

FTO 基因对人脑胶质瘤 A172 细胞放射敏感性的影响及其机制

聂亮琴 周菊英 王利利 秦颂兵 徐晓婷

【摘要】 目的 通过改变人脑胶质瘤细胞系 A172 中脂肪量与肥胖相关基因(FTO)的表达,研究 FTO 基因对细胞放射敏感性的影响及其机制。方法 按 FTO 表达情况将细胞分为正常表达组(A172)、低表达对照组(A172/NC)、低表达组(A172/siRNA)、高表达对照组(A172/PC)和高表达组(A172/FTO)。Western blot 法检测受 X 射线照射后 A172 组内 FTO 蛋白的表达水平;克隆集落形成实验检测 5 组细胞的放射敏感性;免疫荧光法和 Western blot 法检测 FTO 对受照后 A172 细胞内 DNA 损伤及损伤修复相关蛋白的影响。结果 A172 细胞内 FTO 蛋白表达水平与照射剂量和照射时间有关;A172/siRNA 组和 A172/FTO 组的放射增敏比($SER_{D_{50}}$)分别为 1.829、0.812;抑制 FTO 表达能使 γ -H2AX foci 数目增加($t = -21.884, P < 0.05$),Ku80 和 p-p95/NBS1 蛋白下调($t = 24.731, 23.293, P < 0.05$),Rad50 蛋白表达上调($t = 3.140, P < 0.05$);FTO 高表达后 DNA 损伤修复相关蛋白表达结果与前面相反($t = 0.642, -8.364, 26.829, P < 0.05$)。结论 FTO 是一种辐射抗性基因。改变 FTO 表达能显著改变 A172 细胞的放射敏感性,其机制可能与 FTO 能调控电离辐射引起肿瘤细胞的原发性损伤、改变照射后 DNA 损伤修复有关。

【关键词】 人脑胶质瘤; 放射敏感性; 肥胖相关基因

Effects of FTO gene on the radiosensitivity of A172 cells and its mechanism Nie Liangqin, Zhou Juying, Wang Lili, Qin Songbing, Xu Xiaoting. Department of Radiation Oncology, Affiliated First Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China
Corresponding author: Zhou Juying, Email: zhujuying@sohu.com

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of Fat Mass and Obesity Associated (FTO) gene on radiosensitivity of human glioma cell A172 and investigate its potential mechanism by changing the expression of FTO gene. **Methods** Cells were divided into five groups according to their FTO protein expression level. The normal expression group was recorded as A172 Group, the low-expression and its negative control group was A172/siRNA and A172/NC Group, and the over-expression and its negative control group was A172/FTO and A172/PC group. FTO protein expressions were assayed by Western blot in A172 Group after irradiation. Clonogenic assay was executed to evaluate the relationship between FTO gene and radiosensitivity. Immunofluorescence and Western blot assay were applied to detect the proteins of DNA damage and repair. **Results** FTO protein expression level in A172 Group was significantly related to the irradiation dose and the time post-irradiation. The radiosensitization ratio ($SER_{D_{50}}$) of A172/siRNA and A172/FTO group were 1.829 and 0.812 respectively. Not only the number of γ -H2AX foci increased ($t = -21.884, P < 0.05$) in A172/siRNA 1 h post-irradiation but the decreases of p-p95/NBS1 and Ku80 proteins were also detected ($t = 24.731, 23.293, P < 0.05$) together with the increase of Rad50 protein ($t = 3.140, P < 0.05$). But the expressions of these proteins in A172/FTO group were opposite to the above phenomenon ($t = 0.642, -8.364, 26.829, P < 0.05$). **Conclusions** FTO gene is a radiation-resistant gene, which may because the regulation of FTO gene could alter the primary injury and DNA damage repair in the irradiated tumor cells.

【Key words】 Glioblastoma; Radiosensitivity; Fat mass and obesity associated gene

目前约 70% 的肿瘤需行放疗,但大多数肿瘤都

存在一定的放射抗拒性。即使在精确放疗的今天,临床上放疗野内复发的情况仍然存在。因此,细胞的放射敏感性及其影响因素的相关研究已上升为近年来的研究热点。有研究表明,基因治疗能够提高肿瘤对放、化疗的敏感性,同时,减少肿瘤的复发

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-5098.2015.04.004

作者单位:215006 苏州大学附属第一医院[聂亮琴(现在宁波市第二医院放疗科)、周菊英、王利利、秦颂兵、徐晓婷]

通信作者:周菊英,Email:zhujuying@sohu.com

和转移^[1]。

脂肪量与肥胖相关基因 (fat mass and obesity associated gene, FTO) 是近年来研究的热门基因之一。全基因组关联分析显示 FTO 基因的单核苷酸多态性可能与某些肿瘤 (胰腺癌^[2]、子宫内膜癌^[3]、乳腺癌^[4]、前列腺癌^[5]等) 的发生风险有关, 但其在人体中的作用机制尚未完全阐明^[6]。有研究发现, FTO 基因敲除可能影响肿瘤细胞的能量平衡及增殖活性^[7-8]。本研究从放射增敏的角度, 探讨 FTO 基因与脑胶质瘤细胞放射敏感性的关系。

材料与方 法

1. 细胞系: 人脑胶质瘤 A172 细胞购自美国 ATCC 细胞库。按 FTO 表达情况将 A172 细胞分别应用于干扰 RNA 瞬时转染技术和重组质粒转染联合 G418 筛选的方法构建 A172/NC、A172/siRNA、A172/PC 和 A172/FTO 组, 分别为低表达对照组、低表达组、高表达对照组和高表达组, 并得到验证。4 组细胞均由苏州大学长江学者实验室构建并提供。A172 细胞为正常表达组。

2. 主要试剂: DMEM 培养基、胎牛血清、胰酶均购自美国 GIBCO 公司。姬姆萨染液购自美国 Biosharp 公司, 抗 FTO 抗体、抗 γ -H2AX 抗体、抗 Ku80 抗体、抗 p-p95/NBS1 抗体、抗 Rad50 抗体等均购自美国 Abcam 公司和美国 Santa Cruz 公司。化学发光试剂盒购自美国 Millipore 公司。

3. 照射条件: 高能 6 MV PRIMUS 医用直线加速器 (德国西门子公司) X 射线照射, 吸收剂量率 200 cGy/min, 固定源靶距 100 cm, 照射野为 10 cm \times 10 cm, 1.5 cm 补偿膜以取消建成效应。

4. Western blot 法: 各组蛋白样品分别取 50 μ g, 经电泳分离后转印至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上。用 5% 脱脂牛奶封闭后, 加入特异性一抗溶液置于室温作用 1 h, 0.1% 磷酸盐吐温缓冲液 (TBST) 洗涤后, 与二抗溶液室温作用 45 min, 洗涤后化学发光显色试剂盒 (EZ-ECL) 进行曝光。

5. 克隆集落形成法: 5 组细胞按照不同剂量 (0.05、1、2、4、8 Gy) 分别照射, 每组细胞每个剂量点设 3 个平行样。常规培养 15 d。终止培养后用无水甲醇固定 30 min, 姬姆萨染色 1 h, 于显微镜下计数不小于 50 个细胞的集落。计算出克隆形成率 (PE) 和存活分数 (SF) 并拟合细胞存活曲线: $SF = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$ 。式中, D_0 为平均致死剂量, D_q 为

准阈剂量, N 为外推值。

6. 免疫荧光法计数 γ -H2AX foci 数: 各组细胞分别用 4% 多聚甲醛固定 10 min, 0.5% Triton 穿孔 15 min, 1% BSA 封闭 30 min。加入一抗于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 二抗于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 5 μ g/ml DAPI 染色 2 min, 抗淬灭封片剂封片。置于共聚焦显微镜下计数 γ -H2AX foci 数目。

7. 统计学处理: 所有实验均重复 3 次, 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 19.0 统计软件分析, 在检验数据正态分布及方差齐性的条件下, 多组间数据比较采用方差分析; 各组组间差异比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. X 射线对 A172 细胞内 FTO 蛋白表达水平的影响: 如图 1、表 1 所示, 当剂量为 2、4、6、8 Gy 时, 照射 1 h FTO 蛋白表达水平均较未照射 A172 细胞增加 ($t = -149.253 \sim -24.394, P < 0.05$), 且剂量越大, FTO 表达增加越明显 ($r = 0.996$)。当时间大于或等于 12 h 时, X 射线照射后 FTO 蛋白表达均比未照射 A172 细胞减少 ($t = 4.996 \sim 167.351, P < 0.05$), 且经过一定时间后, FTO 蛋白表达降至最低后可逐渐恢复。

2. FTO 对 A172 细胞放射敏感性的影响: 将细胞克隆形成实验所得数据采用多靶单击模型拟合细胞存活曲线并计算与放射敏感性相关的参数, 结果如图 2 和表 1 所示。当干扰 FTO 表达时, A172 与 A172/NC 组细胞存活曲线之间差异无统计学意义, 而 A172/siRNA 组的存活曲线较前两组均明显下移, 且随着照射剂量增加, 存活曲线下移越明显。此外, A172/siRNA 组细胞存活曲线肩区较前两组窄, 这说明干扰 FTO 表达能抑制 A172 细胞发生亚致死性损伤修复。当 FTO 过表达时, A172/FTO 组在低剂量照射后的细胞存活率较 A172 和 A172/PC 组均变化不大; 而在照射剂量大于 4 Gy 的情况下, A172/FTO 组的细胞存活率大于后两者, 但 A172/PC 组细胞存活率亦大于 A172 组。这说明 FTO 过表达对 A172 细胞的辐射保护作用不能排除质粒 pcDNA3.1 干扰的因素。由表 2 可知, A172/siRNA 组的放射增敏比为 1.829, 而 A172/FTO 组的放射增敏比为 0.812。这进一步说明 FTO 基因可能是一种辐射耐受的靶点基因, 抑制 FTO 表达可以明显增加 A172 细胞的放射敏感性。

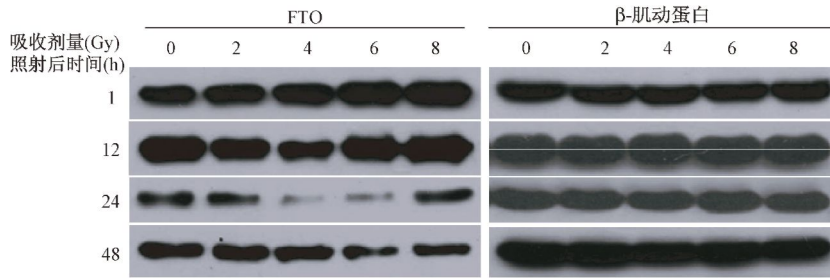


图 1 A172 细胞受不同剂量 X 射线照射后不同时间, FTO 蛋白的表达水平

表 1 不同剂量 X 射线照射后不同时间对 A172 细胞内 FTO 蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s$)

照射后时间(h)	样本数	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy
1	3	4 000. 103 ± 21. 738	4 494. 791 ± 16. 064 ^a	5 129. 008 ± 15. 979 ^a	5 807. 430 ± 14. 455 ^a	6 350. 382 ± 14. 238 ^a
12	3	5 738. 276 ± 20. 238	3 906. 874 ± 15. 671 ^b	3 075. 736 ± 18. 703 ^b	4 561. 489 ± 17. 365 ^b	5 629. 229 ± 12. 660 ^b
24	3	1 985. 509 ± 26. 734	1 388. 327 ± 22. 702 ^c	326. 996 ± 21. 079 ^c	584. 071 ± 15. 897 ^c	1 877. 301 ± 26. 313 ^c
48	3	3 288. 646 ± 24. 002	2 916. 898 ± 21. 231 ^d	2 717. 385 ± 20. 806 ^d	1 665. 438 ± 32. 817 ^d	1 835. 280 ± 21. 292 ^d

注:与 0 Gy 照射后同一时间比较, ^a $t = -149. 253 \sim -24. 394, P < 0. 05$; ^b $t = 7. 912 \sim 167. 351, P < 0. 05$; ^c $t = 4. 996 \sim 78. 041, P < 0. 05$; ^d $t = 20. 094 \sim 78. 458, P < 0. 05$

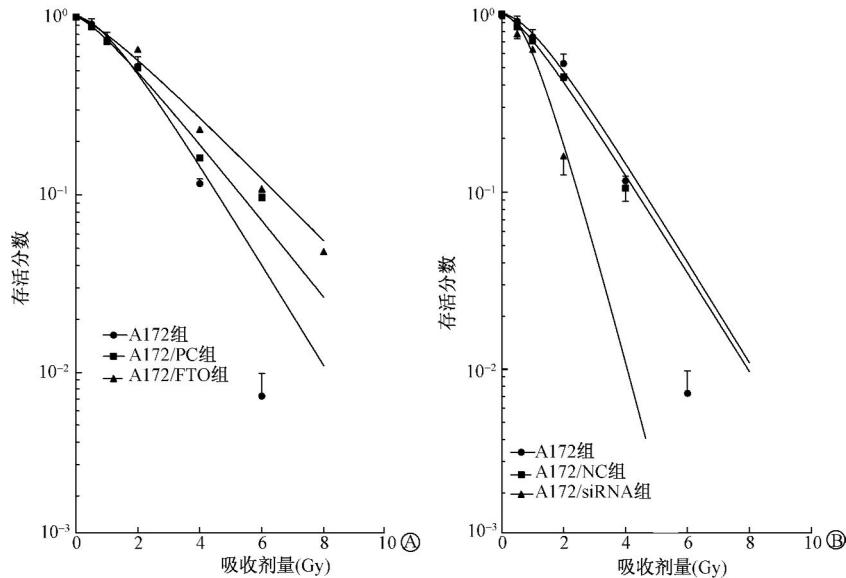


图 2 改变 FTO 表达对 A172 细胞放射敏感性的影响 A. FTO 高表达; B. FTO 低表达

表 2 改变 FTO 表达对 A172 细胞放射敏感性的影响

组别	相关参数的影响				
	K	N	D ₀	D _q	SER
A172 组	0. 654	2. 047	1. 530	1. 141	—
A172/NC 组	0. 640	1. 640	1. 562	0. 941	—
A172/siRNA 组	1. 171	2. 226	0. 854	0. 642	1. 829
A172/PC 组	0. 500	1. 459	1. 998	1. 070	—
A172/FTO 组	0. 407	1. 437	2. 460	1. 263	0. 812

注:“—”为无数据。SER. 增敏比

3. FTO 对 X 射线照射后 A172 细胞 DNA 损伤修复的影响:采用免疫荧光法检测 FTO 不同表达水平的 A172 细胞接受 4 Gy X 射线照射后 1 h 的 γ -H2AX 蛋白 foci 形成并计数,结果列于图 3。与 A172/NC 组比较, A172/siRNA 组内 γ -H2AX 蛋白

foci 形成数目明显增加($t = -21. 884, P < 0. 05$),但 A172/FTO 组较 A172/PC 组内 γ -H2AX foci 数目未见明显差异($t = 0. 856, P > 0. 05$)。这说明抑制 FTO 表达可以诱发 A172 细胞发生电离辐射损伤。

为了进一步研究 FTO 影响 A172 细胞 DNA 损伤修复的机制,采用 Western blot 法对比 FTO 不同表达水平时 A172 细胞内 DNA 损伤修复相关蛋白的表达,结果列于图 4、5。由图 4 可知,改变 FTO 蛋白的表达水平后,5 组内调控 DNA 损伤修复相关的蛋白 Ku80、p-p95/NBS1、Rad50 蛋白表达均相应改变。由图 5 可进一步了解,FTO 低表达时, A172/siRNA 组内 Ku80 和 p-p95/NBS1 蛋白表达下降, Rad50 蛋白表达增加。而 FTO 高表达时,结果正好相反。由此

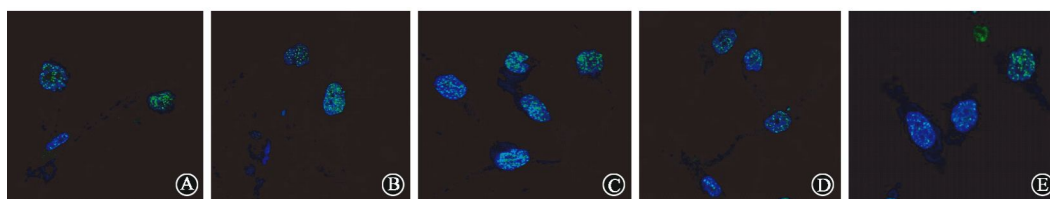
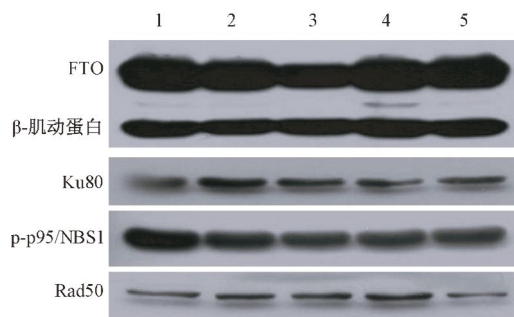
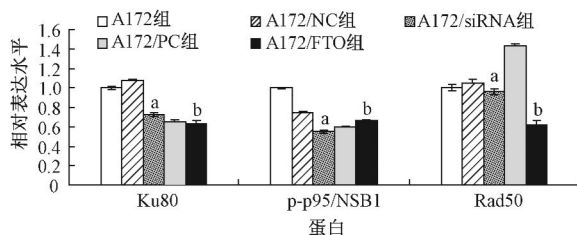


图3 FTO对A172细胞电离辐射后 γ -H2AX foci形成数目的影响 A. A172组;B. A172/NC组; C. A172/siRNA组;D. A172/PC组;E. A172/FTO组



注:1~5分别表示A172、A172/NC、A172/siRNA、A172/PC、A172/FTO组

图4 改变FTO对A172受照射后DNA损伤修复相关蛋白表达的影响



注:^a与同一蛋白A172/NC组比较, $t=3.140\sim24.731, P<0.05$;

^b与同一蛋白A172/PC组比较, $t=-8.364\sim26.829, P<0.05$

图5 FTO表达对A172受照射后DNA损伤修复相关蛋白表达的影响

可知,FTO可能通过调控DNA损伤修复蛋白的表达进而影响A172细胞的放射敏感性。

讨论

FTO蛋白属于AlkB家族高度同源蛋白,表达于细胞核,含有与 Fe^{2+} 以及 α -酮戊二酸(α -ketoglutaric acid, α -KG)依赖的加氧酶相同的基序^[9-10]。Zhao等^[11]的研究提示约75%的继发性恶性脑胶质瘤和5%的原发性恶性脑胶质瘤存在可溶性异柠檬酸脱氢酶1(isocitrate dehydrogenase 1, IDH1)基因突变,该突变可导致催化异柠檬酸氧化脱羧生成 α -KG的能力大大下降,而向肿瘤细胞转染 α -KG后, IDH1的突变效应可以得到逆转。这为FTO基因与脑胶质瘤之间的联系提供了一种可能。

本实验发现,采用不同剂量的X射线照射A172细胞,经过不同时间后FTO蛋白的表达水平不同。这为研究通过改变FTO基因表达来影响肿瘤细胞放射敏感性提供了可能。

当用不同剂量的X射线分别照射正常表达组A172细胞,1h后FTO蛋白表达水平均较未照射A172细胞显著增加,且FTO蛋白表达水平与照射剂量呈正相关($r=0.9963$)。这提示X射线能够诱导FTO蛋白在短时间(1h)内的表达,FTO蛋白可能参与辐射引起的细胞急性损伤,其作用及作用机制仍缺乏足够的实验数据支持。当照射剂量固定时,照射1hFTO蛋白表达增加,照射12~24hFTO蛋白表达逐渐下降,照射48h,FTO蛋白表达又逐渐恢复。这提示,FTO蛋白参与X射线引起的细胞辐射损伤及损伤修复的过程。

本研究进一步探索了FTO蛋白与辐射之间的关系。通过细胞克隆形成实验检测体外培养细胞受照射后的细胞克隆存活率,是分析细胞内在放射敏感性的一种有效手段^[12]。应用多靶单击模型对FTO不同表达水平的A172细胞受X射线照射后的细胞存活曲线进行拟合,发现FTO低表达时A172细胞的存活曲线较正常表达时明显下移,而且肩区明显变窄,这说明干扰FTO表达能通过抑制A172细胞发生亚致死性损伤修复来达到放射增敏的效果。免疫荧光法发现A172/siRNA细胞内 γ -H2AX foci形成数目明显增加,这进一步证实了干扰FTO表达能诱发受照射后的A172细胞发生DNA损伤。另一方面,FTO过表达相关实验的结果与前面结果却并不一致。A172/FTO细胞受低剂量照射后的细胞存活率较A172细胞和A172/PC细胞均变化不大;而当照射剂量大于4Gy时,A172/FTO细胞的存活率大于后两者,且A172/PC细胞存活率亦大于A172细胞。FTO过表达时A172细胞 γ -H2AX计数与空质粒组比较数目减少,但差异不具有统计学意义。这提示FTO可能是一种辐射抗性基因,抑制FTO蛋白的表达,可使X射线更易诱导A172细胞的死亡。其

过表达时未显现出增加 A172 细胞辐射抗性的作用可能与质粒 pcDNA3.1 本身影响 A172 细胞的放射敏感性有关。

众所周知,细胞的放射敏感性与受照后 DNA 的损伤修复能力密切相关^[13]。当受到电离辐射时,细胞发生单链断裂(single-strand breaks, SSBs)和双链断裂(DNA double-strand breaks, DSBs),其中 DSBs 被认为是 DNA 受到电离辐射后最致命的损伤^[14]。感受到损伤后,由 Mre11、Rad50 和 p95/NBS1 组成的三聚复合物 MRN 首先识别 DNA 损伤,招募活化的 ATM 到损伤位点,使 ATM 下游底物 H2AX、BRCA1 等发生磷酸化并聚集,进而参与 DSB 的识别和修复^[15-17]。已知细胞修复 DSBs 主要通过非同源末端结合(non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组(homologous recombination, HR)两种途径。在 NHEJ 途径中,Ku 蛋白首先识别 DNA 双链断裂末端并在此聚集形成 DNA-Ku70/Ku80 复合物,进一步激活 DNA 依赖性蛋白激酶 DNA-PKs 与 DNA 结合,由 DNA 连接酶、DNA 连接酶辅因子 XRCCs 等多个分子参与并共同完成 DNA 修复^[18-21]。采用 Western blot 法对比 FTO 不同表达水平时 A172 细胞内 DNA 损伤修复相关蛋白的表达,结果提示,FTO 低表达时,A172 细胞内 Ku80 和 p-p95/NBS1 蛋白表达下降。而 FTO 高表达时,结果正好相反。由此可知,FTO 可能通过调控 DNA 损伤修复蛋白的表达进而影响 A172 细胞的放射敏感性。

综上所述,FTO 基因可能是一种与辐射耐受有关的靶点基因。通过一些药物作用于该基因,选择性的提高肿瘤细胞的放射敏感性,同时又不增加正常组织的放射损伤,有望成为一种理想的放射增敏方法。但是,以 FTO 基因作为分子靶点的放射增敏剂,在取得基础实验和循证医学的进一步证实和验证方面仍有大量的工作需要完成。

参 考 文 献

- [1] Gridley DS, Slater JM. Gene therapy: A possible aid to cancer radiotherapy[J]. *Discov Med*, 2004,4(24):408-414.
- [2] Li G, Chen Q, Wang L, et al. Association between FTO gene polymorphism and cancer risk: evidence from 16277 cases and 31153 controls[J]. *Tumour Biol*, 2012,33(4):1237-1243.
- [3] Lurie G, Gaudet MM, Spurdle AB, et al. The obesity-associated polymorphisms FTO rs9939609 and MC4R rs17782313 and endometrial cancer risk in non-hispanic white women[J]. *PLoS One*, 2011,6(2):e16756.
- [4] da Cunha PA, de Carlos Back LK, Sereia AF, et al. Interaction between obesity-related genes, FTO and MC4R, associated to an increase of breast cancer risk[J]. *Mol Biol Rep*, 2013,40(12):6657-6664.
- [5] Lewis SJ, Murad A, Chen L, et al. Associations between an obesity related genetic variant (FTO rs9939609) and prostate cancer risk[J]. *PLoS One*, 2010,5(10):e13485.
- [6] Fredriksson R, Hägglund M, Olszewski PK, et al. The obesity gene, FTO, is of ancient origin, up-regulated during food deprivation and expressed in neurons of feeding-related nuclei of the brain[J]. *Endocrinology*, 2008,149(5):2062-2071.
- [7] Pitman RT, Fong JT, Billman P, et al. Knockdown of the fat mass and obesity gene disrupts cellular energy balance in a cell-type specific manner[J]. *PLoS One*, 2012,7(6):e38444.
- [8] Zhang ZB, Zhou DM, Lai YL, et al. Estrogen induces endometrial cancer cell proliferation and invasion by regulating the fat mass and obesity-associated gene via PI3K/AKT and MAPK signaling pathways[J]. *Cancer Lett*, 2012,319(1):89-97.
- [9] Han Z, Niu T, Chang J, et al. Crystal structure of the FTO protein reveals basis for its substrate specificity[J]. *Nature*, 2010,464(7292):1205-1209.
- [10] Gerken T, Girard CA, Tung YCL, et al. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase[J]. *Science*, 2007,318(5855):1469-1472.
- [11] Zhao SM, Lin Y, Xu W, et al. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha[J]. *Science*, 2009,324(5924):261-265.
- [12] Liu XX, Sun C, Jin XD, et al. Genistein enhances the radiosensitivity of breast cancer cells via G₂/M cell cycle arrest and apoptosis[J]. *Molecules*, 2013,18(11):13200-13217.
- [13] Berdis AJ. Current and emerging strategies to increase the efficacy of ionizing radiation in the treatment of cancer[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2014,9(2):167-181.
- [14] Fasih A, Elbaz HA, Huttemann M, et al. The mechanism of metformin-induced radiosensitization of pancreatic cancer cells[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2013,87(2):S653.
- [15] Ponnala S, Veeravalli KK, Chetty C, et al. Regulation of DNA repair mechanism in human glioma xenograft cells both *in vitro* and *in vivo* in nude mice[J]. *PLoS One*, 2011,6(10):e26191.
- [16] Kim YS, Kang MJ, Cho YM. Low production of reactive oxygen species and high DNA repair: mechanism of radioresistance of prostate cancer stem cells[J]. *Anticancer Res*, 2013,33(10):4469-4474.
- [17] Lavrik OI. DNA repair: a key mechanism stabilizing the genome[J]. *Biochemistry*, 2011,76(1):3.
- [18] Bernstein NK, Hammel M, Mani RS, et al. Mechanism of DNA substrate recognition by the mammalian DNA repair enzyme, Polynucleotide Kinase[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009,37(18):6161-6173.
- [19] Meyn RE, Munshi A, Haymach JV, et al. Receptor signaling as a regulatory mechanism of DNA repair[J]. *Radiother Oncol*, 2009,92(3):316-322.
- [20] Kashino G, Liu Y, Suzuki M, et al. An alternative mechanism for radioprotection by dimethyl sulfoxide, possible facilitation of DNA double-strand break repair[J]. *J Radiat Res*, 2010,51(6):733-740.
- [21] Herdendorf T, Nelson S. The molecular mechanism of bacteriophage T4 Rad50/Mre11 DNA repair complex[J]. *FASEB J*, 2012,26:536. 3.