1994. 141~144

- 9 王革娇. 植物遗传转化技术手册. 见: 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣主编. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 157~161
- 10 Hobbs S L A, Kpodar P, Delong C M O. The effect of T —DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant Mol Biol*, 1990, 15: 851~864
- 11 Smith H A, Swaney S L, Parks T D, et al. Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: Expression, regulation and fate of nonessential RNAs. *Plant Cell*, 1994, 6: 1441~1453

(1997-11-29 收稿, 1998-02-10 收修稿稿)

Wortmannin 和 3_AB 对辐射所致细胞 G2 期阻滞及 MPF 活性抑制的影响

孟祥兵 孙志贤

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 p34^{cdc2}与周期蛋白 B(Cyclin B)形成的有丝分裂促进因子(mitosis promoting factor, MPF)的激酶活性是细胞由 G2 期进入 M 期所必需的. 近来研究表明, 电离辐射引起 MPF 活性抑制是细胞 G2 期阻滞的重要机制. 低剂量照射主要引起 p34^{cdc2}不能及时脱磷酸化, 而不是引起周期蛋白 B 的表达或与 p34^{cdc2}形成 MPF 受到抑制, 但 DNA 损伤与 MPF 之间的信号传递途径尚不清楚. 研究表明, PI3 激酶家族抑制剂 Wortmannin (Wort) 和 PARP 特异抑制剂 3_AB 可以部分消除 2Gy γ 射线引起的 G2 期阻滞. 免疫沉淀分析也表明, Wort 和 3_AB 可促进受照细胞的 p34^{cdc2}及时脱磷酸. 这些观察表明, wort 敏感的途径及 PARP 参与了辐射引起的 G2 期阻滞信号传递的起始过程.

关键词 G2 期阻滞 电离辐射 MPF wortmannin 3_AB

电离辐射引起 G2 期阻滞, 导致细胞分裂延迟, 被认为是为细胞进行损伤修复提供充足的时间. 最近关于细胞周期调控机制的认识使探讨辐射引起细胞 G2 期阻滞的机制成为可能. 由催化亚基 p34^{cdc2}和调节亚基周期蛋白 B 组成的有丝分裂促进因子(MPF)激酶活性是细胞由 G2 期进入 M 期所必需的, 两者在 G2 期聚合成 p34^{cdc2} Thr14 和 Tyr15 特异磷酸化的无活性的 MPF 前体. 在由 G2 期进入 M 期时, 这些残基经 cdc25C 脱磷酸化使 MPF 前体迅速活化转变成 MPF^[1]. 研究表明, 辐射引起细胞 G2 期阻滞与 MPF 失活有密切关系. Muschel 等人^[2]研究表明, 大剂量照射(如 10Gy X 射线)同步在 S 期的 HeLaS3 引起的 G2 期阻滞主要是周期蛋白 B 表达受到抑制. Metting 等人^[3]报道小剂量(2Gy X 射线)照射引起的细胞 G2 期阻滞主要与 MPF 不能及时脱磷酸有关, 而不是因为缺乏两亚基之一或不能形成复合物. 但受照细胞 DNA 损伤与 p34^{cdc2}活性调节间的信号传递途径尚不清楚.

哺乳动物细胞对 DNA 损伤的反应是复杂的, 涉及 DNA 损伤识别、活化修复及细胞周期改变的相互关联的信号传导网络. PARP(多聚腺苷转移酶)、DNA PK(依赖 DNA 的蛋白激酶)、ATM(毛细血管扩张共济失调综合征遗传突变基因)等参与 DNA 损伤反应的蛋白可能在 DNA 损伤监视网络信号转导的起始中发挥关键作用. PARP 是在多数真核细胞中含量丰富

的 116 ku 的 DNA 结合蛋白,被认为是染色体中重要的非组蛋白^[4]. 细胞受多种 DNA 损伤剂处理后经 3-AB(3-am inobenzamid), PARP 特异抑制剂抑制其活性可导致细胞死亡、DNA 链断裂、突变、转化及基因扩增的增加. 毛细血管扩张共济失调症的遗传突变基因 ATM 是另一候选分子. ATM 基因突变可导致辐射超敏感、细胞周期检查点异常. AT 患者来源的成纤维细胞和淋巴细胞 G2 期受照后都不能起始正常细胞表现出的 G2 期阻滞. ATM C-末端具有 PI3 激酶家族特有的序列,该家族许多成员在低等生物细胞周期检查的调控中发挥作用. DNA PK 是哺乳动物细胞中另一参与 DNA 损伤识别的 PI3 激酶家族成员,其由催化亚基 DNA PKcs 及调节亚基 Ku70 及 Ku80 组成^[5]. Wortmannin (Wort) 是微生物代谢产物,可特异抑制 PI3 激酶家族成员的激酶活性.

为了阐明电离辐射引起细胞 G2 期阻滞的信号转导途径,特别是识别 DNA 损伤并启动信号传递至 MPF 的分子,我们用 3-AB 和 Wort 分别抑制受照后 HeLa S3 细胞的 PARP 和 PI3 激酶家族活性,以观察 G2 期阻滞和 MPF 脱磷酸化延迟是否发生改变.

1 材料与方法

(1) 细胞培养. 人宫颈癌上皮细胞系 HeLa S3 由本室周平坤教授提供,培养在含 10% 胎牛血清及抗生素的 DMEM 培养基中. 采用胸腺嘧啶核苷(TdR) 双阻断法将细胞同步在 G1/S 期,方法如下:细胞接种后长至 50% 汇合,培养 24 h 后,换为含 2 mmol/L TdR 的 DMEM 完全培养基,12 h 后,弃去培养液,PBS 洗 3 遍后,加入补加 20 mmol/L 胞嘧啶(CdR) 的 DMEM 培养液. 8 h 后弃去培养液,PBS 洗 3 遍后,换为含 2 mmol/L TdR 的 DMEM 完全培养基,温育 12 h 后,弃去培养液,PBS 洗 3 遍后,补加 20 mmol/L 胞嘧啶(CdR) 的 DMEM 培养液,以洗去 TdR 的时间作为同步化的释放时间,以后的时间点均以此为零点. 某些实验组在照射前 2 h 加入 3-AB 或 Wort.

(2) 照射. 同步化细胞释放后 3 h,在距源 5 m 处,使生长在培养瓶的细胞接受 2Gy⁶⁰Co γ 射线照射.

(3) 蛋白裂解. 细胞同步化释放后特定时间取样,首先细胞经冷 PBS 洗 2 遍,然后加入 0.5 mL 细胞裂解液(150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 0.05% SDS, 0.5% NP-40, 1.0 mmol/L PMSF, 0.5 mmol/L 钒酸钠),4℃放置 20 min 后,用细胞刮子将细胞刮起,转移至 Eppendorf 管,超声破碎细胞后,12 000 $\times g$ 离心,上清存于-20℃或立即进行 IP-Western 分析.

(4) 细胞周期分析. 细胞经 2 次 TdR 释放后不同时间,胰酶消化细胞,PBS 洗细胞后固定于 70% 乙醇中,4℃保存数天后,经 PBS 洗去乙醇,RNA 酶 A 消化后,PI 染色,流式细胞仪 FACScan420 分析细胞周期.

(5) IP-Western 分析. 为避免人为造成的辐射效应,免疫沉淀前细胞培养中蛋白未标记放射性同位素. 细胞裂解物在冰浴中保存,经 Bradford 法测定蛋白浓度,通过补加裂解液以保证各组间蛋白总量一致. 免疫沉淀时加入抗 Cdc2 单抗(1:100)后,4℃放置 2 h,随后加入蛋白 A-Sepharose 4B(Pharmacia),4℃过夜. 免疫沉淀物经离心去上清,裂解液洗 3 次后,加入 Laemmli SDS 上样缓冲液,加热处理后上样于 12% SDS-PAGE,电泳、电转移后,分别经 Cdc2 或 p-Tyr 抗体免疫印迹. 所用抗体 p34^{cdc2}(17) sc_54 及 p-Tyr (1G2) sc_20 均购于 Santa Cruze 生物技术公司.

2 结果

2.1 辐射引起同步化细胞 G2 期阻滞

培养的 HeLa S3 通过胸腺嘧啶双阻断法同步在 G1/S 期交界处, 经 PBS 洗后补加含胞嘧啶的培养液, 以此时间为零点, 释放后不同时间取样观察对照组及受 2Gy 照射组各周期时相的改变. 由图 1 可见辐射可引起明显的细胞 G2 期阻滞发生.

图 1 辐射引起 HeLa S3 细胞 G2 期阻滞

同步于 G1/S 期未受照细胞(1)及释放 3 h 后受 2Gy 照射组细胞(2)不同时间点 G2/M 期的百分比

2.2 Wort 和 3_AB 抑制辐射引起的 HeLa S3 细胞 G2 期阻滞

由表 1 可见如果在释放后 1 h 时加入 40 μmol/L Wort 或 400 μmol/L 3_AB, 然后在释放后 3 h 照射, 2Gy 射线引起的 G2 期阻滞明显减弱, 表明 Wort 及 3_AB 阻断了细胞正常的 G2 期检查点调控, 表明与这两种化合物作用的靶分子均参与细胞 G2 期检查点调控.

表 1 Wort 和 3_AB 对辐射引起 HeLa S3 细胞 G2 期阻滞的影响

同步化释放后时间	G2/M 期百分比/%			
	对照	2Gy	2Gy+ Wort	2Gy+ 3AB
9 h	20	31	25	20
13 h	17	34	21	24

2.3 Wort 和 3_AB 抑制辐射引起的 MPF 前体脱磷酸化延迟

由图 2 可见与未受照及受照时加有 Wort 或 3_AB 组相比, 照射组 MPF 经 p_Tyr 抗体印迹带明显强于其他组, 表明其酪氨酸磷酸化严重. 说明 Wort 和 3_AB 可抑制辐射引起的 MPF 前体脱磷酸化延迟. 由于 p34^{cdc2} Tyr15 和 Thr16 磷酸化均可使其电泳迁移率减慢, 故不同位点的磷酸化状态导致 p34^{cdc2} 表现为 3 条电泳迁移带.

3 讨论

本文研究表明 HeLa S3 细胞于 S 期受 2Gy 照射后, 发生明显 G2 期阻滞, 并伴有 MPF 前体脱磷酸化延迟. PI3 激酶家族抑制剂 Wort 及 PARP 特异抑制剂 3_AB 可明显减弱辐射引起的 G2 期阻滞及 MPF 前体脱磷酸化延迟, 表明 Wort 敏感通路和 PARP 在 DNA 损伤引起的细

图2 Wort 和 3-AB 抑制辐射引起的 MPF 前体脱磷酸化延迟

释放后 12 h 细胞裂解物经 cdc2 抗体免疫沉淀, 电泳印迹, 分别经抗 cdc2 或 pTyr 抗体印迹. 1~4 为 cdc2 抗体免疫印迹图, 5~8 为 pTyr 抗体免疫印迹图. 1, 5 为未受照组; 2, 6 为 2Gy 照射组; 3, 7 为 2Gy 照射并加有 Wort 组; 4, 8 为 2Gy 照射并加有 3-AB 组

胞周期阻滞中发挥作用.

Metting 等人研究表明, 1.75Gy X 射线可引起 HeLa S3 细胞 G2 期阻滞并伴有 MPF 前体不能及时脱磷酸化, 但并没观察到 cdc2 或周期蛋白 B 含量随照射减少或形成 MPF 前体有困难. O'Connor (6) 研究发现氮芥引起 G2 期阻滞也伴有酪氨酸磷酸化的 MPF 前体的聚集, 喜树碱引起的 G2 期阻滞也伴有 cdc2 脱磷酸化受阻. 但辐射引起 MPF 前体脱磷酸化延迟的信号传导机制尚不清楚.

MPF Tyr15 磷酸化是由激酶 Weel 和磷酸酶 cdc25C 来调节的, cdc25C 通过使 MPF 前体脱磷酸化而活化, 活化的 MPF 又通过催化 cdc25C Ser/Thr 磷酸化而活化 cdc25C, 即自催化反馈回路. 辐射引起 MPF 活化延迟的机制可能与 Weel 和 cdc25C 间平衡的扰乱有关. Barth 等人^[7]报道 1Gy 照射不仅可抑制 MPF 前体 Tyr15 脱磷酸化, 同时抑制 cdc25C 磷酸酶的活化, 表明 MPF 与 cdc25C 间自催化反馈回路被扰乱, 但射线作用在哪一环节还不清楚. Uckun 等人^[8]报道射线可引起人 B 淋巴细胞前体多种蛋白发生酪氨酸磷酸化. 通过用酪氨酸激酶及磷酸酶抑制剂分析, 结合直接测定酪氨酸磷酸酶活性发现辐射可引起一或多种酪氨酸激酶活化, 但不抑制细胞总酪氨酸酶活性, 表明辐射是通过一或多个酪氨酸激酶途径传递信号的. 最近 Kharbanda 等人^[9]报道细胞受照后可选择性地活化核内 Lyn (一种 Src 样酪氨酸激酶 p56/p53^{Lyn}), 并促进其结合 MPF, 抑制 MPF 激酶活性. 但 DNA 损伤信号如何被识别进而启动信号传导过程还不清楚.

Wort 抑制的 PI3 激酶家族成员中的 DNA PK 及 ATM, 以及 3-AB 抑制的 PARP 均被认为参与 DNA 损伤修复过程. ATM 是参与 G2 期阻滞的最佳后选分子, 因 ATM 异常的 AT 患者细胞受照后 G2 期阻滞异常, 而 DNA PK 缺陷的 SCID 小鼠受照后 G2 期阻滞正常, 表明 DNA PK 并不参与细胞 G2 期检查点调控. 但 DNA 损伤后 ATM, PARP 与 MPF 间信号如何传递, 是否与 MPF 与 cdc25C 自反馈回路或 Lyn 激酶有关还有待进一步验证.

致谢 本工作为国家自然科学基金 (批准号为: 39700038) 资助项目和全军医药卫生“九五”重点基金 (批准号: 9605007) 资助课题.

参 考 文 献

- 1 Dunphy W G. The decision to enter mitosis. *Trends Cell Biol*, 1994, 4: 202~ 207
- 2 Muschel R J, Zhang H B, Iliakis G, et al. Cyclin B expression in HeLa cells during the G2 block induced by ionizing radiation. *Cancer Res*, 1991, 51: 5 113~ 5 117
- 3 Metting N F, Little J B. Transient failure to dephosphorylate the cdc2/cyclin B1 complex accompanies radiation induced G2 phase arrest in HeLa cells. *Radiation Res*, 1995, 143: 286~ 292
- 4 Murcia J M, Niedergang C, Trucco C, et al. Requirement of poly (ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 7 303~ 7 307
- 5 Rathmell W K, Kaufmann W K, Hurt J C, et al. DNA dependent protein kinase is not required for accumulation of p53 in cell cycle arrest after DNA damage. *Cancer Res*, 1997, 57: 68~ 74
- 6 O'Connor P M, Ferris D K, White G A, et al. Relationships between cdc2 kinase, DNA crosslinking and cell cycle perturbations induced by nitrogen mustard. *Cell Growth Differ*, 1991, 3: 43~ 52
- 7 Barth H, Hoffmann I, Kinzel V, et al. Radiation with 1Gy prevents the activation of the mitotic inducers M itosis promoting factor (MPF) and cdc25C in HeLa cells. *Cancer Res*, 1996, 56: 2 268~ 2 272
- 8 Uckun F, Tuel-Ahlgren L, Song C W, et al. Ionizing radiation stimulate unidentified tyrosine specific kinase in human B lymphocyte precursors, triggering apoptosis and clonogenic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 9 005~ 9 007
- 9 Kharbanda S, Saleem A, Yuan Z M, et al. Nuclear signaling induced by ionizing radiation involves colocalization of the activated p56/p53 tyrosine kinase with p34cdc2. *Cancer Res*, 1996, 56: 3 617~ 3 621

(1997-12-12 收稿, 1998-03-02 收修稿稿)

焦点粘着激酶在小鼠外胎盘锥体外扩展中的表达、分布和功能

张春雨^④ 段恩奎^{*} 曹宇静 曾国庆

(中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080; ④Boyer Center for Molecular Medicine, Department of Genetics, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06510, USA. * 联系人)

摘要 小鼠胚胎植入涉及来源于外胎盘锥(ectoplacental cone, EPC)的滋养层细胞对子宫蜕膜细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的粘附和侵入。植入时, 纤粘连蛋白(fibronectin, FN)在蜕膜大量表达并分布在基质细胞周边, 其受体(整合素 $\alpha_5\beta_1$) 在滋养层细胞表达上调。整合素与ECM的结合引起一种分子量为125 ku的蛋白酪氨酸激酶——焦点粘着激酶(focal adhesion kinase, pp125^{FAK})的酪氨酸磷酸化, 其酪氨酸磷酸化位点可作为连接含有Src SH2或SH3结构域的胞内蛋白的结合点。通过这些联系, pp125^{FAK}可以整合由整合素激发的多种信号。我们首次利用EPC体外培养模型, 对EPC在FN上向外生长过程中pp125^{FAK}的表达、分布和功能进行了研究。结果表明, pp125^{FAK}主要表达和点状分布于滋养层从EPC向外扩展的前缘以及单个迁移细胞的周边; pp125^{FAK}的抗体或反义寡聚脱氧核酸抑制EPC粘附、扩展以及滋养层细胞铺展和迁移。实验表明, pp125^{FAK}作为整合素介导的信号传递分子, 参与了EPC的体外扩展并在滋养层细胞与FN的相互作用中起着重要作用。

关键词 纤粘连蛋白 整合素 焦点粘着激酶 外胎盘锥 粘附 扩展

小鼠胚胎植入是一个极为复杂的生理过程, 涉及来源于外胎盘锥(ectoplacental cone,

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1998-43-14-1523>