

X 射线诱导 CREB 活化及其 与 cAMP 通路的关系

何淑杰 谢 风 刘树铮

(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 检测 X 射线全身照射对小鼠胸腺细胞内 CREB 的 DNA 结合活性的影响和 cAMP/cGMP 比值的变化,并探讨照射后 CREB 的活化与 cAMP 通路的关系。采用电泳移动变化分析及竞争性蛋白结合分析法分别检测了胸腺细胞内 CREB 的 DNA 结合活性和 cAMP、cGMP 含量的变化。结果表明,大剂量照射(0.5—6.0 Gy)诱导 CREB 的 DNA 结合活性明显升高,2 Gy 照射后最显著;cAMP/cGMP 比值也表现为剂量依赖性的显著增加。0.075 Gy 照射后,CREB 的 DNA 结合活性短暂下降后轻度增强,cAMP/cGMP 比值下降,24h 达最低值。说明低水平辐射诱导的 CREB 活性短暂下降后的轻度增强,可能不通过 cAMP 通路;较高剂量 X 射线诱导的 CREB DNA 结合活性的明显增强,则主要通过 cAMP 通路。

关键词 全身照射,胸腺细胞,转录因子,CREB,cAMP/cGMP 比值

中图分类号 R811, R322.5⁺3, R329.2⁺8, Q52

电离辐射诱导多种特异基因的表达均涉及到基因的转录调节。转录调节在 DNA 损伤的修复、细胞的增殖及其它的细胞功能中起重要作用,而这个过程需要能与特异的 DNA 结合的转录因子的活化。CREB 为 cAMP 反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, 简称 CREB),在辐射诱导的基因转录中起怎样的调节作用,有关报道甚少。本文就整体照射后小鼠胸腺细胞内 CREB DNA 结合活性及 cAMP/cGMP 比值的时程变化及剂量效应关系进行了研究,以探讨全身照射对小鼠胸腺细胞基因转录调节的影响及其活化的信号通路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雄性昆明小鼠,体重 20 ± 2 g,购自白求恩医科大学实验动物部。动物随机分为对照组和不同剂量照射组或 2Gy、0.075Gy 照射后不同时间组。

1.2 照射条件及实验分组

国产 X·S·S·205(FZ)型固定式 X 射线深部治疗机,电压为 200kV,电流为 10mA,滤板为 0.5mmCu 和 1.0mmAl。照射组分别给予 0.05、0.075、0.1、0.2Gy 和 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0Gy 全身照射,剂量率分别为 12.5mGy/min 和 0.287Gy/min,靶皮距相应为 247.3cm 和 56cm,对照组给予假照射。

不同剂量照射组动物,于照射后 12h 断头处死;0.075Gy 和 2Gy 照射后不同时间组动物,在不同时间照射,同时断头处死。剂量效应组、0.075Gy 时程组及 2Gy 照射后 12h 内各时间点动物均为 5 只,2Gy 照射后 24h、48h 动物分别为 8 只和 12 只。

国家自然科学基金(39570188)资助

第一作者:何淑杰,女,1967 年出生,1991 年 7 月毕业于白求恩医科大学临床医学专业,医学博士,主治医师

收稿日期:初稿 2000—08—28, 修回 2001—02—19

1.3 核蛋白的提取

断头处死小鼠后,立即取胸腺,置 0.01mol/L PBS 中,毛玻片挤压,制成单细胞悬液。在冰上进行以下步骤:PBS 洗涤细胞两次,细胞沉淀内加入 $100\mu\text{L}$ 胞浆蛋白提取液(10mmol/L HEPES, $\text{pH}7.9$, 1.5mmol/L MgCl_2 , 10mmol/L KCl , 10mmol/L Na_2MoO_4 , 0.1mmol/L Na_3VO_4 , 20mmol/L β -Glycerophosphate, 1mmol/L DTT, 0.5mmol/L PMSF, $5\mu\text{g/mL}$ Aprotinin, $5\mu\text{g/mL}$ Leupeptin),冰浴 30min ,加入 $6\mu\text{L}$ 10% NP-40,冰上 2min 后, 4°C 13000r/min 离心 35s 。所得沉淀加 $60\mu\text{L}$ 核蛋白提取液(20mmol/L HEPES, $\text{pH}7.9$, 1.5mmol/L MgCl_2 , 0.4mmol/L NaCl , 10mmol/L Na_2MoO_4 , 0.1mmol/L Na_3VO_4 , 20mmol/L β -Glycerophosphate, 25% glycerol, 1mmol/L DTT, 0.5mmol/L PMSF, $5\mu\text{g/mL}$ Aprotinin, $5\mu\text{g/mL}$ Leupeptin),冰上反应 60min 后, 13000r/min 离心 10min ,上清即核蛋白,分装, -70°C 保存备用。

1.4 蛋白质浓度测定

采用考马斯亮兰 G-250 染色法,用牛血清白蛋白制作标准曲线,测量样品在 595nm 处的吸光度。

1.5 凝胶电泳迁移率变化分析(EMSA)

采用末端标记法,在 T4 多核苷酸激酶作用下,用 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 标记同源寡核苷酸,序列为 GGGACTTTCC。经乙醇沉淀法纯化,液闪计数仪(瑞典 LKB1214 型)测定标记率为 35% 。结合反应体系包含 $7\mu\text{g}$ 核蛋白, $1\mu\text{g}$ poly(dI·dC),放射性标记探针 $2\mu\text{L}$,室温反应 20min 。用 25 倍量未标记寡核苷酸进行特异性抑制试验确证结合的特异性。特异结合蛋白经 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电泳缓冲液为 $0.5\times\text{TBE}$, 100V 恒定电压,电泳 3h 。干胶后用 PhosphorImager(美国 M-D 公司)扫描,并分析各特异带光密度。

1.6 胸腺细胞 cAMP 样品制备

照射后不同时间取胸腺,迅速置于液氮中。每组 6 个样品,称重。用预冷的 1mol/L 高氯酸作为匀浆液,匀浆,离心去沉淀。用 $20\%\text{KOH}$ 中和后再离心去沉淀。取全部上清在 $70\text{--}75^\circ\text{C}$ 水浴上蒸干,干渣重溶于适量 TE 缓冲液,测 cAMP。

1.7 胸腺细胞 cGMP 样品制备

照射后不同时间取胸腺,迅速至于液氮中。每组 6 个样品,称重后置于匀浆器中,然后加 0.6mL 预冷的 10% 三氯乙酸,匀浆,离心去沉淀。用 4 倍体积的水饱和乙醚洗提 4 次,以去除过量的三氯乙酸,吸出乙醚,置 60°C 水浴上蒸干, $0\text{--}4^\circ\text{C}$ 冰箱保存。蒸干的样品溶于适量的乙酸钠缓冲液,测 cGMP。

用竞争性蛋白结合分析法检测 cAMP、cGMP 含量。cAMP、cGMP 标准溶液的配制及样品的检测顺序均按试剂盒说明书操作(中国原子能科学研究院)。其标准曲线经 logit 转换,线性良好, $r < -0.981$ 。

2 结 果

2.1 2Gy 和 0.075Gy X 射线全身照射后胸腺细胞内 CREB 活性的时程变化

如图 1a 及图 1b 所示,假照射组 CREB 即有组成性的低水平活性。 2Gy 照射后 1h CREB 的 DNA 结合活性即开始增强,至照射后 4h 达峰值,为假照射组的 5.2 倍,随后逐渐回降,但仍呈高水平活化状态,持续至照射后 48h ,回降至假照射组的 2 倍。 0.075Gy 照射后,CREB 的 DNA 结合活性(如图 1b 及图 1c 所示),于 1h 有短暂降低, $2\text{--}4\text{h}$ 略增强,为假照射组的 1.27

—1.32 倍，随后缓慢回降，24h 后恢复正常。竞争抑制分析表明 CREB 的 DNA 结合活性为特异性的。

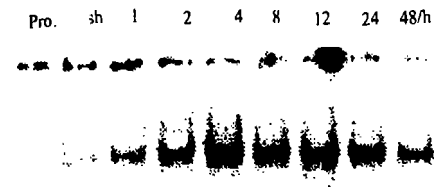


Fig. 1a Effect of WBI with 2Gy X rays on activity of CREB in thymocytes
Pro; Probe sh sham—irradiation

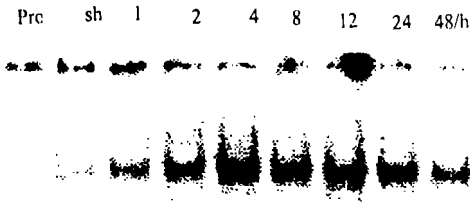


Fig. 1b Effect of WBI with 0.075Gy X rays on activity of CREB in thymocytes
Pro; Probe sh sham—irradiation

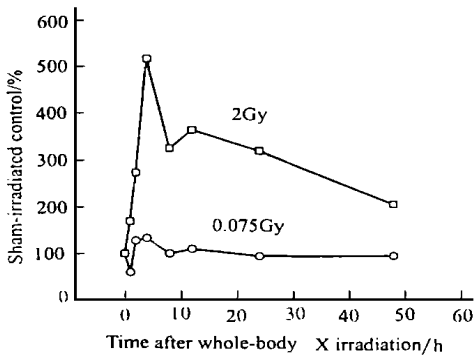


Fig. 1c Time course of CREB binding activity in thymocytes

2.2 胸腺细胞内 CREB 活性的剂量效应变化

图 2a 显示了不同剂量 X 射线全身照射后 12h 胸腺细胞内 CREB 的 DNA 结合活性的变化。由图 2b 可见，在低剂量范围内，0.05Gy 及 0.075Gy X 射线可诱导 CREB 的 DNA 结合活性轻度增强，0.1Gy 时活性下降。当剂量高于 0.5Gy 时，CREB 活性明显增强，尤以 2Gy 照射后明显，为假照射组的 2.8 倍。结果表明，照射后 12h 各剂量组中，CREB 活性表现为 S 型曲线，即低剂量照射后下降，高剂量照射后上升。

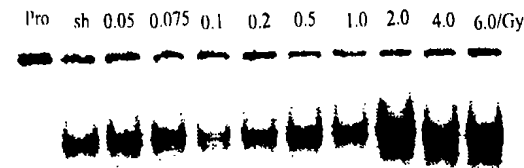


Fig. 2a Dose—effect relationship of activity of CREB in thymocytes measured 12h after WBI with different doses of X rays
Pro; Probe sh sham—irradiation

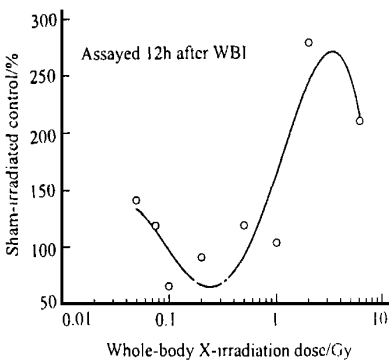


Fig. 2b Dose—effect curve of CREB binding activity in thymocytes

2.3 2Gy 和 0.075 Gy X 射线照射后胸腺细胞内 cAMP/cGMP 比值的时程变化

由图 3 可见, cAMP/cGMP 比值在 2 Gy 照射后迅速升高, 至 8h 已显著高于假照射组水平 ($p<0.01$), 至 48h 达所测时程内的最高值 ($p<0.001$)。cAMP/cGMP 比值在 0.075Gy 照射后 2h 即低于假照射组水平, 12h 降低显著 ($p<0.05$), 至 24h 降至最低值 ($p<0.001$)。48h cAMP/cGMP 比值开始回升, 接近于假照射组水平。以上结果提示, 较高剂量照射诱导 cAMP/cGMP 比值升高, 低剂量照射诱导 cAMP/cGMP 比值下降。

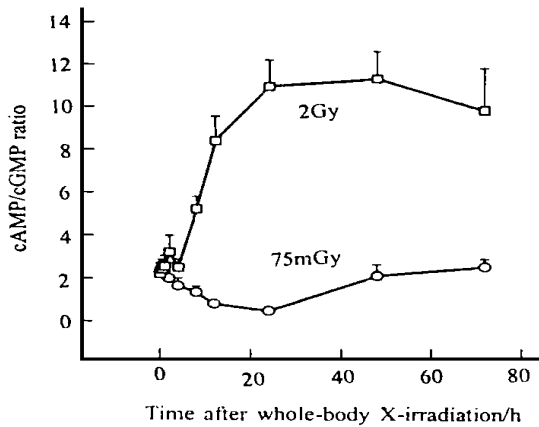


Fig.3 Time course of thymocyte cAMP/cGMP ratio after W

2.4 cAMP/cGMP 比值的剂量效应变化

由图 4 可见, 低剂量 X 射线全身照射后 24h 胸腺细胞内 cAMP/cGMP 比值下降; 当剂量高于 0.5Gy 时, cAMP/cGMP 比值呈剂量依赖性升高, 表现为 J 型曲线。0.075Gy 及 0.1Gy 的低剂量照射后 cAMP/cGMP 比值显著下降 ($p<0.01$); 而 2Gy 和 4Gy 的高剂量却明显诱导 cAMP/cGMP 比值升高 ($p<0.001$)。

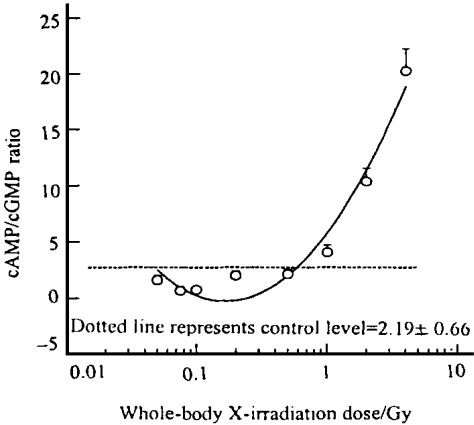


Fig.4 Thymocyte cAMP/cGMP raatio 24h after WBI

3 讨 论

在静止的和激活的正常鼠胸腺细胞内, CREB 总水平相等。静止的胸腺细胞主要含有未磷酸化的 CREB, 胸腺细胞的活化导致 CREB 的迅速磷酸化及活化, 且 CREB 磷酸化为正常 T 细胞的活化所必需^[1]。长期以来人们一直接受 Barton 等的这种观点, 即认为 CREB 的表达是

组成性的,通过其 Ser¹³³磷酸化来调节其转录调节活性。现在,有越来越多的数据表明,CREB 在常规状态下有低水平活性,外环境刺激可诱导其转录水平及活性均增强,并存在自身正向调节作用^[2]。整体照射可诱导多种特异基因的表达,其中是否涉及 CREB 的转录调节以及是否通过 PKA 通路尚不清楚,因此,我们进行上述实验来检测电离辐射全身作用后,鼠胸腺细胞内 CREB 活性及 cAMP/cGMP 比值的变化,以探讨辐射全身作用对 CREB 转录调节的影响及 CREB 与 cAMP 通路之间的关系。

我们在时程实验中观察到 2Gy 照射后 CREB 的 DNA 结合活性迅即增高,于 4h 即达峰值,在观察的 48h 内逐渐回降,但始终高于对照。在此过程中,照射后 12h 的数值居于最高和最低值之间,故在量效实验中取 12h 测定各剂量的效应,以便观察不同剂量可能引起的不同方向的改变。我们的实验表明,整体照射条件下,较高剂量诱导的 CREB 活性增强持续时间较长,而胸腺细胞内的 cAMP/cGMP 比值及 PKA 水平也表现为持续升高^[3]。提示较高剂量辐射诱导 CREB 活性的增强,是通过 cAMP 介导的 PKA 通路。Coven E 等表明,在 C6 神经胶质瘤细胞内,cAMP 通路的活化上调 CREB 的表达^[4]。Forskolin(细胞内 cAMP 增加剂)能够诱导 PC12 细胞内 CREB 磷酸化,却不能诱导 B 细胞内 CREB 磷酸化^[5]。然而,这些结果与文献^[6]的观察结果却并不一致,通过热休克或地塞米松处理大鼠胸腺细胞诱导凋亡模型,发现在这两种凋亡模型中 CREB 活性均下调。说明不同的细胞在不同的刺激条件下,其转录因子的反应存在着明显的差别。

低剂量 X 射线照射使 CREB DNA 结合活性在短暂下降后轻度升高,却伴随着 cAMP/cGMP 比值水平和 PKA 活性的显著下降,在此条件下它们之间的关系尚待进一步研究^[7]。而此时 PKC 活性增强,Ca²⁺增多^[7],是否低剂量辐射诱导的 CREB 活性轻度升高,不通过 PKA 通路,而通过 PKC 通路使 CREB 适当活化,尚待证实。

Muthusamy N 等表明,TCR 受激导致 CREB 上 Ser¹³³的快速磷酸化和 CREB 的活化,经过涉及 p56lck、PKC、Ras、Raf-1、MEK 和 RSK2 活化的信号通路,因此 CREB 的磷酸化在正常 T 细胞的活化过程中具有重要作用^[8]。所有这些资料均反映出 CREB 及 cAMP 通路在细胞类型及对外部刺激的反应上存在的差异。适当活化的 CREB 可以促进细胞的增殖和活化,为细胞的正常功能所必需^[1],对 AP-1 的正常诱导、随后 IL-2 的产生及细胞周期进程均有重要作用。因而低剂量照射通过活化 CREB 等转录因子对免疫兴奋效应可能起正向调节作用^[9],而高剂量辐射通过 cAMP/PKA 通路诱导 CREB 的高水平持续活化,却可能参与细胞凋亡信号的诱导,或与 p53 协同作用促进细胞凋亡。

参 考 文 献

- 1 Barton K, Muthusamy N, Chanyangem M *et al*. *Nature*, 1996, **379**(4):81—85
- 2 Crosson S M, Davies G F, Roesler W J. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **227**:915—920
- 3 LIU S Z, XIE F. *Chin Med Sci J*, 2000, **15**(1):1—7
- 4 Coven E, Ni Y, Widnell K L *et al*. *J Neurochem*, 1998, **71**:1865—1874
- 5 XIE H, Rothstein T L. *J Immunol*, 1995, **154**:1717—1723
- 6 Sikora E, Grassilli E, Radziszewska E *et al*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **197**(2):709—715
- 7 LIU S Z. *Human Ecol Risk Assessment*, 1998, **4**(5):1217—1254
- 8 Muthusamy N, Leiden J M. *J Biol Chem*, 1998, **273**:22841—22847
- 9 刘树铮. 低水平辐射兴奋效应. 北京:科学出版社,1996. 299—311

ACTIVATION OF CREB INDUCED BY X RAYS AND ITS RELATIONSHIP WITH cAMP SIGNAL PATHWAY

HE Shujie XIE Feng LIU Shuzheng

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

ABSTRACT To measure the changes in DNA binding activity of CREB and the ratio of cAMP/cGMP in thymocytes after whole body irradiation (WBI) with X rays, as well as to discuss the relationship of the activation of CREB with cAMP signal pathway. Changes in DNA binding activity of CREB and the concentration of cAMP and cGMP in mouse thymocytes were respectively assayed by electrophoresis mobility shift assay (EMSA) and competitive protein binding assay. The increased activity of CREB DNA-binding was upregulated after irradiation with larger doses of X rays (0.5—6.0 Gy), with the upregulation being most significant after irradiation with 2.0 Gy X rays. Following WBI with 0.075 Gy, there was only a brief decrease followed by slight increase in the DNA binding activity of CREB, while the decrease in cAMP/cGMP ratio reached the lowest value at 24h. These results suggested that the slight increase in the DNA binding activity of CREB observed after irradiation with 0.075 Gy may not involve the cAMP signal pathway, while the latter was probably involved in the marked increase in the DNA binding activity of CREB induced by WBI with higher doses of X rays.

KEYWORDS Whole-body X irradiation, Thymocytes, Transcription factor, CREB, cAMP/cGMP ratio

CLC R811, R322.5⁺3, R329.2⁺8, Q52