

NNK 抑制 ATM 基因表达的实验研究

陈俊生^{1,2}, 董 琪^{2,3}, 曹玉祥⁴, 吴志浩⁵

(1. 皖南医学院 麻醉学院, 安徽 芜湖 241002; 2. 皖南医学院 精准医学兴趣小组, 芜湖 安徽 241002; 3. 皖南医学院 临床医学院, 安徽 芜湖 241002; 4. 安徽师范大学 生命科学学院, 安徽 芜湖 241000; 5. 皖南医学院 细胞生物学教研室, 生物活性大分子重点实验室, 安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 研究烟草致癌物质 4-甲基亚硝胺基-1-3-吡啶基-1-丁酮 (NNK) 在非小细胞肺癌细胞 H1299 中对 ATM 基因表达的影响。**方法:** 采用 Western Blot 的方法检测不同时间段 NNK 处理的人非小细胞肺癌细胞 H1299 中 ATM 蛋白的表达量; 构建 ATM 启动子萤火虫荧光素酶报告基因质粒; 用双荧光素酶报告基因系统检测经 NNK 处理的 H1299 细胞中 ATM 启动子的活性。**结果:** Western Blot 证实 H1299 细胞中, NNK 在增加了 p-ATM (表明 ATM 被激活) 的同时抑制了 ATM 蛋白的表达。**结论:** 测序结果显示 ATM 启动子质粒构建成功; 双荧光素酶报告基因检测系统证实了在 H1299 细胞中 NNK 抑制 ATM 启动子的活性, 从而抑制 ATM 基因的表达。

【关键词】 ATM; NNK; 启动子克隆; DNA 损伤; 肿瘤

【中图分类号】 R 734. 2; R 393 **【文献标志码】** A

【DOI】 10. 3969 /j. issn. 1002-0217. 2018. 02. 002

Experimental study on the inhibition of ATM expression by NNK in non-small cell lung cancer cells

CHEN Junsheng, DONG Qi, CAO Yuxiang, WU Zhihao

School of Anesthesiology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To investigate the effect of 4-methylnitrosamino-1-3-pyridyl-1-butanone (NNK) on ataxia-telangiectasia mutated (ATM) gene expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line H1299. **Methods:** Western blot was performed to detect the expression of ATM in H1299 cells treated with NNK at different time intervals, and plasmid of the firefly luciferase reporter gene was developed by fusing to the ATM promoter to test its activity in NNK-treated H1299 cells that was measured in a dual luciferase reporter gene assay. **Results:** Western blotting indicated that NNK was capable of increasing phospho-ATM levels and inhibiting the expression of ATM protein in H1299 cells. **Conclusion:** ATM promoter luciferase reporter plasmid was successfully constructed by sequencing verification. Dual luciferase reporter gene assay confirms that NNK is able to inhibit the ATM promoter activity H1299 cells.

【Key words】 ATM; NNK; promoter cloning; DNA damage; neoplasm

烟草的使用是全世界主要的公共卫生问题, 与烟草有关的癌症每年造成数百万人死亡, 其中肺癌患者占绝大多数^[1]。4-甲基亚硝胺基-1-3-吡啶基-1-丁酮 (4-methylnitrosamino-1-3-pyridyl-1-butanone, NNK) 是烟草中重要的致癌物质, 其在体内可被代谢为强致癌物 4-羟基-1-(3-吡啶基)-1-丁酮^[2]。在细胞中发生了这些复杂的生化反应的结果是 NNK 广泛地诱导 DNA 损伤^[3-5]。

毛细血管扩张-共济失调突变基因 (Ataxia-telangiectasia mutated, ATM) 定位于染色体 11q22-23,

长度为 13 kb, 其中含有 66 个外显子, 编码一个 13 kb 长度的 mRNA。其编码产物为 ATM 蛋白, 属于一种丝/苏氨酸蛋白激酶, 含有 3056 个氨基酸残基, 是一种分子质量为 350 ku 大分子量蛋白, ATM 是磷脂酰肌醇激酶相关激酶 (PIKK) 家族的成员, 其在 DNA 双链断裂 (DSB) 诱导的信号传导中起主要作用^[6-7]。在细胞受到 DNA 双链损伤时, 它被磷酸化激活并启动双链修复阻止细胞周期的进程^[4]。因此, 研究其活性调控及蛋白表达的机制具有重要的临床意义。目前关于 ATM 基因表达的相关机制

基金项目: 安徽省自然科学基金项目 (1708085MH203)

收稿日期: 2017-09-16

作者简介: 陈俊生, 男, 2016 级麻醉学本科生, (电话) 17855325837, (电子信箱) 17855325837@163.com;

董 琪, 男, 2016 级临床医学本科生, (电话) 15755819518, (电子信箱) 15755819518@163.com, 共同第一作者。

吴志浩, 男, 研究员, (电子信箱) zwu2ster@163.com, 通信作者。

还尚未明确,为了后续探究 ATM 信号转导的相关分子机制,我们构建了人源 ATM 基因启动子荧光素酶报告基因质粒,并对其活性进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料 人非小细胞肺癌细胞 H1299 为本实验室冻存; DMEM 培养基(HyClone 公司); 小牛血清(南京博全科技有限公司); polyjet(SignaGen 公司); E. coli DH5 α Competent Cells(TaKaRa 公司); 双荧光素酶报告基因检测试剂盒、PGL3-Basic 质粒(Promega 公司); T4 DNA 连接酶、Kpn I 和 Nhe I (NEW-ENGLAND BioLabs); p-ATM、ATM 和 β -actin 抗体以及二抗(CST 公司); DNA Maker、质粒小量提取试剂盒(碧云天公司); 质粒中提试剂盒(QIAGEN 公司); 基因组 DNA 提取试剂盒和 Taq PCR MasterMix (TIANGEN 公司); 显影液(MILLIPORE 公司)。

1.2 方法

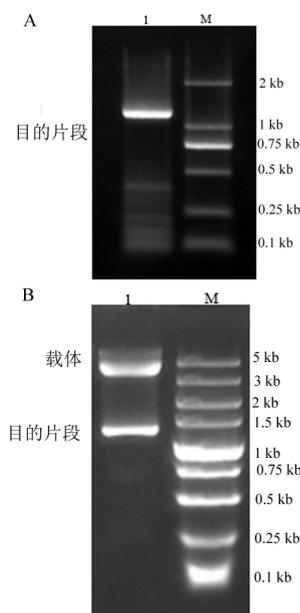
1.2.1 蛋白质免疫印迹法(Western Blot) 检测 ATM 蛋白的表达量 适量的细胞接种于六孔板中,用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基培养,待长满后以 DMEM 饥饿 12 h,再以 1 μ mol/L 的 NNK 不同时间段处理(浓度为本实验室前期探索^[8]), 4 h 后收样。在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶上分离,转膜后,用脱脂牛奶封闭 1 h,然后用一抗过夜孵育,再以二抗孵育 1 h,最后涂以适量显影液进行成像。

1.2.2 ATM 启动子的克隆 H1299 细胞培养于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中。待长满后,用基因组 DNA 提取试剂盒制备 H1299 细胞基因组 DNA,具体步骤按照操作手册进行。通过 UCSC 网站,找到人 ATM 基因启动子序列,设计出一对引物,上游为 5'-CCGGTACCCCTGACAGACAAGTGACCCACAAACA-3',下游为 5'-CTAGCTAGCAGAAGCAACGCCAAGCAGCCGCAGAGC-3'。以提取的 H1299 细胞基因组 DNA 为模板,PCR 条件: 预变性 94 $^{\circ}$ C、3 min; 变性 94 $^{\circ}$ C、30 s,退火 60 $^{\circ}$ C、30 s,延伸 72 $^{\circ}$ C、60 s,共 30 个循环,延伸 72 $^{\circ}$ C、5 min,扩增后的产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行分析。将上述克隆的 ATM 启动子片段和 PGL3-Basic 分别经 Kpn I、Nhe I 双酶切、连接,然后进行转化,挑取单克隆菌落做菌落 PCR 鉴定其阳性的克隆,然后阳性的克隆再次进行摇菌,保种后进行质粒提取、酶切并送往上海生物工程技术有限公司测序。

1.2.3 利用 GraphPad Prism 6 软件对实验中的数据进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

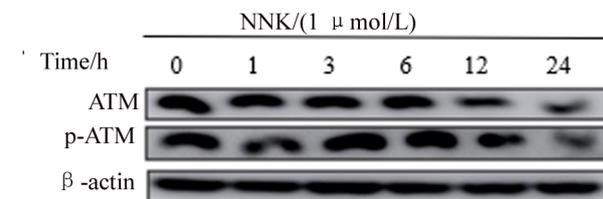
2.1 ATM 启动子克隆成功 将扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行分析,出现了预估的条带,说明扩增成功(图 1A)。将构建好的质粒进行 Kpn I、Nhe I 双酶切,出现了两条带,分别与载体和片段的分子量相同(图 1B),上海生物工程技术有限公司的测序结果更加说明了 ATM 启动子克隆成功。



A: 1. PCR 扩增产物, M. DNA Maker DL2000。
B: 1. 所构建质粒的酶切产物, M. DNA Maker DL5000。

图 1 琼脂糖凝胶电泳检测结果

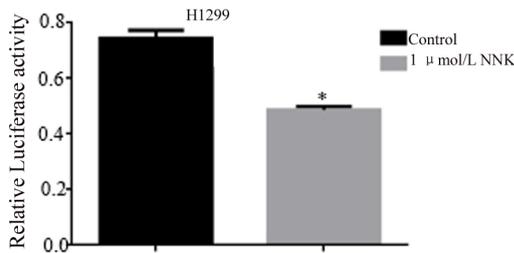
2.2 NNK 对于 ATM 蛋白的表达有抑制作用 用 1 μ mol/L 的 NNK 以不同时间段处理 H1299 细胞,我们发现随着时间的增加,NNK 对于 ATM 的抑制逐渐增强而 NNK 在 3 h 和 6 h 增加了 p-ATM 的活性,之后随着时间的增加 p-ATM 的活性减弱,这可能是因为 NNK 抑制 ATM 的总蛋白表达量,继而影响到 p-ATM 的量(图 2)。



1 μ mol/L 的 NNK 以不同时间段处理的 H1299 细胞中 ATM 与 p-ATM 的表达量。

图 2 Western Blot 检测结果

2.3 NNK 在转录水平上抑制 ATM 基因的表达 将构建的 ATM 启动子报告基因转入 H1299 细胞中,以 1 μ mol/L 的 NNK 处理 4 h,结果显示 NNK 抑制 ATM 启动子的活性(图 3)。



Control: 0.7380 ± 0.0594, n = 3; 1 μmol/L NNK: 0.5015 ± 0.0147, n = 3; t = 3.865, P = 0.0289, 差异具有统计学意义。

图3 双荧光素酶报告基因检测系统检测 H1299 细胞中 NNK 对 ATM 启动子活性的影响

3 讨论

我国属于肺癌多发国, 多达 90% 的肺癌可归因于吸烟或二手烟, 其中烟草致癌物质 NNK 已被国际癌症研究机构列为第 1 类人体致癌物质, 吸烟导致肺癌的现状不容乐观。NNK 已在体内外的实验中被证明和肺癌的发生与发展密切相关。在动物模型中, NNK 是唯一系统诱导小鼠、大鼠以及仓鼠肺部肿瘤的强致癌物。NNK 是来源于烟草加工过程中所产生的亚硝胺类物质。在体内, 经过细胞色素 p450 的作用导致了 NNK 的羟基化, 产生了 4-羟基-1-(3-吡啶基)-1-丁酮 (HPB), 促进了 DNA 加合物的生成, 进而会导致核苷酸的替代、缺失或染色体的重排^[9-10]。NNK 不仅诱导了 DNA 的突变, 同时可以影响细胞内多种信号通路。研究表明, EGFR、AKT、MAPK、NF-κB 等细胞内重要的信号转导途径都可以被 NNK 所激活^[9]。我们实验室前期的工作发现, NNK 可以和尼古丁乙酰胆碱受体结合诱导 AKT 和 ERK1/2 信号通路, 进而诱导缺氧诱导因子 HIF-1α 的表达^[8,10]。由 NNK 诱导的 DNA 突变及染色体变化无疑会导致 DNA 损伤修复的激活。这与我们发现的 p-ATM 在 NNK 处理早期呈上升趋势的结果一致。ATM 在细胞内与 NBS1 以及 BRCA1 形成 BRSC 复合物 (BRCA1-Associated Genome Surveillance Complex) 起到监视 DNA 损伤的作用。当 DNA 受到损伤时, ATM 蛋白激酶会被磷酸化激活, 激活的 ATM 蛋白激酶会激活下游一系列控制细胞周期的蛋白底物, 如 p53、chek2、chek1、Nhb1 等, 以此来使细胞周期停滞, 为 DNA 损伤的修复赢得时间^[11]。因此, ATM 在修复 NNK 诱导的 DNA 损伤中起到关键作用。我们的研究发现, NNK 抑制 ATM 蛋白表达呈时间依赖性, 同时我们发现 NNK 可以在转录水平上抑制 ATM 启动子的活性。根据本实验室及国内外其他实验室工作的结果, 我们推测 NNK 有可能

影响了某个信号通路的功能进而抑制了 ATM 蛋白的表达, 其具体分子机制目前正在加紧研究中。

本研究证实了 NNK 对 ATM 总蛋白的表达有抑制作用, 这有可能导致大范围的 DNA 损伤不能被修复, 因此, 我们认为 NNK 抑制 ATM 是肺癌发生发展的可能机制之一。本实验为探究 NNK 在非小细胞肺癌细胞中有关 ATM 信号通路的分子机制奠定了基础, 进一步探究 NNK 对 ATM 活性及表达的调节对了解烟草如何诱导肺癌的发生具有重要意义, 若能更清楚地了解 ATM 基因和 ATM 蛋白的功能, 可为 ATM 作为治疗吸烟所致肺癌的新靶点提供更准确可靠的理论依据。

【参考文献】

- [1] GRIFFIN R, RAMIREZ RA. Molecular Targets in Non-Small Cell Lung Cancer [J]. The Ochsner journal, 2017, 17(4): 388 - 392.
- [2] MICHEL AK, ZARTH AT, UPADHYAYA P, et al. Identification of 4-(3-Pyridyl)-4-oxobutyl-2'-deoxycytidine Adducts Formed in the Reaction of DNA with 4-(Acetoxymethylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone: A Chemically Activated Form of Tobacco-Specific Carcinogens [J]. ACS omega, 2017, 2(3): 1180 - 1190.
- [3] PETERSON LA, Context Matters. Contribution of Specific DNA Adducts to the Genotoxic Properties of the Tobacco-Specific Nitrosamine NNK [J]. Chemical research in toxicology, 2017, 30(1): 420 - 433.
- [4] STRACKER TH, ROIG I, KNOBEL PA, et al. The ATM signaling network in development and disease [J]. Frontiers in genetics, 2013, 4: 37.
- [5] BLACKFORD AN, JACKSON SP. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response [J]. Molecular cell, 2017, 66(6): 801 - 817.
- [6] GEORGE VC, RUPASINGHE HPV. Apple Flavonoids Suppress Carcinogen-Induced DNA Damage in Normal Human Bronchial Epithelial Cells [J]. Oxidative medicine and cellular longevity, 2017, 2017: 1767198.
- [7] AKOPYAN G, BONAVIDA B. Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis [J]. International journal of oncology, 2006, 29(4): 745 - 752.
- [8] GUO L, ZHOU Q, WU Z, et al. Mitochondrial reactive oxygen species mediates nicotine-induced hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in human non-small cell lung cancer cells [J]. Biochimica et biophysica acta, 2012, 1822(6): 852 - 861.
- [9] LIN RK, HSIEH YS, LIN P, et al. The tobacco-specific carcinogen NNK induces DNA methyltransferase 1 accumulation and tumor suppressor gene hypermethylation in mice and lung cancer patients [J]. The Journal of clinical investigation, 2010, 120(2): 521 - 532.
- [10] REZAEIAN AH, LI CF, WU CY, et al. A hypoxia-responsive TRAF6-ATM-H2AX signalling axis promotes HIF1alpha activation, tumorigenesis and metastasis [J]. Nature cell biology, 2017, 19(1): 38 - 51.
- [11] XU Y, GAO P, LV X, et al. The role of the ataxia telangiectasia mutated gene in lung cancer: recent advances in research [J]. Therapeutic advances in respiratory disease, 2017, 11(9): 375 - 380.