Chk1 防止 DNA 损伤的 S 期肿瘤细胞进行异常的有丝分裂

李小方, Tarsha Ward, 姚雪彪, 吴家睿*

中国科学技术大学合肥微尺度物质科学国家实验室(研究部), 中国科学技术大学生命科学学院系统生物学系, 合肥 230027;

Morehouse School of Medicine, Department of Physiology, Atlanta, GA 30310, USA;

中国科学院系统生物学重点实验室, 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031

* 联系人, E-mail: wujr@sibs.ac.cn

2009-07-07 收稿, 2009-08-19 接受

国家自然科学基金创新研究群体项目(批准号: 30821065)和国家重点基础研究发展计划资助项目(批准号: 2006CB503900)

摘要 为探讨在 p53 失活的肿瘤细胞中 DNA 甲基化试剂引发的 DNA 损伤对于细胞周期的影响, 我们将同步化在 G1, S 和 G2/M 期的 HeLa 细胞分别进行甲磺酸甲酯(MMS)处理。MMS 的处理结果表明, 各个时相的细胞周期进程均发生延迟或阻滞, 其中 S 期细胞对药物最为敏感。进一步的分子机理研究表明, 3 个时相中 ATM-Chk2 和 p38 MAPK 通路均被激活, 但是 Chk1 仅在 S 期中被活化, 提示 Chk1 特异地参与了 S 期的 DNA 损伤检查点(DNA damage checkpoint)或者 DNA 复制检查点(DNA replication checkpoint)的作用。为了进一步确定 Chk1 在 S 期的检查点功能, 用专一的小分子抑制剂抑制 Chk1 的磷酸化, 发现被 MMS 处理的 S 期细胞能在未完成复制的情况下进行异常的有丝分裂, 提示 Chk1 主要是在 HeLa 细胞 S 期的 DNA 损伤检查点而不是 DNA 复制检查点发挥其作用。另外, 本研究还检查了参与 G2/M 期进程的 cyclin B1 的表达变化情况。在 MMS 处理的 S 期细胞中, cyclin B1 表达量不能上调; 而在加入 Chk1 抑制剂处理后, cyclin B1 则有所增加。这一结果进一步支持 DNA 损伤 S 期细胞在 Chk1 失活时进入异常有丝分裂的推论。研究结果表明, Chk1 是 MMS 诱发的 HeLa 细胞 S 期 DNA 损伤检查点的专一性的重要蛋白激酶; 当 MMS 引发 DNA 损伤后, 上游蛋白激酶对 Chk1 进行磷酸化, 从而激活了 S 期的 DNA 损伤检查点, 阻止细胞进入 G2/M 期。由于这一过程不依赖于 p53 的活性, 因此 Chk1 有可能作为 p53 失活的肿瘤细胞的药物靶标。

关键词

细胞周期

DNA 损伤检查点

DNA 复制检查点

Chk1

甲磺酸甲酯

细胞在长期进化过程中形成了控制细胞增殖过程的质量的分子调控机制, 称为细胞周期检查点(checkpoints), 主要有 3 种类型: 第一种负责查看 DNA 有无损伤, 称为 DNA 损伤检查点(DNA damage checkpoint); 第二种检查 DNA 复制是否正常, 称为 DNA 复制检查点(DNA replication checkpoint); 第三种是管理染色体的正确分配与否, 称为纺锤体组

检查点(spindle assembly checkpoint)^[1,2]。

DNA 损伤检查点可以保证在基因组 DNA 损伤时能够进行及时的响应、延迟或停滞细胞周期进程, 并启动 DNA 损伤的修复。因为 DNA 损伤可以发生在细胞周期的不同时期, 所以在细胞中分别存在着 G1, S 和 G2/M 期的 DNA 损伤检查点。众多的研究揭示, 不同时期的 DNA 损伤检查点有着不同的分子作用机

引用格式: 李小方, Tarsha Ward, 姚雪彪, 等. Chk1 防止 DNA 损伤的 S 期肿瘤细胞进行异常的有丝分裂. 科学通报, 2009, 54: 2797~2805

Li X F, Ward T, Yao X B, et al. Chk 1 prevents abnormal mitosis of S-phase HeLa cells containing DNA damage. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0633-1

制^[3,4]。在这些参与 DNA 损伤响应的细胞周期检查点分子机制中, ATR/Chk1 激酶通路和 ATM/Chk2 激酶通路起着重要作用^[5]。在 DNA 双链断裂时, 通常是 ATM/Chk2 通路被激活^[6]; 而在 DNA 单链断裂或者 DNA 烷基化等结构性损伤时, 则是 ATR/Chk1 通路被激活^[7]。二者被活化后激活一系列的下游底物, 如 Cdc25, cyclin 和 Wee1 等, 使得细胞周期停滞^[3-5]。不久前, 研究者还发现了 DNA 损伤响应的第 3 个重要激酶通路: p38MAPK/MAPKAP-K2(MK2)模块; 该通路的激活也依赖于 ATR 和 ATM; 并和 Chk1/2 类似, MK2 可磷酸化 Cdc25 分子上相同的位点^[8]。

DNA 复制检查点的工作是, 当发现 S 期 DNA 复制异常时, 及时阻止复制过程的进行。其主要分子机制也是通过蛋白磷酸化途径进行。如果把裂殖酵母细胞的 DNA 复制用药物阻断, 将激活 Cds1 或 Chk1 蛋白激酶; 这两个蛋白激酶都可以对 Wee1 激酶进行磷酸化, 并导致 Mik1 激酶的增多^[9]。Wee1 和 Mik1 都可以对 Cdc2 第 15 位上的酪氨酸进行磷酸化, 从而抑制 Cdc2 的活性。DNA 复制检查点激活的 Cds1 或 Chk1 也可以直接对 Cdc25 进行磷酸化, 使 Cdc25 不能发挥其功能^[10]。此外, 我们早期研究发现, CHO 细胞的早 S 期以及中 S 期对于 DNA 复制检查点的反应也有差别^[11]。值得注意的是, 这些蛋白因子常常是既对 DNA 复制抑制有反应, 也能对 DNA 损伤进行检测。表明细胞周期检查点对这两类问题的探测是密切相关的。

肿瘤抑制因子 p53 参与了细胞周期检查点和 DNA 修复等多种重要的生命活动, 在维护基因组完整性中发挥着重要的作用^[1,2]。但是, 一半以上的肿瘤类型中均发现 p53 的突变或者失活。例如, HeLa 细胞由于感染了 HPV18 病毒^[12], 病毒的 E6 蛋白能够与 p53 结合并导致 p53 降解, 从而使 HeLa 细胞的 p53 通路不能被正常激活^[13]。因此, 肿瘤细胞体系中 DNA 损伤检查点的机制可能不同于正常的组织细胞。对于 p53 失活的肿瘤细胞体系的 DNA 损伤检查点机制的研究, 不仅有助于深入了解细胞周期的调控机制, 也有可能为癌症的特异性治疗提供理论依据。

研究者还发现, 对于处于 S 期的细胞, 因离子射线等引起的 DNA 断裂损伤通常不明显延缓 S 期的进程, 而因紫外线或者烷化剂等引起的 DNA 损伤则会导致显著的 S 期的进程延缓或停滞; 这种效应被认为是通过 S 期检查点引起的^[4,14]。这一过程不依赖于

p53 途径, 其具体的分子机理仍不是很清楚。

DNA 甲基化试剂甲磺酸甲酯(MMS)是一种常用的 DNA 烷化剂, 其作用方式是在嘌呤碱基上添加甲基化基团(7-methylguanine 或 3-methyladenine), 导致碱基错配以及复制阻断^[15,16]。本研究将 p53 失活的 HeLa 细胞进行同步化, 并用 MMS 进行处理, 然后开展 S 期 HeLa 细胞的 DNA 损伤检查点的分子活动机制的研究。

1 材料与方法

() 实验材料。研究中采用的羟基脲(hydroxyurea, HU), DNA 甲基化试剂甲磺酸甲酯(MMS)、Chk1 抑制剂 UCN-01, RNase A, 碘化丙啶(Propidium iodide, PI)和 DAPI 均购自 Sigma-Aldrich 公司; 胎牛血清(FBS)和 DMEM 培养基源自 Invitrogen Life Technologies 公司。HeLa 细胞购自 ATCC 公司。研究中用于免疫印迹的抗体 β -actin, Chk1, p-ATM 抗体购自 Santa-Cruz 公司; Chk2 抗体购自 BD 公司; p-Chk1(ser345), p-Chk2 (Thr68), ATM, p38, p-p38, cyclin B1 抗体均购自 Cell Signalling Technology 公司; 抗小鼠 IgG、抗兔 IgG 及 ECL Kit 为 Amersham 公司产品; 鼠抗微管蛋白抗体 DM1A 购自 Sigma-Aldrich 公司。

() 细胞培养与同步化。HeLa 细胞在 37 和 10% CO₂ 条件下, 培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中。HeLa 细胞采用 HU 药物双阻断方法同步化于 G1/S 边界处。具体方法为: 将指数期生长的细胞用 2 mmol/L HU 处理 12 h, 然后将细胞更换在无 HU 的生长培养基中培养 10 h, 随后再次加入 2 mmol/L HU 处理 12 h, 即获得处于 G1/S 边界处的同步化细胞。

() 细胞周期分析。收集胰酶消化后的细胞, 并用 70%酒精对细胞进行固定。在用流式细胞仪分析前, 将固定的细胞用 500 μ g/mL RNase A 在 37 水浴中处理 1 h, 然后将细胞用 30 μ g/mL PI 染色, 并采用流式细胞仪(BD FACSCalibur)于 488 nm 激发光波长下, 检测细胞中的 DNA 含量。

() 蛋白质的免疫印迹分析。在细胞样品中加入 1 $\times$ SDS 上样缓冲液, 在沸水中煮 10 min。采用 Lowry assay 测定总蛋白浓度。将等总蛋白数的蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳后, 由半干法转移到 PVDF 膜上, 并用含 10%脱脂奶粉的 TBS-T 对膜进行封闭; 随后用相应的抗体进行孵育, 并用 ECL 试剂盒检测荧光信号。

() 细胞的 DAPI 染色与分析. 用 -20°C 预冷的甲醇处理细胞, 并在 -20°C 条件下固定 15 min; 然后用 PBS 洗涤, 并加入 200 ng/mL DAPI, 在室温下染色 5 min. 随后用倒置荧光显微镜(Olympus IX51)在紫外激发光条件下观察 DAPI 染色的细胞.

() 细胞的免疫荧光与分析. 细胞的免疫荧光实验步骤见参考文献[17]. 主要过程如下: 将固定并通透的 HeLa 细胞与鼠微管蛋白抗体 DM1A 和兔抗 NuMA 抗体一起在室温下孵育 1 h, 随后用标记有 Alexa Fluor-488 (Invitrogen)的羊抗鼠抗体和标记有 Alexa Fluor-568(Invitrogen)的羊抗兔抗体一起在室温下孵育 30 min; 最后加入 DAPI. 样品用 DeltaVision Deconvolution 显微镜(Applied Precision Inc)进行检测[17].

2 结果

2.1 HeLa 细胞的同步化

我们采用化合物 HU 对 HeLa 细胞进行同步化. HU 能够抑制细胞内的核糖核苷还原酶的活性, 使得胞内的 dNTP 合成受阻, 从而抑制了 S 期的 DNA 合成的进行. 我们的研究表明, 如果将 HeLa 细胞用 2 mmol/L HU 处理 12 h, 大多数细胞将同步化在 G1/S 边界; 但是, 在把药物除去后(称为释放), 同步化的细胞群在通过 S 期, 进入 M 期和新的 G1 期时并不是很一致(结果未显示). 为此, 我们进行了同步化方法的改进, 即对 HeLa 细胞采用两次 HU 处理的“双阻断法”(见“材料与方法”部分). 采用双阻断法对细胞进行同步化后, (85.7 $\pm$ 0.2)% HeLa 细胞被同步化于 G1/S 边界处(图 1); 随后将这些细胞用不含 HU 的培养基进行培养, 在释放 3 h 后细胞比例达(77.1 $\pm$ 1.4)% (图 1); 在释放 6~9 h 后大多数细胞进入 G2/M 期, 而在释放 12 h 后, 绝大多数细胞完全进入下一个 G1 期(图 1). 这些数据表明, 双阻断法对 HeLa 细胞进行了有效地同步化, 并且这些细胞在去除同步化药物释放后, 能够高度同步地进入 S 期、G2/M 期和新一轮的 G1 期. 这为我们下面的研究工作奠定了很好的基础.

2.2 MS 引发 HeLa 细胞发生细胞周期停滞或延缓

将同步化在 G1/S 边界的 HeLa 细胞释放, 对释放后第 3, 第 7 和第 12 小时进入细胞周期不同相的 HeLa 细胞用不同浓度的 MMS 处理, 然后利用流式细胞仪分析相应的细胞周期进程. 从图 2 可以看到, 释放 3 h 后进入 S 期的细胞对 MMS 最为敏感, 0.2 mmol/L

MMS 的处理就明显导致 S 期进程的延缓, MMS 处理 4 h 后只有(53.4 $\pm$ 8.6)%的细胞进入 G2/M 期, 而对照组细胞 4 h 后则有(79.3 $\pm$ 5.2)%细胞进入 G2/M 期; 0.8 mmol/L MMS 的处理则使得细胞几乎完全停滞于 S 期, 不能进入 G2/M 期(图 2(a)). G2/M 期的细胞对于 MMS 的敏感性则最低, 0.2 mmol/L MMS 的处理对细胞没有太大的影响, 大多数细胞都能像对照组细胞一样进入 G1 期; 只有当 MMS 浓度高到 0.8 mmol/L, G2/M 期细胞中才有一部分被阻滞, 不能进入 G1 期(图 2(b)). 而 G1 期细胞对 MMS 的敏感度则介于 S 期和 G2/M 期之间: 0.2 mmol/L MMS 的处理对细胞没有太大的影响, 大多数细胞都能像对照组细胞一样进入 S 期; 但是, 当 MMS 浓度升高到 0.4 mmol/L 以后, 大多数细胞就被药物阻滞在 G1 期(图 2(c)). 这些结果表明, 处于细胞周期不同相的 HeLa 细胞对 MMS 的敏感程度是很不一样的.

2.3 MMS 诱导的细胞周期停滞或延缓是通过激活细胞周期检查点途径实现的

研究者已经发现, 细胞周期检查点的激活主要涉及 3 种蛋白激酶通路: ATM/Chk2 通路、ATR/Chk1 通路和 p38MAPK/MK2 通路[5]. 因此, 在 MMS 诱导的 HeLa 细胞周期停滞或延迟的研究中, 分别选择了代表这 3 种通路的重要蛋白激酶进行检测. 首先采用对不同相的细胞都有明显影响的高浓度 MMS (0.8 mmol/L)分别对 S 期细胞(图 3, 泳道 4)、G2/M 期细胞(图 3, 泳道 6)和 G1 期细胞(图 3, 泳道 8)进行处理, 然后进行相关蛋白质的免疫印迹分析. 可以看到, 未处理组中 Chk1, Chk2 以及 p38 的表达量以及磷酸化状况随着细胞周期的进行并无明显的变化; 然而, ATM, Chk2 和 p38 三种蛋白的磷酸化程度在所有这些不同相 MMS 处理的细胞中都有明显的升高(图 3, 泳道 4, 6 和 8), 表明 ATM/Chk2 通路和 p38/MK2 通路在 MMS 处理的细胞中都被激活, 并且这两条通路的激活不依赖于细胞周期的特定相. Chk1 的结果则很不一样, 其磷酸化程度的升高主要表现在 MMS 处理的 S 期细胞(图 3, 泳道 4); 而在 MMS 处理的 G2/M 及 G1 期细胞中则没有检测到 Chk1 磷酸化的变化(图 3, 泳道 6 和 8). 免疫印迹的结果表明, 在 MMS 诱发的 HeLa 细胞周期不同相的细胞周期检查点中, ATM/Chk2 通路和 p38/MK2 通路都发挥着作用; 而 ATR/Chk1 通路则只是在 S 期检查点中发挥作用.

图 1 HeLa 细胞的同步化

HeLa 细胞用 HU 进行“双阻断法”处理, 使其同步化在 G1/S(见“材料与方法”)。同步化的细胞释放后, 于不同时间点收样, 并用流式细胞仪进行检测。箭头所示分别为 DNA 含量 $2n$ 和 $4n$ 的位置

图 2 MMS 对于 HeLa 细胞周期各时相的进程的影响

将同步化在 G1/S 边界的 HeLa 细胞释放, 对释放后第 3 小时(S 期细胞)、第 7 小时(G2/M 期细胞)和第 12 小时(G1 期细胞)用不同浓度的 MMS (0.2~0.8 mmol/L)处理, 然后用流式细胞仪进行检测。箭头所示分别为 DNA 含量 $2n$ 和 $4n$ 的位置

图3 MMS 处理的 HeLa 细胞周期检查点蛋白的变化情况

用 0.8 mmol/L MMS 处理不同时相的 HeLa 细胞(同图 2)。收集样品的总蛋白,并对主要的细胞周期检查点蛋白的表达情况及其磷酸化水平进行免疫印迹分析;β-actin 为定量用的参考蛋白。1, 同步化于 G1/S 样品;2, 释放后第 3 小时样品;3, 释放后第 7 小时样品;4, 释放后第 3 小时样品, 用 MMS 处理到第 7 小时;5, 释放后第 12 小时样品;6, 释放后第 7 小时样品, 用 MMS 处理到第 12 小时;7, 释放后第 18 小时样品;8, 释放后第 12 小时样品, 用 MMS 处理到第 18 小时

2.4 Chk1 的失活不影响 MMS 诱发的 DNA 复制检查点的功能

为了研究 Chk1 在 MMS 引发的 S 期细胞周期检查点中的作用,我们对同步化在 G1/S 的 HeLa 细胞在释放 2 h 后先加入 Chk1 的小分子抑制剂 7-hydroxystaurosporine (UCN-01)^[18],对这些 S 期 HeLa 细胞进行 1 h 的预处理,然后再用 0.8 mmol/L MMS 对这些 UCN-01 处理的细胞进行 DNA 损伤诱导。研究结果表明,UCN-01 可以抑制 MMS 诱发的 Chk1 的磷酸化;这一抑制作用呈现出浓度依赖性,当 UCN-01 浓度达到 1000 nmol/L 时, MMS 引发的 Chk1 的磷酸化程度仅有 50%左右(图 4(a)和(b))。然而,用流式细胞仪分析相应的细胞周期进程的结果却表明,用 UCN-01+MMS 处理的细胞 DNA 含量分布图(Profile)与单独用 MMS 处理的几乎没有发生改变(图 4(c))。这些结果提示,虽然 UCN-01 抑制了 Chk1 的磷酸化,但是 Chk1 的失活并没有消除 S 期 HeLa 细胞的 DNA 复制检查点阻滞 DNA 复制过程的功能。

2.5 DNA 损伤的 S 期细胞在 Chk1 失活时进入异常有丝分裂

尽管 MMS 处理的 S 期 HeLa 细胞在 UCN-01 作用下 DNA 复制过程依然处于停滞状态,但是我们在显微镜下观察发现,与未处理的对照组以及 MMS 单

独处理组相比,UCN-01+MMS 处理组出现了许多形态上像分裂期细胞的圆形细胞。为此,我们将细胞固定后用 DAPI 进行细胞核 DNA 染色,然后在荧光显微镜下进行观察。镜检结果表明,释放 7 h 后的对照组以及单独 MMS 处理组中,绝大多数细胞核的 DNA 都呈现匀净的弥散式分布(图 5(a));但是,当 UCN-01 与 MMS 共同处理 S 期 HeLa 细胞后,许多细胞核则出现了染色质的异常浓缩;该染色质的异常浓缩还呈现出 UCN-01 的浓度依耐性(图 5(a))。这一结果提示,Chk1 磷酸化的抑制可以消除 S 期 DNA 损伤检查点,导致 MMS 处理的 S 期 HeLa 细胞发生异常的有丝分裂。

为了进一步证实 Chk1 磷酸化的抑制导致 DNA 损伤细胞的异常有丝分裂,我们采用抗蛋白 tubulin 抗体和抗蛋白 nuclear mitotic apparatus (NuMA)抗体对 HeLa 细胞进行免疫荧光分析实验(见“材料与方法”部分)。这两种蛋白是装配细胞分裂期纺锤体装置的重要成分^[19,20]。镜检结果表明,在对照组(DMSO)和单独用 MMS 处理组(MMS)中的分裂期细胞的数量是用 UCN-01 与 MMS 共同处理组(MMS+U300; MMS+U1000)中的分裂期细胞的数量的一半左右。更重要的是,对照组(DMSO)和单独用 MMS 处理组(MMS)中的分裂期细胞显示出正常的染色体分裂;而 UCN-01 与 MMS 共同处理组(MMS+U300; MMS+U1000)中的

图4 UCN-01抑制MMS诱导的S期细胞中Chk1的磷酸化

(a) 将同步化在G1/S期的HeLa细胞释放2 h后,用Chk1小分子抑制剂UCN-01(300或1000 nmol/L)预处理细胞1 h,然后再加入MMS处理至第7小时;然后将样品进行免疫印迹分析。1,释放后第3小时样品;2,释放后第7小时样品;3,释放后第3小时样品,用MMS处理到第7小时;4,用300 nmol/L UCN-01和MMS联合处理的样品;5,用1000 nmol/L UCN-01和MMS联合处理的样品。(b)用ImageJ软件分析(a)中各样品的p-Chk1的相对含量;3次重复的统计结果,误差为样本标准误差;*, $P < 0.05$,表示两组间存在显著差异。(c)对这些样品进行流式细胞仪检测。箭头所示分别为DNA含量2n和4n的位置

分裂期细胞则表现出异常的染色体分裂(图5(b))。这些结果证实,Chk1磷酸化的抑制的确导致了DNA损伤的S期HeLa细胞进行异常的有丝分裂。

早期的研究揭示,调控真核细胞周期的CDK1的活化需要周期蛋白因子cyclin B1的参与,而CDK1-cyclin B1在G2期的激活则是细胞进入有丝分裂期(M期)的必要条件^[21]。最近的研究还指出,cyclin B1可以作为反映抑制Chk1活性的分子标记物^[22]。为了进一步证实UCN-01抑制Chk1的磷酸化能够导致异常有丝分裂发生,我们检测了HeLa细胞的cyclin B1的表达水平。当MMS的处理使细胞周期阻滞于S期时,cyclin B1蛋白的表达水平明显低于释放7 h的未处理细胞(图5(c)和(d));而在UCN-01+MMS处理组中cyclin B1蛋白的表达水平则高于单独MMS处理组,并呈现出UCN-01的浓度依赖性(图5(c)和(d))。因此,cyclin B1蛋白的检测进一步支持了以上观点:抑制Chk1的活性将使S期DNA损伤检查点不能正常工作,使HeLa细胞进入异常的有丝分裂期。

3 讨论

DNA单链或双链的断裂等各种DNA损伤可以发生于细胞周期的任一时相,因此在细胞周期的各个时相都有DNA损伤检查点。但是,S期还有一个特定检测DNA复制质量的DNA复制检查点^[1,2]。例如,当复制过程受到化合物HU的抑制时,或者当DNA复制叉发生断裂时,DNA复制检查点都被激活^[23,24]。由于DNA单链或双链断裂等DNA损伤经常发生在DNA复制过程^[4],因此许多检查点蛋白既参与DNA复制检查点的工作,也同时参与DNA损伤检查点的工作^[24,25]。需要指出的是,细胞周期检查点的功能活动中有许多不同的蛋白激酶和其他种类的蛋白质参与,这些蛋白质之间形成了复杂的调控网络,使得协调DNA复制检查点和DNA损伤检查点之间的关系也变得很复杂。不久前有研究报道,因化合物BCNU引起的DNA复制停滞而激活的ATR/Chk1激酶通路独立于BCNU诱导的碱基错配修复通路^[26]。还有研

图5 Chk1 的失活导致 MMS 处理的 S 期 HeLa 细胞进行异常的有丝分裂

(a) 用 DAPI 对细胞核进行染色, 然后在荧光显微镜下检测. 箭头所示为发生异常有丝分裂的细胞; 标尺示 50 μ m. (b) 用抗 tubulin 蛋白抗体和抗 NuMA 蛋白抗体对 HeLa 细胞进行免疫荧光分析; 其中微管蛋白为绿色; NuMA 蛋白为红色. (c) Cyclin B1 的免疫印迹分析. β -actin 为定量用的参考蛋白. (d) 用 ImageJ 软件分析(c)中各样品的 Cyclin B1 的相对含量; 1, 释放后第 3 小时样品; 2, 释放后第 7 小时样品; 3, 释放后第 3 小时样品, 用 MMS 处理到第 7 小时; 4, 用 300 nmol/L UCN-01 和 MMS 联合处理的样品; 5, 用 1000 nmol/L UCN-01 和 MMS 联合处理的样品. 3 次重复的统计结果, 误差为样本标准误差; *, $P < 0.05$, 表示两组间存在显著差异

究指出,检查点协调蛋白 Claspin 一方面用来协助 ATR 对 Chk1 的磷酸化,另一方面还能够以独立于 ATR/Chk1 激酶通路的方式对复制叉的稳定性进行调控^[27]. 本研究结果表明, MMS 对 HeLa 细胞的作用可以使 ATR-Chk1, ATM-Chk2 以及 p38-MK2 三条通路均被激活(图 3),提示在 MMS 诱导的 HeLa 细胞周期检查点中存在着复杂的调控网络.

MMS 作为一种常用的 DNA 烷化剂,既能导致 DNA 损伤,又能引起复制阻断^[15,16]. 利用非洲爪蟾 (*Xenopus*)卵抽提物进行的体外实验指出, MMS 诱发的 DNA 损伤检查点活动与 DNA 复制活动紧密相关,并主要涉及到复制叉的双链断裂^[28]. 在裂殖酵母细胞的研究中则发现, MMS 处理引起的 DNA 损伤能够抑制 DNA 复制的起始和复制叉的移动,从而导致 S 期的停滞^[29]. 我们利用检测 DNA 链断裂的“彗星法”(comet assay)对 MMS 处理的 HeLa 细胞进行分析,看到 MMS 处理引起了 HeLa 细胞的 DNA 链断裂(结果未显示,参见文献^[30]);而通过流式细胞仪分析细胞 DNA 含量分布图的结果表明, MMS 处理的 S 期 HeLa 细胞的 DNA 复制受到了明显的阻滞(图 2(a);图 4(c)). 因此,可以认为,在 MMS 处理的 p53 失活的 S 期 HeLa 细胞中, DNA 损伤检查点与 DNA 复制检查点都被激活了.

Chk1 是一种参与细胞周期检查点的重要蛋白激

酶,它与其上游蛋白激酶 ATR 组成的信号通路在 DNA 损伤检查点与 DNA 复制检查点中都起着重要的作用^[5,7-10]. 最近的研究表明, Chk1 的功能还不仅仅局限于作为检查点蛋白激酶,在正常的细胞周期进程中, Chk1 的磷酸化对有丝分裂期的调控也是必需的^[31]. 特别要强调的是, Chk1 在协调 DNA 损伤检查点与 DNA 复制检查点的关系上可能存在着复杂的反馈作用. 已有实验证明,如果用抑制剂 UCN-01 或者是 RNA 干扰技术抑制结肠癌细胞 HT19 的 Chk1 活性,一方面能够消除 DNA 拓扑异构酶抑制剂 Camptothecin 引起的对 DNA 复制起始和复制叉移动的抑制作用,从而恢复了 DNA 复制进程;可另一方面, Chk1 的失活却同时加剧了 Camptothecin 诱导的 DNA 损伤^[32]. 在本研究中, UCN-01 对 HeLa 细胞的 Chk1 活性的抑制没有消除或减轻 MMS 对 DNA 复制的阻滞行为,表明 DNA 复制检查点的功能依旧(图 4(c));但是, Chk1 的失活却让 DNA 损伤检查点失去作用,从而让 HeLa 细胞进入异常的有丝分裂期(图 5). 由于 ATM-Chk2 和 p38 MAPK 通路在 MMS 处理的 S 期 HeLa 细胞中也被激活(图 3),因此也有可能是这两条通路保证了 DNA 复制检查点继续实施其功能. 本研究结果提示,有必要深入研究 Chk1 是如何协调它自己在 DNA 损伤检查点与 DNA 复制检查点中所扮演的角色.

参考文献

- Hartwell L, Weinert T. Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, 1989, 246: 629—634[doi]
- 吴家睿. 检查点: 细胞周期的质量监督. *生命的化学*, 1999, 19: 199—202
- Sancar A, Lindsey-Boltz L A, Unsal-Kaçmaz K, et al. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, 2004, 73: 39—85[doi]
- Branzei D, Foiani M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9: 297—308[doi]
- Reinhardt H C, Yaffe M B. Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21: 245—255[doi]
- Ahn J Y, Schwarz J K, Piwnicka-Worms H, et al. Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Res*, 2000, 60: 5934—5936
- Liu S, Bekker-Jensen S, Mailand N, et al. Claspin operates downstream of TopBP1 to direct ATR signaling towards Chk1 activation. *Mol Cell Biol*, 2006, 26: 6056—6064[doi]
- Reinhardt H C, Aslanian A S, Lees J A, et al. p53-Deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell*, 2007, 11: 175—189[doi]
- Boddy M N, Furnari B, Mondesert O, et al. Replication checkpoint enforced by kinases Cds1 and Chk1. *Science*, 1998, 280: 909—912[doi]
10. Boddy M N, Furnari B, Mondesert O, et al. Dual regulation of Cdc25A by Chk1 and p53-ATF3 in DNA replication checkpoint control. *J Biol Chem*, 2009, 284: 4132—4139

11. Ren Y, Wu J R. Differential activation of intra-S-phase checkpoint in response to triphchlorolide and its effects on DNA replication. *Cell Res*, 2004, 14: 227—233
12. Yee C, Krishnan-Hewlett I, Baker C C, et al. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol*, 1985, 119: 361—366
13. Kessis T D, Slebos R J, Nelson W G, et al. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 3988—3992[[doi](#)]
14. Grallert B, Boye E. The multiple facets of the intra-S checkpoint. *Cell Cycle*, 2008, 7: 2315—2320
15. Kim E M, Burke D J. DNA damage activates the SAC in an ATM/ATR-dependent manner, independently of the kinetochore. *PLoS Genet*, 2008, 4: e1000015[[doi](#)]
16. Nikiforov A, Svetlova M, Solovjeva L, et al. DNA damage-induced accumulation of Rad18 protein at stalled replication forks in mammalian cells involves upstream protein phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 323: 831—837[[doi](#)]
17. Yao X, Abrieu A, Zheng Y, et al. CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic checkpoint. *Nat Cell Biol*, 2000, 2: 484—491[[doi](#)]
18. Zhao B, Bower M J, McDevitt P J, et al. Structural basis for Chk1 inhibition by UCN-01. *J Biol Chem*, 2002, 277: 46609—46615[[doi](#)]
19. Chang P, Stearns T. δ -Tubulin and ε -tubulin: Two new human centrosomal tubulins reveal new aspects of centrosome structure and function. *Nat Cell Biol*, 2000, 2: 30—35[[doi](#)]
20. Sun Q Y, Schatten H. Role of NuMA in vertebrate cells: Review of an intriguing multifunctional protein. *Front Biosci*, 2006, 11: 1137—1146[[doi](#)]
21. Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, 1990, 344: 503—508[[doi](#)]
22. Xiao Z, Xue J, Gu W Z, et al. Cyclin B1 is an efficacy-predicting biomarker for Chk1 inhibitors. *Biomarkers*, 2008, 13: 579—596[[doi](#)]
23. Barlow J H, Rothstein R. Rad52 recruitment is DNA replication independent and regulated by Cdc28 and the Mec1 kinase. *EMBO J*, 2009, 28: 1121—1130[[doi](#)]
24. Friedel A M, Pike B L, Gasser S M. ATR/Mec1: Coordinating fork stability and repair. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21: 237—244[[doi](#)]
25. Yang X H, Zou L. Dual functions of DNA replication forks in checkpoint signaling and PCNA ubiquitination. *Cell Cycle*, 2009, 8: 191—194
26. Cui B, Johnson S P, Bullock N, et al. Bifunctional DNA alkylator 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea activates the ATR-Chk1 pathway independently of the mismatch repair pathway. *Mol Pharmacol*. 2009, 75: 1356—1363[[doi](#)]
27. Scora J, McGowan C H. Claspin and Chk1 regulate replication fork stability by different mechanisms. *Cell Cycle*, 2009, 8: 1036—1043
28. Stokes M P, Van Hatten R, Lindsay H D, et al. DNA replication is required for the checkpoint response to damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol*, 2002, 158: 863—872[[doi](#)]
29. Kumar S, Huberman J A. Checkpoint-dependent regulation of origin firing and replication fork movement in response to DNA damage in fission yeast. *Mol Cell Biol*, 2009, 29: 602—611
30. de la Torre-Ruiz M, Lowndes N F. The *Saccharomyces cerevisiae* DNA damage checkpoint is required for efficient repair of double strand breaks by non-homologous end joining. *FEBS Lett*, 2000, 467: 311—315[[doi](#)]
31. Wilsker D, Petermann E, Helleday T, et al. Essential function of Chk1 can be uncoupled from DNA damage checkpoint and replication control. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 20752—20757[[doi](#)]
32. Seiler J A, Conti C, Syed A, et al. The intra-S-phase checkpoint affects both DNA replication initiation and elongation: Single-cell and -DNA fiber analyses. *Mol Cell Biol*, 2007, 27: 5806—5818[[doi](#)]