

X射线照射后 EL-4 细胞 p16mRNA 和 P16 蛋白表达的变化

王晓梅¹ 鞠桂芝² 梅树江¹ 付士波² 刘树铮²

¹ (汕头大学医学院生物教研室 汕头 515031)

² (吉林大学卫生部放射生物重点实验室 长春 130021)

摘要 采用 RT-PCR (逆转录聚合酶链反应) 半定量方法检测 p16 基因转录水平的变化, 采用免疫细胞化学方法检测蛋白表达, 观察 X 射线照射对离体培养的 EL-4 细胞 p16 基因转录及蛋白表达的影响, 证实 p16 基因转录表达在辐射诱导 EL-4 细胞 G₁ 期阻滞中的重要作用。结果表明, 2.0Gy X 射线照射后 2—48h, EL-4 细胞 p16mRNA 水平增高, 照射后 72h 恢复正常水平。P16 蛋白表达于照射后 2h 开始增高, 照射后 12h P16 蛋白表达非常显著高于对照组 ($p < 0.01$)。剂量-效应实验表明, 0.5—6.0Gy X 射线照射后 12h, EL-4 细胞 p16mRNA 水平明显提高。2.0、4.0、6.0Gy 组 P16 蛋白表达均非常显著增加 (分别 $p < 0.01$)。研究证实, 电离辐射能够诱导 EL-4 细胞 p16 基因转录及蛋白表达增高, 其增幅呈现明显的剂量依赖性。提示辐射诱导 p16 基因转录表达增加在辐射诱导 EL-4 细胞 G₁ 期阻滞中发挥重要作用。

关键词 X 射线, G₁ 期阻滞, P16 蛋白, p16mRNA

中图分类号 R812, R329.2⁺8, Q813.1⁺1

以往的实验证实电离辐射能够诱导离体培养 EL-4 细胞发生 G₁ 期阻滞^[1], 随后对其发生分子调控机制进行了深入研究。首先发现, G₁ 期阻滞同时伴有 p53 蛋白在核内堆积^[2], 进而证实 P53/p21 细胞周期负向调控通路参与调控 G₁ 期阻滞形成^[3,4]。为进一步揭示 G₁ 期阻滞发生复杂调控机理, 本实验分别采用 RT-PCR 半定量和免疫细胞化学方法检测 X 射线照射后 EL-4 细胞 p16 基因转录和蛋白表达的时程和量效变化, 并分析独立于 p53 通路之外的 p16 表达在 G₁ 期阻滞中的生物意义。

1 材料和方法

1.1 培养细胞

EL-4 鼠淋巴瘤细胞由日本引进。常规传代培养。细胞倍增时间为 14h。

1.2 照射条件

国产 X 射线深部治疗机, 电压 200kV, 电流 10mA, 滤片 0.5mmCu+1.0mmAl, 剂量率 0.3Gy/min, 靶物距 56cm; 照射剂量: 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0Gy。将培养在 10mL 培养瓶中处在对数生长期的 EL-4 细胞, 横放在照射野中心, 进行不同剂量照射。

1.3 半定量 RT-PCR

采用异硫氰酸胍一步法提取总核糖酸 (RNA)。取 1μg 总 RNA 置于 20μL 反转录体系, AMV 反转录酶 10U, 42°C 60min 合成 cDNA, 将 cDNA 95°C 5min 变性后, 4°C 放置。取 cDNA 5μL 作为模板, 置于 50μL 体系中扩增 (同时加入 p16 和 mGAPDH 引物)。条件为 94°C 1min, 56°C 1min, 72°C 1min, 循环 35 圈, 72°C 10min。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳后呈现清晰条带, 以紫外图象扫描仪扫描, 并分析电泳带的平均灰度, 分析结果为特异泳带与 GAPDH 泳带平均灰度的比值。mGAPDH 引物: 5'-TATTTGGGGCGCCGGGTCACCA; 3'-CCACCTTC-TTGATGTCATCA, 扩增片段长度 746bp。P16 引物: 5'-AGGTGATGATGATGGCAACG; 3'-CGAAGTCGAGTTCGTGCGG 扩增片段长度 340bp。

1.4 蛋白表达的测定

调细胞浓度至 1×10^6 /mL, 取 10μL 涂到载玻片上室温晾干。冷丙酮固定 15min, 加 10% 正常羊血清室温封闭 15min, 甩掉血清后加第一抗体 (1:50), 置于湿盒中 4°C 过夜。PBS 浸洗 5min×3 次, 加入生物素化的二抗 IgG (1:200), 37°C, 45min。PBS

国家自然科学基金 (39770193) 资助

第一作者: 王晓梅, 女, 1967 年 2 月出生, 2002 年在吉林大学获博士学位, 放射医学专业, 副教授

收稿日期: 初稿 2003-04-17, 修回 2003-06-06

浸洗 5min×3 次, 加入链亲和素标记的辣根过氧化物酶 (HRP, 1:200), 37°C, 45min。PBS 浸洗 5min×3 次, DAB 室温显色 (6mg DAB+PBS 10ml+6μL 30% H₂O₂) 10min。自来水冲洗后甘油明胶封片。在图象分析仪上计数每张片子 5 个视野中阳性细胞数。

1.5 统计学分析

采用 Student's *t* 检验进行分析。

2 结果

2.1 X 射线照射后 EL-4 细胞 p16mRNA 水平时程和量效变化

各组 EL-4 细胞于照射后即刻计时, 到预定时间从 CO₂ 培养箱中取出, 每个时间点均设一组对照, 每组 3 个平行样, 0.25%胰蛋白酶消化后, 细胞总数约为 1×10⁷, 采用异硫氰酸胍一步法提取总 RNA, RT-PCR 半定量方法检测 p16 基因转录的变化。2.0Gy 照射后 2—72h EL-4 细胞 p16mRNA 水平的时程变化见图 1, 不同剂量照射后 12h 量效变化见图 2。

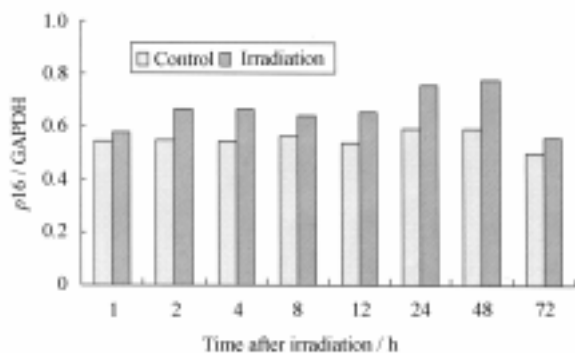


Fig.1 Changes in p16 mRNA level of EL-4 cells after 2.0Gy X-ray irradiation

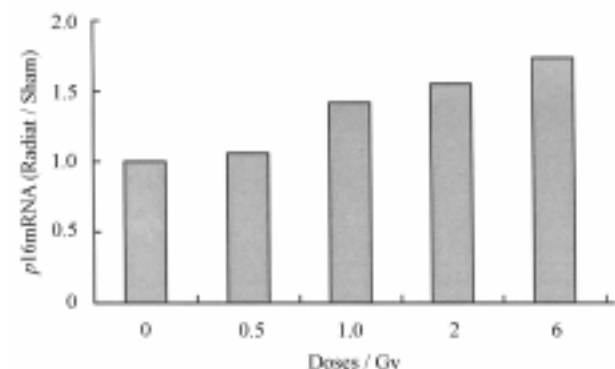


Fig.2 Changes in p16 mRNA level of EL-4 cells at 12h after X-ray irradiation to different doses

结果表明, 2.0Gy X 射线照射后 2h EL-4 细胞 p16 mRNA 水平开始增高, 48h 达到峰值, 照射后 72h 恢复至正常水平。0.5—6.0Gy 照射后 12h EL-4 细胞内 p16 mRNA 水平随着剂量的增加而升高, 6.0Gy 组 p16 mRNA 水平为假照射对照组的 1.74 倍。

2.2 X 射线照射后 EL-4 细胞 P16 蛋白表达的时程和量效变化

EL-4 细胞接受照射后不同时间从 CO₂ 培养箱中取出, 每个时间点均设一组对照, 每组 3 个平行样, 0.25%胰蛋白酶消化后, 离心, 涂片, 采用免疫细胞化学技术检测 EL-4 细胞内 P16 蛋白表达的变化。

2.0Gy 照射后 EL-4 细胞 P16 蛋白表达的时程变化见表 1。不同剂量照射后 12h 量效变化见表 2。从表 1 中可见, 2Gy X 射线照射后 2h P16 蛋白表达开始增加, 12h 达到峰值, 照射后 48h 恢复至正常水平。从表 2 中可见, 不同剂量照射后 12h, EL-4 细胞内 P16 蛋白表达改变呈明显的剂量依赖性。其中 P16 蛋白表达增高在 2.0、4.0 及 6.0Gy 组差异均非常显著 (分别为 $p<0.01$)。

Table 1 Changes in P16 positive cells after irradiation with 2.0Gy X-rays / %

Time after irradiation / h	Control	Radiation
0	25.3±12.0	27.3±4.0
2	25.9±11.0	37.0±7.0
4	30.1±9.5	43.0±1.7
8	34.9±7.7	48.0±7.0
12	33.8±5.8	58.9±3.8 ⁽¹⁾
24	52.3±5.6	71.6±12.7
48	45.3±1.8	37.3±6.6
72	39.2±4.5	42.7±8.9

$\bar{x} \pm s$, $n=3$, ⁽¹⁾ $p<0.01$, vs control group

Table 2 Changes in P16 protein expression of EL-4 cells after X-ray irradiation to different doses

Doses / Gy	Positive cell percentage / %
Sham	33.8±5.8
0.5	41.9±13.0
1.0	43.0±10.0
2.0	58.9±3.8 ⁽¹⁾
4.0	60.0±3.8 ⁽¹⁾
6.0	64.0±6.8 ⁽¹⁾

$\bar{x} \pm s$, $n=3$, ⁽¹⁾ $p<0.01$, vs sham

3 讨论

在细胞周期调控研究中, 人们发现一群低分子蛋白, 它们能够抑制 G₁ 期 CyclinD-CDK 复合体活性, 称为 CDI(CDKs Inhibitors), 属于细胞周期负向调控因子。CDI 通过直接与 CyclinD-CDK 复合物结合, 特异性抑制其活性, 从而阻止细胞进入 S 期。依据它们的结构特征和功能分为两个家族: (1) p16 家族, 包括 p16、p15、p18、p19, 能特异性抑制 CyclinD₁-CDK4 和 CyclinD₁-CDK6 磷酸化酶的活性。 (2) p21 家族, 包括 p21、p27、p57, 它们对 CDK 具有广谱的抑制作用。P21 大部分通过 p53 依

赖性通路发挥其负向调控作用。而 p16 对细胞周期负向调控作用是独立于 p53 之外的, 因它具有 CyclinD box 同源序列, 而和 CyclinD 竞争性结合 CDK4/6, 由此产生的 p16-CDK4/6 复合物不能与 Rb 蛋白结合使其磷酸化, 而非磷酸化 Rb 蛋白则无法释放与之结合的 E2F 等因子, 细胞因此不能进行 DNA 合成而停滞在 G₁ 期。

目前研究已证实中等剂量 X 射线照射后 12h—48h, EL-4 细胞多停滞在 G₁ 期^[4], p53、p21 表达在其发生中起作用^[1,3]。而 p16 在此过程中是否发挥作用尚不清楚。从本实验中发现 2Gy X 射线照射 EL-4 细胞后 2h—48h, p16 mRNA 水平和蛋白表达均不同程度提高。p16 mRNA 水平在照射后 48h 达到峰值, 为对照组的 1.38 倍 (见图 1)。而 p16 蛋白表达在照射后 12h 增加明显 (见表 1), 并随着剂量增加而增加。结果表明, 照射后 EL-4 细胞 p16 表达增加与 G₁ 期阻滞的发生密切相关。本实验结果与 Pavey 等观察 UV 辐射诱导皮肤组织 p16 表达的结果基本一致^[5]。Pavey 等利用体外培养正常皮肤组织^[5], 亚红斑剂量 UV 照射后 16h 皮肤内黑色素细胞和角质细胞胞浆和胞核内 p16 蛋白表达明显增加, 24h 达到峰值, 72h 降低。p16 的增加与 UV 辐射的穿透性有关。Piepkorn 采用亚致死剂量的 UVB 照射体外培养的人正常黑色素细胞^[6], 定量 Western blot 和 Northern blot 方法分别检测照射后 P16 蛋白和 mRNA 水平时程和量效变化。结果表明, 与假照射组相比, UVB 照射后 P16 蛋白水平明显增加, p16 mRNA 水平随受照剂量增加而增高, 最高值超出假照射组 2 倍多。可见 p16 能介导黑色素细胞发生生长阻滞, 这一短暂的生长阻滞可有利于细胞在进入分

裂期前修复 UVB 诱导的 DNA 损伤。我们的实验获得与此实验相似的结果。

综上所述, X 射线照射后 EL-4 细胞内 p16 改变与 X 射线诱导的 G₁ 期阻滞^[4]在时程和量效上均相互依托, 提示 p16 表达增加在电离辐射诱导的 G₁ 期阻滞中起重要作用。其生物学意义可能在于通过永久性的停滞或凋亡, 从有增殖能力的活细胞中清除带有 DNA 损伤的细胞, 保持基因组的稳定性。

参考文献

- 1 鞠桂芝, 傅士波, 刘建香等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1998, **16**(3): 157-160
JU Guizhi, FU Shibo, LIU Jianxiang *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 1998, **16**(3): 157-160
- 2 傅海青, 罗灿, 傅士波等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2000, **18**(3): 208-211
FU Haiqing, LUO Can, FU Shibo *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2000, **18**(3): 208-211
- 3 傅海青, 鞠桂芝, 罗灿等. 中华放射医学与防护杂志, 2000, **20**(6): 385-387
FU Haiqing, JU Guizhi, LUO Can *et al.* Chin J Radiol Med Prot, 2000, **20**(6): 385-387
- 4 鞠桂芝, 傅海青, 罗灿等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2001, **19**(1): 67-70
JU Guizhi, FU Haiqing, LUO Can *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2001, **19**(1): 67-70
- 5 Pavey S, Conroy S, Russell T *et al.* Cancer Res, 1999, **59**(17): 4185-4189
- 6 Piepkorn M. J Am Acad Dermatol, 2000, **42**(5): 741-745

p16 gene transcription and protein expression in EL-4 cells irradiated with X-rays in vitro

WANG Xiaomei¹ JU Guizhi² MEI Shujiang¹ FU Shibo² LIU Shuzheng²

¹(Shantou University Medical College, Shantou 515031)

²(Radiobiology department, Public Health College, Jilin University, Changchun 130021)

ABSTRACT To investigate the effect of ionizing radiation on p16 gene transcription and protein expression in EL-4 cells in vitro, RT-PCR semi-quantity method was applied to determine the p16mRNA level and immunocytochemistry (ICC) was employed to measure the p16 protein expression. The time-course experiments showed that the p16 mRNA level increased at 2—48h in EL-4 cells, and the p16 protein expression increased significantly in EL-4 cells ($p < 0.01$) at 12h after 2.0Gy X-irradiation. The dose-effect experiments showed that the p16mRNA level increased with the dose, and the p16 protein expression increased significantly ($p < 0.01$) with the dose in 2.0 - 6.0Gy range. The results suggested that the increase of p16 gene transcription and protein expression in EL-4 cells might play role in G₁ arrest induced by ionizing radiation in vitro.

KEYWORDS X-rays, G₁ arrest, p16 protein, p16 mRNA

CLC R812, R329.2⁺8, Q813.1⁺1