

文章编号: 1007-4627(2007)04-0289-05

# P53 及其相关蛋白对 X 射线照射肝癌细胞周期的调节\*

刘辉<sup>1,2</sup>, 张红<sup>1, #</sup>, 刘兵<sup>1</sup>, 王小虎<sup>3</sup>, 郝冀芳<sup>1</sup>, 段昕<sup>1</sup>,

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 武汉大学医学结构生物学研究中心, 湖北 武汉 430071;

3 甘肃省肿瘤医院, 甘肃 兰州 730050)

**摘要:** X 射线照射人肝癌细胞 HepG2, 照射后细胞存活随照射剂量增大明显下降。流式细胞术分析, 不同剂量组照射后 24 h 均发生 G<sub>2</sub> 期阻滞。照射后不同时间组的细胞周期分布也有不同, 照射后 12 h, 有显著的 S 期延迟。Western Blot 显示照射后 24 h P53, MDM2, P21 蛋白表达上升, 并有时效效应: P53 在照射后 24 h 之内始终维持较高表达, MDM2 和 P21 分别在照射后 6 和 12 h 的表达最高。X 射线照射通过影响 P53 及其相关蛋白的表达影响细胞周期。

**关键词:** X 射线照射; HepG2; 细胞周期; P53; P53 相关蛋白

**中图分类号:** Q257; R730.55

**文献标识码:** A

## 1 引言

电离辐射引起 DNA 损伤后, P53 蛋白表达上升, 细胞启动 DNA 修复过程, 同时伴随 P53 通路调节的细胞周期紊乱, 即 G<sub>1</sub> 期、S 期和 G<sub>2</sub> 期的阻滞或延迟<sup>[1, 2]</sup>。G<sub>1</sub> 期阻滞过程中伴随着碱基切除修复、核苷酸切除修复和非同源末端连接, S 期和 G<sub>2</sub> 期阻滞过程中伴随有借助同源染色体的同源重组修复<sup>[3]</sup>。辐射引起的细胞周期 G<sub>2</sub> 期阻滞比 G<sub>1</sub> 期阻滞更普遍<sup>[1]</sup>, 夏景光等研究表明 4 种不同的肿瘤细胞在受到 3 Gy  $\gamma$  射线辐射后, 都有明显的 G<sub>2</sub> 期阻滞发生<sup>[4]</sup>。实验表明, DNA 错配修复体系能调节 G<sub>2</sub>/M 检查点<sup>[5]</sup>, 而 G<sub>2</sub>/M 期的阻滞有不依赖 P53 的途径, 也有依赖于 P53 的途径<sup>[6]</sup>。辐射引起的 G<sub>1</sub> 期阻滞依赖于野生型 p53 基因 (wtp53) 的调节, 刘兵等用辐射诱导的 P53 腺病毒重组体转染直肠癌细胞, 发现转染 P53 可引起细胞发生 S 期, G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> 期, G<sub>2</sub>/M 期细胞阻滞<sup>[7]</sup>。P53 通过调节下游效应分子的转录来调控 G<sub>1</sub> 期的进程。细胞受损后, P53 上调 P21 表达, 从而抑制 CDK/周期蛋白对 pRb 蛋白的磷酸化作用, 使细胞发生 G<sub>1</sub> 期和 S 期阻滞。MDM2 则通过与 P53 蛋白氨基末端结合来阻止 P53 蛋白的

转录激活功能, 形成一个负反馈环, 限制 G<sub>1</sub> 期阻滞的时间, 使 DNA 损伤修复后的细胞再进入细胞周期。目前人们已经认识到 P53 及其相关蛋白在调节细胞周期过程中的重要作用, 但对调节过程中很多具体环节的了解还不深入, 本文研究了 X 射线照射对人肝癌细胞 HepG2 细胞周期的影响以及 P53 和相关蛋白表达的时间效应, 从而进一步探讨辐射引起细胞周期紊乱的机制。

## 2 材料与方法

### 2.1 细胞及其培养

人肝癌细胞 (HepG2 细胞系, p53 野生型) 由中国科学院近代物理研究所医学物理组细胞实验室冻存。复苏后细胞培养于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培养基, 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 培养。

### 2.2 细胞照射

1 × 10<sup>6</sup> HepG2 细胞接种于 100 ml 细胞培养瓶, 24 h 后室温下以 0.2 Gy/min 剂量率用 X 射线 (甘肃

\* 收稿日期: 2007-05-09; 修改日期: 2007-09-30

\* 基金项目: 中国科学院 2002 年度“百人计划”基金资助项目 (0306010BRO)

作者简介: 刘辉 (1977-), 女 (汉族), 河南焦作人, 硕士, 从事辐射生物学研究; E-mail: sunshine\_liuhui@yahoo.com.cn

# 通讯联系人: 张红, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn

省肿瘤医院放疗科, CL2100C 型医用电子直线加速器)照射, 剂量为 0, 1.0, 2.0, 4.0 和 8.0 Gy。

### 2.3 细胞存活测定

用克隆形成法测定。细胞照射后立即用胰酶消化, 稀释到合适浓度, 按梯度浓度分别接种于直径为 60 mm 培养皿, 37 °C 培养至第 10 天, 用醋酸: 甲醇(1: 3)固定液固定, Giemsa 染色、计数。

### 2.4 细胞周期测定

用胰酶消化细胞, PBS (磷酸盐缓冲液, pH 7.2)洗涤两次, 1 000 g 离心 5 min, 弃上清后振荡重悬, 75% 乙醇固定 30 min; 用 PBS 洗涤两次, 弃上清后振荡重悬, 加 0.5 ml PI (碘化丙啶)染液染色(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNA 酶、200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  碘化丙啶和 0.1% (v/v) Titon X100), 避光温育 30 min。用流式细胞仪 (FACSCalibur, BD 公司)检测, 用 WinMDI 和 Cylched 软件分析。

### 2.5 Western Blot 检测细胞中 P53, MDM2 及 P21 蛋白表达

用胰酶消化细胞, PBS 离心洗涤两次(200 g 离心 5 min), 弃上清, 裂解细胞提取蛋白, 用 Bradford 法测定样品蛋白浓度。15% 分离胶(水 1.1 ml, 30% 丙烯酰胺储存液 2.5 ml, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 1.3 ml, 10% SDS 0.05 ml, 10% APS 0.05 ml, TEMED 0.001 5 ml), 30 ng 蛋白上样量, 100 V 电压下进行 SDS-PAGE 蛋白电泳, 4 °C 100 mA 恒电流转膜过夜, 封闭后, 加入 P53, MDM2, P21 一抗

孵育 2 h, 再加入二抗孵育 1 h, 化学发光法显色。

## 3 结果

### 3.1 细胞存活

X 射线照射后, HepG2 细胞的存活曲线如图 1 所示。随着照射剂量的增加, 细胞存活明显下降。照射剂量小于 4 Gy 时, 曲线斜率大, 细胞存活率明显下降; 照射剂量大于 4 Gy 时, 细胞存活随照射剂量增大的变化(下降)不显著。

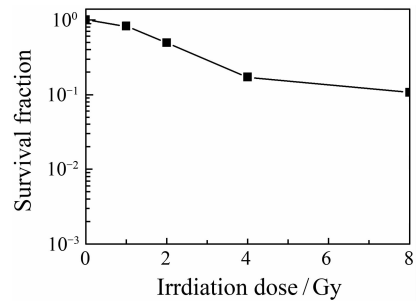


图 1 X 射线照射剂量与 HepG2 细胞存活的关系

### 3.2 细胞周期变化

0, 1.0, 2.0, 4.0 及 8.0 Gy 不同剂量 X 射线照射后 24 h, HepG2 细胞周期分布的变化见表 1。照射 24 h 后, 与对照组比较, 所有剂量组  $G_2/M$  期细胞均显著增多, 提示不同剂量 X 射线照射均引起 HepG2 细胞发生  $G_2$  期阻滞, 而 4.0 和 8.0 Gy 照射组处于  $G_1/G_0$  期细胞减少。特别是 8.0 Gy 组与其它各剂量组相比  $G_1/G_0$  细胞显著减少, 而 S 期的细胞明显增多, 表明细胞在 S 期有积累, 即 8.0 Gy 的 X 射线照射下 HepG2 细胞除发生  $G_2$  期阻滞外, 还发生 S 期延迟。

表 1 不同剂量 X 射线照射 HepG2 细胞 24 h 后细胞周期变化\*

Dose/Gy	$G_1/G_0$	$G_2/M$	S Phase
0	55.40 $\pm$ 3.67	11.13 $\pm$ 7.34	33.46 $\pm$ 4.06
1.0	51.96 $\pm$ 4.67	20.46 $\pm$ 1.94 <sup>(a)</sup>	27.53 $\pm$ 2.73
2.0	48.40 $\pm$ 2.46	25.33 $\pm$ 2.53 <sup>(a)</sup>	26.23 $\pm$ 0.46
4.0	43.06 $\pm$ 0.50 <sup>(a)(b)</sup>	24.86 $\pm$ 1.50 <sup>(a)</sup>	32.06 $\pm$ 1.36
8.0	29.16 $\pm$ 4.65 <sup>(a)(b)(c)(d)</sup>	26.06 $\pm$ 4.97 <sup>(a)</sup>	44.80 $\pm$ 9.53 <sup>(a)(b)(c)(d)</sup>

\* 数据表示为平均值  $\pm$  标准差; (a) 同对照相比 ( $p < 0.05$ ), (b) 同 1 Gy 组相比 ( $p < 0.05$ ), (c) 同 2 Gy 组相比 ( $p < 0.05$ ), (d) 同 4 Gy 组相比 ( $p < 0.05$ )。

2 Gy 剂量的 X 射线照射后 0, 6, 12 和 24 h 不同时间 HepG2 细胞的周期分布情况如表 2 所示。以照射后 0 h 的细胞作为对照, 同对照相比, 接受 2 Gy 的 X 射线照射后 12 h 的细胞处于  $G_1/G_0$  期的细胞在统计学上显著减少, 同时 S 期的细胞显著增加, 提示 S 期细胞积累较多, 细胞出现 S 期细胞延

迟; 而照射后 6 h, 细胞周期分布基本没有变化; 照射后 24 h, 处于  $G_1/G_0$  期和 S 期的细胞都有增多,  $G_2/M$  期的细胞减少, 但在统计学上没有意义。12 h 组比其它时间组  $G_1/G_0$  期细胞显著要少, 而 S 期细胞 12 h 组和 24 h 组都比 6 h 组明显增多。

表 2 2 Gy X 射线照射 HepG2 细胞后不同时间细胞周期变化\*

Time/h (after radiation)	$G_1/G_0$	$G_2/M$	S Phase
0	46.33 ± 2.97	33.63 ± 4.00	20.00 ± 1.24
6	45.73 ± 1.56	32.26 ± 5.14	21.96 ± 6.60
12	34.93 ± 1.97 <sup>(a)(b)</sup>	33.60 ± 0.70	31.50 ± 1.56 <sup>(a)(b)</sup>
24	48.40 ± 2.46 <sup>(c)</sup>	25.33 ± 2.53	26.23 ± 0.46

\* 数据表示为平均值 ± 标准差; (a) 同对照相比 ( $p < 0.05$ ), (b) 同 6 h 组相比 ( $p < 0.05$ ), (c) 同 12 h 组相比 ( $p < 0.05$ )。

### 3.3 P53, P21 和 MDM2 蛋白的表达

图 2 显示了 HepG2 细胞在接受了不同剂量的 X 射线照射 24 h 后细胞中的 P53, P21 和 MDM2 蛋白的表达情况。HepG2 细胞为 P53 野生型, 对照组中 P53 有表达, P21 和 MDM2 只有微弱的表达, 而细胞在接受照射后 3 种蛋白的表达均上升, 并且表达量随剂量增大有上升趋势。

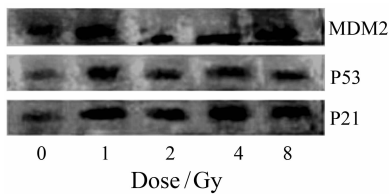


图 2 X 射线照射 24 h 后 HepG2 细胞中 P53, MDM2 和 P21 表达的 Western Blot 检测

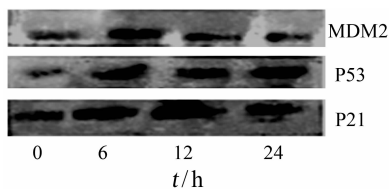


图 3 2 Gy X 射线照射后不同时间 HepG2 细胞中 P53, MDM2 和 P21 蛋白表达

HepG2 细胞接受 2 Gy 剂量 X 射线照射后不同时间细胞中 P53, MDM2 和 P21 蛋白的表达如图 3 所示。P53 在照射后 24 h 内均维持了较高水平的表达。MDM2 和 P21 受 P53 调节表达, 照射后 6 h,

MDM2 的表达较高, 到照射后 12 h 表达量又降低, 和 0 h 对比没有明显变化; 而 P21 照射后 24 h 内的表达量均高于 0 h 对照, 在照射后 12 h 达到最高, 照射后 24 h 的表达水平又有下降。由此看出这 3 个蛋白接受照射后的表达水平有时间效应。

## 4 讨论

通过细胞存活的实验发现, 随着辐射剂量的增大, 细胞存活明显下降。经线形平方拟合可以看出, 存活曲线基本符合线形平方关系。

我们的结果显示, HepG2 细胞经 1.0, 2.0, 4.0 和 8.0 Gy 的 X 射线照射后, 均发生有  $G_2$  期阻滞, 8.0 Gy 剂量照射后还伴随有 S 期的延迟。谢大兴等也发现小剂量 X 射线 (2 和 5 Gy) 照射激活细胞  $G_2$  检测点, 大剂量 X 射线 (10 和 20 Gy) 激活细胞  $G_1$  检测点<sup>[8]</sup>。我们的研究表明, 小剂量范围的 X 射线照射, 引起 HepG2 细胞发生  $G_2$  期阻滞, 即小剂量 X 射线引起的 DNA 损伤, 激活细胞  $G_2$  检测点, 加之 8.0 Gy 剂量照射后伴随有 S 期的延迟, 说明小剂量照射后细胞修复过程主要是在  $G_2$  期和 S 期借助同源染色体的同源重组修复。照射后 P53, P21 和 MDM2 的表达均上升, 提示 P53 等参与调节了辐射引起的  $G_2$  期阻滞, 至于是否存在其它调节途径及具体的调节过程, 是我们以后研究的方向。

研究中还发现细胞受到辐射后蛋白的表达有时间效应, 引起细胞周期在不同的辐射时间后的变化

不同。2 Gy X 射线照射后 24 h 之内, P53 的表达始终维持较高水平, MDM2 和 P21 虽然都受到 P53 的上调表达, 但在时间上不同步。MDM2 在照后 6 h 的表达水平较高, 而 P21 则在照后 12 h 表达较高。其它研究也发现, 辐射后 P53 等蛋白表达随时间变化<sup>[9]</sup>。P21 是 P53 下游调节细胞周期 G<sub>1</sub> 期阻滞和 S 期延迟的重要分子, 它具有广泛激酶抑制活性<sup>[10]</sup>, 又是 DNA 全酶抑制因子<sup>[11]</sup>, DNA 损伤时期不同, P21 蛋白作用机制不同: 损伤在 S 期之前, 它主要通过激酶抑制活性使细胞周期停滞于 G<sub>1</sub> 期; 而损伤在 S 期, 它通过与 PCNA 的结合来抑制 DNA 合成<sup>[12]</sup>。我们研究针对低剂量范围 X 射线照射的相关效应, 故未发现 G<sub>1</sub> 期阻滞, 结果显示 HepG2 细胞接受 2 Gy X 射线照射后 12 h, 细胞周期有显著的 S 期延迟, 这对应了 P21 在照射后 12 h 表达量最高。

电离辐射引起细胞周期紊乱, 其信号转导通路涉及了很多基因和生物大分子的参与, 而破坏辐射引起的细胞周期紊乱, 即可增加细胞的辐射敏感性。从这个意义来讲, 本研究就 X 射线照射引起细胞周期紊乱有时间效应的发现, 对于临床癌症放疗实践有一定的指导意义。

## 参考文献 (References):

[1] Xia S X. Radiobiology. Beijing: Military Medical Science Publishing Co, 1998, 60 (in Chinese).  
(夏寿萱主编. 放射生物学. 北京: 军事医学科学出版社, 1998, 60.)

[2] Dai J M, Lin R X, Wang S Q. J Radia Res and Radia Processing, 2005, **23**(5): 262 (in Chinese).  
(代金明, 林汝仙, 王升启. 辐射研究与辐射工艺学报, 2005, **23**(5): 262.)

[3] Bodnarchuk I A. Radiats Biol Radioeclo, 2003, **43**(1): 19.

[4] Xia J G, Li W J, Wei W, *et al.* Nuclear Techniques, 2005, **28**(8): 621 (in Chinese).  
(夏景光, 李文建, 魏 巍等. 核技术, 2005, **28**(8): 621.)

[5] Yan T, Schupp J E, Hwang H S, *et al.* Cancer Research, 2001, **61**(22): 8 290.

[6] Gao Y, Lin L P, Ding J. Life Science, 2005, **17**(4): 318 (in Chinese).  
(高 燕, 林莉萍, 丁 健. 生命科学, 2005, **17**(4): 318.)

[7] Liu B, Zhang H, Li W J, *et al.* J Radia Res and Radia Processing, 2006, **24**(2): 102 (in Chinese).  
(刘 兵, 张 红, 李文建等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2006, **24**(2): 102.)

[8] Xie D X, Feng Y D, Zhang P, *et al.* Chin J Exp Surg, 2005, **22**(2): 798 (in Chinese).  
(谢大兴, 冯永东, 张 鹏等. 中华实验外科杂志, 2005, **22**(2): 798.)

[9] Kastan M B, Zhan Q, El Deiry W S, *et al.* Cell, 1992, **71**: 587.

[10] El-Deiry W S, Tokino Y, Velculescu V E, *et al.* Cell, 1993, **75**: 817.

[11] Waga S, Hannon G J, Beach D, *et al.* Nature, 1994, **369**(6 481): 574.

[12] Yang A Q, Zheng X Z, Pan X L, *et al.* J Mod Oncol, 2006, **14**(2): 243 (in Chinese).  
(杨安强, 郑兴征, 潘晓琳等. 现代肿瘤医学, 2006, **14**(2): 243.)

## Effect of X-ray Radiation on Cell Cycle Regulated by P53 and Its Related Proteins in HepG2 Cells\*

LIU Hui<sup>1,2</sup>, ZHANG Hong<sup>1,#</sup>, LIU Bing<sup>1</sup>, WANG Xiao-hu<sup>3</sup>, HAO Ji-fang<sup>1</sup>, DUAN Xin<sup>1</sup>

(1 Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

2 Research Center for Medicine and Structural Biology, Wuhan University, Wuhan 430071, China;

3 Tumor Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730050, China)

**Abstract:** HepG2 cells were irradiated with X-ray at the doses of 0, 1.0, 2.0, 4.0 or 8.0 Gy and separately maintained in DMEM at 37 °C for 0, 6, 12 or 24 h. Colony-forming assay showed that cell survival decreased with

\* Received date: 9 May 2007; Revised date: 30 Sep. 2007

\* Foundation item: 2002 Century Program of Chinese Academy of Sciences(0306010BRO)

# Corresponding author: Zhang Hong, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn

the irradiation dose increasing. Cell cycle was detected by FACS, the arrest of S phase was found after 12 h irradiation and arrest of G<sub>2</sub> phase took place at 24 h after all irradiation doses, which suggested that cell cycle distribution was different in groups gathered after different maintaining time. The results of Western blotting showed that the expression of P53, MDM2 and P21 increased more after irradiation than the control. The expression of P53 remained high at 24 h after irradiation, while the levels of MDM2 or P21 arrived at the highest at 6 h or 12 h after irradiation respectively. The expressions of P21 after irradiation were in corresponding with the cell cycle distribution in the groups of different maintaining time. In conclusion, irradiation change the distribution of cell cycle by effecting the expression of P53 and its related proteins.

**Key words:** X-irradiation; HepG2; cell cycle; P53; related protein of P53