

电离辐射对小鼠胸腺细胞 p16、CyclinD1、CDK4 表达的影响

王晓梅 鞠桂芝 马淑梅 付士波

(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(FCM)检测了不同剂量 X 射线全身照射后,昆明种小鼠胸腺细胞 p16、CyclinD1、CDK4 蛋白表达的时程变化和量效关系。结果表明,2Gy X 射线照射后 8h 小鼠胸腺细胞 p16 表达明显增高,24h 达到峰值,持续至照射后 48h,72h 降至正常水平;CDK4 表达水平在照射后 8h 明显降低,12h 降至最低,照射后 48h 恢复近正常水平;周期蛋白 CyclinD1 表达轻度下调。不同剂量(0.5—4Gy)照射后 p16 蛋白表达随着剂量的增加而增加,2Gy 组与假照射组相比显著增多($p < 0.01$);CDK4 蛋白表达在 2Gy 照射后明显低于假照射组($p < 0.01$);CyclinD1 表达在 0.5—2Gy 照射后可见下降趋势。结果提示:p16/CyclinD1/CDK4/pRb 通路在电离辐射诱导胸腺细胞 G₁ 期阻滞中可能起着十分重要的作用。

关键词 电离辐射, p16, CDK4, CyclinD1

中图分类号 R811, R322.2, R329.2⁺8

细胞增殖失控是导致肿瘤发生的重要因素。因此,细胞周期调控成为生物研究的热点之一。在 G₁/S 调控点,以 Rb 为中心,各种调节组分形成多个调控途径,其中 p16/CyclinD1/CDK4/pRb 负向调控通路研究得比较明确^[1]。而且它与肿瘤的发生^[2]、转移、预后^[3]密切相关。在 G₁/S 转换中起关键作用。我们曾报道电离辐射可诱导胸腺细胞发生 G₁ 期阻滞^[4,5],其分子机制可能主要与 p53/p21 通路有关。为进一步探讨电离辐射诱导 G₁ 期阻滞相关分子机制,本工作观察了 X 射线照射后小鼠胸腺细胞 p16、CyclinD1、CDK4 表达的变化。目前有关电离辐射对正常体细胞 p16、CyclinD1、CDK4 表达影响的报道甚少。

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,白求恩医科大学实验动物室提供。

将动物随机分成假照射组和照射组,每组 15 只(每组 5 个平行样,每个平行样 3 只鼠)。时程实验:2Gy 照射后 4、8、12、24、48、72h 检测;量效实验:0.5、1、2、4、6Gy 照射后 24h 检测,于上述各时间点断头处死小鼠,迅速取胸腺制成单细胞悬液,PBS 洗 2 次后,将细胞悬浮于一 20℃ 70%乙醇中过夜备用。

1.2 主要试剂

一抗:p16 多克隆抗体(rabbit anti-p16 Santa Cruz,美国),CyclinD1 多克隆抗体(rabbit anti-p16 Santa Cruz,美国),CDK4 多克隆抗体(rabbit or goat anti-p16 Santa Cruz,美国)。二抗:羊抗

国家自然科学基金(39770193)资助

第一作者: 王晓梅,女,1967 年出生,1993 年硕士毕业于白求恩医科大学,现读医学博士学位,放射医学专业,副主任医师

收稿日期:初稿 2001—01—08, 修回 2001—02—19

兔 IgG-FITC(goat anti-rabbit IgG-FITC 美国 VECTOR 公司)。

1.3 照射

国产 X 射线深部治疗机,电压 200kV, 电流 10mA, 滤片为 0.5mmCu+1.0mmAl, 剂量率 0.287Gy/min, 靶皮距 56cm;照射剂量:0.5、1、2、4、6Gy。

1.4 蛋白表达测定

采用间接荧光标记法,用 FACSscan 流式细胞仪检测 3 种蛋白表达变化。将在-20℃ 70%乙醇中固定的胸腺细胞用 PBS 洗 2 次,去除乙醇后,每个样品(1×10^6 cells)加入第一抗体 50μL (1:50 稀释),4℃反应 45min,PBS 洗 2 次,加第二抗体 50μL (1:100 稀释),4℃反应 45min, PBS 洗 2 次,加 PBS 100μL,流式细胞仪检测抗体标记阳性细胞百分数。每个样品均设非特异对照,即用 PBS 代替第一抗体,其余步骤相同。每个样品阳性细胞百分数减去非特异对照的阳性细胞百分数即为特异阳性细胞百分数。抗体均为临用前新配制。

1.5 统计分析

实验结果采用 Student's t 检验。

2 结果

2.1 2Gy X 射线全身照射后小鼠胸腺细胞 p16、CyclinD1、CDK4 表达的时程变化

表 1 为 2Gy X 射线全身照射后小鼠胸腺细胞 p16、CyclinD1、CDK4 表达的时程变化。由表 1 可见,2Gy X 射线照射后 8h,胸腺细胞内 p16 蛋白表达显著增多($p<0.05$),24h 达峰值($p<0.01$),72h 恢复至正常水平;细胞周期蛋白 CyclinD1 未见显著改变,仅在 8h 出现轻度的降低,与假照射组相比无显著性差异;CDK4 在照射后 8h 明显降低($p<0.05$),12h 降至最低($p<0.01$),48h 开始回升。

Tab.1 Changes in expression of p16, cyclinD1 and CDK4 in mouse thymocytes at different time after whole-body irradiation with 2Gy X rays ($\bar{x}\pm s$)

Time after irradiation	Percentage of positive cells/%		
	p16	Cyclin D1	CDK4
0	29.89±7.70	17.56±4.47	34.96±7.51
4	25.07±4.25	15.50±5.26	26.39±4.89
8	40.17±1.75 ⁽¹⁾	12.93±1.55	21.98±3.18 ⁽¹⁾
12	34.47±3.59	16.61±7.34	17.46±4.12 ⁽²⁾
24	42.20±3.82 ⁽²⁾	14.93±1.67	23.10±3.44 ⁽¹⁾
48	39.21±1.49 ⁽¹⁾	16.31±4.11	31.54±4.60
72	24.66±4.47	13.95±3.60	26.25±6.28

$n=5(3\times 5=15)$, ⁽¹⁾ $p<0.05$, ⁽²⁾ $p<0.01$ vs Sham-irradiation

2.2 不同剂量照射后 24h 小鼠胸腺细胞 p16、CyclinD1、CDK4 表达的变化

表 2 为不同剂量 X 射线照射后 24h,小鼠胸腺细胞 p16、CyclinD1、CDK4 表达的量效变化。由表 2 可见,0.5-4Gy X 射线照射后 24h p16 蛋白表达随着剂量的增加而增加,1、2、4Gy 组与假照射组相比具显著性差异($p<0.05-p<0.01$)。不同剂量照射后 CyclinD1 表达可见降低趋势,CDK4 表达在 2Gy 组呈显著性降低($p<0.01$)。

Tab.2 Dose effect of expression of p16, cyclinD1 and CDK4 in mouse thymocytes at 24h after whole-body irradiation with different dose X rays ($\bar{x} \pm s$)

D/Gy	Percentage of positive cells/%		
	p16	CyclinD1	CDK4
Sham-irradiation	29.89±7.70	17.56±4.47	34.96±7.51
0.5	34.96±5.77	12.37±0.55	33.68±3.16
1	36.29±5.76 ⁽¹⁾	14.53±7.33	37.23±4.95
2	42.19±3.82 ⁽²⁾	13.61±2.47	23.03±1.91 ⁽¹⁾
4	39.33±5.04 ⁽¹⁾	20.22±1.96	33.65±4.30
6	14.89±1.24	15.36±2.30	35.27±1.55

$n=5(3 \times 5=15)$, $^{(1)}p<0.05$, $^{(2)}p<0.01$ vs Sham-irradiation

3 讨论

随着现代生物技术的发展,人们正从分子水平上逐步揭示细胞周期有序调控机制,其中在G₁→S检查点调节途径中,正向调控是生长因子结合相应的受体刺激Cyclin合成与表达,Cyclin与CDK结合形成激酶复合体,使pRb磷酸化,释放E2F因子,使细胞进入S期。负向调控中以p53为中心的p53/p21通路、p53/GADD45通路和以Rb为中心的p16/cyclinD1/CDK4/pRb通路起极其重要的作用。p16是CDK4/CDK6特异抑制剂,它的氨基末端具有与CyclinD1的周期素盒编码区同源的区域,因此与CyclinD1竞争CDK4/CDK6,抑制其活性,不能使pRb磷酸化,阻止细胞从G₁期进入S期。p16与CyclinD1对G₁→S调控点的正、负调控中需要有一个量的平衡^[1]。

G₁期阻滞是机体对外界刺激的一种保护性反应,国内、外学者发现电离辐射诱导细胞发生G₁期阻滞^[4,6],且依赖于野生型p53的存在,其可能的机制是电离辐射损伤DNA→激活p53,主要通过p53/p21通路使细胞停滞在G₁期。文献[7]报道人皮肤受UV照射可引起p16蛋白表达增多,表明辐射损伤的DNA分子也可以激活Ink4a(p16基因)基因,导致p16蛋白堆积。Valenzuela^[8]等发现离体人肿瘤细胞在电离辐射或增温作用后,无p53功能细胞(G₁期阻滞异常)比有p53功能细胞(G₁期阻滞正常)p16蛋白表达量明显增高,这种趋势在所研究的细胞系中皆存在。启发人们另一条负向调控通路p16/cyclinD1/CDK4/pRb可能在辐射诱导的G₁期阻滞中起作用。本实验结果发现,X射线照射后8—48h引起小鼠胸腺细胞p16表达显著增高,而且与受照射剂量(1—4Gy)呈依赖性增加。CyclinD1在照射后轻度降低。2Gy照射后8—24hCDK4表达显著减少。电离辐射诱导的p16增加和CDK4减少与傅海青等^[2]报道的G₁期阻滞发生的时间相平行,说明在辐射诱导的正常体细胞G₁期阻滞中,p16表达增多,使CyclinD1—CDK4复合体急剧减少,pRb无法磷酸化,细胞停滞在G₁期。结果提示,除了p53/p21通路外道,p16/CyclinD1/CDK4/pRb通路可能在辐射诱导的G₁期阻滞中起着十分重要的作用。

参 考 文 献

1 隗月. 国外医学分子生物学分册, 1998, 20(1): 10—13
KUI Y. Foreign Med Sci Sect Mol Biol, 1998, 20(1): 10—13

2 罗丹, 刘启福, 苏建华 等. 中华肝脏病杂志, 1999, 7(2): 94—95

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

- LUO D, LIU Q F, SU J H *et al.* Chinese J Liver Disease, 1999, **7**(2): 94—95
- 3 陈晓峰, 苏晋梅, 周清华 等. 长治医学院学报, 1998, **12**(1): 7—9
- CHEN X F, SU J M, ZHOU Q H *et al.* J Changzhi College of Med Sci, 1998, **12**(1): 7—9
- 4 傅海青, 鞠桂芝, 苏旭 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2000, **18**(2): 86—89
- FU H Q, JU G Z, SU X *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2000, **18**(2): 86—89
- 5 马淑梅, 傅士波, 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
- 6 Dimitrijevic B M, Balzaretto M V, Gadbois D M. Cancer Res, 1999, **59**(19): 4843—4847
- 7 Sandra P, Sinead C, Terry R *et al.* Cancer Res, 1999, **59**: 4185—4189
- 8 Valenzuela M T, Nunez M I, Villalobos M *et al.* Int J Cancer, 1997, **72**(2): 307—312

EFFECT OF IONIZING RADIATION ON EXPRESSIONS OF p16、CyclinD1 and CDK4 IN MOUSE THYMOCYTES

WANG Xiaomei JU Guizhi MA Shumei FU Shibo

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

ABSTRACT Using flow cytometry (FCM), The changes in expressions of p16, CyclinD1 and CDK4 in the thymocytes of mice treated with different doses of whole-body irradiation or with a fixed dose and different post-irradiation intervals were analyzed. The results showed that the expression of p16 protein in mouse thymocytes began to increase significantly at 8h after 2Gy X irradiation, reached the peak level at 24h, kept a high level until 48h, and recovered at 72h. The CDK4 protein expression decreased at 8h after 2Gy irradiation, reached the bottom level at 12h, and recovered at 48h. The expression of CyclinD1 protein showed a little reduction only after 2Gy irradiation. Overexpression of p16 depended on the doses of radiation (0.5—4Gy). The expression of p16 in 2Gy group was significantly increased in comparison with that in the sham-irradiated group ($p < 0.01$). The reduction of CDK4 expression was significant in 2Gy group ($p < 0.01$). CyclinD1 expression showed its decrease after 0.5—2Gy irradiation. These results suggested that p16/CyclinD1/CDK4/pRb pathway might play an important role in G1 arrest of thymocytes induced by ionizing radiation.

KEYWORDS Ionizing radiation, p16, CDK4, CyclinD1

CLC R811, R332.2, R329.2⁺8