

电离辐射对 EL-4 细胞的 p53 蛋白及其下游基因 MDM2 mRNA 和蛋白表达的影响 *

傅海青 罗 灿 傅士波 鞠桂芝

(白求恩医科大学卫生部放射生物学重点实验室 长春 130021)

摘要 采用流式细胞术和 Northern blot 杂交检测了 X 射线照射后 EL-4 细胞中 p53 蛋白及其下游基因 MDM2 mRNA 和蛋白表达的变化,以探讨 X 射线照射诱导 EL-4 细胞 G₁ 期阻滞的分子机制。结果表明:经 4Gy X 射线照射后的 EL-4 细胞, p53 蛋白表达在照射后 2h 增高, 4h 达峰值,持续至照射后 24h ($p < 0.05 \sim 0.001$); MDM2 蛋白的表达在照射后 4~24h 明显升高 ($p < 0.05 \sim 0.01$)。进一步观察 X 射线照射后 MDM2 mRNA 水平的时程变化后发现,在经 4Gy X 射线照射后的 EL-4 细胞中, MDM2 mRNA 水平在照射后 1~8h 有增高趋势,其中, 2h 明显升高 ($p < 0.01$)。结果表明, X 射线照射 EL-4 细胞可通过 p53 蛋白诱导 MDM2 蛋白表达,从而限制 G₁ 期阻滞的时间,使 DNA 损伤修复后的细胞重新进入细胞周期。

关键词 电离辐射, EL-4 细胞, MDM2, p53

中图分类号 R81, Q52, Q786

X 射线照射可一次性诱导细胞 G₁ 期阻滞,其机制是目前放射生物学界研究的热点。作为转录因子的 p53 蛋白可诱导 MDM2 基因的转录,MDM2 蛋白反过来通过蛋白与蛋白之间的相互作用与 p53 蛋白结合来阻止 p53 蛋白的转录激活功能,形成一个“负反馈环”^[1,2]。因此,MDM2 的正常功能是限制 G₁ 期阻滞的时间,使 DNA 损伤修复后的细胞重新进入细胞周期。本工作观察了电离辐射对 EL-4 细胞的 p53 蛋白及其下游基因 MDM2 mRNA 和蛋白表达的影响,以探讨电离辐射诱导 EL-4 细胞 G₁ 期阻滞的分子机制。

1 材 料 和 方 法

1.1 细胞株及照射条件

EL-4 为小鼠淋巴瘤细胞,白求恩医科大学卫生部放射生物学重点实验室保存。用 Philips 深部 X 射线治疗机照射,电压 200kV,电流 10mA,滤板 0.5mmCu,1.0mmAl,剂量率分别为 0.0125Gy/min 和 0.287Gy/min,靶皮距分别为 212cm 和 50cm。检测 4Gy X 射线照射后 1、2、4、8、12、24、48h,EL-4 细胞 p53 蛋白表达和 MDM2 mRNA 水平及蛋白表达的变化。同时设假照射对照组。

* 国家自然科学基金资助 (39770193)

收稿日期:初稿 1999-11-16,修回 2000-02-14

1.2 蛋白表达测定

荧光标记, FACSscan 流式细胞仪检测 p53 和 MDM2 蛋白表达的变化。将 75% 冷乙醇中固定的胸腺单细胞悬液 (1×10^6 个细胞) 用 PBS 洗涤 2 次, 除去乙醇, 每份样品加入第一抗体 $50 \mu\text{L}$, (1:50 稀释), 4°C 反应 45min, PBS 洗涤 2 次, 加第二抗体 $50 \mu\text{L}$ (1:100 稀释), 4°C 反应 45min, PBS 洗涤 2 次, 加 PBS $500 \mu\text{L}$, 进行流式细胞仪检测。平行样 5 份。每一样品均设非特异对照, 即用 PBS 代替第一抗体, 其余步骤同上。用 FACSscan 软件收集细胞, Lysis 软件分析处理数据, 结果用特异阳性细胞百分率表示, 抗体均为用前新配制。

1.3 RNA 印迹法

总 RNA 提取方法见文献 [3]。取 2×10^6 个细胞, PBS 洗 2 次, 去上清, 弹起细胞, 加入 0.6 mL 异硫氰酸胍裂解液, 迅速混匀, 加 0.1 体积乙酸钠 (pH4.0), 混匀, 加入等体水饱和酚, 混匀, 再加 0.3 体积 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{ISA}$ (49:1), 充分振荡混匀后, 4°C 放置 15min。 4°C 12000 r/min 离心 20min, 小心吸取上层水相置于另一 1.5 mL 离心中, 加入等体积异丙醇, 混匀, -20°C 沉淀 RNA 至少 30min。 4°C 12000 r/min 离心 15min, 弃上清, 沉淀干燥后溶于 $40 \mu\text{L}$ 无 RNase 水, 紫外分光光度计测定 RNA 纯度及含量, -70°C 贮存, 待用。转膜、杂交、洗膜见文献 [4]。采用随机引物法标记探针, 详细流程见厂家说明书。用 Phosphor Imager 同位素标记激光扫描成像仪检测杂交带的平均灰度, 结果用特异探针杂交带与 GAPDH 探针杂交带平均灰度的比值表示。

2 结果

2.1 X 射线照射后 EL-4 细胞 p53 和 MDM2 蛋白表达的变化

采用单克隆抗体免疫荧光染色, 流式细胞术检测, 观察经 4 Gy X 射线照射后 2、4、8、12、24h, EL-4 细胞 p53 和 MDM2 蛋白表达的变化 (见表 1)。表 1 结果表明, 经 4 Gy X 射线照射后的 EL-4 细胞, p53 蛋白表达在照射后 2h 增高, 4h 达峰值, 持续至照射后 24h ($p < 0.05 \sim p < 0.001$); MDM2 蛋白的表达在照射后 4~24h 明显升高 ($p < 0.05 \sim p < 0.01$)。

Tab.1 Changes of protein expression in EL-4 cells at different time intervals after 4 Gy X-rays

Time after irradiation /h	Positive cell percentage/%	
	p53	MDM2
Sham-irradiation	11.96 ± 3.42	26.02 ± 7.05
2	$22.43 \pm 7.54^{(1)}$	35.75 ± 9.15
4	$22.19 \pm 6.52^{(1)}$	$42.48 \pm 4.7^{(2)}$
8	$16.46 \pm 2.07^{(1)}$	$35.85 \pm 5.5^{(1)}$
12	$21.78 \pm 1.22^{(3)}$	$42.85 \pm 5.5^{(2)}$
24	$17.38 \pm 1.22^{(1)}$	$36.66 \pm 6.26^{(1)}$

$\bar{x} \pm s$, $n=5$ $^{(1)}p < 0.05$, $^{(2)}p < 0.01$, $^{(3)}p < 0.001$ vs sham-irradiation

2.2 X 射线照射后 EL-4 细胞 MDM2 基因 mRNA 水平的变化

采用 RNA 印迹法 (Northern blot) 法观察 X 射线照射后 MDM2 mRNA 水平的时程变化。结果见图 1, 生理状态下 EL-4 细胞中 MDM2 基因的转录水平较低, 经 4 Gy X 射线照射后的

EL-4 细胞中, MDM2 mRNA 水平在照射后 1~8h 有增高趋势, 其中, 2h 明显升高 ($p < 0.01$)。

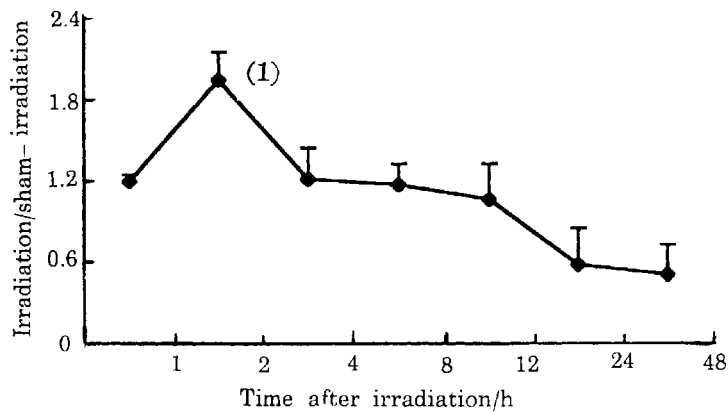


Fig.1 Time course of MDM2 mRNA level El-4 cells after irradiation with 4Gy X-rays
 $n = 3, ^{(1)}p < 0.01$, vs sham-irradiation

3 讨论

MDM2(murine double minute 2) 最初是在一种可致瘤的小鼠成纤维细胞中发现的, 它含有双微体基因扩增的细胞遗传学标志, 在人体和小鼠正常组织中有广泛的表达, 提示它可能与细胞的基本生理过程有密切关系。p53 蛋白通过结合于 MDM2 基因第一内含子区的 p53 蛋白共有序列而调节 MDM2 基因的转录, 其蛋白产物 MDM2 蛋白反过来又可通过蛋白与蛋白间的相互作用结合到 p53 蛋白的氨基末端, 从而使 p53 蛋白失去转录因子活性, 限制其对下游基因 WAF1 及 GADD45 等转录的调节功能。电离辐射作用后, p53 功能的激活及其调节的下游基因的转录是辐射诱导 G_1 期阻滞的重要分子通路。而 MDM2 蛋白与 p53 蛋白的作用则可形成一个“负反馈环”, 限制了 G_1 期阻滞的时间, 使 DNA 损伤修复后的细胞再进细胞周期 [1,2]。

实验结果表明, 经 4Gy X 射线照射后的 EL-4 细胞, p53 蛋白表达在照射后 2h 增高, 4h 达峰值, 持续至照射后 24h; MDM2 蛋白的表达在照射后 4~24h 明显升高。同时发现, 在经 4Gy X 射线照射后的 EL-4 细胞中, MDM2 mRNA 水平在照射后 1~8h 有增高趋势, 其中, 2h 明显升高。以上结果表明, X 射线照射可诱导 EL-4 细胞 p53 蛋白表达, 进而诱导其下游基因 WAF1、GADD45 和 MDM2 等转录, 其蛋白表达产物 p21、GADD45 可诱导 EL-4 细胞的 G_1 期阻滞, 使 DNA 损伤得以修复 (白求恩医科大学卫生部放射生物学重点实验室待发表材料)。而 MDM2 的蛋白表达产物则通过蛋白与蛋白间的相互作用结合到 p53 蛋白的氨基末端来阻止 p53 蛋白的转录激活功能, 进而阻止其下游基因的转录和表达, 形成一个“负反馈环”, 从而限制 G_1 期阻滞的时间, 使 DNA 损伤修复后的细胞重新进入细胞周期, 与文献 [5~7] 报道一致。

参 考 文 献

- 1 Oliner J D, Diatenpol J A, Thiagalingam S *et al.* *Nature*, 1993, **362**:857-860
- 2 Chen C Y, Oliner J D, Zhan Q *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**:2684-2688
- 3 Chomczynski P, Sacchi N. *Anal Biochem*, 1987, **162**:150-159
- 4 Shambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* *Molecular cloning, a Laboratory manual*, 2nd ed, New York: CSH, 1989, 362-371
- 5 Chin P L, Momand J, Pfeifer G P. *Oncogene*, 1997, **15**:87-99
- 6 Bac I, Fan S, Bhatiak *et al.* *Cancer Res*, 1995, **55**:2387-2393
- 7 Bac I, Smith M S, Zhan Q *et al.* *Cancer Res*, 1996, **56**:840-847

EFFECT OF IONIZING RADIATION ON p53 AND MDM2 GENE EXPRESSIONS OF EL-4 CELLS

FU Haiqing LUO Can FU Shibo JU Guizhi

(*MH Radiobiology Research Unit, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021*)

ABSTRACT To explore the molecular mechanism of G₁ arrest of EL-4 cells induced by whole body irradiation (WBI), Flow cytometry (FCM) and Northern blot were used to analyze p53, MDM2 gene expressions of EL-4 cells after irradiation with X-rays. Results showed that the p53 protein level of EL-4 cells increased from 2 to 24h, and the MDM2 protein level of EL-4 increased from 4 to 24h after 4Gy irradiation with X-rays. Meanwhile, the MDM2 mRNA level was significantly increased at 4h after irradiation. Conclusion: these results suggested that there was a feedback loop between p53 and MDM2 protein in EL-4 cells after irradiation with X-rays, which made G₁ arrest cells reenter cell cycle.

KEYWORDS Ionizing radiation, EL-4 cells, MDM2, p53

CLC R81, Q52, Q786