

电离辐射对小鼠骨髓细胞 CDK4 表达的影响

马淑梅 鞠桂芝

(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 采用流式细胞术和 Northern blot 检测 X 射线全身照射后小鼠骨髓细胞 CDK4 转录水平和蛋白表达的变化。结果表明, 2 Gy X 射线全身照射后 4—48h CDK4 mRNA 转录水平及蛋白表达均明显下降; 0.5—6 Gy X 射线全身照射后 12 h CDK4 mRNA 水平及蛋白表达亦呈降低改变。结果提示, CDK4 在电离辐射诱导的小鼠骨髓细胞 G₁ 期阻滞中可能起重要作用。

关键词 CDK4, 电离辐射, 骨髓细胞, G₁ 期阻滞

中图分类号 R811, R332.2, R329.2⁺⁸

哺乳动物的细胞周期进程受控于细胞周期素(Cyclin)和细胞周期素依赖性激酶(CDK), CDK 是细胞周期转换过程的中心物质, 它同相应的 Cyclin 结合发挥其调控作用。其中, CyclinD/CDK4、6、CyclinE/CDK2 在 G₁/S 期转换过程中起重要作用。文献[1]对骨髓细胞周期进程的研究表明, 中等剂量电离辐射能诱导小鼠骨髓细胞发生 G₁ 期阻滞, 且呈剂量依赖性关系。本工作拟观察电离辐射对 CDK4 转录及蛋白表达的影响, 并讨论其在辐射诱导 G₁ 期阻滞中的作用。

1 材料和方法

1.1 动物

昆明系小鼠购自白求恩医科大学实验动物学部, 雄性, 体重 20 ± 2 g, 随机分组, 每组 15 只, 每 3 只小鼠骨髓细胞混合为一个样, 设 5 个平行样。

1.2 主要试剂

PI(碘化丙啶 Sigma, 美国)。第一抗体: CDK4 兔多克隆抗体(Santa Cruz, 美国), 第二抗体: 羊抗兔 IgG-FITC(Jackson, 美国)。CDK4 cDNA 质粒(美国 St. Jude 儿童医院 Chales J 博士惠赠)。Random DNA Labeling Kit(Promega, 美国)。 $[\alpha-^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ (北京亚辉医学工程公司)。

1.3 照射条件

用国产 X·S·S·250(FZ)型固定式 X 射线深部治疗机照射, 电压 200kV, 电流 10mA, 滤板 0.5mmCu, 1.0mmAl, 靶皮距 56cm, 吸收剂量率 0.287Gy/min, 剂量效应研究取剂量分别为 0.5、1、2、4、6Gy 照射后 12h 的样本, 其中 2Gy 组又分别于照射后 2、4、8、12、24、48、72h 取样本作时程观察。

1.4 蛋白表达测定

将小鼠骨髓单细胞悬液, 经 75%冷乙醇固定 24h 后, PBS 洗 2 次, 每份样品定容 100 μL (含 1×10^6 个细胞), 每份样品加入第一抗体 50 μL (1:50), 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应 45min, PBS 洗 2 次, 加第二抗

国家自然科学基金(39770193)资助

第一作者: 马淑梅, 女, 1971 年出生, 1998 年毕业于白求恩医科大学, 现读医学博士学位, 放射医学专业

收稿日期: 初稿 2000-10-13, 修回 2001-02-21

体 50μL(1:100), 4℃反应 45min, PBS 洗 2 次, 加 PBS 500μL, 上机检测。平行样 5 份。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, 结果表示为加第一抗体细胞的平均荧光强度, 减去未加第一抗体细胞的平均荧光强度, 抗体均为用前新配制。

1.5 Northern blot

取 1×10⁷ 骨髓细胞, 加 0.6mL 异硫氰酸胍裂解液混匀, 加 0.1 体积乙酸钠(pH 4.0), 加入等体积水饱和酚, 再加入 0.3 体积 CH₄Cl₃/ISA (49:1) 充分振荡混匀。放置 15min 后 4℃ 12000r/min 离心 15min, 取水相, 往其内加入等体积异丙醇, 混匀, -20℃ 沉淀 RNA 至少 30min。4℃ 12000r/min, 15min, 弃上清, 沉淀干燥后溶于 40μL 无 RNase 水, 紫外分光光度计测定 RNA 纯度及含量, -70℃ 冻存待用。甲醛变性凝胶电泳、转膜、杂交、洗膜及显影见文献 [2]。采用随机引物法标记探针, 放射自显影结果用 Phosphimager(美国)激光扫描仪测定杂交带的平均灰度值。结果用特异探针杂交带和 GAPDH 探针杂交带的平均灰度的比值表示。

2 结果

2.1 CDK4 mRNA 水平的时程变化

图 1 为小鼠骨髓细胞 CDK4mRNA 水平的时程变化。由图 1 可见, 2Gy X 射线全身照射后, 小鼠骨髓细胞 CDK4 的 mRNA 水平于照射后 2h 呈一过性升高, 而后急速下降, 于 8h 降至最低值, 然后逐渐回升, 72h 仍未恢复至对照水平。

2.2 CDK4 mRNA 水平的量效变化

图 2 为小鼠骨髓细胞 CDK4mRNA 水平的量效变化。由图 2 可见, 0.5—6Gy 全身照射后 12h, 小鼠骨髓细胞 CDK4 的 mRNA 水平自 1Gy 起均有明显下降。

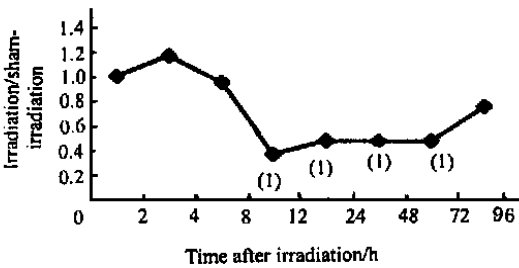


Fig-1 Changes in CDK4 mRNA level of mouse bone marrow cell at different time after WBI with 2Gy X ray
n=3, p<0.01 vs sham-irradiation

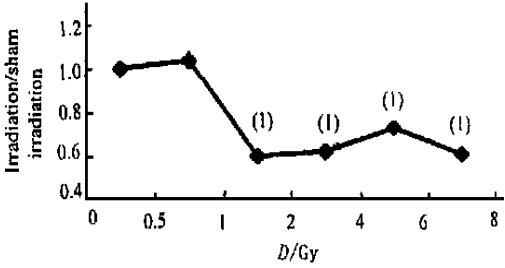


Fig-2 Dose effect relationship of CDK4 mRNA level of mouse bone marrow cells 12h after WBI with different dose X ray
n=3, p<0.01 vs sham-irradiation

2.3 CDK4 蛋白表达的时程变化

图 3 为小鼠骨髓细胞 CDK4 蛋白表达的时程变化。由图 3 可见, 经 2Gy X 射线全身照射后, 小鼠骨髓细胞 CDK4 蛋白表达于照射后 2 h 急速下降, 于 72h 有所回升但仍未恢复至对照水平。

2.4 CDK4 蛋白表达的量效变化

图 4 为小鼠骨髓细胞 CDK4 蛋白表达的量效变化。由图 4 可见, 0.5—6 Gy X 射线全身照射后 12 h, 小鼠骨髓细胞 CDK4 蛋白表达于照射后 0.5Gy 开始下降, 1、2、4、6 Gy 与对照相比有显著性。

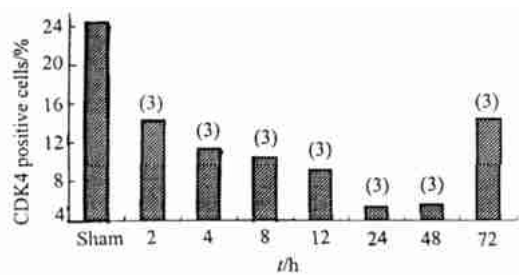


Fig.3 Changes in CDK4 expression in mouse bone marrow cells at different time after WBI with 2Gy X rays
 $n=5, p<0.001$ vs sham irradiation

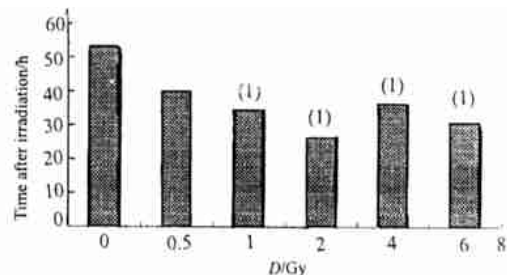


Fig.4 Dose effect of CDK4 expression in mouse bone marrow cells 12h after WBI with different doses X ray
 $n=5, p<0.05$ vs sham irradiation

3 讨论

电离辐射对细胞周期进程的影响是放射生物学研究的热点课题,其中辐射诱导细胞 G₁ 期阻滞倍受关注。多数学者认为,G₁ 期阻滞是机体对外界刺激的一个保护性反应,可提供充足的时间来促使受损伤的 DNA 在进入 DNA 合成和复制的 S 期前得以修复,损伤严重者可通
过凋亡等方式除掉 DNA 异常的细胞,从而降低了基因组的不稳定性,减少了肿瘤的发生^[3]。调控细胞周期分子机制的核心为细胞周期蛋白依赖性激酶(CDKs),其中 CDK4、CDK6 被认为在 G₁ 期阻滞中起关键作用^[4]。

CDK4 是一种分子量为 35KD 的蛋白激酶,它包含有一个催化亚单位和一个调节亚单位,其表达是组成性的,单独的 CDK4 亚基没有蛋白激酶活性。CyclinD 是它的调节亚单位,可使 CDK4 激酶活化,进而使 RB 蛋白磷酸化,磷酸化的 RB 释放其结合并抑制的蛋白,主要是转录因子 E2F 以及具有激酶活性的 c-Abl 蛋白等,游离的 E2F 进入核内结合一系列的基因产物能促进细胞通过 G₁-S 调控点基因的启动子区,启动这些基因的转录。周期素依赖性激酶抑制剂(CKI)按其结构分两个家族(1)Ink4 家族,包括 P16 等,能特异性抑制 CDK4-CyclinD、CDK6-CyclinD 的活性^[5];(2)Kip 家族,包括 P21 等,对 CDK 具有广谱的抑制作用^[6],使 RB 保持去磷酸化结合 E2F 及其它蛋白的状态,从而使细胞周期停滞于 G₁ 期。

骨髓细胞作为一增殖分化旺盛的群体,与细胞周期调控有密不可分的关系。文献[1]对骨髓造血细胞周期进程的研究表明,中等剂量电离辐射可诱导小鼠骨髓细胞发生 G₁ 期阻滞,且呈剂量依赖关系。本研究结果显示,0.5-6Gy X 射线全身照射后 12h 小鼠骨髓细胞 CDK4 无论是从转录水平还是蛋白表达水平均出现不同程度的降低,而且随着剂量的增加这种抑制作用更为明显;经 2Gy X 射线全身照射后,小鼠骨髓细胞 CDK4 基因转录从照射后 4h 开始降低,直至 72h 仍未恢复到对照水平。CDK4 蛋白表达从照射后 2 h 开始就急剧下降,72h 仍未恢复。我们同时观察到 p21 表达的增高(待发表),与文献[6]对电离辐射诱导小鼠胸腺细胞 G₁ 期阻滞所观察到的 p21 的变化相一致,提示 CDK4 的降低可能与 p21 的升高有关。文献[7]认为,p21 能广泛抑制 cyclin-CDK 复合物,从而使该复合物的活性丧失,进而使 RB 蛋白不能磷酸化,使细胞周期停滞于 G₁ 期。同时,Reed^[8]等研究造血细胞系 32D cl 3 时发现,CDK4 的过表达可通过中和 p21 从而使 CDK4、CDK2 保持激酶活性,进而抵抗辐射诱导的 G₁ 期阻滞,进一步证实了 CDK4 激酶活性的降低在电离辐射诱导的细胞周期 G₁ 期阻滞中具有重要作用。

参 考 文 献

- 1 马淑梅, 付士波, 鞠桂芝. 辐射研究与辐射工艺学报, 2000, **18**(2):104—107
MA S M, FU S B, JU G Z. J Radiat Res Radiat Process, 2000, **18**(2):104—107
- 2 Shambrook J, Maniatis T, Fritsch E F *et al*. Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd edit, New York: CSH, 1989
- 3 Kastan M B, Onyekwere O, Sidransky D *et al*. Cancer Res, 1991, **51**:6304—6311
- 4 Tam S W, Theodoras A M, Shag J W *et al*. Oncogene, 1994, **9**:2663—2674
- 5 Khatib Z A, Matsushime H, Valentine M *et al*. Cancer Res, 1993, **53**:5535—5541
- 6 鞠桂芝, 傅海青, 苏旭等. 中华放射医学与防护杂志, 1999, **19**(4):258—260
JU G Z, FU H Q, SU X *et al*. Chin J Radiol Med Prot, 1999, **19**(4):258—260
- 7 CHEN J, Jackson P K, Kirschner M W *et al*. Nature, 1995, **374**:386—388
- 8 Reed M F, LIU V F, Ladha M H *et al*. Oncogene, 1998, **17**(23):2961—2971

EFFECT OF IONIZING RADIATION ON THE CDK4 EXPRESSION IN MOUSE BONE MARROW CELLS

MA Shumei JU Guizhi

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

ABSTRACT To investigate the effect of ionizing radiation on the CDK4 expression in mouse bone marrow cells, Flow cytometry (FCM) and Northern blot were used to analyze the changes in the level of CDK4 mRNA and protein expression respectively after whole body irradiation (WBI) with X rays. The results indicated that both the levels of CDK4 mRNA and protein expression decreased significantly from 2h to 72h after 2Gy X rays. Meanwhile, we found a dose—dependent relationship for these two levels at 12h after irradiation with different doses (0.5, 1, 2, 4, 6Gy). These results suggested that the effect of ionizing irradiation on CDK4 expression maybe have profound significance and desire further research.

KEYWORDS CDK4, Ionizing radiation, Bone marrow cells, G₁ arrest

CLC R811, R332.2, R329.2⁺8