

WORTMANNIN 的辐射增敏与 NF- κ B 相关

李雨 赵芳 郑秀龙

(第二军医大学海军医学系放射医学教研室 上海 200433)

摘要 用凝胶迁移实验 (Electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 研究 PI-3K 的特异性抑制剂 WORTMANNIN (WT) 影响细胞辐射反应与核因子 NF- κ B 的关系。合成含 kB 位点的双链寡核苷酸碱基序列, 以无菌双蒸水稀释, 退火, 制备放射性核苷酸探针。常规方法培养 LP3 细胞, 实验 LP3 细胞样品受 WT 作用及 5 Gy γ 射线照射后, 提取核蛋白, 与标记探针进行结合反应, 进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。真空干胶, 低温环境中进行放射自显影, 照相扫描, 进行转录因子的凝胶迁移率改变分析。未受 WT 作用的 LP3 细胞转录因子 NF- κ B 结合活性在受 5 Gy γ 射线照后 6 h 内, 经历从 8% 升高至 50% 然后降低至 12%, 50 μ mol/L WT 明显抑制了转录因子受照后的变化幅度。电离辐射可能通过一些信号传导途径激活 NF- κ B, 进而促使一些与 DNA 损伤修复和细胞其它防御机制有关的基因活动, 以减轻辐射损伤, WT 有可能是通过阻滞这一过程的早期阶段而发生辐射增敏效应。

关键词 Wortmannin, 辐射, NF- κ B, 凝胶迁移实验

中图分类号 R817.4, R818

电离辐射是自然界普遍存在的环境致突变和致癌因子, 并广泛应用于癌症治疗。尽管对电离辐射的生物学效应进行了长期的研究, 仍对受电离辐射作用后细胞内的信号事件知之不多。对 AT (Ataxia talangectasia, 一种电离辐射反应异常敏感的遗传病) 的研究发现, 其 cDNA 序列与磷脂酰肌醇-3 激酶 (Phosphatidylinositol-3 Kinase, PI-3K) 具同源关系^[1], 后者是当今引起广泛关注的一种新的细胞内信号物质, 与多种跨膜受体的信号传导有关, 影响多种原癌基因的表达, 在细胞的分化增值, 免疫系统的应答等重要的生命活动中可能居重要位置^[2]。现已发现愈来愈多的蛋白激酶与 PI-3K 同源, 形成所谓“PI-3K 超家族”^[3], 它们都与细胞的基本生命活动有关, 其中一部分参与异常辐射反应。

本工作设想如果抑制 PI-3K, 有可能使细胞的辐射敏感性发生变化。研究组曾经使用 PI-3K 的特异性抑制剂 WT, 从细胞存活和 DNA 损伤修复环节探索其辐射增敏作用机制^[4,5], 本工作继续从转录因子水平了解 WT 的辐射增敏作用。

1 材料与方法

1.1 材料

小牛血清购自华美生物工程公司; RPMI 1640

培养液, WT, 二甲基亚砜, 低熔点琼脂均为 SIGMA 公司产品; ⁶⁰Co γ 射线辐照装置, 第二军医大学辐照中心; 溴化乙锭 (EB) 瑞士 Fluka 公司; 蛋白酶 K 由华顺公司进口分装; 上海安亭科学仪器厂生产; TR-A 紫外线检测仪, 上海顾村厂生产; MECROTEK-6E 光学扫描仪, 台湾中晶公司生产; 586 MMOL/LX-200 微型计算机 (兼容机), ONE-DISCAN 电泳凝胶图象分析软件 (CSP 公司); 含 kB 位点和 CREB 位点的双链寡核苷酸 (CRE: 5'CAT TCGA TGACATCA GTAGGGTG3', 3'CTA AGCT ACTGTAGT CATCCCAC 5'; kB: 5'CAAC AGA GGGGA CTTTCC GAGAGC 3', 3'GTT GTCT CCCCT GAAAGG CTCTCG 5') 均由中国科学院上海植物生理研究所合成, ³²P- γ ATP [腺苷 5' (γ -³²P) 三磷酸盐] 北京市亚辉生物医学工程公司产品, 比活度 >185 Tbq/mmol/L。T4 多核苷酸激酶及其反应缓冲液, SIGMA 公司产品; 5M 乙酸铵溶液, 上海华顺生物工程公司产品。Hepes, SIGMA 公司产品; 苯甲酸磺酰氟 (PMSF), SIGMA 公司产品; DTT, SIGMA 公司产品; 抑蛋白酶肽 (Aprotinin) 和抑蛋白酶肽 (leupeptin), Calbiochem 产品; Tris 碱, Watson Biomedical 公司产品; 30% 聚丙烯酰胺, 过硫酸铵, SERVA 公司产品; TEMD, SIGMA 产品; 医用 X 光胶片, 日本富士产品; Poly (dI-dc), SIGMA 产

第一作者: 李雨, 男, 1956 年 4 月出生, 1983 年毕业于武汉医学院, 医疗专业, 副教授

通讯联系人: 赵芳

收稿日期: 初稿 2008-12-04, 修回 2008-12-18

品; Protein II 型垂直凝胶电泳装置 (B-R) 公司产品; 国产 ZC-201 型放射型沾染探测仪; 自制真空干胶装置。其余常用试剂 (KOH、MgCl₂、硼酸、乙醇等) 常用试剂均为国产 AR 级产品。

1.2 方法

含 10 % 小牛血清的 RPMI 1640 培养基培养小鼠 LP3 细胞。将配制好的 WT 加入培养液, 细胞在含 50 μmol WT 的培养液中温育 1 h, 接受 5 Gy γ 射线照射, 继续在该培养液温育不同时间后, 分别进行 NF- κB 测定。

细胞转录因子 NF- κB 测定方法参阅 Singh SP 方法^[6]。合成含 κB 位点的双链寡核苷酸碱基序列, 以无菌双蒸水稀释, 退火, 制备放射性核苷酸探针。

实验 LP3 细胞样品受 5 Gy 照射及 WT 作用后, 提取核蛋白, 与标记探针进行结合反应, 上样进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。真空干胶, 低温环境中进行放射自显影, 照相扫描, 进行转录因子的凝胶迁移率改变数据分析。

2 结果

LP3 细胞的辐射相关多功能转录因子 NF- κB 的结合活性在受 5 Gy γ 射线照后 6 h 内经历了从 8 % 升高至 50 % 然后降低至 12 %, 在照后 3 h 出现峰值。50 $\mu\text{mol/L}$ WT 明显抑制 NF- κB 受照后的变化幅度 (见图 1)。

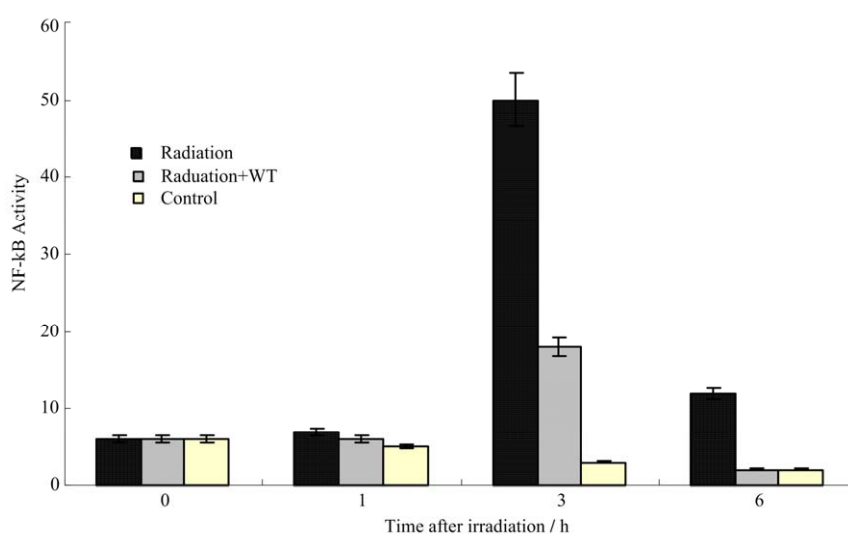


Fig.1 NF- κB Changes after WT and 5 Gy Irradiation

3 讨论

已经发现 PI-3K 可以催化肌醇环于 D3 位的磷酸化, 生成的相应 D3 磷酸化产物不是已知磷脂信号通路的成分, 有愈来愈多的证据显示这是一个新的磷脂信号通路^[7]。共济失调毛细血管扩张症 (AT) 对电离辐射敏感, 对其基因克隆显示该基因属于 PI-3K 相关激酶家族, 这一类激酶中相当一部分与辐射反应异常有关^[8]。

我们的前期工作显示, PI-3K 的特异性抑制剂 WT 对受照 LP3 细胞的存活有增敏效应, 即 WT 降低细胞的存活率, 剂量存活曲线显示其增敏比约为 1.2 左右。继而我们还研究了 WT 对受照细胞 DNA 损伤修复的影响, 用 50 $\mu\text{mol/L}$ WT 抚育细胞合并 γ 射线照射, 发现照后不同时间进入凝胶的 DNA 数量, 片段大小, 分布位置都有所区别, 提示 WT 的辐射增敏作用与其增加细胞 DNA 损伤或/和抑制

DNA 损伤的修复有关^[4,5]。

本实验发现受 5 Gy γ 射线照后, LP3 细胞的转录因子 NF- κB 的结合活性在 6 h 内经历了一个由低升高, 然后降低的过程, 在照后 3 h 达到最高值, 用 50 $\mu\text{mol/L}$ WT 处理, 明显抑制了 NF- κB 受照后的变化幅度。

真核基因表达是严格按一定时间, 空间顺序发生的事件, 其调节机制可在复制、转录过程中、转录后, 翻译和翻译后的各级水平进行。mRNA 转录是真核基因表达调节的基本控制点, 究竟通过何种机制调节基因的激活过程和转录程度, 尚不十分清楚。顺式作用元件与反式作用因子的相互作用, 对真核基因转录有重要的调节作用是目前公认的一个事实, 尽管本实验中不同时间点 NF- κB 变化的详细机制尚不甚明了, 但提示 WT 有可能在转录水平的不同时间影响细胞对辐射的响应。

核因子 KB (Nuclear Factor-kB, NF-kB) 是一个多功能转录因子, 由 p50 和 p65 亚基组成, 与一调节亚基 I-kB 形成复合物, 在一定条件下复合物解聚在胞浆-胞核信息传递中起重要作用。它在细胞浆中被激活后从胞质易位到核中, 与 kB 基因序列结合发挥转录调控作用。其功能可分两大类: (1) 胞浆-胞核间信号传递; (2) 激活早期反应基因, 与免疫应答, 急性期反应和炎症过程相关。有证据说明多种生物理化因素 (包括电离辐射) 可使 NF-kB 增加, 与细胞生命相关的重要基因表达增加^[9]。

今年美国学者利用细菌的鞭毛蛋白研发的新药, 可保护健康细胞和骨髓辐射损伤对健康细胞的损害, 据称健康细胞的基因转录因子 NF-kB 是其关键环节^[10]。电离辐射可能通过一些信号传导途径激活 NF-kB, 进而促使一些与 DNA 损伤修复和细胞其它防御机制有关的基因活动发生改变, 以减轻辐射损伤, WT 有可能是通过阻滞这一过程的早期阶段而发生辐射增敏效应, 相关机理的深入研究是必须的。

参考文献

- 1 Savitsky A, Bar shira A, Gilad S, *et al.* Science, 1995, **268**(5218): 1749-1753
- 2 Vanhaesebroeck B, Stein R C, Waterfield M D. Cancer Survey, 1996, **27**(1): 249-269
- 3 Abraham R T. Curr Opin Immol/Lun, 1996, **8**(2): 412-418
- 4 李雨, 鲁颖, 郑秀龙, 等. 中华放射医学与防护杂志, 1999, **19**(5): 330-333
LI Yu, LU Ying, ZHENG Xiulong, *et al.* Chin J Radiol Med Prot, 1999, **19**(5): 330-333
- 5 李雨, 赵芳, 郑秀龙, 等. 中华放射医学与防护杂志, 2000, **20**(5): 176-178
LI Yu, ZHAO Fang, ZHENG Xiulong, *et al.* Chin J Radiol Med Prot, 2000, **20**(3): 176-178
- 6 Singh S P, Lavin M F. Mol Cell Biol, 1990, **10**(7): 5279-5285
- 7 KeTTh C T, Schreiber S L. Science, 1995, **270**(5220): 50-51
- 8 Virginia A Z. Cell, 1995, **82**(3): 685-687
- 9 Lobrich M, Ikpeme S, Haub P, *et al.* Int J Radiat Biol, 1993, **64**(2): 539-546
- 10 Lyudmila G, Burdelya, Vadim I, *et al.* Science, 2008, **320**(5873): 226-230

The studies of radiosensitized effect related to NF-kB induced by WORTMANNIN

LI Yu ZHAO Fang ZHENG Xiulong

(Radiation Department in Navy Medical Faculty, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT In order to investigate radiosensitized effect induced by WORTMANNIN(WT) the nuclear factor kB (NF-kB) was studied by Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA). Double strand nucleotide sequence which contains kB genetic locus was composed, diluted and annealed in pure water, and then labeled as radioactive nucleotide probe. LP3 cell was cultivated in conventional method and receive 5 Gy of γ -irradiation after nurturing with WT. The nucleoprotein picked up from the cell was combined with the radioactive labeled probe and then was carried out with electrophoresis by SDS-PAGE, which was taken photographs using autoradiograph in low temperature after vacuum drying. It has been found that the NF-kB activity of LP3 cell arises from about 8 % to 50 % and then becomes down to 12 % in 6 h after irradiation. WT at 50 μ mol/L can inhibit the NF-kB activity evidently. Radiation can activate NF-kB through message pathway and promote the gene express, which is related to repair and other defense mechanism of damaged DNA in cells. WT may block the message pathway at early stage and induce radiation sensitized effect.

KEYWORDS Wortmannin, Radiation damage, NF-kB, Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

CLC R817.4, R818