

文章编号: 1007-4627(2023)02-0280-07

线虫 DDR 食道球特异挽救对辐射诱导胚胎致死的影响及相关机制研究

尚梦柯¹, 戴张昱², 张文静², 卞坡^{2,3}, 王婷^{2,3,†}, 吴李君^{1,†}

(1. 安徽大学物质科学与信息技术研究院, 合肥 230601;

2. 中国科学院合肥物质科学研究院, 合肥 230031;

3. 安徽医科大学基础医学院, 合肥 230032)

摘要: DNA 损伤反应 (DDR) 是生命对抗外源和内源性氧化胁迫的主要机制之一。在生命体的不同细胞和组织中 DDR 具有不同的激活程度, 本研究以模式生物秀丽隐杆线虫为实验对象, 通过构建 DDR 通路上游关键基因 *hus-1* 的食道球特异表达转基因系, 并将其杂交到 *hus-1* 突变背景获取 DDR 食道球特异挽救品系 BPL1121、BPL1122 和 BPL1123, 探究 DDR 异质性激活对辐射生物效应的影响及其内在机制。利用该实验体系检测 DDR 食道球挽救对 γ 辐射诱导胚胎致死的影响。与 *hus-1* 突变体线虫相比, 辐射当代 BPL1121 线虫的胚胎致死率由 24.72 ± 1.77 增加到 $42.66 \pm 1.18 (P < 0.01)$, 这种增强效应延续到了未经过直接辐照的 F1 子代线虫 ($P < 0.01$), 但在 F2 线虫中恢复到本底水平 ($P > 0.05$)。线虫中的类胰岛素通路与线虫的生长、发育和繁殖等行为密切相关, *daf-2* 是该信号通路上的一个关键基因。把 BPL1121 引入到 *daf-2* 突变背景, 发现 DAF-2 功能缺失明显抑制了 BPL1121 线虫的胚胎辐射致死。DDR 食道球异质性激活增加了生殖细胞的辐射敏感性, 类胰岛素途径参与了食道球 DDR 对生殖细胞辐射敏感性的远程调控。

关键词: DDR 异质性; 组织特异挽救; 秀丽隐杆线虫; 胚胎致死; DNA 损伤反应

中图分类号: Q691

文献标志码: A

DOI: 10.11804/NuclPhysRev.40.2022060

0 引言

DNA 作为遗传物质, 在生命体的生长、发育和繁殖等过程中扮演着核心的角色。由于生命体长期受到内源和外源性遗传毒剂的胁迫, DNA 经受着频繁的损伤和突变。为了维持基因组的完整性, 生命体进化了一套 DNA 损伤修复机制——DNA 损伤反应 (DNA damage response, DDR), 该通路包括 DNA 损伤检验点、信号传导和应激反应三个部分^[1]。DNA 损伤检验点位于 DDR 通路的上游, 包括 *hus-1*、*atm-1*、*mrt-2* 和 *clk-2* 等, 负责损伤信号的识别。而在损伤检验点下游是转导子蛋白 (ATM 和 ATR), 把 DNA 损伤信号进一步级联传递至效应子, 诱发细胞应激反应, 主要包括细胞周期抑制、细胞凋亡和 DNA 损伤修复等, 其中 DNA 损伤修复包括非同源末端连接 (Nonhomologous end-joining, NHEJ)、同源重组 (Homologous recombination, HR)、错配修复 (Mismatch repair, MMR) 和碱基切除修复 (Base excision

repair, BER) 等^[2]。

目前普遍认为 DDR 的作用模式是细胞自主性的, 即从 DNA 损伤的感知到下游的应激反应都是以细胞为单位来完成的。但最近越来越多的证据表明 DDR 也受到胞外信号的调控, 具有非细胞自主的调控模式^[3-4]。生命体由不同类型的器官、组织和细胞组成, 由于其分化程度和功能等的差异, 在受到遗传毒剂胁迫时, 它们的 DDR 具有不同的激活程度, 这种异质性激活如何影响辐射的生物学效应是目前大家关注的一个重要科学问题。组织/细胞特异性挽救是研究特定生物过程和功能时空特性的重要技术, 已经在模式生物上面得到广泛的使用^[5]。考虑到 DDR 激活的细胞/组织依赖性, 利用特异性挽救可以建立 DDR 异质性激活实验体系。

模式生物秀丽隐杆线虫凭借其遗传背景清楚、与人类基因组同源性高、生命周期短、结构简单、突变体资源丰富和易于培养等优势, 已经成为科研人员首选的模式生物^[6]。启动子是基因表达的开关, 具有一定的时

收稿日期: 2022-05-12; 修改日期: 2022-06-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (12075275)

作者简介: 尚梦柯 (1996-), 女, 河南平顶山人, 硕士研究生, 从事辐射生物学研究; E-mail: q19201062@stu.ahu.edu.cn

† 通信作者: 王婷, E-mail: wangting@ahmu.edu.cn; 吴李君, E-mail: ljw@ipp.ac.cn

空模式，特别是一些组织特性表达启动子，已被广泛用于特定生物学功能的组织特异性挽救体系的构建^[7]。在秀丽隐杆线虫中，*myo-2* 基因只在食道球肌肉细胞中表达，其启动子是一个经典的食道球特异表达元件^[8-9]。另外，在线虫的体细胞中没有可检测的 DDR 上游生物活性，HUS-1、ATM-1、ATR-1 等 DNA 蛋白的表达在转录水平被明显抑制^[10]。考虑以上因素，在本研究中选择线虫食道球作为目标组织，构建 *myo-2* 启动子驱动 *hus-1* 基因在食道球特异表达的线虫品系。为了排除体细胞中 DDR 本底活性的干扰，将其进一步与 *hus-1* 突变体杂交，最终建立 DDR 食道球特异挽救品系。线虫生殖腺位于身体的中部，是生殖细胞发生和受精的部位。精子由精原细胞分化而来，在 L4 期发育成熟并储存于精囊中。卵母细胞从生殖腺臂的远端到近端依此经历有丝分裂和减数分裂的粗线期、双线期以及终变期，最终发育成熟。这些细胞在各个分裂时期中发生遗传损伤后通常导致胚胎的致死，其致死的程度是评价辐射生物学效应的一个重要指标。在本研究中基于线虫 DDR 食道球特异挽救品系，以 γ 射线为辐射源，研究 DDR 异质性激活对线虫胚胎致死的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂及培养基的制备

秀丽隐杆线虫生长培养基 (Nematode growth medium, NGM): 称取 10.2 g 琼脂 B、1.8 g NaCl、1.5 g 蛋白胨用超纯水定容至 600 mL，121 °C 高压灭菌 30 min。培养基温度降至 65 °C 左右时，在无菌条件下分别加入 0.6 mL 1 mol/L 的 MgSO₄、0.6 mL 1 mol/L 的 CaCl₂、0.6 mL 5 mg/mL 的胆固醇、0.6 mL 1% 的制霉菌素和 15 mL 磷酸缓冲溶液 (边加边摇匀)，然后立即分装到 9.0, 6.0, 3.5 cm 的培养皿中，在超净工作台上放置过夜，待

NGM 凝固后备用。
M9 缓冲溶液：称取 1.5 g KH₂PO₄、3.0 g Na₂HPO₄、2.5 g NaCl，用超纯水定容至 500 mL，121 °C 高压灭菌 30 min，待温度降至室温时，在无菌条件下加入 500 μ L 1 mol/L 的 MgSO₄ 溶液，分装到 10 个 50 mL 离心管中，室温保存备用。

1.2 秀丽隐杆线虫的品系和培养方法

实验中所用的线虫品系购买自美国国立卫生研究院资助的线虫种质中心 (Caenorhabditis genetics center, CGC)，涉及到的品系如表 1 所列。秀丽隐杆线虫在实验室培养条件下以尿嘧啶缺陷型大肠杆菌 OP50 作为唯一的食物来源，在本研究中避光培养在 20 °C 生化培养箱中。具体培养方法参照 <http://www.wormbook.org> 提供的线虫标准实验操作流程。

1.3 秀丽隐杆线虫的同步化处理

为了使实验过程中所使用的线虫处于同一发育时期以便减少系统误差，我们对线虫进行同步化处理。具体实验过程如下：用 M9 缓冲液将处于产卵高峰期的线虫从 NGM 板上洗至 1.5 mL 离心管中，自然沉降去上清，用 M9 缓冲液洗三次，加入线虫裂解液 (M9 缓冲液 700 μ L、NaClO 溶液 200 μ L、5 mol/L 的 NaOH 溶液 100 μ L，现配现用) 放置在暗处裂解虫体，当 70% 的虫体裂解时，用离心机 6 000 r/min 离心 1 min，去上清，用 M9 缓冲液再次清洗三次，然后将虫卵均匀地分散在 3 mL M9 缓冲液中，过夜孵化后接种在含有 OP50 的 NGM 板上，即可得到同步化生长的线虫。

1.4 秀丽隐杆线虫的杂交

将目的序列 *Pmyo-2::hus-1::gfp(myo-2*，食道球特异性启动子，*gfp* 筛选报告基因) 插入 pPD49.78 质粒，然后用显微注射技术将重组质粒打到野生型秀丽隐杆线虫

表 1 本实验中所涉及线虫品系

品系名	基因型	描述
N2		野生型
WS2277	<i>hus-1(op241) I</i>	<i>hus-1</i> 基因突变品系
RB2473	<i>cpr-4(ok3413) V</i>	<i>cpr-4</i> 基因突变品系
CB1370	<i>daf-2(e1370) III</i>	<i>daf-2</i> 基因突变品系
BPL1121, BPL1122, BPL1123	<i>Pmyo-2::hus-1::gfp;(op241) I</i>	<i>hus-1</i> 食道球特异挽救线虫品系
BPL1111, BPL1112, BPL1113	<i>Pmyo-2::hus-1::gfp;N2</i>	<i>hus-1</i> 食道球特异表达品系
BPL1100	<i>Pmyo-2::gfp;N2</i>	野生型背景下 <i>gfp</i> 食道球特异表达品系
BPL1101	<i>Pmyo-2::gfp;(op241) I</i>	<i>hus-1</i> 基因突变背景下 <i>gfp</i> 食道球特异表达品系
BPL1131	<i>Pmyo-2::hus-1::gfp;cpr-4(ok3413) V</i>	<i>cpr-4</i> 基因突变背景下 <i>hus-1</i> 食道球特异挽救品系
BPL1141	<i>Pmyo-2::hus-1::gfp;daf-2(e1370) III</i>	<i>daf-2</i> 基因突变背景下 <i>hus-1</i> 食道球特异挽救品系

的生殖腺中,得到野生型背景下 *hus-1* 在食道球特异性表达的游离型秀丽隐杆线虫株系,其基因型为: *Ex[Pmyo-2::hus-1::gfp;N2]*(转基因操作委托福建上源生物科技有限公司进行)。接着使用 γ 射线对其进行辐照处理,诱导基因组 DNA 双链断裂,使游离的质粒通过重组整合到基因组中,筛选三个能够稳定遗传的 *hus-1* 食道球特异表达平行转基因品系,根据 CGC 授权的实验室代码,将其命名为 BPL1111、BPL1112 和 BPL1113 [*Pmyo-2::hus-1::gfp;N2*]。按照此方法构建野生型背景下 *gfp* 食道球特异表达品系 BPL1100:*Pmyo-2::gfp;N2*。通过杂交的方法将 *hus-1* 食道球特异表达转基因系引入 *hus-1* 基因突变背景。在这里我们选择带有绿色荧光蛋白标记的转基因品系 BPL1111、BPL1112 和 BPL1113 雄虫作为杂交父本,不带标记的 *hus-1* 突变品系 WS2277 的雌雄同体线虫作为杂交母本,用挑虫针按照 3:1 的比例挑成虫期的雄虫和 L4 期的雌雄同体线虫到同一个含有少量 OP50 的 3.5 cm 的培养皿中繁殖(增加杂交机率)。当产生后代后,挑一条带绿色荧光标记的 F1 代雌雄同体线虫单独培养(F1 代中带有绿色荧光蛋白标记的即为杂交后代),产生 F2 代后,再从中挑选 24 条带绿色荧光蛋白标记的雌雄同体线虫单独培养,产生 F3 代后,筛选出 F3 代中均带绿色荧光蛋白标记的 F2 代线虫,验证其基因型,根据 CGC 授权的实验室代码,将 *hus-1* 食道球特异挽救品系命名为 BPL1121、BPL1122 和 BPL1123 [*Pmyo-2::hus-1::gfp;(op241) I*]。按照此方法构建 *hus-1* 基因突变背景下 *gfp* 食道球特异表达品系 BPL1101:*Pmyo-2::gfp;(op241) I*、*cpr-4* 基因突变背景下 *hus-1* 食道球特异挽救品系 BPL1131:*Pmyo-2::hus-1::gfp;cpr-4(ok3413) V* 和 *daf-2* 基因突变背景下 *hus-1* 食道球特异挽救品系 BPL1141:*Pmyo-2::hus-1::gfp;daf-2(e1370) III*。DNA 提取方法参照文献[11],在 PCR 管中加入 16 μ L RNase-free water 和 2 μ L 10 $\times$ Ex-Taq buffer,用挑虫针挑一条线虫放入 PCR 管中。然后将其放进液氮中 1 min,再立即用 PCR 仪 85 $^{\circ}$ C 加热 2 min 破碎线虫。之后加入 1 mg/mL 的蛋白酶 K 溶液 2 μ L,用 PCR 仪 56 $^{\circ}$ C 加热 15 min,95 $^{\circ}$ C 加热 10 min,即可得到单条线虫的全基因组 DNA。用核酸定量仪 Q5000(美国 Quawell 公司)检测提取的 DNA 浓度。以单条线虫的全基因组 DNA 为模板,在 PCR 管中加入 25 μ L 的 2 $\times$ Hieff PCR Maste Mix(With Dye),2 μ L 的上游引物(10 μ mol/L),2 μ L 的下游引物(10 μ mol/L),10 μ L 的 DNA 模板,最后加入灭菌后的超纯水至总体积为 50 μ L。PCR 反应程序为:预变性 95 $^{\circ}$ C 2 min,变性 94 $^{\circ}$ C 30 s,退火 58.5 $^{\circ}$ C 30 s,延伸 72 $^{\circ}$ C 50 s,变性-退火-延伸扩增 29 个循环,

终延伸 72 $^{\circ}$ C 2 min。PCR 扩增引物如表 2 所列。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定,点突变序列送公司测序,并将测序结果上传到 NCBI 上进行序列比对。

表 2 PCR 引物序列

基因	引物	引物序列(5'-3')
<i>hus-1</i>	正向	TGCAGGGAATAGTGTCTCA
	反向	TCGGCTTCTGGATTCTAAC
<i>daf-2</i>	正向	ATCAATGCGTACTCCTCATC
	反向	TGGAAATCTCCGTGACTATC
<i>cpr-4</i>	正向	AAAAGACCATCGCAATGAAG
	反向	TTCATGATCCTATCAGTCCACG

1.5 γ 射线辐照秀丽隐杆线虫

将待检测的 L3 期线虫置于 6 cm 的 NGM 板上,利用中国科学院合肥物质科学研究所的 Biobeam Cs137 辐射源发出的 γ 射线以 3.37 Gy/min 的剂量率进行辐照,诱导 DNA 损伤产生。辐照结束后将线虫转移到新鲜的含有 OP50 的 NGM 板上,放置在 20 $^{\circ}$ C 培养箱中避光培养。用于后续胚胎致死率的检测。

1.6 秀丽隐杆线虫胚胎致死率检测

本研究以秀丽隐杆线虫的胚胎致死率作为检测终点,参照文献[12]的实验方法:用挑虫针挑取 30 条待检测的 L4 期雌雄同体线虫放在含有 OP50 的 3.5 cm 的 NGM 板上单独培养,在体视镜下记录每条线虫第一颗受精卵排出的时间,在培养箱中产卵 24 h 后移走母虫,放回培养箱中孵化 24 h,然后在培养板上加入 40 mmol/L 的 NaN₃ 溶液 30 μ L 对线虫麻醉 5 min。在体视镜下统计出幼虫的数目和未孵化的受精卵的数目,总产卵数等于孵化的幼虫数目和未孵化的受精卵的数目之和,胚胎致死率等于未孵化的受精卵的数目与总产卵数的比值。

1.7 数据统计与分析

本实验所有数据的分析均采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计学差异分析,均采用平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ Standard Deviation)的形式表示。组间差异分析使用双边 *t* 检验的统计学方法,当 *P* 值小于 0.05 时,表示两组数据间具有统计学差异。

2 结果

2.1 DDR 食道球挽救对辐射诱导的线虫胚胎致死的影响

我们首先检测了 γ 辐射对 DDR 食道球挽救品系(BPL1121)胚胎致死的影响。L3 期的秀丽隐杆线虫分别暴露于 0, 10, 20 和 40 Gy 的 γ 辐射。结果如图 1(a)所示,

三个品系的胚胎致死率与辐射剂量呈正相关, BPL1121 的胚胎致死率明显高于 N2 和 *hus-1* 基因突变线虫, 并且 BPL1121 在 20 Gy 时最先达到半数致死量。以 20 Gy 辐照处理为例, *hus-1* 基因突变线虫的胚胎致死率相对于野生型线虫增加了 1.48 倍 ($P < 0.01$), 而 BPL1121 线虫的胚胎致死率相对于 N2 增加了 3.59 倍 ($P < 0.001$), 相对于 *hus-1* 突变体线虫增加了 0.85 倍 ($P < 0.01$)。考虑到稳定转基因线虫过程中, 目的基因的整合是随机的, 为了排除目的基因序列插入位点的影响, 我们检测了 20 Gy γ 辐照诱导 BPL1121 的平行品系 BPL1122 和 BPL1123 的胚胎致死水平。结果如图 1(b) 所示, BPL1122 和

BPL1123 的胚胎致死率相对于 *hus-1* 突变线虫分别增加了 0.78 和 0.63 倍 ($P < 0.01$), 与 BPL1121 表现出相同的趋势。另外, 为了排除 *hus-1* 以及报告基因 *gfp* 食道球过表达本身对胚胎致死的影响, 我们检测了 20 Gy 辐照对 N2、BPL1111、BPL1112、BPL1113、BPL1100 和 BPL1101 的胚胎致死水平, 发现阳性对照品系 BPL1111、BPL1112、BPL1113、BPL1100 与 N2 相比胚胎致死率均没有统计学意义上的差异 ($P > 0.05$) [图 1(c) 和 (d)], 阴性对照品系 BPL1101 与 *hus-1* 突变品系胚胎致死率没有明显的差异 ($P > 0.05$) [图 1(e)], 表明辐射诱导 BPL1121 高胚胎致死主要来自 DDR 的食道球特异性挽救。

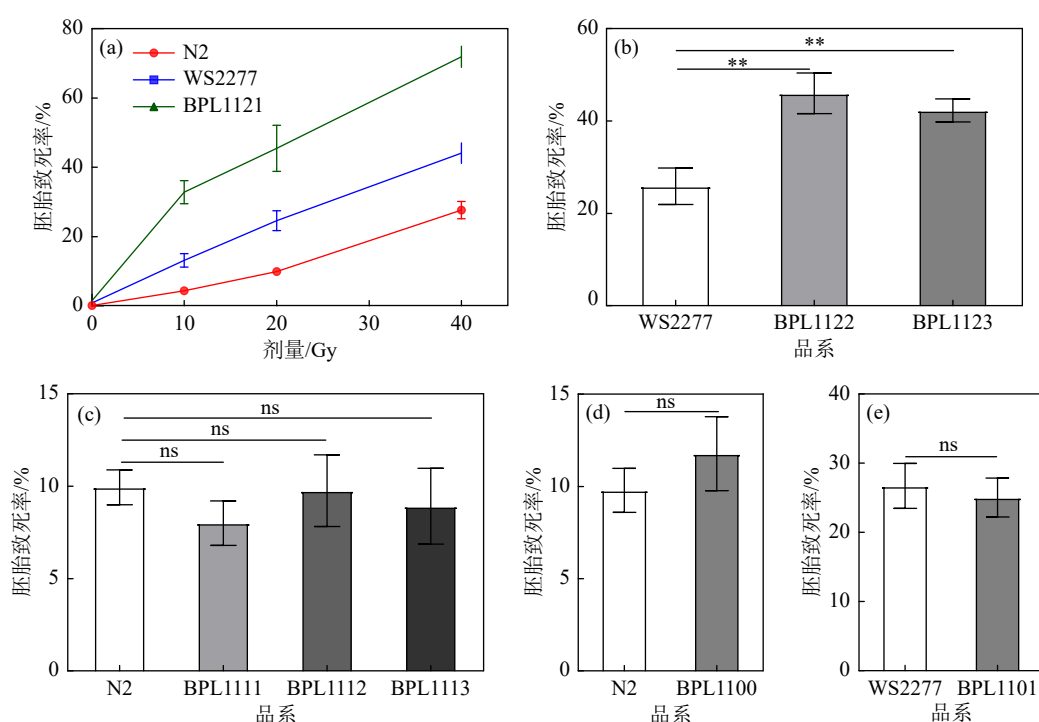


图1 *hus-1* 异位表达增强线虫生殖细胞的辐射敏感性 (在线彩图)

(a) 辐射诱导线虫胚胎致死率的剂量曲线; (b) BPL1121 平行品系的胚胎致死率; (c) *hus-1* 食道球表达品系的胚胎致死率; (d) 野生型背景下食道球表达 *gfp* 的胚胎致死率; (e) *hus-1* 突变背景下食道球表达 *gfp* 的胚胎致死率。**两个品系之间的胚胎致死率差异, $P < 0.01$; ns 两个品系之间的胚胎致死率差异, $P > 0.05$ 。

2.2 DDR 食道球挽救对辐射诱导的线虫胚胎致死的遗传效应

辐射也能诱导基因组不稳定, 在后代中表现出增加的遗传损伤。为了研究 DDR 食道球挽救线虫中辐射诱导胚胎致死的遗传效应, 我们进一步检测了辐照处理 BPL1121 线虫的 F1 代和 F2 代胚胎致死情况。结果如图 2 所示。经 20 Gy γ 射线辐照后, 与 *hus-1* 突变体线虫相比, 辐射当代 BPL1121 线虫的胚胎 (P0) 致死率由 24.72 ± 1.77 增加到 42.66 ± 1.18 ($P < 0.01$), F1 代 BPL1121 线虫的胚胎致死率由 1.55 ± 0.18 增加到 4.71 ± 0.63 ($P < 0.01$), F2 代 BPL1121 线虫的胚胎致死率恢复到了未辐

照时的水平。上述研究结果表明, γ 射线辐照 DDR 食道球挽救线虫 BPL1121 可能使辐照当代生殖细胞的遗传物质发生了突变, 使 F1 代表现出类似于辐照当代的生物学效应。已有的研究表明, 当代生物体暴露于环境胁迫后可以产生跨代遗传效应。关于 DNA 损伤突变的跨代遗传效应目前主要解释为辐射或其它胁迫引起的基因组不稳定性。现有的报道中, 跨代遗传效应大多可以持续 3~5 代。图 2 显示, 在三个品系中, F1 代的胚胎致死率相对于 P0 代均有明显的降低, F2 代已恢复到了未辐照时的水平, 说明在我们的实验条件下, 基因组不稳定只持续了 1 代, 这可能也是 DDR 异质性的一个特点,

相关详细的机制还有待进一步的研究。

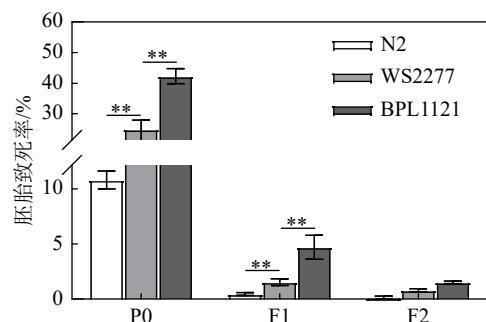


图2 *hus-1* 食道球挽救对辐射诱导的线虫胚胎致死的遗传效应

**两个品系之间的胚胎致死率差异, $P < 0.01$ 。

2.3 CPR-4 不参与 *hus-1* 食道球挽救线虫 DDR 的远程调控

2017年,清华大学薛定教授课题组发现了线虫中第一个参与辐射旁效应的因子—人类组织蛋白酶B的同源物 *cpr-4*。*cpr-4* 是紫外线或电离 γ 射线作用于线虫时分泌的,也是条件培养基中导致细胞死亡和未辐照线虫中胚胎致死的主要原因,他们认为 *cpr-4* 可能是通过类胰岛素样生长因子受体 *daf-2* 来介导辐射旁效应的^[13]。基于此,我们选择 BPL1121 的雄虫作为杂交父本, *cpr-4* 基因突变的线虫品系 RB2473 作为杂交母本,利用聚合酶链式反应 PCR 的方法筛选出杂交纯和突变体,将 BPL1121 构建在 *cpr-4* 突变(RB2473)背景下,根据 CGC 授权的实验室代码将 BPL1121 引入 *cpr-4* 突变背景的线虫品系命名为 BPL1131:*Pmyo-2::hus-1::gfp;cpr-4(ok3413)* V。相关线虫品系经 20 Gy γ 射线辐照处理后, *cpr-4* 突变体线虫的胚胎致死率与 N2 相比增加了 0.63 倍 ($P < 0.05$), DDR 食道球挽救品系 BPL1121 的胚胎致死率与 *cpr-4* 突变体相比增加了 1.88 倍 ($P < 0.001$),与 *cpr-4* 突变背景下 DDR 食道球挽救品系 BPL1131 相比胚胎致死率没有统计学意义的差异 ($P > 0.05$)(图 3)。上述研究结果表明, *cpr-4* 没有参与 DDR 食道球特异挽救对辐射诱导的线虫胚胎致死的影响。

2.4 类胰岛素通路参与 *hus-1* 食道球挽救线虫 DDR 远程调控

接下来,我们选择 BPL1121 的雄虫作为杂交父本, *daf-2* 基因突变的线虫品系 CB1370 作为杂交母本,利用 PCR 的方法筛选出杂交纯和突变体,将 BPL1121 构建在 *daf-2* 突变(CB1370)背景下,根据 CGC 授权的实验室代码将 BPL1121 引入 *daf-2* 突变背景的线虫品系命名为 BPL1141:*Pmyo-2::hus-1::gfp;daf-2(e1370)III*。相关线虫品系经 20 Gy γ 射线辐照处理后, *daf-2* 突变体线虫

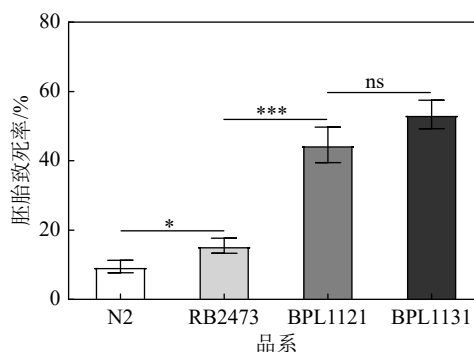


图3 *cpr-4* 不参与 *hus-1* 食道球挽救对线虫生殖细胞辐射敏感性的调控

* 两个品系之间的胚胎致死率差异, $P < 0.05$; *** 两个品系之间的胚胎致死率差异, $P < 0.001$; ns 两个品系之间的胚胎致死率差异, $P > 0.05$ 。

的胚胎致死率与 N2 相比增加了 0.46 倍 ($P < 0.05$), DDR 食道球挽救品系 BPL1121 的胚胎致死率与 *daf-2* 突变体相比增加了 2.21 倍 ($P < 0.001$),与 *daf-2* 突变背景下 DDR 食道球挽救品系 BPL1141 相比增加了 0.40 倍 ($P < 0.05$)(图 4)。上述研究结果表明, *daf-2* 参与了 DDR 食道球特异挽救对辐射诱导的线虫胚胎致死的影响。

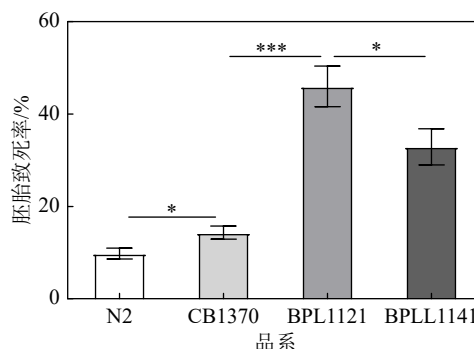


图4 *daf-2* 参与 *hus-1* 食道球挽救对线虫生殖细胞辐射敏感性的调控

*, ***分别表示两个品系之间的胚胎致死率差异 $P < 0.05$ 、 $P < 0.001$ 。

3 讨论

一个细胞的 DNA 每天都发生上万次的损伤,包括碱基损伤(Base Damage, BD)、单链断裂(Single-strand breakage, SSB)、链间交联(Interstrand cross-linking, ICL)和 DNA 双链断裂(Double-strand breakage, DSB)等^[14]。为了应对这些损伤,生命体进化了高度复杂的 DDR 机制。由于 DDR 在维持基因组稳定中的关键作用,它的许多组分都是重要的肿瘤抑制因子。然而,构成生命体的各种细胞具有不同分化程度和功能,这也就决定了在受到遗传毒剂胁迫时,它们中的 DDR 具有不同的激活特性,而身体 DDR 的这种异质性会如何影响遗传毒剂以及辐射的生物学效应,一直是一个有待解决的科学问

题。在本研究中,我们建立了一个DDR食道球特异挽救线虫品系来模拟DDR的异质性激活的特点。在这个模型中,我们选择食道球作为DDR的挽救组织,主要是基于以下考虑:1)秀丽隐杆线虫身体透明,在光学显微镜下可轻易辨别食道球^[15];2)食道球结构简单且表征良好。食道球由95个细胞组成,其位置和形态已经在超微结构水平上进行了表征^[16];3)食道球发育稳健,在其它组织中发育异常的胚胎仍然可以产生分化的食道球^[17-18];4)具有可靠的在食道球特异表达的基因启动子。更重要的是,DDR通路中的CEP-1/p53在线虫食道球中有微量的活性,说明食道球相对于其它的身体组织(生殖腺除外)有相对高的DDR活性^[19]。因此,在本研究中,我们选择食道球作为DDR的挽救组织是合适的。

生殖细胞中的DNA损伤不能被有效修复和及时清除,通常会导致胚胎致死。因此,DDR通路对线虫胚胎的发育具有保护作用,它的一些关键基因,如*hus-1*等的突变能够增加辐射诱导的线虫胚胎致死^[20]。在目前的研究中,我们的结果也证明了这一点[图1(a)]。然而令人不解的,是DDR在食道球的特异挽救并没有缓解生殖细胞的辐射损伤,反而加剧了胚胎的致死。与身体细胞不同,线虫的生殖细胞具有完善的DDR通路,在其上游包括两个关键的信号级联:Rad9-Rad1-Hus1(9-1-1)-ATR和MRE11/RAD50/NBS1(MRN)-ATM。在我们构建的DDR挽救品系中,食道球具有较强的9-1-1-ATR活性,但没有明显的MRN-ATM活性。然而在生殖细胞中,9-1-1-ATR通路的功能是缺失的,而MRN-ATM具有正常的功能。因此,我们推测:在DDR挽救品系中,食道球的9-1-1-ATR信号级联远程下调了生殖腺MRN-ATM的功能,降低了辐射损伤的修复效率,进而引起了严重的胚胎致死,前期研究也证明9-1-1-ATR可以远程调控线虫身体其它组织的ATM通路的活性^[21]。

CPR-4作为人组织蛋白酶B的同源物,已经被证明介导了线虫的辐射旁效应^[13]。为了进一步探究CPR-4在DDR的食道球—生殖腺调控中的角色,我们检测了线虫品系BPL1131的胚胎致死情况,发现*cpr-4*基因突变并不影响BPL1131线虫的胚胎致死,说明CPR-4并没有参与DDR的食道球—生殖腺调控。线虫中的类胰岛素通路与线虫的生长发育、繁殖、寿命、营养代谢和行为等密切相关,同时也参与了线虫对内外源胁迫的响应,*daf-2*是该信号通路上的一个关键基因。为了进一步证明类胰岛素途径是否参与DDR的食道球—生殖腺调控,我们检测了线虫BPL1141品系,发现*daf-2*基因

突变明显降低了线虫BPL1141的胚胎致死率,说明线虫食道球9-1-1-ATR通过类胰岛素通路远程负调控了生殖细胞的MRN-ATM,但其具体的作用机制尚待进一步深入研究。

总的来讲,在本研究中,我们利用线虫DDR特异挽救品系,初步明确了DDR异质性对辐射生物效应的影响。该研究对肿瘤的治疗也有一定的借鉴意义,例如,在肿瘤微环境中,除了肿瘤细胞外,还包括周围的成纤维细胞、巨噬细胞、免疫细胞和肿瘤血管等。这些细胞在肿瘤细胞的发生、发展和转移的过程中有重要的作用^[22]。众所周知,肿瘤细胞的DDR几乎都存在某种缺陷,但微环境中的其它细胞DDR功能通常是正常的,这表明在肿瘤微环境中DDR的激活也是异质性的。因此,深入研究DDR异质性对辐射效应的影响也能为癌症放疗提供一些新的理论支撑。

参考文献:

- [1] HOEIJMAKERS J H J. *Nature*, 2001, 411: 366.
- [2] WANG Z, ZHAO J, WANG G, et al. *Cancer Research*, 2018, 78(22): 6486.
- [3] REINHARDT H C, SCHUMACHER B. *Trends in Genetics*, 2012, 28(3): 128.
- [4] OU H L, SCHUMACHER B. *Blood*, 2018, 131(5): 488.
- [5] CHOE J H, WATCHMAKER P B, SIMIC M S, et al. *Science Translational Medicine*, 2021, 13(591): eabe7378.
- [6] GUPTA B P, REZAI P. *Micromachines*, 2016, 7(7): 127.
- [7] SU Chunming. The Establishment and Application of *C. Elegans* Neuron-specific Expression System[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2014. (in chinese)
(苏春明. 线虫神经元特异性表达体系的建立与应用[D]. 武汉: 华中科技大学, 2014.)
- [8] MILLER D M, ORTIZ I, BERLINER G C, et al. *Cell*, 1983, 34(2): 477.
- [9] ARDIZZI J P, EPSTEIN H F. *Journal of Cell Biology*, 1987, 105(6): 2763.
- [10] VERMEZOVIC J, STERGIOU L, HENGARTNER M O, et al. *Cell Death & Differ*, 2012, 19(11): 1847.
- [11] WANG Jiangling, ZHANG Jiancheng, GU Jianfeng. *Plant Quarantine*, 2011, 25(2): 32. (in Chinese)
(王江岭, 张建成, 顾建锋. 植物检疫, 2011, 25(2): 32.)
- [12] HOLWAY A H, KIM S H, LA VOLPE A, et al. *Journal of Cell Biology*, 2006, 172(7): 999.
- [13] PENG Y, ZHANG M, ZHENG L, et al. *Nature*, 2017, 547: 458.
- [14] DE BONT R, VAN LAREBEKE N. *Mutagenesis*, 2004, 19(3): 169.
- [15] SULSTON J E, SCHIERENBERG E, WHITE J G, et al. *Developmental Biology*, 1983, 100(1): 64.
- [16] ALBERTSON D G, THOMPSON J N. *Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Sciences*, 1976, 275(938): 299.
- [17] AHNN J, FIRE A. *Genetics*, 1994, 137(2): 483.
- [18] BAUM P D, GARRIGA G. *Neuron*, 1997, 19(1): 51.

- [19] TANG H Q, CHEN L W, LIU J L, et al. *Radiation Research*, 2016, 185(4): 402.
- [20] CHEN Liangwen. The Interaction of Radiation-induced Bystander Effects and Adaptive Responses Mediated by Volatile Pheromones in *Caenorhabditis Elegans*[D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2018. (in Chinese)
(陈亮稳. 秀丽隐杆线虫挥发性信息素介导辐射旁效应和适应性反应偶联过程和机制研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2018.)
- [21] DAI Z Y, ZHANG W J, SHANG M K, et al. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(14): 7544.
- [22] YANG Fang, YU Yan. *Chinese Journal of Lung Cancer*, 2015, 18(1): 48. (in Chinese)
(杨芳, 于雁. 中国肺癌杂志, 2015, 18(1): 48.)

Studies on Effect and Its Related Mechanism of Pharynx-specific Rescue of DDR on Radiation-induced Embryonic Lethality in *Caenorhabditis Elegans*

SHANG Mengke¹, DAI Zhangyu², ZHANG Wenjing², BIAN Po^{2,3}, WANG Ting^{2,3,†}, WU Lijun^{1,†}

(1. Institutes of Physical Science and Information Technology Anhui University, Hefei 230601, China;

2. Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China;

3. School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract: DNA damage response (DDR) is one of the main mechanisms, by which life counters against exogenous and endogenous oxidative stress induced DNA damage. In an organism, the DDR in different cells and tissues has various levels of activation. Using the model organism *Caenorhabditis elegans* as experimental objects, we constructed a transgenic line for the pharynx-specific expression of *hus-1* gene, upstream of the DDR pathway, and then introduced into *hus-1* mutation background, generating DDR pharynx-specific rescue lines BPL1121, BPL1122 and BPL1123. The experimental system was used to detect the effect of DDR pharynx rescue on the embryos lethality of γ radiation induced and investigate the effects of heterogeneous activation of DDR on radiation biological effects and its underlying mechanisms. Results showed that the embryonic lethality of irradiated BPL1121 worms increased from 24.72 ± 1.77 to 42.66 ± 1.18 ($P < 0.01$) compared with *hus-1* mutant worms, this enhancement continued up to the intact F1 progeny of non-irradiated worms ($P < 0.01$), although F2 progeny return to background levels ($P > 0.05$). The insulin-like pathway in nematodes is closely related to the growth, development and reproduction behaviors of nematodes, and *daf-2* is a key gene in this signaling pathway. Introducing BPL1121 into the background of *daf-2* mutation, it was found that DAF-2 functional loss significantly inhibited the embryonic radiation lethality of BPL1121 worms. The heterogeneous activation of DDR in pharynx increases the radiation sensitivity of germ cells, and the insulin-like pathway participates in the remote regulation of pharyngeal DDR to radio-sensitivity of germ cells.

Key words: DDR heterogeneous; tissue-specific rescue; *Caenorhabditis elegans*; embryonic lethality; DNA damage response

Received date: 12 May 2022; Revised date: 15 Jun. 2022

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(12075275)

† Corresponding author: WANG Ting, E-mail: wangting@ahmu.edu.cn; WU Lijun, E-mail: ljw@ipp.ac.cn