

整体照射后胸腺细胞和脾细胞 p16 基因转录 和蛋白表达的变化

王晓梅¹ 鞠桂芝² 梅树江¹ 付士波² 刘树² 曲扬²

¹ (汕头大学医学院 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 研究 X 射线全身照射对小鼠胸腺细胞和脾细胞 p16 基因转录及蛋白表达的影响。采用 Northern blot 检测 p16 基因转录水平的变化;采用流式细胞术检测蛋白表达的变化。时程结果表明,2.0Gy 照射后 4—24h,胸腺细胞 p16mRNA 水平明显增高,8—48h P16 蛋白表达显著增高 ($p < 0.05$ — $p < 0.01$);照射后 4—8h 脾细胞 p16mRNA 水平明显增高,24h P16 蛋白表达显著增高 ($p < 0.05$)。量效结果表明,0.5—6.0Gy 照射后,胸腺细胞 p16mRNA 水平呈剂量依赖性增高,P16 蛋白表达在 1.0—4.0Gy 组明显高于假照射组 ($p < 0.05$ — $p < 0.01$);脾细胞 p16mRNA 水平亦增高,但增幅远低于胸腺细胞,P16 蛋白表达在 1.0—4.0Gy 组明显高于假照射组 ($p < 0.05$ — $p < 0.01$)。X 射线全身照射可诱导胸腺细胞和脾细胞 p16 基因转录及蛋白表达增高。p16 表达参与整体照射诱导细胞 G₁ 期阻滞的分子调控。

关键词 X 射线, G₁ 期阻滞, p16

中图分类号 R812, R329.2⁺8, Q691

辐射诱导细胞发生 G₁ 期阻滞,其分子调控机制尚不十分清楚。人们首先发现 G₁ 期阻滞同时伴有 P53 蛋白在核内堆积,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^[1]。近期来研究发现,UV 诱导的细胞生长阻滞引起 P16 蛋白增多^[2],而电离辐射诱导整体细胞 G₁ 期阻滞与 P16 蛋白堆积的相关性尚未见文献报道。本实验分别采用 Northern blot 和流式细胞术检测 X 射线照射后小鼠胸腺细胞和脾细胞 p16 基因转录和蛋白表达的变化,并分析独立于 p53 通路之外的 p16 细胞周期负向调控通路在 G₁ 期阻滞中的生物意义。

1 材料和方法

1.1 动物分组及处理

雄性昆明种小鼠,体重 (20±2)g,吉林大学白求恩医学部实验动物室提供。将动物随机分成假照射组和不同照射组,每组 15 只。时程实验:2Gy 照射后 4、8、12、24、48、72h 检测。量效实验:0.5、1.0、2.0、4.0、6.0Gy 照射后 12h 或 24h。于上述各时间点断头处死小鼠,迅速取胸腺和脾脏,制成单细胞悬液,PBS 洗 2 次后备用。

1.2 照射条件

国产 X 线深部治疗机,电压 200kV,电流 10mA,滤片 0.5mmCu+1.0mmAl,剂量率 0.287Gy/min,靶皮距 56cm;照射剂量:0.5、1.0、2.0、4.0、6.0Gy。

1.3 Northern blot

采用异硫氰酸胍一步法提取总 RNA。方法简述如下:2~10⁷ 个细胞,加入 1mL 异硫氰酸胍裂解液,混匀,加 100μL 乙酸钠 (pH 4.0),混匀,加等体积水饱和酚,混匀,加 200μL CH₂Cl₂/ISA (49:1),混匀,4℃,15min。低温离心 (12000r/min) 10min,小心吸取上层水相置于另一 Eppendorf 管中,加等体积异丙醇,混匀,-20℃沉淀 RNA 至少 30min。低温离心 (12000r/min) 15min,弃上清,加 200μL 75%乙醇沉淀,干燥后溶于 100μL 无 RNase 水中,紫外测 RNA 纯度及含量,-70℃贮存备用。转膜、杂交、洗膜参见常规分子生物学技术。采用随机引物法标记探针,详见厂家说明书。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 杂交带平均灰度的比值表示。

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 2003-05-12,修回 2003-06-24

1.4 蛋白表达的测定

单克隆抗体免疫荧光标记, FACSscan 流式细胞仪检测蛋白表达的变化。单细胞悬液 ($1 \sim 10^6$ 细胞), 75%冷乙醇固定 24h, PBS 洗 2 次, 1200 r/min^{-1} 离心 5min, 除去乙醇。每份样品加入第一抗体 p16 单抗 (鼠 IgG, Santa Cruz, 美国) $50 \mu\text{L}$ (1:50 稀释), 4°C 反应 45min, PBS 洗 2 次, 加第二抗体 (Goat anti-mouse IgG-FITC, Santa Cruz, 美国) $50 \mu\text{L}$ (1:100 稀释), 4°C 反应 45min, PBS 洗 2 次, 加 PBS $500 \mu\text{L}$, 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 FACSscan 软件收集细胞, Lysis 软件分析数据, 结果以阳性细胞百分率表示。抗体均为现用现配。

1.5 统计学分析

采用方差分析进行检验。

2 结果

2.1 2.0Gy 全身照射对胸腺细胞、脾细胞 p16mRNA 水平的影响

2.0Gy X 射线全身照射后 4—72h, 胸腺细胞及脾细胞 p16mRNA 水平的变化见图 1。从图 1 中可见, 假照射组小鼠胸腺细胞 p16mRNA 水平很低, 2.0Gy 照射后 4h, p16mRNA 水平开始明显增高, 照射后 8、12、24h, p16mRNA 水平分别为假照射组的 4.8、6.2 及 11.7 倍, 照射后 24h 达到峰值, 48h 恢复至正常水平。脾细胞 p16mRNA 水平照前亦很低, 照射后开始增高, 8h 增至最高水平, 为假照射组的 2.60 倍。胸腺细胞比脾细胞具有更明显的辐射诱导性。

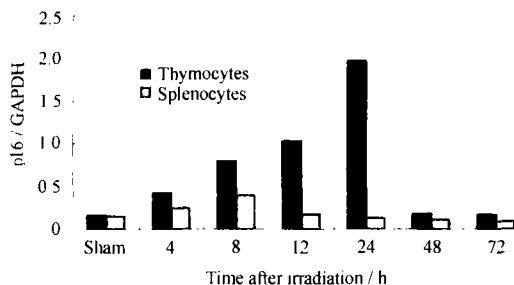


Fig.1 Changes in p16 mRNA level of thymocytes and splenocytes after 2Gy X-irradiation in mice

2.2 不同剂量全身照射后胸腺细胞、脾细胞 p16mRNA 水平的变化

0.5—6.0Gy X 射线全身照射后, 胸腺细胞及脾细胞 p16mRNA 水平的变化见图 2。

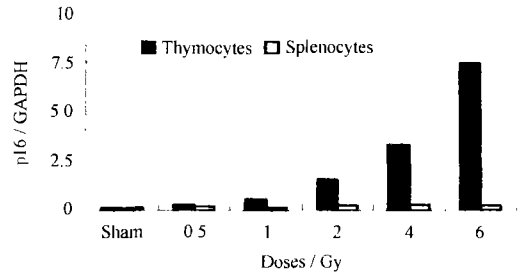


Fig.2 Changes in p16 mRNA level of thymocytes and splenocytes after different doses X-irradiation in mice

从图 2 中可见, 不同剂量照射后 12h 胸腺细胞 p16mRNA 水平呈明显的剂量依赖性增高, 6.0Gy 组是假照射组的 48 倍。脾细胞 p16mRNA 水平亦随照射剂量的增加而增高, 4.0Gy 组仅为假照射组的 1.96 倍, 其增高幅度远低于胸腺细胞。

2.3 2.0Gy 全身照射对胸腺细胞、脾细胞 P16 蛋白表达的影响

2.0Gy 照射后不同时间胸腺细胞及脾细胞 P16 蛋白表达的变化见表 1。结果表明, 2.0Gy 照射后 8h 胸腺细胞 P16 蛋白表达显著增高 ($p < 0.05$), 24h 达峰值 ($p < 0.01$), 48h 仍显著高于对照组 ($p < 0.05$), 72h 恢复正常。2.0Gy 照射后 24h 脾细胞 P16 蛋白表达显著增高 ($p < 0.05$), 72h 恢复至正常水平。

Table 1 Changes in percentage of p16 positive cells in thymocytes and splenocytes after 2.0Gy X-irradiation in mice / %

Time after irradiation / h	Thymocytes	Splenocytes
Sham	29.89±7.70	22.45±7.10
4	25.07±4.25	19.64±7.00
8	40.17±1.75 ⁽¹⁾	24.08±1.00
12	34.47±3.59	29.33±8.58
24	42.20±3.82 ⁽²⁾	32.37±4.59 ⁽¹⁾
48	39.21±1.49 ⁽¹⁾	25.15±4.25
72	24.66±4.47	19.28±2.73

$\bar{x} \pm s$, $n=5(5 \times 3=15)$, ⁽¹⁾ $p < 0.05$, ⁽²⁾ $p < 0.01$ vs Sham

2.4 不同剂量全身照射后胸腺细胞、脾细胞 P16 蛋白表达的变化

不同剂量照射后 24h 胸腺细胞和脾细胞 P16 蛋白表达的变化见表 2。从表 2 中可见, 照射后胸腺细胞 P16 蛋白表达随着剂量的增加而增加, 1、2、4Gy 组与假照射组相比差异显著 ($p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$)。照射后脾细胞 P16 蛋白表达随着剂量的增加而增加, 1、2、4Gy 组与对照组比较差异显著 (分别为 $p < 0.05$ 、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$)。

Table 2 Changes in percentage of p16 positive cells in thymocytes and splenocytes after different doses X-irradiation in mice / %

Doses / Gy	Thymocytes	Splenocytes
Sham	29.89±7.70	31.29±3.78
0.5	34.96±5.77	34.57±4.17
1.0	36.29±5.76*	37.63±1.65*
2.0	42.19±3.82**	39.68±3.19*
4.0	39.33±5.04*	41.11±2.53**
6.0	14.89±1.24	33.39±2.37

$\bar{x} \pm s$, $n=5(5 \times 3=15)$, ⁽¹⁾ $p < 0.05$, ⁽²⁾ $p < 0.01$ vs Sham

3 讨论

正常生理条件下, p16 基因一般处于沉默状态, 其基础表达很低甚至无表达。p16 表达增加往往与增殖性衰老阻滞和各种因素诱导永久性生长阻滞相关。P16 主要通过直接抑制 CDK4/CDK6 介导的 Rb 基因蛋白产物的磷酸化, 发挥其细胞周期负向调控作用, 使细胞停滞在 G₁ 期。同时 P16 和 CyclinD 竞争性与 CDK4/6 结合, CyclinD 因不能与 CDK 结合而被降解, CyclinD 缺乏使 P27 无法从 CyclinE-CDK2-27 和 CyclinA-CDK2-27 复合体中被释放出来, 结果导致 CyclinE-CDK2 和 CyclinA-CDK2 活性受抑, pRb 处于低磷酸化状态, 间接抑制细胞周期进程^[3]。

在正常增殖性衰老阻滞和紧张因素诱导永久性生长阻滞 (Stress-induced premature senescence, SIPS) 分子机制中, 主要存在两条通路, 一条是 DNA 损伤激活 P53-P21 通路, 另一条是由 MARK 信号转导系统诱导 P16 表达累积^[4]。近期研究充分表明: p16 在正常状态和各种因素诱导的永久性的停滞或凋亡中起关键作用。正常人两倍体成纤维细胞体外培养时自发产生衰老样生长阻滞, 加入新鲜血清不能改变这种状况, 实验中观察到 CDKs 广谱性抑制因子 p21 在阻滞开始阶段增多, 随后下降; 而 P16 作为 CDK4/CDK6 特异抑制因子则能持续增多且至少维持两个月, 说明 p21 在阻滞早期发挥作用, P16 在永久性衰老样生长阻滞中意义重大^[5]。Schwarze 等体外培养正常人前列腺上皮细胞和子宫内皮细胞^[6], 当它们进入永久性生长阻滞之前, p53、p21 和 p15 一过性表达提高, 进入生长阻滞后, p16 表达增加而 pRb、CyclinD、p19 (Ink4d) 和 p27 表达下降。P16 表达变化亦可成为体外培养 T 淋巴细胞衰老的标记^[7]。Pavey 等发现 UV 可引起体外培养的正常皮肤组织中黑色素和角质细胞发生 G₁ 期阻滞和 G₂ 期阻滞^[8], 照射后 P16 的增加可持续到 48h, 而且 P16 表达的增加与阻滞的发生密切相关但未见 P53 明显改变。Suzuki 等研究 X 射线诱导正常人两

倍体细胞发生永久性生长阻滞时发现 P53 蛋白堆积^[9], 随后 P21 和 P16 表达提高, 而与端粒变短无关。

本实验结果表明: 正常情况下, 小鼠胸腺和脾脏细胞 p16mRNA 水平很低, 电离辐射全身照射后可诱导 p16 基因转录明显增高, 而且胸腺细胞比脾脏细胞更加明显, 呈现一定细胞异质性。Gunnlaugur 等发现^[10], P16 在出生后人和鼠胸腺淋巴细胞中限制性表达, 随着年龄的增加 P16 表达增加, 因为胸腺细胞以每年 3% 的速率自发发生衰老样凋亡, 可见 P16 高表达与凋亡发生率相关。6Gy X 射线照射后胸腺细胞多数发生 G₁ 期凋亡, 提示照射后胸腺细胞高凋亡细胞率与 p16 表达大幅度增加有关。脾细胞为一个含有成熟 T 和 B 淋巴细胞群体, 与胸腺细胞比较而言具有一定的辐射抗性, 可能是脾细胞内 p16 变化略小的原因之一。实验结果提示电离辐射诱导的 G₁ 期阻滞的分子调控机制与独立于 P53/P21 通路之外的 p16 负向调控密切相关。

综上所述, p16 在电离辐射诱导的 G₁ 期阻滞中起重要作用, 其生物学意义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。p16 基因的突变将导致细胞增殖永生, 使带有 DNA 损伤的细胞不能去除且持续扩增, 提高基因组的不稳定性, 成为细胞癌变的原因之一。

参考文献

- JU G Z, FU H Q, FU S B *et al.* Biomed Environ Sci, 2001, 14(1): 27-31
- Piepkorn M. J Am Acad Dermatol, 2000, 42(5pt1): 741-745
- Roussel M F. Oncogene, 1999, 18(38): 5311-5317
- Toussaint O, Medrano E E, von Zglinicki T. Exp Gerontol, 2000, 35(8): 927-945
- Stein G H, Dulic V. J Invest Dermatol Symp Proc, 1998, 3 (1): 14-8
- Schwarze S R, Shi Y, Fu V X *et al.* Oncogene, 2001, 20(58): 8184-8192
- Jauga E, Skierski J, Radziszewska E *et al.* Acta Biochim Pol, 2000, 47(2): 293-300
- Pavey S, Russell T, Gabrielli B. Oncogene, 2001, 20 (43): 6103-10
- Suzuki K, Mori I, Makayama Y *et al.* Radia Res, 2001, 155(1pt2): 248-253
- Gunnlaugur P, Nielsen, Anat O. Laboratory Investigation, 1999, 79 (9): 1137-1143

Changes in p16 mRNA level and protein expression in thymocytes and splenocytes after whole body irradiation

WANG Xiaomei¹ JU Guizhi² MEI Shujiang¹ FU Shibo² LIU Shuzheng² QU Yang²

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 of thymocytes and splenocytes in mice. Northern blot was applied to determine p16mRNA level. Flowcytometry (FCM) was employed to measure p16 protein expression. The time-course experiments showed that p16mRNA level was markedly increased at 4—24h in thymocytes and at 4—8h in splenocytes, and p16 protein expression increased significantly at 8—48h in thymocytes ($p < 0.05$ — $p < 0.01$) at 24h in splenocytes ($p < 0.05$) after 2.0Gy whole body irradiation with X-rays. The dose-effect experiments showed that p16mRNA level of thymocytes and splenocytes increased with increasing doses and the p16 protein expression increased significantly, too, when the dose increased from 1.0 to 4.0Gy for both thymocytes and splenocytes ($p < 0.05$ — $p < 0.01$). p16 gene transcription and protein expression could be induced by X-rays irradiation, and tendency of the increase varied with the dose and cell type. The results suggested that p16 expression played a critical role in G₁ arrest induced by ionizing radiations

KEYWORDS X-rays, G₁ arrest, p16

CLC R812, R329.2⁺8, Q691