

between the intensities of the bands corresponding to the amplified products. The test for characterizing the MDR1 expression offers high sensitivity and specificity and is therefore of great

clinical relevance.

Key words competitive RT-PCR, MDR1 (multidrug resistance) gene, tumor cells

低剂量辐射激活小鼠脾细胞 CREB 及 NF- κ B^{*}

陈沙力 刘树铮

(白求恩医科大学放射生物教研室, 长春 130021)

摘要 采用凝胶电泳迁移率变化分析和寡核苷酸竞争抑制方法检测低剂量 X 射线整体照射对小鼠脾细胞基因转录调控的影响. 75 mGy X 射线全身照射小鼠后 4 h, 脾细胞核蛋白提取物的 CREB 及 NF- κ B 与其基因启动部位增强子控制序列的结合活性较相同浓度的对照核蛋白提取物分别增强 7 倍及 5 倍. 竞争抑制试验证实 CREB 及 NF- κ B 与其控制序列特异地结合. 提示低剂量 X 射线全身照射选择性地激活脾细胞 CREB 及 NF- κ B, 通过与增强子控制序列位点的结合, 特异地诱导基因转录, 从而引起功能激活.

关键词 低剂量辐射, 脾细胞, CREB, NF- κ B, 转录水平调控

学科分类号 Q691

电离辐射作用于哺乳动物细胞可通过多种可能的调节机制控制基因表达^[1]. 主要包括转录因子与基因启动子特定部位或 RNA 多聚酶结合、转录后修饰和翻译后修饰等. 目前低剂量整体照射条件下转录调控及转录因子活性的变化尚缺乏研究, 探讨转录因子对控制序列识别机制具有重要意义. cAMP response element binding protein (CREB) 及 nuclear factor kappa B (NF- κ B) 是多功能转录因子, 在细胞信号传递过程中通过与增强子控制序列位点的结合, 参与许多特异基因的转录调节. 为了观察辐射后转录因子结合活性的变化, 采用凝胶电泳迁移率变化分析 (gel electrophoresis mobility shift assay, EMSA) 和寡核苷酸竞争抑制方法对低剂量 X 射线全身照射激活小鼠脾细胞转录因子 CREB 及 NF- κ B 的变化进行了分析, 现将结果报告如下.

1 材料与方法

1.1 动物及照射条件

健康雄性昆明系小鼠, 体重 18~22 g. 采

用 Philips 深部 X 射线机照射动物, 电压 220 kV, 电流 10 mA, 滤板 0.5 mmCu, 1.0 mmAl, 靶皮距离 212 cm. 单次全身照射, 剂量率 12.5 mGy/min, 照射剂量 75 mGy.

1.2 小鼠脾细胞悬液的制备

于照射后 4 h 断头处死小鼠, 取脾置 RPMI 1640 培养液中, 毛玻片挤压, 制成单细胞悬液, 200 目尼龙网过滤, 去除结缔组织, 1 000 r/min 离心 5 min, 沉淀细胞加 10 倍体积的红细胞裂解液, PBS 洗涤 2 次. 同时制备正常细胞悬液作为对照.

1.3 细胞核分离及蛋白质提取

在 4℃ 条件下将细胞悬于 5 倍容积的 A 液 [10 mmol/L HEPES (pH 7.9), 1.5 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L DTT] 中, 放置 10 min, 2 000 r/min 离心 10 min, 将沉淀细胞悬于 2 倍细胞体积的 A 液中, 用匀浆器破碎细胞, 2 000 r/min 离心 10 min, 沉

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (39270207).

收稿日期: 1997-02-03, 修回日期: 1997-07-17

淀物 (细胞核) 用 A 液洗涤 1 次, 1 500 r/min 离心 20 min, 每 10^9 细胞的沉淀物悬于 3 ml B 液 [20 mmol/L HEPES (pH 7.9), 0.42 mol/L NaCl, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L PMSF, 0.5 mmol/L DTT, 25% 甘油] 中, 匀浆至细胞核破碎, 将匀浆物置磁力搅拌器上搅拌 30 min, 1 500 r/min 离心 30 min, 上清为细胞核蛋白提取物, 用 50 倍细胞体积的 C 液 [20 mmol/L HEPES (pH 7.9), 100 mmol/L KCl, 0.2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L PMSF, 0.5 mmol/L DTT, 20% 甘油] 透析过夜, 透析物 1 500 r/min 离心 20 min, 上清分装, -70°C 保存备用^[2].

1.4 蛋白质浓度测定

采用 Folin 酚试剂法, 用 BSA 作标准.

1.5 凝胶电泳迁移率变化分析

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 分别标记能与不同转录因子结合的顺式反应元件 NF- κ B、CREB、AP1、SP1、GRE 及 OCT1 双股寡核苷酸控制序列 (Promega 产品), 经 G-25 葡聚糖凝胶柱纯化. 结合反应体系包含 5~20 μg 细胞核蛋白质提取物, 2 μg poly (dI·dC) (Pharmacia 产品), $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 标记的寡核苷酸控制序列探针 2 μl (每微升每分钟放射性计数值为 50 000), 于 22°C 孵育 20 min. 竞争法步骤是: 细胞核蛋白质提取物 15 μg , 预先与 25~50 倍过量未标记的寡核苷酸控制序列作用 5 min, 然后加入 ^{32}P 末端标记的探针. 采用 5% 聚丙烯酰胺凝胶 (acrylamide:bis 20:1 重量比) 进行电泳, 电泳缓冲液为 7 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 3 mmol/L 乙酸钠和 1 mmol/L EDTA. 上下槽电极液循环 10 ml/min. 电压为 100 V. 当未结合探针迁移到凝胶下部时结束电泳. 干胶后进行放射自显影及光密度扫描定量^[3].

2 结 果

75 mGy X 射线全身照射小鼠后 4 h, 脾细

胞核的转录因子 CREB 与其基因转录启动部位

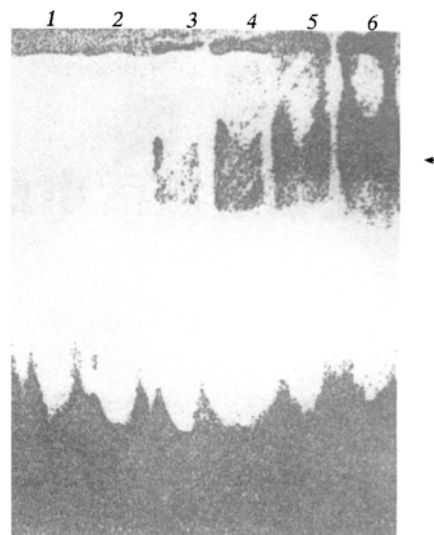


图 1 小鼠脾细胞转录因子 CREB 结合活性的变化

1: 未加蛋白的阴性对照; 2、3: 加对照组蛋白, 含量分别为 10、20 μg ; 4~6: 加照射组蛋白, 含量分别为 5、10、20 μg ; 箭头示阻滞区带.

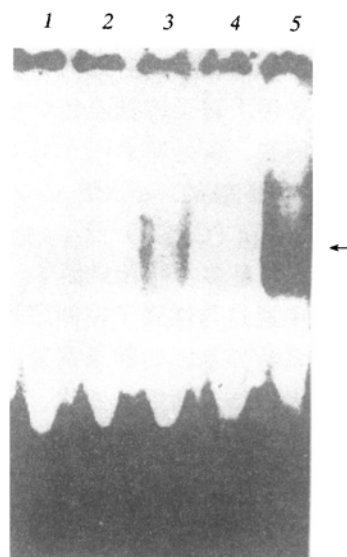


图 2 小鼠脾细胞转录因子 NF- κ B 结合活性的变化

1: 未加蛋白的阴性对照; 2、3: 加对照组蛋白, 含量分别为 10、20 μg ; 4、5: 加照射组蛋白, 含量分别为 10、20 μg ; 箭头示阻滞区带.

的控制序列的结合活性较相同核蛋白浓度的假照射对照明显增强 (图 1). 经光密度扫描证实, CREB 的结合活性随细胞核蛋白浓度的增加而增大, 较同等浓度的假照射对照相应核蛋白增强 7 倍. 结果提示, 低剂量 X 射线照射小鼠后, 脾细胞核的转录因子 CREB 结合活性明显增强, 从而启动特异性基因转录, 表现出生物学效应. 同时脾细胞核的转录因子 NF- κ B 与其控制序列的结合活性较同等浓度的假照射对照相应核蛋白增强 5 倍 (图 2). 而转录因子 SP1、AP1、GRE 及 OCT1 无明显变化. 以上结果提示低剂量 X 射线照射小鼠后, 主要激活小鼠脾细胞转录因子 CREB 及 NF- κ B, 从而诱导基因转录启动, 可能是低剂量辐射兴奋效应重要的转录水平调控方式.

用过量未标记 CREB 及 NF- κ B 寡核苷酸分别进行的竞争抑制试验表明 (图 3, 4), 未加蛋白提取物则无阻滞带出现; 不加未标记的寡核苷酸则出现明显的阻滞带, 加入 25 至 50 倍过量未标记寡核苷酸后, 结合活性可被部分

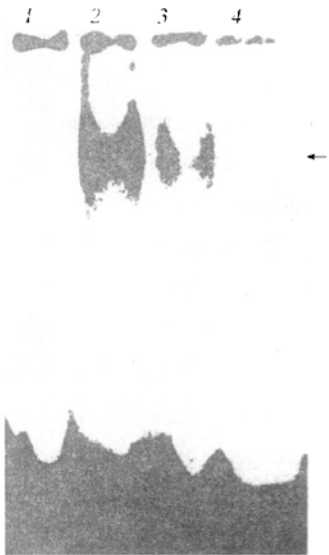


图 3 未标记 CREB 寡核苷酸竞争抑制的结果
1: 未加蛋白的阴性对照; 2: 无未标记寡核苷酸的阳性对照; 3、4: 分别加 25、50 倍过量的未标记寡核苷酸; 箭头示阻滞区带.

或全部抑制, 阻滞带明显减弱或消失. 表明转录因子 CREB 及 NF- κ B 与其控制序列特异性结合.

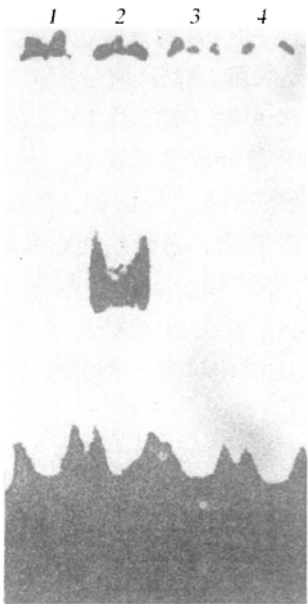


图 4 未标记 NF- κ B 寡核苷酸竞争抑制的结果
1: 未加蛋白的阴性对照; 2: 无未标记寡核苷酸的阳性对照; 3、4: 分别加 25、50 倍过量的未标记寡核苷酸; 箭头示阻滞区带.

3 讨 论

NF- κ B 是一种多功能转录因子, 在细胞浆中以 p50 和 p65 异源性二聚体形式与无活性的调节亚单位 I κ B 形成复合物^[4], 在细胞核、细胞浆信号传递过程中参与许多特异基因的转录调节. 在刺激因素作用下, 细胞信号传递系统发生一系列生物化学变化, 包括磷脂酶 C (PLC) 的激活, 磷脂酰肌醇二磷酸 (PIP₂) 的水解, 产生第二信使, 如肌醇三磷酸 (IP₃) 和二酰基甘油 (DG). 这两个第二信使导致了细胞内游离钙离子的增多和 PKC 的激活, 经过一系列磷酸化过程, NF- κ B 与 I κ B 解离, 由细胞浆转入细胞核, 识别并与免疫球蛋白的 κ 轻链的增强子区的一个 116 bp 特异性 DNA 基

序结合并诱导特定的基因转录^[5,6]。我室实验证实未照射的正常胸腺细胞浆中存在一较低分子质量的阻滞带,照射后则消失。而细胞核在照射后则出现明显的阻滞带(未发表资料)。这一结果支持 NF- κ B 的核转位论点。

CREB 是细胞 cAMP 信号传递系统的转录因子,在体外可被 PKC 及 PKA 磷酸化而激活。在 cAMP 信号传递系统中, cAMP 通过经典的方式激活 PKA,从而使 CREB 的第 123 位的丝氨酸磷酸化、磷酸化的 CREB 与基因调控特定部位 CRE 结合,调控基因转录^[7]。值得注意的是在辐射后 CREB 的激活是通过 PKC 介导的磷酸化过程,而并非由 PKA 所介导^[3]。

辐射诱导基因转录是十分复杂的过程,可能有许多信息传递通路及转录因子参与。不同剂量范围的辐射可能诱导不同的基因系列表达,通过不同的信号传递通路和转录因子,产生不同的效应。细胞类型的反应特点对上述效应产生明显的影响^[8]。低剂量 X 射线全身照射明显激活小鼠脾细胞 CREB 及 NF- κ B,从而诱导基因转录启动,可能是低剂量辐射兴奋效应重要的转录水平调控方式。

参 考 文 献

- Boothman D A, Lee S W. Regulation of gene expression in mammalian cells following ionizing radiation. *Yokohama Med Bull*, 1991, **42**: 137~ 149
- Dignam J D, Lebovitz R M, Roeder R G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*, 1983, **11**: 1475~ 1489
- Sahijdak W M, Yang C R, Zuckerman J S *et al.* Alteration in transcription factor binding in radioresistant human melanoma cells after ionizing radiation. *Radiat Res*, 1994, **138**: S47~ 51
- Leonardo M J, Baltimore D A. Pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell*, 1989, **58**: 227~ 229
- Liu S Z, Su X, Zhang Y C *et al.* Signal transduction in lymphocytes after low dose radiation. *Int J Occup Med Toxicol*, 1994, **3** (2): 107~ 117
- Sen R, Baltimore D A. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a post-translational mechanism. *Cell*, 1986, **47**: 921~ 928
- 杨, 于秉治. 蛋白激酶 C 研究的最新进展. *生物化学与生物物理进展*, 1994, **21** (4): 308~ 312
- 陈沙力, 刘树铮. 蛋白质-DNA 相互作用与辐射诱导的基因转录. *国外医学·放射医学核医学分册*, 1996, **20** (2): 78~ 82

Activation of Transcription Factors CREB and NF- κ B in Mouse Spleen by Low Dose Radiation. CHEN Sha-li, LIU Shu-zheng (*Department of Radiation Biology, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021, China*).

Abstract The effect of whole-body irradiation (WBI) on transcriptional regulation in mouse spleen was studied using gel electrophoresis mobility shift assay (EMSA) and oligonucleotide competitive inhibition analysis. Binding of nuclear protein extract from splenic cells to [γ -³²P] ATP labeled CREB and NF- κ B consensus sequences was found to be increased 4 h after WBI with 75 mGy X-rays, being 7 and 5 times higher, respectively, than that of the sham-irradiated control. Competitive inhibition analysis with excessive amount of unlabeled consensus sequences completely blocked the binding in corresponding EMSA, demonstrating the specificity of the reaction. The results suggest that low dose WBI could selectively activate the transcription factors CREB and NF- κ B, which would induce specific gene transcription in the splenic cells leading to their functional activation.

Key words low dose radiation, spleen, CREB, NF- κ B, transcriptional regulation