

·研究简报·

电离辐射诱导 EL-4 淋巴瘤细胞 G₁ 期阻滞及相关蛋白的表达

鞠桂芝 傅海青 罗 灿 傅士波

(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 探讨 X 射线诱导 EL-4 细胞 G₁ 期阻滞及相关蛋白的表达。采用 PI 荧光标记, 流式细胞术检测细胞周期的变化。用单克隆抗体免疫荧光标记, 流式细胞术检测蛋白表达的变化。结果表明, 2.0Gy 和 4.0Gy 照射后 12-72h, G₁ 期 EL-4 细胞百分数显著高于假照射组 ($p < 0.05 - p < 0.001$)。4.0Gy 照射后 EL-4 细胞 p53 蛋白表达从照射后 2h 开始明显增高, 持续至照射后 24h ($p < 0.05 - p < 0.001$); p21 蛋白表达在照射后 2h 开始明显增高, 持续至照射后 48h ($p < 0.05 - p < 0.001$); GADD45 蛋白表达在照射后 2h 开始明显增高, 持续至照射后 48h ($p < 0.05 - p < 0.001$); MDM2 蛋白表达在照射后 4h 开始明显增高, 持续至照射后 24h ($p < 0.05 - p < 0.001$)。结果提示, 中等剂量 X 射线照射可诱导 EL-4 细胞 G₁ 期阻滞。p53、p21 和 GADD45 蛋白表达在电离辐射诱导 EL-4 细胞 G₁ 期阻滞中起重要作用。

关键词 电离辐射, G₁ 期阻滞, 蛋白表达

中图分类号 R811, Q786

电离辐射对细胞周期进程的影响深受放射生物学界的关注。早在 30 年前 Little^[1] 就报道了 γ 射线能诱导细胞 G₁ 期阻滞。近年来, 随着分子生物学研究的进展, 对 G₁ 期阻滞基因及分子调控的研究进展迅速。1991 年, Kastan^[2] 等发现 X 射线诱导细胞 G₁ 期阻滞伴有 p53 蛋白的堆积。此后, 研究者们对不同种类细胞进行研究, 其结果尚存争议。本文对 X 射线诱导 EL-4 淋巴瘤细胞 G₁ 阻滞及相关蛋白的表达进行了探讨。

1 材 料 和 方 法

1.1 细胞株

EL-4 细胞系为小鼠淋巴瘤细胞, 白求恩医科大学卫生部放射生物学重点实验室保存。

1.2 主要试剂

碘化丙啶 (propidium iodide, PI, Sigma, 美国)。第一抗体: p53 单克隆抗体 (mouse anti-p53, Neomarker, 美国); p21 多克隆抗体 (rabbit anti-p21, Santa Cruz, 美国); GADD45 多克隆抗体 (rabbit anti-GADD45, Santa Cruz, 美国); MDM2 单克隆抗体 (mouse anti-MDM2, Santa Cruz, 美国)。

国家自然科学基金 (39770193) 资助

第一作者: 鞠桂芝, 女, 1942 年 3 月出生, 吉林医科大学毕业, 教授, 放射医学专业

收稿日期: 初稿 2000-04-03, 修回 2000-06-28

Gruz, 美国)。第二抗体: 羊抗鼠 IgG-FITC (Goat anti-mouse IgG-FITC, Jackson, 美国); 羊抗兔 IgG-FITC (Goat anti-rabbit IgG-FITC, Jackson, 美国)。

1.3 照射条件

Philips 深部 X 射线机, 电压 200kV, 电流 10mA, 滤板 0.5mm Cu, 1.0mm Al, 剂量率 0.287Gy/min, 靶皮距 50cm。同时设假照射对照组。观察 2.0Gy 和 4.0Gy 单次照射后 EL-4 细胞周期的变化, 以及 4.0 Gy 照射后 0、2、4、8、12、24 和 48h, p53、p21、GADD45 及 MDM2 蛋白表达的变化。

1.4 细胞周期测定

采用 PI 染色, FACScan 流式细胞仪 (美国 BD 公司) 进行细胞周期测定。用 Cellfit 软件收取细胞 (每份样品收取 1×10^4 个细胞), 并分析细胞周期。结果以细胞周期各时相细胞百分比表示。

1.5 蛋白表达测定

荧光探针标记, FACScan 流式细胞仪检测各种蛋白表达的变化。将 75% 冷乙醇中固定的 EL-4 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 $500 \mu\text{L}$, 行流式细胞仪检测。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 FACScan 软件收集细胞, Lysis 软件分析处理数据, 记录阳性细胞百分率, 减去非特异对照值, 得出特异阳性细胞百分率。抗体均在使用前新配制。

1.6 统计学处理

采用 student's *t* 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 X 射线照射诱导 EL-4 细胞 G_1 期阻滞

采用 PI 染色, 流式细胞术检测细胞周期, 观察 2.0Gy 和 4.0Gy X 射线照射后 12、24、48、72h, EL-4 细胞周期的变化, 结果见图 1。由图 1 可见, 2.0Gy 照射后 12-72h, G_1 期 EL-4 细胞百分数显著高于假照射组 (分别为 $p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, 和 $p < 0.01$); 4.0Gy 照射后 12-72h, G_1 期 EL-4 细胞百分数也显著高于假照射组 (分别为 $p < 0.001$)。

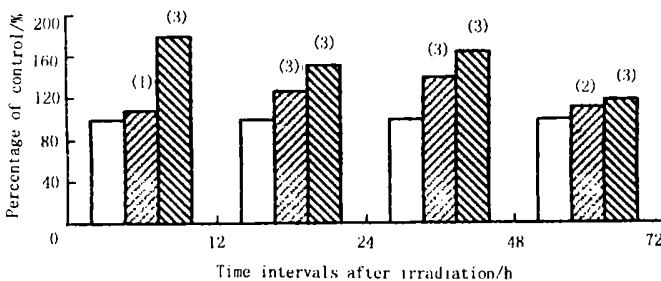


Fig.1 Changes in G_1 phase of EL-4 cells after X-irradiation

□ Sham-irradiation, ▨ 2.0Gy, ▨ 4.0Gy

$n=5$, (1) $p < 0.05$, (2) $p < 0.01$ (3) $p < 0.001$ vs sham-irradiation

以上结果表明, 2.0Gy 及 4.0Gy 照射均可诱导 EL-4 细胞 G₁ 期阻滞。以 4.0Gy 照射后的变化尤为显著。

2.2 X 射线照射后 EL-4 细胞 p53、p21、GADD45 和 MDM2 蛋白表达的变化

采用单克隆抗体免疫荧光标记、流式细胞术检测观察 4.0Gy 照射后 0-48h EL-4 细胞 p53、p21、GADD45 及 MDM2 蛋白表达的变化, 结果见表 1。由表 1 可见, 4.0Gy 照射后 EL-4 细胞 p53 蛋白表达从照射后 2h 开始明显增高, 持续至照射后 24h ($p < 0.05 - p < 0.001$); p21 蛋白表达在照射后 2h 开始明显增高, 持续至照射后 48h ($p < 0.05 - p < 0.001$); GADD45 蛋白表达在照射后 2h 开始明显增高, 持续至照射后 48h ($p < 0.05 - p < 0.001$); MDM2 蛋白表达在照射后 4h 开始明显增高, 持续至照射后 24h ($p < 0.05 - p < 0.01$)。

Tab.1 Expressions of relative proteins in EL-4 cells after 4.0Gy

X-irradiation in vitro		($\bar{x} \pm s$)			%
Time after irradiation/h	p53	p21	GADD45	MDM2	
0	11.96±3.42	6.70±4.05	25.64±3.47	26.02±7.05	
2	22.43±7.54 ⁽¹⁾	25.84±5.38 ⁽³⁾	38.26±4.27 ⁽³⁾	35.75±9.15	
4	22.19±6.52 ⁽¹⁾	23.04±4.50 ⁽³⁾	36.04±4.38 ⁽²⁾	42.48±4.70 ⁽²⁾	
8	16.46±2.07 ⁽¹⁾	12.38±3.81 ⁽¹⁾	21.97±7.57	35.85±5.50 ⁽¹⁾	
12	21.78±1.22 ⁽³⁾	18.34±1.40 ⁽³⁾	36.25±5.33 ⁽²⁾	42.85±6.29 ⁽²⁾	
24	17.38±1.22 ⁽¹⁾	16.04±1.96 ⁽²⁾	36.66±6.26 ⁽¹⁾	36.66±6.26 ⁽¹⁾	
48	-	13.48±3.80 ⁽¹⁾	36.58±4.36 ⁽²⁾		

$n=5$, ⁽¹⁾ $p < 0.05$, ⁽²⁾ $p < 0.01$, ⁽³⁾ $p < 0.001$ vs 0h

3 讨论

近年来, 细胞周期基因调控的研究已经积累了大量资料。细胞周期进程中有 3 个检查点 (checkpoints), 即 G₁ → S、S → G₂、G → M 的过渡。在这 3 个检查点上, 基因及其蛋白产物调控着细胞周期进程。其中 G₁ 检查点 (G₁ checkpoint) 的调控在放射生物学研究中倍受重视。目前多数报道认为哺乳动物细胞中的野生型 p53 蛋白在 G₁ → S 过渡中起关键作用^[3]。电离辐射作为物理性 DNA 损伤因子可激活 p53 基因, 其蛋白产物 p53 蛋白作为转录因子 (transcription factor) 调控其下游基因的转录及表达。p21 蛋白为 p21^{WAF1/CIP1} 基因 (p53 下游基因) 的蛋白产物, 是周期素依赖性蛋白激酶抑制剂, 通过抑制周期素 E 蛋白激酶 2 复合物的形成, 抑制 G₁ → S 过渡。因而, 在辐射诱导 G₁ 期阻滞的发生中起重要作用^[4]。GADD45 蛋白是 GADD45 基因 (p53 下游基因) 的蛋白产物, GADD45 蛋白可与增殖细胞核抗原 (PCNA) 结合, 抑制 DNA 合成, 阻止细胞进入 S 期。因此认为 GADD45 蛋白在调控 G₁ → S 过渡中亦发挥重要作用^[5]。MDM2 蛋白是 MDM2 基因 (p53 下游基因) 的蛋白产物, MDM2 蛋白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, 阻止 p53 蛋白的转录活性, 对 p53 蛋白调控的 G₁ 期阻滞形成负反馈^[6]。因此认为, MDM2 蛋白的正常功能是限制 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。

本实验证实, 2.0Gy 和 4.0GyX 射线照射后 12-72h, EL-4 细胞发生明显的 G₁ 期阻滞。同时观察到 p53、p21、GADD45 蛋白表达在照射后 2h 开始明显增高, 持续至照后 48h。以上蛋白表达与 G₁ 期阻滞的变化在时间上密切相关。MDM2 蛋白表达在照射后 4-24h 显著增高, 其作用为负反馈抑制 p53 蛋白的功能, 从而限制 G₁ 期阻滞的时间。以上结果仅限于

在实验测定时间范围内的结果, 尚需延长时间点进一步观察, 进而阐明 MDM² 蛋白的负反馈作用。这些结果提示, X 射线照射可诱导 EL-4 细胞 G₁ 期阻滞, p53、p21、GADD45 蛋白表达在电离辐射诱导 EL-4 细胞 G₁ 期阻滞中起重要作用。

Bae 等^[7]报道, γ 射线离体照射诱导 Burkitt's 淋巴瘤细胞系 WMN 细胞, 以及成淋巴细胞系 FWL 细胞 G₁ 期阻滞的分子通路为 p53-p21 和 p53-GADD45 两条通路^[7]。而对大多数人黑色素瘤细胞 G₁ 期阻滞只存在 p53-p21 通路^[8]。本实验结果表明, X 射线照射可诱导 EL-4 细胞 G₁ 期阻滞, 其分子通路为 p53-p21 及 p53-GADD45 两条通路, 与 Bae^[7] 报道的分子通路相符。此结果为辐射细胞周期效应研究增加了新的生物学依据。

参 考 文 献

- 1 Little J B. Nature, 1968, 218; 1064-1065
- 2 Kastan M B, Onyekwere O, Sidransky D *et al.* Cancer Res, 1991, 51; 6304-6311
- 3 Gadbois D M, Crissman H A, Nastasi A *et al.* Radiat Res, 1996, 146; 414-424
- 4 Waldman T, Kianzler K W, Vogelstein B. Cancer Res, 1995, 55; 5187-5190
- 5 Smith M L, Chen I, Zhan Q *et al.* Science, 1994, 266; 1376-1380
- 6 Chen G Y, Oliner J D, Zhan Q *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91; 2684-2688
- 7 Eae I, Fan S, Bhatia K *et al.* Cancer Res, 1995, 55; 2387-2393
- 8 Bae I, Smith M S, Zhan Q *et al.* Cancer Res, 1996, 56; 840-847

G₁ ARREST AND THE EXPRESSIONS OF RELATIVE PROTEINS IN EL-4 CELLS INDUCED BY IONIZING RADIATION

JU Guizhi FU Haiqing LUO Can FU Shibo

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

ABSTRACT To investigate G₁ arrest and the expressions of relative proteins in EL-4 cells induced by ionizing radiation, flow cytometry (FCM) was used to analyze cell cycle through staining cells with propidium iodide (PI). And FCM was also employed to analyze protein expression of EL-4 cells stained with monoclonal and polyclonal antibodies for their immunofluorescence. It was found that the number of EL-4 cells in G₁ phase increased significantly 12–72h after X-irradiation with doses of 2.0Gy and 4.0Gy. The results also showed significant increases of p53 protein expression at 2h to 24h ($p < 0.05 - p < 0.001$), p21 protein expression at 2h to 48h ($p < 0.05 - p < 0.001$), GADD45 protein expression at 2h to 48h ($p < 0.05 - p < 0.001$), and MDM² protein expression at 4h to 24h ($p < 0.05 - p < 0.001$) after 4.0Gy X-irradiation. These results suggest that G₁ arrest of EL-4 cells could be induced by ionizing radiation and the expression of p53, p21 and GADD45 proteins may play an important role in the mechanism.

KEYWORDS Ionizing radiation, G₁ arrest, Protein expression

CLC R818, Q786