

辐射诱导小鼠淋巴瘤细胞凋亡涉及 NADPH 氧化酶的活性

周新文 *

(苏州大学放射医学与公共卫生学院, 苏州 215021)

摘要 用⁶⁰Co γ射线对小鼠淋巴瘤细胞 3SB(p53^{+/+})和 1B1C4(p53^{-/-})进行照射处理。观察了辐射后细胞形态学变化, 结果发现, 3SB 对γ射线诱导的凋亡非常敏感, 而 1B1C4 细胞对辐射具有抗性。DNA 片断化试验和藻红 B 染色试验的结果也证实这一点。进一步分析了凋亡信号途径上的 caspase-3 和 p53。在 3SB 细胞中, 检测到激活的 caspase-3 并发现 p53 的表达随辐射剂量的增加而增高。比较了两种细胞中 caspase-3 mRNA 的表达, 但未见差异。对两种细胞中的 NADPH 氧化酶活性的测定结果表明, 凋亡的 3SB 细胞中的 NADPH 氧化酶活性增高。因此, 在电离辐射诱导细胞凋亡的过程中, NADPH 氧化酶参与了上游信号的转导。

关键词 辐射诱导; 淋巴瘤细胞; 凋亡; NADPH 氧化酶

细胞凋亡是生物在长期进化中所获得一种自我调节和自我保护功能。它在组织发育分化, 胁迫损伤细胞的清除, 细胞数量自我平衡调节等生理功能中扮演着重要的角色^[1]。绝大多数的肿瘤细胞由于凋亡功能的缺失, 对辐射具有相当高的抗性, 给放射治疗肿瘤工作带来了很大的困难。而淋巴细胞对电离辐射诱导的凋亡非常敏感。即使在非常低的照射剂量下, 也可在体外和体内的试验中观察到细胞凋亡的发生^[2]。阐明其凋亡分子信号转导途径和机制, 有助于探索在辐射抗性肿瘤治疗中的应用前景。

Kawai 等^[3]分离到几株带着不同肿瘤抑制基因遗传背景的淋巴瘤细胞株, 这些细胞株对电离辐射都非常敏感。在 p53 基因依赖的敏感细胞的凋亡过程中, 都发现核因子 NF-κB 的下调^[4]。对细胞凋亡途径进一步的研究表明, caspase-3 是 p53 依赖的辐射诱导的细胞凋亡中的重要信号分子^[5]。进一步对 caspase-3 的下游信号转导途径分析, 我们发现在辐射诱导的小鼠淋巴瘤细胞的凋亡过程中, 鸟苷解离因子 LyGDI 被 caspase-3 酶解, 形成 23 kDa 断裂的小片段 LyGDI, 该断裂的片段进入到细胞核中, 且其 23 kDa 的 LyGDI 的核内迁移具有凋亡信号转导功能^[6]。为进一步完善电离辐射诱导淋巴瘤细胞的凋亡信号转导途径, 我们对 caspase-3 上游信号转导途径进行了分析。但未见抗凋亡的 Bcl-2

表达水平下降, 也未见原凋亡蛋白 Bax 和促凋亡蛋白 Bid 活性的增高, 同时, 未检测到 caspase-9、caspase-7、caspase-6 和 caspase-8 的激活。因此, 我们想探究电离辐射诱导的上游凋亡信号是如何转导至 caspase-3 的。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与辐射处理

小鼠淋巴瘤细胞 3SB(p53^{+/+})和 1B1C4(p53^{-/-})由广岛大学放射线医科学研究所基因调控试验室的铃木教授提供。将该两种细胞悬浮培养在改良的 DMEM (Gibco) 培养液中, 外加 10% 牛血清(Gibco, 批号 A028228), 100 μmol/L 的非必需氨基酸(Sigma-Aldrich) 和 150 μmol/L 的 L 型天门冬氨酸。培养温度控制在 37 °C 并保持 5% 的 CO₂。

用⁶⁰Co γ射线照射对数期生长的细胞, 剂量率为 0.5 Gy/min。

1.2 细胞凋亡分析

1.2.1 形态学观察 用 DAPI 对细胞进行染色, 共聚焦显微镜(Carl Zeiss) 观察细胞及核内 DNA 结构; 用染料藻红 B(erythrosine B) 对细胞染色, 活细胞不能

收稿日期: 2005-10-12 接受日期: 2006-01-17

国家自然科学基金资助项目(No.3057048)

* 通讯作者。Tel: 0512-65880068, E-mail: martin_zhouxw@hotmail.com

被染色, 死细胞的细胞核被染成红色, 根据被染色细胞占总观察细胞的百分率计算细胞的死亡率, 每次处理观察 300 个细胞。

1.2.2 DNA 片断化试验 提取细胞总 DNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 观察在凋亡细胞中形成的特征性梯形条带。

1.3 Western 印迹分析

离心收集细胞, 用 4 ℃ 冰冷的 SDS 提取液(由 25 mmol/L Tris-HCl, 5% 甘油, 1% SDS 组成, pH 6.8)裂解细胞, 并分 3 次用超声波裂解细胞(每次 10 s), 然后 4 ℃ 15 000 r/min 离心 1 min, 取上清液作 Western 印迹分析。

用 Bio-Rad 公司的蛋白质分析试剂盒分析蛋白质的含量, 以保证在每个加样孔中加入等量的总蛋白。然后用 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离样品。用 Millipore 膜转膜(Millipore, Billerica, MA), 经一抗杂交后, 再用标有辣根过氧化物酶的驴抗兔、抗羊第二抗体杂交。洗膜后, 用化学增强发光剂检测曝光的 X 光胶片。

羊抗 p53(sc-6243G)和识别兔抗 caspase-3 (#9661 D175)一抗购于 Santa Cruz 公司。

1.4 RT-PCR 分析

为比较小鼠淋巴瘤细胞 3SB 和 1B1C4 辐射前后 caspase-3 mRNA 的表达, 用 Qiagen 公司的 RNA 提取试剂盒(RNeasy Mini)提取辐射处理前后的 3SB 和 1B1C4 细胞的 mRNA, 然后用 Toyobo 公司的 RT-PCR High Plus 进行 mRNA 定量分析。5' 端引物序列 GGGTACCACCATGGAGAACAAACAAAACCTCA-GTGGATTCA, 3' 端引物序列 CGGGATCCGAGT-GATAAAAGTACAGTTCTTCGTGAGCAT, 2 μg 总 mRNA, 125 ng 引物, 30 个循环。电泳观察。

1.5 NADPH 氧化酶活性的分析

3SB 和 1B1C4 细胞培养于 60 mm 培养皿中, 当细胞数量达到 1×10^6 个时, 用 2 Gy 的 γ 射线进行辐射处理, 经过 6 h 的辐射后培养, 离心收集细胞并悬浮于氮蓝四唑(nitroblue tetrazolium, NBT)溶液中(4 mg/ml), 于 37 ℃ 保温加热 20 min。加入 200 μl 的 1 mol/L HCl 终止反应, 离心后加入 600 μl 的二甲亚砜稳定形成的三苯基甲酯, 在 560 nm 处用分光光度计测定其吸光度(A), A 值越大表明 NADPH 氧化酶活性越高^[7]。

2 结果

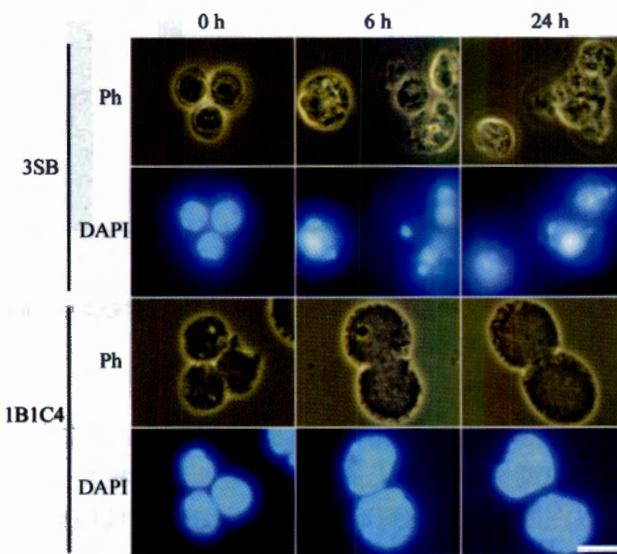


图 1 γ 射线辐射诱导的淋巴瘤细胞 3SB 与 1B1C4 的凋亡(DAPI 染色)

2 Gy 的 γ 射线辐照处理 3SB 与 1B1C4 细胞, 经过 6 h 和 24 h 的辐射后培养, DAPI 染色后, 用共聚焦显微镜观察凋亡的细胞和细胞核形态。Ph: 相控制; DAPI: 4',6- 二氨基 -2- 苯基吲哚二氯化盐。

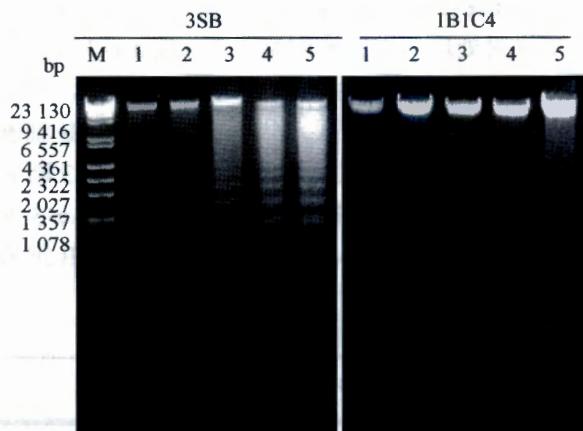


图 2 凋亡的 3SB 细胞中出现梯形电泳条带

用 0~5 Gy γ 射线辐照 3SB 和 1B1C4 细胞, 经过 6 h 的辐射后培养后, 提取细胞中的总 DNA, 电泳观察凋亡细胞中 DNA 的断裂 M: marker; 1: 0 Gy; 2: 0.5 Gy; 3: 1 Gy; 4: 2 Gy; 5: 5 Gy。

2.1 辐射诱导的淋巴瘤细胞凋亡

我们首先对 γ 射线辐射后 3SB($p53^{+/+}$)和 1B1C4 ($p53^{-/-}$)两种细胞的形态学进行了观察。两种不同 $p53$ 遗传背景的淋巴瘤细胞对 γ 射线的辐射敏感性是截然不同的, 带有野生型 $p53$ 的 3SB 细胞非常敏感, 而 1B1C4 细胞却非常具有抗性。图 1 是 DAPI 染色的试验结果, 2 Gy γ 射线辐射后 6 h, 在 3SB 中可以观察到细胞凋亡形成的微核结构及细胞膜出现泡状结构, 辐照 24 h 后, 几乎所有的细胞都出现了

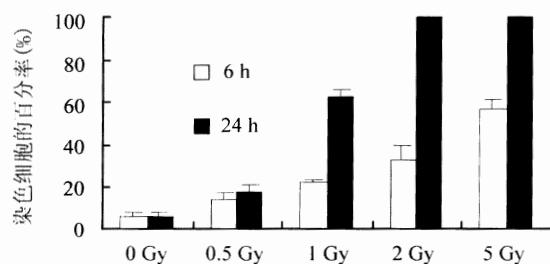


图3 萍藻红B染色法观察3SB细胞在0~5 Gy辐射处理后, 6 h与24 h 3SB细胞的凋亡百分率

凋亡形态学上的变化。在1B1C4细胞中, 观察不到任何凋亡形态学上的变化。与此结果相互一致, 可以在图2中观察到不同辐射剂量的 γ 射线照射后, 在3SB细胞中出现特有的DNA片断化, 形成180和180 bp成倍的电泳梯形条带。萍藻红B染色的实验结果(图3)也进一步证实了3SB细胞对辐射诱导的凋亡非常敏感。

2.2 凋亡淋巴瘤细胞中的 caspase-3 激活与 caspase-3 mRNA 的表达

Caspase-3被认为是凋亡的执行蛋白, 我们对两种受辐射处理的淋巴瘤细胞中的caspase-3进行了分析, 发现它们的活性caspase-3是不同的。与前面凋亡形态学观察的结果一致。在凋亡的3SB细胞中, 辐射6 h后, 可观察到激活的caspase-3断裂带。且在0~0.5 Gy辐射剂量范围内, caspase-3的激活存在剂量效应(图4a), 同时也观察到3SB细胞

中p53的活性改变和辐射剂量效应(图4b)。而在1B1C4细胞中, 未见任何caspase-3的变化。是否两种细胞受照射后, 细胞中的caspase-3不同是由于p53不同造成的? 从遗传背景上, 两种细胞最主要的不同之处在于p53遗传背景的不同, 另一方面, p53具有转录调控功能, 有报道认为p53具有直接调节caspase-3的表达, 过度表达的caspase-3具有自我催化功能, 使得无活性的32 kDa的caspase-3 C端的12 kDa肽链被水解后, 变成活性形式的caspase-3。为了弄清楚caspase-3的差异是否来自caspase-3 mRNA的表达差异, 于是我们比较两种细胞受2 Gy γ 射线照射后, caspase-3 mRNA的表达, 结果发现在两种细胞中, p53的不同, 并没有影响caspase-3 mRNA的表达。受照射后, caspase-3的激活并不是由于caspase-3 mRNA表达差异引起的(图5)。

2.3 辐射诱导3SB细胞中NADPH氧化酶活性的改变

我们对3SB细胞中的caspase-3上游凋亡信号途径进行了分析。首先检测了Bcl-2家族蛋白中的Bcl-2、原凋亡蛋白Bax和促凋亡蛋白Bid的表达, 同时, 检测了caspase-9、caspase-7、caspase-6和caspase-8的表达。尽管在该凋亡信号转导途径上未发现结果。但观察到p53的激活与线粒体的细胞色素c的释放。辐射诱导活性氧(ROS)的产生, ROS的产生与NADPH氧化酶的活性相关^[8], 从而改变

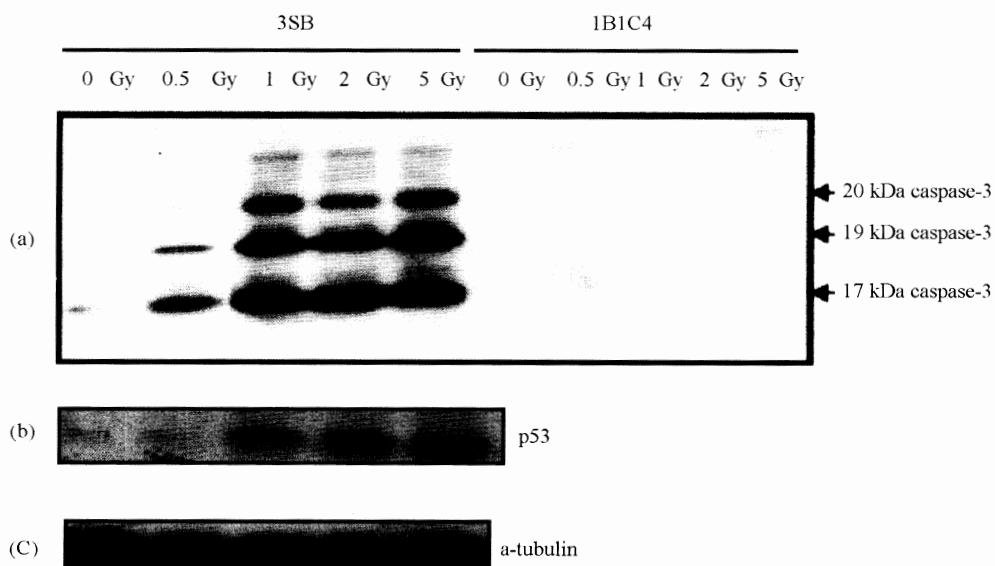


图4 Western印迹分析3SB和1B1C4细胞中caspase-3的变化

用0~5 Gy γ 射线辐射3SB和1B1C4细胞, 经过6 h的辐射后培养, 3SB细胞中可见caspase-3的断裂(a)和p53表达增高(b)。c:微管蛋白(a-tubulin), 样品量的控制。

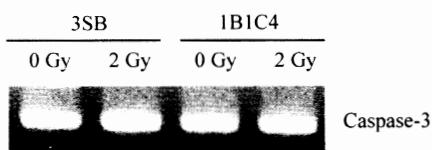


图 5 γ 射线诱导的 3SB 和 1B1C4 细胞中 caspase-3 mRNA 的表达

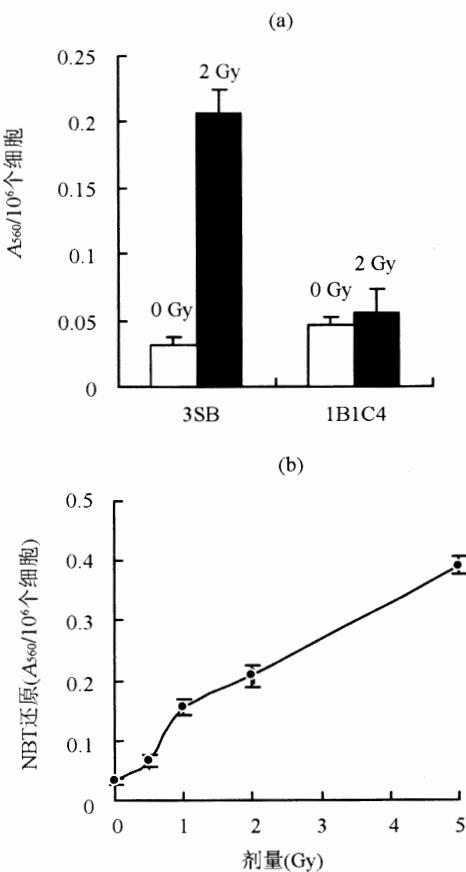


图 6 3SB 和 1B1C4 细胞中 γ 射线辐射诱导的 NADPH 氧化酶活性的变化

a: 2 Gy 的 γ 射线辐射处理后, 离心收集 3SB 和 1B1C4 细胞, 于氨基蓝四唑保温处理, 在 560 nm 处测定形成的三苯基甲酯。b: 3SB 细胞中 NADPH 氧化酶活性随辐射剂量的变化。

线粒体膜的通透性, 释放细胞色素 c 与 caspase-3 的激活^[7,9]。于是我们比较了对照及 2 Gy 辐射处理 6 h 后 3SB 和 1B1C4 细胞中的 NADPH 氧化酶的活性, 结果发现在 3SB 细胞中, NADPH 氧化酶的活性增高(图 6a), 且 NADPH 氧化酶的活性的变化与辐射剂量间存在剂量效应(图 6b)。

3 讨论

淋巴细胞主要通过细胞凋亡的方式来调节在生物体内的数量。对 DNA 损伤诱导的凋亡非常敏感, 实验中, 辐射诱导的 3SB 细胞凋亡结果证实

这一结论。此外, 电离辐射是 DNA 损伤、细胞凋亡的主要因子。DNA 损伤信号是如何传递给凋亡信号的执行者——Caspase-3? 众所周知, 在 p53 介导的 DNA 损伤细胞凋亡中, p53 能够转录激活一些与凋亡相关基因的表达, 如 Bcl-2 家族, 该家族包括 Bax 及含 BH3 结构的蛋白 Noxa、Bid 和 Puma 等, p53 还可以转录激活 Fas 等细胞表面受体死亡蛋白^[10]。比较照射后 3SB 和 1B1C4 细胞中 caspase-3 mRNA 表达, 并没有发现它们之间存在差异。说明 p53 可以没有直接转录激活 caspase-3。除了转录活性外, p53 作为损伤感知蛋白可以直接与 DNA 结合, 致使部分 p53 转移至线粒体的外膜上, 直接拮抗 Bcl-2 和 Bcl-XL 的抗凋亡作用^[8]。整个过程不需要新蛋白质的合成。此外, Konishi 等^[11]发现核小体的连接蛋白 Histone H1.2 在 X 射线诱导的细胞凋亡中, 从细胞核内转移至胞质中, 导致 Bax 等蛋白质改变了线粒体的膜潜力, 从而释放细胞色素 c, 诱导 caspase-3 的激活。在 3SB 细胞中是否存在这一凋亡途径目前还不清楚。

在 γ 射线辐射诱导淋巴瘤细胞凋亡的实验中, 观察到 3SB 细胞中 p53 的激活与线粒体的细胞色素 c 的释放, 但结果未显示抗凋亡的 Bcl-2 表达水平下降, 也未显示原凋亡蛋白 Bax 和促凋亡蛋白 Bid 活性的增高。同时, 未检测到 caspase-9, caspase-7, caspase-6 和 caspase-8 的激活。但是, 在 3SB 和 1B1C4 这两种细胞中发现 NADPH 氧化物酶活性的不同。已有大量文献报道该酶的活性与电离辐射产生的 ROS 相关, 能够导致线粒体释放细胞色素 c, 从而诱导 caspase-3 的激活^[9,12]。在骨髓淋巴细胞的分化和诱导骨髓淋巴细胞的凋亡具有重要的生理功能^[7]。因此, NADPH 氧化物酶在电离辐射诱导的骨髓淋巴细胞凋亡中参与了上游信号的转导。

已有的报道表明 Rho 家族中的 Rac1、Cdc42 等蛋白质有调节 NADPH 氧化物酶活性的作用。Rho 蛋白的抑制因子也可以通过 Rho 蛋白来调节其活性变化。RhoGDI 在多数的肿瘤细胞中过度表达, 它通过与 Rac1 和 Cdc42 形成 1:1 稳定的复合物, 抑制这两种蛋白质的裂解, 阻止了 ROS 的产生及 NADPH 氧化物酶的激活, 从而抑制了化疗药物诱导的凋亡^[13]。在 GDI 家族成员中, 我们发现 LyGDI 是唯一能够在辐射诱导的细胞凋亡中发生断裂。我们推测, 在淋巴细胞中, 辐射诱导的 LyGDI 断裂导致了 Rac1 和 Cdc42 激活 NADPH 氧化物酶, 进一步激活 caspase-3。下一步我们将进一步分析它的 Rac/Cdc42/NADPH 氧化物酶/caspase-3 信号通路。

Rock 信号转导途径。

参考文献 (References)

- [1] Danial NN *et al.* *Cell*, 2004, **116**: 205
- [2] Ashkenazi A *et al.* *Science*, 1998, **281**: 1305
- [3] Kawai H *et al.* *Radiat Res*, 1998, **149**: 41
- [4] Kawai H *et al.* *Cancer Res*, 1999, **59**: 6038
- [5] Fuchs EJ *et al.* *Cancer Res*, 1997, **57**: 2550
- [6] Zhou X *et al.* *Radiat Res*, 2004, **162**: 287
- [7] Armstrong JS *et al.* *Int J Androl*, 2002, **25**: 223
- [8] Perfettini JL *et al.* *Nat Cell Biol*, 2004, **6**: 386
- [9] Kulms D *et al.* *Oncogene*, 2002, **21**: 5844
- [10] Norbury CJ *et al.* *Oncogene*, 2004, **23**: 2797
- [11] Konishi A *et al.* *Cell*, 2003, **114**: 673
- [12] Hampton MB *et al.* *Ann N Y Acad Sci*, 1998, **854**: 328
- [13] Zhang B *et al.* *Cancer Res*, 2005, **65**: 6054

γ -Irradiation Induced Mouse Lymphoma Cell Apoptosis Involved the NADPH Oxidase Activity

Xin-Wen Zhou*

(Department of Radiation Medicine and Public Health, Soochow University, Suzhou 215021, China)

Abstract Mouse Lymphoma cell 3SB ($p53^{++}$) and 1B1C4 ($p53^{-/-}$) were irradiated with ${}^{60}\text{Co}$ γ -ray. Their apoptotic morphology was observed with microscope. Apoptotic assay results demonstrated that those two cell lines were quite differently to γ -irradiation. 3SB was very sensitive, while 1B1C4 was anti-sensitive to γ -irradiation. Both DNA ladder experiment and erythrosine B staining results confirmed this conclusion. The signal transduction molecular caspase-3 and p53 were also analyzed. The activated caspase-3 and p53 were found up-regulated by γ -irradiation with dose pattern in 3SB cell. The caspase-3 mRNA differential expressions were also amplified between those two cell lines, but no difference was found. Then the activity of NADPH oxidase was checked in these two cells, the activity of NADPH oxidase was found only in apoptotic 3SB cell. In our research we found that NADPH-oxidase is another upstream signal molecular which involved in irradiation induced apoptosis.

Key words irradiation; lymphoma cell; apoptosis; NADPH oxidase

Received: October 12, 2005 Accepted: January 17, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.3057048)

*Corresponding author. Tel: 86-512-65880068, E-mail: martin_zhouxw@hotmail.com