

文章编号: 1001-098X(2002)04-0180-03

电离辐射诱导的细胞G₂期阻滞

刘光伟, 龚守良

摘要: 哺乳动物受X射线照射后, 可以使细胞周期延迟或阻滞, 包括G₁期阻滞、S期延迟和G₂期阻滞。G₁期阻滞仅在野生型p53基因存在时出现, 在清除DNA损伤的细胞中具有重要作用; 而G₂期阻滞更有利于损伤后DNA的修复和细胞存活, 并且与p53基因存在状态无关。因此, 对电离辐射诱导细胞G₂期阻滞机制的探讨成为近年来国内外放射生物学领域的研究热点。

关键词: G₂期阻滞; 电离辐射; 细胞周期调控点

中图分类号: Q253, Q345.2 **文献标识码:** A

G₂ phase arrest of cell cycle induced by ionizing radiation

LIU Guang-wei, GONG Shou-liang

(MH Radiobiology Research Unit, Jilin University, Jilin Changchun 130021, China)

Abstract: The exposure of mammalian cells to X rays results in the prolongation of the cell cycle, including the delay or the arrest in G₁, S and G₂ phase. The major function of G₁ arrest may be to eliminate the cells containing DNA damage and only occurs in the cells with wild type p53 function whereas G₂ arrest following ionizing radiation has been shown to be important in protecting the cells from death and occurs in all cells regardless of p53 status. So the study on G₂ phase arrest of the cell cycle induced by ionizing radiation has currently become a focus at radiobiological fields.

Key words: G₂ phase arrest; ionizing radiation; cell cycle checkpoint

哺乳动物受X射线照射后, 可以导致细胞周期出现G₁期和G₂期阻滞。G₁期阻滞仅在野生型p53基因存在时出现, 后者通过调控细胞周期出现G₁期阻滞, 可以抑制细胞增殖, 直到受损伤的DNA修复。如果受损伤的DNA不能修复, 则通过启动细胞凋亡等途径将带有损伤DNA的细胞清除。当p53基因突变时, 失去了p53基因通过调控G₁期阻滞发挥的监视功能, 使DNA损伤累积, 最终导致肿瘤形成。然而, 近年来的研究表明, p53基因除了诱导G₁期阻滞外, 还可以诱导G₂期阻滞, 并且G₂期阻滞的发生与p53基因状态无关^[1]。在肿瘤细胞中, p53基因的突变经常发生, 因此, 深入探讨电离辐射诱导细胞G₂期阻滞的分子机制, 对肿瘤的临床治疗具有极其重要的

意义。

1 电离辐射诱导G₂期阻滞的p53基因依赖性调控

大量实验证据表明, p53基因在电离辐射诱导细胞G₂期阻滞中起关键性调控作用。这种p53基因依赖性调控作用是通过抑制细胞周期分裂基因(cyclin B1, cdc2激酶的调节亚单位, 是启动减数分裂过程所必需的调控因子)的抑制作用来诱导G₂期阻滞的。p53基因通过抑制cdc2启动子-104区到-74区和cyclinB1启动子-287区到-23区, 从而抑制cyclin B1和cdc2的转录。同时, p53蛋白也可以影响cyclin B1/cdc2在胞核的积聚, 最终诱导G₂期阻滞。但是, 单独诱导cyclin B1连续表达或与活性cdc2蛋白T14A Y15F结合时, 均不能逆转G₂期阻滞; 而且将cyclin B1注入胞核诱导表达出cdc2活性蛋白T14A Y15F后, 也不能消除G₂期阻滞。这暗示, 在p53基因依赖性G₂期阻滞调控途径上游存在其他调控分子^[2]。

文献资料表明, p53分子是分别通过直接或间接

收稿日期: 2002-05-28

作者简介: ①刘光伟 (1973-), 男, 吉林白城人, 吉林大学卫生部放射生物学重点实验室 (吉林长春, 130021) 博士研究生, 主要从事电离辐射生物效应的研究。

②龚守良 (1945-), 男, 吉林长春人, 吉林大学卫生部放射生物学重点实验室 (吉林长春, 130021) 教授, 博士生导师, 主要从事电离辐射生物效应的研究。

接地调控p21(细胞周期依赖激酶相互作用蛋白, Waf1/CIP1)、gadd45(p53基因调控蛋白)和14-3-3sigma(是通过结合和分离磷酸化蛋白质,调节细胞活性的蛋白质家族成员),并抑制cyclin B1/cdc2活性,从而阻断细胞进入减数分裂,使细胞停滞在G₂期时相。

Siu WY等^[3]研究发现,p53基因及其转录激活产物p21是维持G₂期阻滞的必需因子,当实验阻断p53和p21基因的作用后,电离辐射诱导的细胞G₂期阻滞解除,大量细胞迅速进入减数分裂状态。Flatt PM等^[4]发现,p53基因调控的G₂期阻滞是p21和pRB依赖性的,并影响cyclin B1/cdc2复合物活性,使后者活性抑制和含量下降。如果阻断p21或pRB在这些含有野生型p53基因细胞的功能,就相应地可阻断cyclin B1和cdc2的表达下降,并使G₂期阻滞迅速解除。另外,Zhan Q等^[5]研究证明,通过调节gadd45也可抑制cyclin B1/cdc2活性和cdc2的激活。通过体内实验研究表明^[6],gadd45主要通过其蛋白质中心区域(65~84个氨基酸)的肽段和cdc2结合,从而发挥使cyclin B1/cdc2复合物解离的效应。Yang Q等^[7]研究证明,gadd45介导的G₂期阻滞是依赖于野生型p53基因的。在人成纤维细胞实验中发现,gadd45介导G₂期阻滞时出现cyclin B1和cdc25的表达增加,这暗示p53依赖性gadd45介导的G₂期阻滞至少部分是通过调节cyclin B1/cdc2复合物活性实现的^[8]。另外,Samuel T等^[9]在实验中也发现,细胞受照射后,可以诱导p53依赖的14-3-3sigma的表达,诱发细胞周期出现G₂期阻滞。Chan TA等^[10]发现,DNA损伤可以诱导人大肠癌14-3-3sigma(+/+)细胞出现G₂期阻滞;但是相反,在14-3-3sigma(-/-)细胞,不能诱导细胞G₂期阻滞,而是迅速触发细胞凋亡,并同时伴有caspase 3升高和Bax蛋白迅速从胞质移出及细胞色素C的释放等典型细胞凋亡分子生物学改变,如果在人大肠癌14-3-3sigma(-/-)细胞中通过腺病毒转入14-3-3sigma蛋白,就可以防止细胞凋亡的发生。这说明,14-3-3sigma在诱发p53依赖性G₂期阻滞中具有重要调控作用。

2 电离辐射诱导G₂期阻滞的p53基因非依赖性调控

近年来的实验证据表明,细胞尤其是肿瘤细胞内,也大量存在p53非依赖性G₂期阻滞调控途径。细

胞受照射后,ATM蛋白(共济失调性毛细血管扩张症细胞突变蛋白)诱导G₂期阻滞发生,并且一些调控G₂期阻滞下游的靶分子已被证实。检查点激酶1(checkpoint kinase 1, Chk1)和Chk2分别为G₂期和S期DNA损伤及复制检查点激酶,在DNA损伤反应中,Chk1和Chk2可催化cdc25在Ser216部位磷酸化,并可以和14-3-3sigma蛋白相结合。细胞受照射后激活Chk2需要功能性ATM蛋白,而cdc25正常可以激活cdc2的磷酸化。在细胞受照射后,ATM依赖性激活Chk1和Chk2,后者通过失活cdc25而抑制cdc2,并最终诱发G₂期阻滞^[11]。Athar M等^[12]实验发现,紫外线照射携带有突变p53基因的肿瘤细胞,也可以使肿瘤细胞以剂量依赖方式出现G₂期阻滞。当紫外线照射(剂量为200 mJ/cm²)6 h时,观察到G₂期细胞数比正常情况下增加了3倍,同时cyclin B1水平升高、cyclin B1/cdc2复合物在try15部位高度磷酸化、Chk1激酶和cdc25蛋白水平下降。Chk1使cdc25在ser216部位磷酸化而失活,而cdc25使cdc2在try15部位去磷酸化和激活cyclin B1/cdc2复合物。这说明,细胞内存在一条ATM-Chk1-cdc25-cyclin B1-cdc2的p53非依赖性G₂期阻滞调控途径。

另外,在电离辐射诱导的G₂期阻滞中,cyclin A/cdk2的激活也起着重要作用。Goldstone S等^[13]在实验中发现,正常时cyclin A/cdk2在G₂期早期被cdc25激活;而当DNA损伤诱导G₂期阻滞发生时,则cdc25依赖性的cyclin A/cdk2和cyclin B1/cdc2的激活被阻断,并证明G₂期调控点cyclin A/cdk2激活的阻断是非依赖于ATM的。这暗示,ATM非依赖性cyclin A/cdk2激活可能是诱导G₂期阻滞的另一条调控途径。

当然,p53基因依赖性G₂期阻滞和p53基因非依赖性G₂期阻滞调控途径又相互关联并形成网状分子调控系统。实验中发现^[14],Chk2(-/-)基因剔除的小鼠胚胎干细胞在γ射线照射后,不会出现G₂期阻滞,而且Chk2(-/-)细胞对p53基因的稳定性和γ射线照射后诱导的p53基因依赖性转录激活p21等也有影响;但是,当Chk2基因转入后,就恢复了γ射线照射诱导的p53依赖性和非依赖性G₂期阻滞调控。这说明,某一调控分子有可能是两条途径上的共有分子,在某些细胞中起关键性调控作用,并且这两条调控途径在某些细胞诱导细胞G₂期阻滞中也常常是共同起作用的。

3 电离辐射诱导G₂期阻滞的意义

真核细胞受照射后,可以广泛诱导G₂期阻滞出现,这在保证细胞的完整性、损伤后细胞的存活和保持细胞的遗传稳定性方面具有重要生物学和遗传学意义。

实验表明^[1],在照射后,细胞大多处于G₂期阻滞状态,许多细胞的DNA损伤可以及时得到修复,这样非常有利于细胞的存活。辐射造成细胞DNA损伤的同时也诱导了G₂期阻滞,使损伤得到修复,这说明辐射诱导的细胞G₂期阻滞是机体的一种保护性调节。另外,细胞G₂期阻滞与细胞辐射敏感性有关。哺乳动物细胞预先用咖啡因(可以解除照射诱导的细胞G₂期阻滞)处理后照射,可以使细胞存活率明显下降。在应用咖啡因类似物和一些细胞周期激酶抑制剂时,也可以观察到相似的实验结果^[6]。相反,当一些细胞G₂期阻滞延长时,也明显增强了细胞的辐射抗性。在大鼠胚胎成纤维细胞辐射抗性效应实验中发现^[7],细胞辐射抗性与DNA损伤或修复无关,但却表现为G₂期阻滞明显延长和细胞存活率明显提高。细胞G₂期阻滞也与细胞遗传稳定性有关。研究表明^[4],p53基因突变的细胞,表现出了明显的遗传不稳定性,而且这种遗传不稳定性常同时伴有照射后G₂期阻滞缩短。

总之,电离辐射可以诱导p53基因依赖性和p53基因非依赖性的G₂期阻滞,而且G₂期阻滞的发生明显与p53基因状态无关。在肿瘤细胞中,细胞周期调节基因突变是很常见的,细胞周期调节的缺陷可能增加肿瘤的辐射抗性。因此,对于p53基因非依赖性G₂期阻滞调控途径和辐射诱导细胞G₂期阻滞在促进细胞存活方面作用的认识,对深入研究G₂期阻滞的生物学和遗传学意义十分重要。同时,也为肿瘤的临床治疗提供新的途径。例如,可以采用咖啡因或蛋白激酶抑制剂等,通过解除细胞G₂期阻滞来增加肿瘤细胞的辐射敏感性,从而提高肿瘤放疗效果。

参考文献:

[1] Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G₂/M transition by p53[J]. *Oncogene*, 2001, 20(15): 1803-1815.
[2] Taylor WR, Deprimo SE, Agarwal A, et al. Mechanisms of G₂ arrest in response to overexpression of p53 [J]. *Mol Biol Cell*, 1999, 10(11): 3607-3622.

[3] Siu WY, Yam CH, Poon RY. G₁ versus G₂ cell cycle arrest after adriamycin induced damage in mouse Swiss3T3 cell [J]. *FEBS Lett*, 1999, 461(3): 299-305.
[4] Flatt PM, Tang LJ, Scatona CD, et al. p53 regulation of G₂ checkpoint is retinoblastoma protein dependent[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(12): 4210-4223.
[5] Zhan Q, Antinore MJ, Wang XW, et al. Association with cdc2 and inhibition of cdc2/cyclin B1 kinase activity by the p53 regulated protein gadd45[J]. *Oncogene*, 1999, 18(18): 2892-2895.
[6] Jin S, Antinore MJ, Lung FD, et al. The GADD45 inhibition of cdc2 kinase correlates with GADD45 mediated growth suppression[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(22): 16602-16608.
[7] Yang Q, Manicone A, Corusen JD, et al. Identification of a functional domain in a GADD45 mediated G₂/M checkpoint[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(47): 36892-36898.
[8] Wang XW, Zhan Q, Coursen JO, et al. GADD45 induction of a G₂/M cell cycle checkpoint[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1999, 96(7): 3706-3711.
[9] Samuel T, Weber HO, Rauch P, et al. The G₂/M regulator 14-3-3 sigma prevents apoptosis through sequestration of Bax[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(48): 45201-45206.
[10] Chan TA, Hermeding H, Lengauer C, et al. 14-3-3 sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage[J]. *Nature*, 1999, 401(6753): 616-620.
[11] Bulavin DV, Amundson SA, Fornace AJ. P38 and Chk1 kinase: different conductors for the G₂/M checkpoint symphony[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12(1): 92-97.
[12] Athar M, Kim AL, Ahmad N, et al. Mechanism of ultraviolet B induced cell cycle arrest in G₂/M phase in immortalized skin keratinocytes with defective p53[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 277(1): 107-111.
[13] Goldstone S, Pavey S, Forrest A, et al. Cdc 25 dependent activation of cyclin A/ cdk2 is blocked in G₂ phrase arrested cells independently of ATM/ATR[J]. *Oncogene*, 2001, 20(8): 921-932.
[14] Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, et al. DNA damage induced activation of p53 by the checkpoint kinase chk2 [J]. *Science*, 2000, 287(5459): 1824-1827.
[15] Teyssier F, Bay JO, Dionet C, et al. Cell cycle regulation agents exposure to ionizing radiation[J]. *Bull Cancer*, 1999, 86(4): 345-357.
[16] Deplaque G, Ceraline J, Becherel MC, et al. Caffeine and G₂/M block override: a concept resulting from a misleading cell kinetic delay independent of functional p53 [J]. *Int J Cancer*, 2001, 94(3): 363-369.
[17] Luo Y, Rockow SK, Joseph MK, et al. Abrogation of G₂ checkpoint specifically sensitize p53 defective cells to cancer chemotherapeutic agents[J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(1A): 23-28.