

文章编号: 1007-4627(2011)01-0126-04

核仁的细胞辐射应激功能研究进展*

畅磊^{1,2}, 周光明^{1, #}

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 中国科学院研究生院生命学院, 北京 100049)

摘要: 核仁是细胞核内核糖体合成、加工的场所。最近研究发现核仁参与多种细胞过程, 其中最为重要的就是细胞应激反应。核仁作为细胞应激感受器, 调控 ARF 等多种蛋白的定位及 P53 等关键蛋白的活性等, 从而介导细胞的应激反应。对核仁的细胞辐射应激功能研究进展进行了综述。

关键词: 核仁; 应激; 电离辐射; 辐射生物效应

中图分类号: Q691

文献标识码: A

1 引言

核仁是哺乳动物细胞核内最大的亚细胞结构, 是由 rRNA 和 rDNA 结合多种核仁蛋白形成的非膜性细胞器。核仁作为核糖体合成的场所, 与蛋白质的合成密切相关, 其形态和功能的完整性对细胞维持正常形态和发挥正常功能具有重要意义^[1-2]。近年来, 随着生命科学技术的发展, 人们对核仁的结构和功能有了进一步的了解。细胞受到外界刺激时, 核仁作为细胞应激的感受器, 其形态、数目以及核仁蛋白在核仁内外的定位分布发生变化, 从而介导细胞的应激反应。辐射作为一种重要的外界刺激, 与人们日常生活密切相关。随着载人航天的飞速发展、核能的和平利用、放射治疗和核医学成像技术的推广、电脑和手机的普及, 人们接触辐射的几率越来越大。因此, 对各类放射源的辐射生物效应研究日益受到重视。核仁对细胞应激反应的调控作用有可能加深人们对辐射生物效应机理的认识, 为降低辐射损伤和提高利用效率提供有益参考。

2 核仁的基本结构与功能

核仁由纤维中心(fibrillar center, 简称 FC)、致密纤维组分(dense fibrillar component, 简称 DFC)、颗粒组分(granular component, 简称 GC)、

核仁液泡(Nucleolar vacuole, 简称 NV)4 种基本结构区域组成。纤维中心的染色质没有组蛋白存在, 但存在嗜银蛋白, 嗜银蛋白的数目和结构特征与 rRNA 转录和细胞增殖相关^[3]。致密纤维组分是核仁中电子密度最高的部分, 呈环形或半月形包围 FC。颗粒组分是加工、成熟的核糖体亚单位前体颗粒。核仁液泡是一种包含多种内容物的无膜结构, 成分类似核仁基质, 其内部通常含有松散分布的核糖体前体颗粒、颗粒类似物和纤维成分。核仁没有膜结构, 被或多或少的染色质包围, 这层染色质称为核仁相随染色质(nucleolar associated chromatin)。用 RNase 和 DNase 处理核仁, 在电镜下观察到核仁的残余结构, 称为核仁基质(nucleolus matrix)或核仁骨架。FC, DFC 和 GC 都湮没在这种无形的核仁基质中。

一般认为核仁功能包括 rRNA 合成和核糖体装配。但随着生命科学的发展, 特别是蛋白质组学研究的突破, 已发现不同功能的核仁蛋白近 700 种^[4-6], 其中 126 种是新发现的蛋白质, 这些核仁蛋白参与多种生物过程^[7], 诸如 tRNA 前体加工、mRNA 转运、DNA 损伤修复、端粒代谢、周期调控和衰老等。多种核仁蛋白能在核仁和核质间穿梭^[8-9], 甚至能分泌到细胞表面^[10], 例如 nucleolin C23。

* 收稿日期: 2010-05-28; 修改日期: 2010-07-28

* 基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2010CB834201); 中国科学院百人计划计划资助项目(O760140BRO); 国家自然科学基金资助项目(10979062)

作者简介: 畅磊(1987-), 男(汉族), 甘肃兰州人, 硕士研究生, 从事辐射生物学研究; E-mail: changlei09@mails.gucas.ac.cn

通讯联系人: 周光明, E-mail: zhoug@impcas.ac.cn

3 核仁与辐射应激

辐射可分为电离辐射(如 X 射线、重离子束等)和非电离辐射(如紫外线)。电离辐射在细胞中沉积的能量可以直接导致 DNA 损伤,或者与细胞中的水分子等相互作用产生具有强化学反应活性的氧自由基等,间接导致 DNA 氧化损伤或者断裂,其中双链断裂通常难于修复、修复的忠实度极低,被认为是最关键的一类损伤。与电离辐射相比,紫外线辐射是更加普遍的环境辐射源,通常导致嘧啶二聚体的形成。

当受到辐射刺激时,细胞内核仁呈现明显的变化,主要表现为核仁组分分离,即 GC,DFC 和 FC 的分离,异质性核糖核蛋白等核仁蛋白和 rRNA 的降解所致的分离等。研究表明,核仁结构的改变是一种能够反映 DNA 损伤的生物标志,也是凋亡小体形成的早期体现^[11]。

4 与辐射应激反应相关的核仁蛋白质

Boisvert 等^[12]发现穿梭于细胞质、细胞核、核仁之间的蛋白质种类多达 2000 多种。在稳定状态下,蛋白质主要分布在特定的亚细胞区域;当 DNA 受到损伤后,细胞质中蛋白酶体与抑制蛋白分离或者结合装配伴侣分子而获得穿梭能力,而这些蛋白酶体又与核仁中的激活物关联传递应激信号。ARF 等穿梭性核仁蛋白在细胞应激的调控方面起着非常重要的作用。

ARF(Alternate Reading Frame, 人源 ARF 为 P14,小鼠的同源蛋白为 P19)通过与 mdm2 的结合调控 P53 蛋白的活性^[13]。ARF 基因位于人类染色体 9p21 区,与之处于同一基因位置的还有抑癌基因 $p16^{INK2A}$ 。E2F-1 转录因子调控 ARF 基因的转录,E2F-1 由致癌性过度增殖激活^[14]。ARF 的 N 端与核磷蛋白(Nucleophosmin)的 C 端相互作用,也能与 mdm2 结合^[15],小鼠 ARF 的 N 端是核仁定位信号。

Nucleophosmin(NPM, B23, NO38, numatrin)是癌细胞中核仁富集的磷酸蛋白,抑制早期肿瘤基因的表达^[16]。在其他核蛋白和核糖体 RNA 的协作下,它能和 mdm2 作用,进而影响 P53 的活性。NPM 也可以与 P53 直接作用促进 $p53$ 的表达,影响细胞周期检验点的调控^[17]。

CANu1 是由 Sihm 等^[5]发现的,位于染色体 14q11.2,编码 315 个氨基酸。通过绿色荧光融合蛋白观察发现,CANu1 定位于核仁,其 C 末端对其定位起决定作用。沉默 CANu1 基因能引起核糖体应激,使细胞停滞于 G1 期。CANu1 蛋白在 UV 辐射后能从核仁向细胞核颗粒迁移,其迁移调控机制尚不清楚,但与已知的调节通路不同。有趣的是,UV 辐射后 CANu1 的机动性是非辐射细胞的 2 倍。

PARP-1(poly(ADP-ribose) polymerase)是由 DNA 断裂而自我变构激活的核酶。激活的 PARP-1 能调控多种细胞进程,包括 DNA 修复和细胞凋亡。PARP-1 与 XRCC1 结合并富集于 DNA 损伤位点,然后 XRCC1 与 DNA 连接酶 III 形成复合体对 DNA 进行修复。当 PARP-1 激活时,能引起凋亡感受因子(apoptosis induction factor,简称 AIF)从线粒体迁入细胞核^[18],同时 PARP 大量消耗细胞中的 NAD^+ ,促使细胞发生凋亡。大约 40% 的 PARP-1 定位于核仁,但只有在核质中的 PARP-1 才具有反应活性。DNA 受损后,PARP-1 从核仁迁移至核质,其迁移机制尚不清楚。Rancourt 等^[19]发现喜树碱(camptothecin,简称 CPT)能使 PARP-1 从核仁迁出,然后 PARP-1 被 MNNG(N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine)激活。作为对比,若先使用 MNNG 再使用 CPT,PARP-1 首先被激活,但没有 DNA 损伤修复活性以及消耗内源性的 NAD^+ 。这些结果说明,PARP-1 在应激时先从核仁迁徙至核质,然后再被激活的。

FEN-1(flap endonuclease)是典型的 5'端特异性核酸酶。它具有 3 种不同的核酸酶活性:(1) FEN (flap endonuclease) 活性;(2) EXO (nick-specific exonuclease) 活性;(3) GEN (gap-dependent endonuclease) 活性。FEN 活性,冈崎片段成熟后切除 RNA 引物和长片段 DNA 切除、修复。当连接酶的效率不如 EXO 时,FEN-1 就会从 FEN 活性转向 EXO 活性,继续从 5'端切除核酸形成沟,FEN-1 的第 3 个活性 GEN 将这个沟变成双链断裂。FEN-1 在核仁富集,并且参与 DNA 复制叉前进障碍的修复。细胞受到 UV 照射时,FEN-1 发生磷酸化,从核仁移入核质,利用其 EXO 和 GEN 活性参与解决 UV 辐照产生的 DNA 交联。Guo 等^[20]突变 FEN-1 的 Ser(187)Asp 来模拟恒定的磷酸化,使 FEN-1 不在核仁中积累;而突变 Ser(187)Ala 除

去这唯一的磷酸化位点，导致 FEN-1 在核仁中滞留。以上两种突变都引起细胞对 UV 辐射敏感，使细胞的损伤修复能力下降、细胞存活率降低。

5 细胞辐射应激时核仁蛋白移位的可能分子机制

正常情况下，ARF 的 N 端与 B23 结合、C 端与拓扑异构酶 I(topo I)结合；P53 在合成之后立即与 mdm2 结合，mdm2 能使之泛素化而降解。UV 辐射或其他外界刺激使 B23，ARF 和 topo I 三者形成的复合物解聚，从而使 ARF 和 B23 从核仁中迁出。在初期 ARF 和 mdm2 结合，释放 P53，使之发挥生物学功能；B23 则在后期结合游离的 mdm2，使 P53 更多地积累^[21](见图 1)。

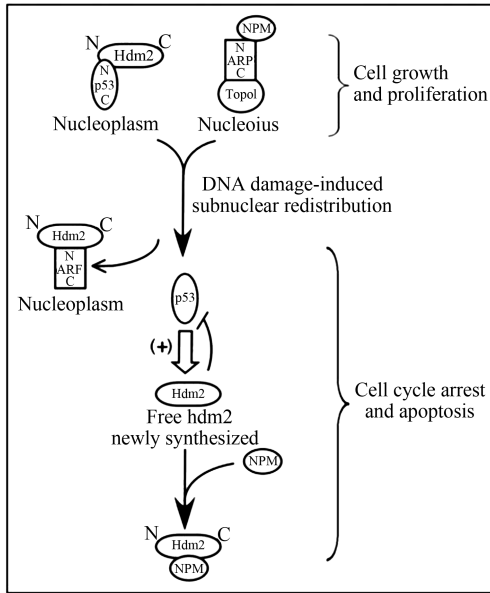


图 1 P53-mdm2-ARF 系统^[23]

UV 照射和电离辐射对 JNK 通路激活的程度有很大差异，JNK 通路主要对 UV 照射敏感。Yogev 等^[18]发现 JNK 基因敲除后，UV 照射不再使 ARF 和 B23 由核仁向核质转移，说明 UV 照射引起的 ARF 和 B23 迁移主要是通过激活 JNK 途径来实现的，但 JNK 途径只能解释 60%—80% ARF 的迁移，说明 JNK 通路并不是唯一途径。Shaulian 等^[22]发现 UV 辐射应激中，c-Jun 是不可或缺的因素，c-Jun 在静息时可以和 B23 相结合。激活的 JNK 能磷酸化 c-Jun 的 Ser⁶³，Ser⁷³ 和 Thr⁹¹，Thr⁹³，而经过 Thr⁹¹ 和 Thr⁹³ 磷酸化的 c-Jun 能够参

与 ARF 的迁移。由此，可以建立起一个细胞辐射应激调控模型：辐射激活 JNK 通路，从而磷酸化 c-Jun 的 Thr⁹¹ 和 Thr⁹³，磷酸化的 c-Jun 结合 ARF，然后与结合于 c-Jun 的 B23 一起转运出核仁，作用于 P53-mdm2-ARF 系统(见图 2)。

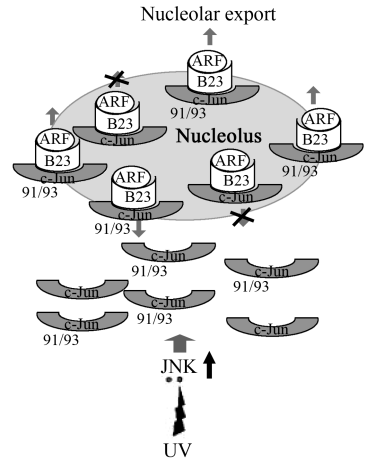


图 2 UV 照射对 JNK 通路的影响^[18]

5 总结与展望

核仁功能研究最近取得了突破性进展，发现核仁不仅仅参与 rRNA 合成和核糖体形成、装配，而且参与多种其它生物过程。核仁蛋白多达 700 种，共有 2000 多种蛋白在核仁与核质、细胞质之间穿梭，因此，核仁像一个路由器，是信号通路网络最大的节点，它通过核仁蛋白参与多种生物学过程，其中最为重要的就是细胞应激反应。

核仁作为细胞应激感受器，调控 ARF 等多种蛋白的定位，以及 P53 等关键蛋白的活性等，从而介导细胞的应激反应。一个以 JNK 为中心的辐射应激信号通路已经初现轮廓，细胞中同时也存在不同于 JNK 和 c-Jun 的信号通路。但是，这些发现仍然只是冰山一角，核仁形态与数目如何反映细胞的生理状态、700 多种核仁蛋白的功能及其与其它穿梭蛋白的相互作用、核仁的应激调控作用在肿瘤放疗和辐射防护中的应用等等，这一系列复杂而有趣的问题还有待进一步的研究。

另外，本实验室在开展重离子束治癌机理研究时发现，重离子束照射和 X 射线处理均可显著改变核仁的形态和大小等，提示核仁结构的变化可能与细胞的辐射效应存在一定联系。深入研究核仁结构和组分蛋白的动态变化有可能为揭示细胞辐射生物

学效应机理提供新的视角。

参考文献 (References):

- [1] Boisvert F M, van Koningsbruggen S. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, **8**(7): 574.
- [2] Pederson T, Tsai R Y. *J Cell Biol*, 2009, **184**(6): 771.
- [3] Pich A, Chiusa L, Micron M E. *Micron*, 2000, **31**(2): 133.
- [4] Leung A K, Andersen J S, Mann M, *et al.* *Biochem J*, 2003, **376**: 553.
- [5] Andersen J S, Lam Y W, Leung A K, *et al.* *Nature*, 2005, **433**(7021): 77.
- [6] Lam Y W, Evans V C, Heesom K J, *et al.* *Mol Cell Proteomics*, 2010, **9**: 117.
- [7] Sihm C R, Lee Y S, Jeong J S, *et al.* *Genes Cells*, 2008, **13**(8): 787.
- [8] Kalderon D, Roberts B L, Richardson W D, *et al.* *Cell*, 1984, **39**(3 Pt 2): 499.
- [9] Scaloni F, Federici L, Brunori M, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(12): 5447.
- [10] Hoja-Luukowicz D, Przybylo M, Pochee E, *et al.* *Cancer Immunol Immunother*, 2009, **58**(9): 1471.
- [11] Wang Kangkai, Deng Gonghua, Xiao Xianzhong. *Progress in Physiological Sciences*, 2003, **34**: 2(in Chinese).
(王慷慨, 邓恭华, 肖献忠. *生理科学进展*, 2003, **34**: 2.)
- [12] Boisvert F M, Lam Y W, Lamont D, *et al.* *Mol Cell Proteomics*, 2010, **9**(3): 457.
- [13] Gjerset R A. *J Mol Histol*, 2006, **37**(5-7): 239.
- [14] Bates S, Phillips A C, Clark P A, *et al.* *Nature*, 1998, **395**(6698): 124.
- [15] Kamijo T, Zindy F, Roussel M F, *et al.* *Cell*, 1998, **91**(5): 649.
- [16] Datta A, Sen J, Hagen J, *et al.* *Mol Cell Biol*, 2005, **25**(18): 8024.
- [17] Colombo E, Marine J C, Danovi D, *et al.* *Nat Cell Biol*, 2002, **4**(7): 529.
- [18] Yogev O, Saadon K, Anzi S, *et al.* *Cancer Res*, 2008, **68**(5): 1398.
- [19] Rancourt A, Satoh M S. *DNA Repair (Amst)*, 2009, **8**(3): 286.
- [20] Guo Z, Qian L, Liu R, *et al.* 2010, *Mol Cell Biol*, 2010, **28**(13): 4310.
- [21] Gjerset R A. *J Mol Histol*, 2006, **37**(5-7): 239.
- [22] Shaulian E, Schreiber M, Piu F, *et al.* *Cell*, 2000, **103**(6): 897.
- [23] Lee C, Smith B A, Bandyopadhyay K, *et al.* *Cancer Res*, 2005, **65**(21): 9834.

Progress in Studies on Nucleolus Functions^{*}

CHANG Lei^{1,2}, ZHOU Guang-ming^{1, #}

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

2 *Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

Abstract: Nucleoli is the sites for ribosome synthesis and processing, however, recent approaches have revealed that it is also involved in variety of cellular processes, especially the cellular stress response. As sensors, nucleoli regulate the localization of nucleolar proteins, such as (Alternate Reading Frame, ARF), and the activation of key factors, such as P53, and consequently mediate the cellular stress response. In this paper, recent progress in the studies on nucleolar functions in cellular stress response to radiation is reviewed.

Key words: nucleolus; cellular stress; ionizing radiation; radiobiological effect

* **Received date:** 28 May 2010; **Revised date:** 28 Jul. 2010

* **Foundation item:** Major State Basic Research Development Program of China(973 program)(2010CB834201); Century Program of Chinese Academy of Sciences(O760140BRO); National Natural Science Foundation of China(10979062)

Corresponding author: Zhou Guang-ming, E-mail: zhougm@impcas.ac.cn