

电离辐射诱导 P21 蛋白表达及对细胞周期解偶联的作用

鞠桂芝 闫凤琴 付士波 李鹏武

(吉林大学公共卫生学院卫生部放射生物学重点实验室 长春 130021)

摘要 采用免疫细胞化学方法检测 P21 蛋白表达的变化。采用 PI 荧光标记及流式细胞术 (Flow cytometry, FCM) 测定细胞周期并分析细胞倍体的变化。观察电离辐射对 EL-4 细胞 P21 蛋白表达的影响及对细胞周期解偶联的作用。时效实验结果显示, 4.0 Gy X 射线照射后 2—72 h, EL-4 细胞中 P21 蛋白表达明显增高 ($p<0.05$ — $p<0.001$)。量效实验结果显示, 0.5—6.0 Gy X 射线照射后 24 h, EL-4 细胞中 P21 蛋白表达明显增高 ($p<0.01$ — $p<0.001$)。结果还显示, 1.0—6.0 Gy X 射线照射后, EL-4 细胞的 8 倍体细胞数在各剂量组均未见明显变化 (均 $p>0.05$)。研究表明, 电离辐射可诱导 EL-4 细胞 P21 蛋白表达, 但不诱导 EL-4 细胞周期解偶联。提示 P21 蛋白可能参与细胞周期解偶联的分子调控。

关键词 电离辐射, P21 蛋白, 细胞周期解偶联

中图分类号 R811

细胞周期解偶联 (Uncoupling) 是近年来细胞生物学研究提出的新概念, 深受研究者的重视。本实验室以往的工作已经证实电离辐射可诱导细胞周期解偶联^[1]。然而电离辐射诱导细胞周期解偶联的机制尚有争论。有学者认为^[2], p21 基因缺乏可诱导细胞周期解偶联, 另有报道则持相反观点^[3]。本工作观察了电离辐射对 EL-4 淋巴瘤细胞 P21 蛋白表达及细胞周期解偶联影响, 并分析 P21 蛋白表达对细胞周期解偶联的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞株

小鼠淋巴瘤 EL-4 细胞, 购自中国科学院细胞库, 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液, 37℃, 5% CO₂ 孵箱中培养。EL-4 细胞倍增时间为 19 h。

1.2 照射条件

Philips 深部 X 射线治疗机, 电压 200 kV, 电流 10 mA, 滤板 0.5 mm Cu 和 1.0 mm Al, 剂量率为 0.287 Gy / min。时效实验, 照射剂量为 4.0 Gy, 照射后 0 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h 检测 EL-4 细胞 P21 蛋白表达的变化。量效实验, 照射剂量分别为 0.5 Gy、1.0 Gy、2.0 Gy、4.0 Gy 和

6.0 Gy, 照射后 24 h 检测 EL-4 细胞 P21 蛋白表达及细胞倍体的变化, 同时设假照射对照组。平行样 4 份。

1.3 蛋白表达的检测

采用免疫细胞化学法检测。方法简述如下: 将细胞在甲醇中固定 15 min 后, 在 0.25% TritonX-100 中孵育 15 min, 用磷酸盐缓冲液 (Phosphate balance solution, PBS) 洗 3 次。每一样品加 P21 蛋白单克隆抗体 50 μL (mouse anti-p21, Santo Cruz, 美国) (1:50 PBS 稀释), 在湿盒中 4℃过夜。其余步骤按照链霉抗生素蛋白过氧化物酶 (Streptavidin-Peroxidase, SP) 超敏试剂盒 (福州迈新生物技术公司) 提示进行。二氨基联苯胺 (Diaminobenzidine, DAB) 染色 3—10 min。非特异对照组用 PBS 代替单抗, 其余步骤同上。抗体需在实验前新配制。结果用 P21 蛋白表达阳性细胞百分率表示。

1.4 细胞周期测定及倍体分析

取细胞悬液 100 μL (1×10^6), 加入 1% 核糖核酸 (Ribonucleic acid, RNA) 酶 (中国科学院上海生化所) 100 μL, 37℃下孵育 30 min 后, 加入 5% 碘化丙啶 (Propidium iodid, PI) 溶液 (美国 Sigma 公司) 0.5 mL, 4℃下作用 30 min, FACScan 流式细胞仪 (美国 BD 公司) 测定细胞周期。用 Cellfit

国家自然科学基金 (30270346) 资助

第一作者: 鞠桂芝, 女, 1942 年 3 月出生, 1965 年毕业于吉林医科大学, 放射医学专业, 教授

收稿日期: 初稿 2004-09-27, 修回 2004-11-16

软件收取细胞（每份样品收取 1×10^4 细胞）并进行细胞倍体分析。结果以百分率表示。

1.5 统计学分析

采用 Student's *t* 检验方法进行统计学分析。

2 结果

2.1 4.0 Gy X 射线照射后 EL-4 细胞 P21 蛋白表达的时程变化

采用免疫细胞化学方法检测 4.0 Gy X 射线照射后 2—72 h, EL-4 细胞中 P21 蛋白表达的时程改变, 结果见表 1。检测结果表明, 4.0 Gy 照射后 2 h, EL-4 细胞中 P21 蛋白表达明显增高 ($p < 0.01$), 24 h 达峰值 ($p < 0.001$), 持续至照射后 72 h, 与对照组相比差异仍非常显著 ($p < 0.001$)。

Table 1 Changes in P21 protein expression of EL-4 cells irradiated to 4.0Gy with X-rays in vitro / %

Time after irradiation / h	P21 positive cells
0	17.26±4.95 ⁽¹⁾
2	23.27±4.97 ⁽³⁾
4	22.18±6.58 ⁽²⁾
8	24.87±4.16 ⁽³⁾
12	27.83±4.71 ⁽⁴⁾
24	54.98±1.36 ⁽⁴⁾
48	46.94±1.31 ⁽⁴⁾
72	27.34±1.28 ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ ($\bar{x} \pm s$), $n=4$, ⁽²⁾ $p < 0.05$, ⁽³⁾ $p < 0.01$, ⁽⁴⁾ $p < 0.001$ vs control

2.2 不同剂量 X 射线照射后 24 h EL-4 细胞 P21 蛋白表达的量效改变

采用免疫细胞化学方法检测 0.5—6.0 Gy X 射线照射后 24 h, EL-4 细胞中 P21 蛋白表达的变化, 结果见表 2。表中结果表明, 0.5—6.0 Gy 照射后 24 h, EL-4 细胞中 P21 蛋白表达均明显增高, 与对照组相比差异显著 ($p < 0.01$ — $p < 0.001$)。

2.3 电离辐射不诱导 EL-4 细胞周期解偶联

1.0—6.0 Gy X 射线照射后 24 h, EL-4 细胞倍体的变化见表 3。表中结果可见, 1.0、2.0、4.0、6.0 Gy 照射后, EL-4 细胞的二倍体细胞数明显增加, 2.0 Gy 及 4.0 Gy 组与对照组的比较差异显著 (分别为 $p < 0.01$), 表明诱导 G_1 期阻滞。而四倍体细胞数

明显减少, 2.0 Gy、4.0 Gy 及 6.0 Gy 组与对照组的比较差异显著 (分别为 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$), 表明 G_2/M 期减少。然而, 八倍体细胞数在各剂量组均未见明显变化 (均 $p > 0.05$), 表明 1.0—6.0 Gy X 射线照射不诱导 EL-4 细胞周期解偶联。

Table 2 Changes in P21 protein expression of EL-4 cells irradiated to different doses with X-rays in vitro / %

Doses / Gy	P21 positive cells
Sham-irradiated	10.94±2.54 ⁽¹⁾
0.5	17.64±1.83 ⁽²⁾
1	28.68±4.04 ⁽³⁾
2	37.76±1.51 ⁽³⁾
4	59.95±2.37 ⁽³⁾
6	35.59±1.96 ⁽³⁾

⁽¹⁾ ($\bar{x} \pm s$), $n=4$, ⁽²⁾ $p < 0.01$, ⁽³⁾ $p < 0.001$ vs sham-control

Table 3 Changes in cell ploidies of EL-4 cells 24h after X-ray irradiation of different doses in vitro / %

Doses / Gy	Percentage		
	2N	4N	8N
Sham-irradiated	68.09±1.41	29.91±1.01	2.24±0.50
1.0	70.07±0.19	28.08±0.37	2.16±0.29
2.0	72.00±0.68 ⁽²⁾	25.66±0.71 ⁽³⁾	2.53±0.31
4.0	71.11±1.14 ⁽²⁾	26.30±1.18 ⁽²⁾	2.84±0.23
6.0	70.72±1.76	26.68±1.69 ⁽¹⁾	2.75±0.27

($\bar{x} \pm s$), $n=4$, ⁽¹⁾ $p < 0.05$, ⁽²⁾ $p < 0.01$, ⁽³⁾ $p < 0.001$ vs sham-control

3 讨论

细胞周期解偶联又称之为 S/M 解偶联, 是细胞生物学中的一个新概念。当细胞受到某种刺激后, 处于周期中的 G_2 期细胞既不能进入有丝分裂 M 期, 也不发生 G_2 期阻滞, 而是返回到 S 期, 继续进行 DNA 复制, 使细胞形成多倍体 (八倍体、十六倍体等) 的巨大细胞 (Polyploid giant cell), 最终细胞死亡。电离辐射能通过诱导巨细胞形成而最终导致细胞死亡, 这一重要的辐射细胞效应在放射生物学的研究中早有报道^[4]。然而, 在此后的年代间, 这种辐射诱导细胞死亡的重要途径并未得到足够的重视, 其机制的研究也进展缓慢。主要原因是, 在此期间研究者们把注意力主要集中于辐射通过 p53 依赖性途径诱导细胞凋亡的研究, 而忽视了对非 p53 依赖性途径诱导细胞死亡机制的研究。直至 1996

年 Waldman 等^[5]报道了 DNA 损伤可诱导 P53 功能缺失或 p21 基因缺失的人类肿瘤细胞发生 S/M 解耦联, 可明显增加肿瘤细胞的死亡。首次提出了 DNA 损伤可通过非 p53 依赖性途径诱导细胞死亡的机制。从而使 DNA 损伤诱导 S/M 解耦联基因调控的研究, 成为细胞死亡机制研究的新热点。在此后的研究中, 多数报道支持这一观点, 并在不同细胞系进一步得到了证实^[6]。然而也有人提出相反观点^[7]。近年又有报道提出 *Chk1* 等新的调控基因参与此过程^[8,9]。目前, 对 DNA 损伤诱导细胞周期解耦联及其基因调控的研究, 所见报道尚有明显争论。

本实验结果证实, 4.0 Gy X 射线照射后 2—72 h, EL-4 细胞中 P21 蛋白表达明显增高。量效实验结果证实, 0.5—6.0 Gy X 射线照射后, EL-4 细胞中 P21 蛋白表达在各剂量组均明显增高。然而, 1.0—6.0 Gy X 射线照射后, EL-4 细胞的八倍体细胞 (巨细胞) 数在各剂量组均未见明显变化。表明电离辐射可诱导 EL-4 细胞 P21 蛋白表达, 但不诱导 EL-4 细胞形成巨细胞, 即不诱导 EL-4 细胞周期发生解耦联。Waldman 等^[5]采用 p21 基因缺失细胞 (p21^{-/-}) 进行研究。发现 DNA 损伤可诱导 p21 基因缺失的人类肿瘤细胞发生细胞周期解耦联。证实了 p21 基因可能参与细胞周期解耦联的基因调控, P21 蛋白可能是细胞周期解耦联的负向调控分子。根据 Waldman 等^[5]的观点, 本实验从另外的角度证实了, P21 蛋白高度表达的 EL-4 细胞, 电离辐射不能诱导其发生细胞周期解耦联。所得结果与 Waldman 等^[5]的观点相一致。我们进一步的研究将采用 RNA 干扰技术 (siRNA), 使 p21 基因沉默 (knock down), 抑制 P21 蛋白表达, 观察电离辐射对 EL-4 细胞周

期解耦联的作用。进而从正向阐明 P21 蛋白分子在电离辐射诱导细胞周期解耦联中的作用, 为电离辐射诱导细胞周期解耦联的基因及分子调控机制研究提供新的实验依据。

参考文献

- 1 鞠桂芝, 付士波, 闫凤琴. 中华放射医学与防护杂志, 2004, 24(4): 295-296
JU Guizhi, FU Shibo, YAN Fengqin. Chin J Radiol Med Prot, 2004, 24(4): 295-296
- 2 Bracey T S, Williams A C, Paraskeva C. Clin Cancer Res, 1997, 3(8): 1371-1381
- 3 Wenz F, Yu Y, Nagasawa H, et al. Radiat Res, 1997, 148(2): 129-134
- 4 刘树铮. 医学放射生物学. 北京: 原子能出版社, 1998. 126-127
LIU Shuzheng. Medical Radiobiology. Beijing: Atomic Energy Press, 1998. 126-127
- 5 Waldman T, Lengauer C, Kinzler K W, et al. Nature, 1996, 381(6584): 713-716
- 6 Bulavin D V, Tararova N D, Aksenov N D, et al. Oncogene, 1999, 18(41): 5611-5619
- 7 Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, et al. Science, 1998, 282(5393): 1497-1501
- 8 Jackson J R, Gilmartin A, Imburgia C, et al. Cancer Res. 2000, 60(3): 566-572
- 9 Yarden R I, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, et al. Nat Genet, 2002, 30(3): 285-289

P21 protein expressing induced by ionizing radiation and its effect in cell cycle uncoupling

JU Guizhi YAN Fengqin FU Shibo LI Pengwu

(MH of Radiobiology Research Unit, Medical Center in Memorial of Norman Bethune of Jilin University, Changchun 130021)

ABSTRACT The work is to investigate whether P21 protein expression could be induced by ionizing radiation and the effect on cell cycle uncoupling. Immunocytochemistry assay was used to measure P21 protein expression. Polyploid was analyzed by FCM following staining of cells with propidium iodide (PI). The results showed that P21 protein expression of EL-4 cells was increased significantly 2—72 h after 4.0 Gy X-ray irradiation ($p < 0.05$ — $p < 0.001$). In dose-effect experiments it was found that P21 protein expression also increased significantly 24 h after exposure to 0.5—6.0 Gy X-rays of EL-4 cells ($p < 0.01$ — $p < 0.001$). However, 8N cells were not changed in EL-4 cells irradiated to 1.0—6.0 Gy by X-rays compared with sham-irradiated control ($p > 0.05$). These results demonstrated that the ionizing radiation could induce P21 protein expression, but not cell cycle uncoupling. It suggested that P21 might play an important role in cell cycle uncoupling.

KEYWORDS Ionizing radiation, P21 protein expression, Cell cycle uncoupling

CLC R811