

X 射线全身照射对小鼠脾细胞 cyclin B₁ 和 cdc2 基因转录水平的影响

叶 飞 刘树铮

(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 Northern blot 杂交法研究了低、高剂量 X 射线全身照射后不同时间小鼠脾细胞 cyclin B₁ 和 cdc2 基因转录水平的变化。结果表明,75mGy X 射线全身照射后 2h 及 12-24h 小鼠脾细胞 cyclin B₁ mRNA 表达量略有升高,分别为假照组的 1.25、1.27 和 1.22 倍,48h 回降至假照水平;而 2.0Gy 照射后 4h 开始下降,12h 降至最低,与假照组相比降低了 39%,48h 恢复至假照组水平。同时观察了 cdc2 mRNA 表达量的变化,结果表明,与假照组相比 75mGy X 射线全身照射后 2-48h 的各时间点小鼠脾细胞 cdc2 mRNA 表达量未见明显变化;而 2.0Gy 照射后的时程变化与相同剂量照射后 cyclin B₁ 的变化基本一致。结果提示:低剂量辐射可诱导小鼠脾细胞 cyclin B₁ 转录水平增高,进而促进其细胞周期进程,但对 cdc2 转录水平无影响;相反,较高剂量辐射可诱导 cyclin B₁ 和 cdc2 转录水平均明显降低,最终发生 G₂ 期阻滞。

关键词 X 射线, 脾细胞, cyclin B₁, cdc2 转录水平

中图分类号 R146, R811, R965

目前对中、高剂量离体照射条件下诱导的 G₂ 期阻滞及其分子调控机制研究较多^[1],但对整体水平全身照射,特别是低剂量全身照射对细胞周期进程及其分子调控的影响目前国内外尚未见报道。已知在分裂的哺乳动物细胞中,Cyclin B₁ 是 G₂/M 转换所必须的,而 Cyclin B₁ 需与 p³⁴cdc2 结合形成复合体,在 G₂→M 期过渡中发挥重要的调节作用。根据我室实验资料证明,低剂量辐射可促进小鼠脾细胞的 DNA 合成与增殖,而较高剂量辐射则诱导其发生 G₂ 期阻滞^[2]。因此,为进一步探讨低、高剂量辐射作用机制的差异,本工作采用 Northern blot 杂交法研究了低、高剂量 X 射线全身照射后不同时间小鼠脾细胞 cyclin B₁ 和 cdc2 基因转录水平的变化。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性昆明系小鼠(由本校实验动物部提供),体重(20±2)g,6-8 周龄。

1.2 照射条件及动物处理

用 Philips 深部 X 射线治疗机进行全身照射,电压 200kV,电流 10mA,滤板 0.5mmCu+1.0mmAl。当照射剂量为 75 mGy 时,靶皮距 212 cm,剂量率 12.5 mGy/min;当照射剂量为 2.0Gy 时,靶皮距 50cm,剂量率 0.288Gy/min。照射后 2、4、12、24、48h 断头处死小鼠,取脾脏并制备成单细胞悬液。

国家自然科学基金(39570188)资助

第一作者:叶飞,女,1968年7月出生,1997年7月毕业于白求恩医科大学,博士,放射生物学专业

收稿日期:初稿 2000-10-24, 修回 2001-02-05

1.3 Northern blot 分子杂交技术探讨脾脏细胞 mRNA 转录水平表达的变化

1.3.1 总 RNA 的提取及质量鉴定 经低、高剂量照射后不同时间收集照射组和假照射组的脾细胞,从 5×10^7 个脾细胞中提取总 RNA,采用异硫氰酸胍法提取之^[3]。然后取 RNA 样品 $10 \mu\text{g}$ 经甲醛变性琼脂糖电泳,以确定提取 RNA 的质量,可见 28S 与 18S 区带清晰集中,28S 与 18S 比值约为 2,表明 RNA 样品未降解。

1.3.2 RNA 甲醛变性琼脂糖电泳 参见《分子克隆》相关章节。

1.3.3 变性 RNA 的转移 将变性 RNA 转移至硝酸纤维素膜 (Amersham 公司, 美国)。

1.3.4 cDNA 探针标记 采用随机引物法标记 DNA 探针,按 Random primer DNA labeling kit (Promega) 说明书要求操作。Cyclin B1 和 cdc2 探针由美国 T. Hunter 博士惠赠。

1.3.5 杂交及激光扫描仪成像 将转有 RNA 样品的硝酸纤维素膜在预杂交液中浸湿,置 42°C 恒温水浴摇床中反应 2—4h, 剪开杂交袋一角,重新加入杂交液(含变性后探针的预杂交液), 42°C 杂交 16—24h。然后分别用 $2 \times \text{SSC}$, $0.5\% \text{SDS}$; $0.5 \times \text{SSC}$, $0.5\% \text{SDS}$; $0.2 \times \text{SSC}$, $0.5\% \text{SDS}$ 和 $0.1 \times \text{SSC}$ 洗膜,将膜封好后放于曝光盒中,于室温下曝光 2—4h 后,用激光扫描仪(PhosphorImager MD, 美国)扫描显像。

1.3.6 结果分析 用激光扫描仪测定杂交带的平均灰度值,GAPDH 基因作为标准内参照物。

2 实验结果

2.1 X 射线全身照射后小鼠脾细胞 cyclin B1 mRNA 表达水平的时程变化

用 Northern blot 杂交法检测了 75mGy 和 2.0Gy 照射后不同时间小鼠脾细胞 cyclin B1 mRNA 表达水平的变化。由表 1 及图 1、2 可见,与假照射组相比, 75mGy 照射后 2h 轻度升高,为假照射组的 1.25 倍,4h 回降至假照水平,12—24h 时再次升高,分别为假照射组的 1.27 和 1.22 倍,48h 降至假照射组水平。 2.0Gy 照射后 4h 开始下降,12h 降至最低,与假照射组相比降低了 39%,48h 恢复至假照射组水平。

Tab.1 Time course of changes in cyclin B1 mRNA level of splenocytes (compared with

GAPDH mRNA expression) after whole body irradiation with 75mGy and 2.0Gy X rays in mice

Time after irradiation /h	75mGy	2.0Gy
Sham—irradiation	1.05	0.73
2	1.31	0.70
4	0.94	0.56
12	1.33	0.44
24	1.28	0.57
48	0.89	0.77

2.2 X 射线全身照射后小鼠脾细胞 cdc2 mRNA 表达水平的时程变化

采用 Northern blot 方法观察了小鼠接受 75mGy 和 2.0Gy 照射后不同时间其脾细胞 cdc2 mRNA 表达量的变化。由表 2 和图 3、4 可知,与假照射组相比, 75mGy 照射后 2—48h 的各时

间点均未见明显变化。2.0Gy 照射后 4h 开始下降, 12h 降至最低, 与假照射组相比降低了 30%, 48h 恢复至假照射组水平。

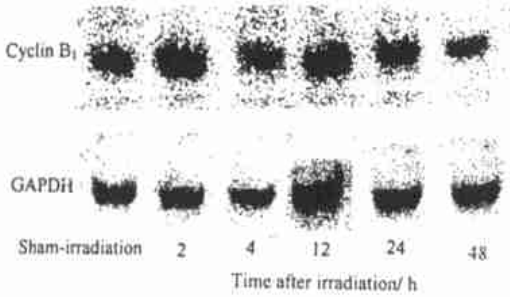


Fig.1 Time course of changes in cyclin B1 mRNA level of splenocytes after whole body irradiation with 75mGy X rays in mice

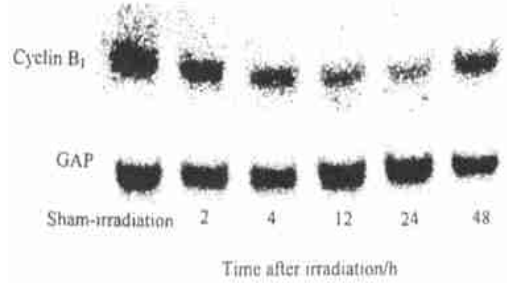


Fig.2 Time course of changes in cyclin B1 mRNA level of splenocytes after wholebody irradiation with 2.0Gy X rays in mice

Tab.2 Time course of changes in cdc2 mRNA level of splenocytes (compared with GAPDH mRNA expression) after whole body irradiation with 75mGy and 2.0Gy X rays in mice

Time after irradiation/h	75mGy	2.0Gy
Sham-irradiation	0.63	0.71
2	0.65	0.68
4	0.67	0.59
12	0.61	0.50
24	0.68	0.61
48	0.62	0.73

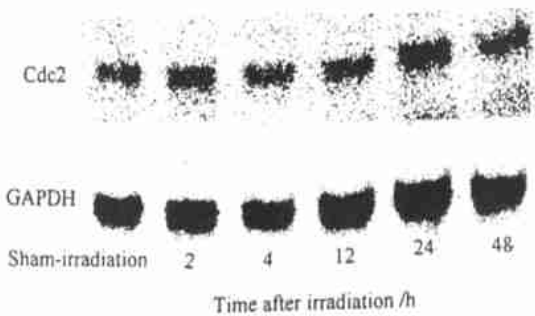


Fig.3 Time course of changes in cdc2 mRNA level of splenocytes after whole body irradiation with 75mGy X rays in mice

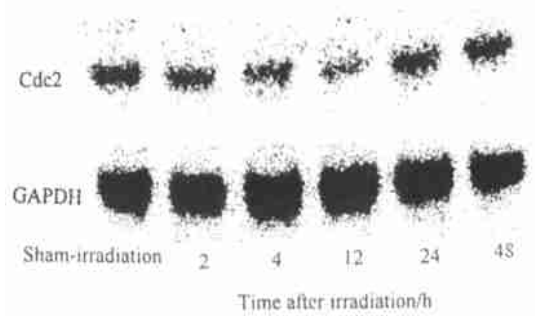


Fig.4 Time course of changes in cdc2 mRNA level of splenocytes after whole body irradiation with 2.0Gy X rays in mice

3 讨论

G₂→M 期过渡是细胞增殖的重要阶段,细胞内 G₂ 期进入 M 期主要受有丝分裂促进因子 (mitosis promoting factor, MPF) 的调节。MPF 是两个蛋白分子的复合体,一是 p^{34cdc2},另一是 Cyclin B₁,因此,有人称 Cyclin B₁ 和 p^{34cdc2} 是 G₂→M 期转换的驱动机器^[4]。

目前关于电离辐射所致的离体培养细胞 G₂ 期阻滞及其基因调控的研究进展较快,确定了辐射诱导的 G₂ 期阻滞主要通过 cyclin B₁/cdc2 调节通路而实现,最近又发现了一种不依赖于 cyclin B₁/cdc2 调节的作用机制,即辐射诱导的 p⁵³ 表达可导致 G₂ 期阻滞^[1]。但这些资料中尚缺乏系统的整体水平研究,特别是低剂量全身照射对细胞周期及其分子调控的研究尚未见报道。本工作采用 Northern blot 杂交法探讨了低、高剂量 X 射线全身照射对小鼠脾细胞 cyclin B₁ 和 cdc2 基因转录表达水平的影响,以期进一步研究低、高剂量辐射作用机制的差异以及低剂量辐射诱导机体免疫功能增强的作用机理。实验结果表明,75mGy X 射线全身照射后小鼠脾细胞 cyclin B₁mRNA 表达的量在照射后 2h 及 12—24h 有所升高,48h 恢复到正常水平;而 2.0Gy 照射后 4h 开始降低,12h 降至最低,48h 恢复到假照水平,这些变化与细胞周期的 G₂ 阻滞的时程变化相对应^[2]。我们采用相同的检测手段和动物模型观察了 cdc2 mRNA 表达量的变化,结果表明:75mGy 照射后的 2—48h 的各时间点均未见 cdc2 mRNA 表达量的明显变化;而 2.0Gy 照射后的时程变化与上述相同剂量照射后 cyclin B₁ mRNA 表达量的变化基本一致。上述实验结果提示:低剂量辐射可诱导 cyclin B₁ mRNA 表达量增强,从而促进细胞周期进程;而低剂量辐射所致细胞周期进程的变化可能与 cdc2 基因转录水平无直接关系。相反,较高剂量 X 射线照射后导致 cyclin B₁ 和 cdc2 基因转录水平均下降,进而使这两种因子的蛋白表达量降低,从而抑制了 MPF 活性,阻止细胞进入有丝分裂期,最终发生 G₂ 期阻滞,由此说明,cyclin B₁ 和 cdc2 基因表达在辐射诱导整体水平发生的 G₂ 期阻滞中起重要作用,提示整体照射和离体照射所致 G₂ 期阻滞可能存在共同的调节通路。

参 考 文 献

- 1 Hwang A, Muschel R J. Radiat Res, 1998, **150** (suppl): 52—59
- 2 叶飞,刘树铮.辐射研究与辐射工艺学报,1999, **17**(2): 111—114
YE F, LIU S Z. J Radiat Res Radiat Process, 1999, **17**(2): 111—114
- 3 Chomczynski P, Sacchi N. Anal Biochem, 1995, **55**: 150—159
- 4 Datta R, Hass R, Gunji H *et al*. Cell Growth Differ, 1992, **3**: 637—644

EFFECTS OF WHOLE BODY IRRADIATION WITH X RAYS ON CYCLIN B₁ AND CDC² TRANSCRIPTION LEVEL OF SPLENOCYTES IN MICE

YE Fei LIU Shuzheng

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

ABSTRACT The changes in cyclin B₁ and cdc² transcription level of splenocytes in mice were observed after WBI with low and high doses of Xrays. The results showed that cyclin B₁ mRNA expression slightly increased at 2h and 12—24h after 75mGy X rays, being 1.25, 1.27 and 1.22 times of sham—irradiated group, returning to sham—irradiated level at 48h. However, cyclin B₁ mRNA began to decrease at 4h after irradiation with 2.0Gy X rays, reaching its lowest level at 12h, with a decrease of 39%, and returning to the level of sham—irradiated control. In addition, we observed the time course of cdc² mRNA expression. The results showed that there were no changes in cdc² mRNA expression at 2—48h after 75mGy WBI, but the time course of cdc² mRNA expression with 2.0Gy WBI was the same as cyclin B₁ after the same dose. The results indicated that low dose irradiation could induce an increase in cyclin B₁ transcription level, accelerating the progression of cell cycle, but did not affect the expression of cdc² gene. In contrast, high dose irradiation could induce the decrease of above two factors, with marked G₂ arrest.

KEYWORDS X rays, Splenocytes, Cyclin B₁, cdc² transcription level

CLC R146, R811, R965