

文章编号: 1001-098X(2002)06-0278-03

电离辐射诱导G₂期阻滞的机制

苑晓燕

摘要: 电离辐射损伤后, 细胞通过若干关卡来调控细胞周期的进程, 使细胞有时间进行DNA修复, 确保染色体组的完整性和遗传稳定性, 减少突变的发生。不同的电离辐射使不同细胞产生G₁、G₂和S期等不同时相的变化, 但电离辐射后G₂期阻滞的现象十分普遍。近年来, 对G₂期阻滞机制的研究多集中在Chk1、Chk2和p53上。

关键词: 电离辐射; G₂期阻滞; Chk1; Chk2; p53

中图分类号: Q253, Q691.9 **文献标识码:** A

Mechanisms of ionizing radiation-induced G₂ arrest

YUAN Xiao-yan

(Department of Radiation Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Cells regulate cell cycle progression by arresting several checkpoints in response to ionizing radiation, which provides time for them to repair DNA damage, ensures genomic integrity and genetic stability and in turn decreases genetic mutations. Different cells arrest different checkpoints such as G₁-, G₂- and S-phase checkpoint in response to different ionizing radiations, whereas G₂-phase arrest is more prevalent. More attention has been focused on Chk1, Chk2 and p53 in the study of mechanisms of ionizing-radiation-induced G₂ arrest these years.

Key words: ionizing radiation; G₂ arrest; Chk1; Chk2; p53

中、高剂量电离辐射对真核细胞的一个普遍效应是导致分裂延迟, 包括G₁、G₂期阻滞、S期延迟等。有资料表明, 辐射所致的G₂期阻滞比G₁期阻滞更为普遍, 只有表达野生型p53、且有p21参与时, 细胞受到辐射后才产生G₁期阻滞。同时, G₂/M检查点(checkpoint)防止了染色体的错误分离, G₂期阻滞对辐射所致的DNA双链断裂能以重组方式进行修复, 确保了细胞染色体组的完整性和稳定性, 减少了突变的发生。因此, 探讨G₂期阻滞的调控机制有重大意义。

1 G₂/M期进程的调控

研究表明, 调控细胞周期进程分子机制的核心为CDK(周期蛋白依赖性激酶)的活性表达与调控。目前认为, CDK的活性调节主要通过以下几种方

式: (1)周期蛋白与CDK的结合; (2)CDK亚基上特定位点的磷酸化与去磷酸化; (3)CDK抑制剂(CDI)与CDK的结合; (4)泛素依赖的蛋白溶解系统。

现发现周期蛋白(cyclin)有8个成员, 分别命名为A~H。它们作为调节亚基, 需与相应的催化亚基CDK结合, 形成具有激酶活性的复合物, 在细胞周期的相应时期发挥调节作用。cyclin分别在细胞周期的不同时期周期性地合成和释放, 通过含量的改变影响细胞周期的进程。

CDK有8个成员, 分别命名为CDK1~8, 它们在细胞周期中的表达相对稳定, 主要通过自身的磷酸化与去磷酸化改变其活性, 参与周期调控。Cyclin A、cyclin B1均可与cdc2(cell division cycle)激酶(即CDK1)结合, 调控G₂/M期进程, 但cyclin B1只特异作用于G₂期, 在G₂/M期进程调控中起关键作用。一般认为有丝分裂前, cdc2的抑制性位点第14位苏氨酸、第15位酪氨酸的磷酸化使cyclin B1-cdc2复合物处于失活状态; cdc25C磷酸酶可使cdc2的第14位苏氨酸、第15位酪氨酸去磷酸化, 激活cyclin B1-cdc2, 而使细胞进入有丝分裂期。Fletcher L等^[1]发现

收稿日期: 2002-07-12

作者简介: 苑晓燕(1977-), 女, 河南鲁山人, 第三军医大学防原医学教研室(重庆, 400038)硕士研究生, 主要从事放射生物学研究。

审校者: 第三军医大学防原医学教研室 高京生

cdc2的两抑制性位点分别具有不同功能,第15位酪氨酸的磷酸化在G₂期阻滞中发挥关键作用。

CDI如p21、p27、p57、p16、p15、p18、p19等,通过与相应CDK-cyclin结合,使其配体失活而阻碍细胞周期的进行。例如p21可与多种CDK-cyclin复合物结合形成三联体,直接抑制CDK的活性,在细胞周期的各个关卡发挥重要作用。

最近研究表明,泛素介导的一些关键蛋白定时定点的分解,在周期调控中也起关键作用。泛素可识别蛋白质的特异序列,多个相连的泛素分子通过泛素-蛋白连接酶与底物蛋白共价结合,随后在泛素依赖性蛋白水解酶复合体的作用下,底物蛋白被降解。细胞周期调控分子中,cyclin B、cyclin C、cyclin D的降解,p27的抑活等均通过此途径。

2 G₂期阻滞的调控

DNA损伤后,细胞通过若干关卡来调控细胞周期的进程,使细胞有时间进行DNA修复,保持染色体的完整性和遗传稳定性。电离辐射诱导的G₂/M期阻滞是一个复杂的信号转导网络,涉及多种分子的相互作用。普遍认为,ATM(ataxia telangiectasia mutation)/ATR(ATM-Rad3-related protein)激酶-Chk1(checkpoint kinase 1)/Chk2-cdc25C-cdc2途径在此过程中起着关键作用。此外,p53/p21、Gadd45(生长阻滞与DNA损伤诱导蛋白)、MMR(错配修复蛋白)等也参与了电离辐射诱导的G₂期阻滞的调控,但最终均通过作用于cdc2而发挥作用。电离辐射后,细胞周期调控的下游信号分子研究较多,目前,Chk1/Chk2依赖的信号转导途径和p53依赖的信号转导途径成为周期调控机制的研究热点。需要指出的是,由Chk1/Chk2与p53间存在一定的相互作用,两条通路间并非完全独立。

2.1 Chk1/Chk2依赖的信号转导途径

Chk1是DNA损伤后被激活的一个检查点激酶,在ATM/ATR激酶下游发挥作用,参与细胞周期的调控。研究发现,通过反义RNA阻碍Chk1的表达,会阻断DNA损伤引起的G₂期阻滞,同时细胞凋亡增加^[2];加入Chk1抑制剂如UCN-01,细胞在γ射线照射后不出现周期阻滞,而是继续进行有丝分裂^[3],表明Chk1在正常的细胞增殖和DNA损伤反应中是一个重要的关卡调控蛋白,并为G₂期阻滞所必需。

体外实验表明,辐射损伤后Chk1、Chk2激酶活

化,并磷酸化cdc25C的丝216位点,该位点的磷酸化提供与小分子酸性蛋白14-3-3σ结合的位点。14-3-3σ与cdc25C结合后会引起cdc25C亚细胞定位的改变,使cdc25C被排斥于细胞核外,阻止cdc2的活化,使细胞停滞在G₂期,直到DNA修复或复制完成。Ding Z等^[4]发现,G₂/M期阻滞与cdc2的高度磷酸化和激酶活性减弱有关。Hu BC等^[5]发现,AI-5细胞表现出的辐射抗性与较强的G₂期阻滞相关,这种表型伴有Chk1的高表达和cdc2的高度磷酸化,进一步证实了上述理论。Oe T等^[6]发现,在未成熟的非洲蟾蜍卵母细胞的自发性G₂期阻滞中,Chk1也起一定作用(至少是部分作用)。通过体外卵母细胞培养发现,Chk1可在发生G₂期阻滞的卵母细胞的胞质中发挥抑制cdc25的功能,且细胞成熟过程中cdc25只能在胞质中被活化;在细胞成熟过程中,Chk1的活性无明显变化,而是维持在基础水平;同时发现在Chk1的C末端断裂的突变体具有更高的激酶活性,有很强的抑制细胞成熟和改变其亚细胞定位的能力。以上表明Chk1/cdc25途径还参与了某些细胞胞质中适度的、不依赖于G₂检查点的自发性G₂期阻滞,Chk1的C末端区域负性调节其活性并决定其亚细胞定位^[6]。因此认为Chk1作为cdc25普遍的抑制剂,通过结构变化改变其生物活性,参与G₂期阻滞的调控。

Chk2是哺乳动物中Rad53、cds1的同源基因,作为另一种被DNA损伤激活的检查点激酶,也参与了细胞周期的调控。Atsushi H等^[7]用基因打靶技术得到Chk2^{-/-}的鼠胚胎干细胞,发现γ射线照射后并不诱导细胞产生G₂期阻滞;同时,Chk2^{-/-}细胞在p53的稳定性和p53诱导的p21的转录方面存在缺陷,引入Chk2基因后,依赖p53的转录功能恢复。干扰Chk2基因的表达,会影响电离辐射引起的S期延迟和G₂期阻滞。因此认为,作为ATM/ATR下游的一个重要的效应分子,Chk2发挥着多种功能:(1)Chk2参与了DNA损伤诱导的G₂期阻滞的维持,但不参与其启动;(2)Chk2调控周期阻滞的机制与Chk1相似;(3)Chk2位于p53上游参与DNA损伤后p53活性的调节;(4)p53第15位丝氨酸、第20位丝氨酸的磷酸化被认为与p53的稳定性和DNA损伤反应有关,ATM磷酸化其第15位丝氨酸位点,Chk2磷酸化其第20位丝氨酸位点。研究证实,Chk2在体内的磷酸化和活化必须有ATM的参与,Chk2的第68位苏氨酸为ATM磷酸化位点。

ATM、ATR蛋白激酶具有与PI3K(磷脂酰肌醇3-激酶)和DNA-PK(DNA依赖的蛋白激酶)催化亚单位类似的催化区域,属PI3K家族,是细胞辐射损伤监视网络上游的中心组件,它们感受到DNA损伤信号后,将信号下传最终作用于细胞周期的引擎-CDK-cyclin复合体而调控细胞周期的进程。DNA损伤后,ATM活化Chk2,ATR活化Chk1。ATM/Chk2与ATR/Chk1,究竟哪条通路在G₂期阻滞发挥主要作用,目前还存在争议^[9]。有实验表明,Chk2的激活可能有ATM依赖性和ATM/ATR非依赖性途径,Robert SW等^[9]发现Hus1作为Rad家族的一员,在Chk1上游发挥作用,可促进ATM对Chk1的磷酸化,也提示可能存在ATM/ATR非依赖性的Chk1/Chk2的激活。

2.2 p53依赖的信号转导途径

研究表明,p53及其下游基因产物除参与G₁期阻滞外,还参与了G₂期阻滞。多数人认为,p53参与了G₂期阻滞的维持,并不参与G₂期阻滞的启动,所以非G₂期阻滞所必须。然而,有人发现阻断NHF(正常人纤维母细胞)p53的表达,辐射诱导的G₂期阻滞反应却明显增强。Matsui F等^[9]用大剂量射线照射鼠胚胎纤维母细胞,发现野生型p53细胞中p53的表达明显高于p53突变的细胞,但两者的G₂期阻滞效应却无明显不同,似乎表明p53可能并不参与G₂期阻滞。因此,学者认为,实验结果的不同可能与辐射条件、损伤程度和细胞种类的不同有关。

p53参与G₂期阻滞的机制包括:(1)抑制cdc2激酶的活性。p53作为转录因子激活下游靶基因的转录,由这些效应分子如p21、Gadd45、14-3-3 σ 等发挥抑制cdc2活性的作用,调控G₂期进程;(2)抑制cyclin B1、cdc2基因的表达;(3)通过MCG10、cyclin G₁等基因的转录,加强G₂期阻滞作用,但具体机制不详。

p21作为p53的一个效应分子参与G₂期阻滞的机制可能有:(1)p21通过与CDK-cyclin复合物结合,直接抑制CDK活性;(2)p21的高表达阻碍了CAK(CDK activation kinase)对CDK2第161位苏氨酸位点的磷酸化,使得CDK2不能被激活;(3)p21与PCNA(增殖细胞核抗原)结合,抑制其活性,而PCNA为DNA合成所必需;(4)通过抑制CDK-cyclin的活性,使p130(pRb家族成员)与转录因子E2F结合,遮盖其功能区而抑制其活化cdc2转录的功能^[10]。

Gadd45作为另一个p53下游的效应分子也参与

了G₂/M期转换。Gadd45在体内与cdc2、PCNA、p21相互作用,主要通过抑制cdc2激酶活性参与G₂期阻滞。Jin S等^[11]发现Gadd45蛋白的中心区-氨基酸65-84是cdc2结合区,该区为其抑制cdc2活性所必需。Gadd45与cdc2结合后,使cyclin B1-cdc2解离,细胞阻滞于G₂期。

14-3-3 σ 参与周期阻滞的机制如前所述。除此之外,多种新发现的蛋白及其他p53下游效应分子参与了p53依赖的G₂期阻滞,它们之间相互协调、相互制约,共同完成信号转导。

需要指出的是,辐射损伤后,引起G₂期阻滞的信号转导通路间并非完全独立,ATM、ATR、Chk1、Chk2与p53间存在一定的相互作用。ATM/ATR、Chk1/Chk2分别磷酸化p53第15位丝氨酸、第20位丝氨酸位点,与p53的稳定性及DNA损伤反应有关。Lee SL等^[12]发现DNA损伤后,Chk1第345位丝氨酸的磷酸化有助于Chk1与p53、p21、14-3-3 σ 的结合,提示Chk1与p53下游的效应分子间存在相互作用,两条途径在周期阻滞中发挥协同作用。辐射损伤后,高表达的p53可通过抑制Chk1的转录而导致Chk1蛋白水平降低^[13],也说明p53和Chk1在G₂期阻滞的调控和细胞周期的重新启动中相互依赖、相互补充,两条途径间形成了一个复杂的调控网络。

3 结语

虽然已在电离辐射后G₂期阻滞的发生和调控等研究方面取得了显著进展,但仍有许多重要问题有待解决:(1)DNA损伤引起p53表达增高,其上游的分子机制是什么?(2)除上述两条途径外,是否还存在其他途径介导辐射后的G₂期阻滞,作用如何?(3)不同细胞间产生辐射损伤反应差异的分子机制是什么?(4)如何将这些理论应用于实际,以减少高剂量辐射后基因突变的发生,并解决放疗中某些肿瘤的辐射不敏感问题。

参考文献:

- [1] Fletcher L, Cheng Y, Muschel RJ. Abolishment of the Tyr-15 inhibitory phosphorylation site on cdc2 reduces the radiation-induced G(2) delay, revealing a potential checkpoint in early[J]. Cancer Res, 2002, 62(1): 241-250.
- [2] Luo Y, Chen Z, Han EK, et al. Blocking Chk1 expression induces apoptosis and abrogates the G₂ checkpoint mecha-

微束的准直系统,使其束径的减小可对单个细胞中的特定结构如线粒体进行照射。相信微束装置的不断改进,将有助于回答辐射诱导的旁效应研究,尤其是其发生机制中存有争论的问题,弄清旁效应发生的详细过程,并由此使低剂量辐射效应基本问题上的研究取得重大突破。

参考文献:

- [1] Neldson JM, Brooks AL, Metting NF, et al. Clastogenic effects of defined numbers of 3.2 MeV alpha particles on individual CHO-K1 cells[J]. *Radiat Res*, 1996, 145(5): 568-574.
- [2] Hei TK, Wu LJ, Liu SX, et al. Mutagenic effects of a single and an exact number of alpha particles in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(8): 3765-3770.
- [3] Miller RC, Randers PG, Geard CR, et al. The oncogenic transforming potential of the passage of single alpha particles through mammalian cell nuclei[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(1): 19-22.
- [4] Nagasawa H, Little JB. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles[J]. *Cancer Res*, 1992, 52(22): 6394-6396.
- [5] Deshpande A, Goodwin EH, Bailey SM, et al. Alpha-particle-induced sister chromatid exchange in normal human lung fibroblasts: evidence for an extranuclear target[J]. *Radiat Res*, 1996, 145(3): 260-267.
- [6] Belyakov OV, Malcolmson AM, Folkard M, et al. Direct evidence for a bystander effect of ionizing radiation in primary human fibroblasts[J]. *Br J Cancer*, 2001, 84(5): 674-679.
- [7] Lehnert BE, Goodwin EH. Extracellular factor(s) following exposure to alpha particles can cause sister chromatid exchanges in normal human cells[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(11): 2164-2171.
- [8] Prise KM, Belyakov OV, Folkard M, et al. Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam[J]. *Int J Radiat Biol*, 1998, 74(6): 793-798.
- [9] Zhou H, Suzuki M, Vannais D, et al. Radiation risk to low fluences of alpha particles may be greater than we thought [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(25): 14410-14415.
- [10] Zhou H, Randers PG, Waldern CA, et al. Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(5): 2099-2104.
- [11] Mothersill C, Seymour C. Radiation-induced bystander effects: past history and future directions [J]. *Radiat Res*, 2001, 155(6): 759-767.
- [12] Albanese J, Dainiak N. Ionizing radiation alters Fas antigen ligand at the cell surface and on exfoliated plasma membrane-derived vesicles: implications for apoptosis and intercellular signaling[J]. *Radiat Res*, 2000, 153(1): 49-61.
- [13] Iyer R, Lehnert BE. Effects of ionizing radiation in targeted and nontargeted cells[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 376(1): 14-25.
- [14] Seymour C, Mothersill C. Relative contribution of bystander and targeted cell killing to the low-dose region of the radiation dose-response curve[J]. *Radiat Res*, 2000, 153(5Pt1): 508-511.
- [15] Lyng FM, Seymour C, Mothersill C. Production of a signal by irradiated cells which leads to a response in unirradiated cells characteristic of initiation of apoptosis[J]. *Br J Cancer*, 2000, 3(9): 1223-1230.
- (上接第280页)
- nism[J]. *Neoplasia*, 2001, 3(5): 411-419.
- [3] Jackson JR, Roshak A, Winkler JD, et al. An indolocarbazole inhibitor of human checkpoint kinase (Chk1) abrogates cell cycle arrest caused by DNA damage [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(3): 566-572.
- [4] Ding Z, Parchment RE, LoRusso PM, et al. The investigational new drug XK469 induces G(2)-M cell cycle arrest by p53-dependent and -independent pathways[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(11): 3336-3342.
- [5] Hu BC, Wang X, Wang Y, et al. The radioresistance to killing of A1-5 cells derives from activation of the Chk1 pathway[J]. *Biol Chem*, 2001, 276(21): 17693-17698.
- [6] Oe T, Nakajo N, Katsuragi Y, et al. Cytoplasmic occurrence of the Chk1/Cdc25 pathway and regulation of Chk1 in *Xenopus* oocytes[J]. *Dev Biol*, 2001, 229(1): 250-261.
- [7] Atsushi H, Kong YY, Shuhei M, et al. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2 [J]. *Science*, 2000, 287: 1824-1827.
- [8] Robert SW, Shuhei M, Stephen JE, et al. Hus1 acts upstream of chk1 in a mammalian DNA damage response pathway[J]. *Current Biol*, 2002, 12(1): 73-77.
- [9] Matsui F, Tsuchida Y, Keng PC. Effects of p53 mutations on cellular sensitivity to ionizing radiation [J]. *Am J Clin Oncol*, 2001, 24(5): 486-490.
- [10] Taylor WR, Atark GR, Galante J, et al. p130/E2F4 binds to and represses the cdc2 promoter in response to p53[J]. *Biol Chem*, 2001, 276(3): 1998-2006.
- [11] Jin S, Antinore MJ, Lung FD, et al. The GADD45 inhibition of Cdc2 kinase correlates with GADD45-mediated growth suppression[J]. *Biol Chem*, 2000, 275(22): 16602-16608.
- [12] Lee SL, Tian Hui, Faje AT, et al. Radiation-induced phosphorylation of Chk1 at S345 is associated with p53-dependent cell cycle arrest pathways[J]. *Neoplasia*, 2002, 4(2): 171-180.
- [13] Gottifredi V, Kami SO, Shieh SS, et al. p53 down-regulates CHK1 through p21 and the retinoblastoma protein[J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(4): 1066-1076.