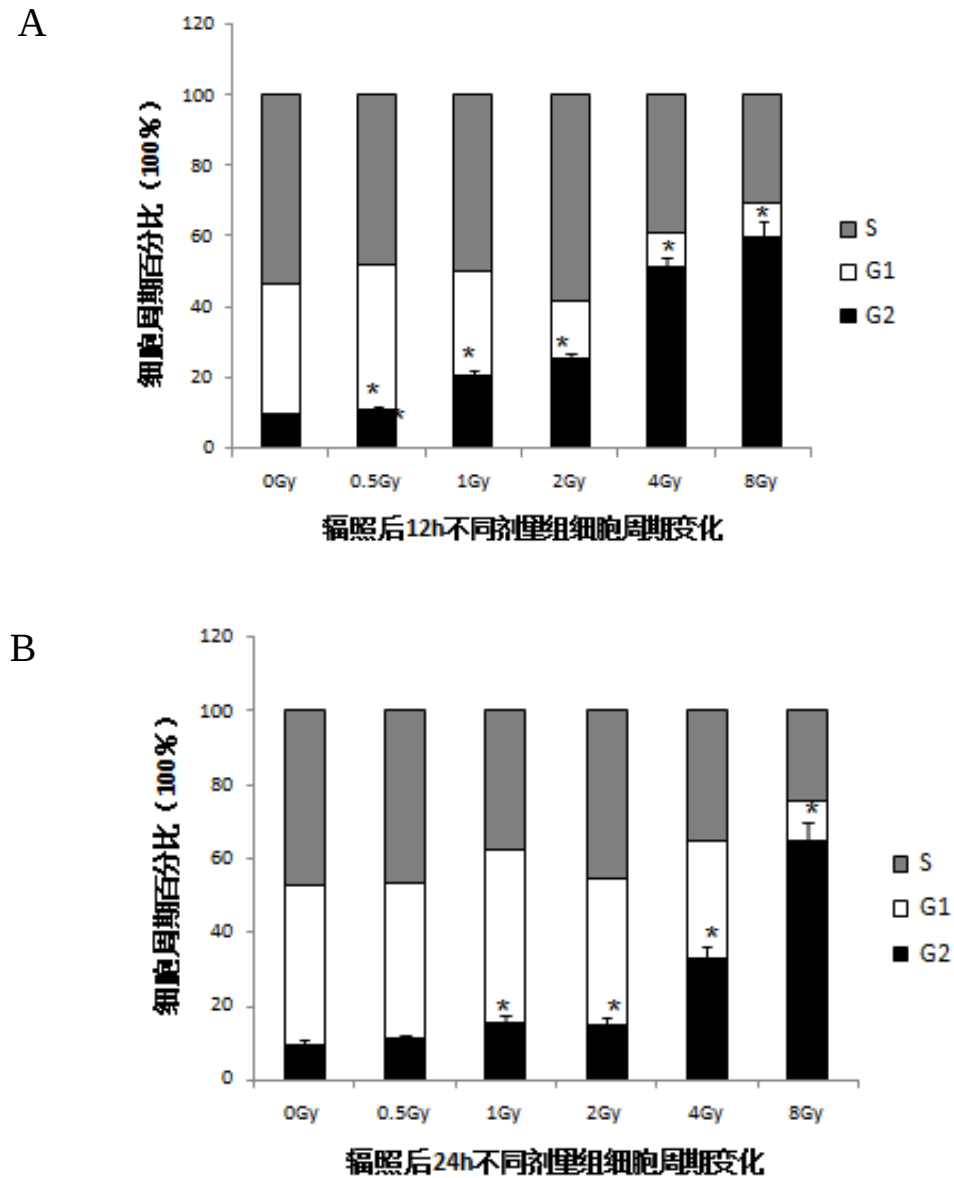


图2 Hep3B 细胞给予不同的照射剂量照射后 12h 和 24h 细胞周期的变化

3.1.3 电离辐射对 Hep3B 细胞 EZH2、BMI-1mRNA 表达水平的影响

Hep3B 细胞分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射,照射后 6h、12h 收集细胞,采用 Real-Time PCR 方法检测 EZH2、BMI-1mRNA 表达水平。结果显示,与假照组相比,随着照射剂量的增加,EZH2、BMI-1mRNA 水平显著升高,且 6h 的结果更加稳定(图 3 A、C、D)。

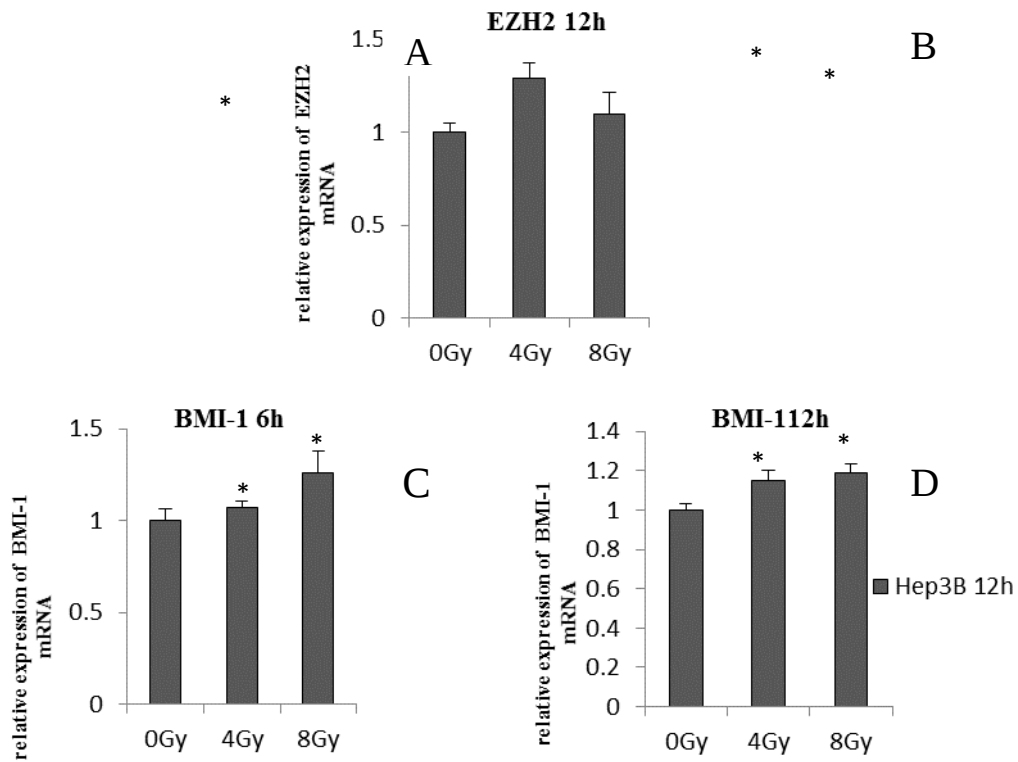
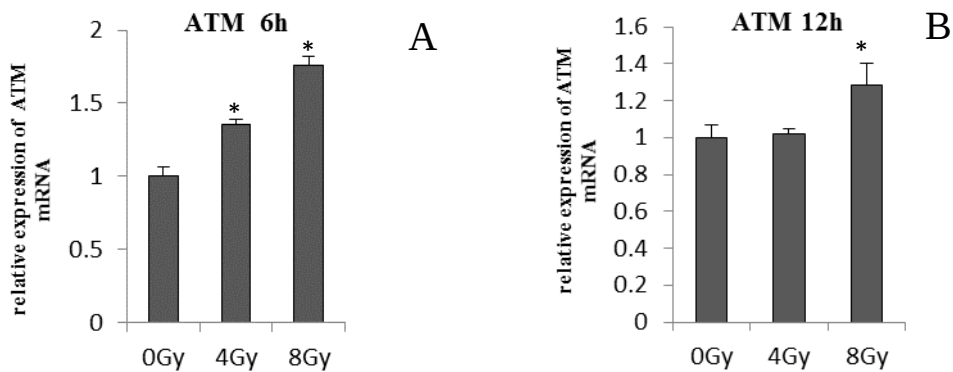


图 3 电离辐射对 Hep3B 细胞中 EZH2、BMI-1mRNA 水平的影响

(注：*与 0Gy 组比较， $P < 0.05$)

3.1.4 电离辐射对 Hep3B 细胞中目的基因 mRNA 水平的影响

Hep3B 细胞分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射，照射后 6h、12h 收集细胞，采用 Real-Time PCR 方法检测 ATM、p53、Chk2mRNA 表达水平。结果显示，与假照组相比，随着照射剂量的增加，ATM、p53、Chk2mRNA 水平显著升高，且 6h、12h 结果规律性较为一致。



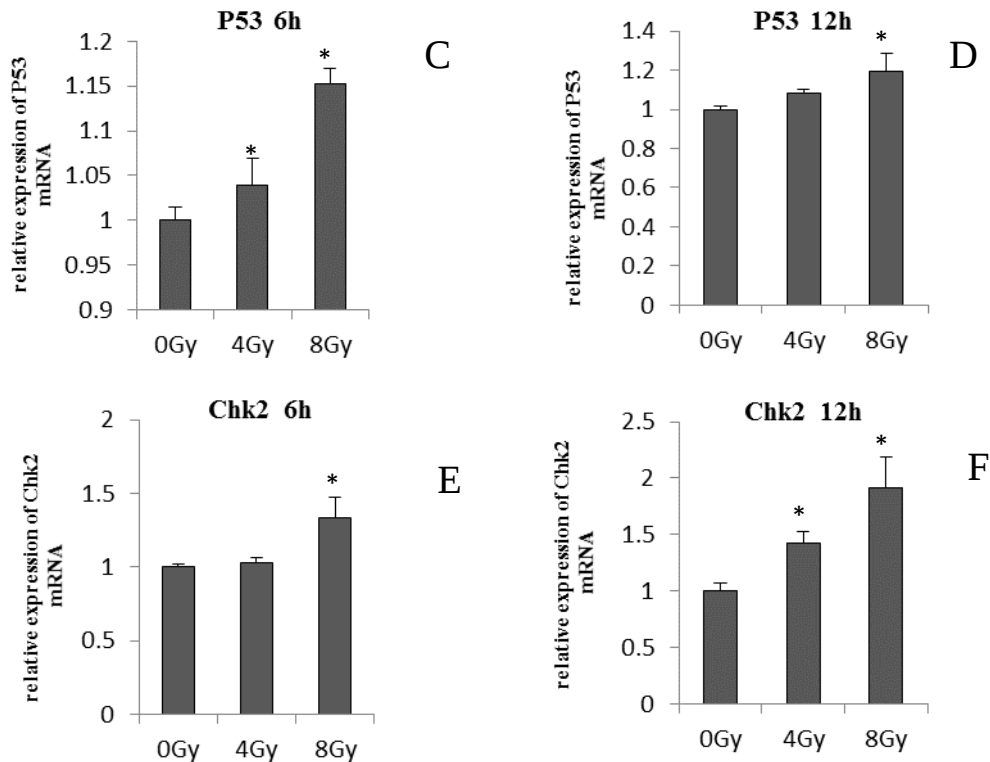


图.4 电离辐射对 Hep3B 细胞中 ATM、p53、Chk2 mRNA 水平的影响

(注：*与 0Gy 组比较， $P < 0.05$)

3.2 探讨 EZH2 生物学效应对 Hep3B 细胞辐射效应的影响

3.2.1 明确 GSK126 的使用剂量

Hep3B 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，选取结果较为稳定时，Hep3B 细胞生长抑制率达 50%时所对应的 GSK126 使用浓度。结果显示，加入 CCK8 孵育 2h 后和加入 CCK8 3h 结果趋向一致，Hep3B 细胞生长抑制率为 50%左右时，GSK126 使用剂量为 10uM。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 10uM GSK126 作为后续实验用量。

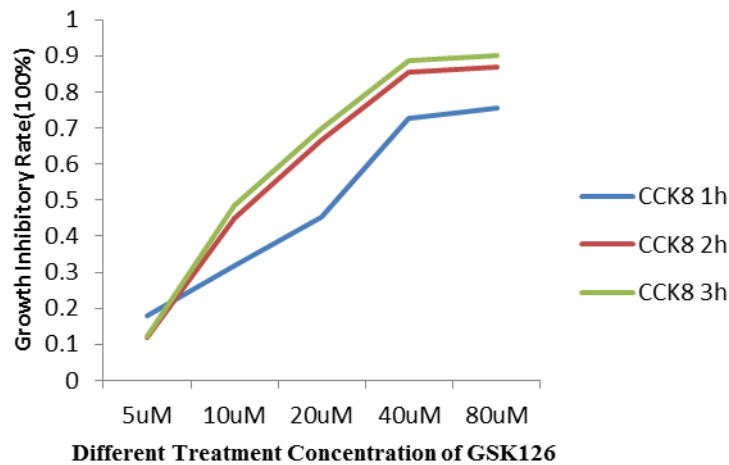


图5 不同浓度的 GSK126 对 Hep3B 细胞的生长抑制作用

3.2.2 抑制 EZH2 的生物学效应对 Hep3B 细胞辐射效应影响

3.2.2.1 抑制 EZH2 生物学效应对辐射诱导 Hep3B 细胞发生 DNA 损伤的影响

Hep3B 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。（图 5 A、B）

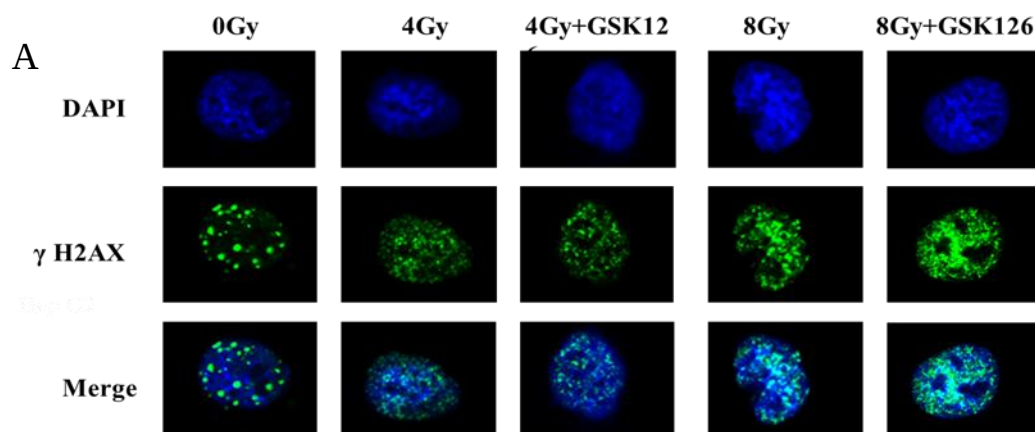


图5A 电离辐射对抑制 EZH2 生物学效应的 Hep3B 细胞 γ H2AX 的影响

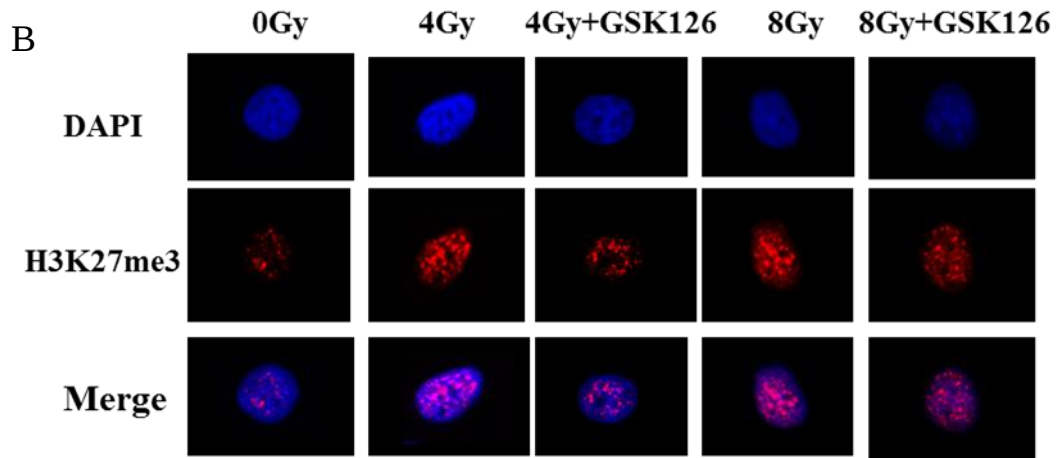
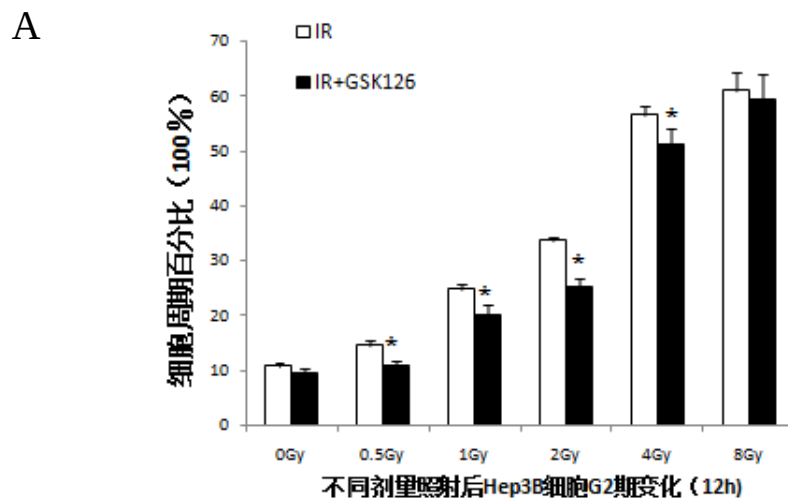


图 5 B 电离辐射对抑制 EZH2 的生物学效应 Hep3B 细胞 H3K27me3 的影响

3.2.2.2 抑制 EZH2 生物学效应对电离辐射诱导 Hep3B 细胞发生周期的影响

对 Hep3B 细胞给予不同的照射剂量 0Gy、0.5Gy、1Gy、2Gy、4Gy、8Gy，照射后 IR+GSK126 组立即加入 GSK126，继续培养 12h 和 24h 后收集细胞，然后采用流式细胞术检测细胞的周期变化。结果显示，随照射剂量的增加，细胞 G2 期阻滞明显增加，且呈剂量依赖性；相同照射剂量下，IR+GSK126 组的 G2 期阻滞较 IR 组有所减少，12h 组(图 6 A)和 24h 组(图 6 B)周期变化规律一致。



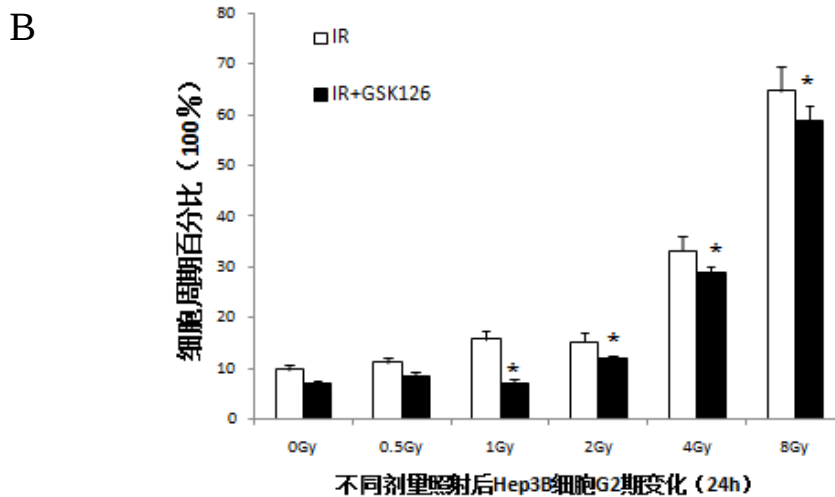
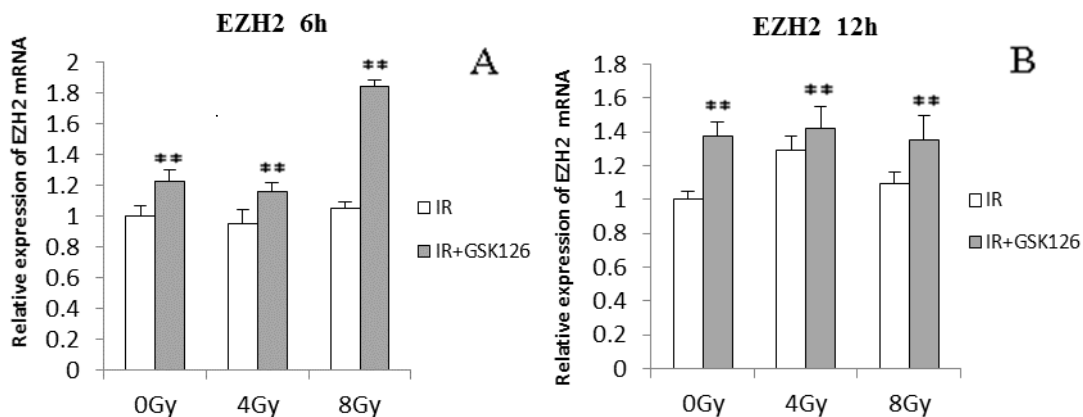


图6 Hep3B 细胞给予 GSK126 处理后 12h 和 24h 细胞周期变化

3.2.3 抑制 EZH2 生物学效应对 Hep3B 细胞辐射效应相关目的基因的影响

Hep3B 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 10uM GSK126, 继续培养 6h、12h 收集细胞, 采用 Real-Time PCR 方法检测 EZH2、ATM、p53、Chk2mRNA 表达水平。结果显示, 在相同的照射剂量下, IR+GSK126 组的 EZH2mRNA 水平高于 IR 组, 且 6h 与 12h 规律一致; 6h ATMmRNA 变化也符合这一规律 (图 7 A、B、C); 而在相同的照射剂量下, IR+GSK126 组的 p53、Chk2mRNA 水平低于 IR 组, 且 6h 与 12h 规律一致, 12h ATMmRNA 变化也符合这一规律。(图 7 D、E、F、G、H)



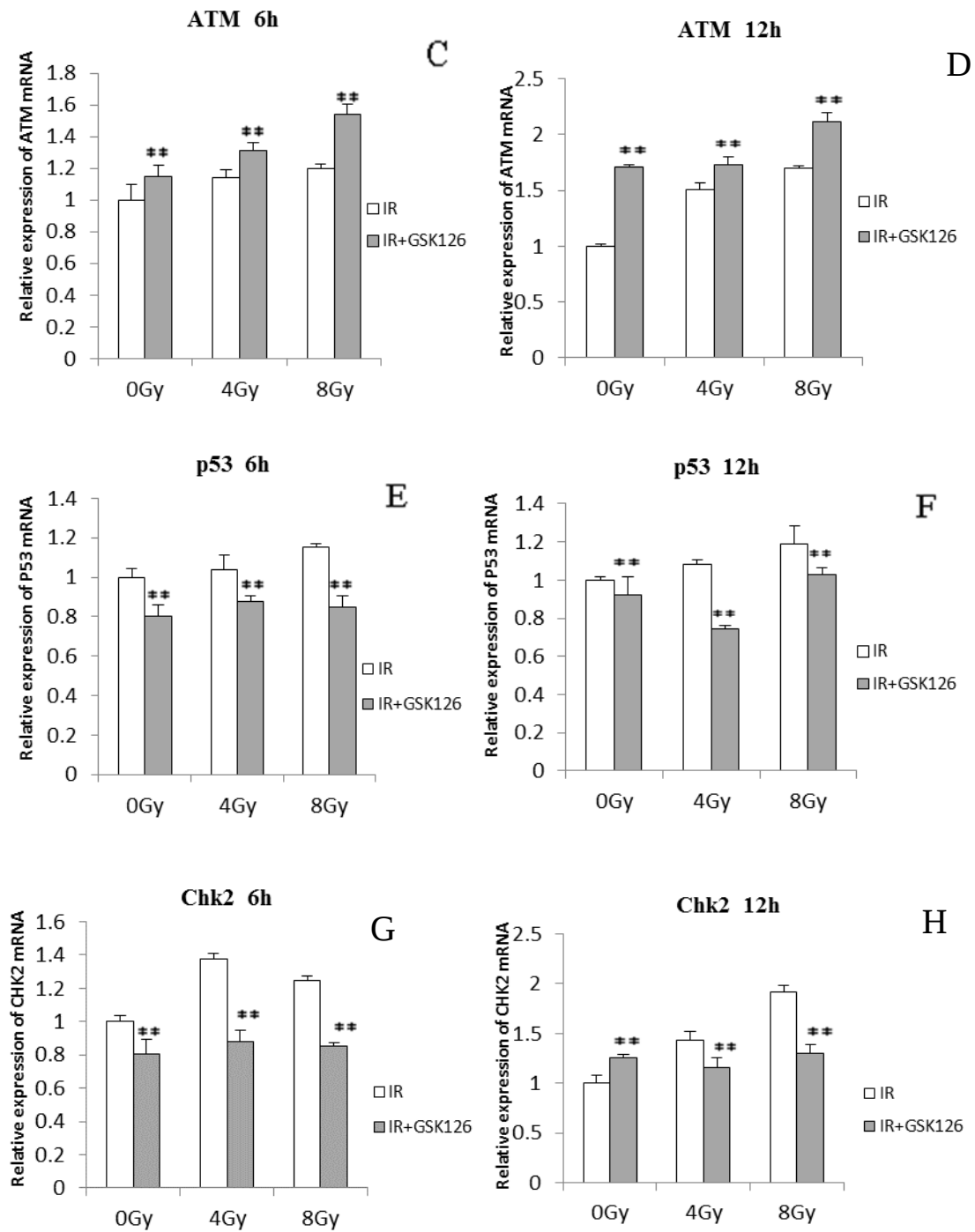


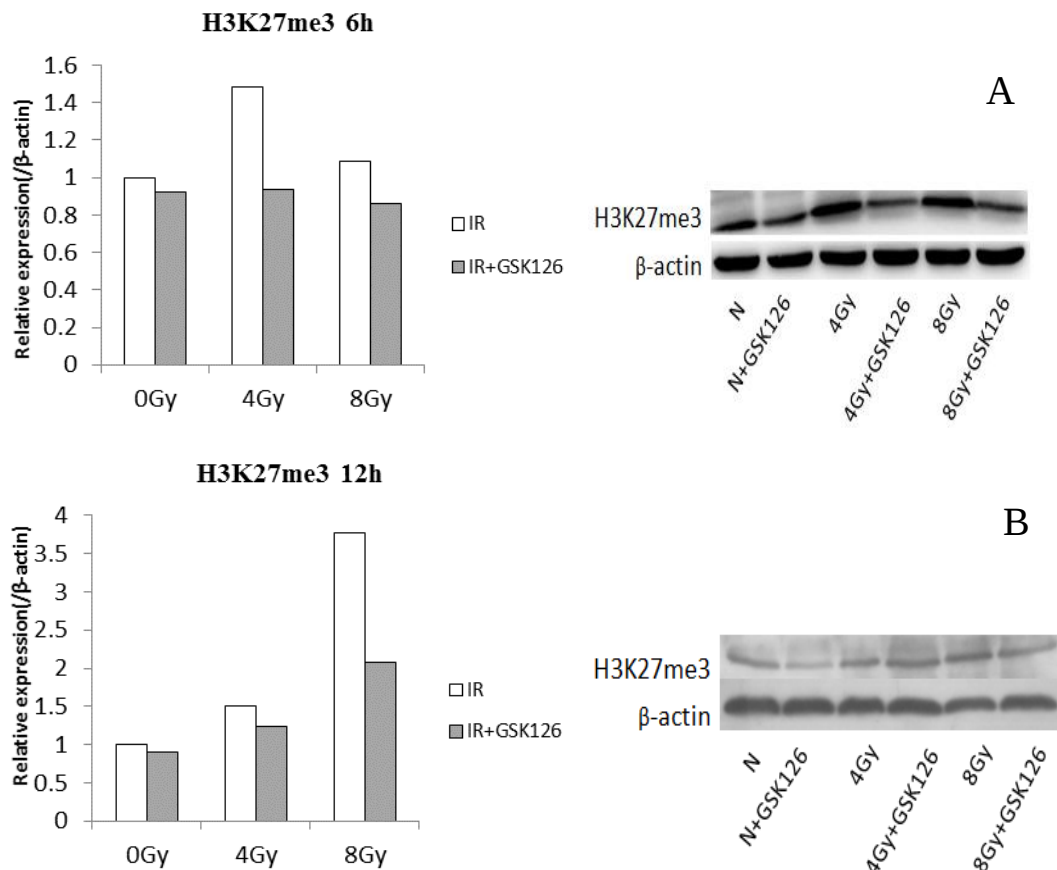
图7 抑制 EZH2 的生物学效应对电离辐射诱导 Hep3B 细胞发生 DNA 损伤后

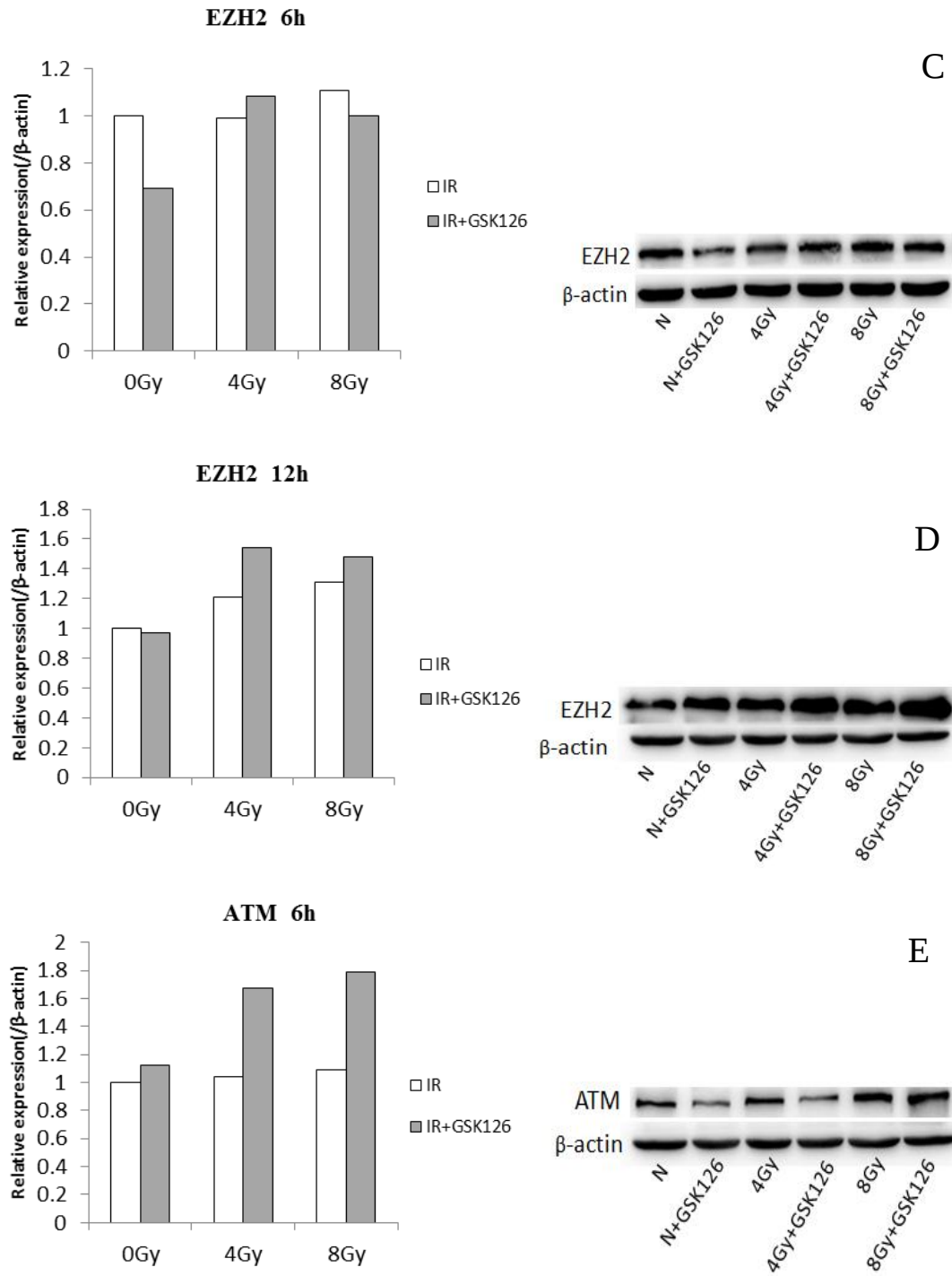
各基因 mRNA 水平的影响

(注: **相同照射剂量两组间比较 $P < 0.05$)

3.2.4 抑制 EZH2 生物学效应对 Hep3B 细胞辐射效应相关目的基因蛋白水平的影响

Hep3B 细胞分别给予 0Gy、4Gy、8Gy 电离辐射处理后, IR+GSK126 处理组加入 10uM GSK126, 培养 6h、12h 收集细胞, 采用 Western blot 实验检测 H3K27me3、EZH2、ATM、p53 蛋白水平的改变。结果如图所示, 在相同的照射剂量下, IR+GSK126 组 H3K27me3 表达水平较 IR 组有所下降, 表明 GSK126 在一定程度上抑制了 EZH2 的生物学效应 (图 8 A、B); GSK126 对 EZH2 蛋白水平的抑制无明显规律 (图 8 C、D); 但在相同的照射剂量下, 12h IR+GSK126 组 ATM、p53 蛋白表达水平较 IR 组有升高 (图 8 F、H)。





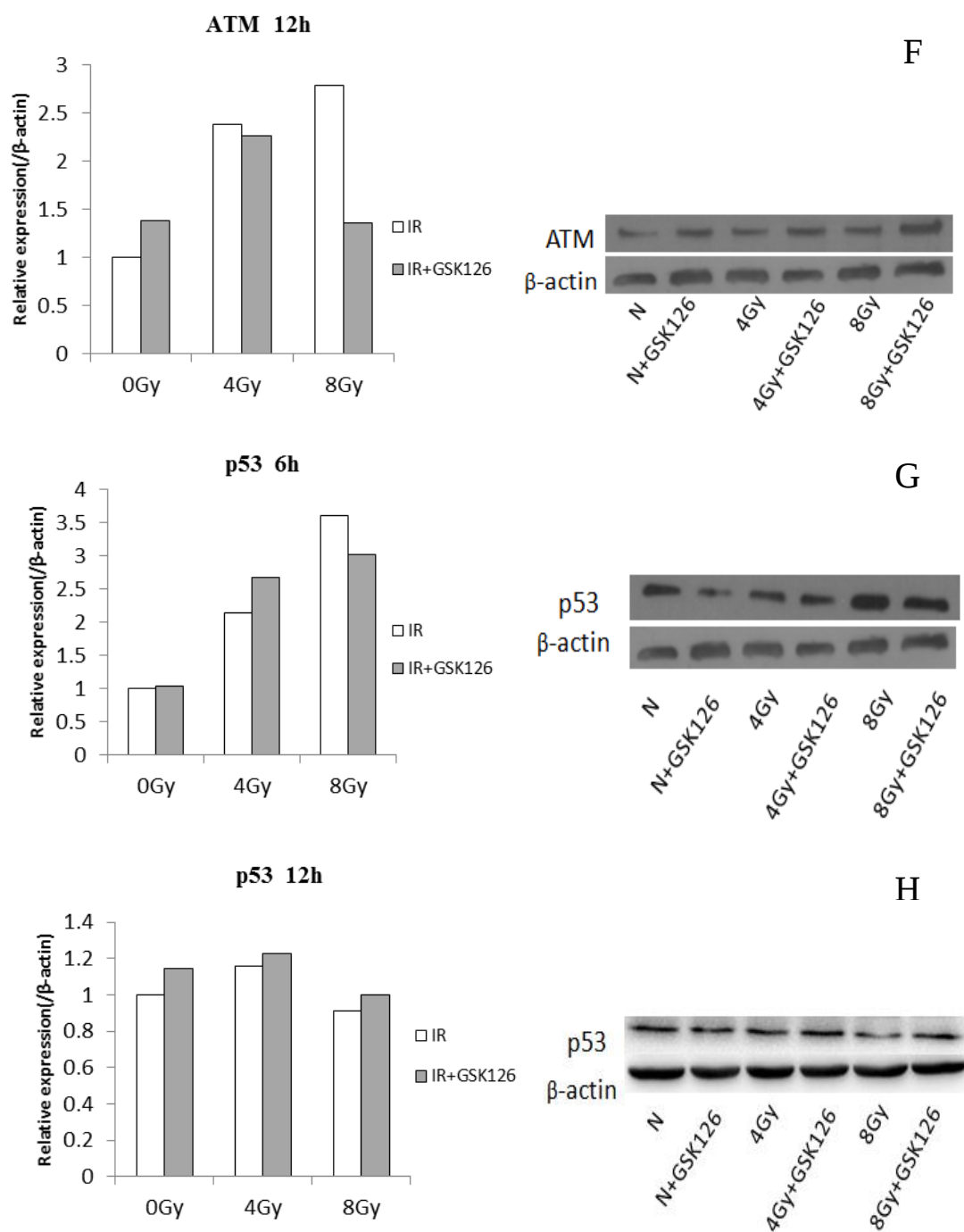


图8 抑制 EZH2 的生物学效应对电离辐射诱导 Hep3B 细胞发生 DNA 损伤后目的基因蛋白水平的影响

3.3 EZH2 在 Hep3B 细胞辐射抗性中对 ATM/Chk2/p53 的调控

3.3.1 EZH2 低表达细胞模型的建立

采用瞬时转染方法将 siRNA 转入 Hep3B 细胞，干扰 EZH2 表达。表 3.3.1 为 siRNA 的序列。通过 Real-Time PCR 验证两条 siRNA 效果，结果如图 9 所示，未干扰组相比，两条 siRNA 均转染成功，且均出现 EZH2mRNA 水平明显降低（图 9），为保证最佳的实验效果，我们选择干扰最明显的 si-EZH2-1。

表 3.3.1 siRNA 序列

基因	siRNA Sequence
si-EZH2-1	GAGGTTTCAGACGAGCTGAT
si-EZH2-2	GCAAATTCTCGGTGTCAAA

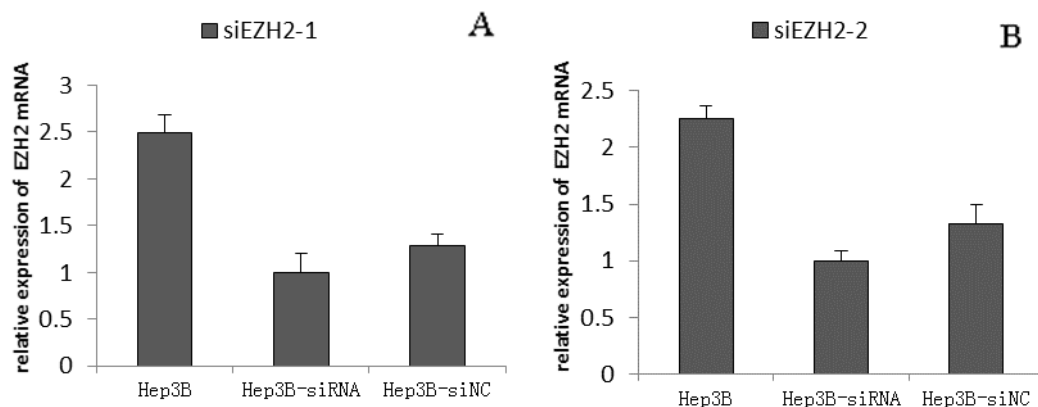


图 9 siRNA 干扰后 EZH2 的 mRNA 表达变化

3.3.2 EZH2 低表达对 Hep3B 细胞辐射效应的影响

采用瞬时转染方法将 siEZH2 转入 Hep3B 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 双联断裂标志 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+si-EZH2 组较 IR 组 γ H2AX 荧光强度明显升高, 而 H3K27me3 荧光强度表现为 IR+si-EZH2 组较 IR 组明显降低。(图 10 A、B)

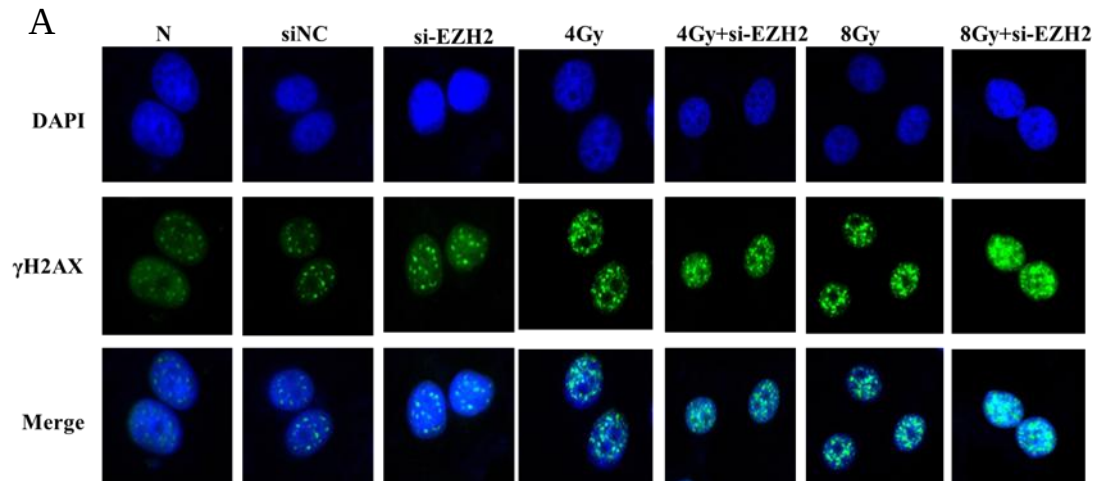


图 10 A 电离辐射对 EZH2 低表达 Hep3B 细胞 γ H2AX 的影响

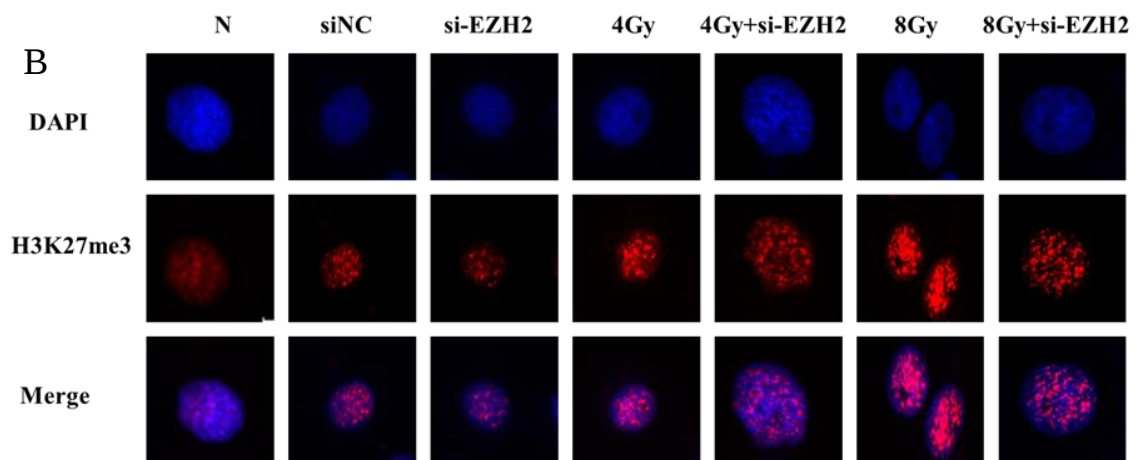
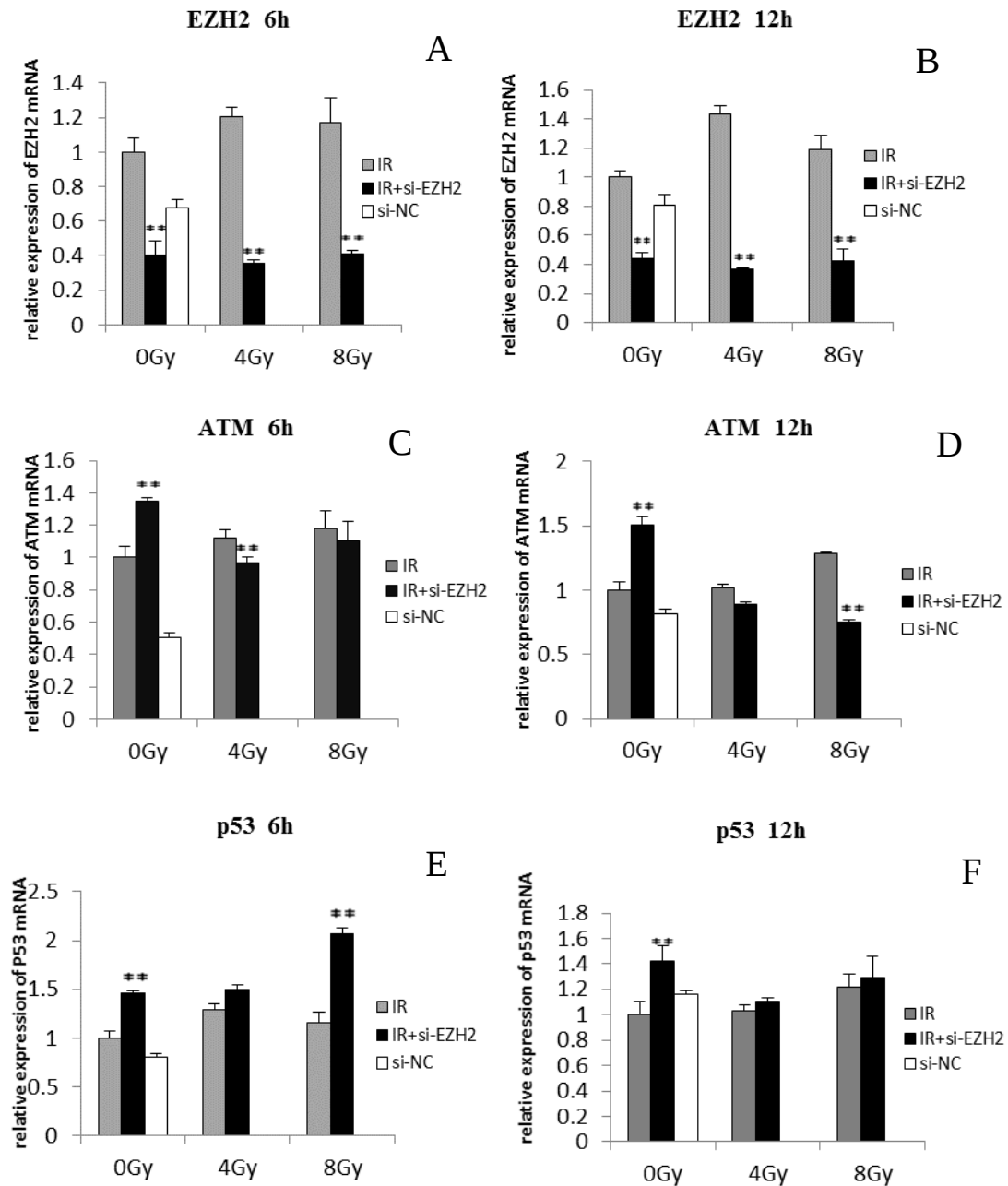


图 10 B 电离辐射对 EZH2 低表达 Hep3B 细胞 H3K27me3 的影响

3.3.3 EZH2 低表达对 Hep3B 细胞中目的基因 mRNA 水平的影响

采用瞬时转染方法将 siRNA 转入 Hep3B 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、ATM、p53、Chk2mRNA 表达水平。结果显示, 在未照射条件下 (0Gy 组), 0Gy +si-EZH2 组的 EZH2mRNA 水平较只给予照射处理的 0Gy 组明显降低, 达到所需的干扰效果 (图 11 A、B); EZH2 表达降低后, 在

未给与照射处理的 0Gy 组中, siEZH2 组 ATM、p53、Chk2mRNA 水平较未转染组明显升高(图 11 C、D、E、F、G、H); 但在 4Gy、8Gy 组, 相同照射剂量下 IR+si-EZH2 组 ATM、Chk2mRNA 水平较 IR 组降低(图 11 C、D、G、H), 而 p53mRNA 水平升高(图 11 E、F)。



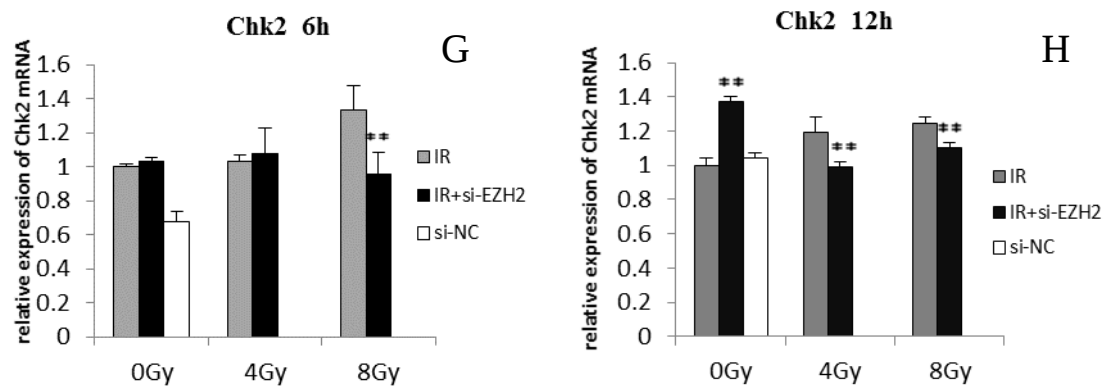
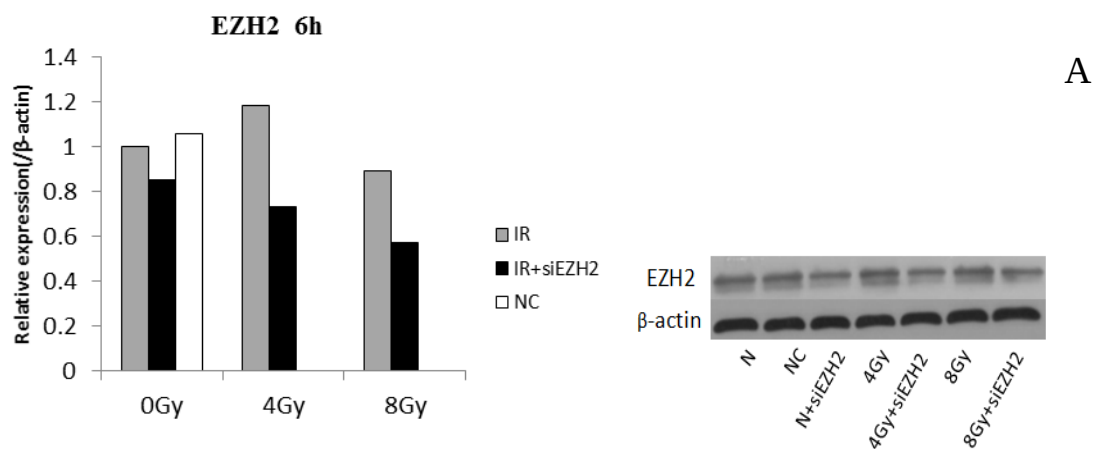


图 11 siRNA 干扰 EZH2 表达后 ATM、p53、Chk2mRNA 水平变化

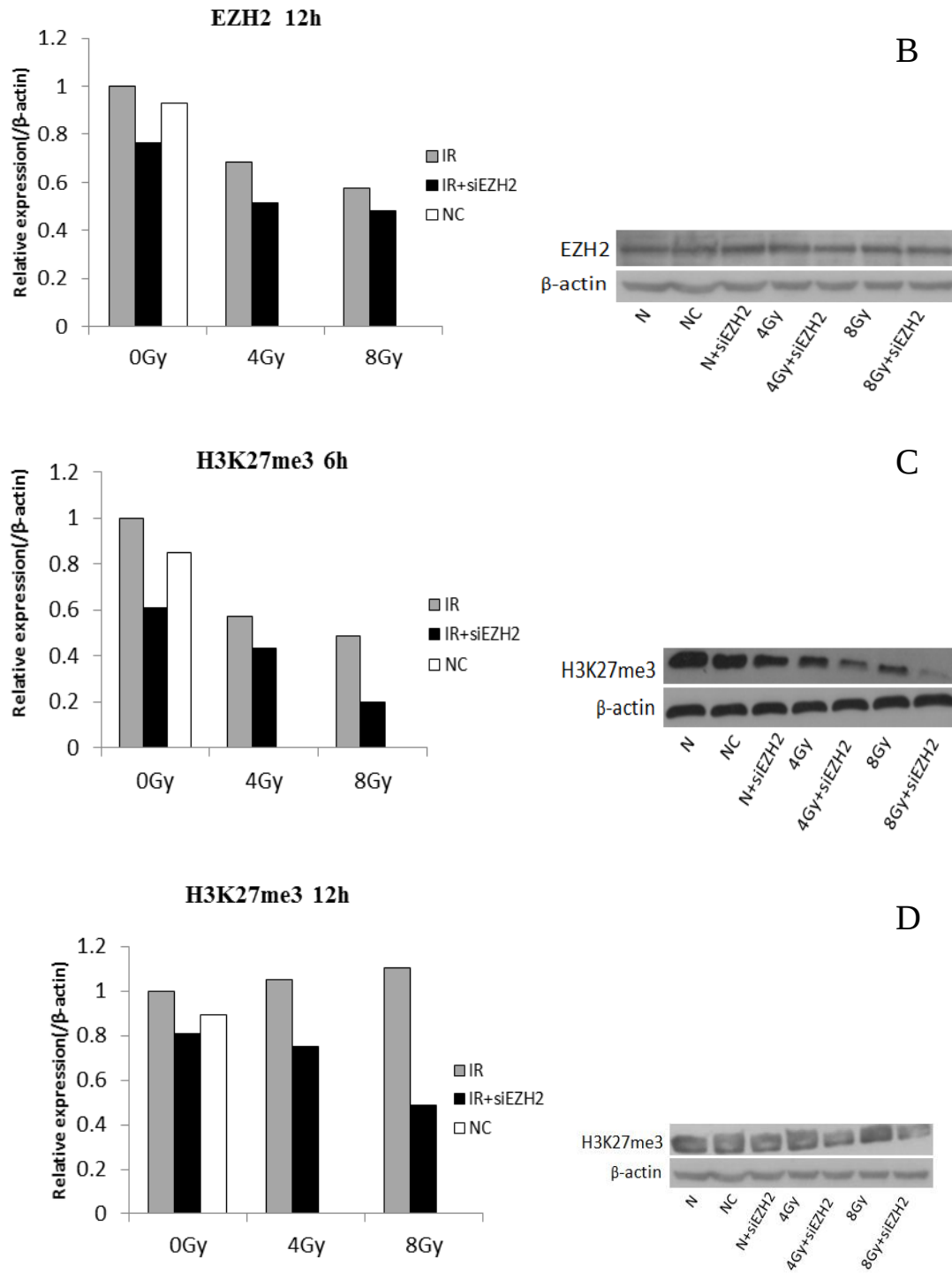
(注: **相同照射剂量两组间比较 $P < 0.05$)

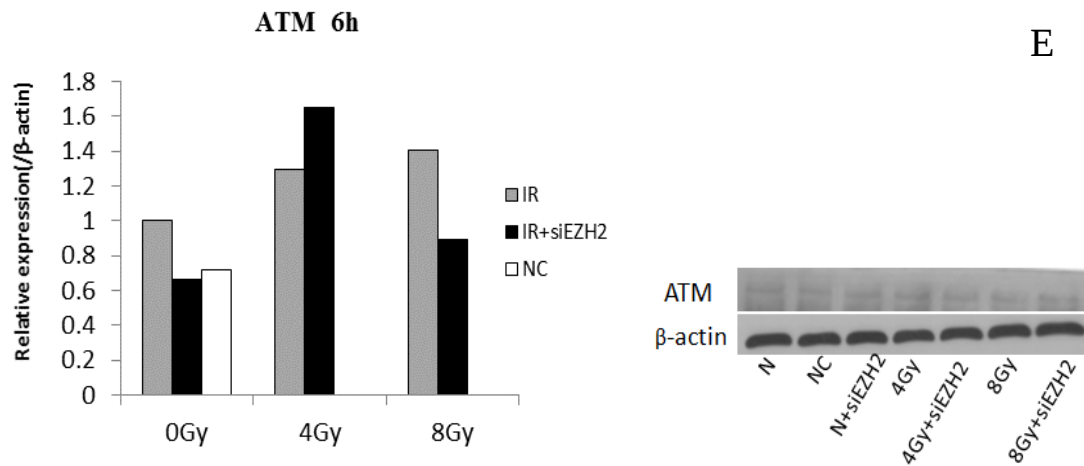
3.3.4 EZH2 低表达对 Hep3B 细胞中目的基因蛋白水平的影响

采用瞬时转染方法将 siRNA 转入 Hep3B 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、H3K27me3、ATM、p53、Chk2 蛋白表达水平。结果显示, 与 0Gy 组比较, 随辐射剂量的增加, EZH2、H3K27me3 的蛋白表达量减少 (图 12 A、B、C、D), 而 12hATM、p53 的蛋白表达升高; 相同的照射剂量下, IR+si-EZH2 组较 IR 组 EZH2、H3K27me3 的蛋白表达量明显减少, 而 IR+si-EZH2 组与 IR 组比较, ATM、p53 的蛋白表达变化相对不明显, 且 6h 和 12h 无特殊规律 (图 12 E、F、G、H)。

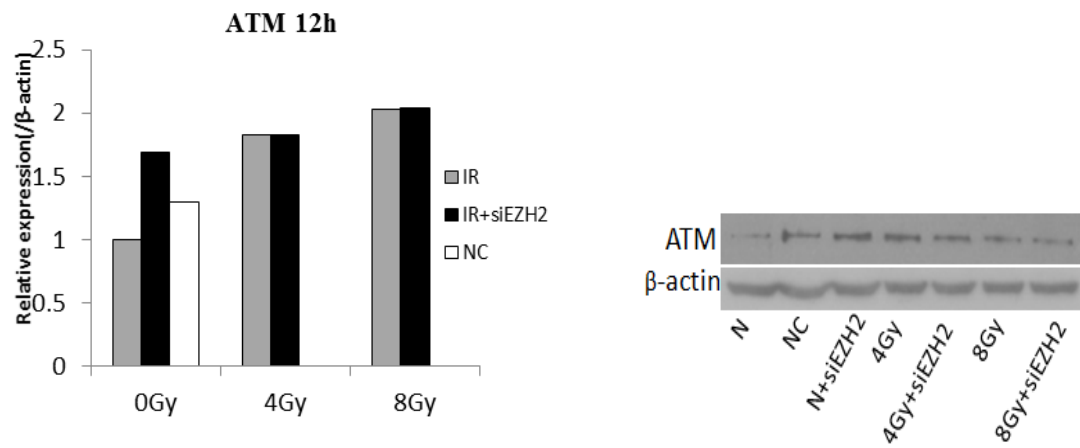


A

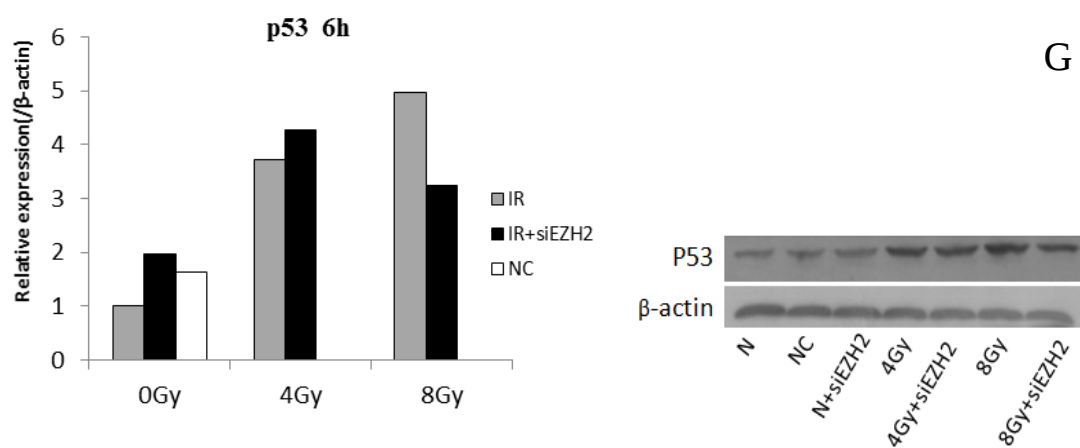




E



F



G

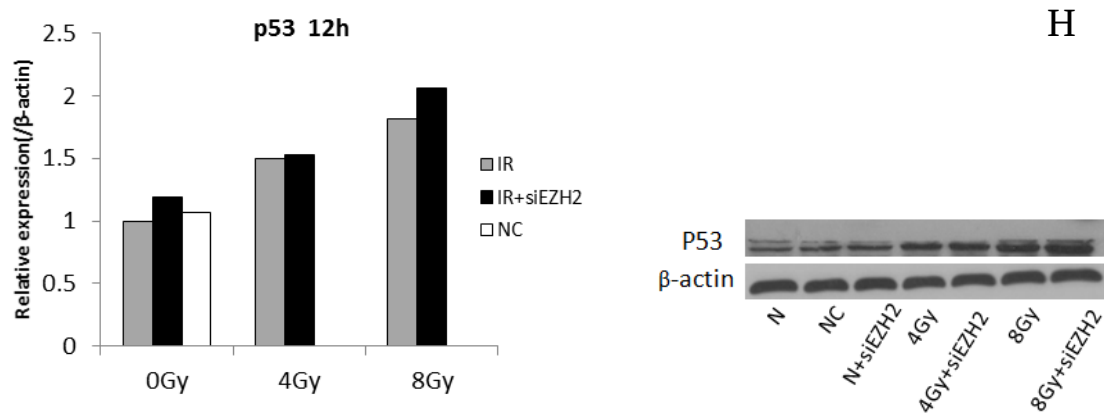


图 12 EZH2 低表达对 Hep3B 细胞中 H3K27me3、EZH2、ATM、p53 蛋白水平的影响

3.3.5 EZH2 过表达细胞模型的建立

由于考虑到转染效率的因素,建立 EZH2 过表达模型采用的是 293T 细胞(人肾上皮细胞)。由于 EZH2 过表达模型的稳定性保持在 18h-48h, 本实验探究照射后 6h-12h 对各基因的表达变化, 因此综合上述因素, 只选择转染后 36h 这一个时间点对 293T 细胞转染效率进行验证。结果如图, A 组、B 组、C 组分别为三组不同的过表达质粒(质粒浓度 0.908 μ g/ μ l)与转染试剂 Lip2000 的使用比例, 分别为 4 μ l:5 μ l、4 μ l:8 μ l、8 μ l:10 μ l, 为使实验达到最高的转染效率, 结合 Western Blot 结果最终选择 B 组的使用比例用于后续实验。

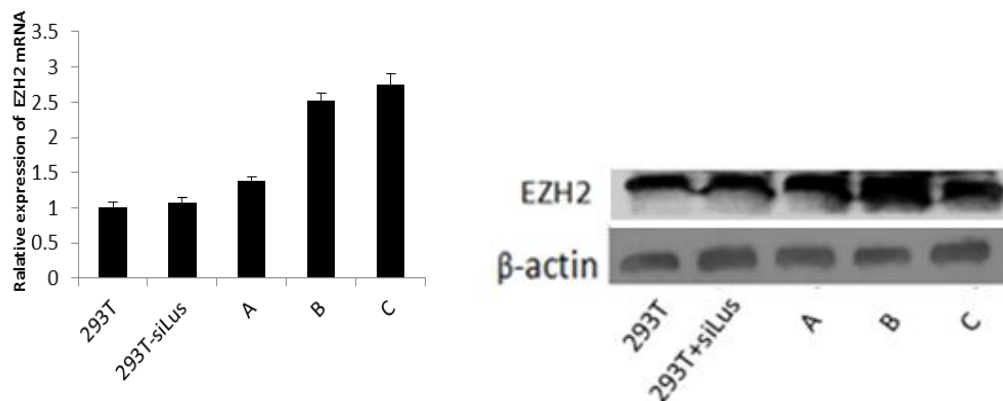


图 13 转染过表达质粒后 EZH2 的 mRNA 和蛋白表达变化

3.3.6 EZH2 高表达对 293T 细胞中目的基因 mRNA 水平的影响

采用瞬时转染方法将 EZH2 过表达质粒转入 293T 细胞中。待 36hEZH2 稳定高表达后, 给予 0Gy、4Gy 电离辐射, 照射后 6h 收集细胞, 采 Real-Time PCR 方法检测 EZH2、ATM、p53、Chk2mRNA 表达水平。结果显示, 在假照组, 转染过表达质粒 (0Gy+EZH2^{过表达}) 后, EZH2mRNA 水平较未转染组明显升高, 达到预期转染效果 (图 14 A); 相同照射剂量下, IR+EZH2^{过表达} 组 ATMmRNA 水平较 IR 组明显升高; p53 较为明显的 mRNA 变化是 4Gy+EZH2^{过表达} 较 4Gy p53mRNA 表达量明显降低; 0Gy+EZH2^{过表达} 组 Chk2mRNA 表达水平较 0Gy 组明显提高, 4Gy+EZH2^{过表达} 组与 4Gy 组比较, 差别较小 (图 14 B、C、D)。

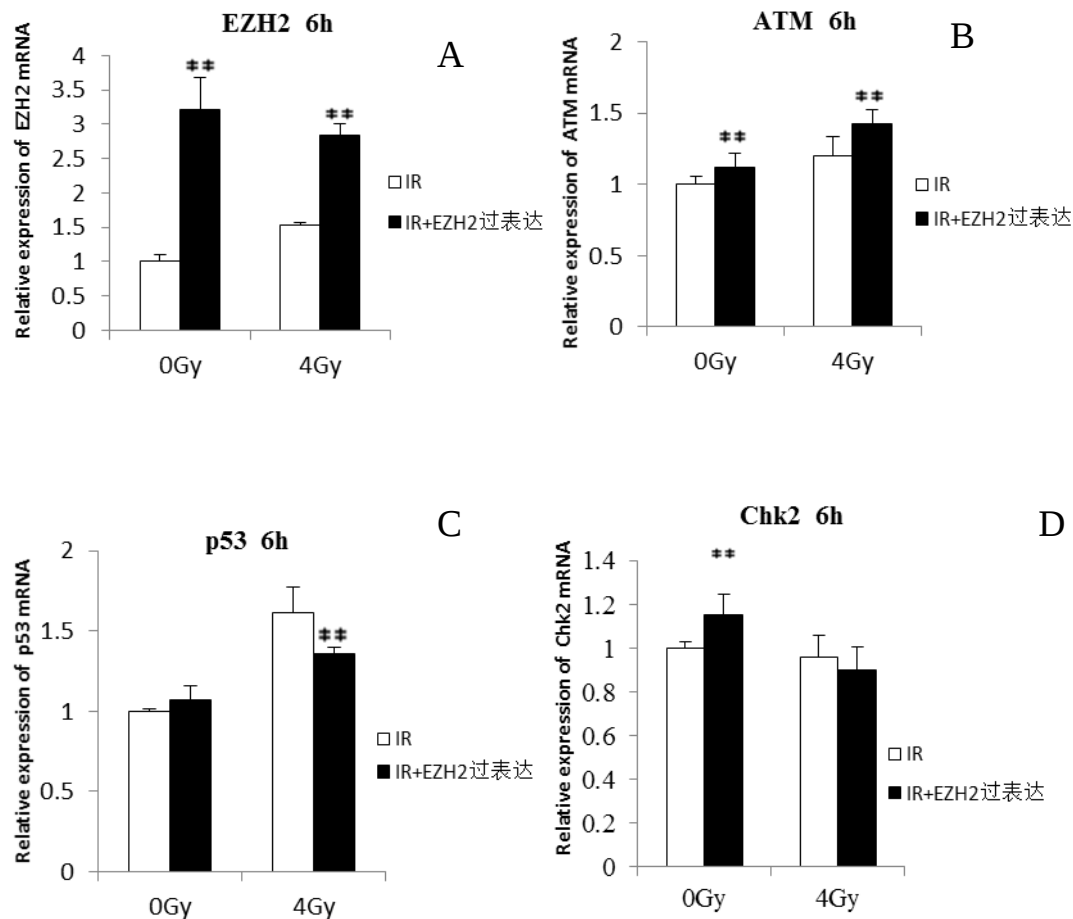
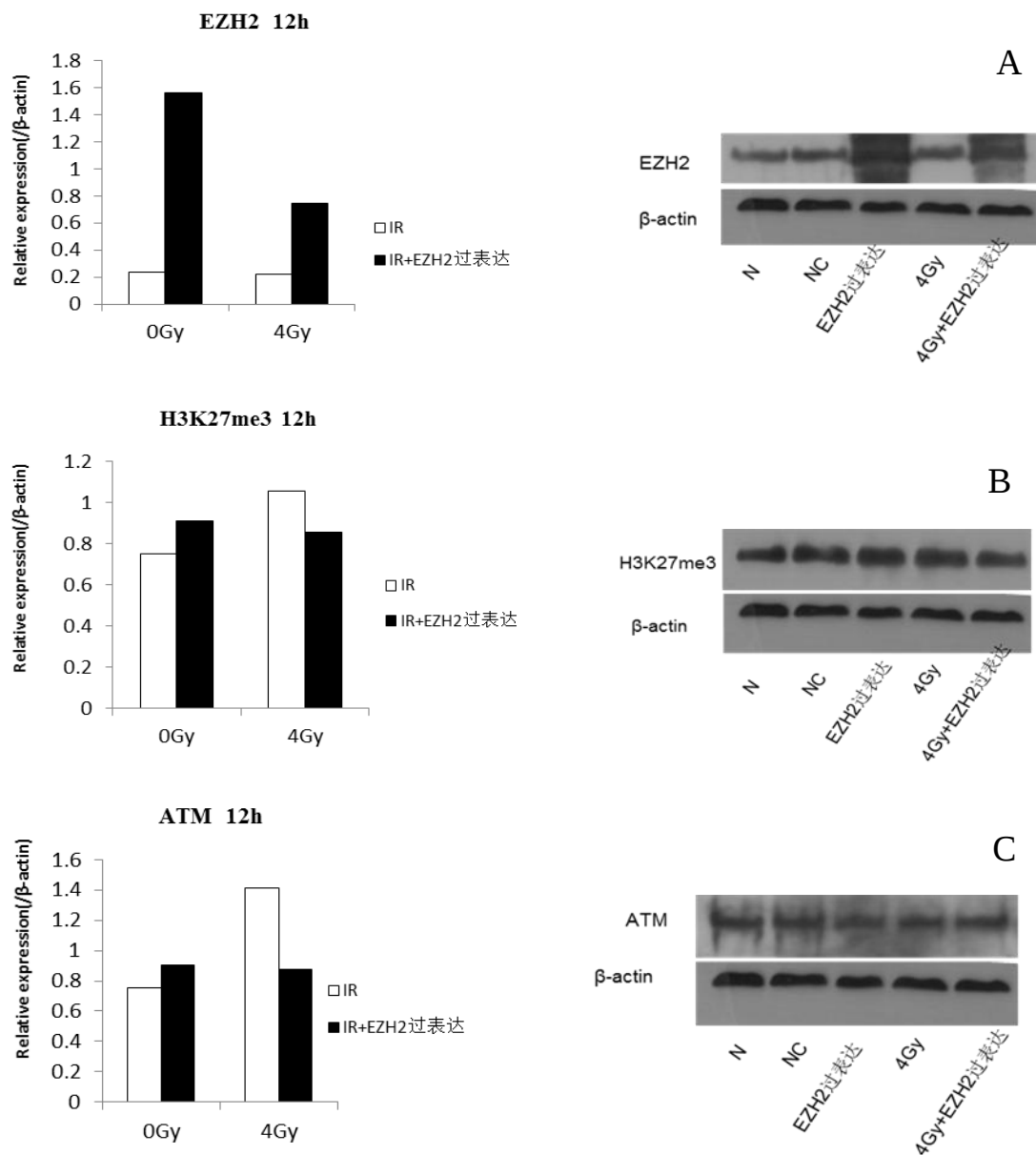


图 14 EZH2 表达升高后 ATM、p53、Chk2mRNA 水平的变化

(注: **相同照射剂量两组间比较 $P < 0.05$)

3.3.7 EZH2 高表达对 293T 细胞中目的基因蛋白水平的影响

采用瞬时转染方法将 EZH2 过表达质粒转入 293T 细胞中。待 36hEZH2 稳定高表达后, 给予 0Gy、4Gy 电离辐射, 照射后 6h 收集细胞, 采 Western Blot 方法检测 EZH2、ATM、p53、Chk2 蛋白表达水平。如图所示, 在相同的照射剂量下, IR+EZH2^{过表达}组的 EZH2 蛋白表达量明显高于 IR 组 (图 15 A); 而 ATM、p53、Chk2 的蛋白变化规律显示, 假照组(0Gy 组)的 ATM、p53、Chk2 蛋白表达量低于 0Gy +EZH2^{过表达}组, 而 4Gy 组的 ATM、p53、Chk2 蛋白表达量则高于 0Gy +EZH2^{过表达}组 (图 15 B、C、D)。



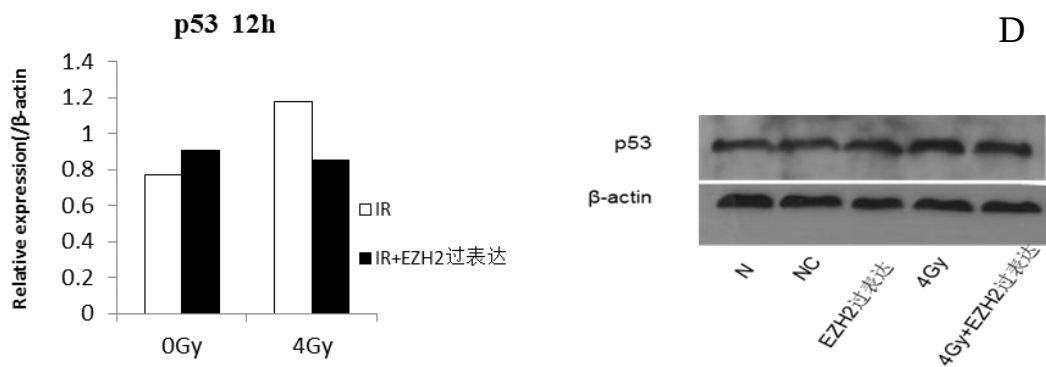


图 15 EZH2 表达升高后 EZH2、H3K27me3、ATM、p53 蛋白水平的变化

3.4 EZH2 介导 H3K27me3 对 ATM/Chk2/P53 通路进行调控

为探讨 ATM 启动子区 H3K27me3 的甲基化修饰水平，选取 ATM 启动子区域 6 对引物（图 16 A），用 ChIP-PCR 方法对两组细胞：Hep3B-siEZH2 和经 GSK126 作用的 Hep3B 细胞 ATM 启动子区的 H3K27me3 的甲基化修饰水平进行检测。结果如图，在选定的 6 个区域上均发现与对照组相比，Hep3B-siEZH2 和经 GSK126 作用的 Hep3B 细胞中 ATM 启动子区的 H3K27me3 的甲基化修饰明显低于对照组，且均在 PP4 区域差别最为明显。（图 16 B、C）

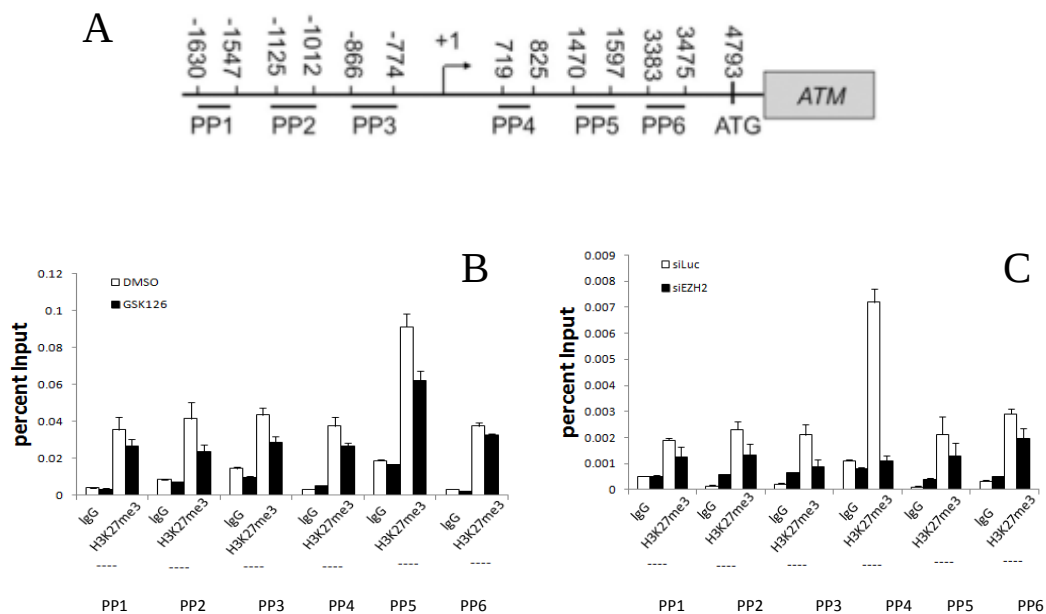


图 16 Hep3B 细胞 ATM 启动子区的 H3K27me3 的甲基化修饰水平

第4章 讨论

原发性肝癌是指肝细胞或肝内胆管细胞发生的恶性肿瘤，其中约90%为肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)，其恶性程度较高、治疗效果差、发展迅速，已成为我国仅次于肺癌的第二大致死性肿瘤。2015年我国原发性肝癌的发病人数为46.6万人，死亡42.2万人，约占全球肝癌死亡病例数的51%。我国成为“肝病大国”的主要原因是大量人口感染HBV和HCV病毒，由病毒性肝炎发展为肝癌。自20世纪90年代起，我国投入大量资金用于病毒性肝炎的防控、疫苗和药品研发以及肝病的临床研究，自实施计划免疫以来，乙型病毒性肝炎发病率显著下降。但随着近些年国人饮食结构及生活方式的改变，过高的摄入高脂肪高热量的食物，加之少动的生活方式，使非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)出现明显的增长趋势，成为全球公认的威胁公共健康的重要问题。

目前，肝癌的治疗仍然倾向于传统的根治性切除，但因我国大多数原发性肝癌患者往往伴有多年的肝炎、肝硬化病史，导致肝脏的自我恢复功能较差而失去了根治性切除的机会，如果能找到一种有效的非手术治疗肝癌的手段，将会使更多的肝癌患者有接受治疗的机会。伴随现代放疗技术的开展，肝癌的放射治疗已经由传统的全肝照射，局部照射发展为立体定向放射治疗，减少了正常组织受照射剂量，提高肿瘤组织剂量，降低放射性肝炎的发生率，为肝癌的治疗提供了一种新的可能。但近些年，随着放射线治疗肿瘤的广泛应用，细胞的辐射抗性也成为了近些年来的研究热点。本课题开展的主要目的也是积极寻找与肝癌辐射抗性相关的开关分子，为放射线抵抗的研究提供一个新思路

4.1 电离辐射对Hep3B细胞表型及目的基因mRNA和蛋白水平的改变

4.1.1 电离辐射对Hep3B肝癌细胞中ATM、Chk2、P53表达水平的影响

H2AX磷酸化(γ H2AX)被认为是DNA双链断裂的分子标志，发生在DNA损伤修复早期，完成对DNA损伤反应蛋白和DNA修复相关蛋白在DNA

双链断裂区(double-stranded break, DSB)的招募[59]。本实验表明, 电离辐射能够诱导 Hep3B 细胞中 γ H2AX 的表达明显升高, 并且随着照射剂量的增加而增强, 可以用此指标衡量细胞发生损伤的程度。很多放射生物学研究成果已经证实, 电离辐射可以改变细胞周期的进程, 引起各种细胞发生周期阻滞, 使细胞停留在 G₁、S、G₂ 期不能进行有丝分裂[60,61], 这与在本实验中观察到的结果一致, 随照射剂量的增加, 细胞出现明显的 G₂ 期阻滞。G₂ 期发生周期阻滞的意义在于为进入下一步有丝分裂的细胞进行 DNA 修复留出时间, 保证子代细胞的遗传物质的稳定性。不同的肿瘤细胞对辐射的敏感性也有较大差异, 且引起哪一期的阻滞也不尽相同, 为证实电离辐射不仅只对 Hep3B 细胞具有 G₂ 期阻滞作用, 我们用同是肝癌细胞的 HepG2 进行平行实验, 也出现了相同规律的 G₂ 阻滞效应, 这能够明确说明电离辐射能够引起肝癌细胞发生 G₂ 期阻滞。

细胞发生 DNA 损伤后, 最先出现的细胞反应就是细胞周期检查点的激活。罗家林等人[62]用免疫共沉淀等方法已经明确检测到当细胞受到电离辐射后, 被激活的 ATM 激酶使 p53 磷酸化, 活化的 p53 能够直接调控下游细胞周期相关基因 p21、p16 的表达, 进而引起细胞周期阻滞。因此可以认为 ATM/Chk2/p53 是激活细胞周期检查点, 使细胞发生周期阻滞的关键通路之一。在本实验中观察到, ATM、Chk2、p53 的 mRNA 平均高于未照射组, 且在一定照射剂量范围内表现为剂量依赖性增加, 且 6h 和 12h 均表现出此规律。结合细胞周期结果, 随电离辐射剂量的增加, Hep3B 细胞 G₂ 期阻滞效应也更加明显。有关 p53 诱导细胞 G₂ 期阻滞机制研究中, 已被清楚证实的是 p53 过表达能够抑制或是激活 cdc2、cyclin B1、B99、MCG10 以及 Topoisomerase II 的表达, 继而诱导 G₂ 期阻滞, 而这些靶基因都是直接参与对细胞的 G₂/M 期转换的调控。本实验中的 G₂ 期阻滞很可能与 Hep3B 细胞受照射后 p53 表达增加有关。实验的蛋白表达结果也显示出了, 随照射剂量的增加, ATM、p53 的蛋白表达水平提高, 但 12h 小时组未表现明显的剂量依赖性, 可能跟基因转录翻译为蛋白质过程的时效性有关。为验证这一问题, 在后续的实验中我们将对两种蛋白表达水平随着时间的规律进行研究, 阐明蛋白表达量随时间变化的规律。

4.1.2 电离辐射对 PcG 家族中 EZH2、BMI-1 表达水平的影响

细胞发生 DNA 双链断裂后,为完成对 DSBs 的修复需要经历对损伤位点的识别-修复-还原(access-repair-restore, ARR)过程。特定区域的染色质结构的调整对整个 DNA 损伤修复过程至关重要。首先,特定的染色质修饰是 DNA 损伤的重要识别位点,另外经过修饰的染色质有更疏松开放的结构,利于多种修复蛋白在损伤区域的聚集[63],修复过程中,染色质结构会恢复到较未损伤前更加浓缩的状态,目的是暂时阻滞细胞的转录或复制进程,保证细胞有更加充足的修复时间,损伤修复完成后,染色质恢复未被损伤前的状态,细胞继续进行增殖。在染色质结构疏松-浓缩-疏松的变化中完成对 DNA 损伤的修复。越来越多的研究发现,组蛋白的甲基化修饰也能够使染色质重构,参与到 DNA 损伤修复过程。O'Hagan[64]等人通过实验发现,在 DSBs 位点能够发现 EZH2 的聚集,且 H3K27me3 增加。EZH2 介导靶基因发生 H3K27me3 后,被 PRC1 特异性识别,能够使染色质结构浓缩,使组蛋白发生重构。Chou, D.M 等人[65]用激光共聚焦联合共定位免疫荧光技术发现,当 HeLa 细胞细胞核区域受到微束的紫外激光照射后,共定位免疫荧光结果显示被照射部位 γ H2AX、EZH2、H3K27me3、RPA32(replication protein A2)的表达较未被照射区域明显增多,更加直观的证实了 PcG 能够在 DNA 损伤区域被招募。我们的免疫荧光实验结果显示,随着辐射剂量的增加, γ H2AX 和 H3K27me3 的表达也明显增多,且与辐射剂量之间存在剂量依赖性。与 Chou, D.M 等人实验不同之处是,我们观察的是 Hep3B 细胞在受到不同剂量的电离辐射时,细胞核内所反应的电离辐射对细胞造成的 DNA 损伤程度及 H3K27me3 的表达变化,而 Chou,D.M 等人关注的是被照射区与非照射区目的基因的表达变化,尽管实验方法不同,但都能够反映当细胞受到电离辐射时 PcG 家族被招募且发挥了 H3K27me3 作用参与 DNA 损伤修复。

在针对 PcG 蛋白是否参与辐射抗性研究中,很多学者也发现了 PRC1[66-69]和 PRC2[65、70]成分的缺失,将增加细胞对电离辐射的敏感性。如 Jay Oza 等人证实通过转染 siRNA 方式降低 U2OS 细胞中 CBX8 的表达,能够抑制细胞同源和非同源重组,增加细胞对电离辐射的敏感性[71]。同时发现, BMI-1 能够

在 DNA 损伤位点聚集，完成对损伤蛋白的招募，当细胞发生 BMI-1 基因缺陷时，能够使细胞的 DNA 损伤修复能力减弱，增加细胞对电离辐射的敏感性[72]。本实验结果中观察到，随电离辐射剂量的增加，EZH2 和 BMI-1 的 mRNA 和蛋白水平均较未照射组显著升高，4Gy 时升高更为明显。免疫荧光结果显示，加入 GSK126 抑制 Hep3B 细胞 EZH2 生物学功能后，分别给予 4Gy、8Gy 照射，结果显示相同照射剂量下，IR+GSK126 组的 γ H2AX 表达量高于 IR 组，而 IR+GSK126 组的 H3K27me3 表达量低于 IR 组。沉默 Hep3B 细胞中 EZH2 表达（Hep3B-siEZH2 组）后，给予相同的照射条件，结果显示相同照射剂量下，Hep3B-siEZH2 组的 γ H2AX 表达量高于单纯照射组，而 Hep3B-siEZH2 的 H3K27me3 表达量则明显比单纯照射组低，与经 GSK126 处理的 Hep3B 细胞表现出相同的变化规律，说明降低 EZH2 表达或抑制其生物学功能后，电离辐射对 Hep3B 细胞的损伤效应更加明显。Bracken and Helin[73]发表的一篇综述中提到 PcG 家族中的多个基因，特别是 BMI-1 和 EZH2 在很多肿瘤中都存在过表达的现象，如肝癌、肺癌、子宫内膜癌等。关于肝癌，Gao SB 等人也在两篇文章中证实，在多种类型的肝癌细胞中，均发现 PcG 中 EZH2 的表达水平较癌旁组织中正常细胞的表达量明显增加[74、75]。除此之外，还发现了一个有趣的现象，当 PRC1 和 PRC2 同时出现过表达时，往往病人的预后较差，生存期较短，但是当只存在 EZH2 过表达或 CBX8 过表达时，病人的预后良好，且术后生存率能达到 80%-90%，这表明 PRC1 和 PRC2 不同的过表达组合形式与病人的预后有着重要的相关性。将这一结论与我们的实验结果进行整合分析，可以得出一个假设：肝癌细胞自身高水平的 EZH2 会影响放、化疗的治疗效果，进而影响肝癌病人的预后生存期。

4.2 EZH2 通过 H3K27me3 作用对 ATM/Chk2/p53 通路进行调控

在 Hep3B 细胞中 EZH2 对靶基因的调控有两种方式，一种是 H3K27me3 依赖性，是指 EZH2 通过介导下游靶基因发生 H3K27me3 修饰，来抑制其表达；另一种为 H3K27me3 非依赖性，是指 EZH2 对靶基因的调控并不是依赖其甲基化修饰作用[76]，但其具体机制还未见报道。Gao[76]等人在探究 EZH2 对靶基

因的调控方式中发现,选取的7种细胞(HepG2、Hep3B、SMMC-7721、PLC/PRF5、HO-8910、MCF7、Wlms)中,仅在HepG2细胞中发现EZH2对p53有明显的调控作用。为进一步探究具体的调控机制,研究者选取p53转录起始点上游和下游25kb区域范围内设计11对引物,用ChIP技术检测这11个片段上H3K27me3修饰水平,结果并没有在该区域发现任何明显的H3K27me3修饰变化,表明在HepG2细胞中EZH2对p53的调控属H3K27me3非依赖性。在实验中,通过分析Hep3B-siEZH2细胞模型和GSK126抑制Hep3B细胞EZH2生物学功能细胞模型的mRNA和蛋白表达结果发现,在Hep3B-siEZH2细胞中,EZH2表达水平降低后,p53的mRNA和蛋白水平均明显升高,但在GSK126处理组,干扰EZH2的H3K27me3的生物学功能后,p53的表达量明显下降,表明在Hep3B细胞中EZH2能调控p53的表达。有趣的是,两组细胞模型中p53的表达规律并不一致,GSK126抑制Hep3B细胞EZH2生物学功能后,p53的表达量出现下降。进一步分析其原因发现,GSK126是一种具有高度特异性的组蛋白甲基转移酶小分子抑制剂,高效抑制EZH2的H3K27me3的生物学功能,但对EZH2mRNA和蛋白水平无影响[77]。在我们的实验结果中也可以反映这一问题,当细胞给予GSK126处理,EZH2的mRNA水平并未出现下降,相反,在siEZH2组,EZH2的表达较正常组mRNA水平下降2-3倍。因此,可以说明在Hep3B细胞中EZH2对p53的调控属H3K27me3依赖型。

ATM是一种重要的DNA损伤修复因子,但是在PcG过表达的肝癌细胞中,是否EZH2参与了对ATM转录调控还不是十分清楚。在实验中我们观察到,加抑制剂GSK126处理的细胞和Hep3B-siEZH2细胞中,ATM的mRNA和蛋白水平均较未经处理组明显升高,提示在Hep3B细胞中,EZH2对ATM的表达有调控作用,Chk2作为ATM的下游基因,其mRNA及蛋白水平变化与ATM表现出一致性。但在本实验中并不能说明,在肝癌细胞中,EZH2参与了对Chk2的转录调控。

ChIP是现阶段用来研究组蛋白的各种共价修饰与基因表达的关系的实验技术,能真实、完整地反映结合在DNA序列上的修饰蛋白。PcG作为一种发挥组蛋白甲基化修饰作用的蛋白复合物,其通过H3K27me3作用调控的靶基因种类繁多,功能各异,其中与肝癌发生关系密切的基因中,已被证实的有

FOXO3、CDKN2A、E2F1 和 NOTCH2。NOTCH2 与肝癌干细胞的自我更新有重要关系,在研究 EZH2 与 NOTCH2 的调控关系时,ChIP 结果发现,在 HepG2 细胞中,抑制 EZH2 表达后,NOTCH2 启动子区的 H3K27me3 水平较 EZH2 正常表达组明显降低,说明 EZH2 能够通过 H3K27me3 作用对 NOTCH2 的表达进行调控。

为探究 PcG 是否通过 H3K27me3 的方式对 ATM 进行调控的,本实验采用了 ChIP 实验方法对 ATM 启动子区的 6 段 DNA 序列的 H3K27me3 修饰情况进行验证。我们的 ChIP 结果显示,在 ATM 的启动子区域发现了 H3K27me3 修饰,而且在 Hep3B-siEZH2 组与 GSK126 处理组均发现与 ATM 启动子区域结合的 H3K27me3 修饰水平较未经处理组的修饰水平显著降低,由此我们推断在肝癌细胞中,EZH2 通过介导 ATM 启动子区发生 H3K27me3 修饰来调控 ATM 通路,进而实现对电离辐射诱导的 Hep3B 细胞 DNA 损伤修复反映的影响。

第 5 章 结 论

1. 电离辐射能够诱导 Hep3B 细胞发生 DNA 双链断裂和细胞 G2 期阻滞;
2. ATM/Chk2/P53 通路参与了电离辐射诱导的 Hep3B 细胞 DNA 损伤反应;
3. PcG 家族中关键基因 EZH2 和 BMI-1 参与了电离辐射诱导的 Hep3B 细胞 DNA 损伤反应, 且干扰 EZH2 表达后, 电离辐射对 Hep3B 细胞的损伤效应增强;
4. 当电离辐射诱导 Hep3B 细胞发生 DNA 损伤时, EZH2 通过介导 ATM 启动子区发生 H3K27me3 修饰来调控 ATM 通路, 进而实现对 Hep3B 细胞辐射效应的影响。

参考文献

- [1]. Harper, J.W. and S.J. Elledge, The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell*, 2007. 28(5): p. 739-45.
- [2]. Rouse, J. and S.P. Jackson, Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science*, 2002. 297(5581): p. 547-51.
- [3]. Harrison, J.C. and J.E. Haber, Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu Rev Genet*, 2006. 40: p. 209-35.
- [4]. Bartkova, J., et al., DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, 2005. 434(7035): p. 864-70.
- [5]. Gorgoulis, V.G., et al., Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature*, 2005. 434(7035): p. 907-13.
- [6]. Halazonetis, T.D., V.G. Gorgoulis and J. Bartek, An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science*, 2008. 319(5868): p. 1352-5.
- [7]. Sulli, G., R. Di Micco and D.F.F. D'Adda, Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2012. 12(10): p. 709-20.
- [8]. Jeggo, P.A., V. Geuting and M. Lobrich, The role of homologous recombination in radiation-induced double-strand break repair. *Radiother Oncol*, 2011. 101(1): p. 7-12.
- [9]. Morrison, R., et al., Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis. *J Oncol*, 2011. 2011: p. 941876.
- [10]. Bao, S., et al., Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 2006. 444(7120): p. 756-60.
- [11]. Helleday, T., et al., DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2008. 8(3): p. 193-204.
- [12]. Martin, S.A., C.J. Lord and A. Ashworth, DNA repair deficiency as a therapeutic target in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 2008. 18(1): p. 80-6.
- [13]. Radhakrishnan, S.K., N. Jette and S.P. Lees-Miller, Non-homologous end joining: emerging themes and unanswered questions. *DNA Repair (Amst)*, 2014. 17: p. 2-8.

- [14]. Sanchez, H., et al., Taking it one step at a time in homologous recombination repair. *DNA Repair (Amst)*, 2014. 20: p. 110-8.
- [15]. 罗婧等, 聚腺苷二磷酸核糖聚合酶抑制剂联合放疗研究进展. *中华放射肿瘤学杂志*, 2016. 25(7): 第782-786页.
- [16]. Harper, J.W. and S.J. Elledge, The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell*, 2007. 28(5): p. 739-45.
- [17]. Abraham, R.T., Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev*, 2001. 15(17): p. 2177-96.
- [18]. Watters, D.J., Oxidative stress in ataxia telangiectasia. *Redox Rep*, 2003. 8(1): p. 23-9.
- [19]. Hammond, E.M., et al., Hypoxia links ATR and p53 through replication arrest. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(6): p. 1834-43.
- [20]. Lavin, M.F. and Y. Shiloh, The genetic defect in ataxia-telangiectasia. *Annu Rev Immunol*, 1997. 15: p. 177-202.
- [21]. Meyn, M.S., Ataxia-telangiectasia and cellular responses to DNA damage. *Cancer Res*, 1995. 55(24): p. 5991-6001.
- [22]. Vogelstein, B., D. Lane and A.J. Levine, Surfing the p53 network. *Nature*, 2000. 408(6810): p. 307-10.
- [23]. Austen, B., et al., Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *J Clin Oncol*, 2007. 25(34): p. 5448-57.
- [24]. Rahko, E., et al., A mutant TP53 gene status is associated with a poor prognosis and anthracycline-resistance in breast cancer patients. *Eur J Cancer*, 2003. 39(4): p. 447-53.
- [25]. Kouzarides, T., Chromatin modifications and their function. *Cell*, 2007. 128(4): p. 693-705.
- [26]. Lachner, M., R.J. O'Sullivan and T. Jenuwein, An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci*, 2003. 116(Pt 11): p. 2117-24.
- [27]. Barski, A., et al., High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 2007. 129(4): p. 823-37.
- [28]. Vermeulen, M., et al., Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell*, 2007. 131(1): p. 58-69.

- [29]. Li, H., et al., Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature*, 2006. 442(7098): p. 91-5.
- [30]. Sims, R.R., et al., Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing. *Mol Cell*, 2007. 28(4): p. 665-76.
- [31]. Shi, X. and O. Gozani, The fellowships of the ING. *J Cell Biochem*, 2005. 96(6): p. 1127-36.
- [32]. Shi, X. and O. Gozani, The fellowships of the ING. *J Cell Biochem*, 2005. 96(6): p. 1127-36.
- [33]. Vermeulen, M., et al., Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell*, 2007. 131(1): p. 58-69.
- [34]. Nielsen, S.J., et al., Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature*, 2001. 412(6846): p. 561-5.
- [35]. El, G.M., et al., G9a and HP1 couple histone and DNA methylation to TNF α transcription silencing during endotoxin tolerance. *J Biol Chem*, 2008. 283(47): p. 32198-208.
- [36]. Souza, P.P., et al., The histone methyltransferase SUV420H2 and Heterochromatin Proteins HP1 interact but show different dynamic behaviours. *BMC Cell Biol*, 2009. 10: p. 41.
- [37]. Luijsterburg, M.S., et al., Heterochromatin protein 1 is recruited to various types of DNA damage. *J Cell Biol*, 2009. 185(4): p. 577-86.
- [38]. Lee, M.G., et al., Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. *Science*, 2007. 318(5849): p. 447-50.
- [39]. Kim, S.N., et al., The pleiohomeotic gene is required for maintaining expression of genes functioning in ventral appendage formation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*, 2008. 319(1): p. 121-9.
- [40]. Piunti, A. and D. Pasini, Epigenetic factors in cancer development: polycomb group proteins. *Future Oncol*, 2011. 7(1): p. 57-75.
- [41]. Boyer, L. A., Mathur, D. and Jaenisch, R. (2006). Molecular control of pluripotency. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 455-462.
- [42]. Bracken, A. P. and Helin, K. (2009). Polycomb group proteins: navigators of lineage pathways led astray in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 9, 773-784
- [43]. Simon, J.A. and R.E. Kingston, Mechanisms of polycomb gene silencing:

- knowns and unknowns. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. 10(10): p. 697-708.
- [44]. Joseph H. A. Vissers;Maarten van Lohuizen;Elisabetta Citterio.The emerging role of Polycomb repressors in the response to DNA damage[J].*J Cell Sci*,2012,Vol.125: 3939-3948
- [45]. Collett, K., et al., Expression of enhancer of zeste homologue 2 is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(4): p. 1168-74.
- [46]. Bachmann, I.M., et al., EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol*, 2006. 24(2): p. 268-73.
- [47]. Breuer, R.H., et al., Increased expression of the EZH2 polycomb group gene in BMI-1-positive neoplastic cells during bronchial carcinogenesis. *Neoplasia*, 2004. 6(6): p. 736-43.
- [48]. Sudo, T., et al., Clinicopathological significance of EZH2 mRNA expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*, 2005. 92(9): p. 1754-8.
- [49]. Bachmann, I.M., et al., EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol*, 2006. 24(2): p. 268-73.
- [50]. Matsukawa, Y., et al., Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer. *Cancer Sci*, 2006. 97(6): p. 484-91.
- [51]. Hu, S., et al., Overexpression of EZH2 contributes to acquired cisplatin resistance in ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther*, 2010. 10(8): p. 788-95.
- [52]. Choi, J.H., et al., Enhancer of zeste homolog 2 expression is associated with tumor cell proliferation and metastasis in gastric cancer. *APMIS*, 2010. 118(3): p. 196-202.
- [53]. Varambally, S., et al., Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science*, 2008. 322(5908): p. 1695-9.
- [54]. Coe, B.P., et al., Genomic deregulation of the E2F/Rb pathway leads to activation of the oncogene EZH2 in small cell lung cancer. *PLoS One*, 2013. 8(8): p. e71670.
- [55]. Zhou, B., et al., Down-regulation of long non-coding RNA LET is associated with

- poor prognosis in gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014. 7(12): p. 8893-8.
- [56]. Zheng, W. and A. Yu, EZH2-mediated suppression of lncRNA-LET promotes cell apoptosis and inhibits the proliferation of post-burn skin fibroblasts. *Int J Mol Med*, 2018. 41(4): p. 1949-1957.
- [57]. Tong, Y., et al., HSF1, in association with MORC2, downregulates ArgBP2 via the PRC2 family in gastric cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 2018. 1864(4 Pt A): p. 1104-1114.
- [58]. Chou, D.M., 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.
- [59]. Kinner A, Wu W, Staudt C, et al. γ H2AX In recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin [J] . *Nucl Acids Res*, 2008, 36 (17): 5678 — 5694
- [60]. Teyssier F , Bay JO , Dinet C , et al. Cell cycle regoulation after exposure to ionizing radiation. *Bull Cancer* , 1999, 86: 345-357.
- [61]. Hwang A ,M uschel RJ. Radiation and the G2 phase of the cell cycle.*Radiat Res*, 1998, 150(Suppl 5): S 52-59
- [62]. 罗加林, 曹建平, 朱巍, 冯爽, 盛方军, 朱财英, 郑斯英. ATM 与辐射激活的磷酸化 P53、P21 蛋白的相互作用[J]. *癌症杂志*, 2005, (9): 1059-1063
- [63]. Colak S and Medema JP. Cancer stem cells – important players in tumor therapy resistance. *FEBS J* 2014; 281: 4779-4791
- [64]. O'Hagan, H. M., Mohammad, H. P. and Baylin, S. B. (2008). Double strand breaks can initiate gene silencing and SIRT1-dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter CpG island. *PLoS Genet.* 4, e1000155
- [65]. Chou, D. M., Adamson, B., Dephoure, N. E., Tan, X., Nottke, A. C., Hurov, K. E., Gygi, S. P., Colaia 'covo, M. P. and Elledge, S. J. (2010). A chromatin localizationscreen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomband NuRD complexes to sites of DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 18475-18480
- [66]. Chagraoui, J., He 'bert, J., Girard, S. and Sauvageau, G. (2011). An anticlastogenic function for the Polycomb Group gene Bmi1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 5284-5289.

- [67]. Ginjala, V., Nacerddine, K., Kulkarni, A., Oza, J., Hill, S. J., Yao, M., Citterio, E., van Lohuizen, M. and Ganesan, S. (2011). BMI1 is recruited to DNA breaks and contributes to DNA damage-induced H2A ubiquitination and repair. *Mol. Cell. Biol.* 31, 1972-1982
- [68]. Ismail, I. H., Andrin, C., McDonald, D. and Hendzel, M. J. (2010). BMI1-mediated histone ubiquitylation promotes DNA double-strand break repair. *J. Cell Biol.* 191, 45-60
- [69]. Pan, M. R., Peng, G., Hung, W. C. and Lin, S. Y. (2011). Monoubiquitination of H2AX protein regulates DNA damage response signaling. *J. Biol. Chem.* 286, 28599-28607
- [70]. Hong, Z., Jiang, J., Lan, L., Nakajima, S., Kanno, S., Koseki, H. and Yasui, A. (2008). A polycomb group protein, PHF1, is involved in the response to DNA doublestrand breaks in human cell. *Nucleic Acids Res.* 36, 2939-2947
- [71]. Oza J, Ganguly B, Kulkarni A, Ginjala V, Yao M and Ganesan S. A novel role of chromodomain protein CBX8 in DNA damage response. *J Biol Chem* 2016; 291: 22881-22893.
- [72] Facchino S, Abdouh M, Chatoo W, Bernier G (2010) BMI1 confers radioresistance tonormal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damageresponse machinery. *J Neurosci* 30(30):10096–10111
- [73]. Bracken, A. P. and Helin, K. (2009). Polycomb group proteins: navigators of lineage pathways led astray in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 9, 773-784
- [74]. Gao SB, Xu B, Ding LH, Zheng QL, Zhang L, Zheng QF, Li SH, Feng ZJ, Wei J and Yin ZY. Thefunctional and mechanistic relatedness of EZH2 and menin in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2014; 61: 832-839
- [75]. Gao SB;Li KL;Qiu H;Zhu LY;Pan CB;Zhao Y;Wei SH;Shi S;Jin GH;Xue LX..Enhancing chemotherapy sensitivity by targeting PcG via the ATM/p53 pathway.[J].*Am J Cancer Res*,2017,Vol
- [76]. EZH2 Represses Target Genes through H3K27-Dependent and H3K27-Independent Mechanisms in Hepatocellular Carcinoma
- [77]. Chen Lu a ;Qiang Zhang a ;Xin Chen a *.New method for synthesis of EZH2 methyltransferase inhibitor GSK126[J].*Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry*, 2016,Vol.46(14): 1215-1222

致 谢

三年的研究生生活即将告一段落，我也将暂时告别校园，以一个全新身份继续接下来的人生旅程！在读研的三年中，我收获的不仅仅是专业知识，对未来的思考，还收获与了老师、同学朋友之间的情义，而这些都是我生命中最宝贵的财富。感谢一路走来你们给予过我关心、支持、帮助，我将带着它们披荆斩棘，无畏前行！

最要感谢的是我的老师孙世龙副教授和刘颖副教授，我觉得我是幸运的，因为我收获了两位老师对我的关心和帮助。在这三年中，孙老师在专业上培养了我的学术思维、专业知识，如何有效的解决问题；刘颖老师在生活上给予了我更多的关心和指点，从为人到处事都对我有很大的触动和启发。从两位导师身上，我学到了如何对自己的未来进行思考和规划。

感谢卫生毒理学教室和放射生物学教研室所有老师为我们提供了一个积极的学习氛围，和良好的科研环境，让我可以全身心的投入到自己的课题研究中，并且在实验上给予了我很多的指导与帮助。

感谢皇甫明美、秦海燕、李思瑶师姐和江阔同学在实验和生活上给予的帮助和陪伴，也感谢董卓师兄，吕亚慧、严珺、王元、侯宝莲、张琦同学等全体放射生物和卫生毒理学教研室的研究生。

最后特别感谢我的家人，感谢他们这么多年对我的爱与支持，让我可以在追求梦想的路上勇敢前行。